



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 :
Samar GHORBAL et Ahlem GUENDIR

Le : dimanche 4 juillet 2021

Mutation des gènes de réparation XRCC1/2 et XRCC3 et cancer de sein chez la population Algérienne

Jury :

Mme. MEDOUR A	MCA	Université de Biskra	Président
Mme. ACHOUR H	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
M. DEHIMAT A.	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2020-2021

Remerciements

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la force et la capacité d'entamer et de terminer ce mémoire qui fait notre fierté.

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Mme. ACHOUR HANANE**, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

Nos remerciement s'adresse également à tous nos professeurs et les membre de jury ,chacun de son nom, pour leurs générosités dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Dédicace

Je tiens c'est avec un grand plaisir que je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents ;

Ghorbal Djamel et Laadjel Hafida

C'est grâce à vos efforts et votre soutien que j'ai pu tracer mon chemin, ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma chère sœur Imene ;

qui m'a donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance tout au long de ma vie .

A mes deux frères Mouhamed Akram et Abed Raouf ;

Que dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur .

*A tous les membres de famille et toute personne qui porte le nom **GHORBAL** et **LAADJAL** et surtout mes cousines **KHOLOUD, OUMAIMA** et **HADJER** .*

A mon cher binôme AHLEM ;

pour son soutien moral, et sa compréhension tout au long de ce projet .

A tous mes amis (es) ;

***DIDA, IMENE, HIBA, SALSABIL, FADIA, IKRAM, DJAWIDA, FATMA**. Pour les liens forts d'amitié qui nous unissent et les meilleurs moments que nous avons passé ensemble.*

A vous tous et à tous ceux que j'ai pu oublier : Merci

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A ma famille ;

*Elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis
aujourd'hui particulièrement :*

A mes parents (aicha saoud et Mohammed ghendir) ;

*Pour le gout à l'effort qu'il a suscité en moi, de par sa rigueur pour leur prière tout au
long de mes études.*

A mon grand-mère ;

ceci est profond gratitude pour ton éternel Amor.

*A mes chers frères (tdjani, Bachir, Akram, Youcef...) et sœurs qui m'avez toujours
soutenu et encouragé durant ces années d'étude.*

A tout ma famille GHENDIR et SAOUD ;

Pour leurs soutiens tout au long de mon parcours universitaire.

A tous mes amis, et ensemble des étudiants de la promotion ;

Merci d'être toujours là pour moi.

Table de matières

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

PREMIERE PARTIE SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1: Le cancer du sein

1.1. La glande mammaire -----	3
1.1.1. Rappel anatomique du sein -----	3
1.2. Le cancer du sein-----	4
1.2.1. Définition du cancer du sein -----	4
1.3. Les facteurs de risque-----	4
1.5. Quelque gène de la prédisposition héréditaire au cancer du sein -----	6
1.5.1. Les Oncogènes -----	6
1.5.1.1. L'oncogène HER2 -----	7
1.5.2. Gènes suppresseurs -----	7

Chapitre 2 : Les gènes XRCC1/2 et 3

2.1. Le gène XRCC1 -----	11
2.1.2. Polymorphisme XRCC1-----	12
2.2. Le gène XRCC2-----	13
2.2.1. Polymorphismes XRCC2 -----	14
2.3. Gène XRCC3 -----	15
2.3.1. La protéine du gène XRCC3-----	16
2.3.2. Polymorphisme XRCC3-----	16

DEUXIEME PARTIE PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

3.1. Matériel biologique -----	18
--------------------------------	----

3.2. Méthodes-----	20
3.2.1. Préparation des échantillons -----	20
3.2.1.1. Extraction d'ADN génomique -----	22
3.2.1.2. L'amplification de l'ADN extrait par la PCR □ -----	23
3.2.1.3. Visualisation des fragments amplifiés -----	27
3.2.2. Méthode d'identification des polymorphismes -----	27

Chapitre 4 : Résultats et discussions

4.1. Résultats-----	31
4.1.1. Profil des produits PCR obtenus-----	31
4.1.2. Profil de Digestion des produits de PCR par les endonucléases de restrictions appropriées -----	31
4.1.3. Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme R188H et T241M -----	34
4.2. Discussion -----	39
4.2.1. Discussion analytique-----	39
4.2.1.1. L'échantillon d'étude -----	39
4.2.1.2. Protocole d'extraction de l'ADN -----	40
4.2.1.3. Détermination de la concentration et la pureté d'ADN -----	40
4.2.1.4. Méthode d'identification des polymorphismes des gènes -----	41
4.2.2. Discussion des résultats -----	41
Conclusion.....	46
Références bibliographiques-----	47
Annexes	
Résumé	

Liste des Tableaux

Tableau 1.Représentation des différents facteurs de risque du développement du cancer du sein féminin.....	5
Tableau 2.Ensemble d'information relative à l'identification du gène XRCC1.....	12
Tableau 3.Description du polymorphisme XRCC1	13
Tableau 4. Ensemble d'information relatives à l'identification du gène XRCC2.....	14
Tableau 5. Description du polymorphisme XRCC2	15
Tableau 6. Ensemble de l'information relative à l'identification du gène XRCC3.	16
Tableau 7. Description du polymorphisme	17
Tableau 8. Les caractéristiques des échantillons étudiés.....	19
Tableau 9. Les caractéristique des échantillons étudiés.	20
Tableau 10. Programme d'amplification par PCR des séquences cibles contenant les codons étudiés.....	24
Tableau 11. Amorces sens et antisens utilisées pour l'amplification par PCR de différentes séquences cibles de gènes XRCC1, XRCC2, XRCC3	26
Tableau 12. Site de reconnaissance et de clivage ainsi que la température spécifiques pour chaque enzyme utilisée.....	29
Tableau 13. Distribution des génotypes (fréquence génotypique) des polymorphismes : XRCC2 R188H dans les échantillons analysés.....	34
Tableau 14. Distribution des génotypes des polymorphismes XRCC3 T241M dans les échantillons analysés.	35
Tableau 15. Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme des genes XRCC2(R188H) et XRCC3(T241M).....	35
Tableau 16. Distribution des génotypes du polymorphisme XRCC2 chez les patients de TNBC et contrôle.	36
Tableau 17. Distribution des génotypes du polymorphisme XRCC3 chez les patients de TNBC et contrôle.....	37
Tableau 18. Distribution des génotypes (fréquence génotypique) des polymorphismes : XRCC2 R188H ,XRCC3 T241M dans les échantillons analysés.....	38
Tableau 19. Distrubition des fréquence allélique des polymorphisme XRCC1 (R280H), XRCC2 (R188H), XRCC3 (T241M).	38
Tableau 20. Les avantages et les inconvénients de l'utilisation des tissus inclus dans des blocs de paraffine.	40

Liste des Figures

Figure 1. Coupe sagittal d'un sein	3
Figure 2. Ganglions lymphatique du sein (Jahanmohan, 2019).....	4
Figure 3. Protocole de l'extraction de l'ADN selon (Pikor <i>et al.</i> , 2011).	22
Figure 4. Illustration des étapes de PCR-RFLP pour l'étude des polymorphismes. 1 : Extraction de l'ADN a partir des cellules humaine ; 2 : Amplification d'un fragment d'intérêt ; 3 : digestion du fragment amplifié PCR par des enzymes de restriction spécifique, 4 : séparation des fragments par électrophorèse après la digestion enzymatique.	28
Figure 5. Analyse des produits PCR obtenus après électrophorèse sur gel d'agarose à 2% et coloration au BET suivie d'une visualisation sous UV.....	31
Figure 6. Profil électrophorétique des produits de PCR digérés par les endonucléases de restrictions appropriées, puis séparés sur un gel d'agarose à 3,5% après coloration au BET et visualisation sous UV.....	32
Figure 7. Profil électrophorétique des produits de PCR (290 pb sur l'exon 3 du gène XRCC2) et de leurs produits de digestion, séparés sur un gel d'agarose à 3,5%, après coloration au BET et visualisation sous UV.....	33
Figure 8. Profil électrophorétique des produits de PCR (211 pb sur l'exon 7 du gène XRCC3) et de leurs produits de digestion, séparés sur un gel d'agarose à 3,5%, après coloration au BET et visualisation sous UV.....	34
Figure 9. Présentation des séquences PCR prévues amplifiées par la PCR <i>in silico</i> qui ont été lancées en-ligne par les deux couples d'amorce des gènes XRCC2.	42
Figure 10. Présentation des séquences PCR prévues amplifiées par la PCR <i>in silico</i> qui ont été lancées en ligne par les deux couples d'amorce des gènes XRCC3.....	42
Figure 11. Présentation des séquences PCR prévues amplifiées par la PCR <i>in silico</i> qui ont été lancées en ligne par les deux couples d'amorce des gènes XRCC3 T241M.	43
Figure 12. Présentation des séquences PCR prévues amplifiées par la PCR <i>in silico</i> qui ont été lancées en ligne à partir de (http://genome.ucsc.edu).....	44

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
APE1: Endonucléases napuriques-apyrimidique
ATP: Adénosine triphosphate
Arg :Arginine
BRCA1: Breast cancer 1
BRCA2: Breast cancer 2
BER: Base excision repair
BET: Bromure d'éthiduim
cSNP: Coding single nucleotide polymorphism.
D: Double-strand Break Repair.
EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique.
ERBB2: Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
HER2: Humain epidermal growth factor receptor 2
HRR: homologue recombaintion repair. His : Histidine
IDs : Identification dans les diffèrent bases de données
Kb: kilo base
KDa: kilo Dalton
NCBI: National Center for Biotechnology Information
Nacl: chlorume de sodium
nd : non determine
Min : minute
mM :milimolaire
Met : Méthionine.
OMS : Organisation mondiale de la santé
OGG1 : Oxo guanine glycosylase
OR: Odds Ratio
PBS: Phosphate Buffered saline.
Pb : paire de base.
PCNA: Proliferating cell nuclear agent
PCR: Polymorphism chain Reaction
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
SNP: Simple Nucleotide Polymorphism

Sec : Second

TP53: Tumor protein 53.

TNBC: Triple-Negative Breast Cancer.

Tm : Melting Temperature

Thr : Thréonine

TAE: Tampon Tris Acetate EDTA

XRCC1: X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1.

XRCC2: X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2.

XRCC3: X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3.

°C : celsius.

y % : pourcentage

ul : microlitre

INTRODUCTION

Introduction

Le terme cancer recouvre l'ensemble de maladies caractérisées par la prolifération rapide des cellules anormales capables d'échapper à une mort cellulaire programmée. Ces cellules peuvent se propager de l'emplacement où elles ont pris naissance jusqu'à d'autres parties de l'organisme.

Le cancer du sein est une tumeur maligne de la glande mammaire qui se développe au dépend de la glande mammaire (Bassowa *et al.*, 2018).

De nos jours le cancer du sein constitue un problème de santé publique tant dans les pays développés que dans les pays en développement. En Algérie, le cancer du sein est le premier cancer chez les femmes avec 9000 nouveaux cas par an, la majorité sont découverts à un stade localement avancé. (chimiothérapie adjuvante associée à l'acide zolédronique dans le cancer du sein localement avancé (Sakhri, 2015).

Les cellules tumorales sont généralement caractérisées par une déficience dans une des voies de réparation des lésions d'ADN. La mutation hautement pénétrée dans les gènes de réparation des cassures double brin est régulée essentiellement par les produits des gènes XRCC2 et XRCC3 (Boukhari, 2014). Il est devenu incontournable de développer des outils performants pour l'investigation d'étude de polymorphismes génétiques de type SNP « Single Nucléotide Polymorphisme » pour comprendre et expliquer les associations observées avec le risque de cancer du sein et la mutation des gènes de réparation.

Dans ce travail, nous allons essayer d'exposer des recherches consistant à explorer des polymorphismes de type SNP des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, qui sont le SNP du gène XRCC2 (P.Arg188His ,rs3218536) et du gène XRCC3(p.Thr241Met ,rs 861539). Notre étude vise à estimer la possible corrélation entre les polymorphismes des gènes de réparation XRCC2 et XRCC3 et le risque de cancer du sein.

Notre manuscrit est divisé en deux parties :

La première partie évoquera un rappel anatomique du sein, la notion de cancer du sein, les données épidémiologiques du cancer du sein et les gènes clés de la réparation d'ADN.

La deuxième partie va présenter le matériel et les méthodes appliqués pour établir la relation entre les différents polymorphismes des gènes XRCC2 et XRCC3 et le risque de cancer du sein chez les femmes Algériennes. Dont le résultat de cette étude va être comparé avec les résultats des différentes populations : polonaises ; finlandaise ; chypriotes.

Nous terminerons par une conclusion générale avec des perspectives proposées.

Première partie

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Le cancer du sein

1.1. La glande mammaire

1.1.1. Rappel anatomique du sein

De nos jours, en raison du développement rapide de la science et de la technologie, l'anatomie du sein est mieux connue et plus précise. On décrit la glande mammaire comme une glande exocrine, paire et lobulée, de morphologie très variable selon le sexe et le stade de la vie génitale. Chez la femme, elle se développe dès le début de la puberté et constitue une masse de tissu glandulaire de forme grossièrement circulaire située à la face antérieure de la partie externe du muscle grand pectoral (La figure 1) (Lecarpentier, 2012).

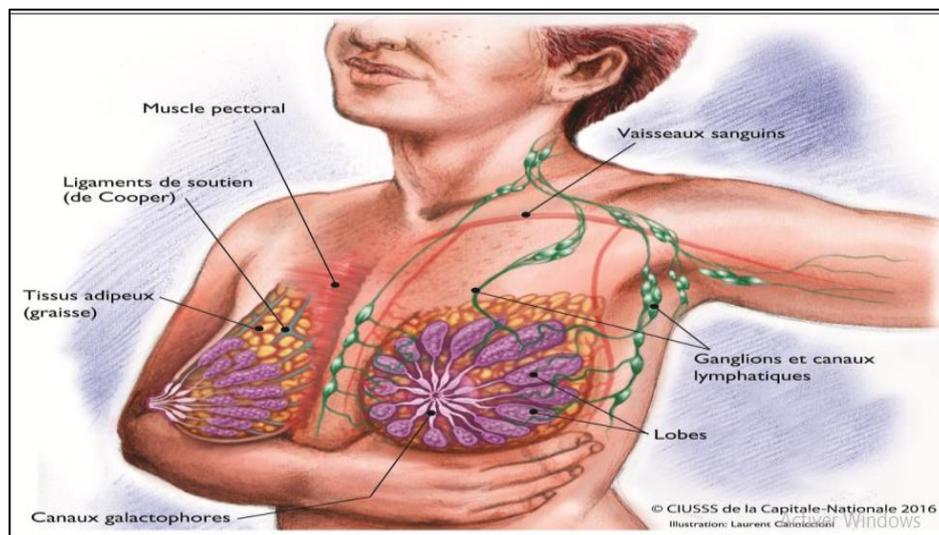


Figure 1.Coupe sagittal d'un sein

([https://www.google.com/search?q=\(CANCER+DU+SEIN+CHEZ+LA+FEMME\)](https://www.google.com/search?q=(CANCER+DU+SEIN+CHEZ+LA+FEMME))).

Elle est divisée en 15 à 20 lobes, qui sont séparés entre eux par du tissu graisseux et des bandes de tissu conjonctif, appelées ligaments de Cooper, qui contribuent au soutien du sein, avec la peau. Les lobes, sont quant à eux subdivisés en lobules et alvéoles (élément synthétiseur et sécréteur de lait). Les alvéoles sont groupés autour de canaux alvéolaires qui aboutissent à un canal lobulaire drainant un lobule. Plusieurs canaux lobulaires forment un canal galactophore qui s'abouche dans un conduit lactifère. L'ensemble des lobules drainés par un conduit lactifère forme un lobe glandulaire. Les conduits lactifères convergent pour s'ouvrir au sommet du mamelon (Lecarpentier, 2012).

Le sein est également parcouru par des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Les ganglions lymphatiques situés au niveau de l'aisselle (ganglions axillaires), de la clavicule (ganglions sus- et sous-claviculaires) et du thorax (ganglions mammaires internes) participent également au drainage lymphatique du sein qui a pour but de combattre les infections (Jahanmohan, 2019).



Figure 2. Ganglions lymphatique du sein (Jahanmohan, 2019).

1.2. Le cancer du sein

1.2.1. Définition du cancer du sein

La notion «cancer du sein» fait partie d'une nomenclature générique faisant référence à une série de proliférations néoplasiques de la glande mammaire qui diffèrent à la fois dans le comportement histologique et évolutif. 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. (Hachana, 2009). Il peut s'agir d'un carcinome développé aux dépens de l'épithélium des canaux galactophore et des lobules.

Il y a deux formes typiques de cancer du sein :

La forme lobulaire développée aux dépens des canaux galactophores intralobulaire : c'est la forme la moins fréquente

- La forme canalaire développée aux dépens du reste de la structure galactophorique : c'est la forme la plus fréquente (Traoré, 2008).

1.3. Les facteurs de risque

Le cancer du sein comme tout autre cancer est une maladie multifactorielle. On parle alors de facteurs de risques. Ces derniers peuvent être intrinsèques, c'est-à-dire, propres à l'individu (sexe, âge, hérédité génétique, etc.) et qui ne peuvent être modifiés. Il existe

également des facteurs de risques extrinsèques (environnement, mode de vie) (Tableau 1) sur lesquels on peut parfois avoir une action pour diminuer le risque de survenu du cancer (Jahanmohan, 2019).

Tableau 1. Représentation des différents facteurs de risque du développement du cancer du sein féminin.

Facteurs de risques intrinsèques			Facteurs de risques extrinsèques	Facteurs hormonaux
Histoire familiale et mutations génétiques	Âge	Le sexe	Facteurs de risque environnementaux	Le rôle des hormones ovariennes dans le développement du cancer du sein. De nombreux facteurs de risque sont bien connus influencent la durée de l'exposition de la femme à ces hormones au cours de sa vie, en particulier durant sa période reproductive.
Le risque relatif pour toute forme de parenté est d'environ 1,9 et l'excès de risque est plus marqué chez les femmes plus jeunes. Les femmes porteuses des mutations sur les gènes BRCA1/2 présentent un risque accru de cancer du sein dépasse 80 % pour les femmes et 6 % pour les hommes. (Nkondjock et Ghadirian, 2005)	le facteur de risque le plus important vis-à-vis du cancer du sein. Le risque augmente entre 50 et 75 ans (près des deux tiers des cancers du sein). (Nkondjock et Ghadirian, 2005)	Être une femme est un facteur de risque principal d'apparition d'un cancer du sein. Il est également observé chez des hommes mais à un pourcentage faible (1%) par rapport aux femmes (Bicar, 2018)	Le rôle de l'irradiation a été prouvé par les explosions atomiques d'Hiroshima, ainsi que les expositions professionnelles aux polluants environnementaux et les agents chimiques - La consommation d'alcool et de tabac augmente le risque de 200%. (Bicar, 2018)	(Desjardins, 2010)

1.4. Données épidémiologique du cancer du sein en Algérie

Le cancer du sein chez la femme situé dans le premier rang en termes d'incidence et de mortalité dans le monde, notamment en Algérie (Badidi, 2012). Cette forte tendance est due à une transition épidémiologique 7500 cas de cancer du sein sont enregistrés avec environ 3500 décès enregistrés chaque année. Le taux d'incidence varient selon les registres des cancers, celui d'Alger a enregistré une incidence standardisé de 69.7/100000 femmes en 2014 (Hamdi-Cherif *et al.*, 2014).

1.5. Quelque gène de la prédisposition héréditaire au cancer du sein

5 à 10% des cancers du sein sont héréditaires mais parmi ceux-ci seulement la moitié est expliquée par une altération constitutionnelle d'un gène de prédisposition connu tels que les gènes BRCA1 et BRCA2 (Bubien, 2016). Se transmettent sur un mode autosomique. (Bonadona et Lasset, 2003).

Les gènes *BRCA1/2* ont été décrits respectivement en 1994 et 1995. Ils sont localisés sur deux chromosomes différents et ne partagent qu'une faible homologie structurale. Le *BRCA1* se trouve sur le chromosome 17, position 21 de la grande sous-unité (17q21). Il intervient dans de nombreux processus cellulaires, tels que la prolifération, la régulation de la transcription et la réparation de l'ADN en réponse aux dommages (Portier, 2017). Tandis que le gène *BRCA2* situé sur le chromosome 13 dans la région q12-13 (Lecaignec, 2020). S'étend sur environ 70 kb et code pour une protéine de 3418 acides aminés. (Zoure, 2017).

Les femmes porteuses d'une mutation de *BRCA1* ou *BRCA2* ont 50 à 80% de risques de développer un cancer du sein au cours de leur vie. En plus d'avoir un risque plus élevé de développer un cancer du sein, l'âge médian de survenue est plus précoce pour les patientes porteuses d'une mutation puisqu'il est de 40 ans pour *BRCA1* et de 43 ans pour *BRCA2* (Portier, 2017).

Les protéines nucléaires *BRCA1* et *BRCA2* sont multifonctionnelles, impliquées entre autres dans la réparation des dommages de l'ADN (mécanisme de recombinaison homologue) et le maintien de l'intégrité du génome, mais à des étapes différentes (Zoure, 2017).

1.5.1. Les Oncogènes

Sont des formes altérées de gènes normaux d'origine cellulaire (). Ces gènes sont responsable du contrôle de la prolifération cellulaire selon un mode d'altération dominant (Nait behloul, 2018). Les proto-oncogènes sont conservés dans toutes les espèces et jouent un

rôle primordiale dans des étapes de la régulation de l'embryogénèse ou de la croissance cellulaire ou tissulaire (Fatscher, 2013).

L'activation des proto-oncogènes en oncogène se fait à la suite d'anomalies au niveau des gènes (mutation, translocation, amplification...). L'amplification génétique est le mode d'altération le plus courant dans le cancer du sein. Plusieurs gènes ont été identifiés comme étant les zones les plus amplifiées dans les cancers du sein (Bicar, 2018).

1.5.1.1. L'oncogène HER2

La dénomination internationale officielle du gène *HER2* est *ERBB2*. Le produit de l'oncogène *HER2* est une glycoprotéine transmembranaire de la famille des récepteurs de type I des facteurs de croissance. Elle est composée de 1 255 acides aminés et pèse 185 kDa (Franchet, 2016). le statut de HER2 permet de classer une tumeur en fonction de son agressivité (les cancers à HER2 positif sont plus agressifs que celles qui sont à HER2 négatif) et de déterminer le traitement le plus approprié (Bicar, 2018).

1.5.1.2. Le gène c-myc

Ce gène joue le rôle de régulateur de la différenciation et de la prolifération cellulaire. Il subit souvent des anomalies et entraîne l'apparition de cancer dans les tumeurs du sein varient de 6 à 40%. (Bicar, 2018).

1.5.2. Gènes suppresseurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs au contraire des oncogènes, ont une action négative sur la prolifération cellulaire. Leur mode de fonctionnement est récessif au niveau cellulaire: c'est-à-dire que, pour que le cancer apparaisse, les deux allèles d'un même antioncogène doivent être inactivés pour qu'il perde sa fonction inhibitrice (Moghtit, 2014).

Le premier gène suppresseur de tumeur décrit est le gène Rb du rétinoblastome. Le gène suppresseur de tumeur le plus souvent impliqué est la TP53, avec des mutations somatiques dans de très nombreux cancers (Maatoug, 2019).

Chapitre 2 : Les gènes XRCC1 / 2 et 3

2.1. Le gène XRCC1

Le gène humain XRCC1 se trouve sur le bras long du chromosome 19 en position 13.3; 19q13.3 (Tableau2)) (Alanazi *et al.*, 2013). Il s'étend sur 33Kb et est contient 17 exons. Ce gène code une protéine de 70 kDa qui se compose de 633 acides aminés (Naguib *et al.*, 2020).

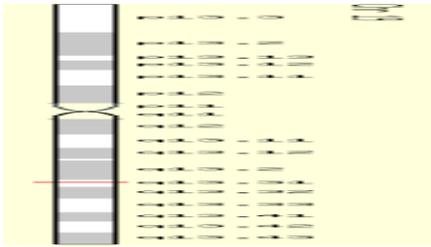
Il a été identifié en raison de sa capacité à restaurer l'activité de réparation de l'ADN dans une lignée cellulaire mutante (Moghtit, 2014).

2.1.1. La protéine du gène XRCC1

La protéine XRCC1 est dépourvue d'activité enzymatique propre (Lévy, 2007). Cette protéine comporte différents domaines structuraux et fonctionnels qui lui permettent d'organiser les différentes étapes de la réparation par excision de base (BER) (Moghtit, 2014).

Cette voie de réparation requiert initialement la détection de la base endommagée par une ADN glycosylase spécifique ,qui clive ensuite la liaison N_glycosidique reliant la base au squelette sucre-phosphate de l'ADN générant ainsi un site abasique (site apurique ou apyrimidique). (Lévy, 2007).

Tableau 2. Ensemble d'information relative à l'identification du gène XRCC1. ^{(1) (2)}

Nom officiel		Localisation
X-Ray Repair Complementing Defective Repair In Chinese Hamster Cells 1		Chromosome : 19 Localisation : 19q13.3
Symbole officiel	Symbole synonyme	
XRCC1	RCC	
Identification (IDs) dans les différentes bases de données		
Ensembl MIM HGNC NCBI Entrez Gene	ENSG00000073050 194360 12828 7515	

2.1.2. Polymorphisme XRCC1

Les rôles multiples de XRCC1 dans la réparation de l'ADN font de cette protéine un acteur majeur du maintien de l'intégrité du génome (Lévy, 2007).

Il 'ya des études qui met en évidence sur l'analyse des polymorphismes XRCC1 représenté essentiellement par SNPs. Parmi les SNP les plus étudiés chez l'homme : le SNP codon.580 C>T et le SNP codon.839 G>A et le SNP codon.1196G>A (Moghtit, 2014).

Tableau 3.Description du polymorphisme XRCC1 (Moghtit, 2014).

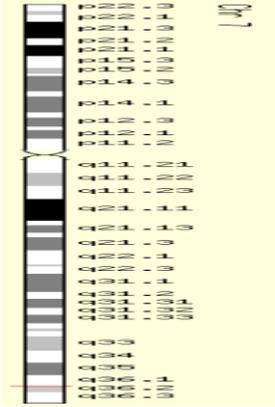
Gène	Polymorphisme	Localisation	Point de mutation	Référence l'SNP rs	Changement dans la séquence protéique
XRCC1	Le SNP R194W Arg149trp	Domaine N terminal de la protéine XRCC1 au niveau des zones d'interaction avec de protéine PCNA ,OGG1,APE1	Transition d'une arginine chargé positivement en un tryptophane hydrophobe	Rs1799782	favorise l'interaction avec certains partenaires de XRCC1 au cours de la réparation de l'ADN

2.2. Le gène XRCC2

Le gène XRCC2 est parmi l'un des cinq paralogues RAD51 somatiques, qui ont tous des motifs Walker A et B ATPase (Blanca, 2008).

Il situé sur le bras long (q) du chromosome 7, position 36.1 (Tableau 4) (Curtin *et al.*, 2009). Est un médiateur essentiel de la voie de réparation par recombinaison homologue. (Bashir *et al.*, 2014). Et un candidat fonctionnel pour l'implication dans la progression du cancer (Tahari *et al.*, 2013). La protéine XRCC2 parmi les protéines qui vont permettre la digestion partielle des deux extrémités 5' de la cassure afin de générer deux extrémités 3' (Moghtit, 2014).

Tableau 4. Ensemble d'information relatives à l'identification du gène XRCC2.^{(1) (2)}

Nom officiel		Localisation
x-ray repair complementing defective repair in chinese hamster cells 2		chromosome:7 localisation :7q36.1
symbole officiel	symboles synonymes	
xrcc2	/	
Identification (ids) dans les différentes bases de données		
Ensembl	00000196584	
OMIM	600375	
HGNC	12829	
NCBI Entrez Gene	7516	

2.2.1. Polymorphismes XRCC2

La mutation biallélique de XRCC2 (FANCU) provoque le sous-type FA-U de FA, tandis que l'hétérozygotie pour les mutations délétères de XRCC2 peut être associée à un risque accru de cancer du sein. Les cellules déficientes en XRCC2 montrent une réduction de plus de 100 fois du HRR par rapport aux cellules compétentes XRCC2 et démontrent diverses formes d'instabilité chromosomique souvent décrit dans le cancer du sein (Lin *et al.*, 2011).

Les cellules déficientes en XRCC2 montrent une réduction de plus de 100 fois du HRR par rapport aux cellules compétentes XRCC2 et démontrent diverses formes d'instabilité chromosomique souvent décrit dans le cancer du sein.

Tableau 5. Description du polymorphisme XRCC2 (Lin *et al.*,2011 ; Boukhari, 2014).

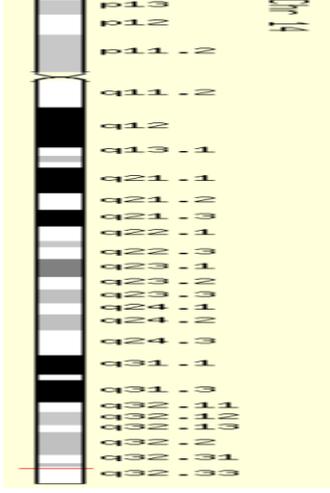
Gène	polymorphisme	Localisation	Point du mutation	Changement dans la séquences protéiques	Référence de l'SNP rs
XRCC2	XRCC2 G31479A R188H	Exon 3 nucléotides 31479,codon: 188	Substitution d'un nucléotide G vers un autre A à la position 31479 du gène XRCC2	Substitution de l'acides aminé Arginine par l'histidine dans la position 188	Rs 3218536

2.3. Gène XRCC3

Le gène *XRCC3* localisé sur le chromosome 14, bras long (q), position 32.3, mesure 18 kb et comprend 10 exons (Tableau 6) (Moghtit, 2014).

Ce gène a été identifié comme un gène capable de compléter la Sensibilité aux dommages à l'ADN et instabilité chromosomique (Saini, 2010).

Tableau 6. Ensemble de l'information relative à l'identification du gène XRCC3. ^{(1) (2)}

Nom officiel		Localisation
X-Ray Repair Complementing Defective Repair In Chinese Hamster Cells 3		Chromosome: 14 Localisation: 14q32.3
Symbole officiel	Symbole synonymes	
XRCC3	CMM6	
Identification (IDs) dans les différentes bases de données		
Ensembl OMIM HGNC NCBI Entrez Gene	00000126215 600675 12830 7517	

2.3.1. La protéine du gène XRCC3

La protéine XRCC3 intervient dans le processus d'initiation de la réparation en formant avec la protéine Rad51 un complexe qui est impliqué dans une étape cruciale de la recombinaison homologue. Elle est caractérisée par la présence des motifs ATPase constitués de Walker A et B, impliqués respectivement dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP (Moghtit, 2014).

2.3.2. Polymorphisme XRCC3

Le polymorphisme de XRCC3 peut être associé à un risque accru du cancer du sein. Il comporte 111 SNP selon la base de données NCBI. Au niveau de l'exon 7 à la position 18067 (rs861539) se trouve le polymorphisme le plus important (Moghtit, 2014).

Tableau 7. Description du polymorphisme (Moghtit, 2014)..

Gène	Localisation de polymorphisme	Point de mutation	Changement dans la séquence protéique	Reference de l'SNP rs
XRCC3	Exon 7 à la position 18067	La substitution de la cytosine (c) par la thymine(T) au niveau du codon 241	Conduit à un changement d'une thréonine (Thr) par une méthionine (Met)	Rs861539

Deuxième partie
Partie expérimentale

Chapitre 3 :

Matériel et méthodes

Dans ce travail, nous avons essayé d'établir une relation entre les différents polymorphismes des gènes XRCC2 et XRCC3 et le risque d'apparition et/ou de développement de cancer du sein chez les femmes Algériennes. C'est pour ça nous avons recherché et analysé toutes les études réalisées sur la population Algérienne, mais malheureusement nous avons trouvé une seule étude qui est de Boukhari (2014) elle a détecté les mutations ponctuelles d'intérêt (XRCC2 R188H, XRCC3 T241M) chez les femmes atteintes un cancer du sein. Dont le résultat de cette étude a été comparé avec les résultats des différentes populations : polonaises ; finlandaise ; chypriotes.

3.1. Matériel biologique

L'équipe de Boukhari (2014) et Smolarz *et al.* (2014) ont utilisé des tissus tumoraux inclus dans des blocs de paraffine. Les caractéristiques des patients sont résumées dans le Tableau 8.

Tableau 8. Les caractéristiques des échantillons étudiés.

	échantillons	Moyen d'âge	Type histologiques	Effectifs
Cas cancéreux	Pour l'étude de Boukhari, (2014) 30 échantillons pathologiques (appartiens aux femmes diagnostiquées pour un cancer du sein)	46 ans	Carcinome canalaire infiltrant Carcinome lobulaire infiltrant	28 02
	Pour l'étude de Smolarz <i>et al.</i> (2014) 70 échantillons Triple négative (TNBC). Taille moyens des tumeurs 20mm	36-68 ans	Carcinome	70
Cas contrôles	Boukhari, (2014), 07 échantillons contrôle négatif	22 ans	Adénofibrome	07
	Smolarz <i>et al.</i> (2014) 70 échantillons ont servi de contrôle	36-68 ans	n.d (non déterminer)	70

L'équipe de Loizidou *et al.* (2008) l'étude a été approuvée par le Comité national de bioéthique de Chypre, sur 2286 femmes qui sont participant à l'étude MASTOS. Cette dernière a réalisé une étude des cas-témoins du cancer du sein à Chypre. Les cas participant à l'étude étaient des femmes diagnostiquées d'un cancer du sein entre janvier 1999 et décembre

2006. Les échantillons d'étude sont du sang prélevé ont été prélevés entre 2004 et 2006 (voir le tableau 9).

Tableau 9. Les caractéristiques des échantillons étudiés.

	Nombre d'échantillons	Moyen d'âge	Diagnostique
Patients	1109 femmes	(40 à70) ans	Cancer du sein
Cas témoins sains	1177 femmes	n.d	Femmes sains

n.d : non déterminer

L'étude de Peltari *et al.* (2015) a été réalisé sur des 1758 femmes finlandaise.

- Dont 182 patientes atteintes d'un cancer du sein pour échantillons ont été utilisé pour détecter anomalie de gène XRCC3 ;
- 342 échantillons pour étude de gène XRCC2 et 1234 cas témoins qui sont des femmes saines.

Les échantillons inclus dans cette étude sont du sang frais. le prélèvement a été réaliser avec l'autorisation du comité d'examen éthique de l'Helsinki. Le prélèvement sanguin préconisé pour l'extraction de l'ADN est recueilli stérilement dans un tube en présence d'EDTA.

3.2. Méthodes

3.2.1. Préparation des échantillons

Boukhari (2014) et Smolarz *et al.* (2014) ont effectué l'extraction d'ADN a partir de tissus mammaires. 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. Mais avant l'extraction, il faut déparaffiner et réhydrater les échantillons selon les étapes suivantes :

- Mettre les échantillons dans des tubes Eppendorf 1,5 ml bien étiquetés, sous forme de sections coupées à partir des blocs de paraffine par un microtome ;
- Sous la hotte, ajoutée de 800 µl de xylène à chaque tube ;
- Mélanger par retournement (15 min) puis Centrifuger à la vitesse maximale 14000 tpm (3 min) ;

- Éliminer de surnageant (paraffine dissous dans le xylène), sans perturber le culot cellulaire et pour éliminer totalement la paraffine, le lavage au xylène est répété 3 fois.

La réhydratation a été réalisée en trois étapes avec l'utilisation des différentes concentrations d'alcool :

- Ajouter de 300 ou 600 µl d'éthanol à 100% à chaque culot cellulaire (selon la taille de culot) ;
- Vortexer puis centrifugé à 14000 rpm pendant 3 min ;
- Éliminer l'éthanol (surnageant), les étapes précédentes ont été répétées avec l'éthanol à 70% puis à 50%.

Pour améliorer le rendement de la lyse cellulaire pendant l'extraction de l'ADN les échantillons contenant une grande quantité de tissus ont été partagés en plusieurs tubes.

REMARQUE : Après l'élimination de l'éthanol à 50%, les culots cellulaires ont été séchés en tubes renversés, à température ambiante (5 min).

Pour l'équipe de Loizidou *et al.* (2008) et Pelttari *et al.* (2015) les échantillons inclus dans ces études sont de sang prélevé. Dont l'extraction d'ADN nécessite d'abord l'élimination des globules rouges par une solution de lyse hypotonique, puis d'un choc thermique dans la glace.

Selon les étapes suivantes :

- Après la centrifugation du sang à 3000rpm/5min, le culot récupéré est lavé 3 fois avec la solution PBS iso-saline formée de tampon phosphate de potassium 10Mm,PH=7,4 et 154ml de NaCl ;
- Chaque lavage consiste en une suspension des cellules dans du PBS Iso-saline et une centrifugation à 3000 rpm/min ;
- Après la dernière centrifugation, le culot est resuspendu à nouveau dans une solution du PBS iso-saline à raison de 1 volume de culot et 9 volume du PBS, permettant ainsi d'obtenir une hématocrite à 10 % (Deflaoui et Ouamara, 2018)

3.2.1.1. Extraction d'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. De très nombreux procédés d'extraction des acides nucléiques ont été décrits, et des kits sont actuellement proposés par un certain nombre d'industriels.

Boukhari (2014) a été choisie la technique classique de salting-Out. Dont l'extraction d'ADN a été effectuée selon le protocole de (Pikor *et al.*, 2011). (Figure 8).

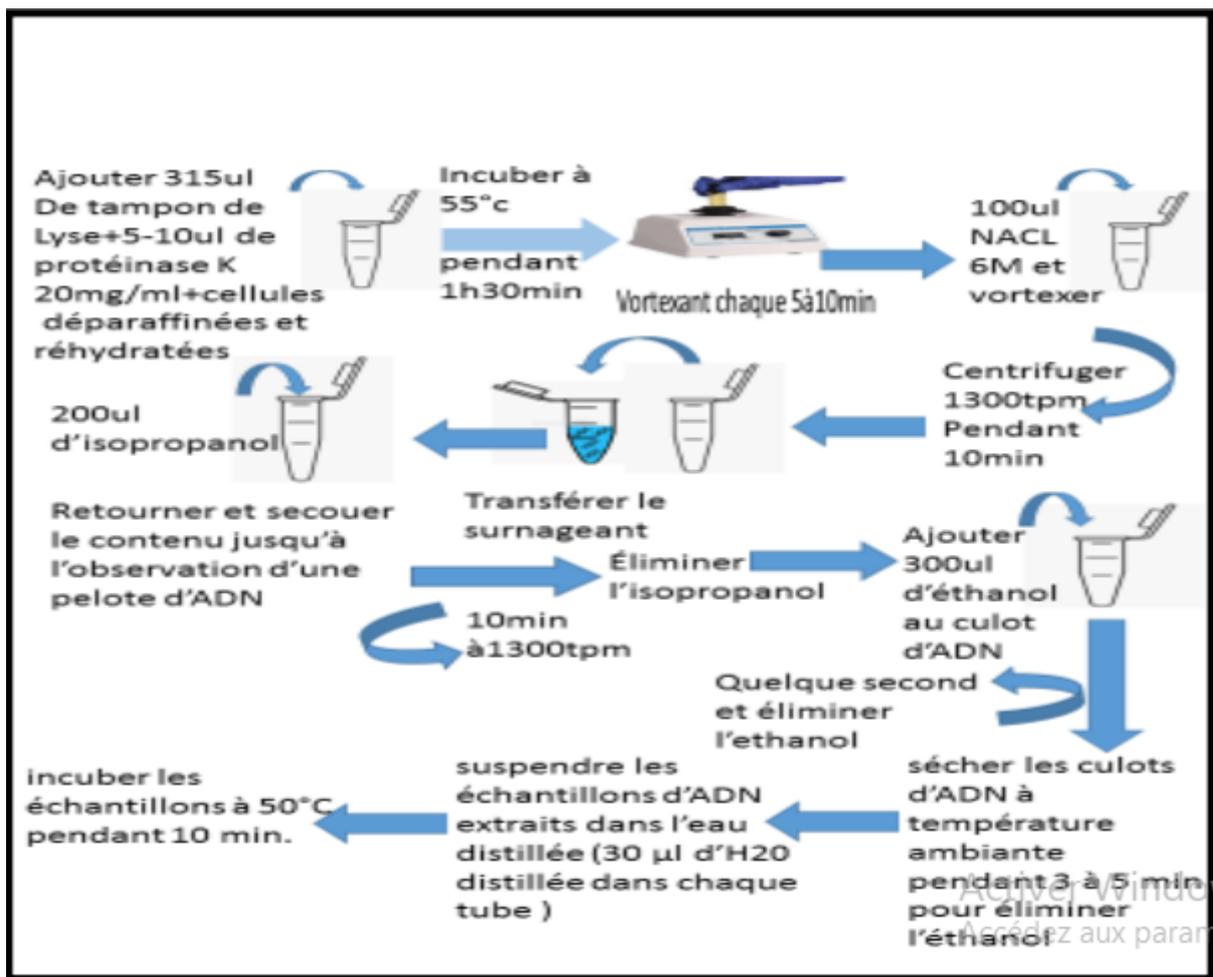


Figure 3. Protocole de l'extraction de l'ADN selon (Pikor *et al.*, 2011).

L'ADN est ensuite quantifié, aliquoté et conservé à -20°C jusqu'à usage ultérieure (courte conservation), ou à -80 pour une conservation durable

- Selon l'équipe de Smolarz *et al.* (2014) l'ADN a été extrait à l'aide d'un kit QI Amp (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) par différentes étapes : (Users/INFO-

PUB/Downloads/HB-0329-004-1102728-HB-QIAamp-DNA-Mini-Blood-Mini-0516-WW.pdf)

- Ajouter de 20ul de protéinase K, vortexer puis incuber à 56°C (pour disposer l'échantillon peut vortexer pendant l'incubation ou placer dans un bain-marie agité ou sur une plate forme à bascule) ;
- centrifuger brièvement les tubes de microcentrifugation (1,5ml) ;
- Si l'ADN génomique sans ARN, ajouter 4ul de l'ARNase A (100mg/ml), vortex pendant 15s et incuber pendant 2 min à température (15-25°C).
Puis centrifuger brièvement les tubes pour éliminer les gouttes de l'intérieur du couvercle avant d'ajouter 200ul de tampon AL à l'échantillon ;
- Enfin mélanger au niveau par pulse-vortex pendant 15s et incuber à 70°C pendant 10min et centrifuger les tubes de microcentrifugation pour éliminer les gouttes de l'intérieur du couvercle ;
- Ajouter 200ul d'éthanol (96-100%) à l'échantillon et mélanger par pulse-vortex (15s) ; puis centrifuger les tubes pour éliminer les gouttes de l'intérieur du couvercle ;
- centrifuger à 8000 rpm (1min) et placer le QIAamp Mini spin colonne dans un tube prélèvement propre de 2ml et rejeter le tube contenant le filtrat ;
- Ouvrir avec précaution la colonne de centrifugation QIAamp Mini ,Ajouter 500ul de tampon AW1 ,fermer le bouchon et centrifuger à 8000rpm pendant 1min. Ensuite placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un tube de prélèvement 2ml et rejeter le tube contenant le filtrat ;
- L'ajouter de 500ul de tampon AW2 et centrifuger à 14000 tr/min pendant 3min ;
- Ajouter 200ul de tampon AE ou eau distillée puis incuber pendant 1 min et centrifuger à 8000rpm (1 min) ;

L'équipe de Loizidou *et al.* (2008) a effectué l'extraction d'ADN à partir des échantillons de sang par le protocole standard (phénol-chloroforme).

L'étude de Peltari *et al.* (2015) fait extraction d'ADN à partir du sang.

3.2.1.2. L'amplification de l'ADN extrait par la PCR

L'ADN extrait peuvent être amplifiés par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR), afin d'obtenir des produits finaux en quantité suffisante pour détecter les polymorphismes des gènes XRCC2 (R188H) XRCC3 (T241M) et XRCC1 (A194T,A280H ,A399H).

La PCR (polymerase chain reaction) est fondée sur une réaction enzymatique *in vitro* permettant d'amplifier plusieurs millions de fois des séquences d'ADN génomique ou d'ADN complémentaire. Elle nécessite de connaître les séquences des extrémités de la région à amplifier, et de les utiliser pour élaborer des amorces nucléotidiques. Après fixation des amorces sur leurs séquences cibles par complémentarité, la région d'ADN cible est copiée par incorporation de désoxyribonucléotides libres grâce à une enzyme ADN polymérase thermostable.

Des variations cycliques de températures vont permettre successivement la dénaturation de l'ADN, l'hybridation des amorces et leur extension par l'ADN polymérase. La succession des cycles permet une augmentation quasi exponentielle de la quantité d'ADN (Uhel *et al.*, 2019). Les programmes d'amplification par PCR sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 10. Programme d'amplification par PCR des séquences cibles contenant les codons étudiés.

Etude choisie	Phases du programme					Nombre de cycle
	Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Extension	Extension finale	
Boukhari, (2014)	94°C pendant 5min	94°C pendant 30sec	60°C pendant 1min	72°C pendant 1min	72°C pendant 5min	35 cycles
Smolarz <i>et al.</i> , 2014)	94°C pendant 30 sec (pour le gène XRCC2)	94°C pendant 30 sec	60°C pendant 30 sec	72°C pendant 1min	72°C pendant 7min	30 cycles
	94°C pendant 60 sec (pour le gène XRCC3)	56°C pendant 30sec	72°C pendant 40sec	n.d	n.d	30 cycles
(Loizidou <i>et al.</i> , 2008); (Pelttari <i>et al.</i> , 2015)	n.d					

Afin d'obtenir des fragments en quantités suffisantes pour réaliser l'analyse par RFLP, l'équipe de Boukhari (2014) a amplifié des séquences autour des sites des polymorphismes d'intérêt (Tableau 11).

La spécificité des amorces choisies a été préalablement validée dans des études antérieures (Brooks *et al.*, 2008 ; Krupa *et al.*, 2009 ; Akisik *et al.*, 2011 ; Romanowicz-Makowska *et al.*, 2011).

Après l'amplification, la spécificité des amorces a été vérifiée par une migration électrophorétique des produits de PCR en déposant 5 µl de produits amplifiés sur un gel d'agarose à 2%.

Loizidou *et al.* (2008) ont été réalisés la PCR par des amorces spécifiques aux gènes XRCC1, XRCC2 et XRCC3 (Tableau 11) (Hu, 2001).

Smolarz *et al.* (2014) ont été réalisés la PCR par des amorces spécifiques aux gènes XRCC2 et XRCC3.

Tableau 11. Amorces sens et antisens utilisées pour l'amplification par PCR de différentes séquences cibles de gènes XRCC1, XRCC2, XRCC3

Les références	Région	SNP	Région de l'amplification Amorce sens (S) et Anti-Sens (AS) (5'→3')		Taille des fragments amplifié
(Boukhari, 2014)	Gène XRCC2 ;(exon 3)	R188H	S	TGTAGTCACCCATCTCTCTGC	290 pb
			A S	AGTTGCTGCCATGCCTTACA	
	Gène XRCC3; (exon 7)	T241M	S	ATGGCTCGCCTGGTGGTCA	211pb
			A S	CATCCTGGCTAAAAATACG	
(Smolarz <i>et al.</i> , 2014)	XRCC2		S	TGTAGTCACCCATCTCTCTGC	290 pb
			A S	AGTTGCTGCCATGCCTTACA	
	XRCC3		S	GCCTGGTGGTCATCGACTC	522pb
			A S	ACAGGGCTCTGGAAGGCACTGCTCA GCTCACGCACC	
(Loizidou <i>et al.</i> , 2008)	Gène XRCC1	Arg280 His	S	GTCTGAGGGAGGAGGGTCTG	n.d
			A S	CAGAGGAGCTGGGGAAGATC	
	Gène XRCC1	Arg194 Trp ; Arg399 Gln	n.d(non déterminer)		n.d
	Gène XRCC2	Arg188 His	S	CACCCATCTCTCTGCCTTT	n.d
			A S	CCTCTCGACGACTGTGTGAT	
Gène XRCC3	Thr241 Met	n.d			

Une vérification de la spécificité de toutes les amorces dans cette étude a été réalisée *in silico* en utilisant l'outil bioinformatique (voir la partie discussion).

3.2.1.3. Visualisation des fragments amplifiés

Les produits de PCR obtenus sont contrôlés par une électrophorèse sur gel d'agarose (2 %) préalablement préparé en présence du tampon de migration TAE 1X (voir l'annexe 1) plus fréquent utilisé grâce à sa capacité relativement faible s'épuisera pendant une électrophorèse longue le principale avantages potentiel liés à l'utilisation de cette tampon par apport autre tampon est une meilleure séparation de l'ADN.

Dont L' ADN est une macromolécule chargée négativement, de ce fait, elle peut migrer dans un champ électrique de la cathode (-) vers l'anode (+) dans le tampon de migration (TAE 1X). Les échantillons sont mélangés au bleu de bromophénol, colorant qui possède une masse moléculaire faible et qui permet de détecter le front de migration.

La visualisation des produits amplifiés a été réalisée sous U.V à la suite d'une coloration au BET. Le BET (Bromure d'éthidium), agent intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice cette molécule est fluorescente sous UV et permet de détecter les fragments d'acide nucléiques.

Le résultat est concrétisé par une prise de photo du gel contenant les bandes visualisées

3.2.2. Méthode d'identification des polymorphismes

PCR-RFLP (Polymorphism chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism)

La PCR permet d'amplifier une région définie des gènes (XRCC1 ;XRCC2 ;XRCC3) .Les produits de PCR ont été soumis à une digestion enzymatique (RFLP) par des enzymes de restriction spécifique avec un Site de reconnaissance et température de restriction bien choisis pour chaque enzyme utilisée (Tableau 12). Lorsqu' une mutation est introduite dans la séquence de l'ADN, il peut y avoir création ou perte d'un site reconnu par une enzyme de restriction. Cette non-coupure de l'ADN est détectée par une variation du nombre et de la longueur des fragments d'ADN (fragments de restriction) obtenus après digestion enzymatique, et séparation par électrophorèse.

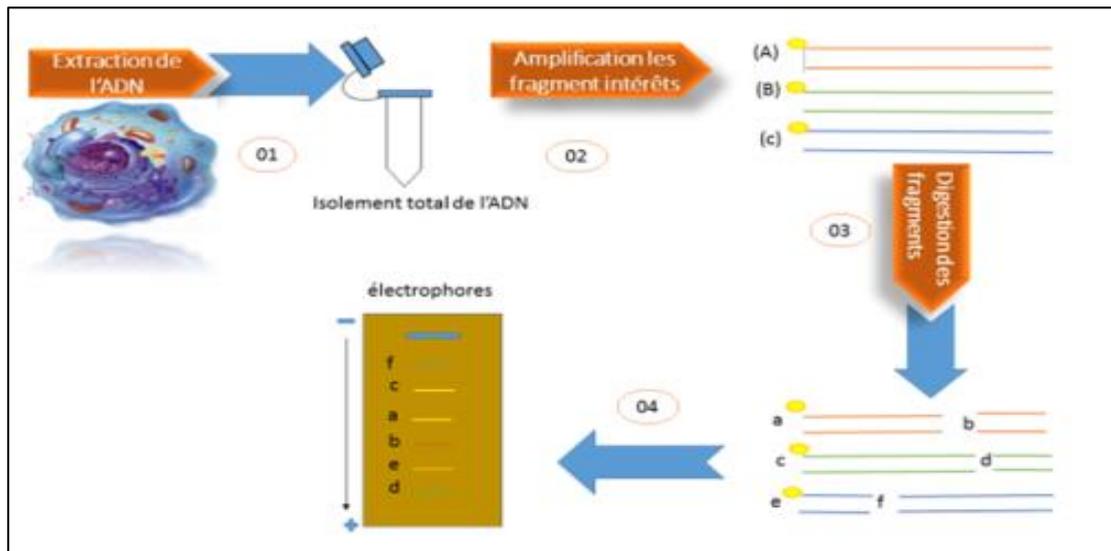


Figure 4. Illustration des étapes de PCR-RFLP pour l'étude des polymorphismes.

1 : Extraction de l'ADN a partir des cellules humaine ; 2 : Amplification d'un fragment d'intérêt ; 3 : digestion du fragment amplifié PCR par des enzymes de restriction spécifique, 4 : séparation des fragments par électrophorèse après la digestion enzymatique.

Tableau 12. Site de reconnaissance et de clivage ainsi que la température spécifiques pour chaque enzyme utilisée. ⁽³⁾

Polymorphisme Des gènes	Les etudes realise	Enzyme de restriction	Température de restriction	Fragment obtenue (pb)
Gène XRCC2 (R188H)	(Smolarz <i>et al.</i> , 2014) ; (Boukharai, 2014)	<i>HphI</i>	37°C	Allèle sauvage : 290 Allèle muté : 142+148
	(Peltari <i>et al.</i> , 2015)	<i>SexAI</i>	37°C	n. d
	(Loizidou <i>et al.</i> , 2008)	n. d	n. d	n. d
Gène XRCC3 (T214M)	(Boukari, 2014)	<i>NlaIII</i>	37°C	Allèle sauvage : 211 Allèle muté : 103+108
	(Smolarz <i>et al.</i> , 2014)	<i>NlaIII</i>	37°C	Allèlesauvage: 239+313 bp Allèlemute: 105+208+239Pb
	(Peltari <i>et al.</i> , 2015)	n. d	n. d	n. d
	(Loizidou <i>et al.</i> , 2008)	n. d	n. d	n. d
Gène XRCC1 (Arg280His)	(Loizidou <i>et al.</i> , 2008)	<i>RsaI</i>	37°C	n. d

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

La concentration en ADN de l'échantillon est estimée par spectrophotométrie. En effet, les acides nucléiques présentent un pic d'absorption dans l'ultraviolet. Le maximum de cette absorption se situe à 260nm. Cette absorption est proportionnelle à la concentration d'ADN, sachant que (Belhadi, 2018).

La pureté d'ADN a été évaluée par mesure du rapport DO260 nm / DO280 nm. Le rapport doit être compris entre (1,8 et 2).

$$\text{La concentration d'ADN} = \text{DO} \times \text{facteur de dilution} \times 50 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

- S'il est $< 1,8$: l'ADN est contaminé par les protéines.
- Et s'il est > 2 : l'ADN est contaminé par les ARNs.

La concentration d'ADN a été calculée et sa pureté a été évaluée pour tous les échantillons inclus dans l'étude.

3.2.4. Visualisation des produits de digestion

Les fragments de restriction ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% pour l'étude de Boukari (2014) et Loizidou *et al.* (2008).

En présence du tampon de migration TAE 1X. La visualisation des produits de digestion a été réalisée sous U.V en présence du BET. Le résultat est concrétisé par une prise de photo du gel contenant les produits colorés.

3.2.5. Séquençage capillaire

Une nouvelle technique qui permet la détection spécifique des mutations, est une méthode spécifique mais souvent à une faible sensibilité (Harlé et Merlin, 2013).

L'équipe de Peltari *et al.* (2015) a recherché les mutations dans les gènes XRCC2 et XRCC3 en utilisant la technique de séquençage capillaire à été purifié par le kit Life Technologies

Chapitre 4 : Résultats et discussions

4.1. Résultats

4.1.1. Profil des produits PCR obtenus

– Population Algérienne

Dans les résultats de groupe Boukhari (2014) les produits d'amplifications ont été, ensuite, soumis à une migration électrophorétique suivie d'une coloration en BET puis visualisation sous UV.

Le profil électrophorétique présenté dans la figure 9 représente les produits des Différentes amplifications des échantillons différents en présence des trois couples D'amorces.

- les puits 4, 5 et 6 : fragments de 290 pb qui portent le site du polymorphisme XRCC2 R188H.
- les puits 7, 8 et 9 : fragments de 211 pb qui portent le site du polymorphisme XRCC3 T241M.

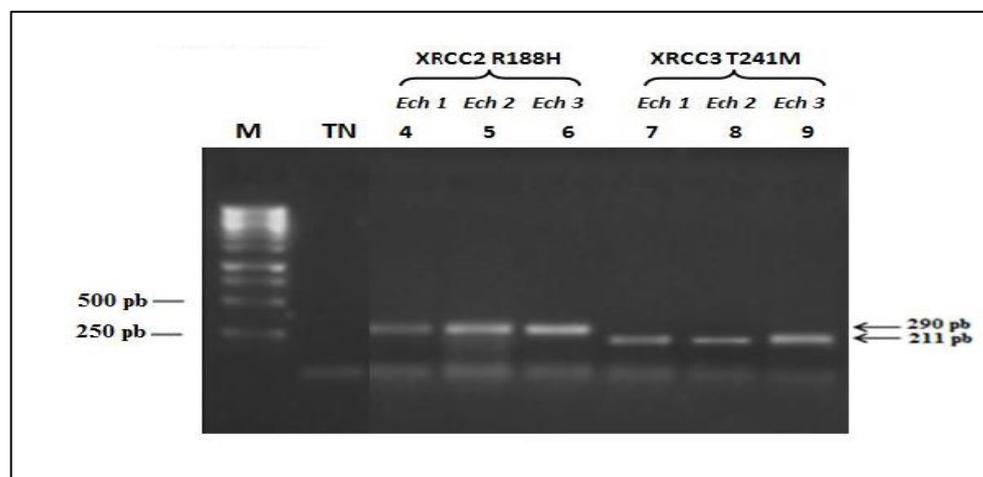


Figure 5. Analyse des produits PCR obtenus après électrophorèse sur gel d'agarose à 2% et coloration au BET suivie d'une visualisation sous UV.

4.1.2. Profil de Digestion des produits de PCR par les endonucléases de restrictions appropriées

Pour Boukhari (2014) Chacun des produits de PCR obtenus des échantillons étudiés a été soumis à une digestion enzymatique par une endonucléase de restriction spécifique, suivie d'une migration électrophorétique des produits de digestion, sur un gel

d'agarose à 3,5% et une coloration au BET, ensuite une visualisation sous Uv (voir la figure 10).

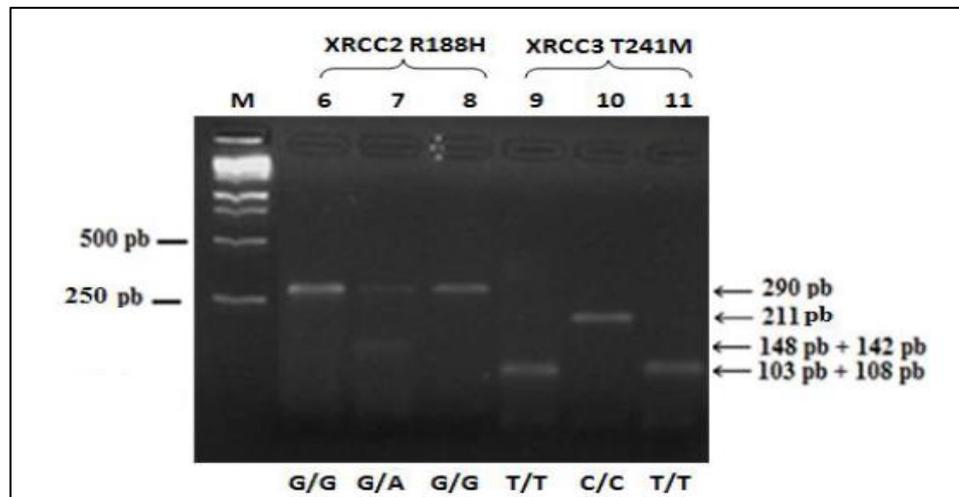


Figure 6. Profil électrophorétique des produits de PCR digérés par les endonucléases de restrictions appropriées, puis séparés sur un gel d'agarose à 3,5% après coloration au BET et visualisation sous UV.

Les puits 6-8 : les produits de digestion des fragments de taille 290 pb qui portent le polymorphisme XRCC2 R188H (G31479A) : G/G (290 pb) et A/A (148 pb + 142 pb).

Les puits 9-11 : les produits de digestion des fragments de taille 211 pb qui portent le polymorphisme XRCC3 T241M (C18067T) : C/C (211 pb) et C/C (108 pb + 103 pb).
M : marqueur de poids moléculaire (1kb, Euromedea).

Le fragment de taille 290 pb du gène XRCC2 a été digéré par l'endonucléase de restriction Hph I. La transition R188H (G31479A) du gène XRCC2, a favorisé l'apparition d'un site de reconnaissance de l'enzyme, et par conséquent, d'une activité enzymatique clivant le fragment amplifié en deux petits fragments de 148 et 142 pb.

Cependant, les échantillons représentant une seule bande sont de type homozygote sauvage G/G. Celles représentant deux bandes de tailles 142 pb et 148 pb sont de type homozygote muté A/A.

Enfin, les échantillons représentant les trois bandes sont de type hétérozygote G/A.

La figure suivante (figure 11 et 12) représente un profil de migration des produits de PCR de taille 290pb couplés avec les produits de leurs digestions enzymatiques, appartenant à 3échantillons différents

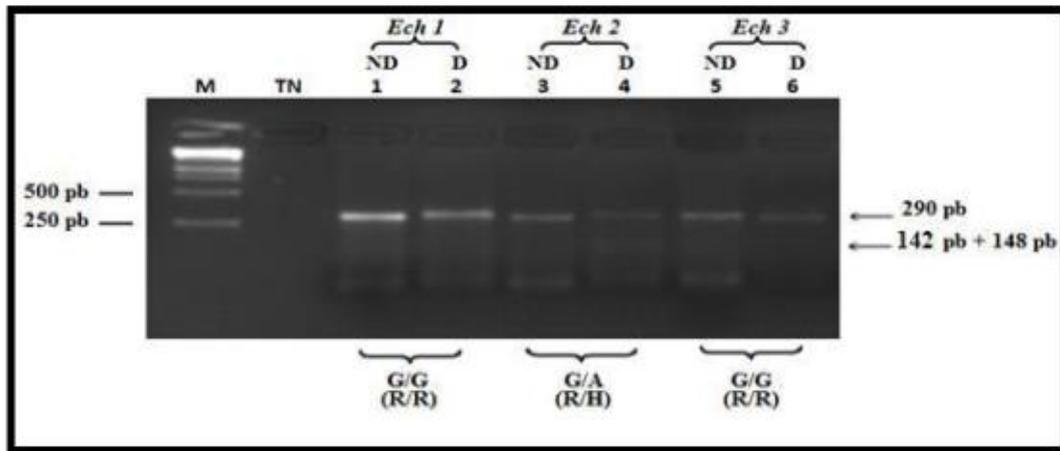


Figure 7. Profil électrophorétique des produits de PCR (290 pb sur l'exon 3 du gène XRCC2) et de leurs produits de digestion, séparés sur un gel d'agarose à 3,5%, après coloration au BET et visualisation sous UV.

- Le fragment de taille 211 pb du gène XRCC3 a été digéré par l'endonucléase de restriction *Nla* III. La transition T241M a favorisé l'apparition d'un site de reconnaissance de l'enzyme, par conséquent, d'une activité enzymatique clivant le fragment amplifié en deux petits fragments de 103 et 108 pb. Alors que, les échantillons représentant une seule bande de type homozygote sauvage C/C. Celles qui représentent deux bandes de tailles 103 pb et 108 pb sont de type homozygote muté T/T, et enfin, les échantillons représentant les trois bandes sont de type hétérozygote C/T.
- Le profil représenté dans la figure suivante correspond à la migration électrophorétique des fragments amplifiés de 211 pb, en présence de leurs produits de digestion enzymatique par *Nla* III.

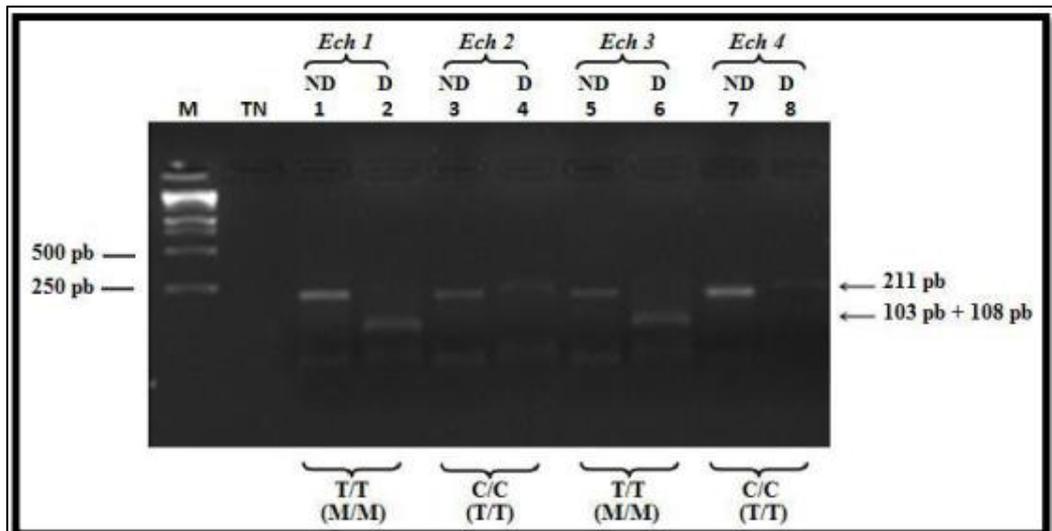


Figure 8. Profil électrophorétique des produits de PCR (211 pb sur l'exon 7 du gène XRCC3) et de leurs produits de digestion, séparés sur un gel d'agarose à 3,5%, après coloration au BET et visualisation sous UV.

Les échantillons 1 et 3 sont de génotype homozygote muté T/T (M241M).

Les échantillons 2 et 4 sont de génotype homozygote sauvage C.

4.1.3. Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme R188H et T241M

L'analyse moléculaire a permis de mettre en évidence les mutations R188H et T241M des gènes XRCC2, XRCC3 respectivement et les fréquences génotypiques et alléliques des différentes formes dans l'ensemble des échantillons étudiés dans la population Algérienne (Tableaux13, 14,15).

Tableau 13. Distribution des génotypes (fréquence génotypique) des polymorphismes : XRCC2 R188H dans les échantillons analysés.

Genotype XRCC2 (R188H)	Patient n=30 (%)		Cas Contrôle n=7 (%)	
	Nombre	(%)	Nombre	(%)
Homozygote sauvage R188R (G188G)	29	97%	07	100%
Hétérozygote R188H (G188A)	01	03%	00	00%
Homozygote muté H188H (A188A)	00	00%	00	00%

Tableau 14. Distribution des génotypes des polymorphismes XRCC3 T241M dans les échantillons analysés.

Genotype XRCC3 (T241M)	Patient n=30 (%)		Cas Contrôle n=7 (%)	
	Nombre	(%)	Nombre	(%)
Homozygote sauvage T241T(M241M)	28	93%	07	00%
Hétérozygote T241M (T241C)	02	07%	00	00%
Homozygote muté M241M (C241C)	00	00%	00	00%

Tableau 15. Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme des genes XRCC2(R188H) et XRCC3(T241M).

Gène	Patient n=30		Cas Contrôle n=7	
	Nombre	(%)	Nombre	(%)
XRCC2 R188H				
Fréquence				
Allélique				
G	59	98.3%	14	100%
A	1	2%	00	00
XRCC3 T241M				
Fréquence				
Allélique				
C	58	97%	00	00
T	02	3%	00	00

La génétique de population a pour objectif l'étude des fréquences des gènes génotypes et allèles et des facteurs susceptibles de modifier ces fréquences au cours de génération successive. Et pour confirmer les associations entre les gènes étudiés et le cancer du sein.

Selon les tableaux précédents, il y'a une différence statistiquement significative été trouvée dans les fréquences génotypiques des cas patients et des témoins, pour les cas patients

97%GG, 3% GA et pour le groupe témoin 100%GG. De plus, les fréquences alléliques des patients et des témoins pour le cas d'allèle G de XRCC2(R188H) est presque identique. Dans les cas l'allèle C étaient de 97% et l'allèle T 3% et pour les témoins 0%C et 0%T.

– **Population polanaise**

Selon Smolarz *et al.* (2014) les résultats de la fréquence génotypique du polymorphisme XRCC2Arg188His chez les patients TNBC (Triple-Negative Breast Cancer) et les échantillons de contrôle ils sont résumés dans le tableau 16.

Tableau 16. Distribution des génotypes du polymorphisme XRCC2 chez les patients de TNBC et contrôle.

XRCC2Arg188Hi	Patient (n=70)		contrôle (n=70)	
	Nombre	%	N	%
188Arg/Arg				
188Arg/His	12	17	18	26
188His/His	8	12	40	57
	50	71	12	1
188Arg	32	23	76	54
188His	100	77	64	46

Au vu de ces résultats (Tableau 16), des différences significatives dans la fréquence génotypique étudié et même les fréquences alléliques

Une faible association entre le carcinome triple négative et la présence d'allèle 188His par contre une association plus forte pour 188His/His que le variant hétérozygote 188Arg/His.

La fréquence du génotype du polymorphisme XRCC3Thr241Met chez les patients TNBC et les échantillons de contrôle sont résumés dans le tableau 17.

Tableau 17. Distribution des génotypes du polymorphisme XRCC3 chez les patients de TNBC et contrôle.

XRCC3Thr241M	Patient (n=70)		contrôle (n=70)	
	Nombre	%	N	%
241Thr/Thr	19	27	15	21
241Thr/Met	35	49	35	50
241Met/Met	16	23	20	29
241Thr	73	52	65	46
241Met	67	48	75	54

Aucune différence statistiquement observée dans les fréquences génotypiques du Polymorphisme XRCC3Thr241M et entre le groupe témoin et les patients TNBC. Une certaine corrélation était observée entre le XRCC2-Arg188His et le XRCC3 Polymorphismes Thr241Met et sein triple négatif.

– Population chypriotes

L'analyse moléculaire a permis de mettre en évidence les mutations R280H, R188H et T241M des gènes XRCC1 ; XRCC2 et XRCC3 respectivement et les fréquences génotypiques et alléliques des différentes formes dans l'ensemble des échantillons étudiés dans la population chypriotes (Tableau 18,19).

Tableau 18. Distribution des génotypes (fréquence génotypique) des polymorphismes : XRCC2 R188H ,XRCC3 T241M dans les échantillons analysés.

GenotypeXRCC2(R188H)	Patient n=1109		Cas controle sn=1177	
	Nombre	(%)	Nombre	(%)
188 Arg/Arg	972	88%	999	85%
188 Arg/His et 188His/His	136	12%	178	15%
Gènotype XRCC3 (Thr241M)				
241Thr/Thr	312	28%	351	30%
241Thr/Met	560	50%	600	60%
241Met/Met	220	20%	226	19%
Génotype XRCC1(Arg188His)				
Arg/Arg	923	83%	959	81%
Arg/His	177	16%	207	18%
His/His	9	0,8%	2	0,16%

Tableau 19. Distrubition des fréquence allélique des polymorphisme XRCC1 (R280H), XRCC2 (R188H), XRCC3 (T241M).

Gène	Patient n=1109		Cas Contrôle n=1177	
	Nombre	(%)	Nombre	(%)
XRCC1R188H G A	2023	91%	2125	90%
	195	9%	211	9%
XRCC2 R188H G A	2080	94%	2176	92%
	136	6%	178	8%
XRCC3 T241M C T		41%	1002 752	43%
		32%		32%

D'après les résultats de (Loizidou *et al.*, 2008) (Tableau 18) le SNP XRCC1 280 et le SNP XRCC2 188 s'écarte significativement de HWE ($P < 0,05$). Les écarts observés sont probablement dus aux résultats au hasard plutôt que des erreurs de génotypage puisque les homozygotes de ces SNP sont très rares dans cette population.

Dans XRCC1, seuls deux témoins étaient homozygotes pour l'allèle 280His et un seul était homozygote pour l'allèle XRCC2 188.

Aussi l'âge moyen des cas de cancer du sein et de contrôles était de 56 ans, tandis que l'âge moyen au moment du diagnostic pour le cas de cancer du sein était de

51,6 ans (écart type (SD) $\pm 9,2$) ; et l'âge moyen à la constatation pour les témoins était de 56,4 ans ((ET) $\pm 9,2$).

Ils ont trouvé des associations significatives du XRCC1 Arg280His et XRCC2 Arg188His et le risque du cancer du sein.

Les porteuses homozygotes de XRCC1 280His ont été un risque accru de cancer du sein (OR = 4,68, IC à 95 % 1,01–21,7, $P = 0,03$) et les Porteuses du XRCC2 son allèle avait un risque réduit de cancer du sein (OR = 0,79, IC à 95 % 0,62 à 1,0, $P = 0,05$).

Aucune association significative avec le cancer du sein n'a été observée pour les SNP XRCC1 Arg194Trp, XRCC1 Arg399Gln et XRCC3 Thr241Met..

– Population finlandaise

Pour Pelttari *et al.* (2015) dans le séquençage des gènes observé une variation faux-sens connue identifiée dans chaque gène depuis le variant de XRCC2(Arg188His) associé à un risque de cancer du sein. Aucune mutation pathogène n'a été détectée dans aucun gènes et la distribution des haplotypes était similaire entre les cas et les témoins.

4.2. Discussion

4.2.1. Discussion analytique

4.2.1.1. L'échantillon d'étude

Le groupe de Boukhari (2014) ; Smolarz *et al.* (2014) et d'autre étude comme l'étude de Jacobsen *et al.* (2003) ont utilisé des tissus conservés dans des blocs de paraffine comme une source d'ADN pour l'analyse génomique. Le déparaffinage par Xylène permet l'élimination de paraffine suivie d'une réhydratation des tissus avec l'éthanol, mais constitué des problèmes (Tableau 20) pour la continuité d'étude.

Tableau 20. Les avantages et les inconvénients de l'utilisation des tissus inclus dans des blocs de paraffine.

Les Avantages	Les inconvénients
1. La quantité suffisante d'ADN pour réaliser l'étude. 2. Rendement élevé. (Ilissar, 2018)	1. Dégrade les acides nucléiques (ADN). 2. la pureté n'est pas optimale. (Boukhari, 2014)

Par contre d'autres travaux réalisés par l'équipe de (Mvumbi, 2013) ont utilisé le sang pour faire les analyses génétiques. Le choix de sang a des plusieurs avantages :

1. Facile à extraire l'ADN ;
2. la concentration et la pureté d'ADN très bonnes ;
3. Gain de temps.

4.2.1.2. Protocol d'extraction de l'ADN

Le groupe de Boukhari. (2014) fait l'extraction de l'ADN génomique selon le protocole Pikor *et al.* (2011) modifié à partir des tissus inclus dans des blocs de paraffine. Le principal inconvénient est la lyse incomplète (absence de détergent). Et la méthode de purification d'ADN n'est pas efficace (salting-out).

Alors que il y a d'autres méthodes de purification qui ont été réalisées dans l'étude de Abdelmaksoud-Dammak *et al.* (2015) comme l'utilisation des solvants organiques comme le phénol chloroforme qui permet un meilleur rendement et pureté d'ADN extrait.

4.2.1.3. Détermination de la concentration et la pureté d'ADN

Ils sont indispensables de déterminer la concentration de l'ADN avant de faire la PCR. L'équipe de Boukhari. (2014) a mesuré l'absorbance à 260nm par la spectrophotométrie UV qui est une méthode simple et reproductible mais présente des inconvénients, comme la quantité des acides nucléiques est requise, et les échantillons mesurés sont dilués qui sont la principale source des erreurs.

De plus, des contaminations absorbantes à 260 nm peuvent conduire des faux résultats (Ho-Pun-Cheung *et al.*, 2009).

D'autres études ont démontré que le dosage de l'ADN par le Nanodrop ça donne des résultats exactes et cette technique est plus sensible que la spectrophotométrie UV et qu'il ne nécessite que 1ul d'échantillon (Desjardins et Conklin, 2010 ; Ponti *et al.*, 2018).

4.2.1.4. Méthode d'identification des polymorphismes des gènes

La stratégie réalisée par l'étude de Boukhari *et al.* (2014) pour identifier les mutations par une technique PCR-RFLP les avantages de cette technique est de permettre la multiplication du nombre de séquences d'ADN et la sensibilité satisfaisante en plus, relativement rapide (Guérin *et al.*, 1995). Mais l'inconvénient principal de cette technique est de ne pas permettre de détecter les nouvelles mutations.

En 2015 ; le groupe de Zamani *et al.* (2015) présente une technique de PCR-SSCP qui permet de détecter des nouvelles mutations.

4.2.2. Discussion des résultats

Afin de rechercher une éventuelle corrélation entre les polymorphismes des gènes de réparation de l'ADN et le risque d'apparition ou de développement d'un cancer du sein. Les études choisies ont été utilisées des techniques de biologie moléculaire (PCR-RFLP, séquençage capillaire) et les ont appliquées sur des échantillons de patients atteints de cancer du sein (Boukhari, 2014), a essayé d'établir une relation entre les polymorphismes des gènes (XRCC2 et XRCC3) et le cancer du sein chez les femmes algériennes.

Pour cette exploration, elle a adopté des techniques de biologie moléculaire (PCR-RFLP) afin de détecter les mutations d'intérêt. D'après leurs résultats, confirment la présence des mutations R188H et T241M avec une fréquence très faible à cause de la quantité d'ADN insuffisante. Malgré la détection de polymorphisme dans les échantillons d'ADN des femmes algériennes, on ne peut pas confirmer l'association entre ces mutations et l'apparition ou/et développement de cancer du sein, c'est à cause du nombre insuffisant (n=37) des échantillons utilisés par Boukhari. (2014).

Nous avons vérifié *in silico* les couples d'amorce utilisés par Boukhari. (2014). Nous avons utilisé UCSC *In-Silico* PCR 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 messager/séquence d'ADN complémentaire rapidement et facilement.

Après les résultats *in silico* pour les deux couples d'amorce des gènes XRCC2et3 dans la (figure 9, 10) montre que ces amorces est spécifique pour les gènes étudié.

```
>chr7:152648784-152649073 290bp TGTAGTCACCCATCTCTCTGC AGTTGCTGCCATGCCTTACA
TGTAGTCACCCATCTCTCTGCcttttgattttggatagcctgtcagcttt
ttactggatagaccgctcaatggaggagaaagtgtgaacttacaggagt
ctactctgaggaaatgttctcagtgcttagagaagcttgtaaagactat
cgcctggttctttttgcaacgacacaaactataatgcagaaagcctcgag
ctcatcagaagaaccttctcatgcctctcgacgactgtgtgatgtggaca
tagactacagaccttatctcTGTAAGGCATGGCAGCAACT
```

Figure 9. Présentation des séquences PCR prévues amplifiées par la PCR *in silico* qui ont été lancées en-ligne par les deux couples d'amorce des gènes XRCC2.

```
>chr14:103699312-103699522 211bp ATGGCTCGCCTGGTGGTCA CATCCTGGCTAAAAATACG
ATGGCTCGCCTGGTGGTCAtcgactcgggtggcagccccattccgctgtga
atthgacagccaggcctccgccccaggccaggcatctgcagtcctgg
gggcccacgctgcgtgagctgagcagtgccctccagagccctgtgctgtgc
atcaaccagggtgagcaccaaggcagggttgaccccctgagctCGTATTTT
TAGCCAGGATG
```

Figure 10. Présentation des séquences PCR prévues amplifiées par la PCR *in silico* qui ont été lancées en ligne par les deux couples d'amorce des gènesXRCC3

Le travail réalisé par Smolarz *et al.* (2014) a été fait pour le but d'évaluer les associations entre les risques de cancer du sein triple négatif (TNBC) et polymorphisme des gènes de réparation (XRCC2 et XRCC3). Par l'application de la technique PCR-RFLP. A partir des résultats obtenues, une relation a été identifié entre le polymorphisme XRCC2 Arg188His et le cancer du sein triple négatif.

Une augmentation a été observée, concernant Fréquence des hétérozygotes 188Arg/His et 241Thr/Met hétérozygotes.

Nous avons aussi vérifié *in silico* les couples d'amorce utilisé par cette étude aucune amplification *in silico*, donc il faut confirmer pratiquement les couples d'amorce de gène XRCC3 T241M de Smolarz *et al.* (2014).

No matches to gcttgggtgctatcgactc acagggctctggaaggcactgctcagctcacgcacc in Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38)

Figure 11. Présentation des séquences PCR prévues amplifiées par la PCR *in silico* qui ont été lancées en ligne par les deux couples d'amorce des gènes XRCC3 T241M.

L'analyse mutationnelle réalisée par l'équipe de Loizidou *et al.* (2008) a pour but de confirmer de l'hypothèse concernant la variation de XRCC1, XRCC2 et XRCC3 dans la modification de risque du cancer du sein. Les variants XRCC1 (Arg280His) XRCC2 (188His) et XRCC3(T241M) peuvent être associés au risque de cancer du sein.

Selon les fréquences génotypiques de XRCC1 Arg280His entre les cas de cancer du sein et les témoins sains il a révélé que l'allèle XRCC1 280His est associé à un risque accru de cancer du sein (Loizidou *et al.*, 2008).

Trois des neuf femmes qui étaient homozygotes pour la variante 280His dont elles étaient fumeuses. C'est possible que les porteurs homozygotes supplémentaires de 280His étaient exposés pendant une longue durée au tabagisme et que la combinaison de l'exposition et du génotype XRCC1 280His a augmenté leur risque de cancer du sein. Mais l'hypothèse n'a pas été confirmée.

Cette étude a suggéré que la variation génétique dans la voie de réparation de l'ADN est associée au risque de cancer du sein chez les femmes chypriotes et comme les gènes XRCC1 et XRCC2 ont des rôles importants dans les voies BER et le HRR, cela indique que le risque de cancer du sein chez les femmes chypriotes associé aux polymorphismes XRCC1 280His et XRCC2 188His.

Pour les résultats qui nous avons obtenu après la PCR *in silico* (figure 12), aucune amplification réalisée *in silico*, donc il faut confirmer pratiquement les couples d'amorce des gènes XRCC1 280His et XRCC2 188His de Loizidou *et al.* (2008).

Pour les résultats qui nous avons obtenu dans la (figure 12) concernant les séquences PCR de cette étude il faut confirmer pratiquement les couples d'amorce des gènes XRCC1 280His et XRCC2 188His de Loizidou *et al.* (2008).

XRCC1280His

No matches to gtctgagggaggagggtctg cagaggagctggggaagatc in Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38)

XRCC2 188His

No matches to caccatctctctgccttt cctctcgacgactgtgtgat in Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38)

Figure 12. Présentation des séquences PCR prévues amplifiées par la PCR *in silico* qui ont été lancées en ligne à partir de (<http://genome.ucsc.edu>).

L'étude réalisée par le groupe de Pelttari *et al.* (2015) a étudié le rôle de gène XRCC2 et XRCC3 dans la prédisposition au cancer du sein et identifier les mutations dans la population finlandaise. Pour cette exploration la détection des mutations ponctuelle, elle adopte une technique de séquençage capillaire. D'après le résultat de cette étude, montrent que aucune mutation pathogène n'a été détectée, suggèrent que le gène XRCC2 et XRCC3 ne contribue pas substantiellement à la prédisposition au cancer du sein dans la population finlandaise.

Il y a des autres études ont démontré qu'il y a une association entre les mutations de gènes XRCC2 et XRCC3. L'étude réalisée par l'équipe (Kuschel. (2002) a suggéré une relation étroite entre l'apparition des mutations (SNP XRCC2 R188H et XRCC3 T241M) et l'augmentation du risque de cancer du sein.

D'autres travaux ont aussi trouvé une relation entre le génotype XRCC3 M/M et l'augmentation du risque de cancer du sein Han *et al.* (2009) et He *et al.* (2012).

Malgré qu'en 2006, l'équipe Christofolini. (2006) n'a trouvé qu'une relation faible entre la transition XRCC3 T241M et le cancer du sein, et aucune relation avec la SNP XRCC2 R188H. Park *et al.* (2012) ont démontré l'association de l'SNP XRCC2 R188H, avec une augmentation du risque de cancer du sein.

Conclusion

Et perspectives

Notre étude a portée sur la corrélation entre les polymorphismes génétiques XRCC2R188H et XRCC3T241Met l'apparition d'un cancer du sein chez une population des femmes Algérienne en comparant avec les résultats des différentes populations.

Les résultats obtenus par Boukhari. (2014) ont permis de détecter des anomalies génétiques au niveau de chacun des 2 gènes étudiés, avec des pourcentages variables. Néanmoins, leur association n'a pas été confirmée vu le nombre restreint des échantillons étudiées.

Il serait intéressant dans le cadre de recherches ultérieures, d'élargir l'échantillon et d'approfondir l'étude. Pour la continuité de ce travail, nous proposons de :

- Augmenter le nombre des échantillons des patients pour obtenir des résultats statiquement et significativement justifié.
- Mettre en évidence sur l'analyse les polymorphismes des autres gènes de réparation d'ADN et leur possible corrélation dans l'apparition d'un cancer du sein comme le gène XRCC1.
- utiliser d'autre stratégie pour identifie les nouvelles mutations comme la technique de PCR-SSCP.

Le dosage de l'ADN par le Nanodrop permet de donné des résultats exactes.

Références bibliographiques

Bibliographie

A

Abdelmaksoud-dammak R., Saadallah-kallel A., Miladi-abdennadher I., Khabir A., Sallemi-boudawara R., Mokdad-gargouri R. 2015. Mutations du gene kras chez les patients du sud tunisien atteint de cancer colorectal: signification clinique, 39-44.

Akisik, E., Yazici, H., et Dalay, N. 2011. ARLTS1, MDM2 and RAD51 gene variations are associated with familial breast cancer. *Molecular Biology Reports*, 38(1), 343-348.

Alanazi, M., Pathan, A. A. K., Ajaj, S. A., Khan, W., Shaik, J. P., Al Tassan, N., et Parine, N. R. 2013. DNA Repair Genes XRCC1, XRCC3, XPD, and OGG1 Polymorphisms among the Central Region Population of Saudi Arabia. *Biological Research*, 46(2), 161-167.

B

Bashir, N., Sana, S., Mahjabeen, I., et Kayani, M. A. 2014. Association of reduced XRCC2 expression with lymph node metastasis in breast cancer tissues. *Familial Cancer*, 13(4), 611-617.

Badid N.2012.Stress oxydatif et profil nutritionnel chez une population de femmes atteintes de cancer du sein dans la région de Tlemcen. Thèse de doctorat, université ABOU BEKER BELKAID Telemcen, 226p.

Bassowa A., Ketevi A., Douaguibe B., Faiagnon K., Sedoh T., Ajavon D., Aboubakari S., Akpadza K. 2018. Deces par cancer du sein au CHU sylvanus Olympio de Lome : plaidoyer pour un depistage systématique chez les patientes a risque au Togo , 1727-8651.

Belhadi K. 2018. Diagnostic Biologique et Moléculaire dela Beta-thalassémie chez une Partie d'Enfants d'Algérie. Thèse de doctorat, Universite Batna-2-, Algérie, 143p.

Boukhari D.2013.Recherche des polymorphismes nucléotidiques des gènes de réparation par recombinaison homologue (RAD51 ,XRCC2et 3) et risque de cancer du sein

chez les femmes algériennes. Mémoire de Magister, Université Mohamed Khider - Biskra, 76p.

Bicar A. 2018. Le cancer du sein chez la jeune femme et sa prise en charge. Thèse de doctorat, Université de Limoges, France, 154p.

Brooks, J., Shore, R. E., Zeleniuch-Jacquotte, A., Currie, D., Afanasyeva, Y., Koenig, K. L., Arslan, A. A., Toniolo, P., et Wirgin, I. 2008. Polymorphisms in RAD51, XRCC2, and XRCC3 Are Not Related to Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers et Prevention*, 17(4), 1016-1019.

Ƨ

Curtin, K., Lin, W.-Y., George, R., Katory, M., Shorto, J., Cannon-Albright, L. A., Smith, G., Bishop, D. T., Cox, A., Camp, N. J., et Colorectal Cancer Study Group. 2009. Genetic Variants in XRCC2: New Insights Into Colorectal Cancer Tumorigenesis. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 18(9), 2476-2484.

Christofolini D.M., Lipay M.V.N, Ramos M.A.P., Brunoni D. et . Melaragno M. 2006. Screening for fragile X syndrome among Brazilian mentally retarded male patients using PCR from buccal cell DNA.

Corgne A.2016. Rôle du pharmacien d'officine dans la prise en charge du cancer des seins après chirurgie mammaire. Thèse de doctorat d'état, Université de Bourgogne, 128p.

Ƨ

Desjardins, P., et Conklin, D. 2010. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*, 1, 2565.

F

Franchet C.2016. Analyse d'image automatisée de l'hybridation in situ en fluorescence pour l'évaluation du statut *her2* dans les cancers du sein. Thèse de doctorat, université Toulouse III – paul sabatier, 159p.

G

Guérin C., Allietta M., Guérin B., Thibier M. 1995. Utilisation de la technique d'amplification de gène pour la détection du virus de la maladie d'Aujeszky dans le sperme de verrat.

H

Hachana M.R.2009. Contribution à l'étude de l'implication des virus et évaluation de leur valeur pronostique dans le cancer du sein de la femme dans la région du centre tunisien. Thèse de doctorat, Université de Monastir, 283p.

Harli A. et Merlin J. 2013. Biomarqueurs prédictifs de réponse aux thérapie ciblées.344 :783-792.

Ho-Pun-Cheung A., Cellier D., Lopez-Crapez E. 2009. Considerations for normalisation of RT-qPCR in oncology, 00396192.

Hu, J. J. 2001. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. Carcinogenesis, 22(6), 917-922.

I

Jacobsen R. N., Nexø, B. A., Olsen A., Overvad K., Overvad K., Tjønneland A., et Vogel U. 2003. No Association between the DNA Repair Gene XRCC3 T241M, 12, 584–585.

Jahanmohan J.P.2019. Les cancers du sein agressifs : conséquences de la ménopause chimio-induite chez les femmes jeunes atteintes d'un cancer du sein non métastatique et

facteurs pronostiques de la rechute du cancer du sein triple négatif. Thèse de doctorat d'état, l'Université Clermont Auvergne, 177p.

Jacobsen R. N., Nexø, B. A., Olsen A., Overvad K., Overvad K., Tjønneland A., et Vogel U. 2003. No Association between the DNA Repair Gene XRCC3 T241M, 12, 584–585.

K

Kuschel, B. 2002. Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Human Molecular Genetics*, 11(12), 1399-1407.

Krupa, R., Synowiec, E., Pawlowska, E., Morawiec, Z., Sobczuk, A., Zadrozny, M., Wozniak, K., et Blasiak, J. 2009. Polymorphism of the homologous recombination repair genes RAD51 and XRCC3 in breast cancer. *Experimental and Molecular Pathology*, 87(1), 32-35.

L

Lecarpentier J.2012. Étude des facteurs modificateurs du risque de cancer du sein des femmes à risque génétique élevé. Thèse de doctorat en Santé Publique, Université Paris-Sud XI, 278p.

Lecaigec C. 200. Predispositions héréditaires aux cancers du sein et/ou de l'ovaire. Thèse de doctorat, Université Henri Poincaré, France, 103p.

Lévy N.2007.XRCC1, un élément clef de la réparation des dommages de l'ADN couplée à la réplication. Thèse de doctorat, université Louis pasteur Strasbourg, 221p.

Lin, W.-Y., Camp, N. J., Cannon-Albright, L. A., Allen-Brady, K., Balasubramanian, S., Reed, M. W. R., Hopper, J. L., Apicella, C., Giles, G. G.,

Loizidou, M. A., Michael, T., Neuhausen, S. L., Newbold, R. F., Marcou, Y., Kakouri, E., Daniel, M., Papadopoulos, P., Malas, S., Kyriacou, K., et Hadjisavvas, A. 2008. Genetic polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, XRCC2 and XRCC3 and risk of breast cancer in Cyprus. *Breast Cancer Research and Treatment*, 112(3), 575-579.

M

Moghtit F.Z.2014. Etude de l'implication des polymorphismes des gènes de réparation de l'ADN dans la survenue du cancer colorectal dans la population de l'Ouest Algérien. Thèse de doctorat d'état, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran « Mohamed Boudiaf, 152p.

Mahnane A., Hamdi Cherif M.2012. Épidémiologie du cancer du sein en Algérie. Registre du Cancer de Sétif, Laboratoire Santé Environnement des Hauts Plateaux Sétifiens, Bendib 9ème Séminaire Intensif en Oncologie Mustaganem Hôtel, Mostaganem 10/13 octobre 2011 »

N

Nait Behloul N.2018.Etude des facteurs de risque du cancer du sein féminin dans la wilaya d'Oran. Thèse de doctorat en sciences médicales, Université d'Oran 1«Ahmed Ben Bella»,173p.

P

Park, D. J., Lesueur, F., Nguyen-Dumont, T., Pertesi, M., Odefrey, F., Hammet, F., Neuhausen, S. L., John, E. M., Andrulis, I. L., Terry, M. B., Daly, M., Buys, S., Le Calvez-Kelm, F., Lonie, A., Pope, B. J., Tsimiklis, H., Voegelé, C., Hilbers, F. M., Hoogerbrugge, N., ... Southey, M. C. 2012. Rare Mutations in XRCC2 Increase the Risk of Breast Cancer. *The American Journal of Human Genetics*, 90(4), 734-739.

Pelttari, L. M., Kiiski, J. I., Ranta, S., Vilske, S., Blomqvist, C., Aittomäki, K., et Nevanlinna, H. 2015. RAD51, XRCC3, and XRCC2 mutation screening in Finnish breast cancer families. *SpringerPlus*, 4(1), 92.

Portier L.2019. Etude de l'influence du stroma BRCA1 muté sur les étapes précoces de transformation tumorale dans le modèle du cancer du sein. Thèse de doctorat, l'Université Paris-Saclay, 200p.

Pikor, L. A., Enfield, K. S. S., Cameron, H., et Lam, W. L. (2011). DNA Extraction from Paraffin Embedded Material for Genetic and Epigenetic Analyses. *Journal of Visualized Experiments*, 49, 2763.

R

Romanowicz-Makowska, H., Smolarz, B., Zadrozny, M., Westfal, B., Baszczynski, J., Polac, I., et Sporny, 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(3), 201-208.



Sakhri S. Chimiothérapie neoadjuvante associée a l'acide zoledronique dans le cancer du sein localement avancée. Thèse de doctorat en sciences médicales, université mouloud Mammeri, 263p.

Southey, M. C., Milne, R. L., Arias-Perez, J. I., Menendez-Rodriguez, P., Benitez, J., Grundmann, M., Dubrowinskaja, N., Park-Simon, T.-W., Dork, T., Garcia-Closas, M., ... Cox, A. 2011. A role for XRCC2 gene polymorphisms in breast cancer risk and survival. *Journal of Medical Genetics*, 48(7), 477-484.

Smolarz, B., Makowska, M., Samulak, D., Michalska, M. M., Mojs, E., Wilczak, M., Romanowicz, H. 2014. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of ERCC2, hOGG1, and XRCC1 DNA repair genes and the risk of triple-negative breast cancer in Polish women. *Tumor Biology*, 35(4).

Sidi Boulenouar A.2019.Etude des profils moléculaires des gènes BRCA1 et 2 impliqués dans la survenue de cancer du sein chez des patientes avec et sans histoire familiale de la population de l'Ouest algérien. Thèse de doctorat d'état, Université d'Oran 1«Ahmed Ben Bella»,148p.



Traoré S.T.2008. Cancer du sein au Mali : Anatomie clinique et suivi. Thèse de doctorat, universite de bamako, 126p.

Tahari, Z., Medjdoub, A., Sahraoui, T., Tahari, F. Z., Soulimani, R., Bousahba, A., et El Kebir, F. Z. 2013. Analyse de l'état du stress oxydatif dans le cancer du sein à l'Ouest algérien via les tests FORD et FORT et corrélation avec le grade histopronostique SBR. *Journal Africain du Cancer / African Journal of Cancer*, 5(1), 16-21.

U

Uhel, F., Zafrani, L., et Commission de la recherche translationnelle de la Société de réanimation de langue française. 2019. Nouvelles techniques de biologie moléculaire. Médecine Intensive Réanimation.

Z

Zamani, P., Akhondi, M., et Mohammadabadi, M. 2015. Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. Small Ruminant Research, 132, 123-127.

Zoure A.A.2017. Etude de facteurs de risques génétiques du cancer du sein chez des femmes Burkinabè. Thèse de doctorat d'état, université Mohammed Faculté des sciences, rabat, 156p.

Site Web

1. (<https://www.uniprot.org/uniprot/P18887>).
2. (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=XRCC1&keywords=XRCC1>)
3. (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER1121#/ER1121>)
4. Users/INFO-PUB/Downloads/HB-0329-004-1102728-HB-QIAamp-DNA-Mini-Blood-Mini-0516-WW.pdf).
5. (<http://genome.ucsc.edu>).

Annexes

Annexe 1. Tampon pour électrophorèse
Tampon Tris Acétate EDTA (TAE) :

Concentration de fonctionnement 1x	Solution mère 10X :
Base Tris 40Mm ; Acide acétate glacial 20 ; EDTA 2,0Mm ou , PH8,3.	Base Tris 4 ,8g ; NaOAc 16,4g ou 11,42ml ; EDTA 7,4g ou EDTA 0 ,5M 20ml (PH8) ; H2O à 1litre.

ملخص

يمثل سرطان الثدي في الجزائر مشكلة صحية عامة حقيقية ، حيث تجمع بين تأثير عامل وراثي ، ترتبط العديد من الجينات بخطر الإصابة بسرطان الثدي ، وبعضها يرمز للبروتينات المشاركة في آليات الإصلاح. DNA من أجل البحث عن الأشكال المتعددة لجينات الإصلاح XRCC1 و XRCC2 و XRCC3 ، قدمنا سلسلة من دراسات الحالة / التحكم على المتغيرات الجينية XRCC1 (R280H) ، XRCC3 (Thr241Met) و XRCC2 (Arg188His) من خلال تطبيق تقنيات البيولوجيا الجزيئية الحساسة ، مثل PCR-RFLP ، التسلسل ، لاكتشاف الطفرات النقطية ذات الأهمية.

الدراسات المختارة من نوع الحالة / المجموعة الضابطة. تم إجراء التتميط الجيني لتعدد الأشكال المختلفة بواسطة PCR-RFLP ودراسات أخرى أجريت عن طريق التسلسل الشعري. تؤكد المقارنة بين ترددات الأليل والترددات الوراثية على ارتباط تعدد الأشكال لجينات XRCC1 و XRCC2 و XRCC3 وسرطان الثدي. تؤكد النتائج التي تم الحصول عليها في السكان الجزائريين وجود متغير XRCC2 R188H و XRCC3 T241M بتردد منخفض ، ولم يتم تأكيد الارتباط بين تعدد الأشكال وخطر الإصابة بسرطان الثدي ، ويرجع ذلك إلى قلة عدد العينات التي تمت دراستها في الشعب الجزائري.

الكلمات الرئيسية: سرطان الثدي ، تعدد الأشكال ، XRCC2 R188H ، XRCC1 (R280H) و XRCC3 T241M ، PCR-RFLP.

Résumé

En Algérie, le cancer du sein représente un réel problème de santé publique. Celui-ci combine l'impaction de facteur génétique, de nombreux gènes sont associé au risqued cancer du sein dont certain codent pour des protéines intervenant dans les mécanismes deréparation de l'ADN. Afin de rechercher les polymorphismes des gènes de réparation XRCC2, XRCC1 et XRCC3, nous avons exposé une série des études cas/témoins portant sur les variantes génétique: XRCC1(R280H) , XRCC3(Thr241Met) et XRCC2(Arg188His). Par l'application des techniques de biologie moléculaire, qui sont sensibles, comme la PCR-RFLP, séquençages, pour la détection des mutations ponctuelles d'intérêt.

Les études choisies sont de type cas/témoins. Le génotypage des différents polymorphismes a été réalisé par PCR-RFLP et des autres études réalisés par séquençage capillaire. La comparaison des fréquences alléliques, génotypiques confirment l'association des polymorphismes des gènes XRCC1, XRCC2, XRCC3 et le cancer du sein. Les résultats obtenus chez la population Algérienne confirment la présence de variante XRCC2 R188H et XRCC3 T241M, avec une fréquence faible. L'association entre le polymorphisme et le risque de cancer du sein n'est pas confirmée c'est à cause le nombre restreint d'échantillons étudiés chez la population Algérienne.

Mots clés: Cancer du sein. polymorphisme. XRCC2 R188H, XRCC1(R280H) et XRCC3 T241M. PCR-RFLP.

Abstract

In Algeria, breast cancer represents a real public health problem. It combines the impaction of a genetic factor, many genes are associated with the risk of breast cancer, some of which code for proteins involved in the repair mechanisms of breast cancer. DNA. In order to search for polymorphisms of the repair genes XRCC2, XRCC1 and XRCC3, we have presented a series of case / control studies on the genetic variants: XRCC1 (R280H), XRCC3 (Thr241Met) and XRCC2 (Arg188His). By the application of molecular biology techniques, which are sensitive, such as PCR-RFLP, sequencing, for the detection of point mutations of interest.

The studies chosen are of the case / control type. The genotyping of the different polymorphisms was carried out by PCR-RFLP and other studies carried out by capillary sequencing. The comparison of allele and genotypic frequencies confirms the association of polymorphisms of the XRCC1, XRCC2, XRCC3 genes and breast cancer. The results obtained in the Algerian population confirm the presence of variant XRCC2 R188H and XRCC3 T241M, with a low frequency. The association between the polymorphism and the risk of breast cancer is not confirmed, this is due to the small number of samples. studied in the Algerian population.

Keywords: Breast cancer, polymorphism, XRCC2 R188H, XRCC1 (R280H) and XRCC3 T241M, PCR-RFLP.

