

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Mohamed Khider - Biskra -
Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie

Option : Biologie appliquée

Thème

**Recherche des polymorphismes nucléotidiques des gènes
de réparation par recombinaison homologe (RAD51,
XRCC2 et 3) et risque de cancer du sein chez les femmes
Algériennes.**

Présenté par : BOUKHARI Dalale

Membres de jury:

Mr BELHAMRA Mohamed	Président	Professeur	Université Mohamed Khider de Biskra.
M ^{me} SATTA Dalila	Examinatrice	Professeur	Université Mentouri de Constantine.
Mr LAIADI Ziane	Examineur	MC'A	Université Mohamed Khider de Biskra.
Mr BOURAS Mourad	Rapporteur	MC'A	Université Hadj Lakhdar de Batna.

Année universitaire : 2013/2014

Remerciements

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance, ma haute considération et mon profond respect à mon encadreur, **Monsieur le Docteur BOURAS Mourad**, qui m'a guidé et encouragé au cours de ce travail, également pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa patience.*

*Je tiens à témoigner toute ma gratitude à **Monsieur le Professeur BELHAMRA Mohamed**, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de mémoire.*

*Il est pour moi un honneur de remercier **Madame le Professeur SATTI Dalila** d'avoir accepté de juger mon travail. Je lui en suis très reconnaissante de même que pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à **Monsieur le Docteur LAIADI Ziane**, qui a accepté d'évaluer ce travail et faire partie de ce jury de mémoire. Je le remercie de l'intérêt qu'il a bien voulu lui porter. Je lui témoigne ma reconnaissance.*

*J'adresse mes sincères remerciements à ceux qui ont permis à ce travail d'être réalisable, notamment, **Dr MOUSSI Abdelhamid**, le Chef de Département des Sciences de la Nature et de la Vie.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à tous les personnes qui ont participé de près ou loin à la réalisation de ce travail et je cite en particulier **Monsieur DEBACHE Karim** et **Mlle FAROUDJ Sana**.*

*Enfin merci à **Mes parents**, pour leur soutien continu durant mes longues études.*

Remerciement spécial

*A Monsieur le Docteur BOUSSOUAR Fayçal de l'Université de
Grenoble.*

*Nous avons eu le plaisir de travailler avec vous. Nous vous
remercions infiniment pour votre précieuse collaboration et votre
disponibilité. Ce mémoire est pour nous l'occasion de vous assurer de
notre profonde reconnaissance et de notre amitié sincère.*

Dédicaces

Je dédie le fruit de mon modeste travail à :

*Mes très chers parents **El-chaiib** et **Amra** qui se sont dévoué
corps et âmes pour me voir réussir dans ma vie que dieu les
gardent,*

*Mes frères : **Yacine, Mourad, Mouhammed et Ibrahim***

*Mes sœurs : **Aicha, Hanane, Nour-el-Houda et Soundesse
Rayen***

*Tous ceux qui m'ont encouragé et soutenu durant les périodes
les plus pénibles avec tant d'amour.*

SOMMAIRE

Introduction

Liste des abréviations

Liste des figures et des tableaux

I. Partie bibliographique

I.1. Rappel anatomique des glandes mammaires	2
I.2. Modification au niveau des seins	2
I.3. Quadrants mammaires	4
I.4. Pathologie du cancer du sein	5
I.4.1. Facteurs de promotion tumorale	5
I.4.2. Diagnostic du cancer du sein	5
I.4.3. Invasion et pouvoir métastatique	6
I.4.4. Classification des cancers du sein	7
I.4.4.1. Classification histologique du cancer du sein	7
I.4.4.1.1. Les carcinomes non invasifs (<i>in situ</i>)	7
a. Carcinome canalaire <i>in situ</i>	7
b. Carcinome lobulaire <i>in situ</i>	8
I.4.4.1.2. Les carcinomes invasifs	9
a. Carcinome canalaire invasif	9
b. Carcinome lobulaire invasif	9
I.4.4.2. Classification moléculaire intrinsèque	10
I.4.4.2.1. Les cancers du sein dits «luminaux»	10
I.4.4.2.2. Les cancers du sein dits «Her2 +++»	10
a- les sous-types d'origine luminale A	10
b- les sous-types d'origine luminale B	10
I.4.4.2.3. Les cancers du sein de phénotype basal	10
I.4.5. Quelques marqueurs moléculaires du cancer du sein	11
I.5. Réparation de l'ADN par recombinaison homologe et cancer du sein	13
I.5.1. Quelques gènes clés de la réparation de l'ADN par recombinaison homologe	14
I.5.1.1. Le gène RAD51	14
I.5.1.2. Le gène XRCC2	15
I.5.1.3. Le gène XRCC3	17

I.5.2. Réparation des cassures doubles brin de l'ADN par recombinaison homologue	18
I.5.3. Implication de la recombinaison homologue dans la progression tumorale	19
I.5.3.1. Polymorphisme RAD51 G135C et progression tumorale	20
I.5.3.2. Polymorphisme XRCC2 R188H et progression tumorale	21
I.5.3.3. Polymorphisme XRCC3 T241M et progression tumorale	22
I.5.3.4. Accumulation des trois polymorphismes et progression tumorale	23
II. Partie expérimentale	
II.1. Matériels biologique.....	24
II.2. Méthodes	24
II.2.1. Préparation des échantillons	24
II 2.2. Extraction de l'ADN.....	25
II.2.3. Détermination de la concentration et de la pureté de l'ADN	26
II.2.4. Recherche de polymorphisme nucléotidique par PCR-RFLP	27
II.2.4.1. Amplification par PCR	28
II.2.4.2. Détection des variants des séquences par PCR-RFLP	29
II.3. Résultats	33
II.3.1. Analyse des produits PCR obtenus.....	33
II.3.2. Digestion des produits de PCR par les endonucléases de restrictions appropriées.....	34
II.4. Discussion	39
II.4.1. Discussion analytique	39
II.4.1.1. Extraction d'ADN	39
II.4.1.1.1. Optimisation de protocole de déparaffinage, de réhydratation de tissu et d'extraction d'ADN.....	40
II.4.1.1.2. Vérification de l'intégrité de l'ADN	40
II.4.1.2. Optimisation de la PCR-RFLP	41
II.4.1.2.1. Choix des amorces et des enzymes de restrictions.....	41
II.4.1.2.2. Optimisation de la concentration en MgCl ₂	42
II.4.1.2.3. Création du programme d'amplification	43
II.4.1.2.4. Optimisation des conditions de restriction	44

II.4.2. Discussion des résultats.....	44
Conclusion et perspectives	
Annexes	

Liste des abréviations

BRCA1	BReast CAncer 1
BRCA2	BReast CAncer 2
CDB	Cassure Double Brin
CCI	Carcinome Canalaire Invasif
CCIS	Carcinome Canalaire <i>In Situ</i>
CLI	Carcinome Lobulaire Invasif
CLIS	Carcinome Lobulaire <i>In Situ</i>
kb	kilo base
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
XRCC2	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2
XRCC3	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3

Liste des figures et des tableaux

Liste des figures

N°	Titre	Page
1.	Coupe sagittale du sein et de la paroi thoracique antérieure	3
2.	Quadrants mammaires (sein droit)	4
3.	Illustration montrant la progression tumorale	6
4.	Classification histologique des sous types du cancer du sein	7
5.	Sous types du carcinome canalaire <i>in situ</i>	8
6.	Carcinome canalaire infiltrant	9
7.	Carcinome lobulaire <i>in situ</i> et invasif	10
8.	Classification moléculaire du cancer du sein	11
9.	Sources des cassures doubles brins de l'ADN et conséquences d'une réparation incorrecte	13
10.	Représentation schématique de la réparation par recombinaison homologue parmi les voies majeures de réparation des cassures doubles brins, indiquant la participation des plusieurs enzymes de réparation	18
11.	Étapes de la carcinogénèse mammaire	23
12.	Illustration des étapes de PCR-RFLP réalisée pour l'étude du polymorphisme RAD51 G135C	27
13.	Caractérisation schématique de l'apparition ou la disparition du site de reconnaissance pour l'endonucléase de restriction <i>Bst</i> MI porté sur un fragment de 157 bp au niveau du gène RAD51	30
14.	Caractérisation schématique de l'apparition ou la disparition du site de reconnaissance pour l'endonucléase de restriction <i>Hph</i> I porté sur un fragment de 290 bp au niveau du gène XRCC2	31

Liste des figures et des tableaux

15.	Caractérisation schématique de l'apparition ou la disparition du site de reconnaissance pour l'endonucléase de restriction <i>NlaIII</i> porté sur un fragment de 211 bp au niveau du gène XRCC3	31
16.	Analyse des produits PCR obtenus après électrophorèse sur gel d'agarose à 2% et coloration au BET suivie d'une visualisation sous UV	33
17.	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	34
18.	Profil électrophorétique des produits de PCR (157 pb sur la région 5'UTR RAD51) et de leurs produits de digestion, séparés sur un gel d'agarose à 3,5%, après coloration au BET et visualisation sous UV	35
19.	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	36
20.	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	37
21.	Exemple de profil électrophorétique d'ADN génomique extrait à partir de tissus pathologiques séparé sur un gel d'agarose à 1% après coloration au BET et visualisation sous UV	41
22.	Exemple de profil électrophorétique des produits PCR montrant l'optimisation de la concentration de MgCl ₂	43

Liste des figures et des tableaux

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I.	Quelques marqueurs moléculaires du cancer du sein	12
II.	Ensemble d'informations relatives à l'identification du gène RAD51	14
III.	Ensemble d'informations relatives à l'identification du gène XRCC2	16
IV.	Ensemble d'informations relatives à l'identification du gène XRCC3	17
V.	Description du polymorphisme RAD51 G135C	20
VI.	Description du polymorphisme XRCC2 R188H	21
VII.	Description du polymorphisme XRCC3 T241M	22
VIII.	Type et moyen d'âge des cas analysés	24
IX.	Type histologiques des échantillons analysés	24
X.	Les amorces utilisées et les tailles des séquences amplifiées sur les gènes cibles	28
XI.	Programme d'amplification par PCR commun aux trois séquences cibles des trois gènes étudiés	29
XII.	Analyse des polymorphismes des séquences cibles de RAD51, XRCC2 et XRCC3 par les enzymes de restriction	30
XIII.	Site de reconnaissance et de clivage ainsi que la température de restriction spécifiques pour chaque enzyme utilisée	32
XIV.	Distribution des génotypes des polymorphismes : RAD51 G135C, XRCC2 R188H et XRCC3 T241M dans les échantillons analysés	38

Introduction

Introduction

Le cancer du sein est un des cancers fréquents. Il est la première cause de décès chez les femmes (1), d'où son impact important sur la santé publique. Le cancer du sein est souvent détecté à un stade avancé, et son risque augmente significativement avec l'âge.

Les cellules tumorales sont généralement caractérisées par une déficience dans une des voies de réparation des lésions d'ADN. La recombinaison homologe, la voie la plus fidèle de la réparation, est régulée essentiellement par les produits des gènes RAD51, XRCC2 et XRCC3.

Récemment, l'association entre les polymorphismes nucléotidiques RAD51 G135C, XRCC2 R188H, XRCC3 T241M et le cancer du sein a pris un impact considérable dans la recherche.

L'objectif de notre étude est d'optimiser et de valider une méthodologie de recherche de biomarqueurs génétiques, en vue d'un diagnostic précoce, basée sur des techniques de biologie moléculaire, qui sont sensibles, reproductibles et fiables, comme la PCR-RFLP, afin de détecter les mutations ponctuelles d'intérêt (RAD51 G135C, XRCC2 R188H, XRCC3 T241M), et d'établir une relation entre ces différents polymorphismes et le risque de cancer du sein chez les femmes Algériennes.

Aussi, comme prospectives, nous proposons dans des travaux futurs :

- de mettre en place, sur l'ensemble des échantillons testés, une analyse par séquençage afin de confirmer nos résultats positifs et de mettre en évidence les substitutions de bases nucléotidiques les plus fréquemment rencontrées ;
- de compléter cette étude par la recherche de nouvelles mutations sur d'autres codons des gènes étudiés ;
- de rechercher la présence d'éventuelles mutations au niveau d'autres gènes de réparations de l'ADN.

Partie Bibliographique

I. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Rappel anatomique des glandes mammaires

Les seins sont les structures superficielles les plus saillantes de la paroi thoracique antérieure, spécialement chez la femme. Les glandes mammaires sont situées dans le tissu sous-cutané qui recouvre les muscles pectoraux. La quantité de tissu adipeux qui entoure le tissu glandulaire détermine les dimensions des seins. Au sommet du sein, se trouve le mamelon, entouré par un disque cutané pigmenté, l'aréole (Fig. 1).

La base plus ou moins circulaire du sein féminin s'étend transversalement depuis le bord latéral du sternum jusqu'à la ligne médio-axillaire et verticalement de la 2^{ème} à la 6^{ème} côte.

Lors de la puberté (de 8 à 15 ans), les seins s'accroissent suite au développement glandulaire et à une augmentation simultanée des dépôts graisseux. Les aréoles et les mamelons s'accroissent également pendant cette période.

Les conduits lactifères bourgeonnent pour donner naissance à 15 - 20 lobules de tissu glandulaire. Chaque lobule est drainé par un conduit lactifère (canal galactophore) qui s'ouvre en général isolément sur le mamelon. Dans la profondeur de l'aréole, chaque conduit se dilate pour former un sinus lactifère dans lequel une petite goutte de lait s'accumule ou subsiste chez la mère qui allaite.

Une petite partie de la glande mammaire peut se prolonger vers la fosse axillaire (aisselle) le long du bord inféro-latérale du muscle grande pectoral ; c'est le prolongement axillaire (de Spence). Ce prolongement peut augmenter de volume au cours du cycle menstruel et certaines femmes peuvent le prendre pour une tuméfaction ou pour un amas de nœuds lymphatiques hypertrophiés (2).

I.2. Modification au niveau des seins

Au cours du cycle menstruel et pendant la grossesse, suite à une augmentation du taux des hormones gonadotropes FSH (Follicle-Stimulating Hormone) et LH (Luteinizing Hormone), des modifications se produisent dans les tissus du sein, comme par exemple l'arborisation des conduits lactifères.

Partie Bibliographique

Chez la *femme multipare* (qui a plusieurs enfants), les seins deviennent souvent volumineux.

Chez les femmes âgées, les seins sont petits et ratatinés suite à une réduction du tissu adipeux et à l'atrophie du tissu glandulaire (2).

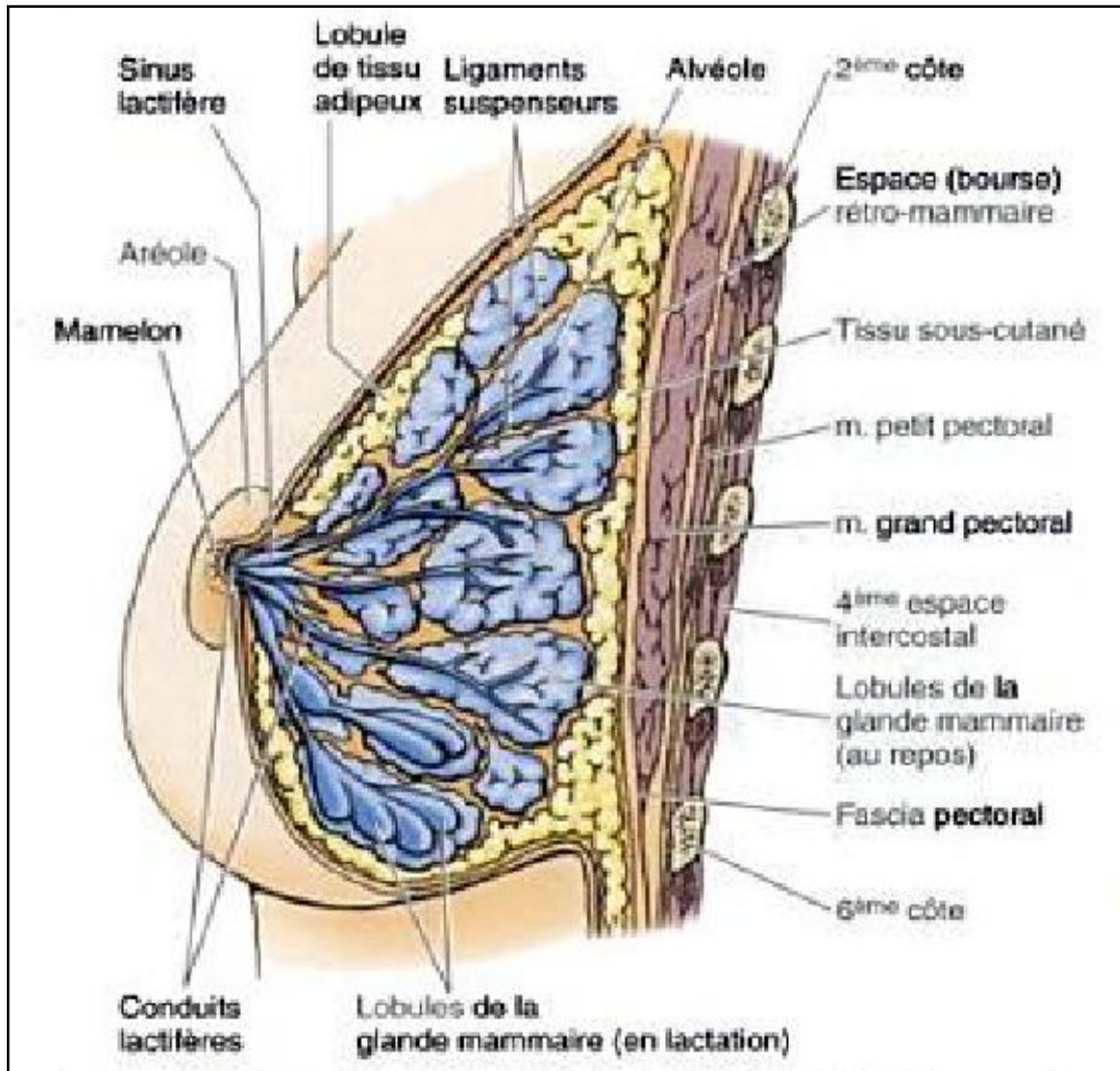


Fig. 1. Coupe sagittale du sein et de la paroi thoracique antérieure. Le sein comprend du tissu glandulaire, des tissus fibreux et adipeux situés entre les lobes et les lobules glandulaires, des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que les nerfs. Dans ses deux tiers supérieurs, la figure illustre schématiquement les ligaments suspenseurs et les alvéoles du sein, avec les lobules de la glande mammaire au repos. La partie inférieure montre les lobules glandulaires pendant la lactation (2).

I.3. Quadrants mammaires

Pour faciliter la localisation anatomique et la description des tumeurs, la surface du sein est subdivisée en quatre quadrants.

- Quadrant supéro-latéral.
- Quadrant supéro-médial.
- Quadrant inféro-médial.
- Quadrant inférolatéral.

Comme il est représenté dans la figure 2.

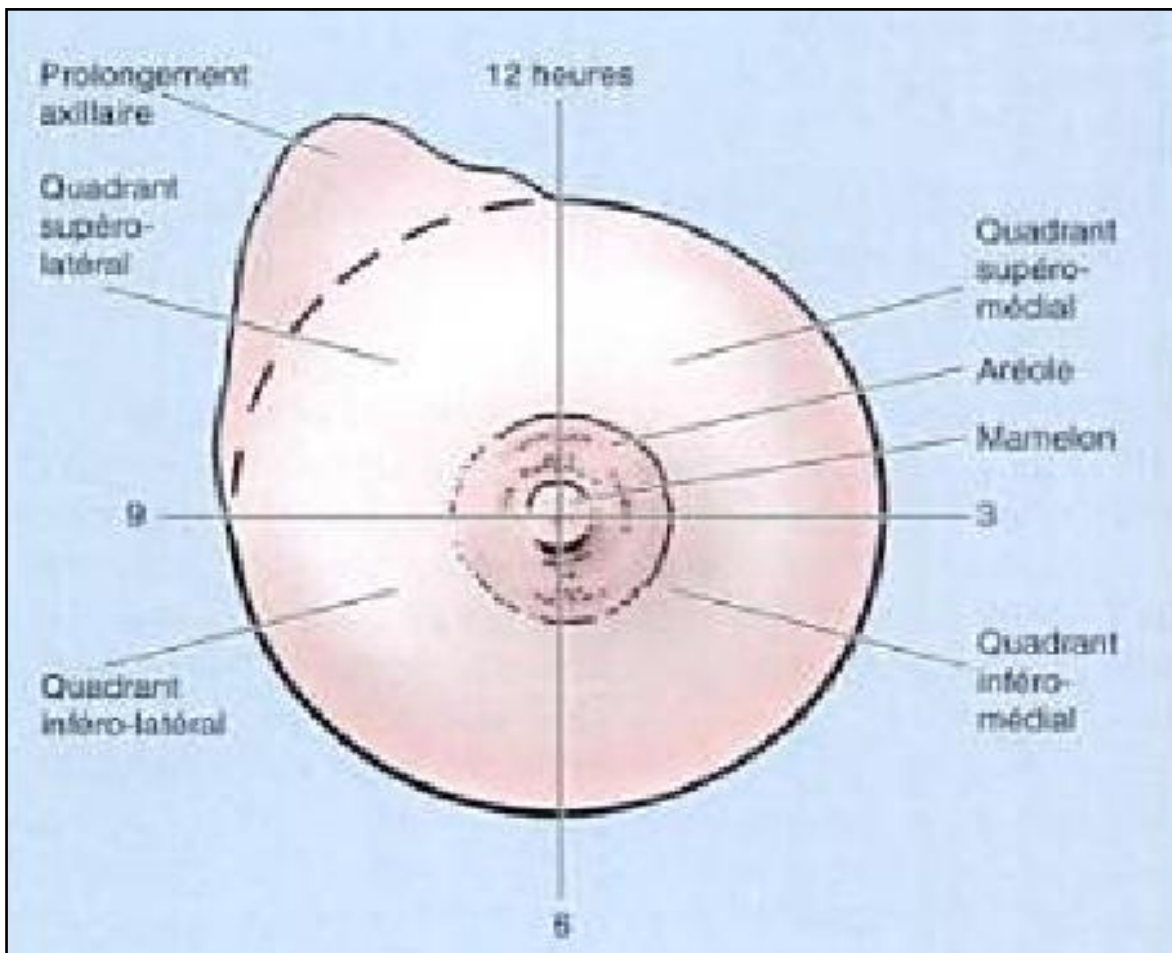


Fig. 2. Quadrants mammaires (sein droit) (2).

I.4. Pathologie du cancer du sein

I.4.1. Facteurs de promotion tumorale

Le risque du cancer du sein est augmenté par plusieurs facteurs comme : le genre et l'âge. L'obésité est encore associée à une augmentation du risque d'adénocarcinome du sein ; une alimentation riche en graisses animales est associée à une incidence accrue de cancer du sein.

Les caractéristiques de la vie reproductive constituent aussi des facteurs de risque pour ce type de cancer comme : la puberté précoce, la première grossesse à l'âge > 30 ans, le manque de grossesse ou d'allaitement, les niveaux plus élevés des hormones et la ménopause tardive. Les mutations des gènes de prédisposition tumorale (BRCA1 et 2 ; BRCA1 et BRCA2), et les antécédents familiaux du cancer du sein sont encore considérés comme des facteurs de risque pour la prédiction du cancer du sein (1, 3-5).

I.4.2. Diagnostic du cancer du sein

Avec l'âge, la glande mammaire connaît une involution adipeuse. La pathologie bénigne (kystes, adénofibromes, mastite inflammatoire...) est rare, donc toute masse palpable est suspecte d'être cancéreuse. Par ailleurs, l'involution adipeuse facilite grandement l'examen clinique et la mammographie.

La tuméfaction mammaire est retrouvée par la patiente ou lors d'un examen médical par exemple aux Etats Unis, plus de 85% des femmes âgées détectent leur cancer du sein elles-mêmes, 12% sont détectés par le médecin et moins de 5% par une mammographie systématique. Les cancers du sein diagnostiqués sont souvent à un stade plus avancé. On note, par exemple, trois fois plus de patientes métastasées d'emblée chez les femmes âgées que chez les femmes jeunes. Il existe donc un retard au diagnostic et à la thérapeutique propre aux patientes âgées, probablement de leurs fait mais aussi par l'attitude des médecins qui, selon l'âge, vont avoir une attitude différente (6).

I.4.3. Invasion et pouvoir métastatique

L'invasion des tissus éloignés par les cellules cancéreuses est la cause principale du décès des patientes atteintes de cancer du sein, plutôt que les tumeurs primaires elles-mêmes. La métastase cancéreuse se développe selon plusieurs étapes parmi lesquelles, le détachement des cellules métastatiques des cellules adjacentes, l'acquisition de la motilité et l'invasion d'un nouveau tissu (7).

Le Carcinome Canalaire Invasif (CCI) est le type le plus répandu des cancers du sein avec un très mauvais pronostic. Il est reconnu que le Carcinome Canalaire *In Situ* (CCIS) est le véritable précurseur du CCI (Fig. 3) (8).

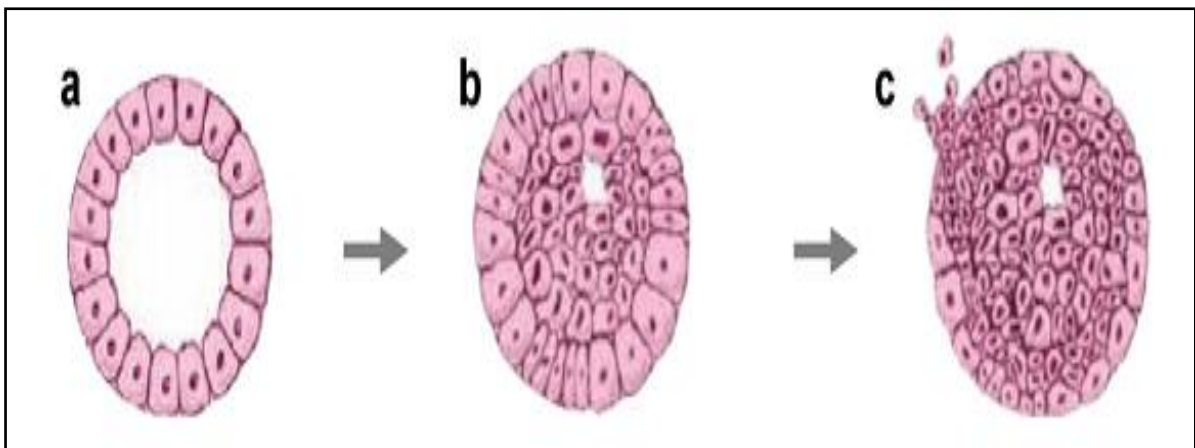


Fig. 3. Illustration montrant la progression tumorale. a : un canal galactophore normal avec une couche de cellules épithéliales ; b : carcinome canalaire *in situ* où les cellules malignes prolifèrent à l'intérieur de la membrane basale vers la lumière du canal ; c : cancer invasif où les cellules malignes prolifèrent et se propagent à travers la membrane basale (8).

I.4.4. Classification des cancers du sein

I.4.4.1. Classification histologique du cancer du sein

Les cancers du sein peuvent être classés en carcinomes *in situ* et carcinomes invasifs (infiltrant) (Fig. 4) (9).

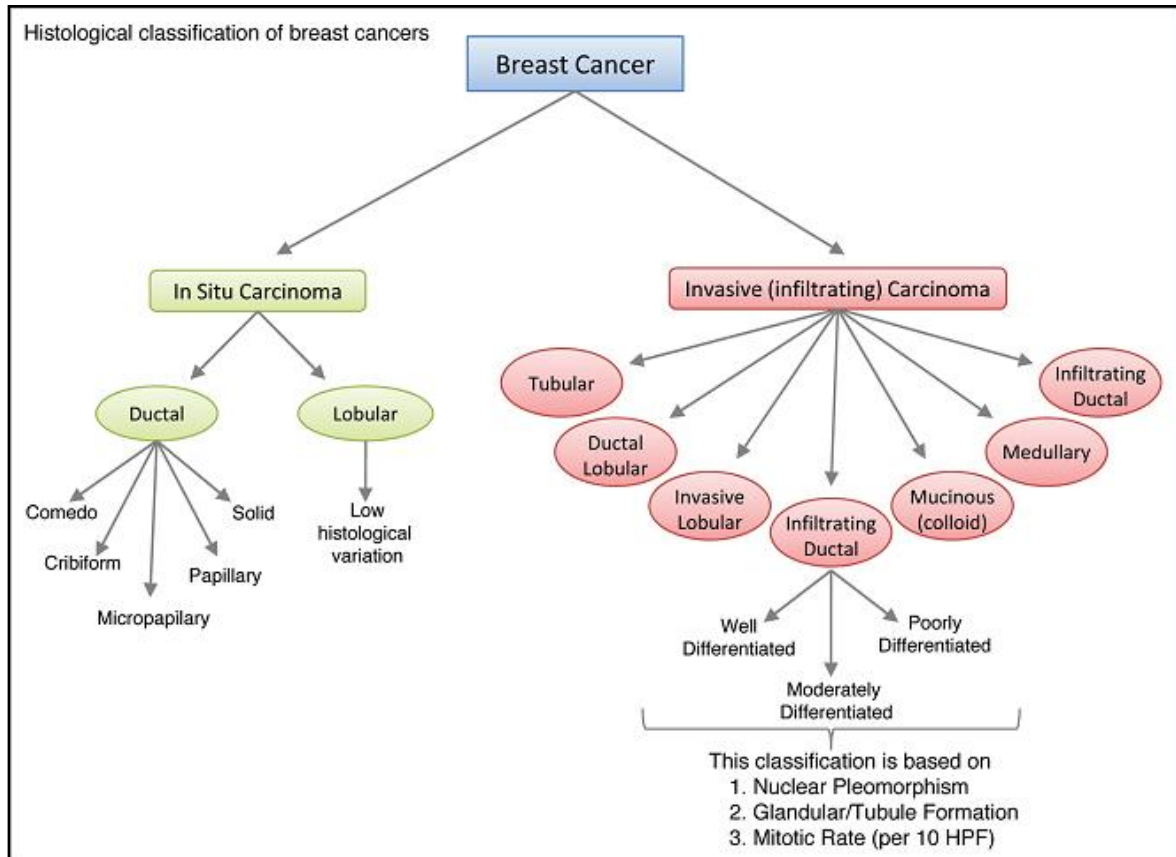


Fig. 4. Classification histologique des sous types du cancer du sein (9).

I.4.4.1.1. Les carcinomes non invasifs (*in situ*)

a. Le Carcinome Canalaire *In Situ* (CCIS)

Ce type est plus commun que le carcinome lobulaire *in situ* (9). Il représente 10% de l'ensemble des cancers du sein (10). Le CCIS est une prolifération des cellules malignes dans les structures canalaire de la glande mammaire sans franchissement de la lame basale (10, 8). Sous le vocable de CCIS, il existe un groupe hétérogène de lésions histologiques qui diffèrent dans leurs modes de croissance et leurs caractéristiques cytologiques (Fig. 5) (8).

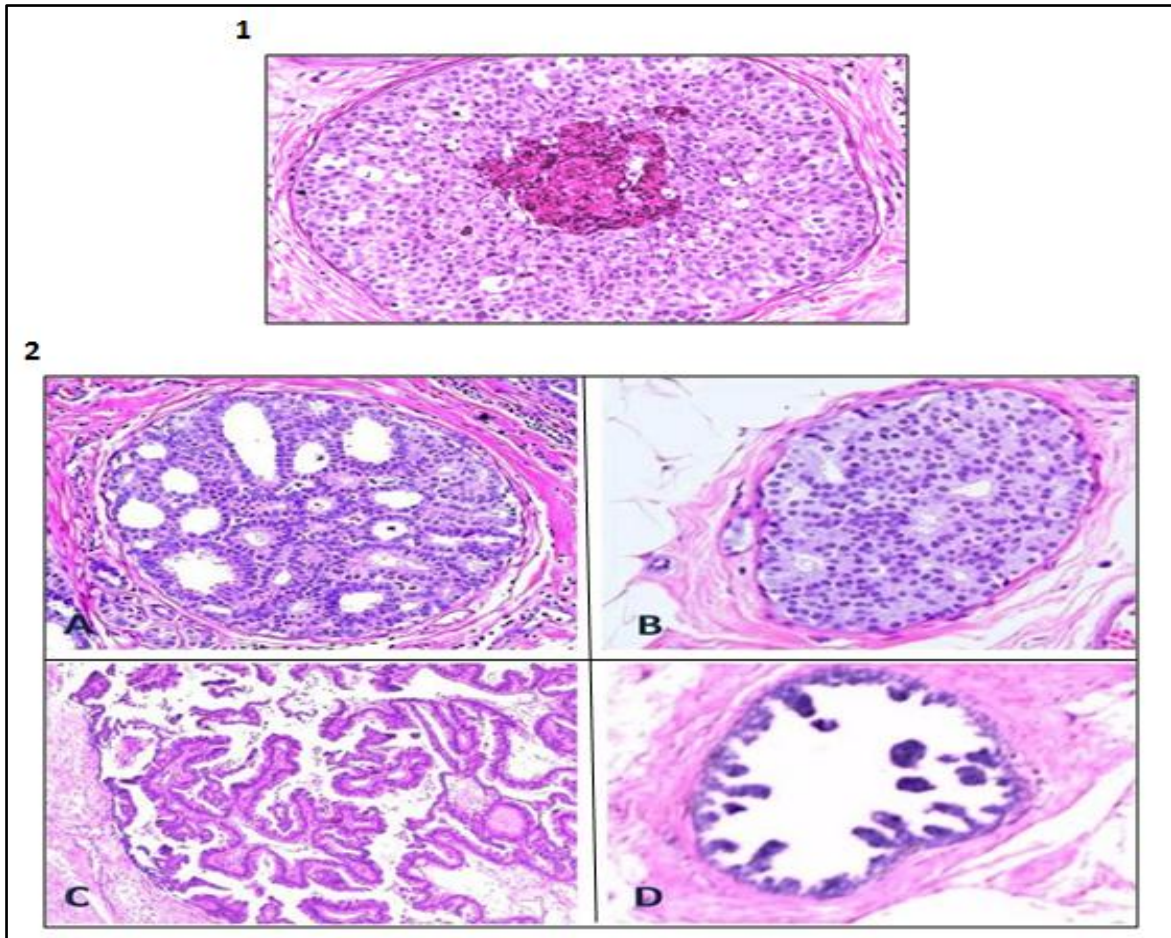


Fig. 5. Sous types des carcinomes canaux in situ. 1. Carcinomes canaux in situ de type comédons avec nécrose centrale. Les cellules tumorales sont grandes, de formes irrégulières, avec un polymorphisme nucléaire, des mitoses anormales et une nécrose abondante. Les débris cellulaires nécrotiques au centre des espaces impliqués se calcifient et ces calcifications sont détectées par la mammographie. **2. Carcinomes canaux in situ de type non comédon.** **A.** Le type cribiforme : les cellules tumorales sont plus petites à cause d'un ralentissement de la croissance et noyaux monomorphes. Elles prolifèrent de manière fenêtrée. **B.** Le type solide : les cellules tumorales remplissent complètement et dilatent les espaces impliqués sans fenestration. **C.** Le type papillaire : les cellules tumorales montrent des noyaux au sein de projections fibrovasculaires intraluminales constituant de vraies papilles. **D.** Le type micropapillaire : les cellules tumorales sont de petite taille avec des noyaux monomorphes. Elles prolifèrent dans de petites touffes orientées perpendiculairement à la membrane basale et projetées dans la lumière (8).

b. Carcinome Lobulaire In Situ (CLIS)

Le CLIS est un carcinome intéressant les canalicules intralobulaires qui sont comblés et distendus par une prolifération de cellules peu jointives sans envahissement du

tissu conjonctif voisin. Les cellules tumorales peuvent se propager dans les canaux extralobulaires (diffusion pagétoïde) et remplacer les cellules de l'épithélium canalaire. C'est, cependant, une maladie d'évolution très lente et l'évolution vers un cancer infiltrant n'est pas obligatoire (11).

I.4.4.1.2. Carcinomes invasives

a. Le Carcinome Canalaire Invasif (CCI)

Le carcinome canalaire invasif, **Not Otherwise Specified** (canalaire NOS) constitue le plus large groupe du cancer du sein. Il est un groupe hétérogène des tumeurs qui ne présente pas des caractéristiques suffisantes pour être classé comme un type histologique spécifique (Fig. 6) (12).

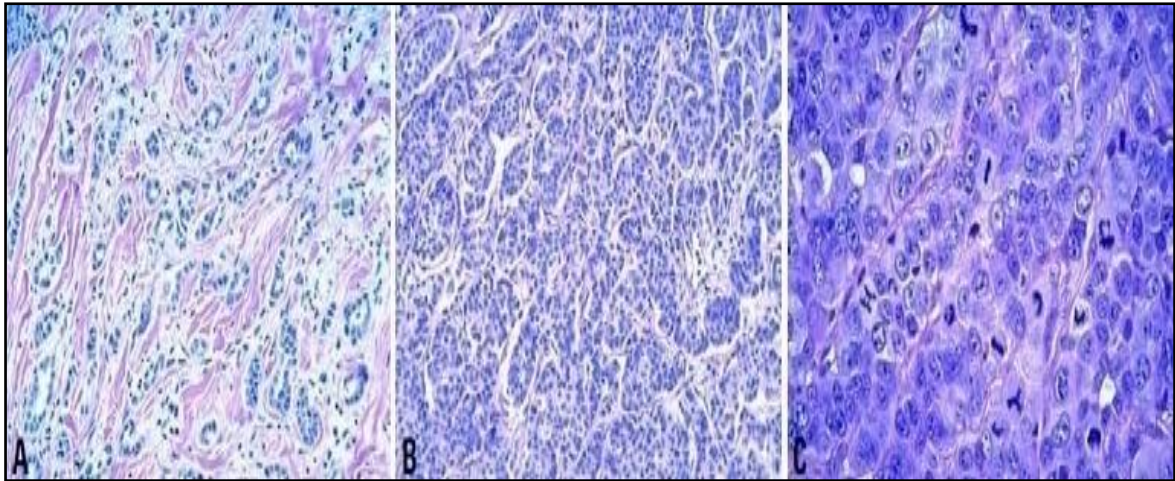


Fig. 6. Carcinomes canaux infiltrants. **A.** Carcinome canalaire infiltrant, grade I. **B.** Carcinome canalaire infiltrant grade II. **C.** Carcinome canalaire invasif NOS, grade III avec aucune évidence de différenciation glandulaire. Il faut noter la présence de plusieurs cellules au cours de la mitose en présence de quelques anomalies mitotiques (12).

b. Le Carcinome Lobulaire Invasif (CLI)

Le CLI est le type spécial le plus commun et le deuxième type commun parmi tous les types de cancer du sein (13). Ce type est associé à un CLIS, il est composé des cellules non cohésives dispersées individuellement ou arrangées sous forme d'une seule file linéaire dans une matrice fibreuse (Fig.7) (12).

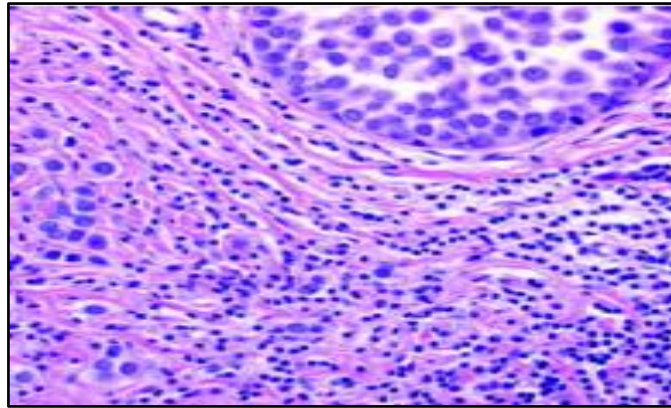


Fig. 7. Carcinome lobulaire *in situ* et invasif. Les grandes cellules dans le côté gauche inférieure du champ sont des cellules tumorales invasives (12).

I.4.4.2. Classification moléculaire intrinsèque

Communément, quatre entités de cancer du sein ont été définies (Fig. 8).

I.4.4.2.1. Les cancers du sein dits «luminaux» : sont caractérisés par l'expression des récepteurs aux estrogènes et du facteur de transcription GATA3. Ils se divisent en deux catégories :

a- les sous-types d'origine luminaire A : se caractérisent par une prolifération cellulaire peu élevée.

b- les sous-types d'origine luminaire B : se caractérisent par une prolifération cellulaire plus élevée.

I.4.4.2.2. Les cancers du sein dits «Her2 +++» : surexpriment l'oncoprotéine cErbB2 Her2, protéine appartenant à la superfamille des récepteurs à l'EGF (Epidermal Growth Factor), mais, également, peuvent exprimer les récepteurs aux estrogènes et à la progestérone.

I.4.4.2.3. Les cancers du sein de phénotype basal : n'expriment ni les récepteurs hormonaux, ni l'oncoprotéine Her2. Ce dernier présente un profil d'expression protéique particulier. En outre, une tumeur mammaire, pour être de phénotype basal, doit également exprimer une partie des marqueurs « basaux » soit des cytokératines 5/6, 17, 14, EGFR, c-kit, la moesine, la caveoline, NGFR/p75 (Fig. 8). Ces tumeurs sont généralement mutées pour p53.

Il reste cependant des tumeurs ne correspondant à aucune de ces catégories et, en particulier, des tumeurs triple négatives non basales, pour lesquelles les ressources

thérapeutiques sont limitées. La classification en luminal A ou B ne tient pas compte des récepteurs à la progestérone (14).

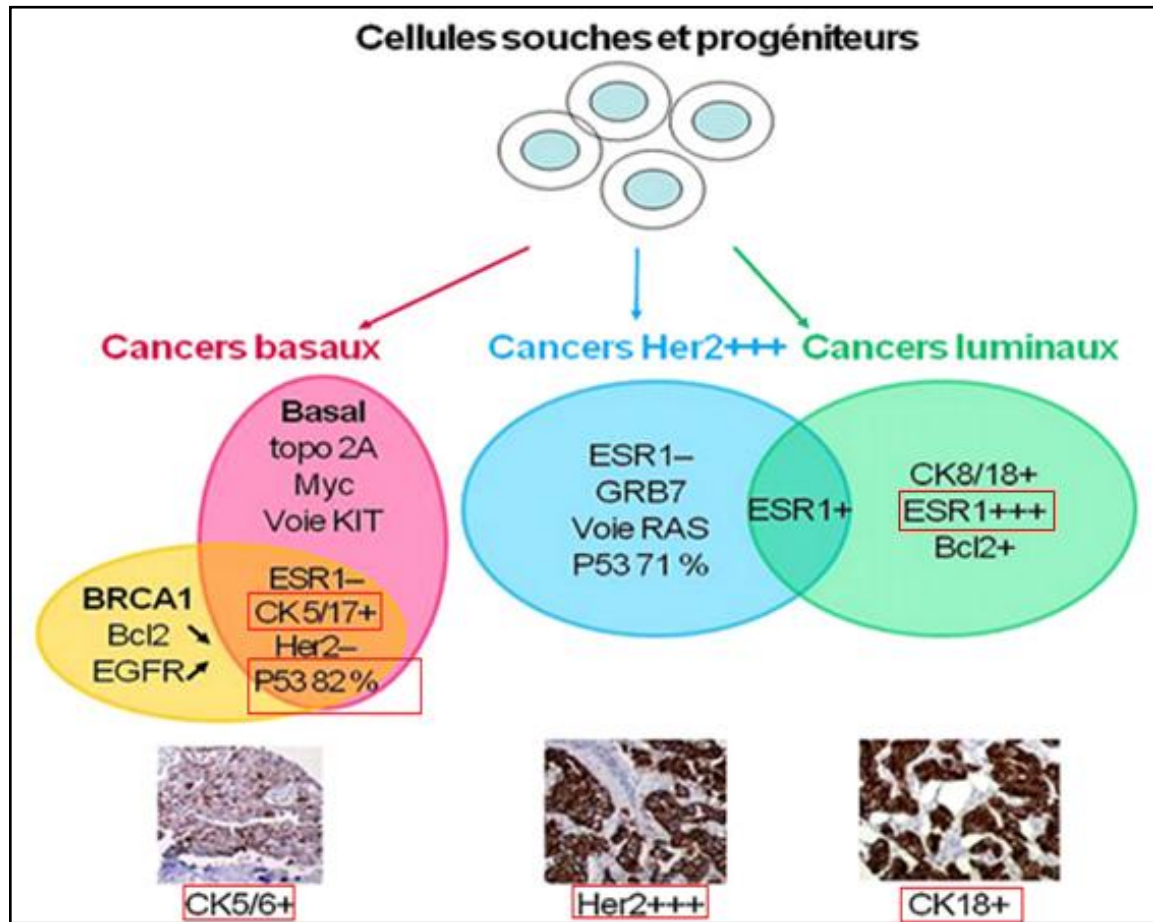


Fig. 8. Classification moléculaire du cancer du sein. Les cancers de type basal surexpriment les cytokératines 5/6. Les cancers de type Her2+++ surexpriment l'oncoprotéine Her2. Les cancers de type luminal surexpriment les récepteurs aux oestrogènes et la cytokératine CK18 (14).

I.4.5. Quelques marqueurs moléculaires du cancer du sein

Le cancer du sein apparaît comme une maladie génétique complexe caractérisée par l'accumulation et la combinaison de multiples altérations moléculaires (Tableau I) (15).

Partie Bibliographique

Tableau I. Quelques marqueurs moléculaires du cancer du sein (15).

Gène	Fonction
ERBB2/HER2	Code pour un récepteur du EGF ; un récepteur transmembranaire à activité Tyrosine kinase. L'amplification du gène ou la surexpression de la protéine sont rencontrées dans presque 25% des cas du cancer du sein.
TOP2A	Code pour une ADN topo-isomérase, contrôle et change les états topologiques de l'ADN pendant la transcription. Il est associé au développement de la résistance à la chimiothérapie.
TAU	Code pour une protéine associée aux microtubules TAU (MAPT : Microtubules Associated Protein TAU), qui joue un rôle dans le maintien de la forme cellulaire, le transport des microvésicules et la formation des axes. Elle interfère dans les dynamiques des axes des microtubules, et cause l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose.
P53	Répond à plusieurs stress cellulaires pour régler ses gènes cibles, qui induisent l'arrêt de cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence ou la réparation de l'ADN.
BRCA1	BRCA1 joue un rôle dans le maintien de la stabilité génétique. Il agit comme un suppresseur de tumeur. Des mutations sur ce gène sont responsables de presque 40% des cancers du sein héréditaires.
HIC-1	Hyperméthylé dans le cancer, il subit une perte allélique dans le cancer du sein et d'autres cancers humains. Le HIC-1 est un gène cible de P53.
RDM1	Code pour la protéine RAD52, qui joue un rôle dans la réparation des cassures double brins de l'ADN par recombinaison homologue. Les perturbations dans le gène RDM1 conduisent à une augmentation de la sensibilité au cisplatine (agent anticancéreux).

I.5. Réparation de l'ADN par Recombinaison Homologue (RRH) et cancer du sein

Les cellules sont sous une pression génotoxique permanente à partir des sources endogènes et exogènes. Il a été estimé que dans une seule cellule humaine, plus d'une dizaine de milliers de lésions d'ADN se produisent chaque jour (16, 17). Parmi ces dernières, les Cassures Doubles Brins (CDB) sont les plus létales. Non réparé, un CDB mène à la perte d'un segment de chromosome et menace la survie de la cellule (18) (Figure 9).

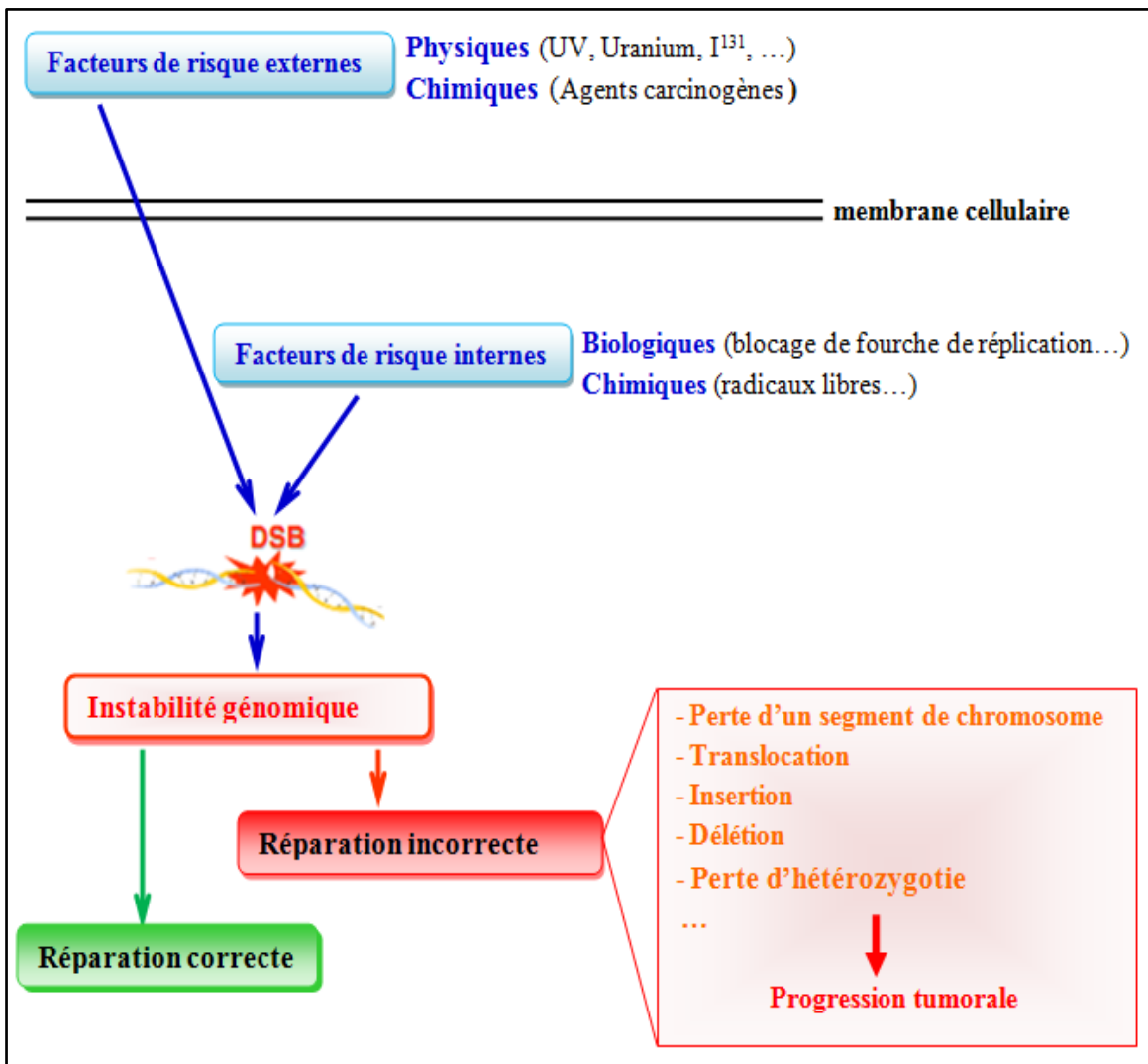


Fig. 9. Sources des cassures doubles brins de l'ADN et conséquences d'une réparation incorrecte.

Partie Bibliographique

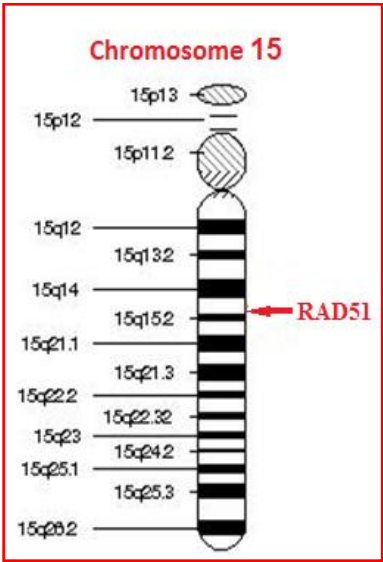
I.5.1. Quelques gènes clés de la réparation par recombinaison homologue

La réparation d'ADN par recombinaison homologue est contrôlée essentiellement par les produits du gène RAD51 et ses paralogues structurales, RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, et XRCC3 (17).

I.5.1.1. Le gène RAD51

Le gène RAD51 se trouve sur le chromosome 15, bras long (q), position 15.1 ; (15q15.1) (19). Il contient 10 exons et recouvre au moins 30 Kb (20). Au cours de la progression normale du cycle cellulaire, la transcription de RAD51 est induite pendant la phase S et G2 (21).

Tableau II. Ensemble d'informations relatives à l'identification du gène RAD51.

Nom officiel		Localisation
Radiation Sensitivity Abnormal		<u>Chromosome : 15 ;</u> <u>Localisation : 15q15.1</u>
Symbole officiel	Symboles synonymes	
RAD51	RECA; BRCC5; MRMV2; HRAD51; RAD51A; HsRad51; HsT16930	
Identifiants (IDs) dans les différentes bases de données		
Gene ¹	<u>5888</u>	Localisation (UCSC) <u>Ch15 : 40987327..41024356</u>
UGNC ²	<u>9817</u>	
Ensembl ³	<u>ENSG00000051180</u>	
HPRD ⁴	<u>01557</u>	
MIM ⁵	<u>1796175</u>	

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=5888>

² http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=9817

³ http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000051180;r=15:40986972-41024354

⁴ http://www.hprd.org/summary?hprd_id=01557&isoform_id=01557_1&isoform_name=Isoform_1

⁵ <http://omim.org/entry/179617>

Le gène RAD51 code pour une protéine de 36,966 kDa (22, 23) caractérisée par deux motifs appelés Walker A et Walker B, qui ont un rôle dans la liaison aux nucléotides, et dans l'activité de RAD51 et ses paralogues. Elle existe sous forme d'un heptamère en solution, (24, 23). La protéine RAD51 est l'acteur central de la RRH. L'activité de RAD51, durant la phase S et l'activation suite à l'exposition aux agents endommageant l'ADN est souvent caractérisée par une relocalisation de la protéine RAD51 diffuse, en des foyers dispersés dans le noyau, dont elle se polymérise en un filament nucléoprotéique indispensable pour la recherche d'une séquence d'ADN homologue au fragment altéré et pour l'échange entre les deux brins (altéré et sain) (23, 25, 26). L'importance du rôle de la protéine RAD51 et de la RH est démontrée par le fait que l'inactivation du gène RAD51 dans des souris cause une instabilité génétique sévère suivie par une mort précoce des animaux (pendant les stades embryonnaires) (24).

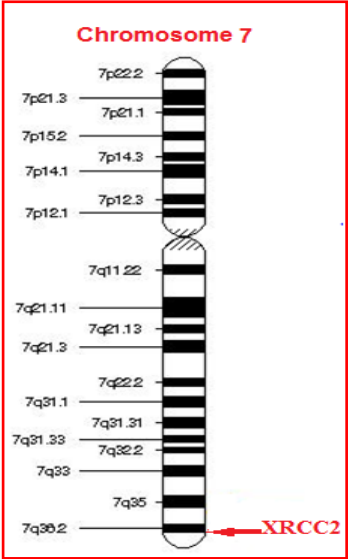
I.5.1.2. Le gène XRCC2

Le gène XRCC2 se trouve sur le chromosome 7, bras long (q), position 36.1 ; 7q36.1 (27) (Tableau III).

Le gène XRCC2 est un paralogue de RAD51. Il code pour une protéine clé de la RRH. Cette protéine est caractérisée par la présence des motifs Walker A et Walker B, caractéristiques de RAD51 et de ses paralogues. Ces motifs fournissent des sites de liaison avec les nucléotides et confèrent aux paralogues une activité ATPase. Pendant la réparation, par recombinaison homologue, la protéine XRCC2 forme un hétéro-tétramère avec RAD51B, C et D, et un hétérodimère avec RAD51B. Ces structures jouent des rôles très importants pendant les stades précoces de la RRH en aidant la protéine RAD51 à faire son rôle (28).

Partie Bibliographique

Tableau III. Ensemble d'informations relatives à l'identification du gène XRCC2.

Nom officiel		Localisation
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2		<u>Chromosome : 7;</u> <u>Localisation : 7q36.1</u>
Symbole officiel	Symboles synonymes	
XRCC2	/	
Identifiants (IDs) dans les différentes bases de données		
Gene ¹	<u>7516</u>	
UGNC ²	<u>12829</u>	
Ensembl ³	<u>ENSG00000196584</u>	
HPRD ⁴	<u>02656</u>	
MIM ⁵	<u>600357</u>	
		Localisation (UCSC)
		<u>Ch7:152343583..152373250</u>

Le gène XRCC2 a un rôle primordial pour la survie cellulaire dont son invalidation chez des souris cause la mort pendant les stades précoces de l'embryogénèse (29). L'importance de la protéine XRCC2 dans la RRH a été démontrée par le fait que les cellules déficientes en le gène XRCC2 présentent une réduction sévère de la RRH (plus que 100 fois inférieur à la capacité de la RRH des cellules normales) (30).

¹ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=7516

² http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=12829

³ http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000196584;r=7:152341864-152373250

⁴ http://www.hprd.org/summary?hprd_id=02656&isoform_id=02656_1&isoform_name=Isoform_1

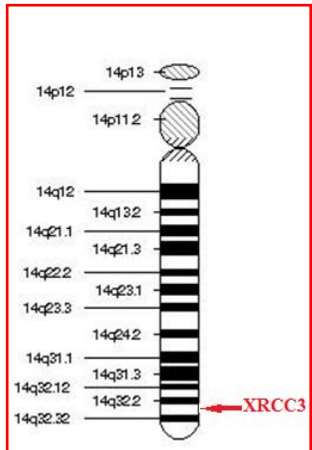
⁵ <http://omim.org/entry/600375>

Partie Bibliographique

I.5.1.3. Le gène XRCC3

Le gène XRCC3 est situé sur le chromosome 14, bras long (q), position 32.3 (14q32.3) (27) (Tableau IV).

Tableau IV. Ensemble d'informations relatives à l'identification du gène XRCC3.

Nom officiel		Localisation
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3		Chromosome :14 ; Localisation : 14q32.3
Symbole officiel	Symboles synonymes	
XRCC3	CMM6	
Identifiants (IDs) dans les différentes bases de données		
Gene ¹	<u>7517</u>	
UGNC ²	<u>12830</u>	
Ensembl ³	<u>ENSG00000126215</u>	
HPRD ⁴	<u>07201</u>	
MIM ⁵	<u>600675</u>	
		Localisation (UCSC)
		<u>Ch14 : 104163954..104181823</u>

Ce gène code pour une protéine clé de la RRH. Elle joue un rôle important dans la réponse aux dommages d'ADN pendant la phase S du cycle cellulaire et la réparation des CDB par RH. Son rôle est primordial, car il a été démontré que l'inactivation du gène XRCC3 cause une instabilité génétique, qui est une des caractéristiques des cellules tumorales (31).

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7517>

² http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=12830

³ http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000126215;r=14:104163946-104181841

⁴ http://www.hprd.org/summary?hprd_id=07201&isoform_id=07201_1&isoform_name=Isoform_1

⁵ <http://omim.org/entry/600675>

La protéine XRCC3 fonctionne comme un cofacteur de la protéine RAD51 grâce à la formation d'un hétérodimère avec la protéine RAD51C (28). Elle est caractérisée par la présence des deux motifs de liaison avec les nucléotides : Walker A et Walker B (32). La fonction de chaque partie de la protéine XRCC3 n'est pas encore complètement déterminée (33).

Récemment, il a été démontré que cette protéine est une cible de la phosphorylation par les kinases ATM/ATR, de ce fait, elle intervient pendant les stades précoces de la réponse aux dommages d'ADN (34).

I.5.2. Réparation des cassures doubles brins d'ADN par recombinaison homologue

La RH est une des voies de réparation des cassures doubles brins (Figure 10). Cette voie est la plus fidèle qui nécessite la présence d'une chromatide sœur qui peut servir comme un modèle pour la réparation de la lésion. Ainsi ce mode de réparation n'est disponible qu'au cours des phases S et G2 du cycle cellulaire (35, 36)

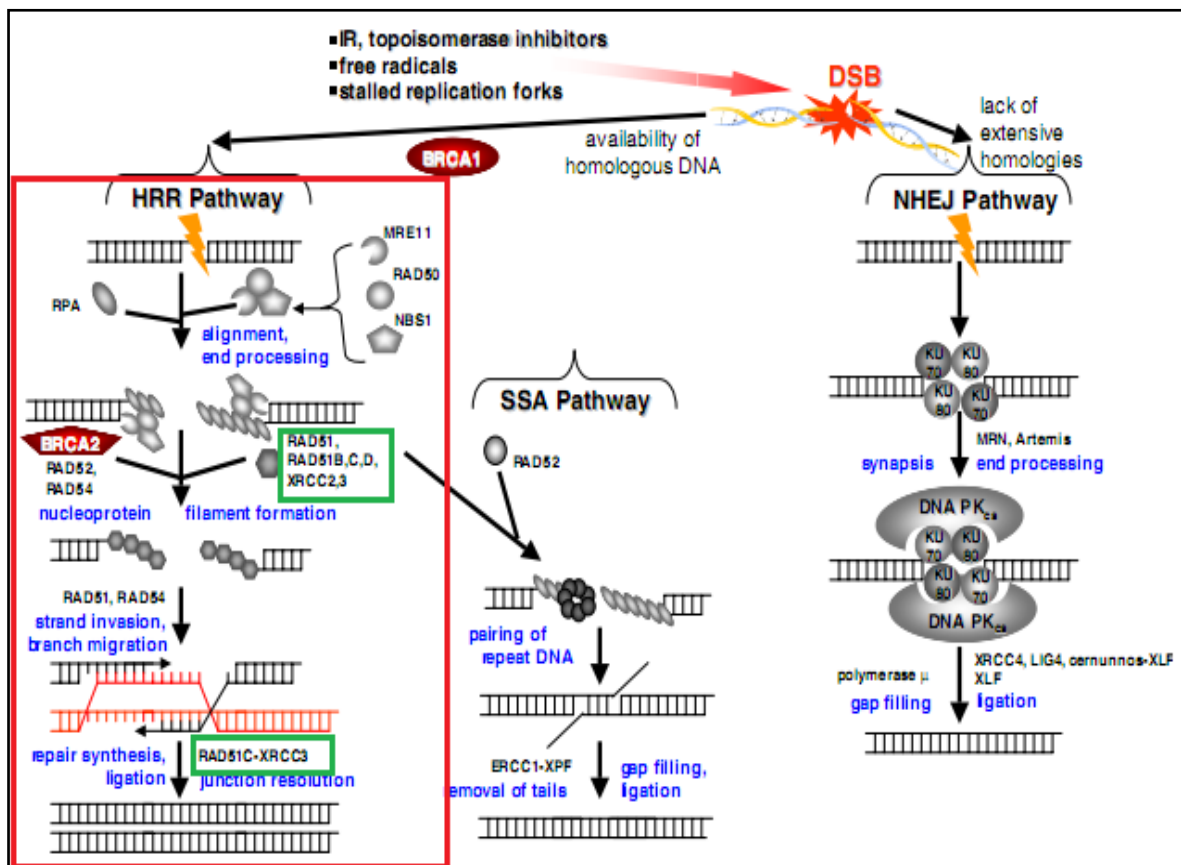


Fig. 10. Représentation schématique de la réparation par recombinaison homologue parmi les voies majeures de réparation des cassures doubles brins, indiquant la participation des plusieurs enzymes de réparation (28).

Après la CDB, des protéines comme 53BPI se fixent sur les extrémités endommagées pour les protéger contre les exonucléases.

S'il existe un ADN homologue, la protéine BRCA1 intervient pour éliminer ces protéines et favoriser la résection d'ADN comme une des premières étapes de la recombinaison homologue (37). Cette étape est réalisée par le complexe protéique MRN (MRE11, RAD50 et NBS1), qui est activé par une protéine appelée CtIP (CtIP stimule l'activité endonucléasique de MRE11) (28, 37, 36). La résection se fait dans le sens 5' → 3' libérant des queues 3' simples brins. La protéine RPA se lie aux queues formées pour enlever la structure secondaire de l'ADN.

Pendant l'étape centrale de la recombinaison homologue, la protéine RAD51 forme un filament nucléoprotéique au tour des extrémités 3' simples brins, mais l'affinité de la protéine RPA est plus que celle de RAD51. À ce moment, la protéine BRCA2 se fixe à RAD51 en favorisant le remplacement de RPA par RAD51 (28, 36, 38). Ce filament nucléoprotéique catalyse la recherche et l'invasion d'une séquence homologue à la séquence altérée, sur la chromatide sœur. Cependant, la protéine RAD51 humaine montre une faible activité. Mais les cofacteurs de la protéine RAD51 comme ses paralogues : XRCC2, XRCC3, RAD51B, RAD51C et RAD51D, aussi bien que RAD52 et RAD54 supportent leur rôle durant la RRH grâce à la formation d'un hétérotétramère (RAD51 B, C, D et XRCC2), et deux hétérodimères : (RAD51C et XRCC3) et (RAD51B et XRCC2) (28).

Après l'invasion de la chromatide sœur, les deux brins (sain et altéré) sont alignés avec les régions homologues dans la chromatide sœur. La synthèse d'ADN, catalysée par l'ADN polymérase δ , est réalisée à partir de l'extrémité 3' pour réparer la séquence d'ADN altérée. Une fois la réplication est terminée, la jonction Holliday est résolue par les ADN résolvas. Finalement les extrémités d'ADN sont liées (36).

I.5.3. Implication de la recombinaison homologue dans la progression tumorale

La voie de la RH fournit un mécanisme de réparation pour les formes les plus létales des dommages d'ADN. En cas de non réparation, une CDB conduit à la perte de segments de chromosome et menace la survie cellulaire. Il n'est pas étonnant, que des mutations dans plusieurs gènes de la RH conduisent à l'accumulation des CDBs non réparées et sont

Partie Bibliographique

associées à la progression tumorale (32). Une fausse réparation par la RH peut conduire à la perte d'hétérozygotie (où la RH a lieu entre les chromosomes paternels et maternels) ou insertions/délétions (où des répétitions ne sont pas alignées correctement) (38). En outre, les cellules cancéreuses sont souvent défectueuses dans une des voies majeures de réparation d'ADN et des mutations héritées, qui affectent les gènes de réparation d'ADN, sont fortement associées à un haut risque de cancer (39).

I.5.3.1. Polymorphisme RAD51 G135C et progression tumorale

Le polymorphisme G135C du gène RAD51 (Tableau V) est situé dans la région non codante 5'UTR, ainsi il pourrait affecter l'expression du gène (la stabilité de l'ARNm et/ou l'efficacité de la traduction), conduisant à un niveau altéré de concentration de la protéine RAD51, qui pourrait influencer l'activité du complexe protéique de la réparation d'ADN, incluant BRCA1, BRCA2 et RAD51 (40, 5).

Tableau V. Description du polymorphisme RAD51 G135C.

Gène	Polymorphisme	Localisation	Mutation ponctuelle	Changement dans la séquence protéique	Changement de la restriction	Référence de l'SNP rs
RAD51	Allèle sauvage	5'UTR* (région non codante)	Présence d'une guanine (G) en position 135	/	Présence d'un site de restriction <i>Bst</i> MI dans la région 157 bp autour du nucléotide 135	/
	RAD51 G135C	5'UTR* (région non codante)	Substitution de (G) en (C) : G135C	Aucune	Absence de site de restriction <i>Bst</i> MI	rs1801320

*UTR : untranslated region

Partie Bibliographique

Une surexpression de la protéine RAD51 a été rapportée dans les cellules immortalisées et tumorales. Cette surexpression favorise l'aneuploïdie et plusieurs réarrangements chromosomiques. Aussi bien la résistance aux radio et chimiothérapie. Ces informations fournissent une corrélation entre des niveaux élevés de la protéine RAD51, l'instabilité du génome, ainsi l'apparition et la progression tumorale (41, 42).

I.5.3.2. Polymorphisme XRCC2 R188H et progression tumorale

Le polymorphisme XRCC2 R188H (Tableau VI) est une substitution de l'acide aminé Arginine 188 dans l'exon 3 de la protéine XRCC2 par une Histidine. Cette substitution est due à la transition d'un nucléotide A vers un autre G à la position 31479 du gène XRCC2 (42).

Tableau VI. Description du polymorphisme XRCC2 R188H.

Gène	Polymorphisme	Localisation	Mutation ponctuelle	Changement dans la séquence protéique	Changement de la restriction	Référence de l'SNP rs
XRCC2	Allèle sauvage	Exon 3, nucléotide 31479, codon 188	Présence d'une guanine (G) en position 31479, Codon 188	Le codon 188 code pour une arginine	Absence de site de restriction <i>HphI</i> dans la région 290 bp autour du nucléotide 31479	/
	XRCC2 G31479A R188H	Exon 3, nucléotide 31479, codon 188	Substitution de (G) en (A): G31479A	Substitution d'une arginine par une histidine en position 188	Apparition d'un site de restriction <i>HphI</i>	rs3218536

Le rôle de la position 188 dans le fonctionnement de la protéine XRCC2 est inconnu (18), mais l'acide aminé 188 est conservé chez l'homme, la souris et le rat, suggérant un rôle important dans l'activité de la réparation de l'ADN (43). Les polymorphismes dans ce

Partie Bibliographique

gène ont fait l'objet de plusieurs études, et les variants du gène XRCC2 ont été considérés comme ayant la capacité d'affecter la prédisposition à, la survie du cancer du sein (44, 28, 18).

I.5.3.3. Polymorphisme XRCC3 T241M et progression tumorale

La substitution T241M est le polymorphisme le plus étudié dans le gène XRCC3. Elle est due à une transition C>T au niveau du nucléotide 18067 sur l'exon 7 du gène XRCC3 (Tableau VII). C'est le polymorphisme le plus fréquent du gène XRCC3 et le plus étudié (33, 44, 45).

Tableau VII. Description du polymorphisme XRCC3 T241M.

Gène	Polymorphisme	Localisation	Point de mutation	Changement dans la séquence protéique	Changement de la restriction	Référence de l'SNP rs
XRCC3	Allèle sauvage	Exon 7, nucléotide 18067 codon 241	Présence d'une cytosine (C) à la position 18067 codon 241	Le codon 241 code pour une thréonine	Absence de site de restriction <i>Nla</i> III dans la région 211 bp autour du nucléotide 18067	/
	XRCC3 C18067T T241M	Exon 7, nucléotide 18067 codon 241	Substitution de (C) en (T) C18067T	Substitution d'une thréonine par une méthionine en position 241	Apparition d'un site de restriction <i>Nla</i> III	rs861539

Cette transition change l'acide aminé d'un résidu hydrophile neutre, avec un groupement hydroxyle, par un autre acide aminé hydrophobe avec un groupement sulfure. Ce changement peut conduire à un changement structural et fonctionnel de la protéine (44). En plus, l'acide aminé T241 se trouve au voisinage du motif Walker B, donc la substitution peut avoir un effet sur la fixation de l'ATP et l'efficacité de la réparation de l'ADN conduisant à l'instabilité génétique, par conséquent à une susceptibilité au cancer (33).

I.5.3.4. Accumulation des trois polymorphismes et progression tumorale

Des altérations des fonctions de protection, ex. de réparation d'ADN, accélèrent la progression tumorale en inactivant les gènes qui contrôlent la croissance ou favorisent la mort cellulaire, provoquant de ce fait, le début du cancer (Fig.11). C'est pourquoi les femmes, avec une capacité réduite de réparation des CDBs sont vraisemblablement à haut risque pour l'exposition au cancer du sein (28). Il a été suggéré que le cancer du sein sporadique soit très probablement provoqué par des gènes à faible pénétrance, y compris ceux impliqués dans des mécanismes de réparation d'ADN. En outre, l'accumulation des dommages d'ADN peut contribuer à la carcinogénèse du sein (45).

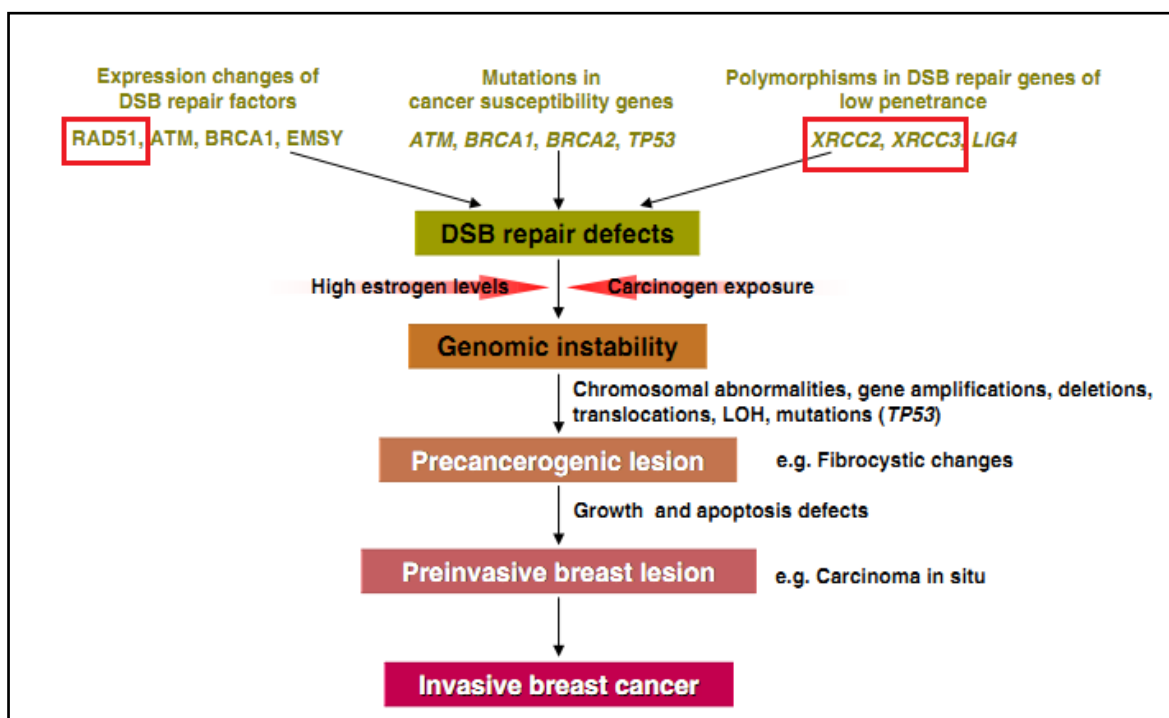


Fig. 11. Étapes de la carcinogénèse mammaire. L'exposition aux cancérigènes, qui peut inclure des niveaux élevés d'œstrogènes, en combinaison avec des anomalies hérités ou acquises dans la réparation des CDBs accélèrent le déroulement des événements menant au carcinome mammaire (28).

Partie expérimentale

II. PARTIE EXPERIMENTALE

II.1. Matériels biologique

Les échantillons inclus dans cette étude ont été aimablement fournis par le service d'anatomopathologie du CHU-Batna. Les pièces ont été préalablement conservées dans des blocs de paraffine.

La présente étude a été réalisée sur :

- 30 échantillons pathologiques (appartiens aux femmes diagnostiquées pour un cancer du sein).
- 7 échantillons contrôle négatif (appartiens aux femmes diagnostiquées pour un adénofibrome).

Les caractéristiques des échantillons étudiés sont représentées dans les tableaux VIII et IX.

Tableau VIII. Type et moyen d'âge des cas analysés.

	Cas cancéreux	Cas contrôle
Moyen d'âge	46 ans	22 ans
Effectifs	30	7

Tableau IX. Type histologiques des échantillons analysés.

	Types	Effectifs (n = 37)
Cas cancéreux	Carcinome canalaire infiltrant	28
	Carcinome lobulaire infiltrant	2
Cas contrôles	Adénofibrome	7

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation des échantillons

Afin d'extraire l'ADN à partir de tissus inclus dans la paraffine, une étape de déparaffinage suivie d'une réhydratation sont indispensables.

Partie Expérimentale

Dans des tubes Eppendorf 1,5 ml bien étiquetés, nous avons mis les échantillons, sous forme de sections coupées à partir des blocs de paraffine par un microtome.

❖ Le déparaffinage a été réalisé grâce à un lavage par le xylène selon les étapes suivantes :

- ↪ sous la hotte, ajouter 800 µl de xylène à chaque tube ;
- ↪ mélanger par retournement pendant 15 min ;
- ↪ centrifuger pendant 3 min à la vitesse maximale (14000 tpm) ;
- ↪ éliminer le surnageant (paraffine dissous dans le xylène), sans perturber le culot cellulaire.

Pour éliminer totalement la paraffine, nous avons répété le lavage au xylène 3 fois.

❖ La réhydratation a été réalisée en trois étapes utilisant différentes concentrations d'alcool :

- ↪ ajouter 300 ou 600 µl d'éthanol à 100% à chaque culot cellulaire (selon la taille de culot) ;
- ↪ vortexer puis centrifuger à 14000 tpm pendant 3 min ;
- ↪ éliminer l'éthanol (surnageant).

Les étapes précédentes ont été répétées avec l'éthanol à 70% puis à 50%.

Les échantillons contenant une grande quantité de tissus ont été partagées en plusieurs tubes afin d'améliorer le rendement de la lyse cellulaire pendant l'extraction de l'ADN.

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

II.2.2. Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir des cellules déparaffinées et réhydratées selon les étapes suivantes :

- ↪ ajouter 315 µl de tampon de lyse et 5 à 10 µl de protéinase K (20 mg/ml), selon la taille du culot cellulaire dans chaque tube ;
- ↪ incuber à 55°C pendant 1 h 30 min en vortexant les tubes chaque 5 à 10 min ;
- ↪ ajouter 100 µl NaCl 6 M ;
- ↪ vortexer pendant 6 min ;

Partie Expérimentale

- ↳ centrifuger (13000 tpm) pendant 10 min ;
- ↳ transférer le surnageant (presque 250 µl/tube), contenant l'ADN, dans un nouveau tube Eppendorf 1,5 ml ;
- ↳ pour précipiter l'ADN, ajouter 200 µl d'isopropanol au surnageant, puis retourner et secouer le contenu jusqu'à l'observation d'une pelote blanchâtre et compacte d'ADN ;
- ↳ centrifuger 10 min à vitesse maximale (13000 tpm) afin de culoter la pelote d'ADN ;
- ↳ éliminer l'isopropanol ;
- ↳ ajouter 300 µl d'éthanol au culot d'ADN puis centrifuger quelques secondes, à la fin éliminer l'éthanol (surnageant) ;
- ↳ sécher les culots d'ADN à température ambiante pendant 3 à 5 min pour éliminer toutes les traces d'éthanol ;
- ↳ suspendre les échantillons d'ADN extraits dans l'eau distillée (30 µl d'H₂O distillée dans chaque tube) ;
- ↳ incuber les échantillons à 50°C pendant 10 min.

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

II.2.3. Détermination de la concentration et de la pureté de l'ADN

- ❖ La concentration de l'ADN et sa pureté ont été déterminées grâce à la lecture de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre : cette absorption est proportionnelle à la concentration d'ADN, sachant que,

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

avec : la densité optique (DO) doit être mesurée à une longueur d'onde de 260 nm,
(la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques) ;

le facteur de dilution est 250 ; nous avons réalisé une dilution 1/250.

- ❖ La pureté d'ADN a été évaluée par mesure du rapport $\text{DO}_{260 \text{ nm}} / \text{DO}_{280 \text{ nm}}$. 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.

Partie Expérimentale

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

II.2.5. Recherche du Polymorphisme Nucléotidique (SNP) par PCR-RFLP

L'analyse des SNPs étudiés a été réalisée par une PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - suivie d'une analyse du Polymorphisme de Longueurs des Fragments de Restriction). Cette technique repose sur l'amplification d'un fragment d'ADN autour du site de polymorphisme d'intérêt, en utilisant des amorces bien choisies, suivie d'une digestion enzymatique des produits de PCR par des enzymes de restrictions, sachant que le SNP (à analyser) appartient au site de reconnaissance de l'enzyme utilisée, par conséquent, 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 (Fig. 12).

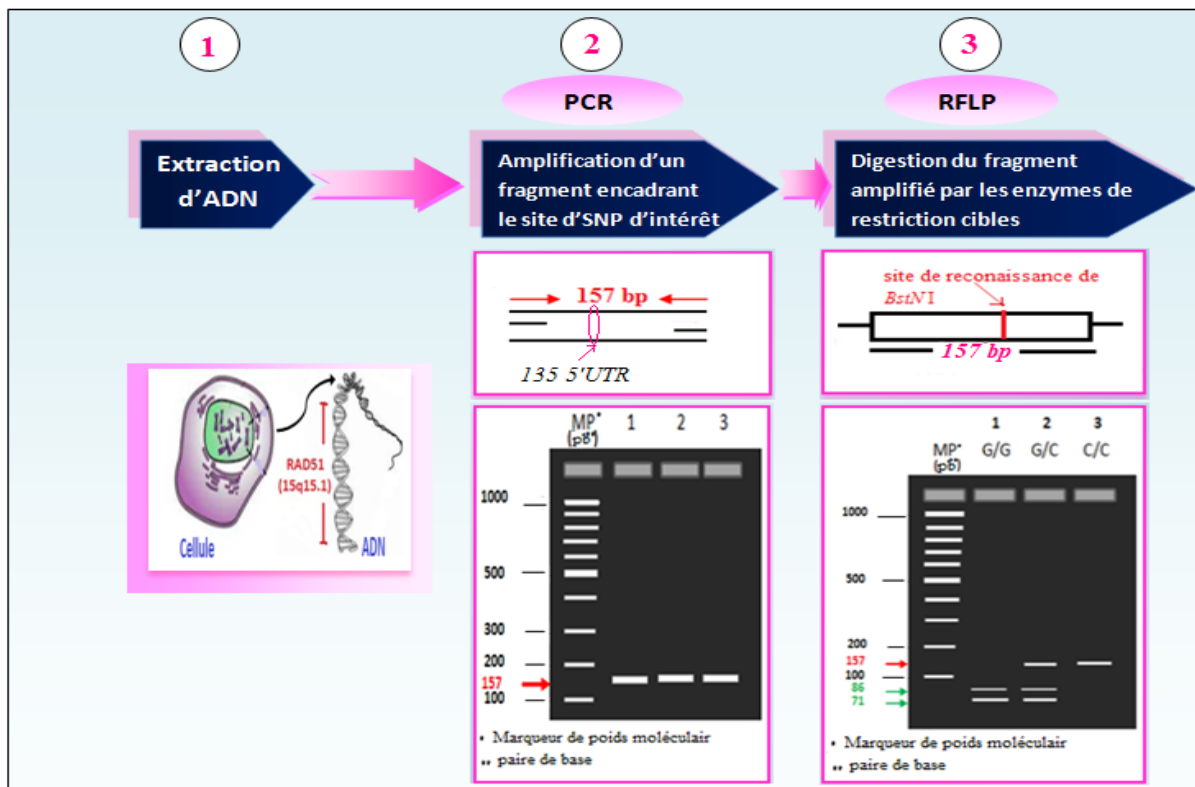


Fig. 12. Illustration des étapes de PCR-RFLP réalisée pour l'étude de polymorphisme RAD51 G135C. 1. Extraction d'ADN. 2. Amplification par PCR du fragment d'intérêt. 3. Digestion du fragment amplifié par une enzyme de restriction qui correspond à la mutation cherchée.

Partie Expérimentale

II.2.4.1. Amplification par PCR

Afin d'obtenir des fragments en quantités suffisantes pour réaliser l'analyse par RFLP, nous avons amplifié des séquences autour des sites des polymorphismes d'intérêt (Tableau X).

La spécificité des amorces et des enzymes de restriction utilisées pour l'analyse les polymorphismes RAD51 G135C et XRCC2 R188H a été préalablement validée dans des études antérieures (18, 46-48). Celle des amorces et des enzymes de restriction utilisées pour l'analyse du polymorphisme XRCC3 T241M a été préalablement validée par le groupe Brooks J. *et al.* (49).

Une vérification de la spécificité de toutes les amorces et les enzymes de restriction inclus dans notre étude a été réalisée *in silico* en utilisant l'outil bioinformatique.

Tableau X. Les amorces utilisées et les tailles des séquences amplifiées sur les gènes cibles.

Région de l'amplification	Amorce sens (S) et Anti-Sens (AS) (5'→3')		Taille de séquence amplifiée
Gène RAD51 ; 5'UTR	S	TGGGAACTGCAACTCATCTGG	157 pb
	AS	GCGCTCCTCTCTCCAGCA	
Gène XRCC2 ; exon 3	S	TGTAGTCACCCATCTCTCTGC	290 pb
	AS	AGTTGCTGCCATGCCTTACA	
Gène XRCC3 ; exon 7	S	ATGGCTCGCCTGGTGGTCA	211 pb
	AS	CATCCTGGCTAAAAATACG	

Les amplifications ont été réalisées selon deux protocoles optimisés pour la concentration en MgCl₂ : le premier en utilisant un tampon de PCR avec MgCl₂ intégré, et le deuxième en utilisant un tampon sans MgCl₂ et en ajoutant 0,5 µl de MgCl₂ (6,12 mM).

Les réactions d'amplification ont été effectuées dans un mix de 25 µl contenant :

- ✓ 100 ng d'ADN génomique ;
- ✓ 1,5 µl d'amorce S ;
- ✓ 1,5 µl d'amorce AS ;
- ✓ 0,3 µl de mélange dNTPs ;
- ✓ 0,2 µl de *Taq* polymérase ;
- ✓ 3 µl de tampon de PCR ;

Partie Expérimentale

- ✓ 0,5 µl de MgCl₂ (selon le protocole) ;
- ✓ qsp 25 µl de H₂O bidistillée.

Le programme d'amplification est présenté dans le tableau ci-après.

Tableau XI. Programme d'amplification par PCR commun aux trois séquences cibles des trois gènes étudiés.

Dénaturation initiale	94°C 05 min	
Dénaturation	94°C 30 sec	x 35 cycles
Hybridation	60°C 01 min	
Elongation	72°C 01 min	
Elongation finale	72°C 05 min	

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% (le gel a été préparé selon le protocole présenté dans l'annexe N°1) selon les étapes suivantes :

- ↳ mélanger 5 µl de produits de PCR avec 3 µl de bleu de chargement (le 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 ;
- ↳ dans un des puits, déposer 3 µl de marqueur de poids moléculaire (1 kb) afin de contrôler la taille des fragments amplifiés ;
- ↳ 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 de tailles attendues ont été détectés sous UV après coloration au BET.

II.2.4.1. Détection des variants des séquences par PCR-RFLP

Les produits de PCR ont été soumis à une digestion enzymatique par des enzymes de restriction bien choisies pour analyser les trois polymorphismes d'intérêt selon le tableau ci-dessous.

Partie Expérimentale

Tableau XII. Analyse des polymorphismes des séquences cibles de RAD51, XRCC2 et XRCC3 par les enzymes de restriction.

Polymorphisme	Taille de fragment amplifié (pb)	Enzyme de restriction	Tailles des fragments attendus (pb)
RAD51 (G135C)	157	<i>BstNI</i>	Allèle sauvage : 86+71 Allèle muté : 157
XRCC2 (R188H)	290	<i>HphI</i>	Allèle sauvage : 290 Allèle muté : 142+148
XRCC3 (T241M)	211	<i>NlaIII</i>	Allèle sauvage : 211 Allèle muté : 103+108

Chaque substitution par mutation dans la séquence du site de reconnaissance de l'enzyme de restriction empêche ou entraîne l'action de l'enzyme comme représenter dans les figures 13, 14 et 15.

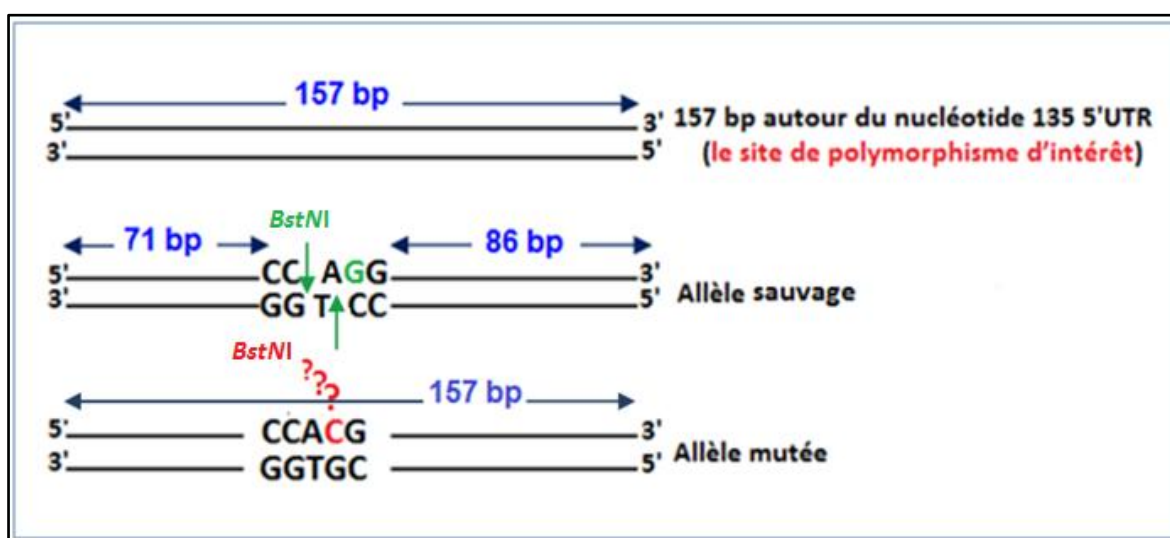


Fig. 13. Caractérisation schématique de l'apparition ou la disparition du site de reconnaissance pour l'endonucléase de restriction *BstNI* porté sur un fragment de 157 pb au niveau du gène RAD51.

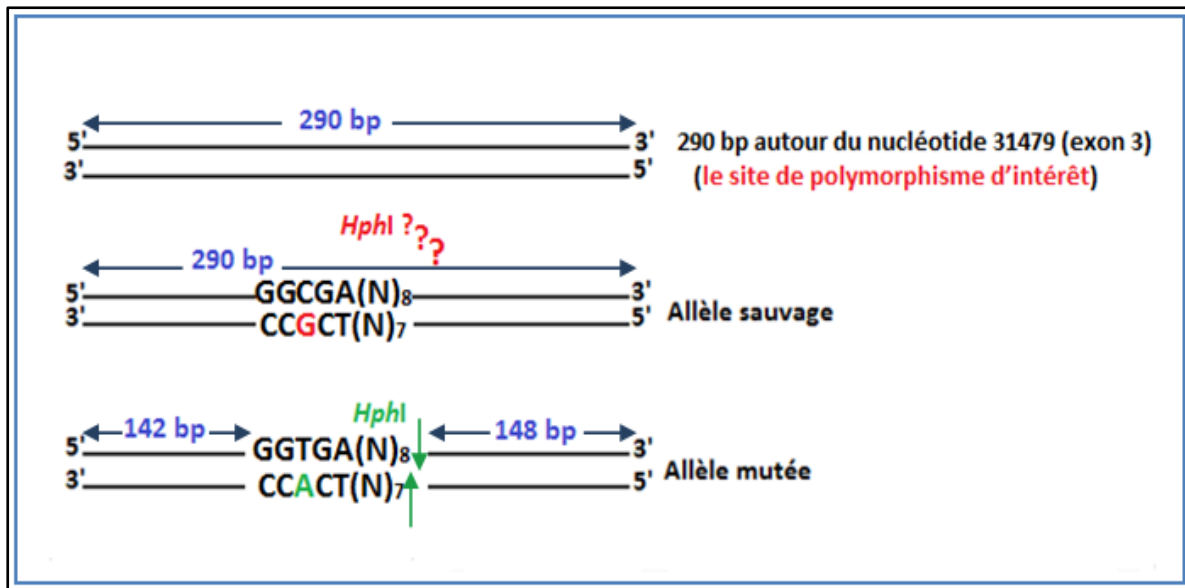


Fig. 14. Caractérisation schématique de l'apparition ou la disparition du site de reconnaissance pour l'endonucléase de restriction *HphI* porté sur un fragment de 290 pb au niveau du gène XRCC2.

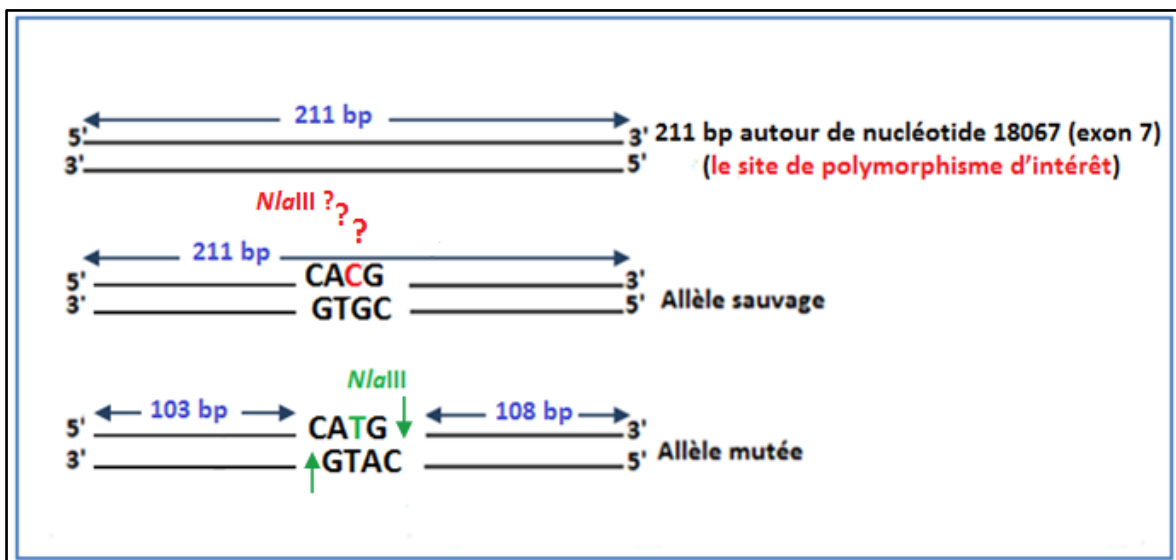


Fig. 15. Caractérisation schématique de l'apparition ou la disparition du site de reconnaissance pour l'endonucléase de restriction *NlaIII* porté sur un fragment de 211 pb au niveau du gène XRCC3.

Partie Expérimentale

La digestion a été réalisée dans un mix de 20 μl contenant :

- ✓ 10 μl de produit de PCR ;
- ✓ 6 μl de Tampon 4 (NEB) ;
- ✓ 3 μl de l'enzyme de restriction choisie ;
- ✓ 1 μl d' H_2O .

Les mix ont été incubés dans un bain marie à la température de restriction spécifique pour chaque enzyme (Tableau XIII) pendant 4 heures.

Tableau XIII. Site de reconnaissance et de clivage ainsi que la température de restriction spécifiques pour chaque enzyme utilisée.

Enzyme de restriction / Condition de restriction	Site de restriction	Température de restriction
<i>BstNI</i>	5'...CC↓WGG...3' 3'...GGW↑CC...5'	60°C
<i>HphI</i>	5'...GGTGA(N) ₈ ↓...3' 3'...CCACT(N) ₇ ↑...5'	37°C
<i>NlaIII</i>	5'...CATG↓...3' 3'...↑GTAC...5'	37°C

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.

II.3. Résultats

II.3.1. Analyse des produits PCR obtenus

Tous les échantillons d'ADN extraits ont été soumis à trois amplifications par PCR en utilisant trois différents couples d'amorces. Le premier couple encadre un fragment de 157 pb au niveau de la région non transcrite 5'UTR du gène RAD51 autour du nucléotide 135, le site de polymorphisme d'intérêt. Le deuxième couple encadre un fragment de 290 pb au niveau de l'exon 3 du gène XRCC2 autour de codant 188, le site de polymorphisme d'étude. Enfin, une troisième paire d'amorce encadrant une séquence de 211 pb au niveau de l'exon 7 du gène XRCC3, le site de polymorphisme d'intérêt.

Les produits des 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 suivante représente les produits des différentes amplifications de trois échantillons différents en présence des trois couples d'amorces.

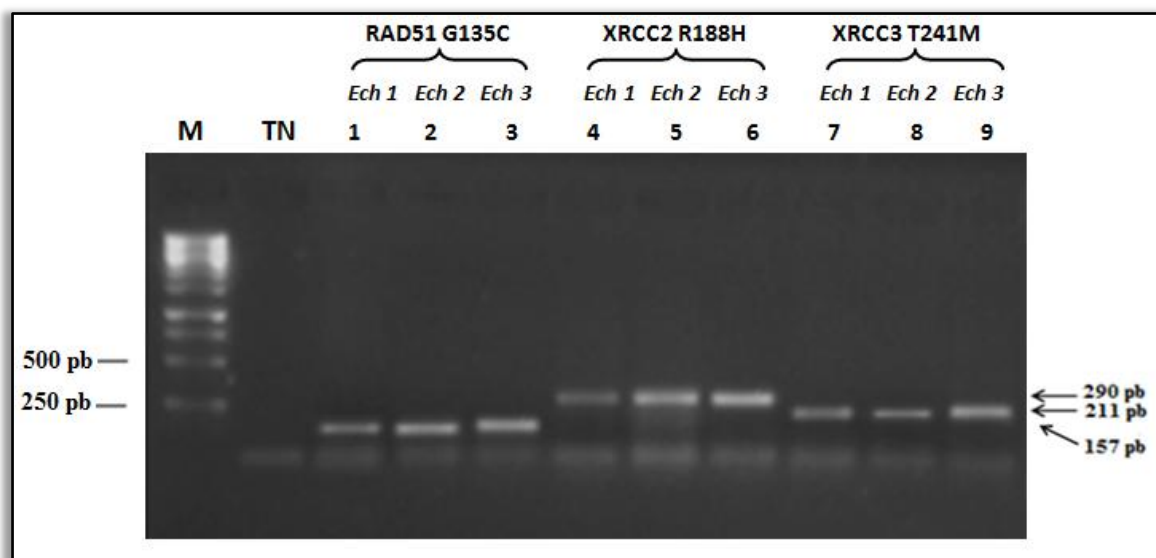


Fig. 16. Analyse des produits PCR obtenus après électrophorèse sur gel d'agarose à 2% et coloration au BET suivie d'une visualisation sous UV. Les puits 1, 2 et 3 : fragments de 157 pb qui portent le site du polymorphisme RAD51 G135C ; les puits 4, 5 et 6 : fragments de 290 pb qui portent le site du polymorphisme XRCC2 R188H et les puits 7, 8 et 9 : fragments de 211 pb qui portent le site du polymorphisme XRCC3 T241M. M : marqueur de poids moléculaire (1 kb, Euromedea). TN : témoin négatif.

II.3.2. Digestion des produits de PCR par les endonucléases de restrictions appropriées

Chacun des trois produits de PCR obtenus, pour chaque échantillon, a été soumis à une digestion enzymatique par une endonucléase de restriction appropriée. Ensuite, une migration électrophorétique des produits de digestion, sur un gel d'agarose à 3,5% et une coloration au BET, suivie d'une visualisation sous UV, a été réalisée.

Le profil électrophorétique présenté dans la figure 17, représente les produits de digestion, par les enzymes de restriction appropriées, des différents produits de PCR.

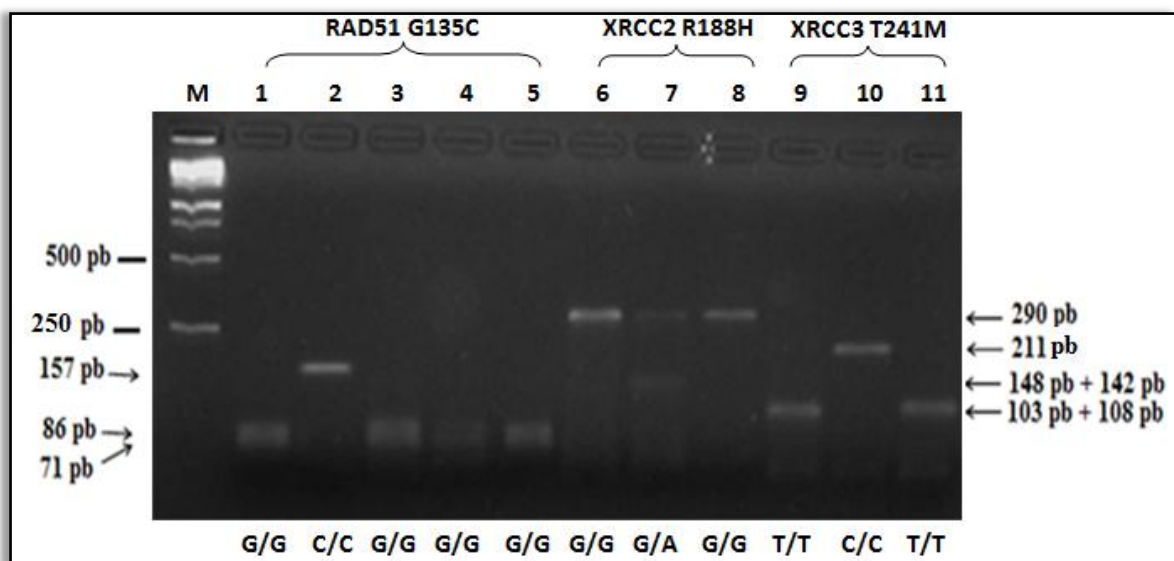


Fig. 17. Profil électrophorétique des produits de PCR digérés par les endonucléases de restrictions appropriées, puis séparés sur un gel d'agarose à 3,5% après coloration au BET et visualisation sous UV. Les puits 1-5 : les produits de digestion des fragments de taille 157 bp qui portent le polymorphisme RAD51 G135C : C/C (157 pb) et G/G (86 pb + 71 pb). 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).

Partie Expérimentale

Le fragment de taille 157 pb du gène RAD51 a été digéré par l'endonucléase de restriction *Bst*NI. Une transition G135C, a favorisé la disparition du site de reconnaissance de l'enzyme et, par conséquent, de l'activité enzymatique. De-ce-fait, les échantillons représentant deux bandes de tailles 86 pb et 71 pb 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 les trois bandes sont de génotype hétérozygote G/C.

Le profil électrophorétique présenté dans la figure 18 représente les produits de digestion des fragments de taille 157 pb du gène RAD51, pour 4 échantillons différents.

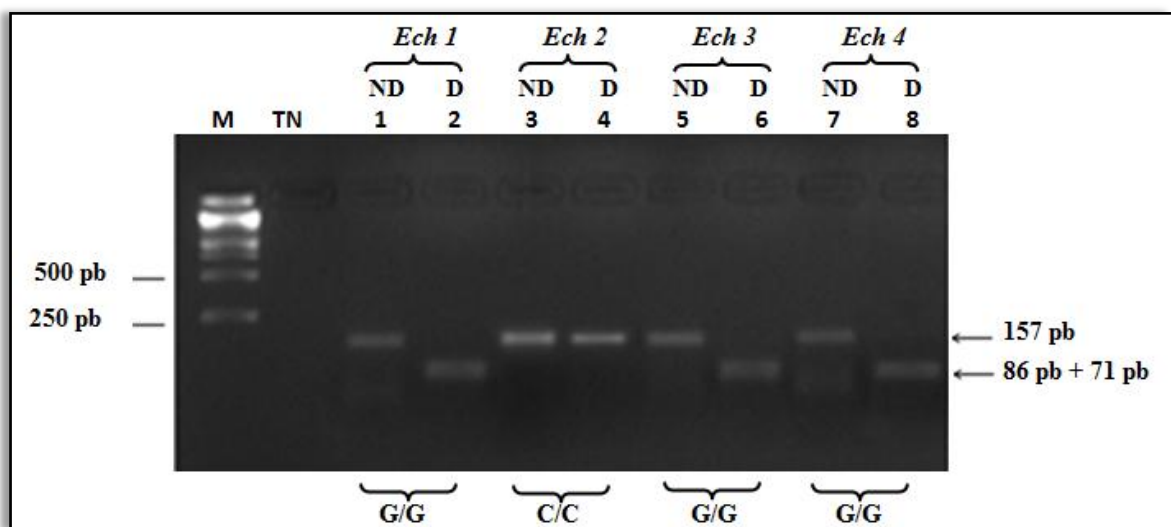


Fig 18. Profil électrophorétique des produits de PCR (157 pb sur la région 5'UTR du gène RAD51) et de leurs produits de digestion, séparés sur un gel d'agarose à 3,5%, après coloration au BET et visualisation sous UV. Les puits 1, 3, 5 et 7 : un fragment de 157 pb dans la région 5'UTR du gène RAD51 ; 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.

D'après le profil, les échantillons 1, 3 et 4, sont de génotype homozygote sauvage G/G, et l'échantillon 2 est de génotype homozygote muté C/C.

Partie Expérimentale

Le fragment de taille 290 pb du gène XRCC2 a été digéré par l'endonucléase de restriction *HphI*. 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 et, enfin, les échantillons représentant les trois bandes sont de type hétérozygote G/A.

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

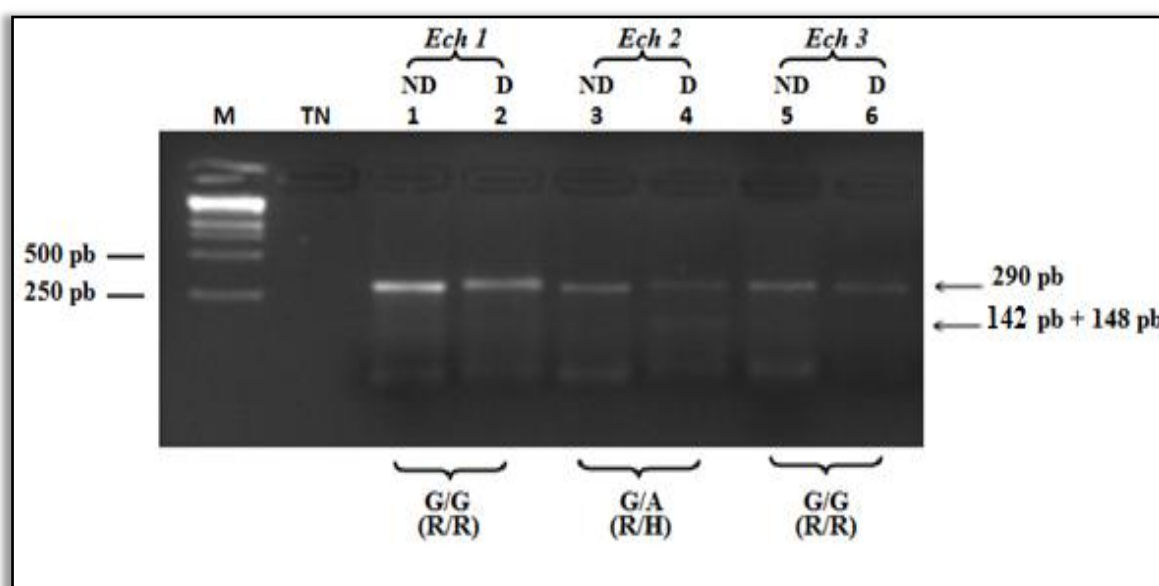


Fig 19. Profil électrophorétique des produits de PCR (290 pb sur l'exon 3 du gène XRCC2) et de leurs produits de digestion, séparés sur un gel d'agarose à 3,5%, après coloration au BET et visualisation sous UV. Les puits 1, 3 et 5 : un fragment de 290 pb dans l'exon 3 du gène XRCC2 ; les puits 2, 4 et 6 : produits de digestion des fragments représentés dans les puits 1, 3 et 5 successivement. Les échantillons n° : 1 et 3 sont de type homozygote sauvage G/G (R/R) pour le polymorphisme XRCC2 H188R et l'échantillon n° : 2 est de type hétérozygote G/A (R/H). D : Digéré. ND : Non Digéré. M : Marqueur de poids moléculaire (1kb, Euromedea). TN : témoin négatif.

A partir de profil, il est claire de déduire que l'échantillons 2 porte le génotype hétérozygote G/A (R188H), tandis que les deux autres échantillon sont de génotype homozygote sauvage G/G (R188R).

Partie Expérimentale

Le fragment de taille 211 pb du gène XRCC3 a été digéré par l'endonucléase de restriction *NlaIII*. La transition T241M (C18067T) 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 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 *NlaIII*.

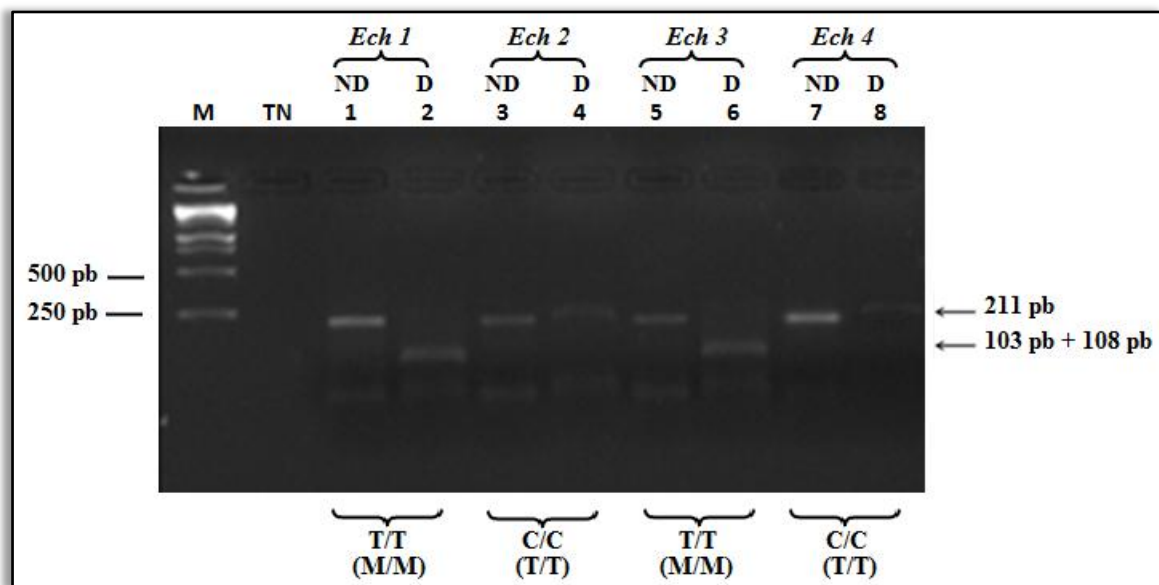


Fig 20. Profil électrophorétique des produits de PCR (211 pb sur l'exon 7 du gène XRCC3) et de leurs produits de digestion, séparés sur un gel d'agarose à 3,5%, après coloration au BET et visualisation sous UV. Les puits 1, 3, 5 et 7 : un fragment de 211 pb dans l'exon 7 du gène XRCC3 ; les puits 2, 4, 6 et 8 : produits de digestion des fragments représentés dans les puits 1, 3, 5 et 7 successivement. Les échantillons n° : 1 et 3 sont de type homozygote muté M/M pour le polymorphisme XRCC3 T241M et les échantillon n° : 2 et 4 sont de type homozygote sauvage T/T. D : Digéré. ND : Non Digéré. M : Marqueur de poids moléculaire (1kb, Euromedea). TN : témoin négatif.

D'après le profil, les échantillons 1 et 3 sont de génotype homozygote muté T/T (M241M). Tandis que, les échantillons 2 et 4 sont de génotype homozygote sauvage C/C (T241T).

Tableau XIV. Distribution des génotypes des polymorphismes : RAD51 G135C, XRCC2 R188H et XRCC3 T241M dans les échantillons analysés.

Génotype	Patients (n = 30)	Contrôles (n = 7)
RAD51 G135C		
Homozygote sauvage G135G	28	7
Hétérozygote G135C	1	0
Homozygote muté C135C	1	0
XRCC2 R188H		
Homozygote sauvage R188R	29	7
Hétérozygote R188H	1	0
Homozygote muté H188H	0	0
XRCC3 T241M		
Homozygote sauvage T241T	28	7
Hétérozygote T241M	0	0
Homozygote muté M241M	2	0

II.4. Discussion

L'objectif de cette étude était l'optimisation ainsi que la validation d'une technique fiable pour détecter des variants alléliques sur les gènes clés de la réparation d'ADN par recombinaison homologue (RAD51, XRCC2 et XRCC3), à partir des blocs de paraffine. De plus, nous avons essayé d'établir une relation entre ces différents polymorphismes et le risque d'apparition et/ou de développement de cancer du sein chez les femmes Algériennes.

Après l'établissement d'une stratégie expérimentale bien déterminée suivie d'optimisations des conditions expérimentales, l'amplification des séquences cibles correspondant aux variants RAD51 G135C, XRCC2 R188H et XRCC3 T241M a été obtenue dans tous les échantillons inclus dans la présente étude, témoignant ainsi de la présence d'ADN en quantité suffisante pour réaliser tous les essais programmés.

II.4.1. Discussion analytique

II.4.1.1. Extraction d'ADN

Suite à l'orientation de la recherche vers l'explication des aspects génétiques des maladies, les tissus fixés et inclus dans la paraffine constituent une source continue dans le domaine de la recherche. Le pouvoir d'extraction d'ADN à partir des blocs de paraffine constitue une chance précieuse pour les études génétiques. Ces tissus n'étaient pas considérés comme une source viable pour les analyses moléculaires, car les acides nucléiques peuvent être très modifiés et, parfois, même dégradés.

La digestion des tissus par les protéinases libèrent les acides nucléiques dirigés pour la réalisation de ce type d'analyse. Même pour un tissu renfermant très peu de cellules et, par conséquence, très peu de matériel génétique extrait, la technique de PCR a permis d'augmenter le nombre de copie obtenu, ce qui a constitué une opportunité d'utiliser ces échantillons pour des études génétiques (50, 51).

L'extraction suivie de l'amplification d'ADN, à partir des tissus inclus dans la paraffine, est une procédure robuste dépendante de plusieurs facteurs comme : l'âge du bloc de paraffine, la longueur du fragment à amplifié et le stade de la maladie. En outre, l'obtention d'un produit de PCR à partir des blocs de paraffine est difficile, car le tissu est rare, dégradé, et souvent contaminé par les traces des substances qui inhibent la protéinase

K pendant l'extraction comme le xylène, ou inhibent la *Taq* polymérase au cours de l'amplification comme la formaldéhyde (50, 51).

II.4.1.1.1. Optimisation de protocole de déparaffinage, de réhydratation de tissu et d'extraction d'ADN

Avant toute expérimentation proprement dite, nous avons réalisé une optimisation des techniques de déparaffinage, de réhydratation de tissu et d'extraction d'ADN, afin d'obtenir un extrait prêt à être amplifié.

Nous avons apporté des ajustements au protocole d'extraction d'ADN recommandé par le groupe de recherche Pikor L.A. *et al.* (51) comme suite :

- pendant la première étape de déparaffinage, la période d'agitation des tubes contenant les échantillons et le xylène a été fixée à une durée de 15 min ;
- durant la première étape de la réhydratation, le volume d'éthanol à ajouter a été modifié de 800 μ l à un volume de 300 à 600 μ l selon la taille de tissu ;
- le protocole d'extraction a été modifié du phénol/chloroforme au NaCl 6M.

Ces modifications ont permis d'obtenir un bon rendement d'ADN extrait, en quantité suffisante pour réaliser l'amplification par PCR.

II.4.1.1.2. Vérification de l'intégrité de l'ADN

L'intégrité de l'ADN extrait a été vérifiée suite à une migration électrophorétique de 4 μ l d'ADN de chaque échantillon déposés sur un gel d'agarose à 1%, sous une tension de 100 V, pendant 30 min. À la fin de la migration, l'ADN a été visualisé sous UV après coloration au BET (Figure 18).

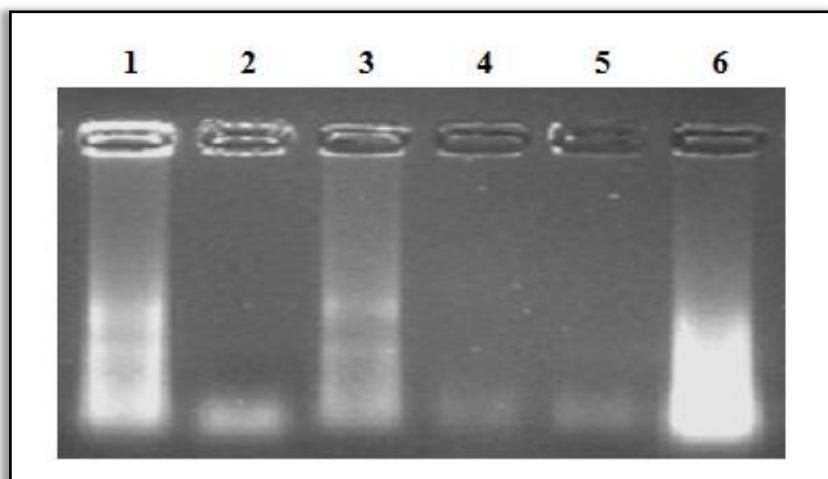


Fig. 21. Exemple de profil électrophorétique d'ADN génomique extrait à partir de tissus pathologiques séparé sur un gel d'agarose à 1% après coloration au BET et visualisation sous UV. Les puits de 1 à 6 correspondent aux échantillons : 8, 10, 9, 12, 2 et 1 successivement.

D'après le profil, tous les échantillons représentent un ADN potentiellement exploitable. La différence dans l'intensité du signal est due à la différence entre les concentrations en ADN d'un échantillon à l'autre.

II.4.1.2. Optimisation de la PCR-RFLP

Notre stratégie expérimentale préalablement préparée a été bien claire et concerne tous les paramètres facilitant l'obtention d'un bon signal d'amplification : du choix des amorces et des enzymes de restriction jusqu'aux concentrations et aux volumes des différentes solutions à utiliser. Ces optimisations ont été réalisées afin de permettre l'obtention de résultats exploitables, avec un regard très particulier sur les possibles contaminations qui pouvaient survenir à la suite d'erreurs de manipulation ainsi que sur la préservation du matériel biologique très précieux.

II.4.1.2.1. Choix des amorces et des enzymes de restrictions

Les amorces et les enzymes de restriction utilisées pour l'analyse des polymorphismes RAD51 G135C et XRCC2 R188H ont été adoptées à partir des travaux validés dans la littérature (18, 46-48) et celles utilisées pour l'analyse de polymorphisme XRCC3 T241M ont été adoptées à partir du travail réalisé par le groupe Brooks J. *et al.* (49). Une autre validation de l'amplification et de la digestion a été réalisée *in silico*, en utilisant l'outil

Partie Expérimentale

bioinformatique, afin de mesurer l'efficacité ainsi que la qualité du résultat estompé, selon les étapes suivantes :

- sur le site <http://genome.ucsc.edu>, déposer les couples des amorces puis lancer l'amplification ;
- sélectionner les séquences amplifiées *in silico*, ensuite les déposer sur le site <http://www.restrictionmapper.org> (annexe 3) ;
- choisir l'enzyme de restriction et lancer la digestion ;
- si le site de reconnaissance est fourni par l'allèle sauvage (le cas de l'SNP RAD51 G135C), les produits de digestion de tailles attendues vont être présentés (annexe 5) ;
- si le site de reconnaissance est créé par la substitution d'intérêt, il faut tout d'abord aller sur le site : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> afin de positionner le point de mutation (annexe 4). En suite, introduire la substitution d'intérêt ;
- placer la séquence mutée sur le site : <http://www.restrictionmapper.org>, sélectionner l'enzyme de restriction convenable puis, lancer la digestion ;
- les fragments de taille attendue vont être obtenus.

De cette façon, nous avons confirmé que les amorces et les enzymes de restriction sont spécifiques, et peuvent servir à réaliser les tests PCR-RFLP d'intérêt.

II.4.1.2.2. Optimisation de la concentration en MgCl₂

Le MgCl₂ a un rôle primordial pour la PCR. Pendant la réaction d'amplification, les ions Mg²⁺ forment un complexe avec les nucléotides libres et, c'est ainsi que le complexe Mg²⁺/nucléotide est le substrat de la *Taq* polymérase.

La concentration en MgCl₂ à utiliser a également été optimisée en faisant varier de façon croissante la quantité de MgCl₂ par série de PCR.

Plusieurs essais d'optimisation sur différentes concentrations de la solution de MgCl₂ pour la réaction d'amplification, ont été réalisés (Figure 19). La concentration finale de 6,12 mM a été retenue sur la qualité de l'amplification.

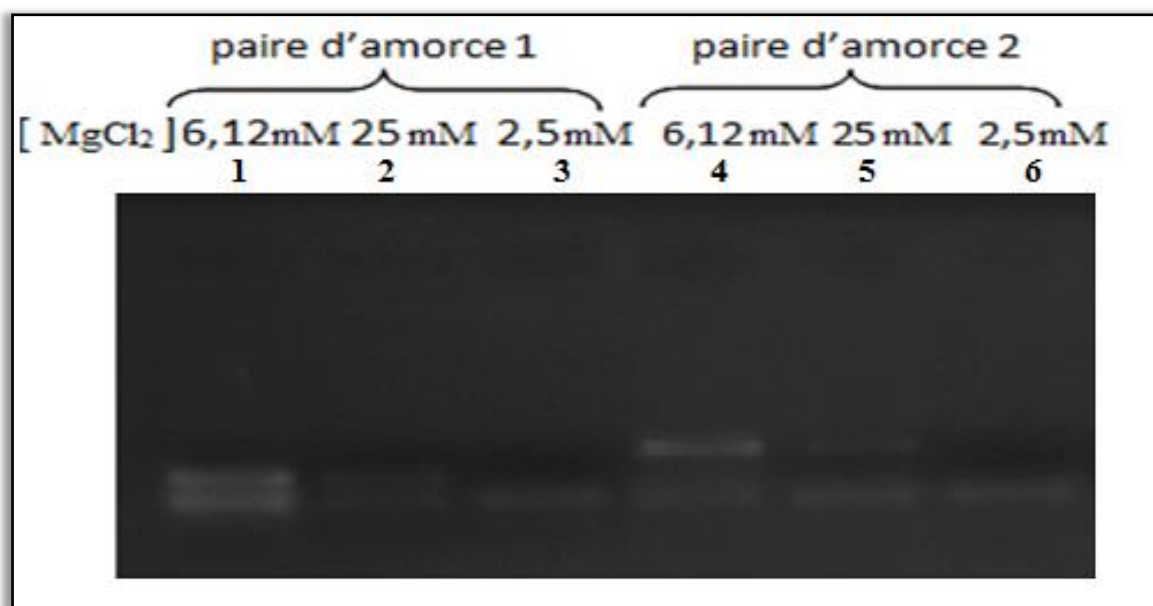


Fig. 22. Exemple de profil électrophorétique des produits PCR montrant l'optimisation de la concentration de MgCl₂. Les puits 1-3 : produits d'amplification en utilisant des concentrations de MgCl₂ à : 6,12 mM, 25 mM et 2,5 mM, successivement, pour un couple d'amorce. Les puits 4-6 : produits d'amplification en utilisant des concentrations de MgCl₂ à : 6,12 mM, 25 mM et 2,5 mM, successivement, pour un deuxième couple d'amorce.

II.4.1.2.3. Création du programme d'amplification

Certaines améliorations des conditions d'amplification ont été apportées à celles issues de la littérature, en particulier, la création d'un programme d'amplification par PCR commun pour les trois couples d'amorces, à condition d'obtenir des fragments cibles bien individualisés et sans aucun risque de contamination possible.

Après plusieurs essais d'optimisation individuels et combinés, nous avons réunis les différents paramètres susceptibles de nous donner un bon signal d'amplification exploitable dans les étapes expérimentales suivantes. Ces paramètres optimisés étaient comme suit :

- la quantité d'ADN a été limitée à 100 ng/échantillon ;
- le nombre des cycles a été augmenté à 35 cycles ;
- la température d'hybridation a été ajustée à 60°C pour l'ensemble des amplifications.

II.4.1.2.4. Optimisation des conditions de restriction

Les digestions enzymatiques ont toutes été réalisées directement sur de l'ADN amplifié par PCR. Pour l'étude de la RFLP, les produits amplifiés par PCR sont soumis à l'action des différentes enzymes de restriction spécifiques pour chaque gène étudié.

Selon la littérature et les conditions de fonctionnement des enzymes de restriction fournis par le site de producteur (New England Biolabs, UK), les réactions de restriction ont été réalisées sous les conditions suivantes :

un milieu réactionnel de 20 µl constitué de :

- 10 µl de produit de PCR ;
- 6 µl de tampon de restriction ;
- 3 µl de l'enzyme de restriction ;
- 1 µl de H₂O.

une température de restriction à :

- 60°C pour l'enzyme de restriction *Bst*NI ;
- 37°C pour les enzymes de restriction *Hph*I et *Nla*III.

une durée de restriction de quatre (4) heures pour les trois enzymes de restriction a été appliquée.

II.4.2. Discussion des résultats

L'instabilité génétique acquise à travers une réparation insuffisante des CDB de l'ADN est suggérée être paramètre essentiel dans la susceptibilité au cancer du sein. Les protéines codées par les gènes, RAD51, XRCC2 et XRCC3 en interaction avec d'autres protéines telle que, BRCA 1, BRCA 2 et RAD51 C, assurent la réparation par RH (la voie la plus fidèle de réparation). En effet, l'effet des polymorphismes ponctuels de ces gènes sur le risque de cancer du sein a fait l'objet d'un nombre important des études (18, 45-49, 53-59).

En 2008, le groupe Smith T.R. *et al.* (52) ont suggéré que la combinaison de plusieurs SNPs dans différents gènes de réparation peut contribuer au risque du cancer du sein.

Partie Expérimentale

Le groupe Haiman C.A. *et al.* en 2008 (53) ont prouvé une faible association entre les polymorphismes RAD51 G135C, XRCC2 R188H et XRCC3 T241M avec une augmentation du risque de cancer du sein. Cependant, d'autres études n'ont trouvé aucune relation entre ces polymorphismes et le cancer du sein (49, 54).

Une étude réalisée sur les SNP XRCC2 R188H et XRCC3 T241M a suggéré une relation étroite entre l'apparition de ces mutations et l'augmentation du risque de cancer du sein (55). D'autres travaux ont aussi trouvé une relation entre le génotype XRCC3 M/M et l'augmentation du risque de cancer du sein (56, 57). Malgré qu'en 2006, l'équipe Garcia-Glosas M., *et al.* (58) 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 D.J. *et al.* (59) ont démontré l'association de l'SNP XRCC2 R188H, avec une augmentation du risque de cancer du sein.

Le génotype homozygote muté C/C de l'SNP RAD51 G135C a été suggéré avoir un effet augmentant le risque du cancer du sein (48).

Dont notre étude, les analyses moléculaires réalisées ont permis de détecter les différents génotypes des polymorphismes étudiés (RAD51 G135C, XRCC2 R188H et XRCC3 T241M). Néanmoins, l'association entre ces polymorphismes et le risque du cancer du sein n'a pas été confirmée à cause du nombre restreint d'échantillons étudiés.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

Le but de notre travail était une optimisation et une validation d'une technique de PCR-RFLP afin d'étudier les polymorphismes génétiques RAD51 G135C, XRCC2 R188H, XRCC3 T241M, et leurs association dans le cancer du sein, en comparant les échantillons pathologiques et bénins.

Les résultats obtenus ont permis de détecter des anomalies génétiques au niveau de chacun des 3 gènes étudiés, avec des pourcentages variables. 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).

Les cellules tumorales sont souvent défectueuses dans une des voies de réparation de l'ADN, par conséquent, la recherche de l'implication des variants du RAD51, XRCC2, XRCC3 est d'une grande importance. Vu l'intérêt de cette recherche, des études complémentaires du profil RFLP des variants RAD51 G135C, XRCC2 R188H, XRCC3 T241M sur un échantillonnage étendu de la population Algérienne, sont nécessaires.

Pour la continuité de notre étude, nous proposons de :

- augmenter le nombre des échantillons pour faire une étude statistique fiable, ce qui va nous permettre d'en tirer des conclusions et dégager des recommandations, très utiles pour le clinicien ;
- valider les résultats positifs obtenus *via* le séquençage afin d'identifier et de confirmer la nature des anomalies détecter ;
- étudier l'association des trois polymorphismes d'intérêt pour une éventuelle analyse complète des gènes, ce qui nous permettra peut-être de déceler de nouvelles mutations spécifiques de la population Algérienne ;
- étudier d'autres polymorphismes dans les autres paralogues du gène RAD51 : RAD51C, RAD51B, RAD51D ;
- analyser d'autres gènes de réparation de l'ADN, surtout chez les patientes qui ne présentent aucune anomalie pour les 3 gènes étudiés.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Blay J. et Ray-Coquard I. Cancer Épidémiologie, cancérogenèse, développement tumoral, classification. *La REVUE DU PRATICIEN*. 2004 : **54**, 1935-1942.
2. Moore K.L. et Dalley A.F. Anatomie Médicale : aspect fondamentaux et applications cliniques. De Boeck ed et Larcier s.a. 2001 : 72-74.
3. Esquivel E.L., Lopez A.P., Sanchez L.C. Hormone risk factors during breast tumoral promotion, progression and prognosis. *Ginecol Obstet Mex*. 2004 : **72**, 545-9.
4. Colditz G.A., Sellers T.A., et Trapido E. Epidemiology-identifying the causes and preventability of cancer? *Nat Rev Cancer*. 2006 : **6 (1)**, 75-83.
5. Romanowicz-Makowska H., Smolarz B., Zadrozny M., Westfal B., Baszczyński J., *et al.* The association between polymorphisms of the RAD51-G135C, XRCC2-Arg188His and XRCC3-Thr241Met genes and clinico-pathologic features in breast cancer in Poland. *Eur J Gynaec Oncol*. 2012 : **XXXIII (2)**, 145-150.
6. Espié M., Hocini H., *et al.* Cancer du sein chez les femmes âgées : traitements locorégional et adjuvant. *Eurocancer*. 2006, 85-92.
7. Goicoechea S.M., Bednarski B., Garcia-Mata R., Prentice-Dunn H., Kim H.J., et Otey C.A. Palladin contributes to invasive motility in human breast cancer cells. *Oncogene*. 2009 : **28**, 587-598.
8. Sakr R.A. Does molecular biology play any role in ductal carcinoma in situ? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 2013: **41**, 45–53.
9. Malhotra G.K., Zhao X., Band H., et Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*. 2010 : **10 (10)**, 955-960.

Références bibliographiques

10. Devouge P., Phalippou J., Martin de Beauce S., Kerdraon O., Prolongeau J.F., *et al.* Reprise chirurgicale des carcinomes canauxaires in situ pour exérèse non in sano : existe-t-il des facteurs de risque? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité.* 2013: **41**, 228-234.
11. Espié M., Hocini H., Cuvier C., Giacchetti S., Boursstyn E., et De-Roquancourt A. Cancer lobulaire in situ du sein. Particularités diagnostiques et évolutives. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité.* 2005 : **33**, 964-969.
12. Tavassoli F.A., Devilee P. (Eds.) : World Health Organization. Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. *IARC Press* : Lyon 2003; 20p, 24p.
13. Rakha E.A., El-Sayed M.E., Powe D.G., Green A.R., Habashy H., *et al.* Invasive lobular carcinoma of the breast : Response to hormonal therapy and outcomes. *EJC.* 2008 : **44**, 73-83.
14. Bourgier C., Heymann S., Vielh P., et Azria D. Implications radiobiologiques de la classification moléculaire des cancers du sein : présent ou avenir? *Cancer/Radiothérapie.* 2012: **16**, 29-33.
15. Zhang Y., et Yu Y. The Important Molecular Markers on Chromosome 17 and Their Clinical Impact in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2011: **12**, 5673-5683.
16. Jackson S.P., et Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* 2009 : **461 (22)**, 1071-1078.
17. Krejci L., Altmannova V., Spirek M., et Zhao X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acide Research.* 2012 : **40 (13)**, 5795-5818.
18. Romanowicz-Makowska H., Smolarz B., Zadrozny M., Westfal B., Baszczyński J., *et al.* Single Nucleotide Polymorphisms in the Homologous Recombination Repair Genes and Breast Cancer Risk in Polish Women. *Tahoku J Exp Med.* 2011: **224**, 201-208.
19. Shinohara A., Ogawa H., Matsuda Y., Ushio N., Ieko T., *et al.* Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. *Nat Genet.* 1993 : **4**, 239 - 243.

Références bibliographiques

20. Schumutte C., Tomblin G., Rhiem K., Sadoff M.M., Schmutzler R., *et al.* Characterization of the Human Rad51 Genomic Locus and Examination of Tumors with 15q14–15 Loss of Heterozygosity (LOH). *CANCER RESEARCH*. 1999 : **59**, 4564-4569.
21. Flygare J., Benson F., et Hellgren D. Expression of the human RAD51 gene during the cell cycle in primary human peripheral blood lymphocytes. *BBA*. 1996 : **1312**, 231-236.
22. Benson F.E., Stasiak A., et West S.C. Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of *E.coli* Rec A. *EMBO*. 1994 : **13 (23)**, 5764-5771.
23. Amunugama R. et Fishel R. Homologous Recombination in Eukaryotes. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2012 : **110**, 155-206
24. Shin D.S., Pellegrini L., Daniels D.S., Yelent B., Craig L., *et al.* Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2. *EMBO*. 2003 : **22 (17)**, 4566-4576.
25. Richardson C. RAD51, genomic stability, and tumorigenesis. *Cancer Letters*. 2005 : **218**, 127-139.
26. Filippo J.S., Sung P. et Klein H. Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annu Rev Biochem*. 2008 : **77**, 229-257.
27. Thacker J. The role of homologous recombination processes in the repair of severe forms of DNA damage in mammalian cells. *Biochimie*. 1999 : **81**, 77-85.
28. Ralhan R., Kaur J., Kreienberg R., Wiesmüller L. Links between DNA double strand break repair and breast cancer: Accumulating evidence from both familial and non familial cases. *Cancer Letters*. 2007 : **248**, 1-17.
29. Deans B., Griffin C.S., O'Regan P., Jastin M., Thacker J. Homologous Recombination Deficiency Leads to Profound Genetic Instability in Cells Derived from Xrcc2-Knockout Mice. *CANCER RESEARCH*. 2003 : **63**, 8181-8187.

Références bibliographiques

30. Lin W.Y., Camp N.J., Cannon-Albright L.A., Allen-Brady K., Balasubramania S., *et al.* A role for XRCC2 gene in breast cancer risk and survival. *J Med Genet.* 2011 : **48**, 477-484.
31. Lindh A.R., Rfii S., Schultz N., Cox A., et Helleday T. Mitotic defects in XRCC3 variants T241M and D213N and their relation to cancer susceptibility. *Human Molecular Genetics.* 2006 : **15 (7)**, 1217-1224.
32. Suwaki N., Klare K. et Tarsounas M. RAD51 paralogues : Roles in DNA damage signaling, recombinational repair and tumorigenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2011 : **22**, 898-905.
33. Ben-Salah G., Fendri-Kriaa N., Kamoun H., Kallahi F., Mkaouar-Rebal E., *et al.* An interethnic variability and a functional prediction of DNA repair gene polymorphisms : the example of XRCC3 (p.Thr241>Met) and XPD (p.Lys751>Gln) in a healthy Tunisian population. *Mol Biol Rep.* 2012: **39**, 9639-9647.
34. Somyajit K., Basavaraju S., Scully R., et Nagaraju G. ATM- and ATR-Mediated Phosphorylation of XRCC3 Regulates DNA Double-Strand Break-Induced Checkpoint Activation and Repair. *Mol Cell Bio.* 2013 : **33 (9)**, 1830-1844.
35. Hendrickson E.A. Cell-Cycle Regulation of Mammalian DNA Double-Strand-Break Repair. *Am J Hum Genet.* 1997 : **61**, 795-800.
36. Kavanagh J.N., Redmond K.M., Schettino G., et Prise K.M. DSB Repair-A radiation perspective. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2012, 1-41.
37. Rass E., Grabarz A., Bertrand P., et Lopez B.S. Réparation des cassures double-brin de l'ADN, un mécanisme peut en cacher un autre : la ligature d'extrémités non homologues alternative. *Cancer Radiother.* 2011 : **XXX**, 1-10.
38. Brandsma I., et Gent D.C. Pathway choice in double strand break repair : observations of a balancing act. *Genome integrity.* 2012 : **3 (9)**.
39. Altieri F., Grillo C., Maceroni M., et Chichiarelli S. DNA Damage and Repair : From Molecular Mechanisms to Health Implications. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING.* 2008 : **10 (5)**, 891-937.

Références bibliographiques

40. Synoweic E., Stefanska J., Morawiec Z., Blasiak J., et Wozniak K. Association between DNA damage, DNA repair genes variability and clinical characteristics in breast cancer patients. *Mutation Research*. 2008 : **648**, 65-72.
41. Richardson C. Stark J.M., Ommundsen M. et Jasin M. RAD51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. *Oncogene*. 2004: **23**, 545-553.
42. Klein H.L. The consequences of RAD51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA Repair*. 2008 : **7**, 686-693.
43. Danoy P., Sanoda E., Lathrop M., Takeda S. et Matsuda F. A naturally occurring genetic variant of human XRCC2 (R188H) confers increased resistance to cisplatin-induced DNA damage. *BBRC*. 2007 : **352**, 763-768.
44. Kurschel B., Auranen A., McBride S., Novik K.L., Antoniou A., *et al.* Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Human Molecular Genetics*. 2002 : **11 (12)**, 1399-1407.
45. Romanowicz-Makowska H., Brays M., Forma E., Maciegczyk R., Polac I., *et al.* Single Nucleotide Polymorphism (SNP) THR241MET In The XRCC3 Gene And Breast Cancer Risk In Polish Women. *POL J Pathol*. 2012 : **2**, 121-125.
46. Krupa R., Synowiec E., Pawlowska E. Morawiec Z., Sobczuk A. *et al.* Polymorphism of the homologous recombination repair genes RAD51 and XRCC3 in breast cancer. *Experimental and molecular biolog*. 2009 : **87**, 32-32.
47. Romanowicz H., Smolarz B., Baszczyński J., Zandrosky M. et Kulig A. Genetics polymorphism in DNA repair genes by base excision repair pathway (XRCC1) and homologous recombination (XRCC2 and RAD51) and the risk of breast carcinoma in the Polish population. *Pol J Pathol*. 2010 : **4**, 206-212.
48. Akisik E., Yazici H., et Dalay N. ARLTS1, MDM2 and RAD51 gene variations are associated with familial breast cancer. *Mol Bio Rep*. 2011 : **38**, 343-348.

Références bibliographiques

49. Brooks J., Shore R.E., Zeleniuch-Jacquotte A., Currie D. Afanasyeva Y., *et al.* Polymorphisms in RAD51, XRCC2, and XRCC3 Are Not Related to Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 : **17 (4)**, 1016-1019.
50. Caura R., Prolla J.C., Meurer L., et Ashton Prolla. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin embedded tissue. *J Clin Pathol.* 2005 : **58**, 894-895.
51. Pikor L.A., Enfield K.S.S., Cameron H., et Lam W.L. DNA Extraction from Paraffin Embedded Material for Genetic and Epigenetic Analysis. *JOVE.* 2011.
52. Smith T.R., Levine E.A., Freimanis R.I., Akman S.A., Allen G. *et al.* Polygenic model of DNA repair genetic polymorphisms in human breast cancer risk. *Carcinogenesis.* 2008 : **29 (11)**, 2132-2138.
53. Haiman C.A., Hsu C., De Bakker P.I.W., Frasco M., Sheng X., *et al.* Comprehensive association testing of common genetic variation in DNA repair pathway genes in relationship with breast cancer risk in multiple populations. *Human Molecular Genetics.* 2008 : **17(6)**, 825-834.
54. Sehl M.E., Langer L.R., Papp J.C., Kwan L., Seldon J.L., *et al.* Associations between Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Double Strand DNA Repair Pathway Genes and Familial Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2009 : **15 (15)**.
55. Kuschel B., Auranen A., McBride S., Novik K.L., Antounious A., *et al.* Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Human Molecular Genetics.* 2002 : **11 (12)**, 1399-1407.
56. Han J., Haiman C., Niu T., Guo Q., Cox D., *et al.* Genetic Variant in DNA Repair Pathway Genes and Premenopausal Breast Cancer Risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 : **115 (3)**, 613-622.
57. He X.F., Wei W., Su J. et Yang Z. Association between the XRCC3 polymorphisms and breast cancer risk : meta-analysis based on case-control studies. *Mol Biol Rep.* 2012 : **39**, 5125-5134.

Références bibliographiques

58. Garcia-Glosas M., Egan K.M., Newcomb P.A. Brinton L.A., Titus-Ernstoff L., *et al.* Polymorphisms in DNA double-strand break genes and risk of breast cancer : two population-based studies in USA and Poland, and meta-analyses. *Hum Genet.* 2006 : **119**, 376-388.
59. Park D.J., Lesueur F., Nguyen-Dumont T., Pertesi M., Odefrey F., *et al.* Rare Mutation in XRCC2 Increase the Risk of Breast Cancer. *The American Journal of Human Genetics.* 2012 : **90**,734–739.

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 mM NaCl)
- Protéinase K (20 mg/ml, Invitrogen, France)
- NaCl 6 M (BIOCHEM Chemopharma, Quebec)
- 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* polymérase 5 U/µl (New England Biolabs, UK)
- Tampon de PCR (+MgCl₂) (New England Biolabs, 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 England Biolabs, UK)
- Tampon de restriction (tampon n°4 ; New England Biolabs, 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)

Annexes

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 μ l 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 μ l H₂O.
- ✓ 2,4 μ g bleu de bromophénol.
- ✓ 3 μ l glycérol.

Annexe 4. Résultats des amplifications *in silico*

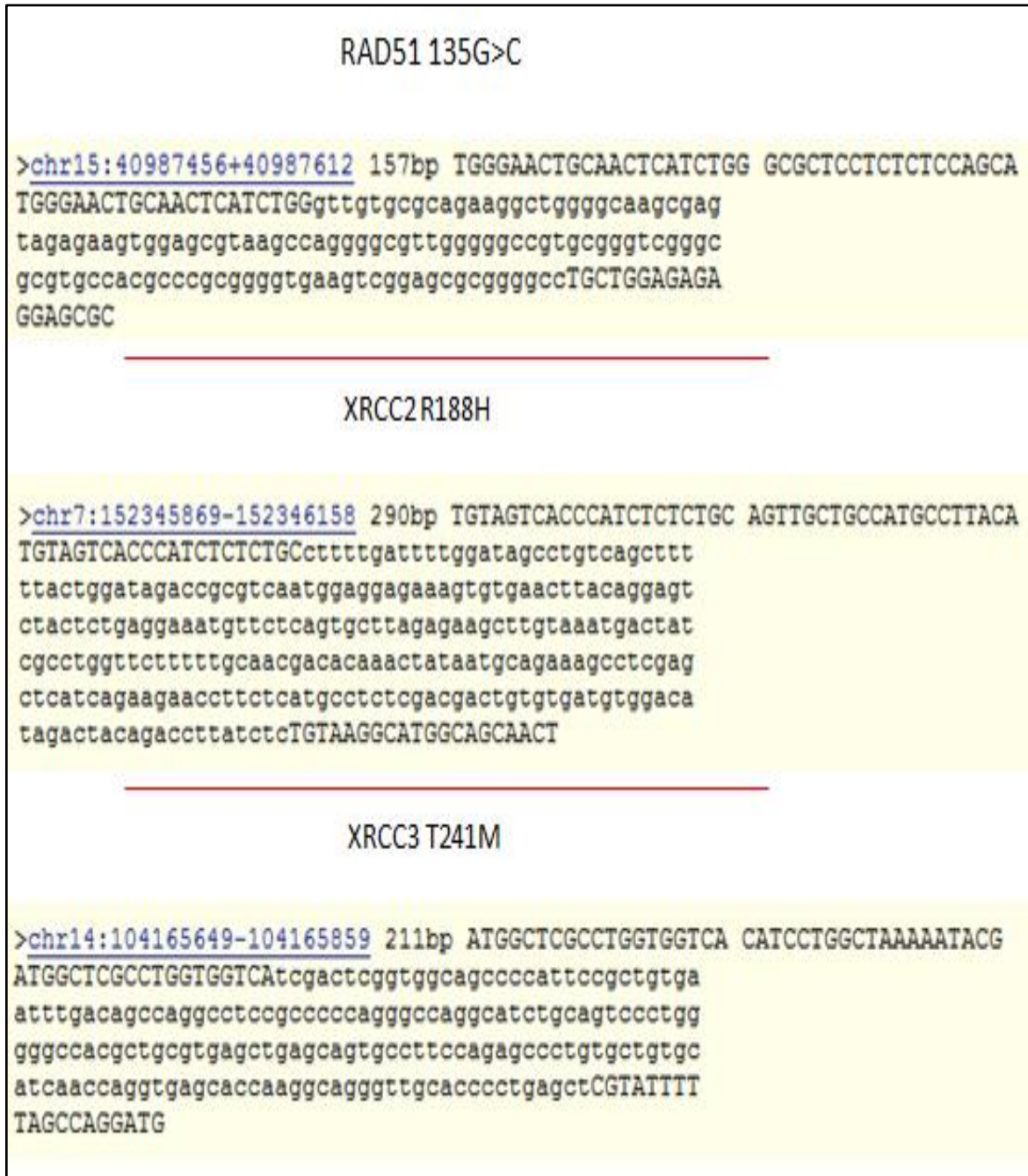


Fig. 1. Présentation des séquences PCR prévues amplifiées par la PCR *in silico* qui ont été lancées en-ligne à partir de <http://genome.ucsc.edu>.

Annexe 5. Positionnement de site de polymorphisme *in silico*

Annexes

RAD51 135G>C
GAGTAGAGAAGTGGAGCGTAAGCCA [C/G] GGGCGTTGGGGCCGTGCGGGTCGG
<hr style="border: 1px solid red;"/>
XRCC2 R188H
TTAGAGAAGCTTGTAATGACTATC [A/G] CCTGGTCTTTTTGCAACGACACAA
<hr style="border: 1px solid red;"/>
XRCC3 T241M
AGGCATCTGCAGTCCCTGGGGGCCA [C/T] GCTGCGTGAGCTGAGCAGTGCCTTC

Fig. 2. Présentation des sites de polymorphisme d'intérêt, disponibles sur : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

Annexe 6. Résultats de la digestion des fragments d'ADN par les endonucléases de restriction *in silico*

RAD51 (allèle sauvage)					
Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
86	BstNI	72	none	157	AGGGCGTTG GGGGCCGTGC GGGTCGGGCG CGTGCCACGC CCGCGGGGTG AAGTCGGAGC GCGGGCCCTG CTGGAGAGAG GAGCGC
71	none	1	BstNI	71	TGGGAACTGC AACTCATCTG GTTGTGCGC AGAAGGCTGG GGCAAGCGAG TAGAGAAGTG GAGCGTAAG C C
<hr style="border: 1px solid red;"/>					
XRCC2 (allèle mutée)					
Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
148	HphI	143	none	290	ATGACTATCA CCTGGTCTT TTTGCAACGA CACAACTAT AATGCAGAAA GCCTCGAGCT CATCAGAAGA ACCTTCTCAT GCCTCTCGAC GACTGTGTGA TGTGGACATA GACTACAGAC CTTATCTCTG TAAGGCATGG CAGCAACT
142	none	1	HphI	142	TGTAGTCACC CATCTCTCTG CCTTTTGATT TTGGATAGCC TGTCAGCTTT TTACTGGATA GACCGCGTCA ATGGAGGAGA AAGTGTGAAC TTACAGGAGT CTACTCTGAG GAAATGTTCT CAGTGCTTAG AGAAGCTTGT AA
<hr style="border: 1px solid red;"/>					
XRCC3 (allèle mutée)					
Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
108	none	1	NlaIII	108	ATGGCTCGCC TGGTGGTCAT CGACTCGGTG GCAGCCCCAT TCCGCTGTGA ATTTGACAGC CAGGCCTCCG CCCCCAGGGC CAGGCATCTG CAGTCCTGG GGGCCATG
103	NlaIII	109	none	211	CTGCGTGAGC TGAGCAGTGC CTTCCAGAGC CCTGTGCTGT GCATCAACCA GGTGAGCACC AAGGCAGGGT TGCACCCCTG AGCTCGTATT TTAGCCAGG ATG

Fig. 3. Présentation des fragments de restriction prévus obtenus suivant des digestions enzymatiques qui ont été lancées en-ligne à partir de <http://www.restrictionmapper.org>.

Résumé

Les gènes RAD51, XRCC2, XRCC3 codent pour des protéines clés de la réparation par recombinaison homologue (la voie la plus fidèle de la réparation). Les polymorphismes nucléotidiques (SNP) dans ces gènes peuvent être associés à une modification de l'efficacité de la réparation en modifiant le risque de développement d'un cancer.

Le but de notre étude concerne l'optimisation et la validation d'une méthodologie expérimentale basée sur les techniques de biologie moléculaire, qui sont fiables, sensibles et reproductibles (PCR-RFLP), pour la détection des SNPs : RAD51 G135C, XRCC2 R188H et XRCC3 T241M et la possible corrélation entre ces polymorphismes et le risque du cancer du sein chez la population Algérienne.

Les résultats obtenus confirment la présence de mutations au niveau de chaque gène étudié, avec des fréquences très faibles. Vu le nombre restreint d'échantillons étudiés, l'association entre les polymorphismes étudiés et le risque du cancer du sein n'a pas été possible et évidente. Néanmoins, ces résultats suggèrent l'existence d'autres mutations associées dans le processus de transformation de ce type cellulaire.

Vu l'intérêt de cette recherche, des études complémentaires du profil RFLP des variants RAD51 G135C, XRCC2 R188H et XRCC3 T241M sur un échantillonnage étendu de la population Algérienne sont envisageables, afin d'avancer des conclusions discutables.

Mots clés :

Cancer du sein, RAD51, XRCC2, XRCC3, Polymorphismes, PCR-RFLP

Summary

RAD51, XRCC2 and XRCC3 genes code for three central players of the homologous recombination repair pathway. Single nucleotide polymorphisms in these genes could be associated with a modification of the efficiency of the DNA repair process, leading to a modification of the risk of developing breast cancer.

The aim of our study is the optimization and validation of an experimental methodology based on molecular biology techniques (PCR-RFLP), which are reliable, sensible and reproducible, to detect the SNPs : RAD51 G135C, XRCC2 R188H, and XRCC3 T241M and the possible correlation between these polymorphisms and the risk of developing breast cancer at the Algerian population.

The obtained results confirm the presence of mutations at the level of each studied gene, with weak frequencies. Due to the restricted number of the samples analyzed, the association between breast cancer risk and the SNPs of interest was not possible. Nevertheless, these results suggest the existence of other mutations associated with the transformation process of this cellular type.

Regarding the importance of the present research, farther studies of RFLP profiles for the variants RAD51 G135C, XRCC2 R188H and XRCC3 T241M on a larger Algerian population are feasible, in order to come up with debatable conclusions.

Key words:

Breast cancer, RAD51, XRCC2, XRCC3, Polymorphisms, PCR-RFLP

ملخص

المورثات RAD51، XRCC2 و XRCC3 تعبر لبروتينات أساسية في إعادة تركيب الحمض النووي المتضرر عن طريق ظاهرة إعادة التركيب المتماثل. قد يؤثر تعدد الأشكال الناتج عن الطفرات الجينية في هذه المورثات علي فعالية إعادة تركيب الحمض النووي المتضرر مؤدية إلى التأثير على خطر الإصابة بسرطان الثدي.

تهدف دراستنا إلى تحديد جميع المعايير الدقيقة اللازمة لضمان منهجية تطبيقية مبنية على أسس تقنيات البيولوجيا الجزيئية (PCR-RFLP) لدراسة الطفرات الجينية التالية : RAD51 G135C، XRCC2 R188H و XRCC3 T241M بالإضافة إلى السعي لتحديد العلاقة بين هذه الطفرات و خطر الإصابة بسرطان الثدي.

تؤكد النتائج المتحصل عليها تواجد طفرات على مستوى المورثات المدروسة بنسب ضعيفة. لكن نظرا للعدد المحدود للعينات المدروسة لم تتمكن من تحديد العلاقة بين هذه الطفرات و خطر الإصابة بسرطان الثدي، بالرغم من ذلك توجي النتائج إلى تواجد طفرات أخرى تساهم في تحول هذا النوع الخلوي.

نظرا لأهمية دراستنا، دراسات أوسع على عينات أكثر ضرورية لتحديد العلاقة بين الطفرات المدروسة (RAD51G135C، XRCC2 R188H و XRCC3 T241M) و خطر الإصابة بسرطان الثدي.

الكلمات المفتاحية :

سرطان الثدي، RAD51، XRCC2، XRCC3، تعدد الأشكال، PCR-RFLP

