

**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

**ANALYSE MUTATIONNELLE DU GENE
SUPPRESSEUR DE TUMEUR p53 DANS LE CANCER
DU SEIN : A PROPOS DE CAS CLINIQUES D'UNE
POPULATION ALGERIENNE**

Présentée par : ACHOUR Hanane

Membre du jury:

Dr LAIADI Ziane	Président	MC'A	Université Mohamed Khider de Biskra.
Dr BOUATROUS Yamina	Examinatrice	MC'A	Université Mohamed Khider de Biskra.
Pr LAROUÏ Salah	Examineur	Professeur	Université Hadj Lakhdar de Batna.
Dr BOURAS Mourad	Rapporteur	MC'A	Université Hadj Lakhdar de Batna.

Année universitaire : 2015/2016

Remerciements

A mon Rapporteur

*Je tiens cependant à faire savoir à mon encadreur, **Monsieur le Docteur BOURAS Mourad**, combien je suis gênée de ne pouvoir trouver les justes mots pour lui exprimer mes sentiments de reconnaissance pour sa prise en charge, sa disponibilité, son savoir et son savoir faire dont il m'a gratifié tout le long de ce travail. Qu'il trouve dans ces lignes l'expression de ma profonde gratitude.*

Aux membres du jury,

*Je tiens à témoigner toute ma gratitude à **Monsieur le Docteur LAIADI Ziane**, 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 Docteur BOUATROUS Yamina** d'avoir accepté de juger mon travail.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à **Monsieur le Professeur LAROUH Salah**, qui a accepté d'évaluer ce travail et faire partie de ce jury de mémoire.*

*Une place particulière est réservée au **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.*

Au laboratoire où j'ai effectué ma thèse,

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.

A Fatiha. Je te remercie pour le soutien moral (fort nécessaire dans certaines périodes de stress), pour ta patience et ta disponibilité dans toutes les circonstances. Merci.

A Dalale, Kenza, Imen, Yamina, Safaa et Nabila, c'était très agréables de travailler avec vous.

Tous les autres que je ne nommerai pas par peur d'en oublier.

A mes amis,

A Amení DJEDIDI, Amení CHERGUI, Wissamo, Amel, Charifa, Imen, Halima, Hafessa, Maryama, Hakima,, pour tous les bons moments qu'on nous avons passé.

A mes amies de labo d'EPSP El-Kantara, avec qui j'ai passé des années inoubliables.

Dédicace

A mon père, Bachír, et ma mère, Djemaa ♥, C'est grâce à vous que j'ai réussi toutes ces années d'études de Biologie. Merci pour votre amour et pour votre soutien perpétuel.

A mes frère Lahcene, Redwane et mes sœurs Rima, Asma, Hadjer, Maroia et Sabrina vous m'avez toujours soutenue pendant mes études. Merci pour votre amour.

A mon oncle Mohamed pour leurs conseils, leur soutien.

ACHOUR Hanane

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures et des tableaux

Introduction

I. Partie bibliographique

I.1. Anatomie de la glande mammaire.....	2
I.2. Vascularisation du sein	3
I.3. Histologie de la glande mammaire	4
I.4. Cancer du sein	4
I.4.1. Facteurs de risques du cancer du sein	4
I.4.2. Facteurs pronostiques	5
I.4.3. Classification des cancers du sein	6
I.4.3.1. Classification anatomopathologique des cancers du sein	6
I.4.3.2. Classification moléculaire du cancer du sein	10
I.4.4. Gènes altérés dans le cancer du sein.....	11
I.5. Gène p53	15
I.5.1. Gène p53 et son produit	15
I.5.2. Fonctions de p53.....	17
I.5.3. Mutations du gène p53 et le cancer du sein	19

II. Partie expérimentale

II.1. Stratégie d'analyse.....	26
II.2. Matériels et Méthodes.....	27
II.2.1. Matériels biologique.....	27
II.2.2. Préparation des échantillons.....	28
II.3. Extraction de l'ADN génomique	29
II.4. Détermination de la concentration de l'ADN.....	30
II.5. PCR-RFLP.....	30
II.5.1. Amplification de l'ADN par PCR.....	30
II.5.2. Etablissement du profil de restriction RFLP.....	32

II.6. Résultats.....	36
II.6.1. Analyse des produits PCR obtenus.....	36
II.6.2. Profils des produits de PCR digérés par les endonucléases de restriction appropriées.....	37
II.7. Discussion	40
II.7.1. Discussion analytique.....	41
II.7.1.1. Echantillons.....	41
II.7.1.2. Vérification de l'intégrité de l'ADN.....	41
II.7.1.3. Optimisation de la PCR-RFLP : conditions réactionnelles et composants.....	42
A. Choix des amorces spécifiques et des enzymes de restriction adaptées.....	42
B. Températures optimales d'hybridation.....	43
C. Nombre de cycle.....	44
D. Optimisation de la concentration en MgCl ₂	45
II.7.2. Discussion des résultats.....	47

Conclusion et perspective

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ATM : *Ataxia Telangiectasia Mutated*

ATR : Ataxia-Telangiectasia mutated and Rad3-Related

CCIS : Carcinome Canalaire *In-Situ*

CHK1 : CHeckpoint Kinase 1

CHK2 : CHeckpoint Kinase 2

CLIS : Carcinome Lobulaire *In-Situ*

CCI : Carcinome Canalaire Infiltrant

CLI : Carcinome Lobulaire Infiltrant

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

DNA-PK : DNA-Protein Kinase

HER2⁺ : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

HIPK2 : Homeodomain Interacting Protein Kinase 3

MDM-2 : Mouse Double Minute 2 homolog

PCR : Polymerase Chain Reaction

PIK3 : Polo-Like Kinase 3

PRR : Proline-Rich Domain (Région Riche en Proline)

P14ARF : P14 Alternate Reading Frame

Liste des figures et des tableaux

Liste des figures

N°	Titre	Page
1.	Anatomie du sein	2
2.	Vascularisation artérielle du sein	3
3.	Facteurs étiologiques impliqués dans le développement de cancer du sein	5
4.	Classification histologique des sous-types de cancer du sein	7
5.	Types de cancer du sein	8
6.	Classification moléculaire des cancers du sein	11
7.	Schéma de l'emplacement chromosomique et de la structure du gène p53 humain	15
8.	Structure de la protéine p53	16
9.	Voies fondamentales de fonction de p53	18
10.	Prévalence des mutations de p53 dans les cancers sporadiques	21
11.	Spectre mutationnelle du gène p53 dans les cancers humains	22
12.	Fréquence et altérations faux-sens de p53 dans le cancer du sein spontanée et le syndrome Li-Fraumeni « mutations de p53 germinales »	23
13.	Illustration schématique des étapes de la PCR-RFLP réalisée pour l'étude des 4 hot spots (175, 248, 249 et 273)	27
14.	Schématisation de l'action des enzymes de restriction <i>HhaI</i> , <i>MspI</i> , <i>HaeIII</i> et <i>BstUI</i> sur les séquences cibles amplifiées par PCR et les fragments obtenus	34
15.	Analyse des produits de PCR obtenus après électrophorèse sur gel d'agarose à 3,5% et coloration au BET suivie d'une visualisation sous UV	36
16.	Profil électrophorétique des produits de PCR (105 pb de l'exon 5 du gène p53) et de leurs produits de digestion, séparés sur un gel d'agarose à 4%, après coloration au BET et visualisation sous UV	37
17.	Profil électrophorétique du "hot spot" 248 montrant les fragments obtenus après digestion par l'enzyme <i>MspI</i>	38

Liste des figures et des tableaux

18.	Profil électrophorétique des produits de PCR (158 pb du codon 249) et de leurs produits de digestion, séparés sur un gel d'agarose à 4%, après coloration au BET et visualisation sous UV	39
19.	Profil RFLP du codon 273 en présence de l'enzyme <i>Bst</i> UI	40
20.	Profil électrophorétique montrant l'intégrité de l'ADN	42
21.	Profil électrophorétique montrant les fragments obtenus du codon 248/249 de l'exon 7 (158 pb) après l'optimisation de la température d'hybridation	43
22.	Profil électrophorétique montrant les fragments obtenus de codon 248/249 de l'exon 7 (158 pb) après l'optimisation du nombre de cycles	44
23.	Profil électrophorétique montrant les fragments obtenus de codon 175 de l'exon 5 (105 pb) après l'optimisation du nombre de cycles	45
24.	Profils électrophorétiques des produits PCR montrant l'optimisation de la concentration en MgCl ₂ pour les codons 248/249 de l'exon 7	46
25.	Profils électrophorétiques des produits PCR montrant l'optimisation de la concentration en MgCl ₂ pour le codon 175 de l'exon 5	46

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I.	Oncogènes les plus importants dans le cancer du sein	12
II.	Gènes suppresseurs des tumeurs	13
III.	Structure des exons du gène p53 humain	16
IV.	Caractéristiques des échantillons étudiés.	28
V.	Amorces sens et antisens utilisées pour l'amplification par PCR de différentes séquences cibles de gène p53	31
VI.	Programme d'amplification par PCR des séquences cibles contenant les codons étudiés.	32

Liste des figures et des tableaux

VII.	Analyse mutationnelle des 4 codons "hot spots" (175, 248, 249 et 273) par les enzymes de restriction, informations générales	33
VIII.	Conditions fonctionnelles des enzymes de restriction.	35

Introduction

INTRODUCTION

Le cancer représente un véritable problème de santé publique de nos jours, qui est à l'origine de 7,6 millions de décès en 2008, soit 13% de la mortalité mondiale. Le nombre de décès par cancer devrait poursuivre sa progression et dépasser 11 millions de personnes d'ici 2030 selon les dernières estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

La plupart d'entre nous connaissent une personne souffrante d'un cancer du sein, qu'il s'agisse d'un membre de la famille, d'une amie ou d'une connaissance. Face à un diagnostic de cancer du sein, de nombreuses femmes demandent « Pourquoi moi ? ». Malheureusement, il n'existe pas de réponse évidente à cette question. Beaucoup de choses restent encore à découvrir au sujet du cancer du sein. Mais la bonne nouvelle, c'est que notre compréhension de cette maladie s'améliore en permanence et que ceci apportera de nouvelles possibilités de prévention de la maladie.

On connaît plusieurs facteurs de risques du cancer du sein. Cependant, dans la plupart des cas, il est impossible d'expliquer les raisons de son apparition chez une personne en particulier. Des mutations sur des gènes, transmises d'une génération à l'autre ou bien acquises au cours de la vie peuvent causer un cancer du sein. Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes qui codent pour des protéines régulant négativement la prolifération cellulaire ou exerçant un effet répresseur sur certains oncogènes. Ils sont des gardiens de l'intégrité du matériel génétique et correspondent aux gènes d'arrêt du cycle cellulaire. La perte ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs peut contribuer à la cancérogénèse. Parmi ces gènes, on trouve le gène p53 qui a de multiples fonctions biologiques du gène suppresseur (régulateur de l'expression de gènes cruciaux du cycle cellulaire, de la réparation et de la division cellulaire...). Depuis plusieurs années, la compréhension des fonctions de p53 et des moyens de la réguler constitue un important défi de la recherche contre le cancer.

Dans notre travail nous allons rechercher et, éventuellement, identifier des mutations sur des points "hot spots" pouvant affecter le bon fonctionnement du gène codant pour la protéine p53. Les mutations de p53 sont caractérisées par une forte prévalence des mutations faux-sens trouvés principalement dans les exons 5 – 8. La plupart des mutations

Introduction

du gène p53 surviennent à quatre points chauds (codons 175, 248, 249, 273). Nous avons donc porté notre attention sur ces quatre codons.

Grâce à la technique de PCR-RFLP, couramment utilisée, nous allons étudier ces points chauds du gène p53 dans une population Algérienne étendue, ce qui va permettre d'établir une corrélation entre le type de mutation observée et comprendre le mécanisme de tumorigenèse déclenché.

Partie Bibliographique

Ինքնուրույն ԲՈՒՄՆԵՐԻ ՄԱՍԻՆ

I. Partie bibliographique

I.1. Anatomie de la glande mammaire

Les seins sont des glandes cutanées sudoripares modifiées situés sur la face latérale antérieure du thorax. Chaque sein s'étend verticalement de la 2^{ème} à la 3^{ème} côte et transversalement du bord latéral du sternum à la ligne axillaire (figure 1) (1). La glande mammaire est composée de 15 à 20 lobes (de tailles variables), ces derniers sont composés de lobules contenant entre 10 et 100 alvéoles (ou acini). Chaque acini mesure 0,12 mm de diamètre (2).

Les lobules sécrétoires divergent pour former 15 à 25 canaux (ducts) qui se fondent en gros canaux (conduit lactifère), ceux-ci se dilatent en aval pour former le sinus lactifère et débouchent sur la surface du mamelon (nipple). Le pore du mamelon est de 0,4 mm à 0,7 mm de diamètre et il est entouré par des fibres musculaires circulaires (2). Le mamelon est entouré d'une zone de peau pigmentée appelée l'aréole (areola) (3).

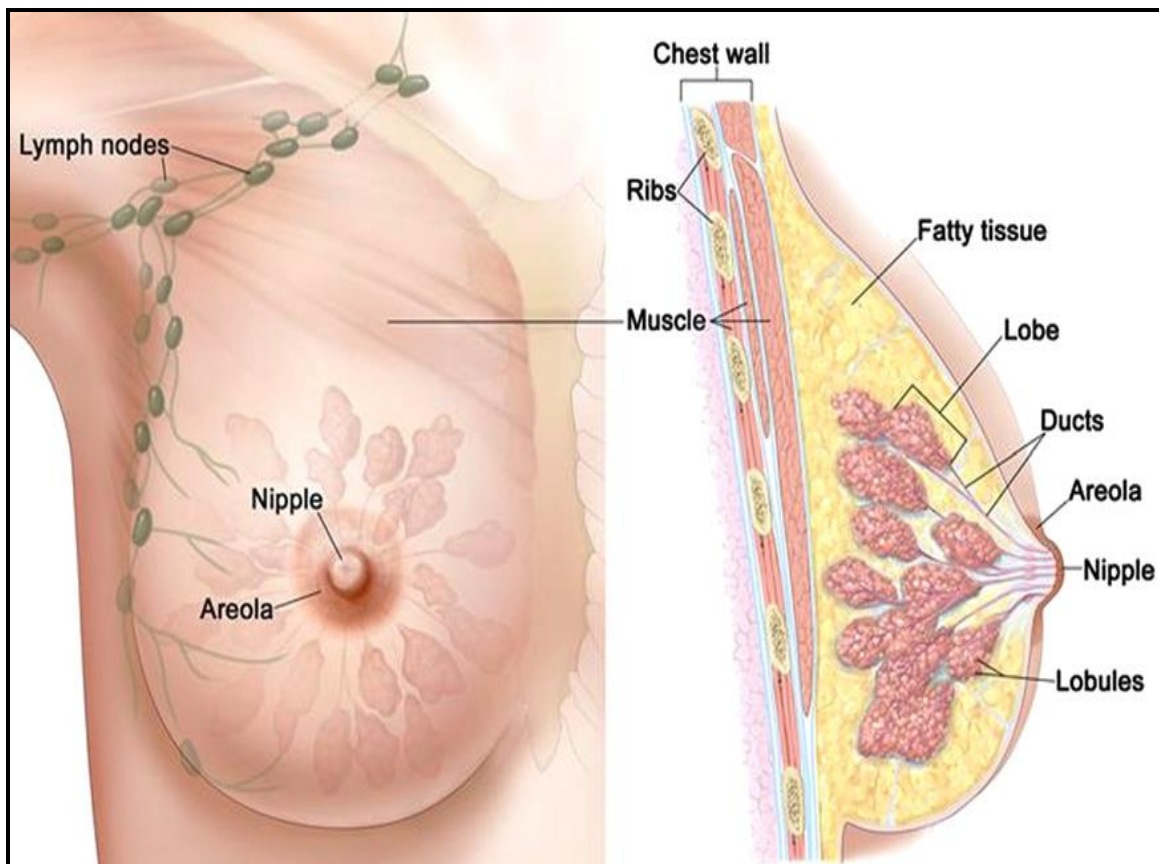


Figure 1. Anatomie du sein (4).

I.2. Vascularisation du sein

a. Vascularisation artérielle : l'approvisionnement du sein en sang est assuré principalement à partir de branches médianes antérieure et postérieure de l'artère mammaire interne (60%) et les branches latérales mammaires de l'artère thoracique latérale (30%) (2). Les deux artères précédemment cités proviennent de l'artère axillaire et entrent dans le sein par la région superomédiale et superolatéral, respectivement (figure 2) (1).

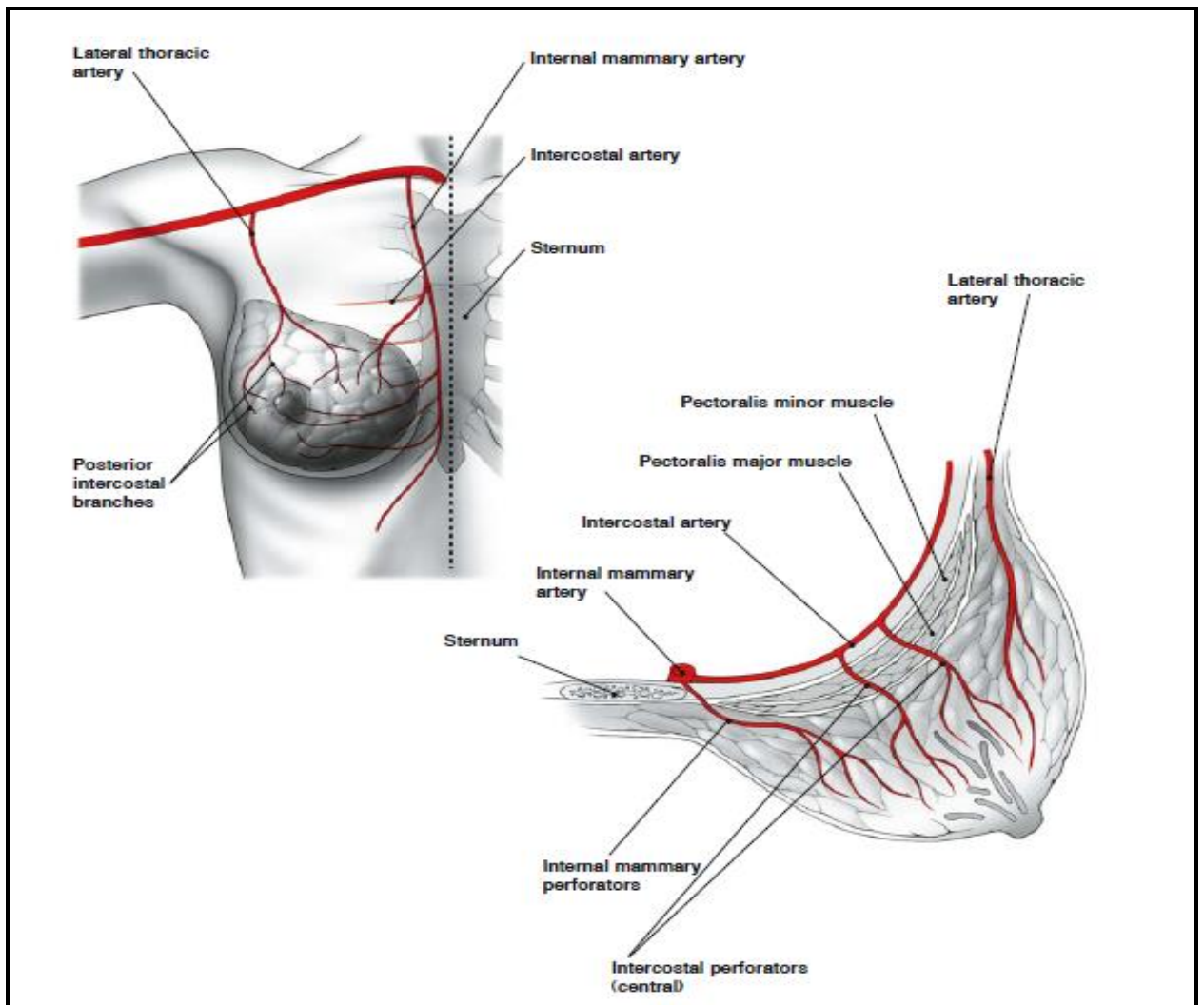


Figure 2. Vascularisation artérielle du sein (1).

b. Vascularisation veineuse : le drainage veineux des seins est divisé en deux systèmes, système profond et système superficiel, qui sont reliés par de petite veine. Les deux systèmes se jettent dans la veine thoracique interne, axillaire et céphalique (2).

c. Drainage lymphatique : Le drainage de la lymphe à partir du sein a été intensivement étudié particulièrement pour le cancer du sein, et on trouve deux voies lymphatiques par lesquelles la lymphe est drainée à partir des seins. La première correspond aux ganglions axillaires, la seconde aux ganglions mammaires internes. La majorité de la lymphe des deux parties médiale et latérale de seins est drainé vers les ganglions axillaires (75%) alors que les ganglions lymphatiques mammaires internes drainent la partie profonde du sein (2).

I.3. Histologie de la glande mammaire

Les seins sont composés de glandes sécrétoires, de tissu adipeux et de tissu conjonctif bien développés qui entourent les canaux et les lobules. Le sein est soutenu par des fibres de tissu conjonctif appelé : ligaments de Cooper (2). La structure de base de la glande mammaire mature est une série d'alvéoles organisés en lobules, chacun est drainé grâce à un système canalaire commun vers le mamelon. Les canaux et les alvéoles sont bordés par une double couche : une couche de cellules épithéliales luminales sécrétoires et une couche de cellules basales myoépithéliales qui fournissent la force contractile de l'éjection du lait pendant la lactation (5).

I.4. Cancer du sein

Le cancer du sein est le premier cancer diagnostiqué chez les femmes dans 140 des 184 pays couverts par GLOBOCAN dans le monde. 1,7 millions de femmes ont un diagnostic du cancer chaque année et en 2012, 6,3 millions de femmes vivaient avec un cancer du sein diagnostiqué au cours des cinq années précédentes. Le cancer du sein est la cause la plus fréquente de décès par cancer chez les femmes (522000 décès). Il représente maintenant un cancer sur quatre chez les femmes et il est aussi l'une des principales causes de décès par cancer dans les pays les moins développés (6) (7).

I.4.1. Facteurs de risque du cancer du sein

Il existe suffisamment de preuves permettant d'affirmer que la susceptibilité génétique, l'exposition à des facteurs environnementaux et à des facteurs liés au style de vie jouent un rôle important dans l'étiologie de cette maladie (8). Les facteurs de risque génétiques

représentent 5 à 10 % des cas de cancer du sein (9). Les facteurs de risques physiologiques et environnementaux établis pour le cancer du sein comprennent : un parent de premier degré atteint de cancer du sein, puberté précoce, ménopause tardive, nulliparité ou premier enfant à un âge avancé, le surpoids après la ménopause, certains types de maladies bénignes du sein, la consommation d'alcool, et l'utilisation à long terme de traitement d'œstrogène substitutif de la ménopause (9).

Il existe d'autres facteurs associés à un risque élevé de cancer du sein : le tabagisme, certains aspects de la nutrition (consommation de viande et de graisse), absence d'activité physique et le stress psychologique (9). La maternité précoce, la nulliparité, l'activité physique régulière, l'allaitement et le maintien de l'équilibre énergétique réduisent ce risque (figure 3) (8).

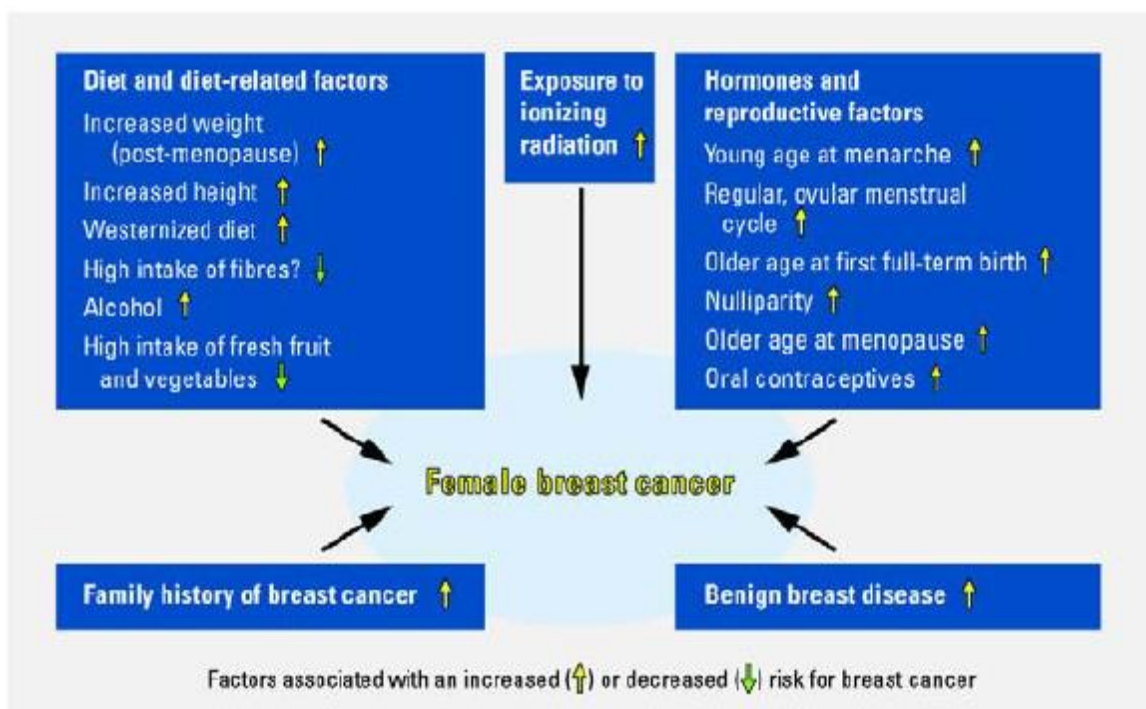


Figure 3. Facteurs étiologiques impliqués dans le développement de cancer du sein (10).

I.4.2. Facteurs pronostiques

Le cancer du sein est une maladie hétérogène avec des aspects morphologiques multiples, des caractéristiques moléculaires différentes, un comportement et une réponse au traitement variables. La prise de décision thérapeutique potentiellement appropriée aux patientes dépend de la disponibilité des forts facteurs cliniques pronostiques, pathologiques

et prédictifs. Dans le cancer du sein au stade précoce, l'utilisation de la thérapie systémique doit être déterminée pour chaque patiente, les 3 principaux déterminants pronostiques utilisés en routine : LN (Lymph Node status) ou status ganglionnaire, c'est le nombre de ganglion lymphatique métastatique, la taille de tumeur et le grade histologique (11). Le grade histologique ou la présence éventuelle de métastases est déterminé par l'évaluation de la quantité de formations glandulaires présentes, de polymorphisme cellulaire et du nombre de mitoses ; l'évaluation de grade apporte des éléments de pronostic supplémentaires. Les carcinomes sont divisés en 3 grades qui correspondent chacun à un pourcentage de survie : grade I (85%), grade II (60%), grade III (45%) (12).

Le stade, le grade, le type histologique des tumeurs et l'état des récepteurs hormonaux sont des facteurs pronostiques qui peuvent être utilisés pour déterminer la survie dans le cas de carcinome mammaire. Il y a aussi la prolifération cellulaire, dont il est possible de déterminer sa vitesse par l'immunohistochimie. Les tumeurs, qui ont une vitesse de prolifération élevée, ont un pronostic mauvais que celles qui ont une vitesse de prolifération basse. Cette caractéristique est significative et indépendante de la détermination histologique du grade de la tumeur. Ainsi que l'expression des oncogènes, dans chaque grade et de chaque stade de cancers mammaires, il existe des variantes des taux de survie. L'étude de l'expression des oncogènes tente d'expliquer ces variantes. Comme beaucoup de tumeurs, le cancer du sein est associé à différentes anomalies d'oncogènes (12).

Le pronostic peut être également relié aux taux des récepteurs hormonaux. Les patientes atteintes d'un carcinome mammaire et qui expriment la présence de récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone ont une survie plus long (12).

I.4.3. Classification des cancers du sein

I.4.3.1. Classification anatomopathologique des cancers du sein

Le cancer du sein peut être classé en carcinome *in situ* et carcinomes infiltrants (invasifs). Le cancer du sein *in situ* est encore classé en canalaire ou lobulaire (figure 4). La différence entre les deux types se fait selon la croissance et les caractéristiques cytologiques (figure 5) (13).

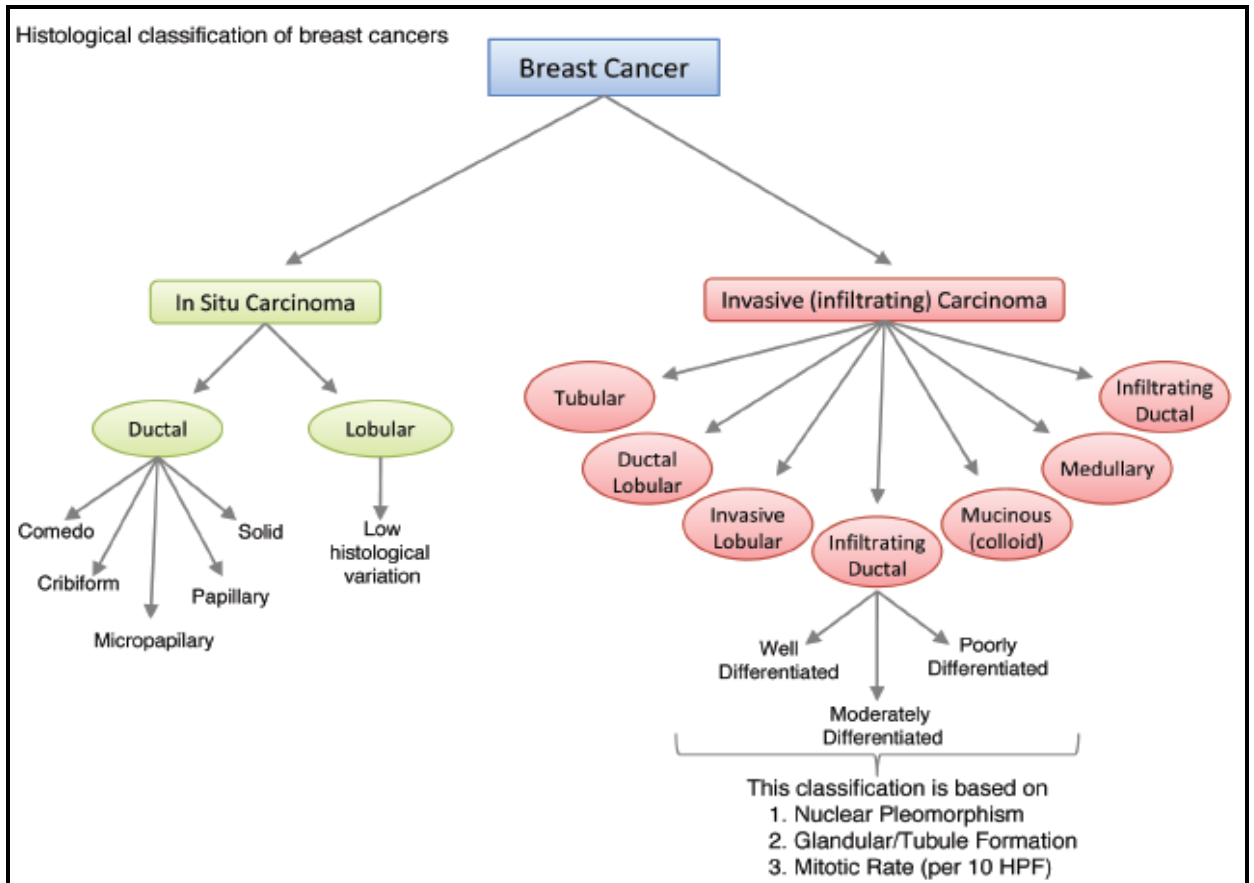


Figure 4. Classification histologique des sous-types de cancer du sein (13).

a. Le carcinome canalaire *in situ* (CCIS) encore appelé carcinome intracanalair ou intragalactophorique ne donne, en théorie, ni métastases ganglionnaires ni métastases à distance, puisque le processus néoplasique se trouve confiné à l'épithélium dans les canaux où la membrane basale est optiquement intacte (figure 5) (14). Le carcinome canalaire *in situ* est considérablement plus fréquent que le carcinome lobulaire *in situ*, et englobe un groupe hétérogène de tumeurs. CCIS se classe en 5 sous-types (selon les caractéristiques architecturales de la tumeur) : comedo, cribriforme, micropapillaire, papillaire et solide (figure 4) (13).

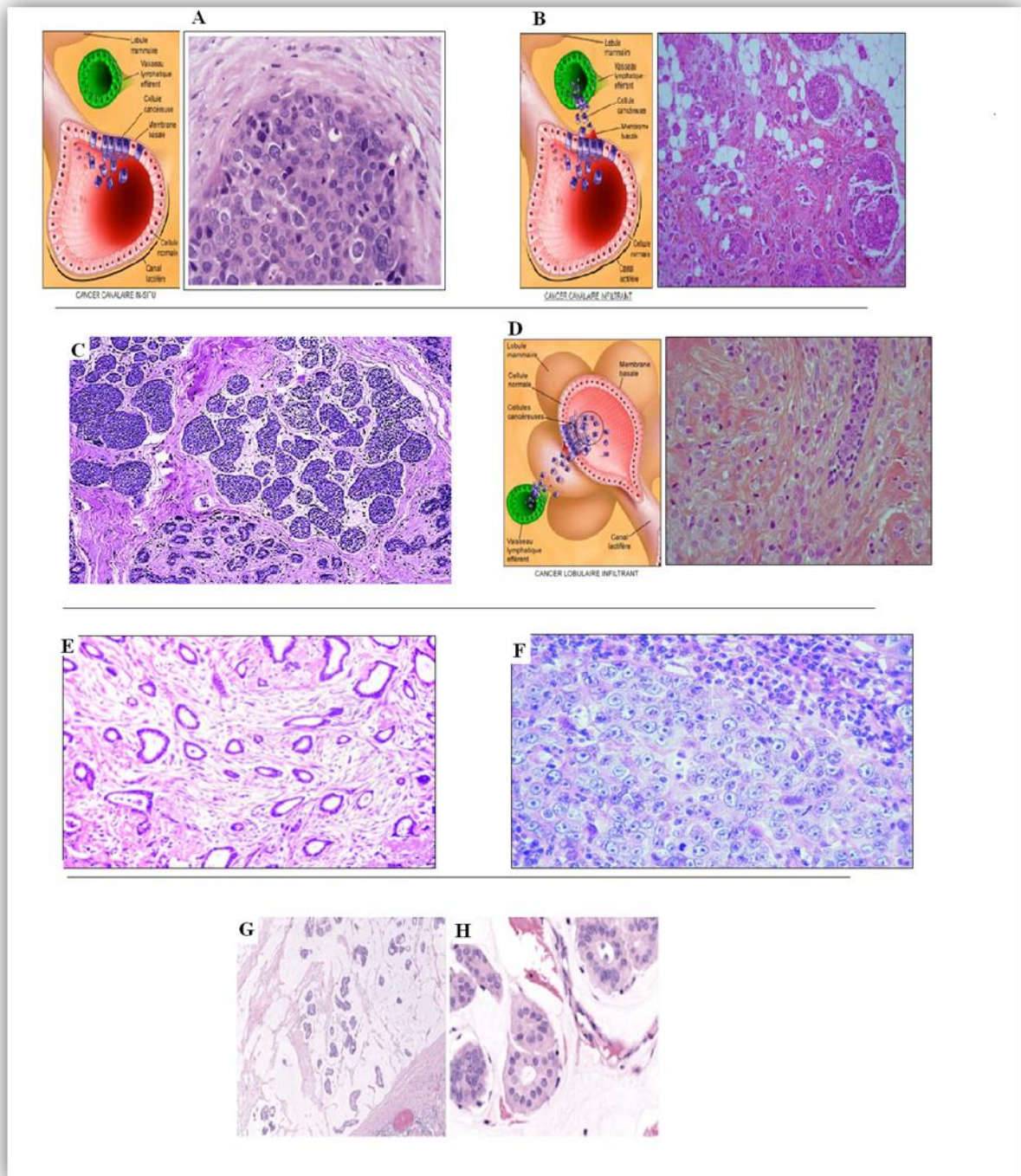


Figure 5. Types de cancer du sein. **(A).** Le carcinome canalaire *in situ* (CCIS). Les cellules malignes pleomorphiques sont vues à l'intérieur d'une bande d'éosinophile de la membrane basale (15) (16). **(B).** Carcinome canalaire infiltrant (HES x 50). Les cellules tumorales s'agencent en tubes et canaux dont l'aspect est assez similaire aux canaux galactophores normaux. Elles infiltrent le tissu normal et la graisse, entourée d'un stroma réaction fibro-élastosique et s'accompagnent d'une composante intracanalair de type massif (15) (19). **(C).** Carcinome lobulaire *in situ* (CLIS), type classique avec distension

glandulaire marquée. Les glandes lobulaires élargies ont rempli la plupart du stroma intralobular. Noter la taille variable des glandes avec CLIS et le lobule non concerné ci-dessous (18). (D). Carcinome lobulaire infiltrant (HES x 40). La tumeur est formée de cellules de taille et de forme homogènes, isolées ou constituant des files indiennes (15) (19). (E). Carcinome tubulaire. Il existe une distribution aléatoire des tubules arrondies et anguleuses avec des lumières ouvertes, bordés par une seule couche de cellules épithéliales séparés par un stroma réactif abondant (10). (F). Coupe histologique d'un carcinome médullaire. La tumeur est composée de massifs de grandes cellules syncytial pléomorphes. Il n'y a pas de différenciation glandulaire. Le stroma adjacent contient de nombreuses cellules inflammatoires (10). (G). Carcinome mucineux invasif. Petites structures glandulaires sont notées dans des plages de mucines (16). (H). Le fort grossissement de carcinome mucineux invasif montre des atypies nucléaires faibles à modérées sans évidence de mitoses (16).

b. Les carcinomes lobulaires *in situ* (CLIS), ils sont rares (environ 0,5% des carcinomes mammaires) et sont, plutôt, considérés comme des marqueurs de risque de développement d'un cancer infiltrant (figure 5) (17).

Le cancer du sein infiltrant est un groupe de tumeurs épithéliales malignes caractérisées par l'invasion des tissus adjacents et une tendance marquée aux métastases à distance (10).

Les principaux types de tumeurs infiltrants, incluant canalaire invasive, lobulaire invasive, mucineux (colloïde), tubulaire, médullaire et carcinome papillaire (canalaire/ lobulaire) (figure 4) (13).

c. Le carcinome canalaire infiltrant (CCI) est le plus fréquent. Il représente 70 à 80% des cas (13). C'est un groupe hétérogène de tumeur. Généralement, il est constitué de cellules de grandes tailles et irrégulières entre elles, pourvues de cytoplasme plus abondant et éosinophile. Ces cellules sont cohésives, s'agençant tantôt en tubes, tantôt en travée ou en massives, plus rarement, adoptant une architecture syncytiale (figure 5) (19).

d. Le carcinome lobulaire infiltrant (CLI) est formé de petites cellules régulières, rondes, uniformes et non cohésives, ressemblant à celles du carcinome lobulaire *in situ* et ayant, en général, un faible taux de mitose (figure 5). L'aspect typique est celui d'une diffusion de

cellules tumorales isolées ou en file indienne groupées de façon concentrique autour de canaux galactophoriques résiduels où un pourtour de lésions de carcinome lobulaire *in situ* (19).

e. Le carcinome tubulaire, un type particulier de cancer du sein, est composé de structures tubulaires distinctes avec ouverture luminal bordé par une seule couche de cellules épithéliales. Les carcinomes tubulaires mesurent habituellement entre 0,2 et 2 cm de diamètre, la majorité est de moins de 1 cm. Les lobules sont généralement avals ou arrondies et les cellules épithéliales sont petites et régulières avec un discret pléomorphisme nucléaire et une faible mitose (figure 5) (10).

f. Le carcinome mucineux (ou colloïde) se rencontre le plus souvent chez les femmes ménopausées. Les cellules sécrètent du mucus dans le stroma, qui donne à la tumeur une consistance molle et visqueuse (figure 5) (12).

j. Le carcinome médullaire, un carcinome bien circonscrit composé des cellules peu différenciées disposées en massifs séparés par de fines travées du tissu conjonctif lâche et des foyers inflammatoires de nécrose et une différenciation malpigiennne peuvent être observées (figure 5) (10).

I.4.3.2. Classification moléculaire du cancer du sein

Le développement des outils biologiques dans le cancer du sein a permis d'individualiser et de classer les différents sous-types pronostic de cancer du sein. La classification moléculaire intrinsèque est certainement la plus largement utilisée de nos jours (20).

L'identification récente des sous-types moléculaires d'un cancer du sein a permis de prédire une réponse aux nouvelles thérapies ciblées, contrairement aux anciennes classifications. Des études récentes ont identifié plusieurs sous-types moléculaires intrinsèques de cancer du sein qui ont été plus tard confirmés et classés comme : basal-like, ErbB2⁺ ou HER2⁺, normal breast like, sous type luminal A et sous-type luminal B et plus récemment, un nouveau sous-type « Claudin low » est identifié (figure 6) (21).

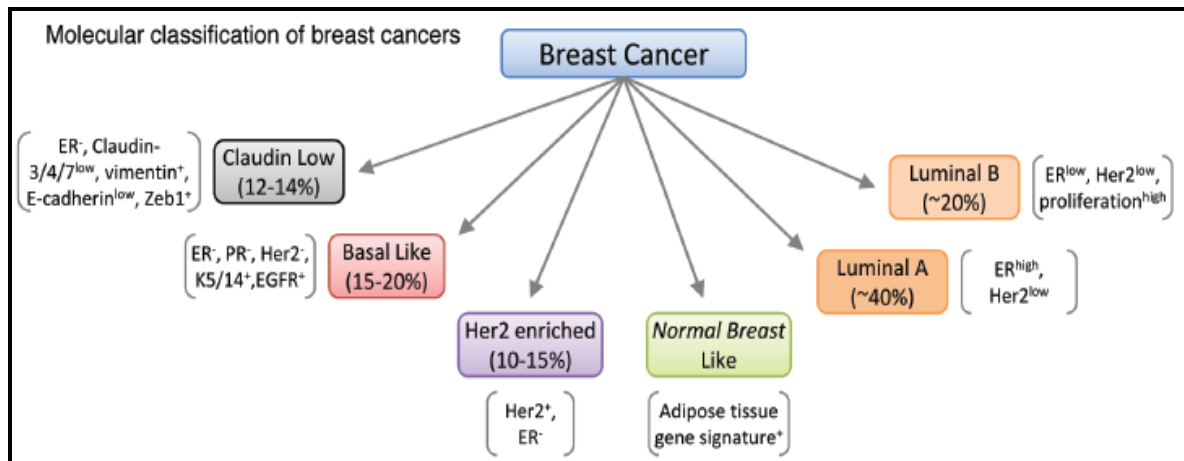


Figure 6. Classification moléculaire des cancers du sein (13).

★ Les cancers du sein dits « luminaux » sont caractérisés par l'expression des récepteurs aux œstrogènes et des facteurs de transcription GATA3. Ils se divisent en 2 catégories ; les sous-types d'origine luminal A se caractérisent par une prolifération cellulaire peu élevée, les sous-types d'origine luminaire B se caractérisent par une prolifération cellulaire plus élevée (20).

★ Les cancers du sein dits « HER2+++ » (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) surexpriment l'oncoprotéine cErbB2 Her2, protéine appartenant à la superfamille des récepteurs à l'épidermal growth factor (EGF) mais également peuvent exprimer les récepteurs aux estrogènes et à la progestérone (20).

★ Les cancers du sein de phénotype basal, n'expriment ni les récepteurs hormonaux, ni l'oncoprotéine Her2. En outre, une tumeur mammaire, pour être de phénotype basal, doit également exprimer une partie des marqueurs « basaux » soit des cytokératines 516, 17, 14, EGFR, C-kit, la moesin, caveolin, NGRF/P75. Les tumeurs sont généralement mutées par p53 (20).

★ Le sous-type basal-like/triple négative (ER⁻/PR⁻/ErbB2⁻) a la plus courte durée de survie (13).

I.4.4. Gènes altérés dans le cancer du sein

La progression du cancer du sein implique de multiples événements génétiques, qui peuvent activer l'action des oncogènes et perturber le fonctionnement de certains gènes suppresseur de tumeur. L'analyse caryotypique et épidémiologique des tumeurs

Partie Bibliographique

mammaires à des stades différents suggèrent que les cancers du sein deviennent de plus en plus agressifs par l'accumulation progressive de mutations génétiques (21).

Les gènes qui sont fréquemment altérés dans le cancer du sein : ErbB2, PI3K, p53, BRCA1/2, et PTEN (22).

a. **Les oncogènes** : ErbB2, PI3KCA, Myc et CCND1 (codent pour cyclin D1) sont fréquemment dérégulées dans le cancer du sein (tableau I).

La plupart des oncogènes sont des mutations de certains gènes normaux appelés proto-oncogènes. Les proto-oncogènes sont « bons » gènes qui contrôlent normalement quel type de cellule que c'est et combien de fois se divise. Quand un proto-oncogène muté en un oncogène, il devient un gène « mauvais » qui peut devenir activé en permanence. Lorsque cela se produit, la cellule se développe hors de contrôle, ce qui peut conduire au cancer (23).

Tableau I. Oncogènes les plus importants dans le cancer du sein (21, 22).

Oncogène	Fonction
ErbB2 (appelé aussi HER-2)	Gène situé sur le chromosome 17q et code pour les récepteurs transmembranaires « tyrosine growth factor receptor », HER-2 presque exprimé exclusivement dans le cancer du sein primaire d'origine canalaire et exprimé dans 30 à 60% des cancers invasifs.
c-myc	A été localisé sur le chromosome 8q24 et code pour une phosphoprotéine nucléaire qui agit comme un régulateur de transcription impliqué dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Il est impliqué et surexprimé dans 15 à 25% des tumeurs du sein.
PI3K	la signalisation de PI3K influence la croissance cellulaire, la survie, le métabolisme. L'altération de PI3K est fréquente dans le cancer du sein.

Partie Bibliographique

Cyclin D1	Méiateur du cycle cellulaire, codé par le gène localisé sur le chromosome 11q13, il est surexprimé dans 40% - 50% des cancers du sein invasives et implifié dans 10%- 20% des cas.
Cyclin E	Méiateur du cycle cellulaire, codé par le gène situé sur le chromosome 19q12 et est rarement amplifié dans le cancer du sein (environ 2 %). Cependant, la surexpression et l'altération de la voie de dégradation, résultant d'accumulation des isoformes de faible poids moléculaire ont été démontrés dans 20 % à 30 % des cancers du sein.

b. Les gènes suppresseurs de tumeur

Les gènes suppresseur de tumeur sont des gènes normaux qui ralentissent la division cellulaire, réparent les erreurs de l'ADN, ou dire aux cellules quand elles meurent (un processus appelé apoptose ou mort cellulaire programmée). Lorsque les gènes suppresseurs de tumeur ne fonctionnent pas correctement, les cellules peuvent se développer hors de contrôle, qui peut mener au cancer (tableau II) (23).

Tableau II. Gènes suppresseurs des tumeurs (22).

Gène	Fonction
P53	Le gène p53 est situé sur le chromosome 17q. Il code une protéine de 393 acides aminés qui possède de multiples fonctions, les mutations de p53 se produisent chez environ 20 à 30% des cancers du sein.
BRCA1/2	Le gène BRCA1 se trouve sur le locus 17q21. Le BRCA1 représentant des mutations à plus de 5% de tous les types de cancers du sein chez les femmes de moins de 40 ans, mais ce chiffre s'élève à plus de 90% dans le cancer familial. Le gène BCRA2 se situe sur le locus 13q12-q13. Les deux gènes confèrent un risque accru du cancer du sein et de l'ovaire lorsqu'ils sont mutés.
PTEN	Le gène PTEN code pour une phosphatase qui est un régulateur négatif d'AKT. La perte de PTEN augmente le signal de survie cellulaire AKT. Les mutations

Partie Bibliographique

	<p>héréditaires du gène PTEN ont montré augmenter le risque de cancers du sein et de l'ovaire, bien que les mutations de ce gène dans des cas sporadiques sont rares.</p>
p27	<p>Le p27 est capable de se lier à un certain nombre d'unique complexes cycline/CDK pour atténuer leur activité, généralement diriger la cellule vers l'arrêt en phase G1. De nombreux rôles de p27 ont été proposés, y compris les fonctions dans la modulation de la pharmacorésistance, la différenciation cellulaire et la protection contre l'inflammation. Soutenir le rôle de p27 comme un suppresseur de tumeur, la diminution de l'expression a été documentée dans un large éventail de lignées cellulaire de cancer humain. Cependant, les mutations de p27 semblent être des événements rares dans une tumeur maligne, qui se produisent dans seulement 1 % des tumeurs dans une étude.</p>
CHK2	<p>Cette kinase est activée par la protéine mutée ataxie-télangiectasie (ATM) en réponse aux dommages de l'ADN et puis phosphoryle p53 et BRCA-1, qui est muté dans certaines familles qui ont un risque de cancer mammaire, avec un phénotype de syndrome de Li-Fraumeni.</p>
ATM	<p>Le gène ATM détecte des dommages de l'ADN et active les points de contrôle et les voies de réparation de l'ADN par phosphorylation rapide de plusieurs substrats y compris p53, BRCA-1 et CHK2.</p>

I.5. Gène p53

I.5.1. Gène p53 et son produit

Le gène p53 humain est situé sur le chromosome 17q13. Il est composé de 19198 nucléotides du premier exon à l'exon 11 (figure 7). La séquence codante commence dans le deuxième exon et se termine dans le dernier exon (tableau III) (24).

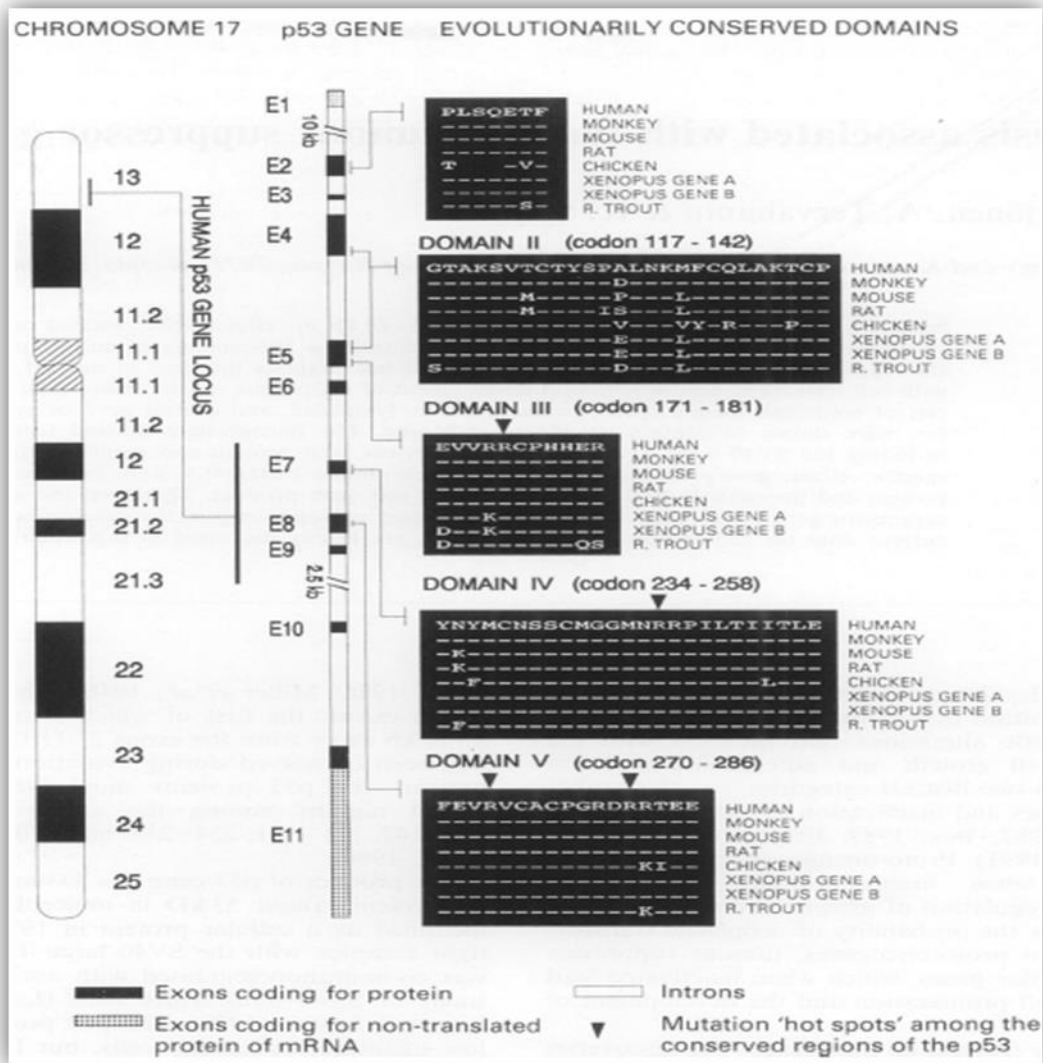


Figure 7. Schéma de l'emplacement chromosomique et de la structure du gène p53 humain (25).

Partie Bibliographique

Tableau III. Structure des exons du gène p53 humain « la partie encadrée » (24).

	p53			p63			p73		
	start	end	length	start	end	length	start	end	length
Full gene length	19,198			265,822			80,728		
Coding region	Starts in exon two, goes through exon 11			Starts in exon one, goes through exon 14			Starts in exon two, goes through exon 14		
Exons	start	end	length	start	end	length	start	end	length
Exon 1	1	223	223	1	151	151	1	77	77
Exon 2	10,978	11,079	102	106,314	106,442	129	29,769	29,866	98
Exon 3	11,197	11,218	22	107,216	107,348	133	30,496	30,616	121
Exon 4	11,328	11,606	279	176,846	177,100	255	54,985	55,227	243
Exon 5	12,364	12,547	184	232,806	232,992	187	69,457	69,643	187
Exon 6	12,629	12,741	113	235,256	235,371	116	70,790	70,905	116
Exon 7	13,310	13,419	110	236,407	236,516	110	74,551	74,660	110
Exon 8	13,763	13,899	137	237,154	237,290	137	75,064	75,206	143
Exon 9	13,992	14,065	74	237,898	237,980	83	75,565	75,653	89
Exon 10	16,885	16,991	107	241,433	241,569	137	76,763	76,884	122
Exon 11	17,910	19,198	1289	254,968	255,125	158	77,436	77,584	149
Exon 12				257,914	258,058	145	78,363	78,501	139
Exon 13				259,363	259,456	94	78,899	78,992	94
Exon 14				262,780	265,822	3043	80,183	80,728	546

Exons and coding region for the longest transcript were extracted from Ensembl database, release 54 (Hubbard et al. 2009).

Le produit du gène p53 est une phosphoprotéine nucléaire de 393 acides aminés (environ poids moléculaire de 53 Kda). La protéine p53 a été trouvée dans les cellules normales à de très faibles quantités mais, de grandes quantités de p53 (5-100 fois) ont été détectées dans les cellules transformées en culture et dans les tumeurs humaines (25).

Le gène suppresseur de tumeur p53 est au centre d'une multitude de voies de signalisation, qui contrôlent le cycle cellulaire et maintiennent l'intégrité du génome humain. La protéine p53 est un facteur de transcription et elle devient active quand elle est sous forme d'un homotétramère (4x393 résidus d'acides aminés) (figure 8) (26).

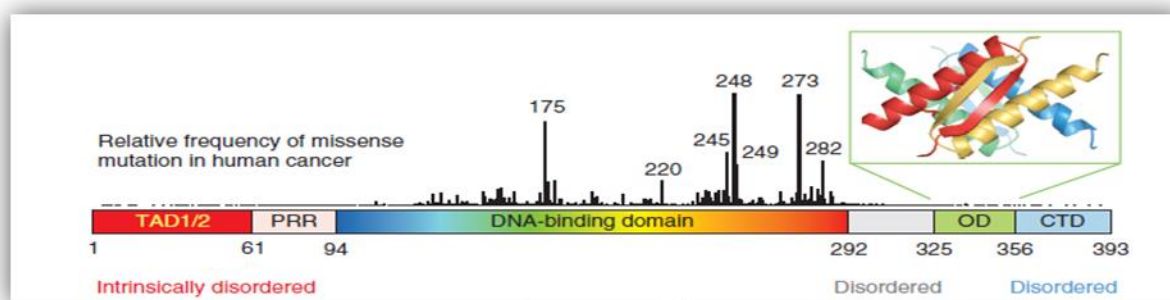


Figure 8. Structure de la protéine p53. La p53 contient un Domaine Amino-terminal de Transactivation (TAD) qui peut être subdivisé en sous-domaines TAD1 et TAD2, suivie d'une Région Riche en Proline (PRR), un domaine centrale (DNA-binding domain) et un domaine de tétramérisation (OD) puis un domaine réglementaire carboxy-terminal (CTD).

La structure du domaine de liaison (DNA-binding domain) à l'ADN est présente comme un gradient d'arc en ciel de l'extrémité amino-terminal (bleu) à l'extrémité carboxyle (rouge), dont les sites de points chauds des mutations " hotspot " présentent comme des modèles du bâton " stick " (26).

Le domaine de liaison à l'ADN de p53 humain est d'une stabilité thermodynamique relativement faible et se déplie rapidement à la température du corps avec une demi-vie de 9 minutes (26).

L'état d'oligomérisation de la protéine p53 régulée *via* son domaine de tétramérisation (acide aminé 325-355 de p53 humain). Au centre de ce contact, les Leucines 344 de toutes les chaînes latérales de 4 sous-unités sont en contact direct. La Leu 344 est responsable du signal d'export nucléaire. Si ce motif est masqué dans la p53 tétramérique, donc on peut conclure que les niveaux de p53 nucléaire peuvent être contrôlés via la régulation de l'état d'oligomérisation. Un pont salin intermoléculaire hautement conservée entre Arg337 et Asp352 stabilise le tétramère. Environ 20% des mutations germinales de p53 sont une mutation au niveau de codon 337, tandis que la fréquence relative des mutations somatiques cancéreuses de ce site est faible (26) (27).

Le domaine C-terminal régule la capacité de la liaison de la p53 entre le domaine centrale et sa séquence spécifique à l'ADN. Ce domaine est riche en acides aminés basiques. Les preuves suggèrent que des changements structurels au niveau du domaine C-terminal sont nécessaires pour activer p53 (28).

I.5.2. Fonctions de p53

La p53 surnommé « le gardien du génome » ou « le gardien cellulaire ». La protéine p53 agit pour transmettre une variété de stress induisant des signaux aux différentes réponses cellulaires antiprolifératifs. La p53 a une variété de fonctions antiprolifératifs susceptibles de contribuer à ses propriétés suppressives de tumeur (figure 9).

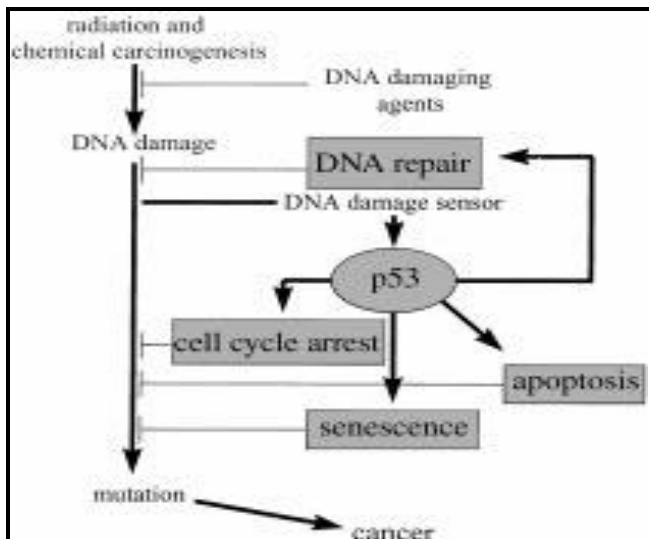


Figure 9. Voies fondamentales de fonction de p53 (29).

En réponse à divers stress cellulaires, les cellules peuvent subir un arrêt de croissance pour prévenir la progression de mutations dans l'ADN. Le rôle de p53 dans l'arrêt de croissance cellulaire a été largement étudié. Il induit un arrêt en G1 principalement par la transactivation de $p21^{waf1/cip1}$, un inhibiteur des kinases cyclines-dépendantes. La p53 a été montrée induire l'arrêt G2/M principalement par la perturbation de la fonction du complexe cyclineB1/cdc2, plus précisément, la p53 réprime le cdc25c, une phosphatase qui favorise la mitose, après la lésion d'ADN. En outre, la p53 active la transcription de 14-3-3 δ après les lésions d'ADN. Le 14-3-3 δ est une protéine qui empêche la bonne localisation nucléaire de cyclineB1/cdc2 (30) (31).

La sénescence cellulaire : est une forme permanente irréversible de l'arrêt du cycle cellulaire. La senescence peut être induite par divers facteurs de stress, y compris disfonctionnement des télomères, lésions d'ADN, signal mitogénique excessif (il produit par les oncogènes) et la perturbation dans l'organisation de la chromatine. La P14ARF peut détecter divers signaux de sénescence, et par la liaison au MDM2, peut activer la p53. Cette dernière peut ensuite transactiver $p21^{waf1/cip1}$, qui contribue à la senescence dépendante de p53, plutôt que l'arrestation irréversible d'un point de contrôle du cycle cellulaire (30).

La p53 agit comme un régulateur du processus apoptotique qui peut moduler les points clés de contrôle dans les deux voies extrinsèques et intrinsèques. Le lien le plus initial entre p53 et apoptose médiée par transactivation provient de sa capacité à contrôler la

transcription des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, dont les promoteurs de ces gènes peuvent se lier à la p53, leur effet net est d'augmenter le taux de protéines pro-apoptotiques des familles Bcl-2, qui favorisent ainsi la libération de protéines apoptogènes des mitochondries, l'activation de caspase donc l'activation de l'apoptose (32).

La p53 a activé aussi la transcription DRAM (damage-regulated autophagy modulator), gène produit une protéine lysosomale et induisant l'autophagie, qui est un processus impliquant la dégradation catabolique des composants propres d'une cellule essentiellement à travers la machine lysosomale (30).

I.5.3. Mutations du gène p53 et le cancer du sein

Le facteur de transcription p53 (codé par le gène humain p53) se distingue comme un suppresseur de tumeur clé et un maître régulateur de différentes voies de signalisation. Il est impliqué dans le processus de tumorigenèse. En effet, les mutations de p53 ont été signalées se produire dans presque tous les types de cancers (33).

Le gène p53 est muté moins fréquemment dans le cancer du sein que dans d'autres tumeurs, mais il est la deuxième altération génétique la plus fréquente dans ce type de cancer. La fréquence de mutation p53 et sa valeur pronostique diffèrent entre les sous-types du cancer du sein (34).

Les examens des cancers du sein révèlent que les mutations de p53 sont rares dans les tumeurs au stade T1, qui sont moins de 2cm de diamètre et significativement plus fréquentes dans les tumeurs au stade T3, qui sont plus de 5 cm (33).

Contrairement à la majorité des gènes suppresseurs de tumeur, comme RB, APC ou BRCA1, qui sont généralement inactivés pendant la progression de cancer par des délétions ou des mutations silencieuses, le gène p53 dans les tumeurs humaines subit, souvent, des mutations faux-sens, dans lesquelles un seul nucléotide est remplacé par un autre. Par conséquent, la protéine contient seulement une seule substitution d'acide aminé. Les mutations de p53 associées au cancer sont très diverses dans leur emplacement dans la séquence de codage de p53 et leur effets sur la stabilité thermodynamique de la protéine p53. Cependant, la grande majorité des mutations résultent d'une perte de capacité de p53 à se lier à l'ADN et activer la transcription des gènes cibles de p53 (33) (35).

Les mutations de gène p53 sont caractérisées par une prévalence élevée de mutations faux-sens, principalement dans les exons 5-8, au niveau du domaine de liaison à l'ADN.

Partie Bibliographique

Le spectre de mutations dans le cancer du sein est similaire à celui des autres cancers, avec moins de transversions G:C à T:A et plus de transitions A:T au G:C (36).

Les mutations du domaine de liaison à l'ADN (DBD), environ 30%, se situent dans six codons chauds ou "hot spots" (résidus **R175**, **G245**, **R248**, **R249**, **R273**, **R282**) et sont fréquentes presque dans tous les types de cancers. L'existence de ces résidus "hot spots" pourraient s'expliquer à la fois par la sensibilité des codons particuliers aux altérations par cancérogène. En plus, la perte de fonction d'une mutation de p53 peut causer, le développement de tumeurs par plusieurs autres moyens est possible. Dans une situation hétérozygote, où les deux allèles de type sauvage (WT) et d'allèle mutant coexistent, p53 mutant peut s'opposer aux fonctions de p53 WT d'une manière négative dominante (DN). L'inactivation de la p53 sauvage par la p53 mutante dans le mécanisme DN provient du fait que l'activité transcriptionnelle de WT p53 repose sur la formation de tétramères, dont la fonction du domaine DNA-binding peut être perturbée par la p53 mutante. Toutefois, un tel état hétérozygote est souvent transitoire, alors que les mutations de p53 sont fréquemment suivies par la perte d'hétérozygotie (LOH) « loss of heterozygoty » au cours de la progression du cancer. La LOH du bras court du chromosome 17, où se trouve p53, implique une force sélective d'entraînement de l'inactivation de l'allèle WT restante, ce qui suggère que l'activité DN de p53 mutante n'est pas suffisante pour inactiver complètement p53 sauvage (WT). En outre, de nombreux isoformes de p53 mutantes peuvent exercer une activité oncogénique supplémentaire par un mécanisme gain de fonction (GOF). Ce terme fait référence à l'acquisition de propriétés oncogéniques de la protéine mutante, par apport à l'inactivation simple de la protéine. Les deux effets de DN et GOF peuvent jouer un rôle important dans la sélection positive des mutations faux-sens de p53 au cours de la tumorigenèse (33).

❖ Les mutations somatiques de p53 : p53 est muté dans 31% de toutes les tumeurs incluses dans le catalogue de mutations somatiques dans le cancer, et est muté dans environ ~25% des échantillons de cancer du sein (figure 10), où il est le second gène le plus fréquemment muté après le proto-oncogène PI3KCA (26 % en COSMIC) (34).

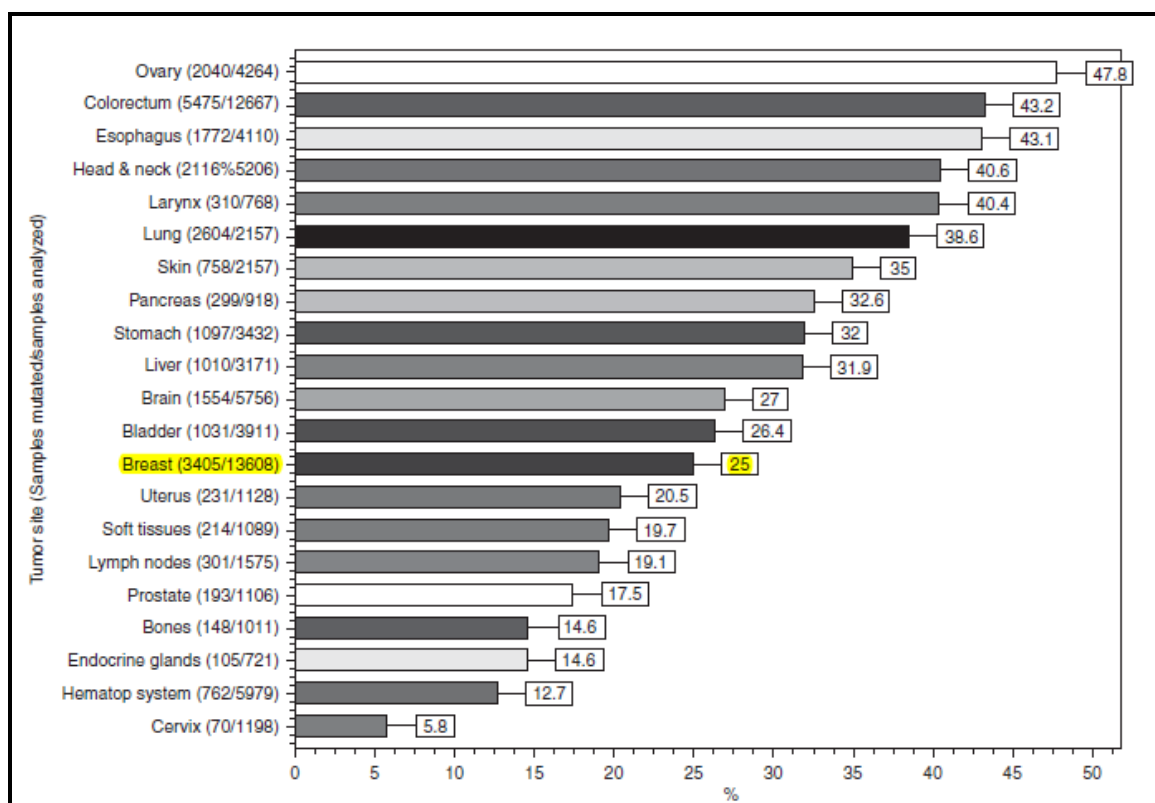


Figure 10. Prévalence des mutations de p53 dans les cancers sporadiques (37).

La plupart des mutations dans le domaine DNA-binding, sont faux-sens (87,9%) (Figure 11). En revanche, en dehors de cette région, les mutations faux-sens représentent environ 40%. La majorité des mutations étant non-sens ou avec un décalage du cadre de lecture. Parmi les substitutions d'une base simple, environ 25% sont des substitutions C:G > T:A sur les sites CpG. Parmi les 22 CpG du domaine DNA-binding, 3 codons "hot spots" (175, 248, et 273) représentent 60% des mutations CpG et 5 autres résidus (196, 213, 245, 282, et 306) représentent 26% des mutations. L'absence de mutations dans les autres sites CpG reflète que la substitution de ces résidus ne génère pas une protéine dysfonctionnelle (37).

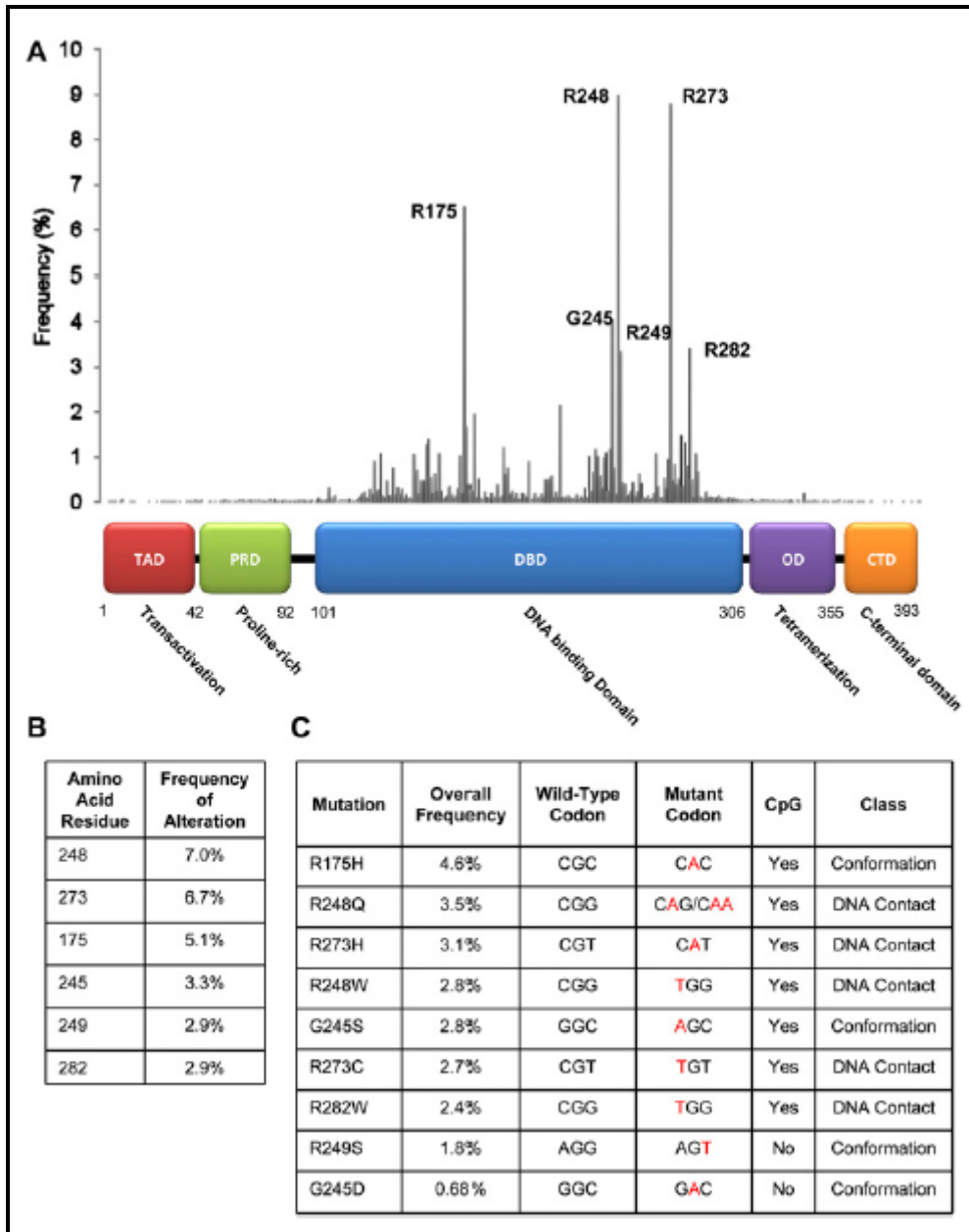


Figure 11. Spectre mutationnelle du gène p53 dans les cancers humains. **(A).** Des données des mutations fautes-sens de p53 pour des patients (N : 19,262). **(B).** Tableau des six résidus " hot spots " dans p53. **(C).** Tableau des plus communes des mutations fautes-sens de résidus " hot spots " dans p53 avec une fréquence correspondante de mutations. (N : 25,902) (38).

❖ Les mutations germinales de p53 : les altérations du gène p53 sont fréquentes dans le syndrome Li-Fraumeni, une maladie héréditaire. Ce syndrome autosomique dominant se caractérise par une forte incidence de cancers précoces comprenant, principalement, le cancer du sein, le sarcome, le carcinome corticosurrénale (ACC), la leucémie et les tumeurs cérébrales (39).

Partie Bibliographique

Le cancer du sein est l'événement le plus fréquent dans le syndrome de Li-Fraumeni, soit > 25% de toutes les tumeurs dans les familles touchées. Le spectre mutationnel de gène p53 dans le cancer du sein de Li-Fraumeni ressemble à celui du cancer du sein sporadique, avec ~65% des mutations faux-sens, mais se diffère dans la distribution de " hot spots " (figure 12). Ceci principalement dû à la fréquence anormalement élevée (jusqu'à 16%) de la mutation du codon 337 des patients de Li-Fraumeni, soit 11% dans syndrome relié aux cancers du sein (34)

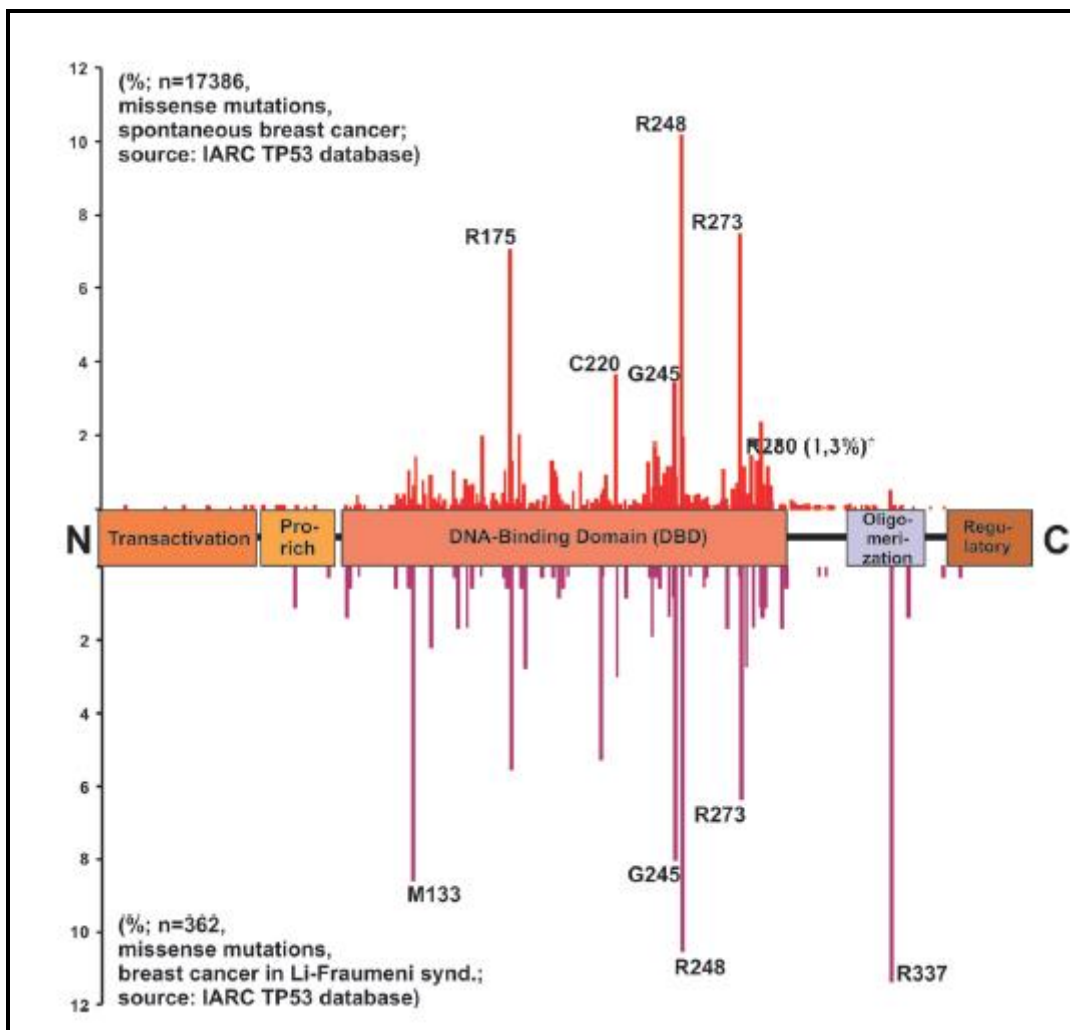


Figure 12. Fréquence et altérations faux-sens de p53 dans le cancer du sein spontanée et le syndrome Li-Fraumeni « mutations de p53 germinales » (34).

Partie Bibliographique

❖ Les polymorphismes de p53 : plus de 80 polymorphismes de p53 ont été identifiés et validés dans des populations humaines. La majorité (90%) est située dans les introns, en dehors des sites d'épissage, dans les exons non codants. Peu d'entre eux ont été testés dans des essais fonctionnels ou étudier leurs effets sur le risque de cancer (37).

Partie expérimentale

Partie expérimentale

II. Partie expérimental

II.1. Stratégie d'analyse

L'étude que nous avons entreprise est transversale de type cas témoins, 30 cas cancéreux, leur âge moyen est de 46 ans et 7 témoins atteints d'adénofibrome et leur âge moyen est de 22 ans.

Dans un premier temps, nous avons effectué l'extraction d'ADN à partir de pièces de tissus mammaires. Un fragment d'ADN précis est amplifié en de multiples copies par une réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN ou PCR (Polymerase Chain Reaction), qui est une méthode de biologie moléculaire ayant pour but d'amplifier sélectivement un segment spécifique d'ADN double brin en utilisant des amorces oligonucléotidiques de séquence définie. Dans notre étude, nous avons utilisé 3 couples d'amorces pour amplifier 3 fragments précis d'ADN du gène p53, contenant les 4 codons "hot spots" (175, 248, 249 et 273). La détermination de la taille est vérifiée sur gel d'agarose après marquage au bromure d'éthidium (BET) (figure 13).

Pour détecter la présence ou l'absence des mutations de p53 dans le cancer du sein, nous avons réalisé une RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Elle permet d'identifier le polymorphisme cible par application des restrictions des endonucléases au niveau l'ADN. Pour cela, l'ADN est digéré par des enzymes de restriction spécifiques. La coupure de l'ADN se fait en un site particulier reconnu par l'enzyme. Chaque enzyme reconnaît une séquence d'ADN qui lui est spécifique. Le produit de digestion est visualisé sur un gel d'agarose à 4%. Selon le nombre de bandes générées, on peut déduire la présence ou l'absence de mutations.

Partie Expérimentale

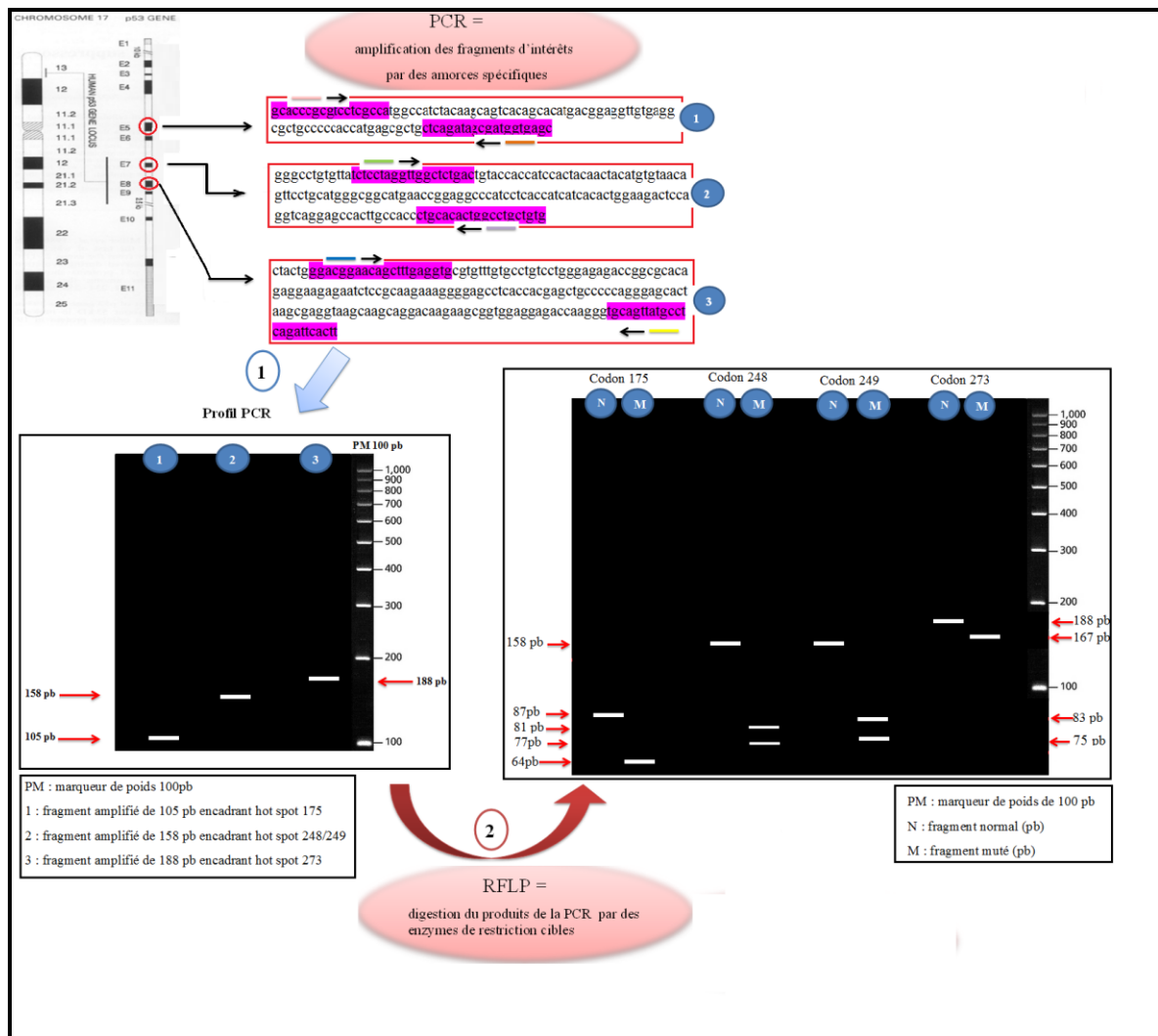


Figure 13. Illustration schématique des étapes de la PCR-RFLP réalisée pour l'étude des 4 hot spots (175, 248, 249 et 273).

II.2. Matériels et Méthodes

II.2.1. Matériels biologique

Notre analyse repose sur 30 cas de cancers du sein et 7 témoins. Les malades sont des femmes de différents âges ayant un cancer du sein. Les témoins sont des jeunes femmes âgées entre 16 et 25 ans et ayant eu un adénofibrome (tableau IV). Le recrutement des malades et des témoins a été effectué au niveau du service d'anatomopathologie de CHU de Batna (Dr Khadraoui H.) dont les pièces ont été préalablement conservées dans des blocs de paraffine. Ensuite, ils ont été transférés au laboratoire à l'Université de Biskra

Partie Expérimentale

pour extraire les acides nucléiques (ADN), afin d'appliquer notre stratégie expérimentale, préalablement élaborée.

Tableau IV. Caractéristiques des échantillons étudiés.

	Types histologiques	Moyen d'âge	Effectifs (n = 37)
Cas cancéreux	Carcinome canalaire infiltrant	46 ans	28
	Carcinome lobulaire infiltrant		2
Cas contrôle	Adénofibrome	22 ans	7

II.2.2. Préparation des échantillons

Les tissus biopsies ou chirurgicalement excisés pour l'analyse et le diagnostic histopathologique sont souvent fixés au formol et inclus en paraffine pour le stockage à long terme.

Les étapes de déparaffinage et de réhydratation sont nécessaires et indispensables, préalablement :

↳ Le déparaffinage a été réalisé en présence du xylène et sous la hotte :

dans des tubes Eppendorf 1,5 ml, nous avons mis les échantillons sous forme de pièces coupées par un microtome, ensuite nous avons complété comme suit :

- ajouter 800 µl de xylène dans chaque tube ;
- agiter par retournement pendant 15 min (grâce une plaque rotatoire) ;
- centrifuger à la vitesse maximale (14000 tpm) pendant 2 min, éliminer le surnageant (paraffine dissous dans le xylène), sans perturber le culot cellulaire ;
- répéter l'étape de déparaffinage par le xylène 2 fois supplémentaires pour enlever totalement la paraffine.

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

- ajouter au culot cellulaire 600 µl d'éthanol 100 % (dans notre cas) ;

Partie Expérimentale

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

II.3. Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir des cellules déparaffinées et réhydratées au cours de l'étape précédente . Elle s'effectue en plusieurs étapes (selon le protocole de Pikor L.A et *al.* (41) :

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

II.4. Détermination de la concentration de l'ADN

La concentration de l'ADN extrait a été estimée par spectrophotométrie à 260 nm sachant que : 1 unité de $DO_{260\text{ nm}} = 50\text{ }\mu\text{g/ml}$ d'ADN. On mesure donc à 260 nm et 280 nm la DO d'une dilution au 1 /250ième de la solution mère. On déduit la concentration de l'ADN grâce au calcul suivant :

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

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

II.5. PCR-RFLP

II.5.1. Amplification de l'ADN par PCR

La PCR permet d'amplifier des séquences autour des sites de mutations en quantités suffisantes pour réaliser l'analyse par RFLP. La spécificité des amorces et des enzymes de restriction utilisées pour l'analyse mutationnelle a été préalablement validée par une étude antérieure (40) (Tableau V).

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

Partie Expérimentale

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

Région de l'amplification	MT	Les amorces		Fragment amplifié(pb)
Exon 5 « Codon 175 »	64°C	S	5' gcacccgcgtcctcgcca 3'	105
	62°C	A	5' gctcaccatcgctatctgag 3'	
Exon 7 « codon 248/249 »	66°C	S	5'cacagcaggccagtggtgcag 3'	158
	62°C	A	5'tctcctaggttgctctgac 3'	
Exon 8 « codon 273 »	68°C	S	5'ggacggaacagcttgaggcg 3'	188
	68°C	A	5'aagtgaatctgaggcataactgca3'	

MT : *MeltingTemperature* (température de fusion)

Les amplifications ont été optimisées après plusieurs essais concernant la concentration en MgCl₂, la température d'hybridation et le nombre de cycles.

➤ **Amplification des séquences cibles contenues dans les exons 5 (codon175), 7 (codon 248/249) et exon 8 (codon 273).**

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

- ✓ 100 ng d'ADN génomique ;
- ✓ 1,5 µl d'amorce S ;
- ✓ 1,5 µl d'amorce AS ;
- ✓ 0,5 µl de mélange dNTPs ;
- ✓ 0,2 µl de *Taq* polymérase ;
- ✓ 3 µl de tampon de PCR ;
- ✓ MgCl₂ : codon 175 (2µl), codon 248/249 (2,5µl) ;
- ✓ qsp 20 µl de H₂O bidistillée.

Partie Expérimentale

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

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

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

➤ Visualisation des fragments amplifiés

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

II.5.2. Etablissement du profil de restriction RFLP

La PCR permet d'amplifier une région définie du gène p53 puis d'appliquer la technique RFLP sur le produit de PCR. L'ADN est soumis à une enzyme de restriction qui coupe la molécule en un endroit précis, définis par une séquence de bases, appelé sites de restriction (tableau VII). Lorsqu'une mutation est introduite dans la séquence de l'ADN, il peut y avoir création ou perte d'un site reconnu par une enzyme de restriction. Cette non-coupe de l'ADN est détectée par une variation du nombre et de la longueur des fragments d'ADN (fragments de restriction) obtenus après digestion enzymatique, et séparation par électrophorèse (figure 14).

Partie Expérimentale

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

Mutation	Taille de fragment amplifié (pb)	Enzyme de restriction	Tailles des fragments de restriction (pb)
R175H Wild-type codon : CGC Mutant codon : CAC	105	<i>Hha</i> I 5'... GCGC...3' 3'... CCGC...5'	Allèle sauvage : 64, 23, 18 Allèle muté : 87, 18
R248Q/ R248W Wild-type codon : CGG Mutant codon : CAG/CAA/ TGG	158	<i>Msp</i> I 5'... CCGG...3' 3'... GGCC...5'	Allèle sauvage : 81, 77 Allèle muté : 158
R249S Wild-type codon : AGG Mutant codon : AGT	158	<i>Hae</i> III 5'... GGCC...3' 3'... CCGG...5'	Allèle sauvage : 83, 75 Allèle muté : 158
R273H/ R273C Wild-type codon : CGT Mutant codon : CAT/TGT	188	<i>Bst</i> UI 5'... CGCG...3' 3'... GCGC...5'	Allèle sauvage : 167, 21 Allèle muté : 188

Partie Expérimentale

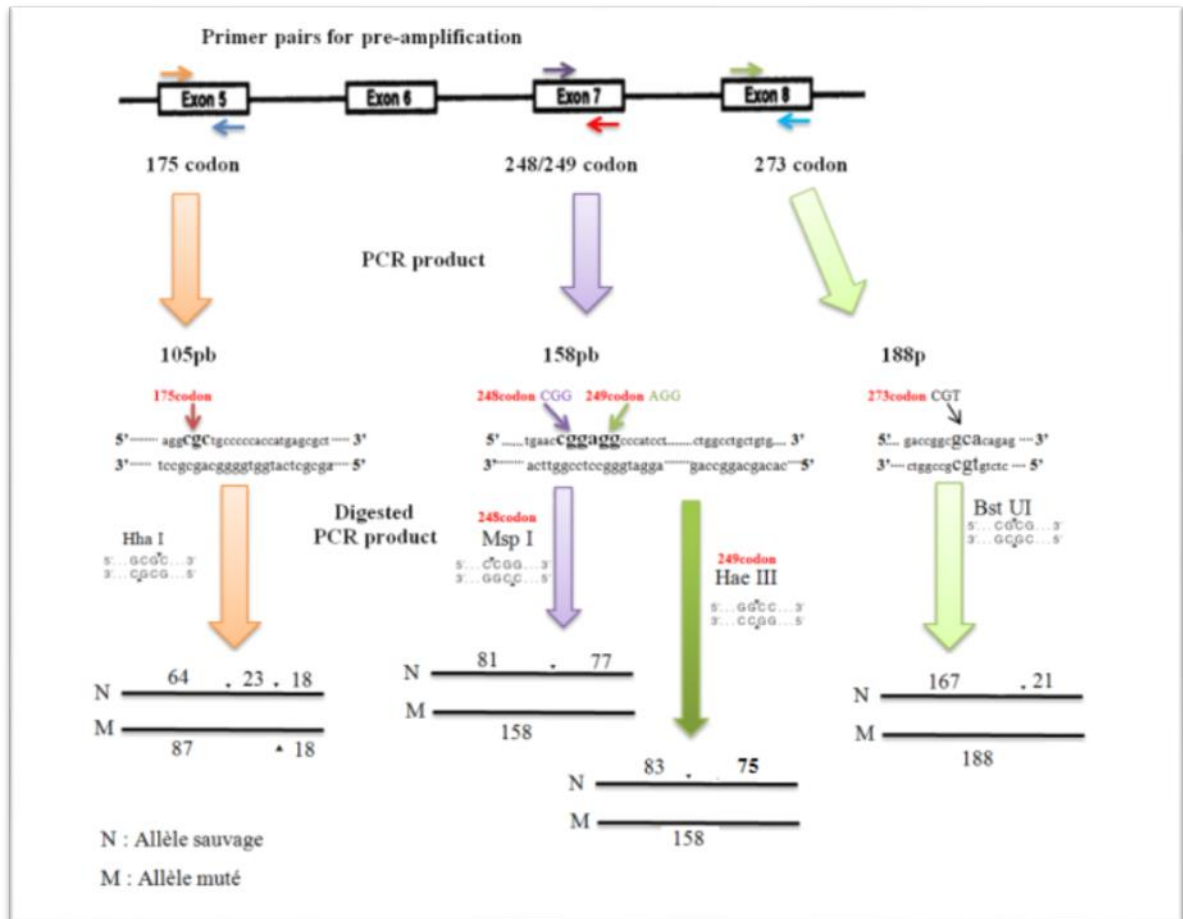


Figure 14. Schématisation de l'action des enzymes de restriction *HhaI*, *MspI*, *HaeIII* et *BstUI* sur les séquences cibles amplifiées par PCR et les fragments obtenus.

Les conditions de fonctionnement des enzymes de restriction sont fournies par le fournisseur (New England Biolabs, UK). Les réactions de restriction ont été réalisées dans les conditions suivantes :

La digestion a été réalisée dans un mix de 20 μ l :

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

Les mix ont été incubés dans un bain marie à la température de restriction spécifique pour chaque enzyme (tableau VIII) pendant une nuit.

Partie Expérimentale

Tableau VIII. Conditions fonctionnelles des enzymes de restriction.

	Conditions des restrictions		
	Site de restriction	Condition de restriction	Condition de dénaturation
<i>Hha</i> I	$ \begin{array}{c} 5' \dots \text{GCGC} \nabla \dots 3' \\ 3' \dots \text{CGCG} \blacktriangle \dots 5' \end{array} $	37°C pendant une nuit	65°C for 20 min
<i>Msp</i> I	$ \begin{array}{c} 5' \dots \text{C} \nabla \text{CGG} \dots 3' \\ 3' \dots \text{GGC} \blacktriangle \dots 5' \end{array} $	37°C pendant une nuit	No
<i>Hae</i> III	$ \begin{array}{c} 5' \dots \text{GGCC} \nabla \dots 3' \\ 3' \dots \text{CCGG} \blacktriangle \dots 5' \end{array} $	37°C pendant une nuit	80°C for 20 min
<i>Bst</i> UI	$ \begin{array}{c} 5' \dots \text{CG} \nabla \text{CG} \dots 3' \\ 3' \dots \text{GC} \blacktriangle \text{GC} \dots 5' \end{array} $	60°C pendant une nuit	No

Les fragments de restriction ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 4 %, en présence du tampon de migration TAE 1X. La visualisation des produits de digestion a été réalisée sous U.V en présence du BET. Le résultat est concrétisé par une prise de photo du gel contenant les produits colorés.

II.6. Résultats

II.6.1. Analyse des produits PCR obtenus

Après l'extraction d'ADN à partir des pièces de tissus mammaire (30 cas malades et 7 cas témoins), l'ADN cible a été amplifié par PCR, en utilisant 3 couples d'amorces pour amplifier 3 fragments précis d'ADN du gène p53, dont la première couple couvre le site du point chaud de la mutation correspondant au codon 175 dans l'exon 5 et génère un fragment de 105 pb. Le deuxième couple amplifie un fragment de 158 pb au niveau de l'exon 7 contenant les 2 codons "hot spots" (248 et 249) et, enfin, une troisième paire d'amorce encadrant une séquence de 188 pb au niveau de l'exon 8, où se trouve le codon 273. L'amplification par PCR a été confirmée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 3,5 % (figure 15).

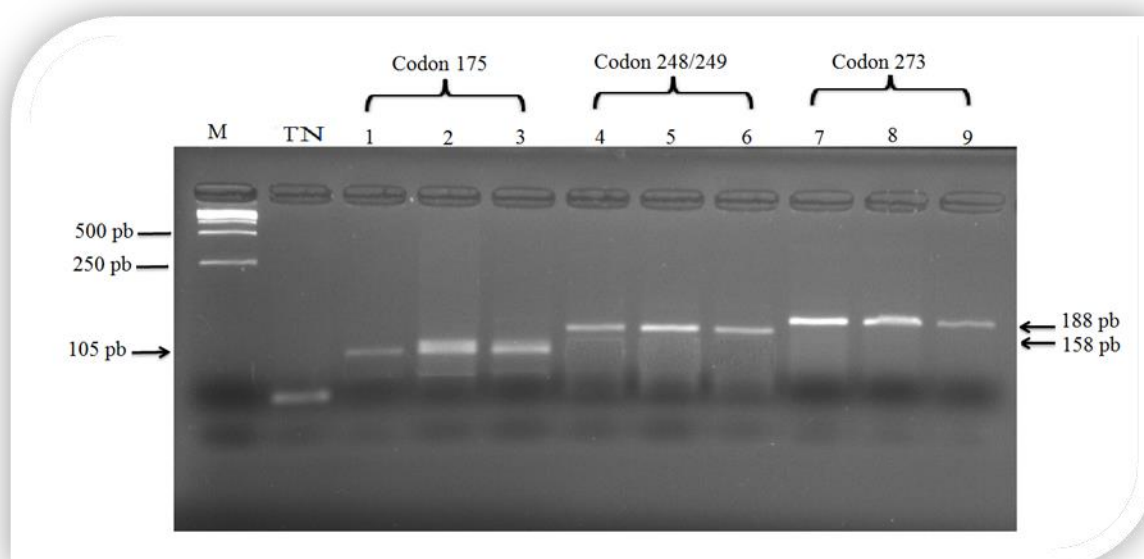


Figure 15. Analyse des produits de PCR obtenus après électrophorèse sur gel d'agarose à 3,5% et coloration au BET suivie d'une visualisation sous UV. Les puits 1, 2 et 3 : fragments de 105 pb qui portent le site du codon "hot spot" 175 ; les puits 4, 5 et 6 : fragments de 158 pb qui portent le site des codons "hot spots" 248/249 et les puits 7, 8 et 9 : fragments de 188 pb qui portent le site du point chaud 273. M : marqueur de poids moléculaire (1 kb, Sigma). TN : témoin négatif.

II.6.2. Profils des produits de PCR digérés 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 4% et une coloration au BET, suivie d'une visualisation sous UV, ont été réalisées.

Le fragment de taille 105 pb qui couvre le hot spot 175 a été soumis à une digestion enzymatique par *HhaI*. En absence de mutation dans ce site, l'enzyme *HhaI* effectue une coupure en deux points donc, les échantillons représentant trois bandes de tailles 64 pb, 23 pb et 18 pb, sont de génotype homozygote sauvage G/G. Une transversion de CGC au CAC (R175H), 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 87 pb et 18 pb sont de génotype homozygote muté A/A. Enfin, les échantillons représentant quatre bandes sont de génotype hétérozygote G/A (figure 16).

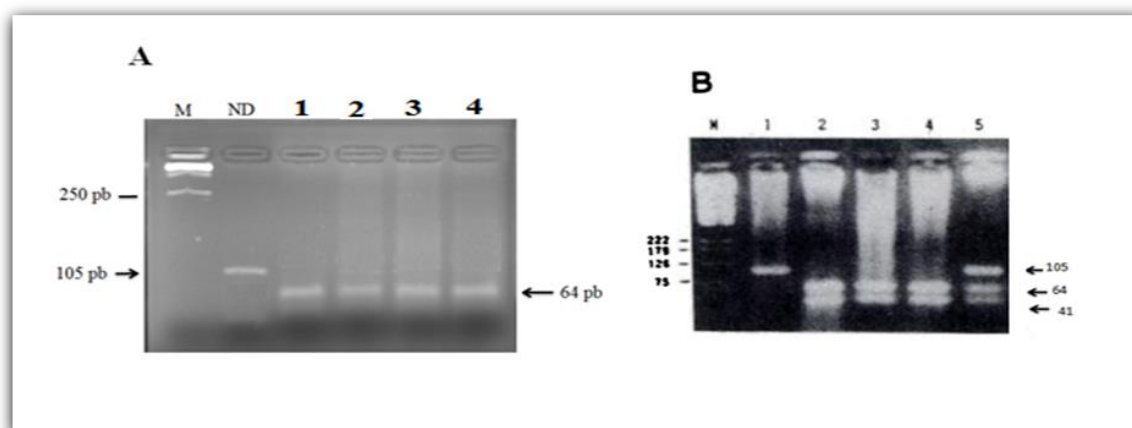


Figure 16. Profil électrophorétique des produits de PCR (105 pb de l'exon 5 du gène p53) et de leurs produits de digestion, séparés sur un gel d'agarose à 4%, après coloration au BET et visualisation sous UV. (A). Le puits 2 représente un fragment 105 pb non digéré. Les produits de digestion des échantillons 1, 2, 3 et 4 sont des fragments de taille 64 pb et les deux autres fragments (23pb et 18 pb) sont sortis du gel suite à une migration prolongée. Les échantillons sont de type homozygote sauvage G/G. D : Digéré. ND : Non Digéré. M : Marqueur de poids moléculaire (1kb, Sigma). TN : témoin négatif. (B). Un exemple de profil électrophorétique montrant un cas de mutation de génotype

Partie Expérimentale

homozygote muté A/A qui est représenté dans le puits 1, le puits 5 représente un génotype hétérozygote G/A.

Les fragments de 158 pb encadrant le codon 248 attendus après digestion complète par l'endonucléase *MspI* sont : 81 pb et 77 pb. La transition de **CGG** en **CAG/CAA** (R248Q) ou **CGG** en **TGG** (R248W) détruit le site de reconnaissance de l'enzyme *MspI* et désactive la digestion donc, on obtient un fragment de 158 pb (figure 17).

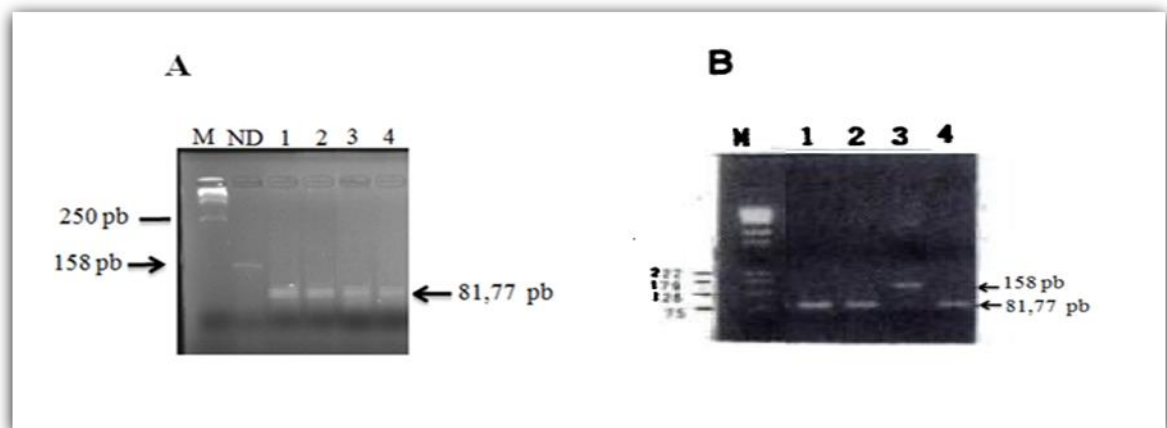


Figure 17. Profil électrophorétique du "hot spot" 248 montrant les fragments obtenus après digestion par l'enzyme *MspI*. (A). Une électrophorèse sur gel d'agarose (4%) des produits digérés par l'enzyme *MspI*, après coloration au BET et visualisation sous UV. le deuxième puits représente un fragment de 158 pb non digéré (ND). Les autres puits représentent le produit de digestion des échantillons 1, 2, 3 et 4, qui sont deux bandes 81 et 77 pb (cas hétérozygote sauvage). M : poids moléculaire. (B). Un exemple d'un profil électrophorétique montrant un cas de mutation de génotype homozygote muté représentée dans le puits 3.

Partie Expérimentale

Les fragments de 158 pb encadrant aussi le codon 249 attendus après une digestion par l'endonucléase *HaeIII* sont 83 pb, 75 pb. Le seul point de mutation Arginine \Rightarrow Sérine (AGG \Rightarrow AGT) détruit le site de reconnaissance de l'enzyme *HaeIII* et la digestion ne peut pas se dérouler au niveau du codon 249 donc, on obtient un fragment de 158 pb (figure 18). D'après le profil, les échantillons sont de génotype homozygote sauvage G/G.

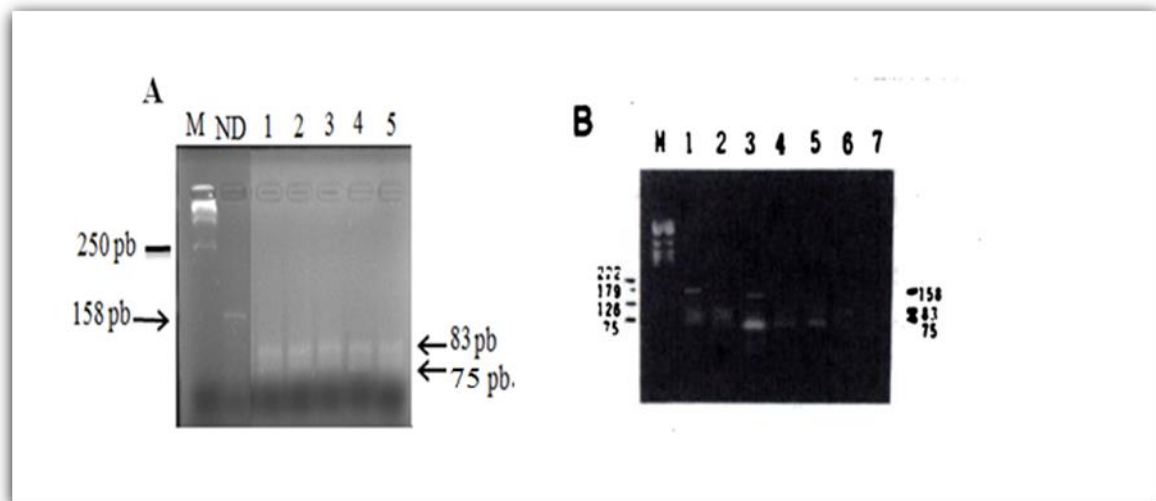


Figure 18. Profil électrophorétique des produits de PCR (158 pb du codon 249) et de leurs produits de digestion, séparés sur un gel d'agarose à 4%, après coloration au BET et visualisation sous UV. (A). Les puits 1, 2, 3, 4 et 5 : les produits de digestion du fragments 158 pb, deux fragments 83pb et 75 pb. ND : Non Digéré (158 pb). M : Marqueur de poids moléculaire (1kb, Sigma). **(B).** Un exemple d'un profil électrophorétique montrant un cas de mutation de génotype hétérozygote muté G/G, G/T représentée dans le puits 1 et 3.

Le fragment de taille 188 pb encadrant le "hot spot" 273 a été soumis à une digestion enzymatique par *BstUI*. En absence de mutation dans ce site, l'enzyme *BstUI* effectue une coupure en un seul point donc, les fragments sont sous forme de deux bandes de tailles 167 pb et 21 pb. Le génotype est homozygote sauvage G/G, C/C. Une transition de CGT au CAT (R273H) ou une transversion de CGT au TGT (R273C), a favorisé la disparition du site de reconnaissance de l'enzyme et, par conséquent, de l'activité enzymatique. De ce fait, on obtient un seul fragment de 188 pb, les échantillons sont de génotype homozygote

Partie Expérimentale

muté G/A ou C/T. enfin, les échantillons représentant trois bandes sont de génotype hétérozygote G/G, C/C et G/A ou C/T (figure 19).

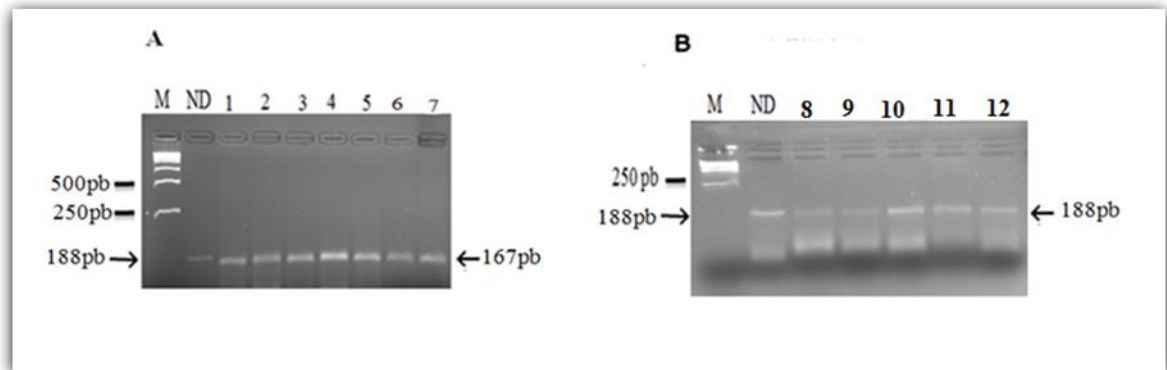


Figure 19. Profil RFLP du codon 273 en présence de l'enzyme *Bst*UI. Une électrophorèse sur gel d'agarose (4%) des produits digérés par l'enzyme *Bst*UI, après coloration au BET et visualisation sous UV. M : poids moléculaire (1Kb, Sigma). Le deuxième puits est l'amplicon 188 pb non digéré (ND). **(A)**. Les autres puits représentent les produits de digestion des échantillons 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7, et on obtient un fragment de taille 167 pb (cas d'absence de la mutation). **(B)**. Produits digéré des patientes 8, 9, 10, 11 et 12 : représentent une bande : 188pb (le cas de mutation de génotype homozygote muté G/A ou C/T).

II.7. Discussion

L'objectif de Notre étude a été d'optimiser et de valider une technique de PCR-RFLP à partir d'ADN extrait de blocs de paraffine conservés dans le laboratoire d'anatomopathologie du CHU-Batna. Ainsi établir une corrélation entre la présence des mutations sur des échantillons pathologiques et le risque d'apparition et/ou de développement de cancer du sein.

II.7.1. Discussion analytique

II.7.1.1. Echantillons

L'extraction des acides nucléiques à partir d'échantillons de malades est souvent effectuée après des années suite au prélèvement initial, généralement fixé au formol et incorporé dans la paraffine (FFIP) et sont stockés dans les archives de l'hôpital pendant des années. On peut récupérer leur ADN par un protocole d'extraction approprié selon Pikor L.A et *al.* (41). On peut extraire l'ADN du tissu paraffiné après plusieurs étapes : déparaffinage et réhydratation. L'utilisation de l'enzyme protéinase k et des tampons spécifiques à cette méthode sont relativement rapides, peu coûteux et donnent des rendements moyens et un ADN de bonne qualité. Elle a été développée pour simplifier la procédure de déprotéinisation et pour éviter l'utilisation de solvants organiques toxiques (notamment le phénol).

La qualité et la quantité d'ADN extrait est tributaire d'un certain nombre de paramètres avant, pendant et après l'extraction de l'ADN, entre autres, le type et la quantité de tissu, le type de fixateur utilisé, la durée de la fixation, âge du bloc de paraffine et les conditions de stockage, ainsi que le volume du fragment d'ADN à amplifier. Alors la suppression de paraffine du tissu est l'étape la plus critique pour une extraction réussie parce que la paraffine dissoute conduit à la mauvaise qualité à l'inhibition de l'amplification par PCR (42).

Dans ce travail, nous avons optimisé une technique de déparaffinage et de digestion des tissus en faveur de l'extraction de l'ADN pour un rendement optimal. Les modifications que nous avons apportées au protocole de déparaffinage au laboratoire et au protocole de Pikor L.A et *al.* (40) a permis d'augmenter le rendement en ADN extrait. Les principales modifications apportées concernent la période d'agitation des tubes contenant les échantillons et le xylène a été incubé pendant une durée de 15 min. Durant la première étape de la réhydratation, le volume d'éthanol à ajouter a été modifié de 800 µl à 300 voire 600 µl selon la taille de tissu. Le protocole d'extraction a été modifié du phénol/chloroforme au NaCl 6M.

II.7.1.2. Vérification de l'intégrité de l'ADN

L'intégrité de l'ADN extrait a été vérifiée par une migration électrophorétique de 4 µl d'ADN de chaque échantillon déposé 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 20).

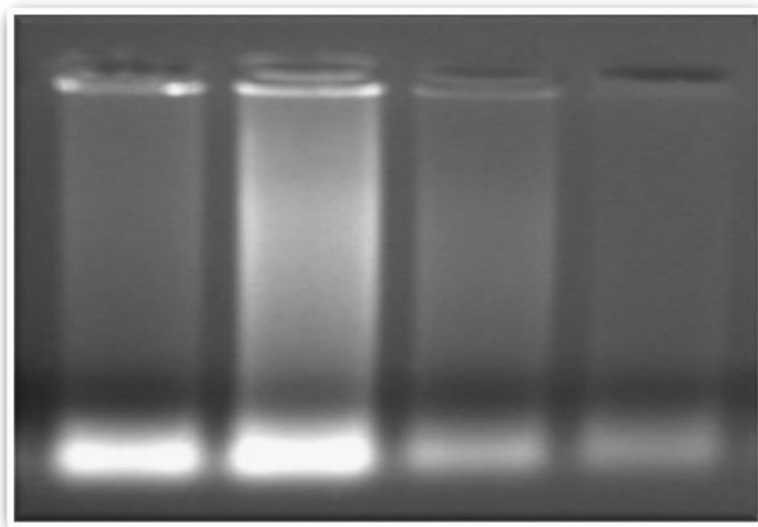


Figure 20. Profil électrophorétique montrant l'intégrité de l'ADN. Une électrophorèse sur gel d'agarose (1%) d'ADN génomique extrait, après coloration au BET et visualisation sous UV.

II.7.1.3. Optimisation de la PCR-RFLP : Conditions réactionnelles et composants

Nous avons optimisé la technique de PCR afin d'obtenir des rendements élevés des séquences cibles spécifiques. Les concentrations en ion de $MgCl_2$, les paramètres de durée et des températures d'hybridation, ainsi que le nombre de cycle ont été optimisées pour améliorer la qualité du signal de l'ADN amplifié ainsi que la quantité de l'amplicon obtenu.

Les produits amplifiés par PCR ont donné des bandes cibles individualisées et bien différenciées après détection en présence d'UV lors de l'électrophorèse contrôle. Une absence d'amplification de bandes parasites était la règle.

A/ Choix des amorces spécifiques et des enzymes de restriction adaptées

En choisissant les amorces pour la PCR, il est important qu'elles ne contiennent pas des bases complémentaires à elles-mêmes ou entre elles, c'est pour éviter surtout la formation de dimère d'amorce. Une teneur en G+C autour de 40% à 60% est recommandée pour chaque amorce.

Partie Expérimentale

Aussi, les amorces ne doivent pas s'accrocher sur des régions secondaires (éviter l'amplification de bandes parasites), pour éviter la non spécificité des amorces et mêmes pour les enzymes de restriction, on a validé l'amplification et la digestion *in silico*, en utilisant l'outil bioinformatique, sur plusieurs sites :

- ✓ <http://genome.ucsc.edu> permet de confirmer la spécificité des amorces sur la région cible de l'ADN.
- ✓ <http://biocompute.bmi.ac.cn/CZlab/MFEprimer-2.0/> permet de confirmer la spécificité des amorces vis-à-vis de la région cible de l'ADN.
- ✓ <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/> réalise la digestion de la séquence amplifiée.
- ✓ <http://www.restrictionmapper.org/> donne la taille des fragments digérés par l'enzyme de restriction choisie.

B/ Températures optimales d'hybridation

Les températures d'hybridation doivent être déterminées pour améliorer le signal d'amplification par PCR. Nous avons modifié la température d'hybridation ($58^{\circ} \Rightarrow 60^{\circ}$) afin d'améliorer le rendement de l'amplification (figure 21).

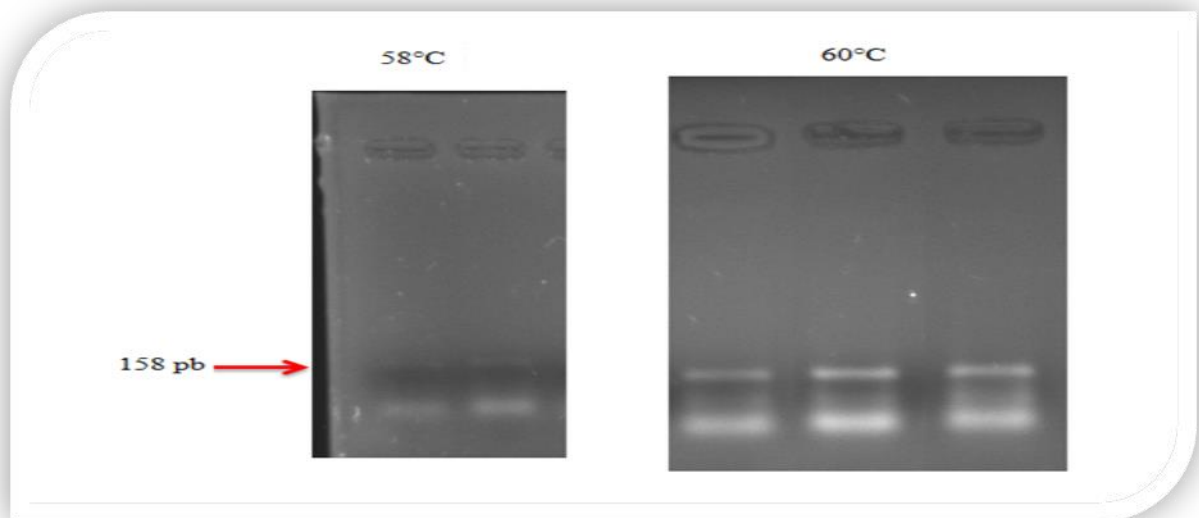


Figure 21. Profil électrophorétique montrant les fragments obtenus du codon 248/249 de l'exon 7 (158 pb) après l'optimisation de la température d'hybridation. Une électrophorèse sur gel d'agarose (2%) des amplicons obtenu par la PCR, après coloration au BET et visualisation sous UV.

C/ Nombre de cycle

Toujours notre but est de rechercher un bon signal d'amplification par PCR des séquences cibles, c'est pour cette raison que nous avons réalisé certains essais concernant l'optimisation du nombre de cycle (30⇒40 cycles) (figure 22 et figure 23).

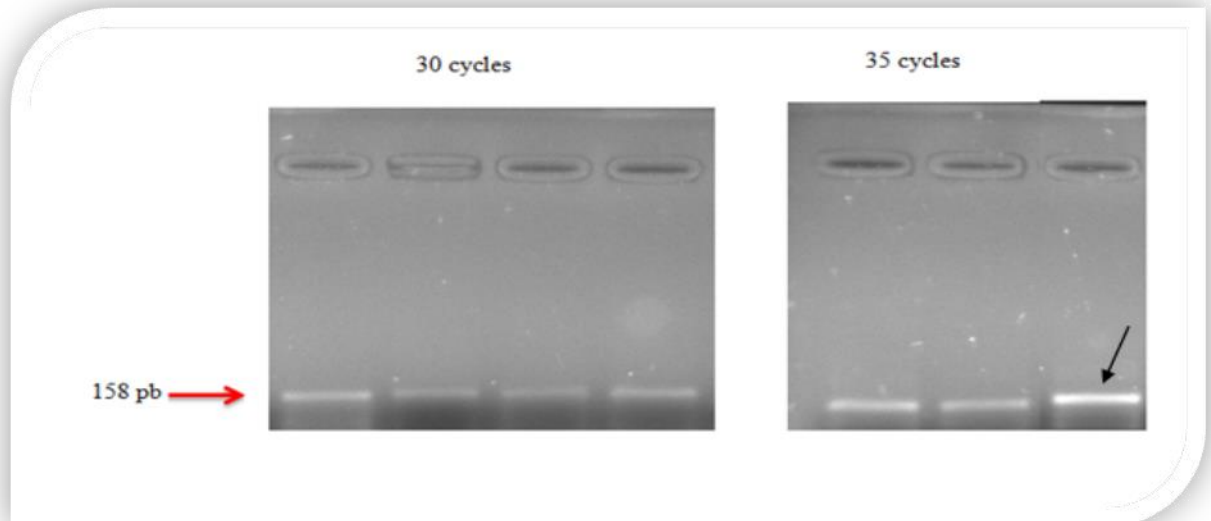


Figure 22. Profil électrophorétique montrant les fragments obtenus de codon 248/249 de l'exon 7 (158 pb) après l'optimisation du nombre de cycles. Une électrophorèse sur gel d'agarose (2%) des amplicons obtenu par PCR, après coloration au BET et visualisation sous UV. Le signal a été plus intense à 35 cycles (indiqué par une flèche sur la bande amplifiée).

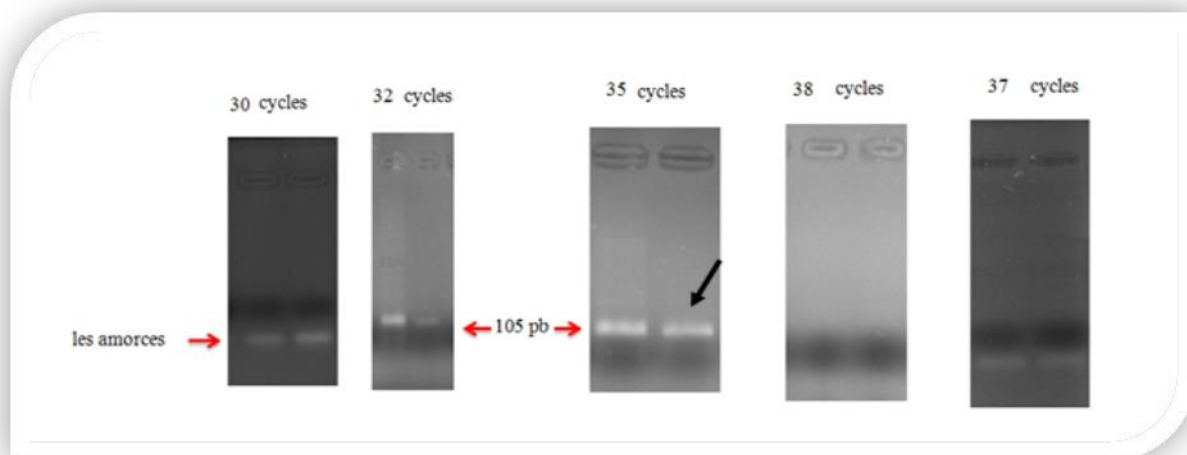


Figure 23. Profil électrophorétique montrant les fragments obtenus de codon 175 de l'exon 5 (105 pb) après l'optimisation du nombre de cycles. Une électrophorèse sur gel d'agarose (2%) des amplicons obtenu par PCR, après coloration au BET et visualisation sous UV. D'après les profils, le nombre de cycle qui donne le meilleur signal est celui de 35 cycles (indiqué par une flèche sur la bande amplifiée).

D/ Optimisation de la concentration en $MgCl_2$

L'ion magnésium Mg^{2+} est un cofacteur indispensable pour la réaction de polymérisation avec la *Taq* polymérase. La présence dans le milieu réactionnel des cations bivalents Mg^{2+} vont neutraliser les charges négatives des groupements phosphates au niveau de l'ADN et ainsi stabiliser les hybrides ADN/ADN. En pratique, la concentration en sel doit cependant rester compatible avec l'activité de l'ADN polymérase.

La concentration en $MgCl_2$ à utiliser a également été optimisée en faisant varier de façon croissante la quantité de $MgCl_2$ par série de PCR. Plusieurs essais d'optimisation sur différentes concentrations de la solution de $MgCl_2$ pour la réaction d'amplification, ont été réalisés pour surmonter la présence des bandes parasites (figure 24 et 25).

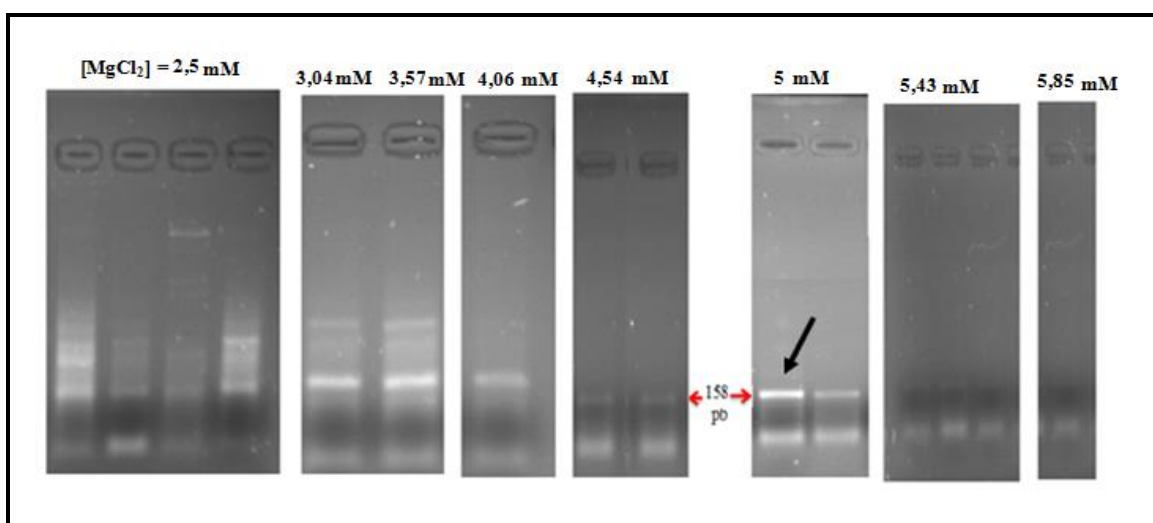


Figure 24. Profils électrophorétiques des produits PCR montrant l'optimisation de la concentration en $MgCl_2$ pour les codons 248/249 de l'exon 7. Les profils montrent que l'augmentation de la concentration va éliminer les bandes parasites et va améliorer la spécificité des amorces sur l'ADN matrice jusqu'à l'amplification de la séquence cible (158 pb) et de bon signal $[MgCl_2] = 5$ mM. Lorsqu'on a dépassé cette concentration, le signal était faible.

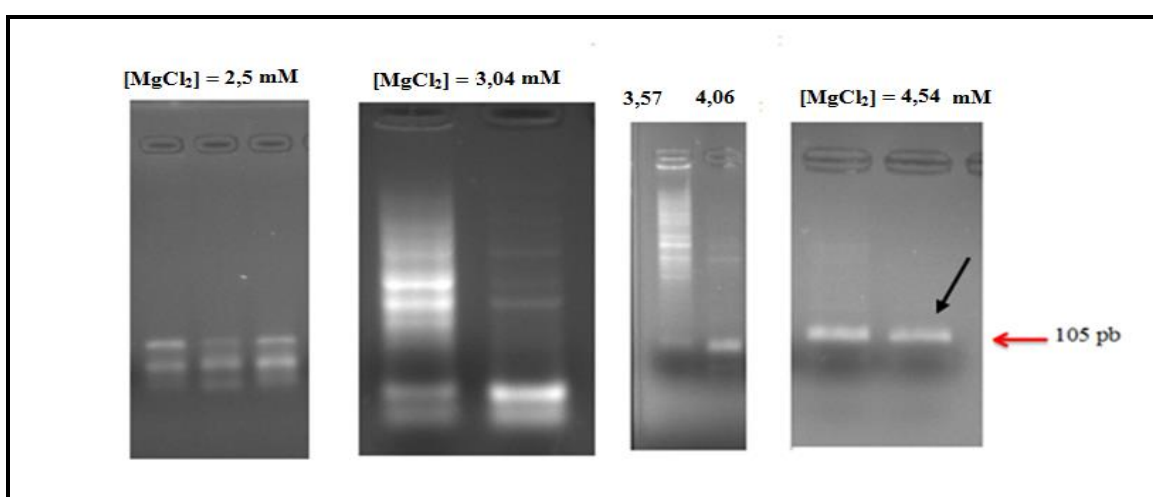


Figure 25. Profils électrophorétiques des produits PCR montrant l'optimisation de la concentration en $MgCl_2$ pour le codon 175 de l'exon 5. Selon les profils, l'augmentation de la concentration va éliminer les bandes parasites et va améliorer la spécificité des amorces sur l'ADN matrice jusqu'à l'amplification de la séquence cible (105 pb). Un bon signal a été obtenu à $[MgCl_2] = 4,54$ mM.

II.7.2. Discussion des résultats

Les mutations de p53 sont présentées chez 50% des tumeurs humaines, avec l'incidence la plus élevée dans les poumons et les tumeurs gastro-intestinales et un nombre important de cancers du sein. Les tumeurs du sein présentant des mutations de p53 ont démontré une agressivité à un stade plus avancé (43) (44).

Le gène p53 est muté moins fréquemment dans le cancer du sein que dans d'autres tumeurs, mais il est la deuxième altération génétique la plus fréquente dans ce type de cancer. La fréquence de mutation p53 et sa valeur pronostique diffèrent entre les sous-types du cancer de sein (34).

L'analyse mutationnelle réalisée par l'équipe T. Khaliq, S. Afghan, A. Naqi, M. H. R. Haider et A. Islam (2001) a conclu que la mutation de p53 est présente au sein du carcinome mammaire dans une population pakistanaise mais il n'y a aucune corrélation significative entre la mutation de p53 et l'agressivité de la tumeur (taille, statu ganglionnaire et histopathologi) (45).

Selon l'étude du groupe Shojaie N., Targari F (2008), les mutations somatiques de p53 sur le codon 248 ont été observées à 11,3% (6 de 53) des cas, dont 9,4 % étaient des mutations hétérozygotes et le reste étaient de mutations homozygotes. Cette lecture indique que le génotype du gène p53 sur le codon 248 est important dans le cas des femmes iraniennes avec un facteur de risque pour le cancer du sein (46).

En 2011 le groupe Silvia Rybárová et al (2011) a observé que toutes les mutations de p53 ne sont pas inactivant. Certains mutants p53 sont dues uniquement à la perte partielle de leur activité de liaison à l'ADN. Et les courbes de survie des malades ont montré que les patients atteints de tumeurs p53-positif avaient une survie significativement plus courte par rapport aux patients avec p53 négatif (47).

Selon des études réalisées par l'équipe ABEER J. AL-QASEM (2011) (48), le gène p53 joue un rôle important dans la cancérogenèse mammaire et l'apparition précoce de la maladie chez les femmes arabes. Ils ont montrés une corrélation entre certaines mutations p53 et la réponse au traitement du cancer. Dans leur étude, des mutations de p53 ont été identifiées par séquençage direct du gène (exons 4-9) de 119 tissus de cancer du sein. 73% des patientes dont les tumeurs contenaient les mutations p53 étaient moins de 50 ans. En outre, pour la première fois, ils ont identifié 7 nouvelles mutations et 16 mutations dans les tissus de cancer du sein. En particulier, toutes les nouvelles mutations trouvées dans l'exon 4, dans lequel 29% des mutations ont été localisées.

Partie Expérimentale

En 2012, l'équipe Abhishikta Ghosh R. *et al.* (49) ont conclu que les mutations dans les exons 5-7 du gène p53 sont des causes rares de cancer du sein chez les Bengali hindous.

Le groupe de Hyung Won Kim *et al.* (2014) ont fait une analyse mutationnelle de l'exon 5 à exon 9 du gène p53 chez les femmes coréennes atteintes de cancer du sein. Ils ont démontré que les mutations plus fréquentes étaient dans l'exon 7 et sont des mutations faux-sens. Ces mutations ont été associées à des caractéristiques clinico-pathologiques plus agressives (50).

Dans notre étude, les analyses moléculaires réalisées ont permis de cerner les différents génotypes des mutations étudiés (R175H, R248Q/ R248W, R249S, R273H/ R273). Vu que dans nos résultats nous n'avons pas détecté de mutations au niveau des trois codons chauds 175, 248 et 249, mais les analyses moléculaires réalisées ont permis de détecter des anomalies génétiques au niveau du codon chaud 273. Néanmoins, l'association entre ces anomalies et le risque du cancer du sein n'a pas été élucidée à cause du nombre restreint d'échantillons étudiés.

Nous avons observé, dans certains profils, des mutations 'douteuses' que nous n'avons pas voulu montrer car elles nécessitent des investigations supplémentaires et un séquençage pour confirmer leurs présences. Cependant, nous pouvons affirmer que la méthodologie suivie a montré ses capacités de détection d'anomalies génétiques et, c'est pour cette raison, qu'elle pourrait constituer un moyen précis et cliniquement utile pour détecter les mutations ponctuelles du gène p53 dans le cancer du sein.

Conclusion et perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Les objectifs de notre travail étaient d'optimiser et de valider une technique de PCR-RFLP afin d'étudier les mutations au niveau du gène p53, affirmer si ces anomalies affectant le gène suppresseur de tumeur p53 peuvent être un bon marqueur dans le cancer du sein en comparant les échantillons pathologiques et bénins.

Nous avons pu détecter des mutations au niveau des points chauds étudiés du gène p53. Un fragment d'ADN extrait du tissu pathologique de la glande mammaire a été amplifié avec des amorces spécifiques et ensuite digérés par des enzymes de restriction reconnaissant des sites de restriction spécifiques. Pour détecter les mutations au niveau des codons 175, 248, 249 et 273, nous avons choisi les enzymes *HhaI*, *HaeIII*, *MspI* et *BstUI*, respectivement, dans 30 cas de cancers et 7 témoins négatifs. Les résultats obtenus ont permis de détecter des anomalies génétiques au niveau des "hot spots" du gène étudié, avec des pourcentages variables. Une confirmation des résultats par séquençage est à réaliser dans le futur. Néanmoins, leur association n'a pas été confirmée vu le nombre restreint des échantillons étudiés.

Nous proposons pour la continuité du travail expérimental :

- d'augmenter le nombre d'échantillons analysés pour en tirer des conclusions fiables, ce qui va nous permettre d'orienter le diagnostic et, de ce fait, dégager des recommandations très utiles pour le clinicien ;
- d'utiliser d'autres techniques de screening des anomalies de p53 tel que SSCP la DGGE.
- d'analyser d'autres gènes de réparation de l'ADN.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Ismail J., Manfred K., Jean Y.P. Atlas of breast surgery. Springer. 1^{ière} édition. 2006 : 133pages.
2. Donna T.G. Inside the lacting breast : the latest anatomy research. Midwifery & Women's Health. 2007 : 52(6), 556-563.
3. Richard L.D., Wayne V., Adem W.M.M. Gray's anatomie pour les étudiants. Elsevier. 2006 : 1111 pages.
4. Tiago B.B., Ana C., Rita C.F.L., Roger R., et Angel F. Breast thermography from an image processing viewpoint : A survey. Elsevier. 2013 : 93(10), 2785-2803.
5. Elizabeth M., Qing S., et Dale W.L. Connexions and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. Membrane Biology. 2007 : 218(1-3), 107-21.
6. International Agency for Research on Cancer;Organisation mondiale de santé. Dernières statistiques mondiale sur le cancer. 12 Décembre 2013, communiqué de presse N° 223, 3pages.
7. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J (2013). Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*, 132(5):1133–1145.
8. Andre N., et Parviz G. Facteurs de risque du cancer du sein. *MEDECINE/SCIENCES*. 2005 : 21 : 175-80.
9. Lilia A., Kristan A., et Christopher R. M. Stress and breast cancer: from epidemiology to molecular biology. *Breast Cancer Research*. 2011 : 13:208.
10. 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*. 2003 : 4, 432 pages.
11. Emad A. R., Jorge S. R., Frederick B., David J. D., Thomas D. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Research*. 2010 : 12:207.

Références bibliographiques

12. Alan S. et James L. Anatomie pathologique générale et spéciale. De Boeck Supérieur, 1997 : 536 pages.
13. Gautam K., Malhotra, Xiangshan Z., Hamid B., et Vimla B. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy. Review.* 2010 : 10, 955-960.
14. Le Bouëdec G., de Lapasse C., Mishellany F., Chêne G., Michy T., Gimbergues P., Dauplat J. Cancer canalaire in situ du sein avec micro-invasion. Place du ganglion sentinelle. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité.* 2007 : 317–322.
15. Yolande M. et Jean-Loup S. Le cancer du sein. Judith 1, Klimt.
16. Frances P O., Sarah E P., Anna M. M. Breast pathology. Elsevier. 2^{ème} édition. 2011 : 377 pages.
17. Michael R. Stratton, Peter J. Campbell et P. Andrew Futreal. The cancer genome. *Nature.* 2009 : 458, 719-724.
18. Rosen, Paul P. Rosen's Breast Pathology. Lippincott Williams & Wilkins. 3^{ème} édition. 2009 : 1136 pages.
19. Moïse N., Michel H., Daniel S., Marc S. Cancer du sein. Springer. 2006 : pages 475.
20. Bourgier C., Heymann S., Vielh P. D. Implications radiobiologiques de la classification moléculaire des cancers du sein : présent ou avenir ?. *Cancer/Radiothérapie.* 2012 : 29–33.
21. Eva Y.H.P. Lee et William J. Muller. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. Cold Spring Harb. 2010 : 2(10), a003236.
22. Cynthia O., Paschal W. et Debu Tripathy. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. *Oncologist.* 2004 : 361-77.
23. American Cancer Society Cancer Information Database. Breast Cancer. Accessed at www.cancer.org/Cancer/BreastCancer/DetailedGuide/index on 4/21/14.

Références bibliographiques

24. Vladimir A. B., Prashanth Ak, Elke M., Haijian W., Wenwei Hu, Anna Puzio-Kuter et Arnold J. L. The Origins and Evolution of the p53 Family of Genes. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2009 : a001198.
25. Chang F., Syrjänen S., Tervahauta A. et Syrjänen K. Tumorigenesis associated with the p53 tumour suppressor gene. *British Journal of Cancer*. 1993 : 68(4):653-61.
26. Andreas C., Joerger et Alan R. Fersht . The Tumor Suppressor p53: From Structures to Drug Discovery. Cold Spring Harbor. 2012 : 2(6): a000919.
27. Petitjean A. C., Mathe E., Kato S., Ishioka C., Tavtigian SV., Hainaut P., Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: Lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat.* 2007 : 622–629.
28. Kumaravel S., et Wafik S. E. Tumor Suppressor p53: Regulation and function. *Frontiers in Bioscience*. 2000 : 424-437.
29. David Malkin. The role of p53 in human cancer. *Neuro-Oncology*. 2001 : 231–243.
30. Jack T. Z., et Scott W. L. Tumor Suppressive Functions of p53. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009 : 1(5): a001883.
31. St Clair S, Manfredi J.J. The dual specificity phosphatase Cdc25C is a direct target for transcriptional repression by the tumor suppressor p53. *Cell Cycle*. 2006 : 5, 709–713.
32. Jordan S. et Scott W. L. Control of apoptosis by p53. *Nature Publishing*, 2003 : 9030–9040.
33. Noa R., Ran B., Moshe O., et Varda R .Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene : Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes & Cancer*. 2011 : 466–474.
34. Dawid W., Marco N., Licio C., et Giannino D. S. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Genes & Cancer*. 2011 : 466–474.
35. Hainaut P., Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res*. 2000 : 77, 81-137.

Références bibliographiques

- 36.** Pavel Rossner Jr., Marilie D. G., Yu-Jing Z., Mary Beth T., Hanina H. et al. Mutations in p53, p53 protein overexpression and breast cancer survival. *J Cell Mol Med.* 2009 : 13(9B): 3847–3857.
- 37.** Magali O., Monica H. et Pierre H. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. Cold Spring Harbor. 2010 : 2(1): a001008.
- 38.** William A. Freed-Pastor et Carol P. Mutant p53: one name, many proteins. *GENES & DEVELOPMENT.* Cold Spring Harbor. 2012 : 1268–1286.
- 39.** Ana I. Robles et Curtis C. Harris . Clinical Outcomes and Correlates of TP53 Mutations and Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010 : 2(3): a001016.
- 40.** Pao-Huei Ch., Shyr-YI Un, Chung-Kwe W., YI-Jen C., Te-Chuan C., et Jan-Gowth C. Hot Spots” Mutation Analysis of p53 Gene in Gastrointestinal Cancers by Amplification of Naturally Occurring and Artificially Created Restriction Sites. *CHEM.* 1993 : 39(10), 2186-2191.
- 41.** Pikor L.A., Enfield K.S.S., Cameron H., et Lam W.L. DNA Extraction from Paraffine Embedded Material for Genetic and Epigenetic Analysis. *JOVE.* 2011 : 49.
- 42.** JONATHAN BEN-EZRA, DAVID A. JOHNSON, JOHN R., NATHAN C. Effect of Fixation on the Amplification of Nucleic Acids from Paraffin-embedded Material by the Polymerase Chain Reaction?. *Histochemistry and Cytochemistry.* 1991 : 39(3), 351-4.
- 43.** Kathleen C., Sharon N. Edmiston, Lisa Cui, Scott D. S., Jingzhong P., Mei He, Chiu-Kit Tse, Joseph G., Lynn D., Edison T. L., Robert M., et Beth N. Prevalence and Spectrum of p53 Mutations Associated with Smoking in Breast Cancer. *Cancer Research.* 2002 : 62, 1987-1995.
- 44.** Haintaut P., Hernandez T., Robinson A., Rodriguez-tome P., Flores M. Hollstein T., Harris C.C., Montesano R. IARC Database of P53 gene mutation in human tumors and cell lines : updated compilation , revised formats and new visualisation tools . *Nucl.Acids.Res.* 1997 : 26(1), 205-213.

Références bibliographiques

- 45.** Khaliq T., Afghan S., Naqi A., Haider M., Islam A. P53 mutations in carcinoma breast- a clinicopathological study. *J Pak Med Assoc* . 2001 : 51(6):210-3.
- 46.** Shojaie N.1., Tirgari F. Detection of Somatic mutation of codon 248 of p53 gene between Iranian women with breast cancer. *Iranian Journal of Cancer Prevention*. 2008 : 26-32.
- 47.** Silvia R., Janka V., Ingrid H., Jozef M., Martina Č., Ján M. Association between polymorphisms of XRCC1, p53 and MDR1 genes, the expression of their protein products and prognostic significance in human breast cancer. *Med Sci Monit*. 2011 : 17(12), 354–363.
- 48.** ABEER J. A., MOHAMED T., ABDELMONEIM M. E., ASMA T., NUJOUR A., SOOAD K. A., NADA A., TAHER A., et ABDELILAH A. TP53 genetic alterations in Arab breast cancer patients: Novel mutations, pattern and distribution. *Oncol Lett*. 2011 : 2(2), 363–369.
- 49.** Abhishikta G. R., BN Sarkar¹, Rakesh R., VR Rao, AR Bandyopadhyay. Absence of P53 Gene Mutations in Exons 5 - 7 Among Breast Cancer Patients of Bengalee Hindu Caste Females, West Bengal, India . *Cancer Prevention*. 2012: 13 (9), 4477-4479.
- 50.** Hyung Won K., Hak Min L., Seung Hyun H., Sung Gwe A., Kyung-A L., et Joon J. Patterns and Biologic Features of p53 Mutation Types in Korean Breast Cancer Patients. *Breast Cancer*. 2014 : 17(1): 1–7.

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 :

- 1- en utilisant un balance de précision, peser x g d'agarose ;
- 2- mélanger l'agarose avec 100 ml de tampon TAE 1x (la proportion d'agarose dépend de la taille des molécules d'ADN à séparer) ;
- 3- Faire fondre l'agarose à la chauffe ballon. Agiter de temps à autre pour homogénéiser le mélange ;
- 4- après refroidissement partiel du gel, ajouter 03 µl de BET (bromure d'éthidium qui est un agent intercalant entre les bases des acides nucléiques et émis une fluorescence orange sous illumination par UV) ;
- 5- Couler lentement le gel sur support d'une cuve horizontale ;
- 6- Laisser refroidir, enlever le peigne et les joints. Le gel est prêt pour le dépôt des échantillons ;
- 7- Dans chaque puits du gel, il est déposé le mélange de : 05 µl de produit d'amplification + 03 µl de Bleu de Bromophénomol, et un puits pour de 4 µl de marqueur de poids moléculaire ;
- 8- Fermer la cuve, brancher les fils et mettre sous tension. Laisser migrer jusqu'à ce que le colorant de charge arrive à proximité du bord du gel (environ 40 min à 100 V) ;
- 9- Couper l'alimentation, débrancher les connections et récupérer le gel dans son support.

Attention, le gel doit être manipulé avec soin car il est très fragile.

Annexe 3. Préparation de bleu de chargement

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

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

Annexes

Annexe 5. Résultats de la digestion des fragments d'ADN par les endonucléases de restriction *in silico*

Untitled digest						Codon 175
Enzymes: HhaI						
Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence	
64	none	1	HhaI	64	GCACCCGCGT CCTCGCCATG GCCATCTACA AGCAGTCACA GCACATGACG GAGGTTGTGA GGCG	
23	HhaI	83	none	105	CTGCTCAGAT AGCGATGGTG AGC	
18	HhaI	65	HhaI	82	CTGCCCCCAC CATGAGCG	

Untitled digest						Codon 248
Enzymes: MspI						
Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence	
81	MspI	78	none	158	CGGAGGCCCA TCCTCACCAT CATCACACTG GAAGACTCCA GGTCAGGAGC CACTTGCCAC CCTGCACACT GGCTGCTGT G	
77	none	1	MspI	77	TCTCCTAGGT TGGCTCTGAC TGTACCACCA TCCACTACAA CTACATGTGT AACAGTTCCT GCATGGGCGG CATGAAC	

Untitled digest						Codon 249
Enzymes: HaeIII						
Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence	
83	none	1	HaeIII	83	TCTCCTAGGT TGGCTCTGAC TGTACCACCA TCCACTACAA CTACATGTGT AACAGTTCCT GCATGGGCGG CATGAACCGG AGG	
66	HaeIII	84	HaeIII	149	CCATCCTCA CCATCATCAC ACTGGAAGAC TCCAGGTCAG GAGCCACTTG CCACCCTGCA CACTGG	
9	HaeIII	150	none	158	CCTGCTGTG	

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

Le P53 un gène autosomique qui code une phosphoprotéine nucléaire de 53KDa, est impliqué dans le contrôle et de la prolifération cellulaire et il est le gène qui rencontre le plus souvent d'être associé à des cancers humains. La p53 est mutée dans 31% de toutes les tumeurs incluses dans les mutations somatiques dans le cancer, et dans environ ~23% des échantillons de cancer du sein. Les mutations p53 sont caractérisées par une forte prévalence des mutations faux-sens trouvés principalement dans les exons 5 – 8, dans le domaine de liaison de l'ADN. La plupart des mutations du gène p53 surviennent à quatre points chauds (codons 175, 248, 249, 273).

Dans notre étude nous avons fait une optimisation des conditions expérimentales de la technique de PCR RFLP sur des patientes atteintes de cancer du sein et aussi nous avons recherché et, éventuellement, d'identifier des mutations pouvant affecter le bon fonctionnement du gène codant pour la protéine p53. Cette technique est un moyen précis et utile pour détecter les mutations ponctuelles "hot spots" du gène p53 dans le cancer du sein. Les analyses moléculaires réalisées ont permis de détecter les différents génotypes des mutations étudiés (R175H, R248Q/ R248W, R249S, R273H/ R273C). Néanmoins, l'association entre ces mutations et le risque du cancer du sein n'a pas été confirmée à cause du nombre restreint d'échantillons étudiés.

Mots-clés : p53, codons chauds, cancer du sein, PCR-RFLP.

Abstract

P53, an autosomal gene that encodes a nuclear phosphoprotein 53 KDa, is involved in the control and cell proliferation, and it is the gene that most often to be associated with human cancers. p53 is mutated in 31% of all tumors included in somatic mutations in cancer, and in about ~ 23% samples of breast cancer. The p53 mutations are characterized by a high prevalence of the mainly found missense mutations in exons 5-8, in the DNA-binding domain. Most mutations in the p53 gene occur in four hot spots (codons 175, 248, 249 and 273).

In our study we make an optimization of the experimental conditions of the PCR-RFLP technique on patients with breast cancer and we also research, possibly, to identify mutations that may affect the proper functioning of the gene coding for the p53 protein. This technique is a specific and useful to detect hot spots of p53 in the breast cancer gene. The molecular analyzes performed have allowed to detect the different genotypes of the studied mutations (R175H, R248Q/R248W, R249S, R273H/R273C). However, the association between these changes and the risk of breast cancers was not confirmed because of the limited number of samples studied.

Key words : p53, hot spots, breast cancer, PCR-RFLP.

ملخص

P53 جين وراثي جسمي الذي يشفر بروتين فسفوري؛ فسفوبروتين نووي 53KDa، يشارك في السيطرة على تكاثر الخلايا وهي وجدت في معظم الأحيان لتترافق مع مرض السرطان البشري. وتتحول P53 في 31% من جميع الأورام المدرجة في الطفرات الجسدية في السرطان، وحوالي ~23% من عينات سرطان الثدي. وتتميز الطفرات P53 من ارتفاع معدل انتشار الطفرات مغلطة وجدت أساسا في الإكسونات 5-8، في المجال ملزمة DNA. وتحدث معظم الطفرات البروتين p53 في أربعة نقاط ساخنة (كودونات 175، 248، 249، 273).

في دراستنا قمنا بتحديد جميع المعايير الدقيقة اللازمة لضمان منهجية تطبيقية مبنية على أسس تقنيات البيولوجيا الجزيئية (PCR-RFLP) لدراسة الطفرات الجينية لدى مرضى سرطان الثدي، ونحن أيضا نقوم بالبحث و تحديد الطفرات التي قد تؤثر على حسن سير العمل في الجينات التي تشفر البروتين p53. هذه الأسلوب هو طريقة دقيقة ومفيدة للكشف عن الطفرات نقطة "النقاط الساخنة" من الجين p53 في سرطان الثدي. التحليلات الجزيئية أدت للكشف عن مختلف الطفرات المدروسة (R175H، R248Q / R248W، R249S، R273H / R273C). ومع ذلك، لم يؤكد الارتباط بين هذه الطفرات وخطر الإصابة بسرطان الثدي بسبب العدد المحدود من العينات المدروسة.

كلمات البحث: الجين p53، كودونات الساخنة، سرطان الثدي، PCR-RFLP

