

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Hadj Lakhdar- Batna
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



MEMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de

Magister En Biologie Animale

Présenté par :

Merabet Nabila

Thème



Association des polymorphismes génétiques du
cytochrome P450 1A1 (CYP 1A1) et risque du
cancer du sein

Devant le jury :

Président : **Pr Yahia M.** Professeur, Université de Batna.
Examinatrice : **Pr Satta D.** Professeur, Université de Constantine.
Pr Hambaba L. Professeur, Université de Batna.
Rapporteur : **Dr Bouras M.** Maître de conférences, Université de
Batna.

Année Universitaire : 2011-2012

Remerciements

Toute ma gratitude a ceux qui ont permis à ce travail d'être réalisable. Merci au chef de laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Batna le Dr *Khadraoui Hachani* et Mr *Ben Otsmen Hassan* qui m'ont accueillie pour un stage et ou j'ai pu collecter le matériel biologique nécessaire pour cette étude. Merci au Dr *Stefan Dimitrov* et au Dr *Ozturk Mehmet* directeurs du centre de recherche INSERM/UJF-U823-Grenoble- d'avoir accepté de nous accueillir au niveau de leur unité de recherche dans le but d'acquérir les techniques nécessaire à ce travail. Merci au Dr *Bouras Mourad*, grâce a son professionnalisme et ses collaborations m'a ouvert cette exceptionnelle opportunité lors de son séjour à l'INSERM de Grenoble. Merci a notre responsable *Yahia Mouloud* qui a permis à ce stage d'être possible. Merci à mon époux qui m'a accompagné dans cette épreuve.

Merci à tous les membres du jury d'avoir évalué et critiqué ce travail. Un Merci spécial à mon encadreur et au professeur *Satta* pour leur rigueur scientifique.

Merci à ceux qui ont participé activement à la rédaction de ce manuscrit. Ma mère, mes sœurs *Nadjet* et *Naziha*. Merci a mon père pour ces encouragements incessant et merci à *Karim* et *Amina*.

Merci à *Redha Guerfi* pour ses encouragements ses conseils et son aide lors du tirage de ce manuscrit.

Bien sûr, je n'oublierai pas de remercier tous mes collègues et tout le personnel du laboratoire d'anatomopathologie pour leur sollicitude, encouragements et gentillesse.

Dédicace

A Baba Abdelkrim et M'a Houria

À Fouady

Et à toute ma super belle-famille.

ملخص

سرطان الثدي من السرطانات الأكثر شيوعاً عند النساء، يتم احصاء حوالي 5000 حالة جديدة سنويا في الجزائر. في نسيج الثدي، حيث يأخذ الاستروجين دورا هاما، يتم انتاج مركبات سامة جينيا ويشارك في ذلك انزيم من عائلة السيتوكروم P450 (CYP 1A1).

تمت دراسة أربعة طفرات جينية (m1, m2, m3, m4) ((mutation = m) لـ CYP 1A1 وانعكاساتها المحتملة من حيث خطر الاصابة بسرطان الثدي. بواسطة تقنية PCR RFLP، سعينا إلى دراسة تحليلية للعلاقة بين هذه الطفرات و سرطان الثدي وذلك بمقارنة عينات سرطانية مع عينات سليمة.

لم تتمكن من اثبات وجود علاقة ذات دلالة إحصائية لتأثير هذه الطفرات على خطر الاصابة بسرطان الثدي. نظرا للاهتمام الكبير للأبحاث العلمية بسرطان الثدي و اشتراك السيتوكروم P450 (CYP 1A1) في خطر حدوث هذا السرطان، والاهتمام بتطوير مؤشرات حيوية جديدة للتشخيص المبكر، و أيضا من اجل نتائج أكثر دقة و دلالة، نحتاج الى دراسات اضافية مع اخذ عدد اوسع من العينات ممثلة لسكان الجزائر.

الكلمات المفتاحية : سرطان الثدي، السيتوكروم P450 1A1، PCR RFLP.

Summary

Breast cancer is the most common fatal malignancy in women, in Algeria; it's about 5000 new cases per year are identified.

In mammary tissue, a member of Cytochrome P450 family (CYP1A1) is involved in the metabolism of estrogen leading to the synthesis of genotoxic compounds.

Four single nucleotide polymorphisms in CYP1A1 have been studied concerning their potential implication in terms of breast cancer risk: m1, m2, m3 and m4 (m = mutation).

We sought to study PCR-based RFLP assay of these polymorphisms in breast cancer and the development of new early diagnostic biomarkers. Further studies of the PCR-based RFLP assay on extensive sampling of the Algerian population are needed.

Keywords: Breast cancer, CYP1A1, PCR-based RFLP assay.

Résumé

Le cancer du sein occupe une place primordiale en cancérologie pour plusieurs raisons. C'est un cancer très fréquent ; en Algérie, environ 5000 nouveau cas par an sont recensés.

Dans les tissus mammaire (tumoral ou non), tissu cible de estrogènes, se déroule une principale voie de synthèse de composés génotoxiques où un des membres CYP de la famille 1A y participe (CYP1A1).

Quatre polymorphismes de l'enzyme CYP1A1 ont été étudiés vue leur potentiel implication dans le risque des cancers mammaires. Ce sont : m1, m2, m3 et m4 (m = mutation).

Le but a été d'étudier le profil RFLP, de ces variants CYP1A1, associé au cancer du sein, en comparant les échantillons pathologiques et normaux. Après une étude statistique le lien des variants CYP1A1 avec le cancer du sein n'est pas significatif.

Vu l'intérêt que porte la recherche sur l'implication du Cytochrome P450 dans le cancer du sein, ainsi que la mise au point de nouveaux biomarqueurs diagnostiques précoces, des études complémentaires du profil RFLP des variants CYP1A1*2A (m1), CYP1A1*2C (m2), CYP1A1*3 (m3) et CYP1A1*4 (m4) sur un échantillon étendu d'une population Algérienne, pourront mieux cerner cette pathologie.

Mots clés : Cancer du sein, CYP1A1, PCR RFLP.

SOMMAIRE

Introduction.....	1
I. Partie Bibliographique.....	3
I.1. Aspect anatomique et physiologique de la glande mammaire.....	3
I.2. Histologie et physiologie de la glande mammaire.....	5
I.2.1. Développement mammaire au cours de la vie génitale.....	6
I.2.2. Contrôle du développement mammaire	8
I.3. Pathologie du cancer du sein.....	9
I.3.1. Aspect anatomopathologique du cancer du sein	9
I.3.1.1. Types de Cancer du sein.....	10
I.3.1.1.1. Cancer <i>in situ</i>	11
I.3.1.1.2. Cancer infiltrant	11
I.4. Cancérogenèse mammaire.....	20
I.4.1. Facteurs de la promotion tumorale.....	20
I.4.2. Invasion et pouvoir métastatique.....	21
I.4.3. Biologie moléculaire du cancer du sein.....	21
I.4.3.1. Oncogènes du cancer du sein.....	22
I.4.3.2. Facteurs de croissance.....	23
I.4.3.3. Gènes suppresseurs de tumeurs (antioncogènes).....	24
I.4.3.4. Gènes de prédisposition familiale.....	25
I.4.4. Implication des œstrogènes dans le cancer du sein.....	26
I.4.4.1. La voie médiée par les récepteurs à estrogène.....	26
I.4.4.2. Métabolisme génotoxiques des œstrogènes.....	27
I.5. Enzymes de détoxification et génotoxicité.....	28
1.5.1. Cytochrome P450.....	28
1.5.2. Nomenclature.....	29
1.5.3. Localisation tissulaire.....	29
1.5.4. Substrats et fonction des CYPs.....	31
I.6. Génétique du CYP1A1.....	33
I.6.1. Gène & polymorphismes.....	33
II. Partie expérimentale.....	36
II.1. Matériels.....	36
II.1.1. Matériels biologique.....	36

II.1.2. Réactifs chimiques.....	36
II.2. Méthodes.....	37
II.2.1. Préparation des échantillons.....	37
II.2.1.1. Déparaffinage des échantillons.....	37
II.2.1.2. Extraction d'ADN.....	37
II.2.1.3. Quantification de l'ADN et appréciation de la digestibilité.....	38
II.2.2. PCR-RFLP.....	38
II.2.2. Amplification par PCR.....	39
II.2.2. Etablissement du profil de restriction RFLP.....	40
II.3. Résultats.....	43
II.3.1. Caractéristiques des patientes.....	43
II.3.2. Profil électrophorétique des séquences amplifiées.....	44
II.3.3. Profils des produits de PCR digérés par les endoncléases de restrictions appropriées.....	45
II.3.4. Fréquences des variants CYP et analyse statistiques.....	47
II.4. Discussion.....	48
II.4.1. Discussion analytique.....	48
II.4.2. Discussion des résultats.....	49
II.4.3. Perspectives.....	50
II.5. Conclusion.....	51
Liste des abréviations.....	52
Liste des tableaux et figures.....	53
Références.....	54

Introduction

Le cancer du sein est un véritable fléau dévastateur de la santé publique. Il survient essentiellement chez la femme, deux cent fois plus que chez l'homme. Près de quatre millions de femmes développent un cancer du sein. Le risque augmente de façon significative avec l'âge entre 30 et 60 ans. 10% des cancers du sein surviennent avant 40 ans, 20% surviennent avant 50 ans et près de la moitié avant 65ans. Environ 1,28 millions nouveau cas sont diagnostiqués par an dans le monde (GLBOCAN IARC¹). Ce type de cancer représente 32,2% de l'ensemble des nouveaux cancers chez la femme. Il s'agit essentiellement d'un cancer de la femme. Il est rare chez l'homme (1%) mais plus grave car le diagnostique est souvent tardif.

En Algérie, près de 5000 nouveaux cas sont recensés chaque année (1), c'est la première cause de mortalité chez la femme.

L'intérêt que représente la recherche pour cette pathologie est d'améliorer la détection précoce.

Ce cancer est souvent un cancer hormono-dépendant : les facteurs augmentant le taux d'œstrogènes sont donc à risque. Il est établi que l'œstrogène a un rôle dans la carcinogenèse mammaire.

Le système de détoxification, cytochrome P450s, représente une superfamille d'enzymes lesquels catalysent la phase I de détoxification.

Les tissus mammaires tumoraux ou non sont des tissus cibles d'œstrogènes. Là, se déroule une principale voie de synthèse de composés génotoxiques où un des membres CYP de la famille 1A (CYP 1A1) y participe.

Quatre variants de l'enzyme CYP 1A1 ont été étudiés sur 15 échantillons pathologiques et 14 échantillons bénins utilisés comme contrôle. Ces mutations m1, m2, m3 et m4 ont une implication potentielle dans le risque des cancers mammaires.

L'objectif de cette étude est d'analyser le profil RFLP de ces variants CYP 1A1 associés au cancer du sein en comparant les profils électrophorétiques des échantillons pathologiques aux échantillons normaux après action des enzymes de restrictions spécifiques pour chaque type de polymorphisme. Un séquençage potentiel permettrait de confirmer les polymorphismes obtenus. L'étude statistique a

¹ International Agency for research on cancer

révélé que les résultats obtenus dans cette étude ne peuvent confirmer si les polymorphismes m1, m2, m3 et m4 étudiés modifient le risque du cancer du sein.

Vu l'intérêt que porte la recherche sur l'implication du cytochrome P450 dans le cancer du sein ainsi que la mise au point de nouveaux biomarqueurs de diagnostic précoce, des études complémentaires du profil RFLP des variants CYP 1A1 (CYP1A1*2A (m1), CYP1A1*2C (m2), CYP1A1*3 (m3) et CYP1A1*4 (m4)) sur un échantillon étendu d'une population Algérienne pourront mieux cerner cette pathologie.

I. Partie bibliographique

I.1. Aspect anatomique et physiologique de la glande mammaire

Le sein, sur le plan superficiel, est recouvert de peau s'étendant jusqu'à la région mamelonnaire, arrondie et pigmentée (Fig. 1). La peau de l'aréole a un aspect grenu parsemée de glandes cutanées et sébacées (glande de Morgani) qui s'hypertrophient à la grossesse. L'aréole est pourvue de fibres musculaires lisses, muscles sphinctériens périaréolaires, qui contrôlent la fonction excrétrice du sein au moment de la lactation.

Le mamelon est la partie centrale surélevée de l'aréole. Les canaux galactophores assurent l'évacuation des sécrétions lactées débouchant sur des pores séparés.

Le sein, sur le plan interne, est essentiellement constitué d'un tissu conjonctif adipeux et de ligaments de Cooper. Le tissu glandulaire responsable de la production exocrine du lait ne représente qu'une faible proportion du volume mammaire. La glande mammaire est constituée de lobes séparés par des cloisons conjonctives qui sont des ensembles de bourgeons glandulaires ou acini développés en période d'allaitement, drainés par des canaux galactophores pourvus vers leurs extrémités d'un sinus galactophore et débouchant séparément au niveau du mamelon (Fig. 1).

Sur le plan profond, on distingue 3 muscles sur lesquels repose le sein : le grand pectoral, le petit pectoral et le sous-clavier. Ces mêmes muscles recouvrent la paroi thoracique.

Le drainage lymphatique du sein est commun au membre supérieur et à la paroi thoracique externe. Le drainage s'effectue à 75 % vers l'aisselle, à 25 % vers la chaîne mammaire interne et accessoirement ou en deuxième relais vers les ganglions sus-claviculaires (Fig. 2).

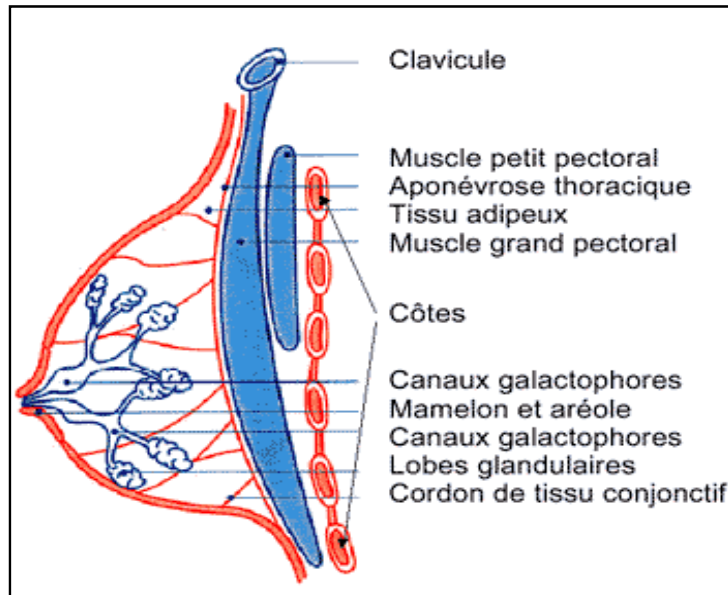


Figure 1. Structure du sein (2).

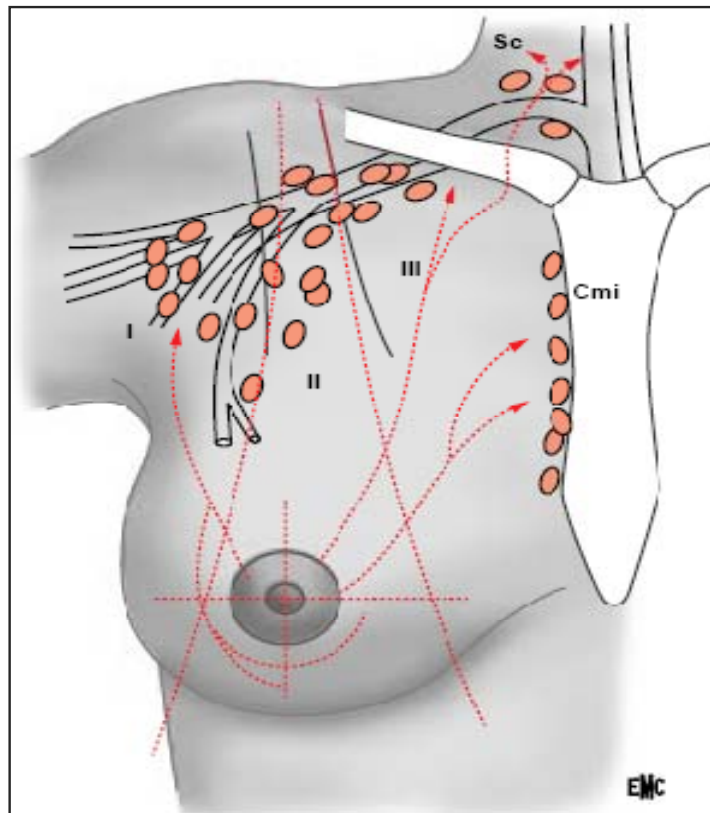


Figure 2. Anatomie des lymphatiques (3).

I.2. Histologie et physiologie de la glande mammaire

L'organisation histologique générale du sein comporte d'avant en arrière le tégument, le tissu conjonctif sous-cutané, le corps mammaire renfermant la glande mammaire puis un tissu conjonctif lâche permettant au corps mammaire discoïde de se glisser en arrière sur le plan musculaire du grand pectoral. Chacune des deux glandes mammaires est une glande exocrine, tubulo-alvéolaire composée, sécrétant le lait. Chaque glande mammaire est constituée de 10 à 20 lobes drainés par des canaux galactophores collecteurs « lactifères » s'ouvrant individuellement à la peau au niveau du mamelon. Chaque lobe est lui-même constitué de lobules, et chaque lobule étant constitué de tubulo-alvéoles correspondant à la partie sécrétrice de la glande. Les lobes sont séparés par du tissu conjonctif dense et entourés par du tissu adipeux abondant, de même les lobules sont entourés par du tissu conjonctif dense alors que le tissu conjonctif intralobulaire (tissu conjonctif palléal) est lâche (4).

Les canaux galactophores sont des canaux excréteurs. Ils sont d'abord intralobulaires, puis interlobulaires (épithélium cubique avec présence de cellules myoépithéliales) et enfin interlobaires à épithélium pavimenteux stratifié. Les tubulo-alvéoles de la glande mammaire au repos sont constitués de cellules disposées sur deux couches : une couche sécrétrice au contact de la lumière et la deuxième myoépithéliale se situe au pourtour (Fig. 3).

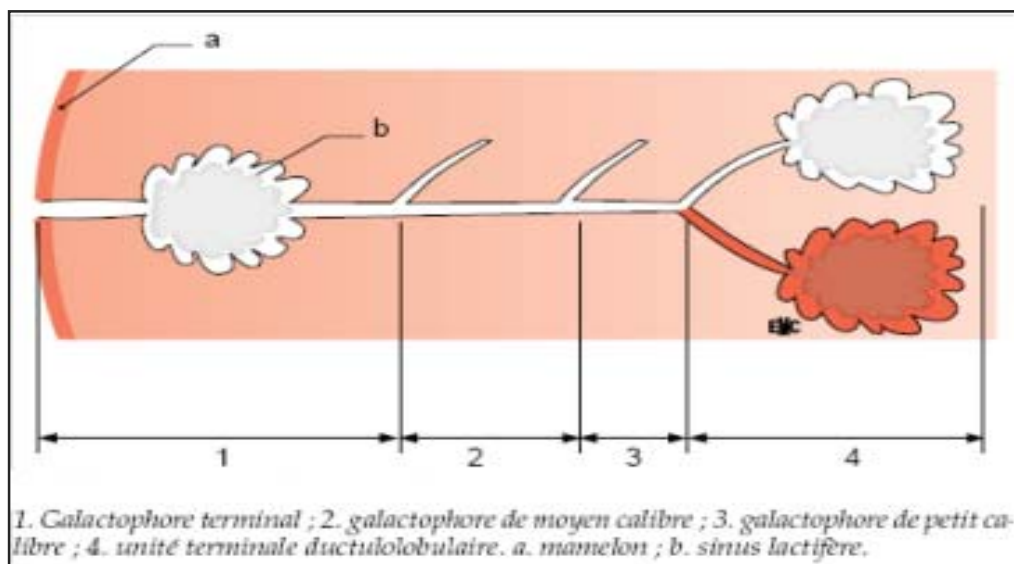


Figure 3. Représentation schématique d'un canal galactophore (3).

I.2.1. Développement mammaire au cours de la vie génitale

Dans les jours qui suivent la naissance jusqu'avant la puberté, une sécrétion se produit dans les tubulo-alvéoles des lobules avec parfois écoulement aux mamelons (crise néonatale). La régression se fait en une à deux semaines.

Pendant l'enfance et jusqu'à la puberté, le système canaliculaire excréteur de la glande mammaire est rudimentaire et les tubulo-alvéoles sont absents.

A la puberté, la sécrétion hypothalamique de GnRH entraîne la sécrétion par l'adéno-hypophyse de FSH et de LH. Ces dernières déterminent des modifications ovariennes qui seront responsables de celles portant sur les voies génitales (cycle menstruel). Lors des premiers cycles menstruels et sous l'influence de la sécrétion des œstrogènes ovariens, la prolifération canaliculaire s'accompagne d'un important développement du tissu conjonctif interlobaire et intralobulaire, d'une multiplication des cellules adipeuses et ainsi les glandes mammaires se développent (5).

En période d'activité génitale en dehors de la grossesse et de l'allaitement, les glandes mammaires restent au repos. Seuls quelques tubulo-alvéoles peuvent se développer au cours de la deuxième partie du cycle sous l'influence de la progestérone. En l'absence de grossesse, ces tubulo-alvéoles involuent (Fig. 4).

La glande mammaire humaine normale subit durant le cycle menstruel une séquence bien définie de modifications histologiques de part dans les structures épithéliales et d'autre dans le stroma. La matrice extra-cellulaire joue un rôle central en modulant une grande variété d'événements cellulaires, comme la prolifération, la différenciation et l'expression de gènes (3).

Pendant la grossesse la sécrétion du lait est physiologiquement liée à l'allaitement du nouveau-né et du nourrisson par sa mère. Elle a pour finalité de nourrir le nouveau-né et d'assurer sa défense immunitaire. En dehors du cas particulier des nourrices, l'allaitement est donc chronologiquement lié au post-partum (Fig. 5).

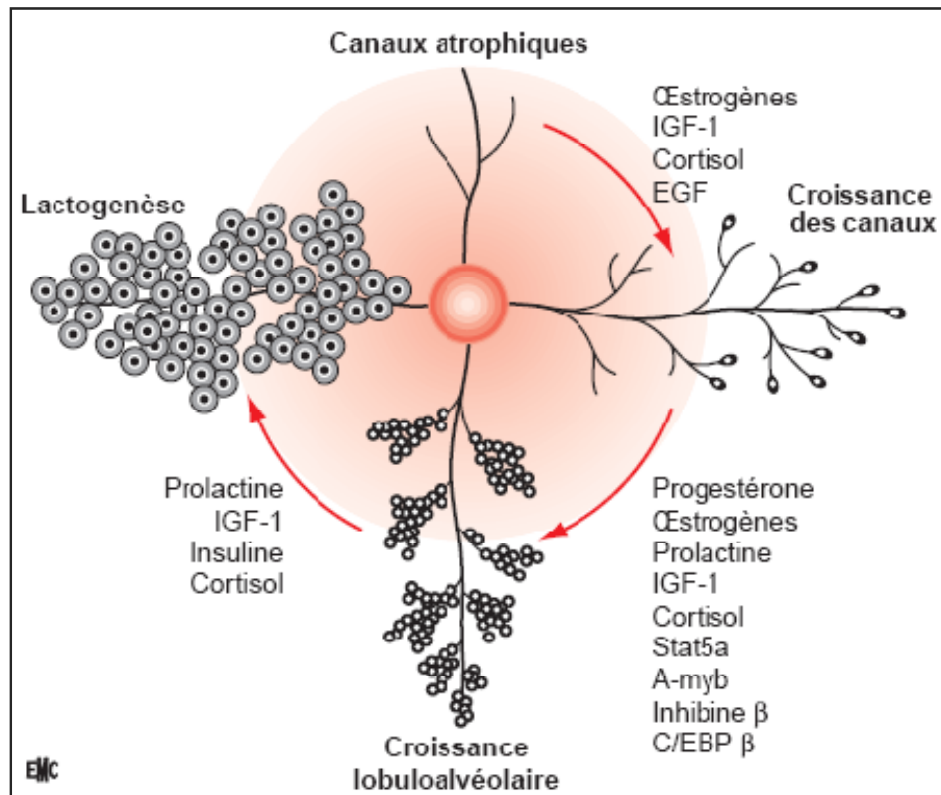


Figure 4. Développements des canaux galactophores (3).

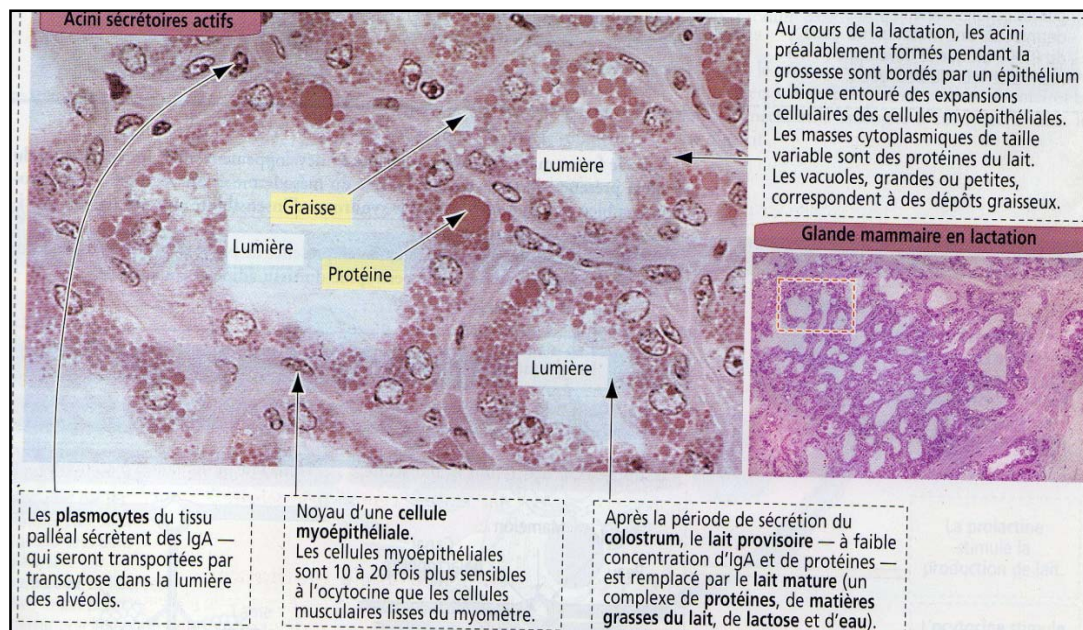


Figure 5. Histologie d'une glande mammaire active (4).

1.2.2. Contrôle du développement mammaire

Pendant la première moitié de la grossesse, sous l'influence des stéroïdes sexuels particulièrement la progestérone, les ramifications terminales du système canaliculaire prolifèrent et de très nombreux tubulo-alvéoles glandulaires se développent.

Dès les premiers mois de la grossesse, sous l'influence de la sécrétion de prolactine, les cellules glandulaires des tubulo-alvéoles commencent à sécréter un produit riche en protéines et pauvre en lipides : le colostrum.

Le rôle des facteurs de croissance produits localement agissant de manière auto/paracrine, est particulièrement important dans le contrôle du développement mammaire.

Une modulation de la réceptivité des cellules épithéliales permet également une croissance mammaire tout en freinant l'induction de la sécrétion lactée. Ainsi l'EGF et son homologue le TGF alpha réduisent le nombre de récepteurs à la prolactine (3).

Le tissu conjonctif en particulier, et sa matrice extra-cellulaire jouent un rôle important :

- les adipocytes sécrètent des facteurs favorisant la ramification des canaux excréteurs et l'organisation des tubulo-alvéoles ;

- la matrice extracellulaire induit l'organisation polarisée des cellules épithéliales mammaires ;

- la sécrétion d'inhibiteurs des collagénases par les cellules myoépithéliales favorise la stabilisation de la matrice extra-cellulaire. Cette stabilité inhibe la prolifération épithéliale. L'action des œstrogènes favorisant la dégradation de la matrice extra-cellulaire par les protéases, lève donc cette inhibition ce qui permet la multiplication des cellules épithéliales (5).

Après la ménopause, il se produit une involution progressive du système canaliculaire et des tubulo-alvéoles restants. Le tissu conjonctif devient plus dense et homogène. L'épithélium s'atrophie et une dilatation kystique des canaux persistants survient fréquemment (6).

I.3. Pathologie du cancer du sein

Le cancer du sein est une tumeur maligne qui peut se développer à partir de différents types de cellules mammaires. Les tumeurs malignes les plus fréquentes sont les adénocarcinomes canaux ou lobulaires avec des formes invasives ou non-invasives (7,8).

Parmi les facteurs de risque l'hormonodépendance peut se traduire par une augmentation du taux d'œstrogènes. La ménopause tardive (52 ans) et la puberté précoce contribuent à l'augmentation du nombre de cycles menstruels donc aux taux d'œstrogènes, ainsi que première grossesse tardive (>35ans), nulliparité, traitement substitutif hormonal de la ménopause (>10 ans) et l'obésité (aromatisation des androgènes en œstrogènes dans les adipocytes) (9).

Les facteurs familiaux et génétiques sont impliqués dans ce type de cancer par les mutations sur des gènes de susceptibilité aux cancers du sein transmises d'une génération à l'autre ou bien acquises au cours de la vie, peuvent conduire au cancer du sein. Les femmes qui portent des mutations de ces gènes ont un très haut risque de cancer (10). D'autres facteurs histologiques (pathologies mammaires bénignes à risque, hyperplasie canalaire atypique) et environnementaux (exposition à des radiations ou à certains produits chimiques toxiques et à des agents mutagènes peuvent induire des mutations) ont été impliqués dans l'initiation de la tumorigenèse (11).

I.3.1. Aspect anatomopathologique du cancer du sein

Les lésions du sein sont observées presque essentiellement chez la femme. Chez l'homme, le sein est une structure rudimentaire, relativement peu sensible aux influences hormonales et apparemment réfractaire au cancer. Par contre chez la femme, la structure plus complexe, le volume plus important et l'extrême sensibilité aux influences hormonales de cet organe le prédisposent à une multitude d'affections.

La plupart des maladies du sein se présentent comme des masses palpables, des lésions inflammatoires, des écoulements mamelonnaires ou des anomalies mammographiques. Bien que la plupart soient heureusement bénignes, le cancer du sein est la deuxième cause de décès chez la femme et une des maladies les plus redoutées (7).

Les tumeurs malignes du sein sont caractérisées par leur type histologique et par leur grade histo-pronostique.

I.3.1.1. Types de Cancer du sein

Les types de tumeurs les plus répandus sont les carcinomes canaux et lobulaires.

Si la prolifération épithéliale maligne est localisée dans la lumière des canaux galactophoriques, il s'agit d'une tumeur est un carcinome intra-canaux ou carcinome canaux *in situ*. Si elle est localisée dans la lumière des acini situés dans les lobules, il s'agit d'un carcinome intralobulaire ou carcinome lobulaire *in situ*. Ces proliférations sont limitées par la membrane basale et donc souvent non invasives. Il arrive qu'un carcinome *in situ* se développe en carcinome infiltrant (9).

Les cancers infiltrants envahissent le tissu mammaire, évoluant localement puis forment des métastases. Les différents types histologiques qui existent, sont (Fig. 6) :

- adénocarcinome canaux infiltrant,
- adénocarcinome lobulaire infiltrant,
- adénocarcinome tubuleux,
- carcinome mucineux ou colloïde muqueux,
- carcinome médullaire,
- la maladie de Paget.
- d'autres formes de carcinomes (papillaire, adénoïde kystique, apocrine) sont plus rares.

Le carcinome canaux infiltrant est la forme la plus répandue des cancers infiltrants. Il a le plus mauvais pronostic. Les cellules épithéliales malignes

invasives forment de petites structures canalaire, des îlots compacts et des nappes cellulaires denses. Le stroma devient fibreux ce qui donne une masse palpable (8). Certaines variétés du carcinome canalaire infiltrant sont moins fréquentes (le carcinome tubuleux et le carcinome mucineux). Ils ont un meilleur pronostic. Les cellules épithéliales malignes dans le carcinome tubuleux forment des structures tubuleuses (8).

I.3.1.1.1. Cancer *in situ*

a. Carcinome intracanalair *in situ*

Il est découvert grâce à l'observation des microcalcifications lors de la mammographie et à l'augmentation croissante due au dépistage. Ce cancer est défini par le grade nucléaire de Holland. Ce grade est réalisé en fonction de l'aspect des noyaux des cellules carcinomateuses. Si les noyaux sont de petites tailles, réguliers entre eux, comportant une chromatine fine, le grade est coté en I. Si les noyaux sont de tailles variables (pléomorphes), à la chromatine grumelée, le grade est coté en III.

Ces différents critères histologiques permettent d'adapter le traitement. Le carcinome intracanalair peut évoluer vers un cancer infiltrant (Fig. 6 a et b).

b. Carcinome intralobulair *in situ*

Cette lésion est souvent une découverte microscopique fortuite dans un prélèvement de tissu mammaire retiré pour une autre raison. Les acini des lobules renferment une prolifération épithéliale faite de cellules monomorphes, élargissant la lumière et réalisant ainsi l'image d'un sac de billes.

Le carcinome lobulair *in situ* peut être associé à un carcinome lobulair ou canalaire infiltrant. Sa fréquence est 5% des tumeurs mammaires malignes.

I.3.1.1.2 Cancer infiltrant

a. le carcinome canalaire infiltrant : c'est Le cancer infiltrant le plus fréquent (75 %) (1). Macroscopiquement, la tumeur correspond à une lésion stellaire et mal limitée. A l'histologie, les cellules carcinomateuses s'agent en travées, en massif et en formation glandulaire. L'anisocaryose et le nombre de mitoses sont variables.

b. L'adénocarcinome tubuleux : c'est un carcinome de bon pronostic. Les cellules carcinomateuses s'agencent uniquement en formations glandulaires. Les noyaux sont réguliers et le nombre de mitoses est faible (9) (Fig. 6 c).

c. Le carcinome mucineux : cette tumeur également nommée carcinome mucoïde ou colloïde, est un carcinome riche en mucus épithélial extra cellulaire en quantité suffisante pour être visible macroscopiquement. Elle se caractérise par de petits îlots de cellules uniformes noyés dans une grande quantité de mucus extra cellulaire (Fig. 6 d).

d. Le carcinome médullaire : c'est une tumeur maligne de bon pronostic. Cinq critères histologiques doivent être présents afin de poser le diagnostic. La tumeur est limitée, le stroma est riche en lymphocytes, le noyau vésiculeux et à nucléole proéminent, l'architecture est de type syncytiale (>75 %). Il n'existe pas de glandes ou de lésions de carcinome intracanalair (Fig. 6 c) (9).

e. Le carcinome lobulaire : il représente 4 % à 11 % des cancers infiltrants (1). Macroscopiquement, la tumeur est indurée et mal limitée. Les cellules carcinomateuses sont agencées en file indienne, avec un aspect en cible autour des canaux galactophoriques. Les noyaux sont réguliers. Le nombre de mitoses est faible (Fig. 6 f) (8).

f. La maladie de Paget du mamelon : L'analyse histologique met en évidence des cellules carcinomateuses au sein du revêtement malpighien du mamelon. Les cellules sont de grandes tailles, polygonales, au cytoplasme abondant clair, au noyau irrégulier et d'architecture lentigineuse. La maladie de Paget du sein témoigne d'un cancer infiltrant ou d'un carcinome intracanalair du sein. Il s'agit d'une propagation de cellules carcinomateuses au mamelon (Fig. 6 g) (9).

Les stades histopronostiques de Scarff Bloom et Richardson (SBR) comprennent trois catégories I, II, III, obtenues par l'addition de trois critères (architecturaux, atypies cytonucléaires et nombre de mitoses) cotés en 1,2 et 3 comme suite :

- **Architecture**
 1. La tumeur ne comprend que des tubes.
 2. La tumeur est partiellement tubulaire.
 3. La tumeur ne comprend aucun tube.
- **Atypies cytonucléaires**
 1. Noyaux réguliers monomorphes.
 2. Atypies modérées.
 3. Noyaux pléomorphes avec atypies marquées.
- **Nombre de mitoses** : le nombre de mitoses est recherché sur 20 champs au fort grossissement en périphérie de la tumeur. Le nombre de mitose le plus important par grand champ est retenu.
 1. Mitose pour quelques champs au fort grossissement.
 2. Deux à trois mitoses dans la majorité des champs au fort grossissement.
 3. Plus de 2 à 3 mitoses dans la majorité des champs au fort grossissement.

Les différents scores sont additionnés pour obtenir le stade histologique global :

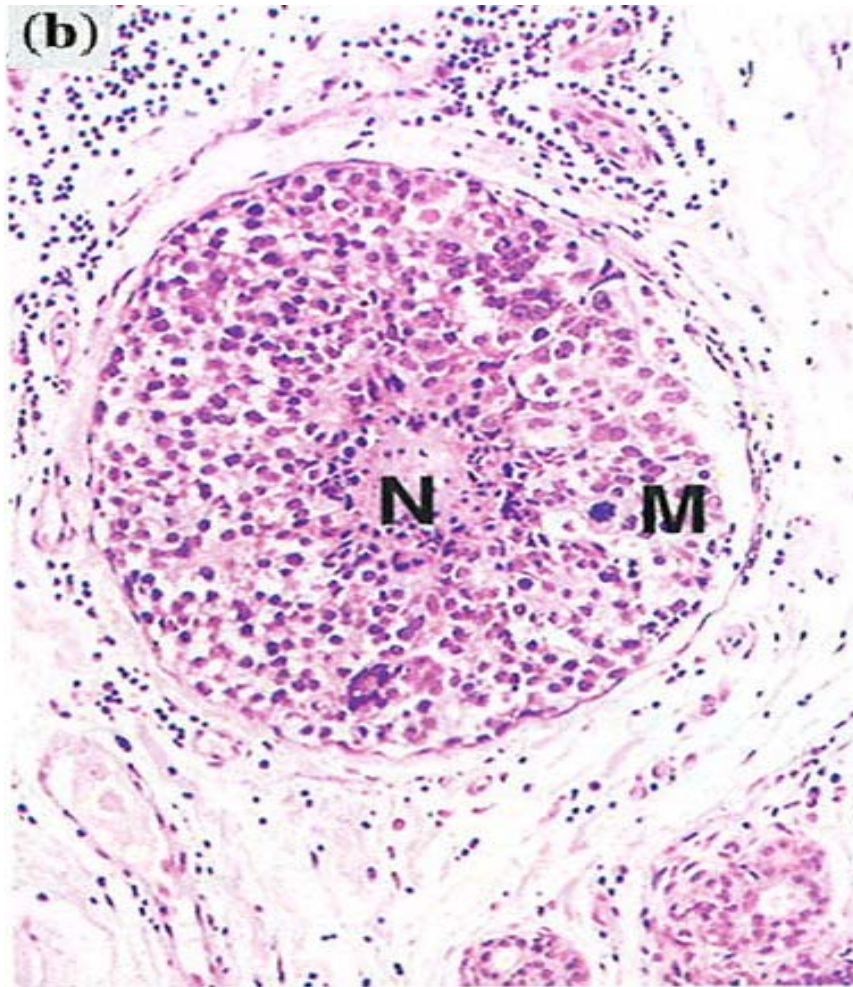
- stade I = score 3,4, 5
- stade II = score 6, 7
- stade III = score 8, 9

Le grade SBR est réalisé sur tous les types histologiques de cancer infiltrant sauf le carcinome médullaire.

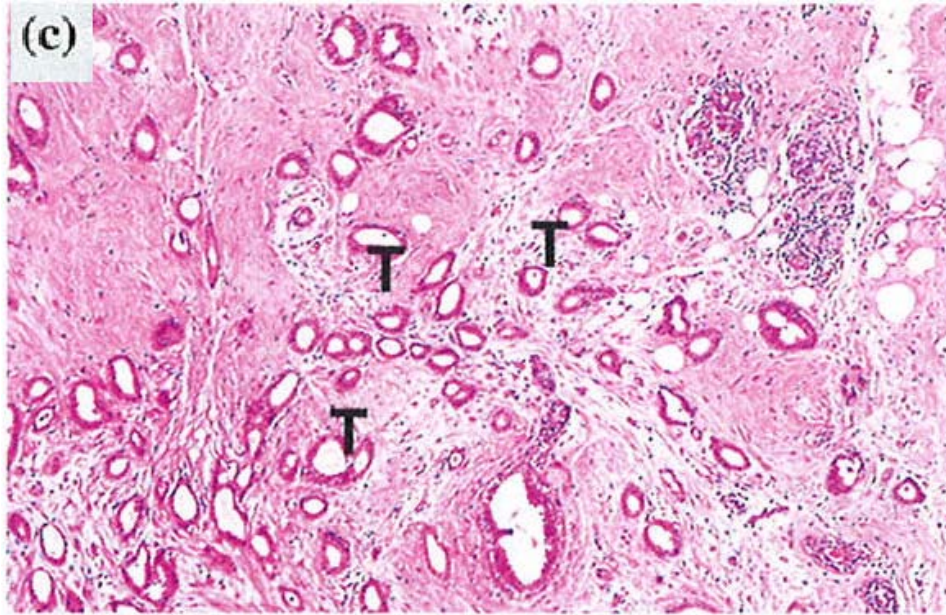
Figure 6. Coupes histologiques des différents types du cancer du sein (9).



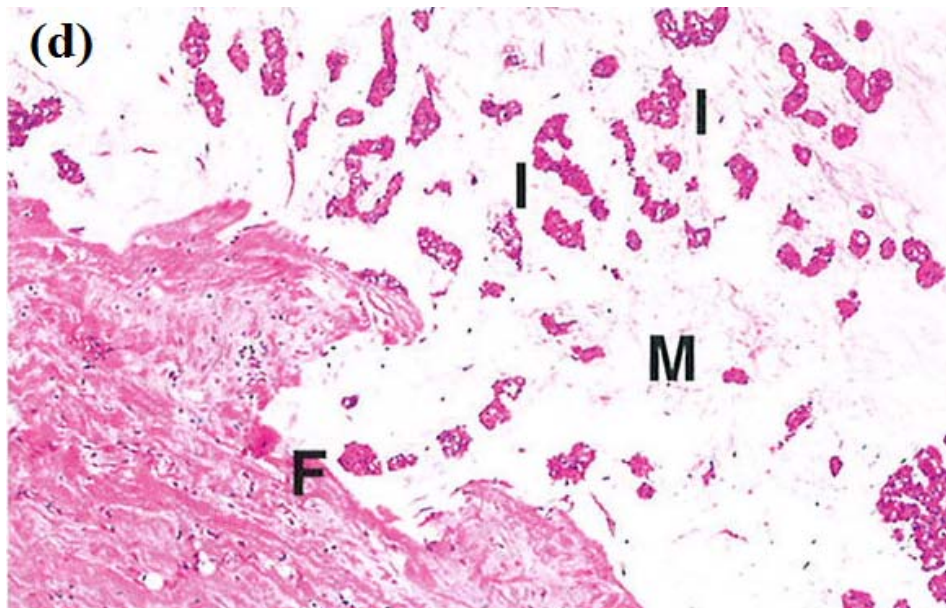
(a) montre un exemple de CIC de bas grade. Les cellules épithéliales remplissent et distendent les canaux, formant des cavités glandulaires **G** bien limitées, séparées par des « ponts » cellulaires rigides **P** ; cet aspect correspond au type cribriforme. Les cellules sont très uniformes en taille et très régulièrement disposées les unes par rapport aux autres.



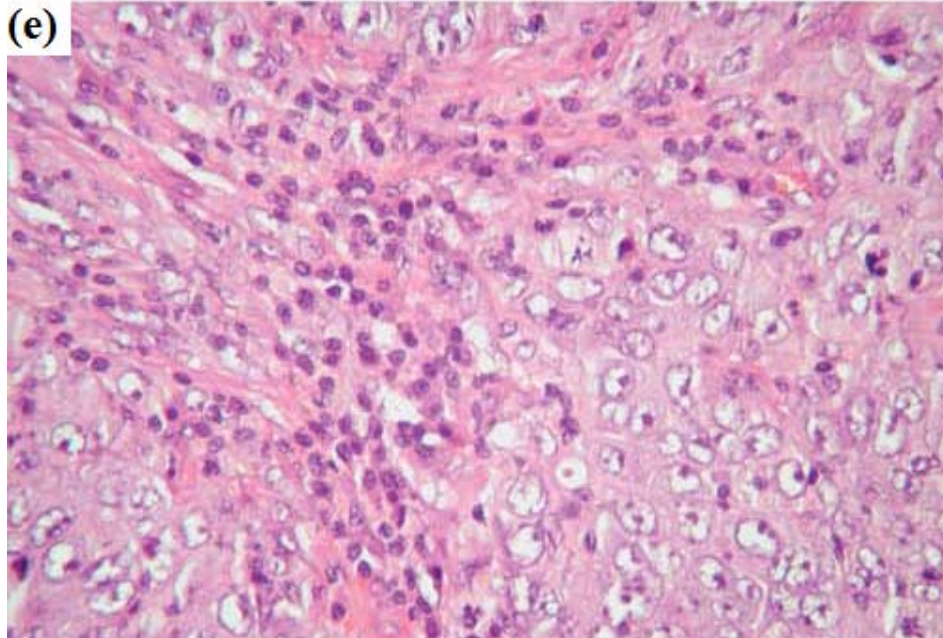
(b) montre un carcinome intra-canalair de haut grade appelé comédocarcinome. Les canaux sont le siège d'une prolifération de cellules de grande taille aux atypies cytonucléaires marquées. Les mitoses **M** sont fréquentes ainsi que la nécrose centrale **N** qui peut se calcifier.



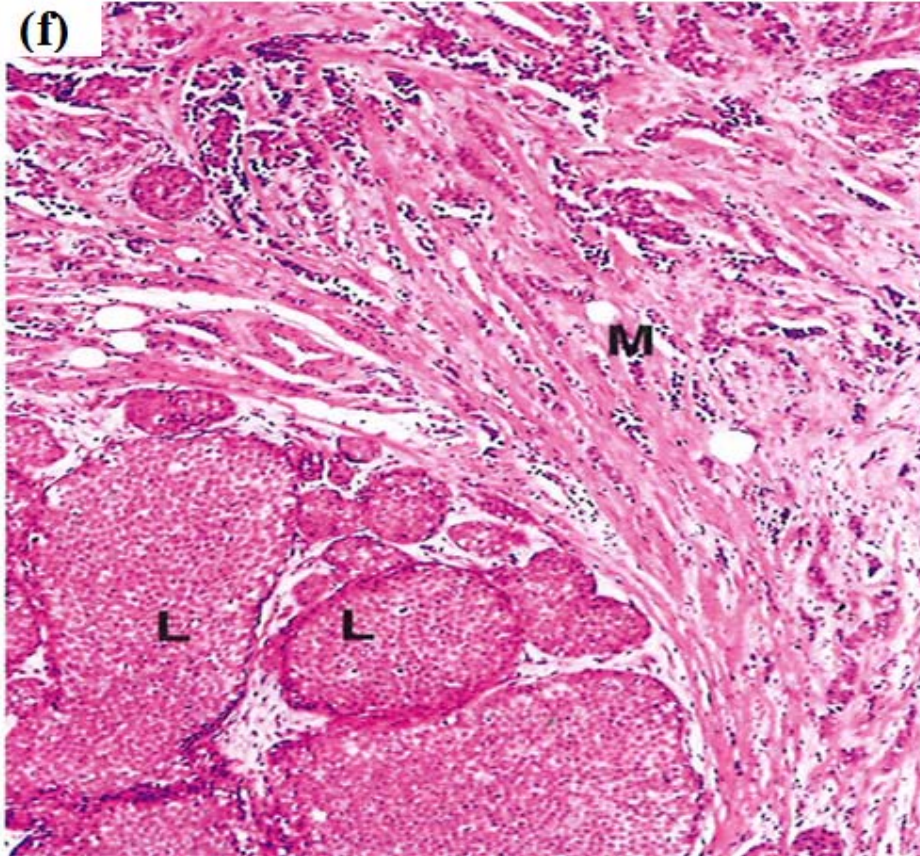
(c) montre un carcinome canalaire infiltrant type tubuleux constitué de cellules épithéliales malignes formant des structures tubuleuses **T** ou canalaire bien définies, sans îlots compacts ni infiltration par des cellules isolées



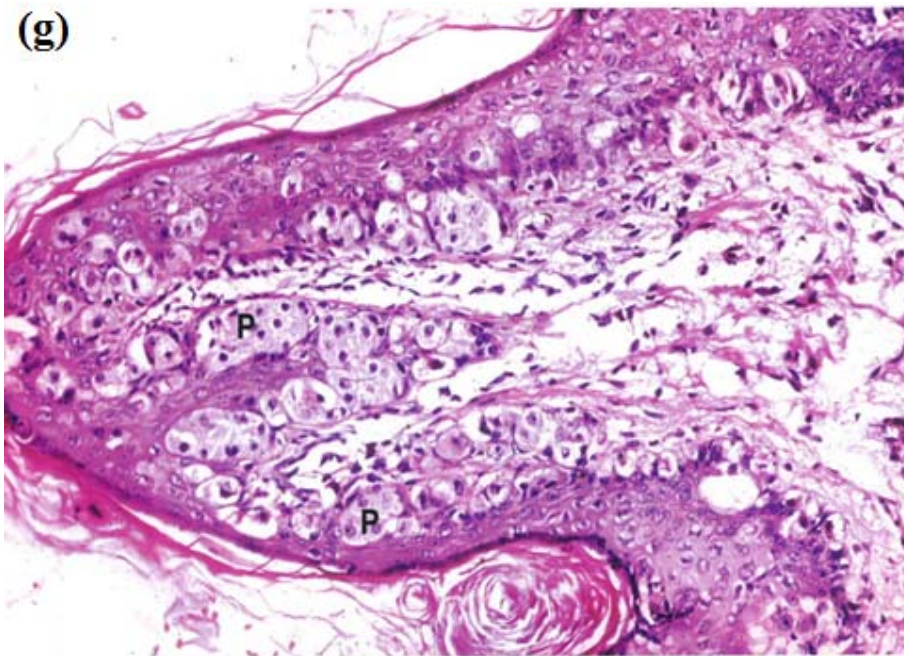
(d) montre un carcinome canalaire infiltrant type mucineux qui se caractérise par des plages de mucus **M** dans lesquels flottent des îlots **I** de cellules malignes. Il a une consistance molle à la palpation et est bien limité par une bande de tissu fibreux **F**.



(e) montre un carcinome infiltrant type médullaire où l'architecture est de type syncytiale.



(f) montre un carcinome lobulaire *in situ* dans la partie inférieure gauche de cette coupe, les lobules **L** sont distendus et remplis par de petites cellules régulièrement espacées. Dans la partie supérieure droite on observe une zone de carcinome lobulaire infiltrant où des cellules malignes **M** infiltrent le stroma sous forme de rangées en fils indiennes.



(g) montre les cellules de Paget **P** carcinomateuses mammaires qui ont diffusé le long de l'épithélium des galactophores du sein et du mamelon jusqu' 'à la surface.

I.4. Cancérogenèse mammaire

Le cancer évolue par étapes successives, qui sont espacées par des intervalles de temps variables. Chaque étape est caractérisée par des modifications génétiques.

Les cellules cancéreuses ont, au début, le même phénotype qui constitue un clone cancéreux.

Ultérieurement, les mutations s'accumulent, expliquant l'hétérogénéité des cancers du sein et la variabilité de leur évolution.

La genèse d'un cancer se distingue par l'initiation tumorale, progression et invasion.

Ceci débute avec l'action d'un facteur cancérogène qui est une transformation d'un proto-oncogène en oncogène ou délétion d'un gène suppresseur de tumeur.

Des mutations génétiques successives transforment les cellules initiées en cellules cancéreuses.

La progression probable est favorisée par des agents de promotion stimulant la prolifération cellulaire et aboutissant au phénotype cancéreux (3).

I.4.1. Facteurs de la promotion tumorale

L'étiologie du cancer du sein reste inconnue. Il n'y a pas un facteur cancérogène principal, mais la coopération de plusieurs.

Les estrogènes ont un rôle dans la carcinogenèse mammaire. Ils stimulent la prolifération des cellules, des canalicules et favorisent l'apparition de kystes mammaires (11).

L'exposition prolongée aux estrogènes constitue un facteur favorisant le développement des cancers mammaires qui sont, pour une grande part, hormono-dépendants. Deux mécanismes principaux ont été évoqués pour expliquer le rôle potentiel de ces molécules dans la carcinogenèse :

- la stimulation de la croissance des tumeurs par l'activation des récepteurs des estrogènes,

- l'implication des métabolites génotoxiques dérivés des œstrogènes dont la synthèse dépend de l'expression et de l'activité de nombreuses enzymes (12).

L'effet des œstrogènes paraît important dans la carcinogenèse mammaire mais non déterminant à lui seul. Ils agissent davantage dans la promotion tumorale qu'en tant qu'agent initiateur (3).

Le facteur nutritionnel a aussi un effet sur les femmes, dont l'alimentation est riche en matière grasse d'origine animale, ou dont le poids est supérieur à la normale. Elles auraient plus de risque à développer un cancer du sein (11).

L'excès de tissu adipeux entraîne l'augmentation de la production et celle du temps d'exposition aux hormones stéroïdiennes. Le tissu adipeux est un site de stockage et de métabolisme des stéroïdes sexuels. Les cellules graisseuses sont riches en aromatases et sont donc capables de transformer les stéroïdes d'origine surrénalienne en œstrogènes. Après la ménopause, l'aromatase des stéroïdes sexuels dans le tissu adipeux est l'une des plus considérables sources d'œstrogènes circulants (3) (11).

I.4.2. Invasion et pouvoir métastatique

Par opposition aux tumeurs bénignes, les cellules tumorales acquièrent une capacité migratoire, perdent leur cohésion cellulaire et peuvent traverser la membrane basale. Ceci est le début de l'invasion métastatique.

I.4.3. Biologie moléculaire du cancer du sein

Les étapes de la cancérisation sont sous la dépendance d'événements génétiques spontanés ou induits par des agents mutagènes.

La survenue de mutations génétiques est un phénomène fréquent au cours de la vie. L'organisme a, bien sûr, un système de réparation pour ces altérations. Ainsi la cancérisation est un phénomène complexe qui nécessite l'activation et la coopération de plusieurs oncogènes, et aussi l'action de multiples agents de promotion. Ceci afin de permettre l'expression complète du phénotype cancéreux.

I.4.3.1. Oncogènes du cancer du sein

Les plus importants sont décrits dans le (Tableau. I) ci-dessous :

Tableau I. Oncogènes les plus importants dans le cancer du sein (3).

<i>Gène c-erbB-2 ou HER-2 ou neu</i>	Il est situé sur le chromosome 17 (17q21). Il code pour un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase intrinsèque. La surexpression de ce gène se traduit par une augmentation du nombre de copies au-delà des deux normales. Le gène est amplifié dans 20 à 30 % des cancers invasifs du sein. Son activation est un signe de mauvais pronostic.
<i>Oncogène c-erbB-1</i>	Ce gène est situé sur le chromosome 7 (7q21) . Il code aussi pour une protéine transmembranaire à activité tyrosine kinase intrinsèque. Il est apparenté à un récepteur membranaire d'un facteur de croissance : l' <i>Epidermal Growth Factor</i> (EGFR) et aux récepteurs du <i>Transforming Growth Factor</i> (TGF). L'oncogène c-erbB-1 est surexprimé dans 40 à 50 % des cancers invasifs.
<i>Oncogène ras</i>	Il s'agit d'une famille de gènes produisant des protéines intervenant dans la transduction intracellulaire des signaux. Les mutations des protéines <i>ras</i> sont communes à beaucoup de cancers et observées dans 30 à 80 % des cancers du sein. Les mutations des gènes <i>ras</i> pourraient intervenir dans la progression des hyperplasies atypiques vers les cancers invasifs.
<i>Famille myc</i>	La famille des oncogènes myc agit comme un régulateur central de la prolifération et de la différenciation cellulaire. L'amplification ou la surexpression de c-myc est rapportée dans 6 à 40% des cancers du sein. La plupart des auteurs relie c-myc surexprimé aux tumeurs les plus agressives et, en particulier, à l'envahissement ganglionnaire massif et en la probabilité de récidives. l'expression de c-myc serait un marqueur de risque de cancer du sein, notamment pour les patientes ayant une mastopathie bénigne.
<i>Oncogène CYC D-1 (del-1/INT2/hst)</i>	Il est situé sur le chromosome 11 (région 11q13) qui contient les proto-oncogènes INT2 et hst1. L'oncogène CYC D-1 code pour des membres de la famille des <i>Fibroblast Growth Factor</i> (FGF). L'amplification de cet oncogène a été détectée dans 15 % des cancers du sein. L'absence d'amplification de ce gène est considérée comme un facteur de bon pronostic. Des variations de ce gène ont été observées, impliquant de nombreuses formes mutantes.

I.4.3.2. Facteurs de croissance

Ils sont sécrétés par la cellule cancéreuse mammaire ou par les cellules du stroma, en particulier les fibroblastes. Ils ont pour effet de réguler ou d'accélérer la prolifération cellulaire (Tableau II).

Tableau II. Facteurs de croissances (3).

Facteur (TGF α) ou « <i>Transforming Growth Factor alpha</i> »	C'est un facteur de croissance positive. Il augmente la prolifération de l'épithélium glandulaire mammaire normal et des cancers <i>in vitro</i> . Il se fixe sur les récepteurs à l'EGFR. TGF alpha est retrouvé dans 50 à 70 % des cancers du sein et constitue un facteur de mauvais pronostic. Le TGF alpha est présent dans les lésions précancéreuses à des taux très élevés entre 87 et 100 %. Dans les seins normaux son taux est faible, entre 0 et 8 %.
Facteur (TGF β) ou « <i>Transforming Growth Factor beta</i> »	C'est un facteur de croissance négative dont le récepteur membranaire est inconnu. Il a pour propriétés d'inhiber la prolifération et de réguler la différenciation. Il serait sécrété de manière autocrine et paracrine. TGF β a été retrouvé dans les stades initiaux des cancers invasifs. Ce facteur est associé aux tumeurs hormonodépendantes et répondant au tamoxifène.
Famille « <i>Insuline like Growth Factor 1</i> » (IGF 1)	Ce facteur de croissance positive stimule la croissance cellulaire. Il est mitogène pour les cellules cancéreuses mammaires en culture. Sécrété par le stroma avoisinant, IGF 1 induirait l'oncogène cycD1. IGF 1 est augmenté dans 40 % des cancers et dans 50 % des lésions d'hyperplasies atypiques. Il est associé aux récepteurs hormonaux positifs. Ces peptides possèdent des analogies structurales avec les produits des proto-oncogènes hst et INT.
Famille « <i>Fibroblast Growth Factor</i> » (FGF)	Ces peptides possèdent des analogies structurales avec les produits des proto-oncogènes hst et INT. FGF est mitogène pour les cellules en culture et serait impliqué dans l'angiogenèse et le pouvoir métastasant. Il agirait en induisant l'oncogène cyc-D1. Ce facteur est sécrété par les cellules myoépithéliales de la membrane basale.

I.4.3.3. Gènes suppresseurs de tumeurs (anti-oncogènes)

L'inactivation ou la perte de ces gènes et de l'expression de leur produit conduit également à la cancérisation. Le mécanisme d'oncogenèse implique l'inactivation des deux copies du gène placé sur chaque allèle. Du fait de leur récessivité, les gènes suppresseurs sont généralement impliqués dans les cancers familiaux (Tableau III). La perte d'activité des gènes suppresseurs de tumeur est observée dans les cancers du sein au niveau du gène de la protéine p53 et du gène suppresseur du rétinoblastome ou gène Rb (1).

Tableau III. Gènes suppresseurs de tumeurs (3).

<i>Gène de la p53</i>	<p>C'est un régulateur négatif de la division cellulaire. Il agit avec deux mécanismes :</p> <ul style="list-style-type: none">– c'est un facteur de transcription se liant spécifiquement à un gène cible d'une protéine antiproliférative et agit par arrêt des mitoses en phase G1,– p53 favorise l'apoptose de la cellule en cas d'échec de la réparation cellulaire. <p>L'anti-oncogène p53 est localisé sur le chromosome 17 (17 p 1-3).</p> <p>Les formes mutées de p53 sont inactives. elles sont retrouvées dans 50 % des cancers invasifs du sein.</p> <p>L'hyper-expression de p53 est un indice de mauvais pronostic et d'agressivité tumorale.</p> <p>La protéine p53 est retrouvée dans 33 à 65 % des comédocarcinomes et à des taux de 0 à 25% dans les autres cancers <i>in situ</i>.</p>
<i>Gène du rétinoblastome (RBI)</i>	<p>Le gène suppresseur des tumeurs RB1 est localisé sur le chromosome 13 q 14. Il code pour une protéine impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et dans la transcription des proto-oncogènes c-fos ou c-myc, ce qui détermine l'entrée dans la phase S du cycle cellulaire.</p> <p>Le mécanisme est la phosphorylation variable de la protéine RB. Selon l'hypo- ou l'hyper-phosphorylation de la protéine RB, on observe le blocage en G1 ou la progression dans le cycle. Des délétions du gène r-B1 ont été observées dans 10 à 15 % des cancers invasifs du sein.</p>

I.4.3.4. Gènes de prédisposition familiale

Trois gènes principaux sont impliqués dans la transmission héréditaire des cancers du sein chez la femme (Tableau IV).

Tableau IV. Gènes de prédisposition familiale (3).

<i>Gène breast cancer 1 (BRCA1)</i>	Il est localisé sur le bras long du chromosome 17 (région 17q21). Le gène BRCA1 appartiendrait à la famille des gènes suppresseurs de tumeur. Il est impliqué dans la majorité des familles ayant un cancer familial du sein ou un syndrome associant cancers du sein et de l’ovaire. Le risque pour les femmes de ces familles d’avoir un cancer est très élevé et à un âge plus jeune que le cancer sporadique. Les personnes porteuses du gène muté sont aussi exposées à un risque accru de cancer du côlon et de la prostate.
<i>Gène BRCA2</i>	Il est situé sur le chromosome 13 (région 13q12-13). Il est impliqué dans 50 % des cancers familiaux du sein. Ce gène se situerait à proximité du gène RB1.
<i>Gène TP53</i>	Il est impliqué dans le rare syndrome de Li-Fraumeni. Il est localisé sur le locus 17q13.
<i>Gène de l’ataxie-télangiectasie</i>	Le gène ATM (<i>Ataxia Telangiectasia Muted</i>) pourrait être impliqué dans des cancers sporadiques.
<i>Autres gènes</i>	D’autres gènes de susceptibilité sont en cours de recherche, et ceci dans le but d’expliquer les cas familiaux non associés aux anomalies des gènes précédents.

I.4.4. Implication des œstrogènes dans le cancer du sein

Deux mécanismes du rôle des œstrogènes dans la carcinogenèse mammaire peuvent être évoqués :

I.4.4.1. La voie médiée par les récepteurs à œstrogène

Pour transmettre son message endocrinien, l'œstrogène emprunte deux récepteurs qui lui sont spécifiques, le ER α et ER β . La réceptivité de la cellule cible est modulée par le ratio ER α et ER β (Fig.7). Le but final est l'activation des voies intracellulaires responsables de la croissance, et la différenciation des cellules mammaires (lors de la puberté, de la grossesse et de l'allaitement) (13).

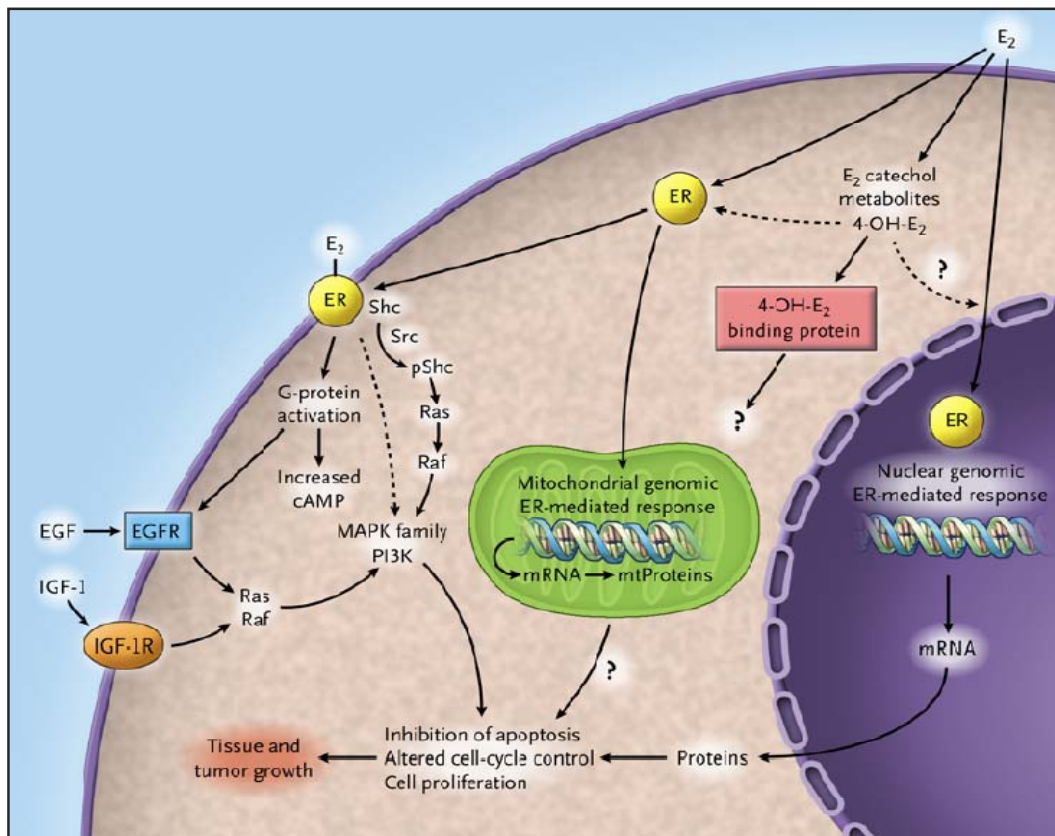


Figure 7. Voies de signalisation œstrogène-récepteur.

Les abbreviations: cAMP: *cyclic AMP*, E2: *Estradiol*, 4-OH-E2: *4-hydroxyestradiol*, ER: *Estrogen Receptor*, EGF: *Epidermal Growth Factor*, EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*, IGF-1: *Insulin-like Growth Factor 1*, IGF-1R: *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*, MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*, mRNA: *messenger RNA*, MPI3K: *phosphoinositide 3 kinase*, mtProteins: *mitochondrial Proteins* et pShc: *phosphorylated Shc protein*. Les flèches à pointillés indiquent des voies possibles (13).

I.4.4.2. Métabolisme génotoxiques des œstrogènes

Différentes voies métaboliques peuvent conduire à la synthèse de composés génotoxiques.

La voie principale conduit à la synthèse de dérivés hydroxyles de l'E2 (estradiol), les catéchols. Il s'agit du 2CE (ou 2OH-E2 pour 2OH-catechol estrogen) qui est le principal catéchol détecté à la fois dans le sang et dans l'urine, et du 4CE (ou 4OH-E2 pour 4OH-catechol estrogen) produit de façon majoritaire dans certains tissus dont les tissus mammaires (tumoraux ou non), ovarien, et l'endomètre. Ces composés sont synthétisés majoritairement par des cytochromes P450 (CYP) extra hépatiques ou hépatiques, mais aussi par d'autres enzymes comme l'aromatase, ou certaines peroxydases (Fig. 8) (12).

L'expression des différents cytochromes P450 est variable selon les tissus.

Au niveau du sein, l'œstradiol est converti en 2CE par les CYP1A et en 4CE par les CYP1B.

En second partie, Les catéchols sont transformés par la suite en semi-quinones puis en quinones. Pour empêcher cette transformation et bloquer la fonction hydroxyle active, une méthylation est assurée par les COMT (cathéchol-O-méthyl transférase). La même action de détoxification peut être assurée par les sulfotransférases et les UDP-glucuronosyl transférases. Les quinones peuvent être détoxifiées par conjugaison au glutathion intracellulaire sous l'effet des glutathion-S-transférases (GST) (14).

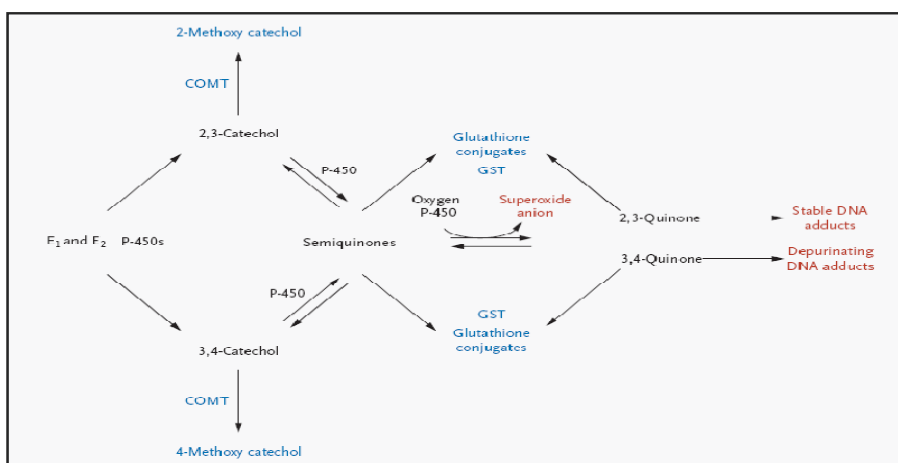


Figure 8. Métabolisme des œstrogènes : voie des catéchols.

E1: estrone, E2: estradiol, COMT; catechol O-méthyltransférase, P-450; cytochrome P-450, and GST glutathione S-transferase (13).

I.5. Enzymes de détoxification et génotoxicité

Les différentes voies métaboliques de l'œstrogène engagent les cytochromes P450 et différentes peroxydases.

Ces mêmes voies produisent des dérivés qui sont protecteurs :

- possédant des propriétés anti-oxydantes,
- inhibiteurs de l'activité angiogénique, de la prolifération et de la croissance cellulaire.

Paradoxalement, la production de dérivés d'œstrogènes réactifs peut amorcer la carcinogenèse :

- production d'adduits d'ADN,
- dégradations oxydatives par production des ROSs (*Reactive Oxygen Species*) (15).

I.5.1. Cytochrome P450

Le système d'enzymes Cytochrome P450s (CYPs) est une superfamille d'enzymes impliqués dans le métabolisme de détoxification. Leur rôle est donc crucial dans les réactions d'oxydation, d'hydroxylation, de désalkylation ou de la déshalogénéation (16).

Ces CYPs métabolisent une large gamme de substrats : des endobiotiques tels que les stéroïdes, les acides biliaires, les acides gras et les prostaglandines ; et des xénobiotiques comme les médicaments et les polluants environnementaux.

I.5.2. Nomenclature

Le nom P450 fait référence à la longueur d'onde d'absorption de ces protéines.

Chaque protéine P450 (Fig. 9) est désignée par :

- une abréviation du cytochrome p450 (CYP),
- un chiffre arabe désignant la famille,
- une lettre capitale indiquant la sous-famille,
- un autre chiffre arabe identifiant l'enzyme spécifique,
- le type d'allèle est défini par une étoile suivie d'un chiffre arabe ; le chiffre 1 si c'est l'allèle sauvage ou un autre chiffre selon le polymorphisme de CYP.

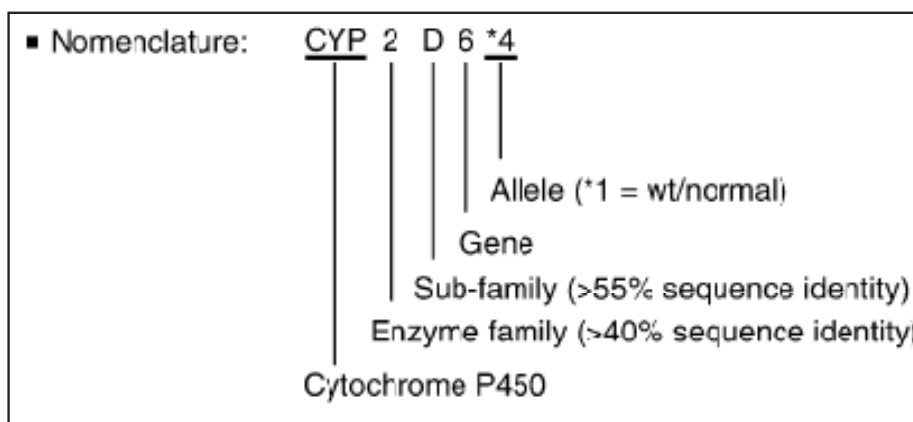


Figure 9. Nomenclature des enzymes P450 (16).

I.5.3. Localisation tissulaire

La majorité de ces enzymes est de localisation hépatique ; cela dit, d'autres membres se trouvent répartis dans différents tissus extra-hépatiques (Tableau V).

Le métabolisme des composés exogènes (xénobiotiques) est la fonction centrale des formes CYPs hépatiques, vu que le foie est la porte d'entrée de toutes les substances ingérées. Les membres CYPs extra-hépatiques sont peu pour cette même fonction.

Les organes, comme les poumons et la peau, sont la première barrière de défense pour l'organisme. Ceci explique l'expression dans ces tissus des isoformes CYPs métabolisant les xénobiotiques.

CYP 3A convertit l'œstradiol en ces dérivés catéchols dans le foie. CYP 1A métabolise l'œstradiol dans les tissus extra hépatiques. La voie principale de synthèse des catéchols met en jeu le CYP 1B1 exprimé dans la plupart des tissus à l'exception du foie (17).

Tableau V. Types et localisation tissulaire des CYPs.

<i>CYP</i>	<i>% Hepatic P450</i>	<i>Variation</i>	<i>% Involvement in drug metabolism</i>	<i>Extrahepatic location that is associated with xenobiotic metabolism</i>
1A1	<1		2.5	Lung, kidney, GI tract, skin, placenta and lymphocytes
1A2	~13	40 fold	8.2	?
1B1	<1		?	Skin, kidney, mammary, prostate, uterus, fetus
2A6	~4	30–100 fold	2.5	Lung, nasal membrane
2B6	<1	50 fold	3.4	GI tract, lung
2C8, 2C9	~18	25–100 fold	15.8	GI tract, larynx, lung
2C18, 2C19	~1	25–100 fold	8.3	GI tract, larynx, lung
2D6	≤2.5	1000 fold	18.8	GI tract
2E1	≤1	20 fold	4.1	Lung, placenta
2F1	<1	~1.3		Lung, placenta
3A4, 3A5	≤28	20 fold	34.1	GI tract, placenta, fetus
4A11	?		?	Kidney
4B1	?		?	Lung, placenta

I.5.4. Substrats et fonction des CYPs

Les P450s ont une large gamme de substrats et une diversité dans leur réaction (Tableau VI). Aussi ils ont une spécificité et une sélectivité pour certains substrats. Chez les mammifères, les fonctions de ces enzymes incluent :

- la biosynthèse des hormones stéroïdes,
- le métabolisme des prostaglandines,
- le métabolisme des acides gras,
- l'oxydation des lipides,
- l'hydrolyse de la vitamine D3.

Le métabolisme des stéroïdes est décrit comme la principale fonction endogène des P450s (17).

Tableau VI. Quelques fonctions des différents CYPs.

CYP	Fonctions
1A1	estrogen hydroxylation
1A2	estradiol 2-hydroxylation
1A3	estradiol 4-hydroxylation
2E1	acetone and acetol oxidation
4B1	lauric acid ω -hydroxylation
4F3	leukotriene B4 ω -hydroxylation
5	thromboxane synthesis
7	cholesterol 7 α -hydroxylation
11A1	cholesterol side-chain cleavage
11B1	progesterone 11 β - hydroxylation
11B2	aldocorticoid synthesis
17	pregnenolone 17 α -hydroxylation
19	androgen aromatization
21	progesterone 21 -hydroxylation
24	steroid 24-hydroxylation
27	cholesterol 27-hydroxylation

Les substrats exogènes (xénobiotiques) des CYP 1A sont essentiellement polycycliques.

Les membres CYP 1A1, CYP 1A2 et CYP 1B1 de la famille CYP 1 sont des enzymes inductibles par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et par leurs dérivés azotés, ainsi que d'autres polluants environnementaux comme le 2, 3, 7, 8-tétrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) (Tableau VII).

Les substrats du CYP 1A1 sont hydrophobes du fait de leur structure polycyclique.

Tableau VII. Exemples de quelques substrats des CYPS (17).

<i>Compound</i>	
Acetanilide	α -Naphthylamine
2-Aminoanthracene	β -Naphthylamine
4-Aminobiphenyl	Phenacetin
Benzo(a)pyrene	PhIP
Caffeine	IQ
Dibenz(a,h)anthracene	Tacrine
Ellipticine (inhibitor)	7-Methoxyresorufin
Estradiol	Furafylline (inhibitor)
3-Methylcholanthrene	Paracetamol
β -Naphthoflavone	6-Aminochrysene

I.6. Génétique du CYP1A1

I.6.1. Gène et polymorphismes

Le gène CYP1A1 est sur le chromosome 15q22-q24. Il contient 7 exons et 6 introns. Il s'étale sur 5,810 paires de base. Il est localisé à 25 kb du CYP 1A2 (Fig. 10).

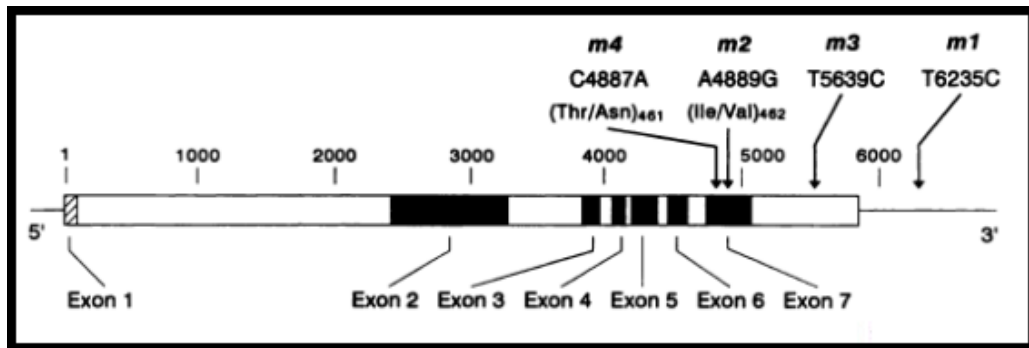


Figure 10. Localisation schématique des mutations m1, m2, m3 et m4 sur le gène CYP1A1. Les numéros attribués aux mutations correspondent à leur découverte chronologique (18).

Ce gène code pour un membre de la superfamille des cytochromes P450. Cette protéine est une monooxygénase impliquée dans le métabolisme xénobiotique et dans celui du cholestérol, des stéroïdes et d'autres lipides.

Cette protéine est localisée dans le réticulum endoplasmique. Son expression est induite par des hydrocarbures polycycliques aromatiques dit PAHs.

Les intermédiaires métaboliques des CYPs ont un potentiel carcinogène.

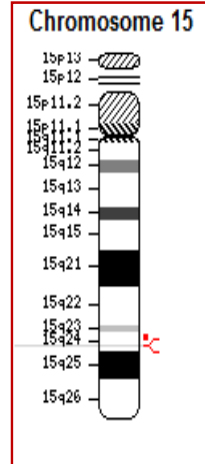
Ce gène est sous le contrôle d'un facteur de transcription, dit le récepteur des hydrocarbures aromatiques AHR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*).

L'expression de CYP 1A1 est à prédominance extra-hépatique.

Plusieurs polymorphismes (variants alléliques) de CYP 1A1 ont été décrits dans la littérature ; quatre d'entre eux sont les plus étudiés pour leur implication dans le cancer (Tableau VIII et IX) (19).

Tableau VIII. Carte ID de CYP1A1.

Nom officiel			
Cytochrome P450, famille 1, sous-famille A, polypeptide 1			
Identifiants (IDs) chez l'espèce humaine			
Symbole officiel	CYP1A1	Symboles synonymes	AHH; AHRR; CP11; CYP1; P1-450; P450-C; P450DX
IDs dans les différentes bases de données			
Entrez² :	<u>1543</u>		
HGNC³ :	<u>2595</u>		
Ensembl⁴ :	<u>ENSG00000140465</u>		
HPRD :	<u>00148</u>		
MIM⁵ :	<u>108330</u>		
UniProt⁶ :	<u>P04798</u>		
RefSeq (mRNA)⁷ :	<u>NM000499</u>		
RefSeq (proteine)⁸ :	<u>NP000490</u>		
Localisation			
<u>chromosome : 15 ; Localisation : 15q24.1</u>			
Localisation (UCSC) : <u>chr15:72798943-72802491</u>			



²

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=default&rn=1&list_uids=1543

³ http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=2595

⁴ http://www.hprd.org/summary?hprd_id=00148&isoform_id=00148_1&isoform_name=Isoform_1

⁵ <http://omim.org/entry/108330>

⁶ <http://www.uniprot.org/uniprot/P04798>

⁷ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_000499

⁸ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000490

Tableau IX. Descriptif des polymorphismes de CYP1A1 (20).

Nomenclature	localisation	Point de la mutation	Changement dans la séquence protéique	Changement de la restriction	<i>single nucleotide polymorphism (SNP) identifier</i>
CYP1A1*2 ou CYP1A1*2A : M1	3' région non codante : en aval du site de polyadénylation	Substitution de (T) en (C) : 3801T>C	Aucun	Apparition d'un nouveau site de restriction MspI	rs4646903
CYP1A1*2C : M2	exon 7 codon 462	Substitution de (A) en (G) : 2455A>G	Substitution Isoleucine→valine : Ile462Val (<i>heme binding region</i>)	Disparition d'un site de restriction BsrDI	rs1048943
CYP1A1*3: M3	3' région non codante : en amont du site de polyadénylation.	thymine (T) to cytosine (C) 3205T>C	Aucun	Apparition d'un nouveau site de restriction MspI	---
CYP1A1*4: M4	Exon 7 codon 461	Substitution de (C) en (A) : 2453C>A	substitution threonine → asparagine: Thr461Asn (<i>heme binding region</i>)	Disparition d'un site de restriction BsaI	rs1799814
L'allèle sauvage : CYP1A1*1 ou CYP1A1*1 A.					

II. Partie expérimentale

II.1. Matériels

II.1.1. Matériels biologique

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

- 15 blocs choisies et diagnostiqués comme carcinomateux,
- 14 cas contrôles sont des échantillons diagnostiqués bénins (adénofibromes, fibroses).

II.1.2. Réactifs chimiques

- Xylène
- 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).
- NaCl saturé a 6M
- Isopropanol
- Tris 10 mM
- EDTA 0,5 mM
- Amorces sens (S) et antisens (A) (10 μ M, OZYME, France)
- dNTP (10 μ M, Takara, Japan)
- 0.2 μ l Taq polymerase (25 U/ml, Takara, Japan)
- Tampon de PCR (Takara, Japan)
- H₂O distillé.
- Enzymes de restriction (*Sph* I, *Msp* I, *Bsa* I et *Bsr* DI, Takara, Japan)
- Tampon de restriction (tampon n°2 et n°4 de *New England Biolabs*)
- Agarose (tébu, France)
- Tampon TAE 10X (Tris, Acétate, EDTA)
- BET (bromure d'éthidium) (Sigma, France)
- Bleu de bromophénol (bleu de chargement) (Sigma, France)

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation des échantillons

Après l'exérèse, les pièces opératoires sont conservées dans le formaldéhyde 10% et après l'étude macroscopique des anatomopathologistes, des prélèvements sont effectués dans des cassettes. Le paraffinage est effectué dans un automate. Dans ce dernier s'effectue une fixation au Bouin, une déshydratation dans différentes dilutions d'alcools et enfin le paraffinage et l'inclusion en paraffine sous forme de blocs.

Des sections de 20 μm de chaque bloc ont été prises pour être déparaffinées afin d'extraire l'ADN génomique.

II.2.1.1. Déparaffinage des échantillons

L'échantillon a été mis dans un tube eppendorf 1.5 ml en présence de 800 μl de xylène sous la hotte, après agitation par retournement pendant 15mn. Le tube a été centrifugé à une vitesse maximale (14.000 tpm). Une fois le xylène a été enlevé minutieusement et sans perturbation du culot, nous avons répété le lavage au xylène 3 fois en vérifiant que la paraffine a bien disparu.

La réhydratation a été réalisée en trois étapes avec différentes dilutions d'alcools : au culot cellulaire, nous avons ajouté 800 μl d'éthanol à 100%, après vortex et centrifugation (14.000 tpm) pendant 3mn, l'éthanol a été éliminé. Les deux autres étapes ont été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment, mais en présence d'éthanol, respectivement, à 70% et à 50%.

Enfin, le culot a été séché pendant 5mn, tube renversé et à température ambiante.

II.2.1.2. Extraction d'ADN

Les tissus ont été broyés grâce à un pilon afin de disperser les cellules. L'ADN a été extrait à partir de ces sections de tissus mammaires déparaffinés, dans le but de réaliser des PCR-RFLP sur chaque ADN extrait. Chaque échantillon a été sectionné grâce à un microtome manuel (des sections de 20 μm d'épaisseur au total).

Dans un tube Eppendorf 1.5 ml, nous avons mis les sections de tissus avec 315 µl de tampon de lyse et 40 µl de protéinase K, ensuite les tubes ont été incubés à 55° C pendant 1h30 et vortexés pendant 5mn.

L'ADN est lavé par ajout de 100 µl d'NaCl saturé à 6M/échantillon. Après un vortex pendant 6mn, les tubes ont été centrifugés pendant 10 mn à 13000 trs/mn. Le surnageant (environ 290 µl) a été pipeté en prenant garde à ne pas secouer les tubes afin de ne pas décoller le culot au fond.

La précipitation de l'ADN a été réalisée grâce au transfert du surnageant dans des tubes propres en présence de 200 µl d'isopropanol. Après un mélange par retournement, tout en secouant les tubes, une pelote d'ADN bien compacte et blanche est observée. Les tubes ont été ensuite centrifugés pendant 10 mn à la vitesse maximale. Et enfin, le surnageant a été délicatement collecté avec différentes pipettes. Les culots d'ADN ont été lavés avec 500 µl d'éthanol à 70% et recentrifugés pendant quelques secondes. Une étape d'élimination complète de l'éthanol a été optimisée. Les culots ont été séchés pendant 30 mn à température ambiante, ensuite resuspendus dans du TE (Tris 10mM, EDTA 0,5mM).

Enfin, l'ADN a été quantifié, aliquoté et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

II.2.1.3. Quantification de l'ADN et appréciation de la digestibilité

Les acides nucléiques absorbent à 260 nm. Cette absorption est proportionnelle à la concentration de l'ADN. Nous avons mesuré la densité optique à 260 nm et 280 nm pour chaque échantillon.

Le rapport DO_{260} / DO_{280} nm a été établi pour chaque échantillon. Le degré de pureté de l'ADN a été évalué.

II.2.2. PCR-RFLP

Après extraction de l'ADN, l'utilisation de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permet d'amplifier les séquences d'intérêts m1 m3 (séquence porteuse du site de la mutation m1 et m3) et m2 m4 puis de réaliser la

technique du polymorphisme des longueurs de fragments de restriction ou RFLP sur les produits de PCR. Une fois digérés par les endonucléases de restriction, ces produits de PCR sont ensuite soumis à une migration sur un gel d'agarose à 1.5 %. Les polymorphismes de la position et du nombre de bande sont visualisés par une réaction colorée avec du BET (Bromure d'éthidium) (Fig. 11).

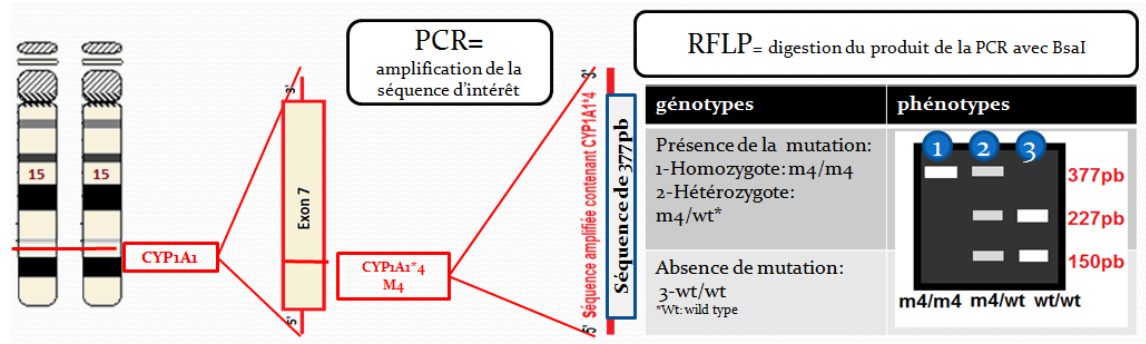


Figure 11. Illustration du profil RFLP pour les variants CYP1A1*4 (m4).

II.2.2.1. Amplification par PCR :

Cette technique permet d'amplifier *in vitro* les régions d'intérêts dans une molécule d'ADN, afin d'obtenir ces séquences en quantité suffisante pour l'analyse RFLP. Les amorces utilisées ont été choisies pour délimiter et amplifier les régions m1 m3 et m2 m4 (Tableau X). La spécificité de ces amorces a été préalablement validée par des études ultérieures (20-22), c'est-à-dire l'amplification donne une seule bande de taille attendue pour chaque amplicon.

Tableau X. Amorces sens (S) et antisens (A) choisies.

	MT ⁹	Séquence des amorces		Enzyme
m1 et m3	60.4 C	S	GGCTGAGCAATCTGACCCTA	<i>Msp</i> I et <i>Sph</i> I
	64.1 C	A	GGCCCCAACTACTCAGAGGCT	
m2 et m4	59.9 C	S	GCA TTG ATC CTC CTGTCC AT	<i>Bsr</i> DI pour M2 & <i>Bsa</i> I pour M4
	60.2 C	A	AGG CAT GCT TCA TGGTTA GC	

⁹ MT : *Melting Temperature* (température de fusion)

Le mélange réactionnel a été réalisé dans un volume final de 25 µl contenant 4.5 µl ADN génomique (1µg/µl), 0.5 µl de chaque amorce, sens (S) et antisens (A) (10 µM), 0.5 µl mélange de dNTP (10µM), 0.2 µl de la *Taq* polymérase (25U/µl), 2 µl du tampon de PCR et 16.8 µl d'H₂O .

Les conditions d'amplification par PCR sont présentées dans le (Tableau XI).

Tableau XI. Conditions d'amplification.

95°C pendant 5 minutes	
95°C 30 secondes	30 cycles
60°C 45 secondes	
72°C 1 minute.	
72°C 5 minute	

La spécificité des amorces et les produits d'amplifications ont été vérifiés en déposant 5 µl de produits de PCR sur un gel d'agarose à 1,5 % suivis d'une révélation sous UV. Les séquences amplifiées de taille 737 pb, 371 pb ont été obtenues (FIG 12).

II.2.2.2. Etablissement du profil de restriction RFLP :

L'ADN est soumis à une digestion enzymatique clivant la molécule à des endroits précis appelés sites de restriction.

Toute modification par mutation dans la séquence du site de restriction pourrait entraîner ou empêcher l'action de l'enzyme. Ces modifications de l'ADN sont détectées par des variations du nombre et de la longueur des fragments de restriction obtenus après digestion enzymatique (Tableau XII).

Tableau XII. Analyse des polymorphismes CYP1A1 avec les enzymes de restriction.

Polymorphisme (allèle)	Localisation	Point de la mutation	Changement dans la restriction	Enzyme de restriction	Fragments attendus (pb)
CYP1A1*2A(M1)	3' région non codante : en aval du site de polyadenylation	Substitution de (T) en (C) : 3801T>C	Apparition d'un nouveau site de restriction <i>Msp</i> I	<i>Msp</i> I	Allèle sauvage: 408 Allèle Muté: 362
CYP1A1*2C(M2)	exon 7 codon 462	Substitution de (A) en (G) : 2455A>G	Disparition d'un site de restriction <i>Bsr</i> DI	<i>Bsr</i> DI	Allèle sauvage: 237 + 140. Allèle M2: 377.
CYP1A1*3 (M3)	3' région non codante : en amont du site de polyadenylation.	thymine (T) en cytosine (C) 3205T>C	Apparition d'un nouveau site de restriction <i>Msp</i> I	<i>Msp</i> I	Allèle sauvage:331 Allèle Muté: 266
CYP1A1*4 (M4)	Exon 7 codon 461	Substitution de (C) en (A) : 2453C>A	Disparition d'un site de restriction <i>Bsa</i> I	<i>Bsa</i> I	Allèle Sauvage: 227+ 150. Allèle M4: 377.

Les conditions de restriction pour chaque enzyme sont présentées dans le (Tableau XIII) ci-dessous :

Tableau XIII. Conditions fonctionnelles des enzymes de restriction.

Conditions des restrictions			
	<u>Site de restriction</u>	<u>Condition de restriction</u>	<u>Condition de dénaturation</u>
<i>Msp</i> I	...C/CGG... ...GGC/C...	37° C	<i>Msp</i> I peut être dénaturé à 65°C pendant 15 minutes.
<i>Sph</i> I	...GCATG/C... ...C/GTACG...	37° C	<i>Sph</i> I peut être dénaturé à 65°C pendant 20 minutes.
<i>Bsr</i> DI	...GCAATGNN/N... ...CGTTAC/NNN...	65° C	<i>Bsr</i> DI peut être dénaturé à 80°C pendant 20 minutes.
<i>Bsa</i> I	...GGTCTCN/NNNNN... ...CCAGAGNNNNN/N...	50°C	<i>Bsa</i> I peut être dénaturé à 65°C pendant 20 minutes.

La restriction s'est déroulée dans des mélanges réactionnels avec un volume final de 20 μ l.

Pour l'analyse des mutations m1 et m3, une double digestion avec *Sph* I et *Msp* I a été optimisée : 1 μ g de produits d'amplification (séquence m1 m3 de 737 pb) est mis en présence de 2 μ l de tampon d'incubation 10X fourni avec l'enzyme et de 1 μ l de chaque enzyme *Sph* I et *Msp* I. Le volume final a été ajusté avec de l'eau distillé stérile jusqu'à 20 μ l. L'incubation s'est déroulée à 37°C pendant une heure, suivie d'une dénaturation pendant 20 mn à 65°C.

Pour l'analyse de m2 : 1 μ g de produits d'amplification (séquence m2 m4 de 371 pb) est mis en présence de 2 μ l de tampon d'incubation 10X, de 1 μ l d'enzyme *Bsr* DI. Le volume réactionnel total de 20 μ l a été ajusté avec de l'eau distillée stérile. Après une incubation dans un bain marie à 65° C pendant une heure une dénaturation enzymatique a été faite à 80° C.

Pour l'analyse de m4 : on a mis 1 μ g de produits d'amplification (séquence m2 m4 de 371pb) avec 2 μ l de tampon d'incubation 10X, d'1 μ l d'enzyme *Bsr* DI et on a complété avec de l'eau distillé stérile jusqu'à 20 μ l. L'incubation s'est déroulée à 50° C pendant une heure suivie d'une dénaturation enzymatique à 65° C.

Ces fragments de restriction (Tableau XII et Fig. 14) ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5 %, en présence de tampon de migration TAE 1X. La visualisation des produits de restriction a été réalisée sous U.V suite à une coloration au BET. Le résultat est concrétisé par une prise de photo du gel contenant les produits colorés.

La démarche expérimentale détaillée a été conduite comme suit : une fois le gel est solidifié et déposé dans la cuve d'électrophorèse, les échantillons ont été mélangés avec du bleu de bromophénol (bleu de chargement) et déposés dans les puits appropriés.

Les conditions de migrations : 100 volts pendant 1h30.

II.3. Résultats

II.3.1. Caractéristiques des patientes

Tableau XIV. Types et âge moyen des cas analysés.

	Cas cancéreux	Cas contrôle bénin
effectifs	15	14
Age moyen	50 ans	33 ans

Tableau XV. Types histologiques des échantillons analysés.

	Types	Effectifs (N=29)
Cas contrôles	Adénofibromes	11
	Dystrophies Fibrokystiques	3
Cas cancéreux	Carcinomes	15
	CCI ¹⁰	10
	CLI ¹¹	2
	Carcinome colloïde	1

¹⁰ Carcinome canalaire infiltrant

¹¹ Carcinome lobulaire infiltrant

II.3.2. Profil électrophorétique des séquences amplifiées

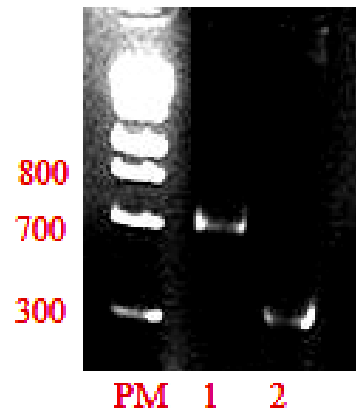


Figure 12. Analyse des produits PCR obtenus

1 : séquence de 737 pb qui porte les mutations m1 et m3.

2: séquence de 371 pb qui porte les mutations m2 et m4.

II.3.3. Profils des produits de PCR digérés par les endonucléases de restrictions appropriées :

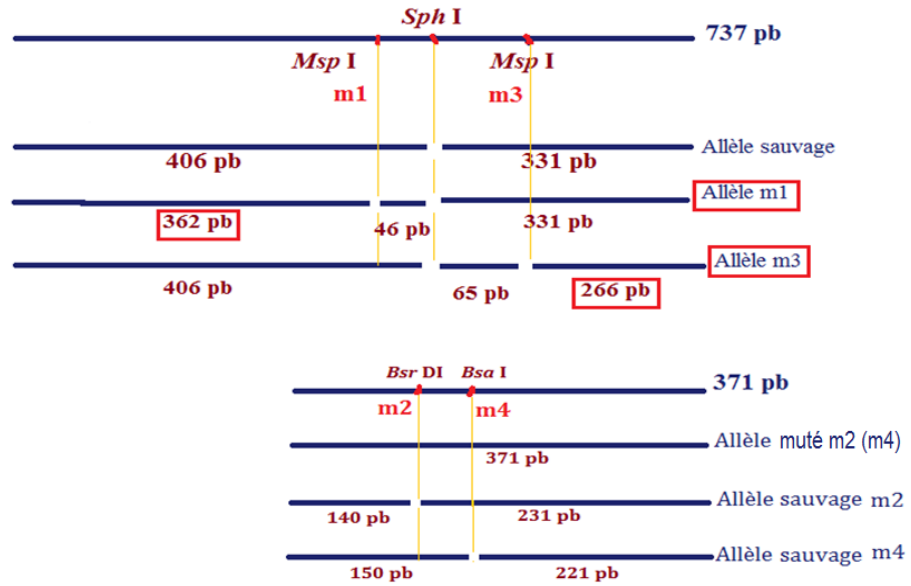


Figure 13. Cartographie de restriction et caractérisation de l'apparition ou disparition des sites de restrictions pour différentes enzymes.

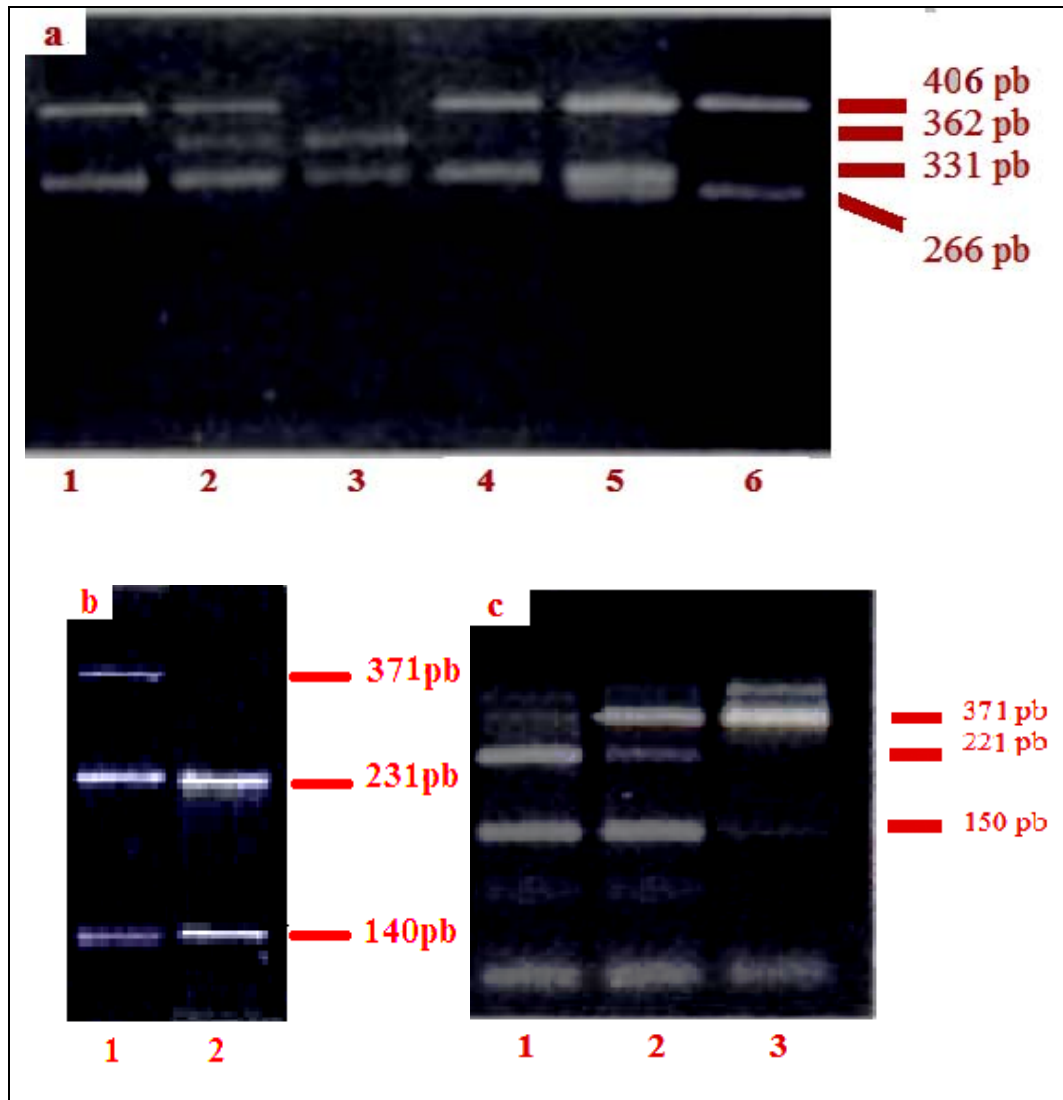


Figure 14. Profils RFLP obtenus

- a) Profil d'analyse de m1 et m3 : la ligne 1 : homozygote sauvage pour m1, ligne 2 : hétérozygote m1 et ligne 3 : homozygote m1. La ligne 4: homozygote sauvage pour m3, ligne 5 : hétérozygote m3 et ligne 6 : homozygote m3. L'allèle m1 est caractérisé par la bande 362 pb et l'allèle m3 est caractérisé par la bande 266 pb. Notons que les bandes de 46 pb et 65 pb (Fig.14) ne sont pas visualisés dans ces conditions d'électrophorèse.
- b) Profil d'analyse de m2 : la ligne 1 : hétérozygote m2 et la ligne 2 : homozygote sauvage.
- c) Profil d'analyse de m4: la ligne 1 : homozygote sauvage pour m4, ligne 2 : hétérozygote m4 et ligne 3 : homozygote m4.

II.3.4. Fréquences des variants CYP et analyse statistiques

Tableau XVI. Résultats statistiques.

	Patientes N= 15	Cas control N= 14	OR (95% CI)	P valeur et signification statistique
M1 Fréquences des génotypes Effectif (fréquence)				
Wt/Wt	12 (0.8)	13 (0.9)	0,3077 [0.02803 à 3.378]	0,6423 (non significatif alpha<0.05)
M1/Wt	2 (0.13)	1 (0.07)		
M1/M1	1 (0.06)	0		
M2 Fréquences des génotypes Effectif (fréquence)				
Wt/Wt	12 (0.8)	14 (1)	0,1232 [0.005780 à 2.624]	0,2472 (non significatif alpha<0.05)
M2/Wt	3 (0.2)	0		
M2/M2	0	0		
M3 Fréquences des génotypes Effectif (fréquence)				
Wt/Wt	15 (1)	12 (0.85)	6,200 [0.2718 à 141.4]	0,2241 (non significatif alpha<0.05)
M3/Wt	0	1 (0.07)		
M3/M3	0	1 (0.07)		
M4 Fréquences des génotypes Effectif (fréquence)				
Wt/Wt	11 (0.73)	12 (0.85)	0,4583 [0.06961 à 3.018]	0,7160 (non significatif alpha<0.05)
M4/Wt	2 (0.13)	2 (0.14)		
M4/M4	2 (0.13)	0		

On a réalisé une analyse statistique Chi2 avec correction de Yates avec calcul des Odds Ratio, en utilisant GraphPadPrism version 5.00 pour Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

II.4. Discussion

Notre étude s'est basée sur la mise en place d'une technique simple et fiable pour la détection des différents variants alléliques du CYP1A1 (CYP1A1*2A (m1), CYP1A1*2C (m2), CYP1A1*3 (m3) et CYP1A1*4 (m4) sur des échantillons de tissus pathologiques (carcinomes et pathologies bénignes) conservés dans la paraffine.

L'objectif a été d'optimiser une technique de PCR-RFLP à partir de blocs de paraffine conservés dans la tumorotheque du laboratoire d'anatomopathologie du CHU-Batna.

II.4.1. Discussion analytique

II.4.1.1. prélèvements

L'avantage des échantillons conservés dans la paraffine permet d'augmenter le nombre de cas étudiés et d'étendre notre étude sur un intervalle de temps large, d'un autre côté la fixation dans le formaldéhyde et surtout dans le bouin n'est pas en faveur de l'extraction des acides nucléiques tels que l'ADN et encore moins des ARNs (23-25).

Les étapes de fixations suivies par le laboratoire avant l'inclusion en paraffine diminue considérablement le rendement en ADN génomique extrait. Pour les échantillons collectés, la fixation au bouin a été abandonnée définitivement.

En premier lieu on a optimisé la technique de déparaffinage et digestion des tissus en faveur de l'extraction de l'ADN pour un rendement optimale. Les modifications que nous avons apportées au protocole de déparaffinage du laboratoire et au protocole de Pikor L.A et *al.* (26) à permis d'augmenter le rendement en ADN génomique.

II.4.1.2. Optimisation de la PCR-RFLP

Une stratégie de notre analyse PCR-RFLP a été établie avant toute manipulation. Ceci a consisté à préparer des mélanges pré-réactionnels pour minimiser le nombre de manipulations et ainsi d'éviter les erreurs, la perte en matériel biologique (surtout pour les petites quantités d'ADN) et les contaminations potentielles.

Les protocoles issus de la littérature (21) (22), expérimentés au début, n'ont pas donnés les résultats escomptés ; on a dû optimiser les conditions d'amplification pour la PCR :

- la température d'hybridations des amorces a été ajustée à 60°C,
- diminutions du nombre de cycles à 30,
- limitation de la quantité d'ADN à 0.2 ug/échantillon.

Les produits amplifiés par PCR, nous ont donnés les deux bandes cibles individualisées et bien différenciées après détection en présences des UV lors de l'électrophorèse contrôle (Fig. 13). Une absence d'amplification de bandes parasites était la règle.

II.4.2. Discussion des résultats

L'étiologie des cancers mammaires ne dépend pas seulement des facteurs environnementaux, elle est multifactorielle et varie entre les populations (19).

Les variants alléliques de CYP1A1 pourraient jouer un rôle dans la modification du risque du cancer du sein (19)(27).

Selon des études réalisées, le variant m1 est plus prépondérant que le m2, ils ont été observés plus chez les populations asiatiques que chez les populations caucasiennes (19). M2 pourrait être associé au cancer du sein chez les caucasiens (9)(10). Le m3 a été rapporté chez les populations africaines mais aucune association significative avec le cancer du sein n'a été décrite (22).

Dans notre étude, quelques cas d'homozygotie ont été mis en évidence dans les carcinomes mammaires, 6% des cas homozygotes m1 et 13% homozygotes m4. Un cas homozygote m3 était décelé parmi les cas contrôles bénins.

Pour apprécier le lien entre les différents variants alléliques et la modification du risque du cancer du sein, on a procédé au calcul des rapports de dépendance (ORs) et le test Chi2 (avec correction de Yates).

L'occurrence des différents variants n'a pas de lien significatif avec le risque du cancer du sein.

Dans le but d'exploiter au mieux nos résultats une étude portant sur un nombre plus large de prélèvements pour chaque type pathologique se voit nécessaire afin de permettre une interprétation statistique éligible.

II.4.3. Perspectives :

Nous proposons pour la continuité du travail expérimental:

- valider des résultats obtenus par ré-amplification des bandes mutées sur l'ensemble des échantillons testés ainsi qu'une analyse par séquençage pour confirmer les substitutions des bases nucléotidiques observées dans nos résultats,
- compléter ce travail par l'étude des associations entre les différents polymorphismes (étude des haplotypes),
- analyser d'autres polymorphismes pour d'autres enzymes impliquées dans le métabolisme des œstrogènes et qui étaient rapportés impliqué dans le cancer du sein, tel que : la glutathione S-transferase (GST) (28) (29), COMT, CYP1B1 (30) (31) et CYP17 (32).

II.5. Conclusion

Le but de notre travail était une optimisation et une validation d'une technique de PCR-RFLP afin d'étudier des polymorphismes génétiques CYP 1A1 associés au cancer du sein, en comparant les échantillons pathologiques et bénins. Le lien entre m1, m2, m3 et m4 avec le cancer du sein n'est pas consistant vu le nombre restreint des échantillons étudiés.

Un séquençage permettrait d'identifier les variants obtenus (essentiellement les homozygotes) lors de notre analyse.

Vu l'intérêt que porte la recherche sur l'implication du Cytochrome P450 dans le cancer du sein, ainsi que la mise au point de nouveaux biomarqueurs diagnostiques précoces, des études complémentaires du profil RFLP des variants CYP 1A1*2A (m1), CYP 1A1*2C (m2), CYP 1A1*3 (m3) et CYP 1A1*4 (m4) sur un échantillonnage étendu de la population Algérienne, sont nécessaires.

Liste des Abréviations

2CE	2OH-catechol estrogen
4CE	4OH-catechol estrogen
CCI	Carcinome canalaire infiltrant
CLI	Carcinome lobulaire infiltrant
COMT	Cathechol-O-methyl transferase
CYP	Cytochrome P450
CYP1A1	Cytochrome P450 1A1
E2	estradiol
EGF	Epidermal growth factor
ER α	Récepteur à estrogene alpha
ER β	Récepteur à estrogene beta
Gn-RH	Récepteur de la gonadotrophine
GST	Glutathion-S-transferase
M	mutation
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP	Restriction Fragment Lengh Polymorphism
SBR	Scarff Bloom et Richardson grade pronostic
TGF alpha	Transforming Growth Factor alpha

Liste des figures et des tableaux :

FIGURES

N°	Titre	Page
1.	Structure du sein	4
2.	Anatomie des lymphatiques	4
3.	Représentation schématique d'un canal galactophore	5
4.	Développements des canaux galactophores	7
5.	Histologie d'une glande mammaire active	7
6.	coupes histologiques représentatives de différents carcinomes du sein	14
7.	Voies de signalisation œstrogène-récepteur	26
8.	Métabolisme des œstrogènes : voie des catéchols.	27
9.	Nomenclature des enzymes P450	29
10.	Localisation schématique des mutations m1, m2, m3 et m4 sur le gène CYP1A1.	33
11.	Illustration du profile RFLP pour les variants CYP1A1*4 (m4).	39
12.	Analyse des produits PCR obtenus	44
13.	Cartographie de restriction et caractérisation de l'apparition ou disparition des sites de restrictions pour différentes enzymes.	45
14.	Profils RFLP obtenus	46

TABLEAUX

N°	Titre	page
I.	Oncogènes les plus importants dans le cancer du sein.	22
II.	Facteurs de croissances.	23
III.	Gènes suppresseurs de tumeurs.	24
IV.	Gènes de prédisposition familiale.	25
V.	Types et localisation tissulaire des CYPs.	30
VI.	Quelques fonctions des différents CYPs.	31
VII.	Exemples de quelques substrats des CYPs.	32
VIII.	Carte ID de CYP 1A1.	34
IX.	Descriptif des polymorphismes de CYP1A1	35
X.	Amorces sens (S) et antisens (A) choisies.	39
XI.	Conditions d'amplification.	40
XII.	Analyse des polymorphismes CYP 1A1 avec les enzymes de restriction.	41
XIII.	Conditions fonctionnelles des enzymes de restriction.	41
XIV.	Types et âge moyen des cas analysés.	43
XV.	Types histologiques des échantillons analysés.	43
XVI.	Résultats statistiques.	47

Références

1. Hamdi Cherif et *al.* Registre du cancer de Sétif (Algérie): incidence, tendance et survie, 1986-2005. 2010 ; 4(14) : 245 - 258.
2. Keith L. Moore, Arthur F. Dalley, Anatomie médicale : aspects fondamentaux et applications cliniques, De Boeck ed, 2006.
3. E Cabarrot. Histoire naturelle des cancers du sein. EMC. 2000.
4. Alan .S, James L, histologie humaine, 3 ed, Elsevier, 2006.
5. Linda J. Heffner, Reproduction humaine, De Boeck ed, 2003.
6. Plu-Bureau G, Touraine P et Kuttenn F. Sein et hormones. Encycl Med, Elsevier SAS ed., Gynécologie, Paris 2002; 810-A-10,19 p.
7. Alan .S, James L et Barbara Y. Anatomie pathologique, Atlas de Wheater.4 ed, deboek, 2004.
8. Jean de Brux, Histopathologie du sein, Masson ed. 1979 ; 299.
9. Farid Moinfar, Essentials Of Diagnostic Breast Pathology A Practical Approach. Springer ed. 2007 ; 483.
10. Espié M, Tournant B, Cuvier C et Cottu PH. Épidémiologie des lésions malignes du sein. Encycl Med, Elsevier SAS ed., Gynécologie, Paris 2001 ; 840-A-15, 10 p.
11. AndreNkondjock et ParvizGhadirian. Facteurs de risque du cancer du sein. MEDECINE/SCIENCES. 2005 ; 21 : 175 - 80.
12. Xavier Coumoul et Robert Barouki. Génotoxicité des métabolites des œstrogènes et cancers. Medecine/Sciences. 2002 ; 18 : 86 - 90.
13. James D. Yager et Nancy E. Davidson. Mechanisms of disease : Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. N Engl J Med. 2006 ; 354 : 270 - 82.
14. E. L. CAVALIERI, D. E. STACK et *al.* Molecular origin of cancer : Catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997. 94 : 10937-10942.
15. Daniel W. Nebert and Timothy P. Dalton. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. Nature Reviews Cancer. 2006 ; 6 : 947 - 960.

-
16. Ron H. N. et Van Schaik. Cytochrome P450. Encyclopedia of cancer. Springer 2^e ed. 2008 ; 806 - 812.

 17. David F.V. Lewis. Guide to Cytochromes P450. Taylor & Francis e-Library. 2005 ; 69 - 104.

 18. Bartsch H, Nair U, et al., Genetic polymorphisms of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2000 ; 9 :3 - 28.

 19. Masson LF, Sharp L, Cotton SC, Little J. Cytochrome P-4501A1 gene polymorphisms and risk of breast cancer : a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2005; 161 : 901– 915.

 20. L. Renee Bailey, Nady Roodi, et al. Breast Cancer and CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 Polymorphisms : Evidence of a Lack of Association in Caucasians and African Americans, *Cancer Res.* 1998 ; 58 : 65 - 70.

 21. Yu Li, Robert C Millikan et al., Polychlorinated biphenyls, cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) polymorphisms, and breast cancer risk among African American women and white women in North Carolina : a population-based case-control study. *Breast Cancer Res.* 2005.

 22. Okobia M, Bunker C et al. Cytochrome P450 1A1 genetic polymorphisms and breast cancer risk in Nigerian Women. *Breast Cancer Res Treat.* 2005; 94 : 285 –293.

 23. Lehmann U, Kreipe H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods.* 2001 ; 25: 409 – 18.

 24. Akalu A, Reichardt JK. A reliable PCR amplification method for microdissected tumor cells obtained from paraffin-embedded tissue. *Genet Anal.* 1999 ; 15 : 229 –33.

 25. Imyanitov EN, Grigoriev MY, Gorodinskaya VM et al. Partial restoration of degraded DNA from archival paraffin-embedded tissues. *Biotechniques.* 2001 ; 31: 1000 -1002.

 26. Pikor L.A et al. DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analysis. *JoVE.* 2011 ; 49.

 27. Sergentanis T N et Economopoulos KP. Four polymorphisms in cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) gene and breast cancer risk : a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 ; 122(2) : 459 - 69.

 28. Li-Xin Qiu, Hui Yuan et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta-analysis involving 46,281 subjects. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 ; 121(3) : 703 – 708.
-

-
29. Theodoros N. Sergentanis et Konstantinos P. Economopoulos. GSTT1 and GSTP1 polymorphisms and breast cancer risk: a meta-analysis.. 2010 ; 121(1) : 195 – 202.
-
30. Konstantinos P. Economopoulos et Theodoros N. Sergentanis. Three polymorphisms in cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) gene and breast cancer risk: a meta-analysis 122 (2) : 545 – 551.
-
31. Haixia Ding, Yuanyuan Fu et *al.* COMT Val158Met polymorphism and breast cancer risk: evidence from 26 case–control studies. . Breast Cancer Res Treat. 2010 ; 123 (1) : 265 -270.
-
32. Liewei Wang, Katarzyna A E et *al.* Functional Genetic Polymorphisms in the Aromatase Gene *CYP19* Vary the Response of Breast Cancer Patients to Neoadjuvant Therapy with Aromatase Inhibitors. Cancer Res. 2010; 1, 70 ; 319.
-