

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Université des frères Mentouri, Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Animale**

**N° d'ordre : 111/Ds/2017  
N° de série : 06/Bioa/2017**

**THÈSE**

**Présentée pour l'obtention du diplôme de docteur en sciences  
Spécialité : Génétique Moléculaire  
Option : Génétique des pathologies humaines**

**Par**

**Mme SEDRATI ep ZAAF Khadidja**

**THÈME:**

*Étude pharmacogénétique du cancer du sein*



**Membres du Jury :**

<b>Présidente du Jury :</b>	<b>SATTA. D</b>	<b>Prof. Université des Frères Mentouri Constantine 1</b>
<b>Directeur de thèse :</b>	<b>ABADI. N</b>	<b>Prof. Université Constantine 3</b>
<b>Examineurs :</b>	<b>AMEDAH. S</b>	<b>Prof. Université des Frères Mentouri Constantine 1</b>
	<b>BOURAS. M</b>	<b>Prof. Université de Batna 2</b>
	<b>FILALI. T</b>	<b>Prof. Université Constantine 3</b>

**Année universitaire: 2016 - 2017**



**A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE**  
A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

**SANS LUI CE TRAVAIL N'AURAIT**  
SANS LUI CE TRAVAIL N'AURAIT

**PAS VU LE JOUR**  
PAS VU LE JOUR

**J'ÉTAIS PETITE MES VOUS AVEZ SU**  
J'ÉTAIS PETITE MES VOUS AVEZ SU

**ME COMMUNIQUER VOTRE FORCE**  
ME COMMUNIQUER VOTRE FORCE

# REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à mon directeur de thèse, Professeur **ABADJ Mouradine**, pour m'avoir fait confiance malgré les connaissances plutôt légères que j'avais, pour sa présence remarquable durant la réalisation de ce travail et son engagement dans toutes les étapes du déroulement de mon travail de recherche tout en me laissant une grande liberté. Il m'a accueilli au sein de son équipe et de m'a accordé toute sa confiance pour mener à terme mon projet. C'est un honneur de travailler avec quelqu'un d'aussi passionné, compétent et droit que vous. J'espère que tout au long de ma carrière, je saurai rester fidèle à ces valeurs essentielles.

Je suis infiniment gré à **Mme SAÏJA DALILA**, professeur à l'université des frères Mentouri Constantine 1 et responsable de la filière de génétique. Merci de nous avoir montré les clés du succès : avoir confiance en soi et en ses capacités, croire en soi et toujours tenter de se dépasser. Merci d'avoir été si patiente avec nous et de nous avoir aidés dans les moments les plus difficiles. Merci de l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de présider ce jury.

Je souhaite remercier les membres de jury :

**Mr FSLALY Taha**, professeur à l'université Constantine 3, Merci de m'avoir communiqué votre respect et votre passion pour la profession, Pour m'avoir permis l'accès à toutes les données et m'avoir adjoint l'aide précieuse des différents membres du service ainsi que pour l'ouverture de votre service pour le recrutement des malades pendant toutes ces années. Sans vous ce travail n'aurait pu être mené à bien. Je vous remercie aussi pour votre participation en tant qu'examinateur et membre de ce jury.

**Mme AMEDAK Souad**, professeur à l'université des frères Mentouri Constantine 1, Je vous suis vraiment reconnaissante pour votre investissement dans l'évaluation de mon travail. Vous nous honorez par votre présence au jury. Mon profond respect vous est acquis.

**Mr BOURAS NOURAD** Professeur à l'Université Batna 2. D'avoir accepté avec une grande amabilité de faire partie de ce jury pour examiner cette thèse et pour m'avoir fait l'honneur de votre présence à ma soutenance. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance et de ma considération respectueuse.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du Laboratoire de Biochimie et Hormonologie du CHU IBN BADIS de Constantine et le laboratoire de Biologie et de Génétique moléculaire en particulier Mme **DADIS Yasmina**, pour leur aide.

Je tiens aussi à remercier le personnel du service d'oncologie médicale, plus particulièrement Docteur **CHROUF Amel** pour s'être impliqués dans ce travail.

Ce travail est le résultat d'une collaboration avec le laboratoire de Biologie spécialisé et oncogénétique située à l'Institut Régionale du Cancer (IRC) de Montpellier (France). Je tiens à remercier vivement Pr. **Pierre Jean LAMY** pour m'avoir permis de réaliser une partie expérimentale de génotypage dans son laboratoire et pour m'avoir conseillée et guidée avec bienveillance. Je remercie chaleureusement tous les membres de son équipe pour leur grande disponibilité et l'ambiance décontractée qui m'a facilité le travail, et tout particulièrement **Marie Anne LAFRE** pour leur simplicité, leurs conseils précieux et leur suivi qui'ils m'ont apporté tout au long de mon stage.

Enfin, au terme de ce travail, il m'est agréable d'exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué à ma formation et qui m'ont aidé de près ou de loin à la réalisation ce travail.

# Dédicaces

DÉDICACES

*A MA MÈRE, mon pilier, à qui je dois tout ce que je suis, merci d'être ce que tu es, par tes encouragements, tes prières, ta sagesse, tu as permis que ce travail s'accomplisse. Que Dieu vous préserve et vous accorde longue vie.*

*Je dédie ce travail à mon mari **BILLEL** qui n'a cessé de m'encourager tout au long de ces années, d'être à côté de moi dans les moments les plus difficiles. Merci pour ta patience et ton aide précieuse durant toute cette période d'angoisse.*

*Je dédie ce travail à mon petit ange **TAHA ELFAROUK**, mon rayon de soleil.  
Puisse-t-il être toujours fier de sa maman*

***MOHAMED**, mon frère, mon ami, ton soutien indéfectible, tes conseils et ton écoute m'ont permis d'atteindre ce but.*

*Mes frères : **FARES, BILLEL, LAZHAR**, mes camarades au foyer ; mes sœurs : **FARIDA, RAFIAA, HASSINA, SORAYA** ; mes belle sœurs : **KARIMA, FADIA, WASSILA, SALWA** ; mes neveux et mes nièces, il n'y a pas assez pour vous remercier d'être tous simplement ma famille grâce à qui j'en suis là aujourd'hui, parce que vous avez toujours cru en moi et m'avez soutenue.  
Vous avez tous contribué à votre manière à cette réussite... Je vous aime*

*A toutes mes amies les plus chères : **OUARDA, DJALILA, ZEINEB, HADIA, RAZIKA, SOUAD, NAWEL, CHAHINEZ**, merci d'avoir répondu toujours présentes*

# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>5,10- MTHF :</b>	5, 10-MéthylèneTétraHydroFolate
<b>5-dUMP :</b>	5- désoxy Uridine-Mono Phosphate
<b>5-FU :</b>	5-Fluorouracile
<b>5-MTHF :</b>	5- MéthylèneTétraHydroFolate
<b>ABC :</b>	ATP Binding Cassette
<b>ADCC:</b>	Anti body Dependant Cell mediated Cytotoxicity
<b>BBP :</b>	Bleu de Bromo Phénol
<b>BET :</b>	Bromure d’Ethidium
<b>BRCA</b>	BReast CAncer
<b>CCI :</b>	Carcinome Canalaire Infiltrant
<b>CCIS :</b>	Carcinome Canalaire <i>In Situ</i>
<b>CHUC :</b>	Centre Hospitalier Universitaire Ben Badis de Constantine
<b>CLI :</b>	Carcinome Lobulaire Infiltrant
<b>CLIS :</b>	Carcinome Lobulaire <i>In Situ</i>
<b>CYP :</b>	Cytochrome P450
<b>ddNTP :</b>	di-désoxy Nucléotides Tri Phosphates
<b>dNTP :</b>	désoxy-Nucléotides Tri Phosphates
<b>DPYD :</b>	Dihydro PYrimidine Déshydrogénase
<b>EDTA:</b>	Ethylen Diamin Tetra acetic Acide
<b>FRET :</b>	Fluorescence Resonance Energy-transfer Technology
<b>FAC :</b>	5-FU (F), la doxorubicine (A) et le cyclophosphamide (C)
<b>FEC :</b>	5-FU (F), l’épirubicine (E) et le cyclophosphamide (C)
<b>GSTP1 :</b>	Glutathion S Transférase P1
<b>HRM :</b>	High Resolution Melting
<b>ICM :</b>	Institut Régionale du Cancer de Montpellier
<b>MDR :</b>	<i>Multi Drug Resistance</i>
<b>MI :</b>	Métaboliseurs Intermédiaires
<b>ML :</b>	Métaboliseurs Lents
<b>MR :</b>	Métaboliseurs Rapides
<b>MRP :</b>	<i>Multi drug Resistance Protein</i>
<b>MTHFR :</b>	Méthylène TétraHydrofolate Réductase
<b>MUR :</b>	Métaboliseurs Ultra Rapides
<b>NER :</b>	<i>Nucleotide Excision Repair</i>

<b>P :</b>	Progression tumorale
<b>PCR :</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>Pgp :</b>	P Glycoprotéine
<b>RC :</b>	Réponse Complète
<b>RECIST:</b>	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
<b>RFLP :</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RP :</b>	Réponse Partielle
<b>S :</b>	Stabilité tumorale
<b>SDS:</b>	Sodium Dodécyle Sulfate
<b>SLC :</b>	SoLute Carrier
<b>SNP :</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<b>TBE :</b>	Tris Borate EDTA
<b>TNM :</b>	Tumor Node Metastasis
<b>TPMT :</b>	Thio Purine Méthyl Transférase
<b>TS :</b>	Thymidylate Synthase
<b>UGT 1A1 :</b>	UDP-Glucuronosyl Transférase 1A1
<b>UICC :</b>	Union Internationale Contre le Cancer
<b>XPD :</b>	Xeroderma Pigmentosum group D

# TABLE DES MATIERES

## REMERCIEMENTS ET DÉDICACES

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

## LISTE DES FIGURES

## LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

### ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

#### I. Le cancer du sein

1. Généralités .....	3
2. Différents types de tumeurs du sein.....	4
2.1. Tumeurs bénignes .....	4
2.2. Tumeurs malignes communs.....	5
2.3. Métastase.....	5
2.4. Formes rares .....	6
3. Classifications des tumeurs mammaires.....	7
3.1. Classification TNM.....	7
3.2. Classification histologique.....	9
3.3. Classification moléculaire.....	10
4. Données épidémiologiques.....	10
5. Facteurs de risque.....	12
6. Traitement.....	14
6.1. Chirurgie.....	15
6.2. Chimiothérapie .....	16
6.3. Radiothérapie.....	16
6.4. Hormonothérapie .....	16
7. Mécanisme d'action des médicaments anticancéreux.....	16
7.1. Action sur la multiplication cellulaire.....	17
7.2. Action sur le fonctionnement cellulaire.....	18

#### II. La pharmacogénétique

1. Historique .....	20
---------------------	----

2. Notions de pharmacogénétique .....	21
3. Pharmacogénétique et pharmacogémonique .....	23
4. Pharmacodynamie des anticancéreux.....	24
5. Gènes candidats d'intérêt pharmacogénétiques.....	25
5.1. Gènes de synthèse et de métabolisme des acides nucléiques.....	25
5.2. Gènes des enzymes du métabolisme et du transport des médicaments.....	29
5.2.1. Gènes des enzymes du métabolisme.....	30
5.2.2. Gènes des molécules de transport.....	32
5.3. Gènes de réparation de l'ADN .....	35
<b>PATIENTS ET METHODES</b>	
1. Echantillonnage.....	37
2. Stratégies d'évaluation de la réponse tumorale.....	38
3. Etude moléculaire.....	39
3.1. Prélèvement sanguin.....	40
3.2. Extraction de l'ADN.....	40
3.3. Estimation de la qualité et de la quantité d'ADN.....	40
4. Choix des gènes.....	41
5. Analyse moléculaire.....	42
5.1. Génotypage par PCR-RFLP.....	43
5.1.1. Amplification par PCR .....	43
5.1.2. Contrôle des produits PCR.....	45
5.1.3. Digestion des produits PCR .....	45
5.1.4. Electrophorèse des produits de la digestion.....	46
5.2. Génotypage par séquençage.....	50
5.2.1. Amplification par PCR quantitative en temps réel.....	50
5.2.2. Principe du séquençage.....	52
5.2.3. Réaction de séquence.....	54
5.2.4. Purification des produits de séquençage.....	54
5.2.5. Analyse des séquences.....	55
6. Analyse statistique.....	56
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
1. Caractéristiques clinico-pathologiques de la population d'études.....	58
2. Résultats moléculaires.....	61

2.1. Analyse RFLP .....	62
2.2. Analyse par séquençage des polymorphismes G2677T/A et C3435T du gène ABCB1.....	65
2.3. Corrélations réponses / génotypes.....	66
<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>77</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>82</b>

**ANNEXES**

**RÉSUMÉ**

**ABSTRACT**

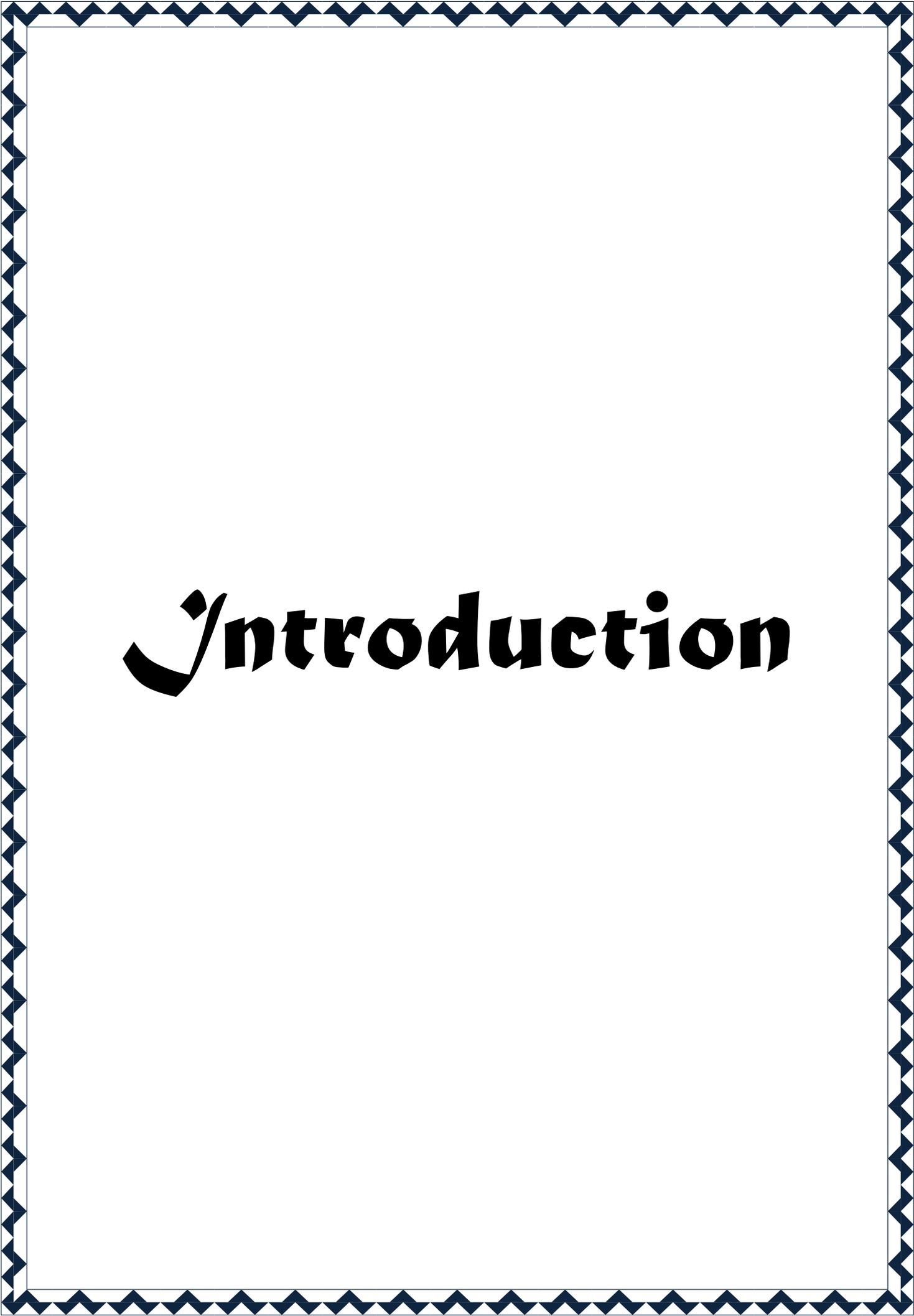
ملخص

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b>	Anatomie de la glande mammaire	3
<b>Figure 2 :</b>	Principaux sites métastatiques du cancer du sein	5
<b>Figure 3 :</b>	Classification TNM	8
<b>Figure 4 :</b>	Estimation de Nouveaux et Cas et de décès de cancer dans le monde, selon le sexe	11
<b>Figure 5 :</b>	Formes les plus fréquents de cancers chez la femme en Algérie. Année 2010	11
<b>Figure 6 :</b>	Facteurs modifiant le risque de développer le cancer du sein	13
<b>Figure 7 :</b>	Traitement du cancer du sein de la femme selon le stade de la maladie	15
<b>Figure 8 :</b>	Champ d'application de la pharmacogénétique	21
<b>Figure 9 :</b>	Principaux mécanismes moléculaires des modifications de l'activité des médicaments anticancéreux.	22
<b>Figure 10 :</b>	Conséquence clinique des polymorphismes génétiques	23
<b>Figure 11 :</b>	Structure des allèles non fonctionnels de la TPMT les plus fréquents	26
<b>Figure 12 :</b>	Polymorphisme de la TS	28
<b>Figure 13 :</b>	Métabolisme du 5-FU	29
<b>Figure 14 :</b>	Représentation schématisée du métabolisme des xénobiotiques	30
<b>Figure 15 :</b>	Schéma partiel du gène UGT1A1 montrant la localisation des polymorphismes	31
<b>Figure 16 :</b>	Résultat observé d'un contrôle des produits PCR	45
<b>Figure 17 :</b>	Profil de restriction par <i>NdeI</i>	47
<b>Figure 18 :</b>	Photographie d'un profil de digestion du polymorphisme IVS14+1G >A du gène de la DPYD	47
<b>Figure 19 :</b>	Photographie d'un profil de digestion du polymorphisme C677T du gène de la MTHFR	48
<b>Figure 20 :</b>	Photographie d'un profil de digestion du polymorphisme A1298C du gène de la MTHFR	49
<b>Figure 21 :</b>	Photographie d'un profil de digestion du polymorphisme A313G du gène GSTP1	49
<b>Figure 22 :</b>	Le principe de la PCR HRM	51
<b>Figure 23 :</b>	Représentation de la courbe de fusion	52
<b>Figure 24 :</b>	Mécanisme de fluorescence par la technique de transfert d'énergie par résonance	53
<b>Figure 25 :</b>	Profil de séquençage obtenu pour le polymorphisme G2677T/A du gène ABCB1	55
<b>Figure 26 :</b>	Profil de séquençage obtenu pour le polymorphisme C3435T du gène ABCB1	56
<b>Figure 27 :</b>	Représentation des taux de réponse observés dans la population d'étude	61

# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b>	Différents types de tumeurs bénignes du sein	<b>4</b>
<b>Tableau 2 :</b>	Classification UICC	<b>9</b>
<b>Tableau 3 :</b>	Principaux protocoles utilisés en chimiothérapie dans le cancer du sein	<b>19</b>
<b>Tableau 4:</b>	Détermination de la réponse tumorale globale	<b>39</b>
<b>Tableau5:</b>	Présentation des polymorphismes de l'étude	<b>42</b>
<b>Tableau6:</b>	Représentation des différentes amorces spécifique de chaque SNP et leurs programmes de PCR	<b>44</b>
<b>Tableau 7:</b>	Processus de digestion enzymatique pour chaque gène	<b>46</b>
<b>Tableau 8 :</b>	Les amorces spécifiques de chaque polymorphisme du gène ABCB1	<b>50</b>
<b>Tableau 9:</b>	Marquage du produit de PCR purifié	<b>54</b>
<b>Tableau 10:</b>	Caractéristiques clinicopathologiques de la population d'étude	<b>58</b>
<b>Tableau 11 :</b>	Résultats de génotypage du polymorphisme IVS14+1G >A du gène de la DPYD	<b>62</b>
<b>Tableau 12 :</b>	Résultats de génotypage des polymorphismes C677T et A1298C du gène de la MTHFR	<b>63</b>
<b>Tableau 13 :</b>	Résultats de génotypage du polymorphisme A313G de la GSTP1	<b>64</b>
<b>Tableau 14 :</b>	Résultats de génotypage des polymorphismes G2677T/A et C3435T du gène ABCB1	<b>65</b>
<b>Tableau 15 :</b>	Fréquences génotypiques des deux polymorphismes d'ABCB1 en fonction des populations.	<b>66</b>
<b>Tableau 16 :</b>	Association entre le polymorphisme IVS14 + 1G >A (rs3918290) de la DYPD et la réponse clinique à la chimiothérapie	<b>67</b>
<b>Tableau 17 :</b>	Association entre le polymorphisme C677T (rs1801133) de la MTHFR et la réponse clinique à la chimiothérapie	<b>70</b>
<b>Tableau 18 :</b>	Association entre le polymorphisme A1298C (rs1801131) de la MTHFR et la réponse clinique à la chimiothérapie	<b>71</b>
<b>Tableau 19 :</b>	Association entre le polymorphisme A313G (rs1695) de la GSTP1 et la réponse clinique à la chimiothérapie	<b>72</b>
<b>Tableau 20 :</b>	Association entre le polymorphisme G2677T/A (rs2032582) de gène ABCB1 et la réponse clinique à la chimiothérapie	<b>74</b>
<b>Tableau 21 :</b>	Association entre le polymorphisme C3435T (rs1045642) de gène ABCB1 et la réponse clinique à la chimiothérapie	<b>75</b>



# ***Introduction***

## **Introduction :**

Le cancer du sein se caractérise par sa grande fréquence devenant un véritable fléau dans le monde par son incidence, sa morbidité et sa mortalité. Il est la première cause de mortalité par tumeurs malignes chez la femme [1]. La multiplication des moyens thérapeutiques, naturellement, amenée à se poser la question de la stratégie thérapeutique, utilisant différentes approches et, notamment, leurs importance et positionnement pour l'obtention d'une guérison ou d'un allongement de vie gagnés sur la maladie. Ainsi, Les traitements du cancer du sein ont connu des avancées significatives ces dernières années, mais les patients répondent différemment à des thérapies identiques.

Il existe une variabilité importante des effets de médicaments anticancéreux d'un individu à l'autre : le même protocole thérapeutique administré à des patientes, montrant la même symptomatologie, pourra être efficace chez les uns alors qu'il ne l'est pas pour les autres.

Cette hétérogénéité pourrait être liée à des causes génétiques traduite par des polymorphismes et / ou des mutations sur les gènes. Les biomarqueurs, produits de ces gènes, peuvent être des métabolites résultant de l'activité des enzymes métabolisant les médicaments, des cibles pharmacodynamiques ou encore des peptides liés au processus inflammatoire. [2, 3]

La variabilité interindividuelle des réponses aux médicaments a entraîné la naissance d'une nouvelle discipline : la pharmacogénétique. Cette discipline récente étudie l'influence de la diversité génotypique associée à ces polymorphismes sur la réponse aux médicaments.

Il a été démontré que les polymorphismes génétiques de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sont l'une des causes majeures de cette diversité de réponses individuelles aux médicaments associés à des conséquences parfois très graves. [4]

A partir des nombreuses données de la littérature [2 - 4], et devant l'absence de travaux en Algérie sur ce phénomène, nous nous sommes intéressés à la variabilité de la réponse à un même traitement administré à des patientes atteintes du cancer du sein. Cette réponse est appréciée en premier lieu cliniquement. Dans notre étude, nous avons opté pour une appréciation des métabolites potentiels impliqués dans cette résistance et la recherche du polymorphisme des déterminants génétiques.

Ce travail présente un double intérêt : il est initié pour la première fois en Algérie et pourra, à court et long terme, contribuer à une meilleure connaissance des mécanismes des médicaments et de leur action. Ainsi, en plus d'un apport sur le plan fondamental, il aura un retentissement dans son application par l'amélioration de la prise en charge médicamenteuse en procédant à la diminution des effets secondaires de ces traitements.

Nos objectifs tendent à:

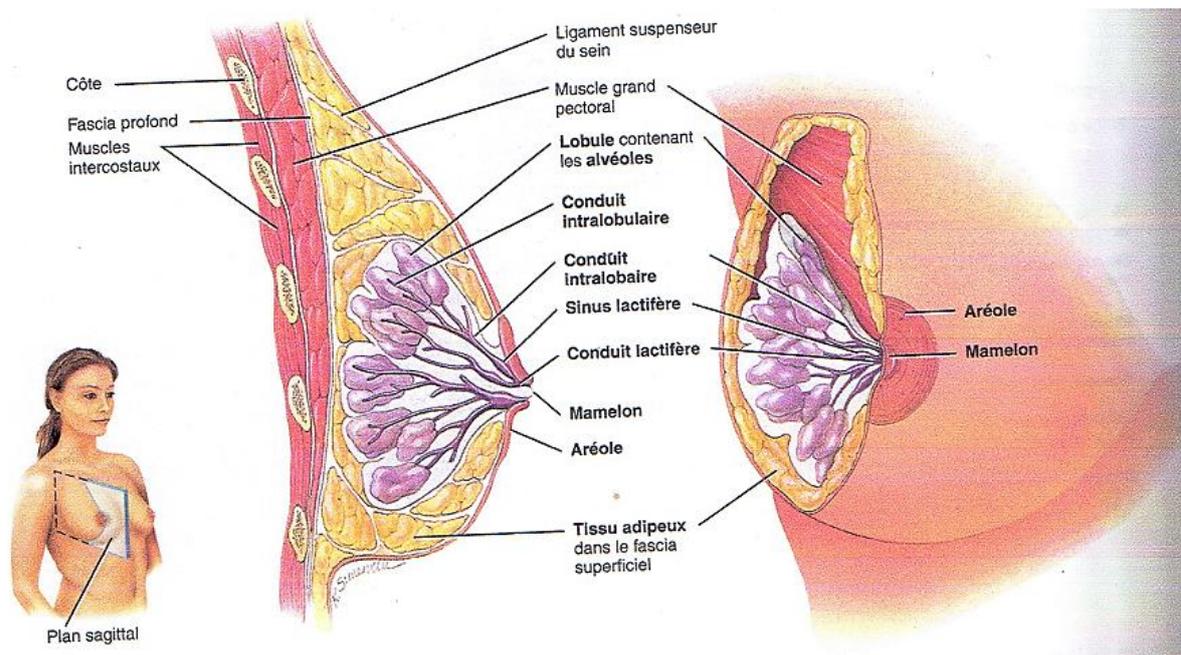
- mettre en place des techniques de biologie moléculaire pour l'étude et la recherche des polymorphismes génétiques ayant une implication potentielle dans la réponse du patient à la chimiothérapie
- étudier la distribution des polymorphismes des gènes DPYD, GSTP1, MTHFR et ABCB1 dans le cancer du sein, contribuant à la pharmacodynamie des médicaments anticancéreux.
- établir une corrélation entre les différents polymorphismes étudiés et l'évaluation du taux de réponse au protocole chimio thérapeutique
- déterminer l'intérêt des tests génétiques et moléculaires pour la prescription médicamenteuse personnalisée dans le traitement chimiothérapeutique du cancer du sein.

# **Étude bibliographique**

## I. Le cancer du sein

### 1. Généralités :

Le sein féminin est composé de glandes mammaires et de canaux galactophores acheminant le lait vers le mamelon, entourés de tissu graisseux et de tissu conjonctif (Figure 1)



**Figure 1 :** Anatomie de la glande mammaire [5]

Une croissance anarchique des cellules dans l'un ou l'autre de ces tissus peut provoquer le cancer du sein. La notion de « Cancer du sein » relève d'une nomenclature générique, qui fait référence à tout un ensemble de proliférations néoplasiques de la glande mammaire, qui diffèrent tant du point de vue histologique qu'en ce qui concerne leur comportement évolutif. Le terme de "cancer du sein" ne désigne que les tumeurs malignes, potentiellement agressives du sein, tandis que le terme de "tumeur du sein" désigne à la fois les tumeurs malignes et bénignes [6]. Toute tumeur maligne touchant la glande mammaire est due à une prolifération incontrôlée des cellules mammaires [7]. Ce cancer prend habituellement naissance dans l'épithélium des conduits plutôt que des structures tubulo-alvéolaires des lobules [8]. Il est à noter qu'il peut se produire chez l'homme mais il est très rare [9].

Le cancer du sein a un processus d'évolution lent, puisque la formation d'une tumeur au site primaire dure plusieurs années. Cependant, au cours de cette phase, des phénomènes d'invasion de la membrane basale font évoluer la tumeur d'un état localisé de carcinome *in situ* à un état de carcinome invasif. L'évolution de ce cancer est dominée par le risque d'apparition de métastases qui représentent la principale cause de mortalité dans cette pathologie [10].

## 2. Différents types de tumeurs du sein

### 2.1. Tumeurs bénignes

Les tumeurs bénignes du sein sont des affections bénignes et non inflammatoires de la glande mammaire portant également le nom de dystrophie mammaire, elles se développent au détriment des structures épithéliales (canaux et lobules), conjonctives (tissu fibreux et adipeux) et parfois des deux. Les tumeurs bénignes du sein regroupent plusieurs types (Tableau 1) [11].

**Tableau 1 : Différents types de tumeurs bénignes du sein [11]**

Type de cancer	Définition	Age
<b>Les adénofibromes ou fibroadénomes</b>	Les plus fréquentes. Ce sont des tumeurs nodulaires d'origine mixte. épithéliale glandulaire (adéno) et conjonctive (fibrome) de tailles diverses, uniques ou multiples. Le risque de dégénérescence ultérieure ou l'association à un cancer est rare.	entre 15 et 30 ans
<b>Les kystes</b>	Les kystes se présentent comme solitaires de grande taille ou comme kystes multiples, remplis de liquide sécrété par les cellules d'un ou plusieurs canaux galactophores fermes.	entre 25 et 45 ans
<b>Tumeur phyllode</b>	La tumeur phyllode représente 0,3 à 4% des tumeurs du sein chez la femme. Elle refoule les tissus avoisinants et est parfois responsable d'anomalies inquiétantes de la peau quand elle est de grande taille. Il n'y a pas d'atteinte ganglionnaire.	entre 40 et 50 ans
<b>Adénomes</b>	L'adénome est une prolifération épithéliale pure (adénome lacté chez la femme jeune enceinte ou allaitante, ou adénome tubuleux).	Avant 40 ans
<b>Lipome</b>	Il s'agit d'une masse molle et mobile ne nécessitant aucun traitement.	Environ 45 ans
<b>Papillome intracanaulaire</b>	Le papillome intracanaulaire se développe à partir du canal galactophore et croit dans la lumière du canal. La tumeur est soit unique et souvent rétromamelonnaire (papillome solitaire) soit multiple et périphérique au niveau des lobules.	solitaire après 50 ans, et multiples à 40 ans

## 2.2. Tumeurs malignes communs

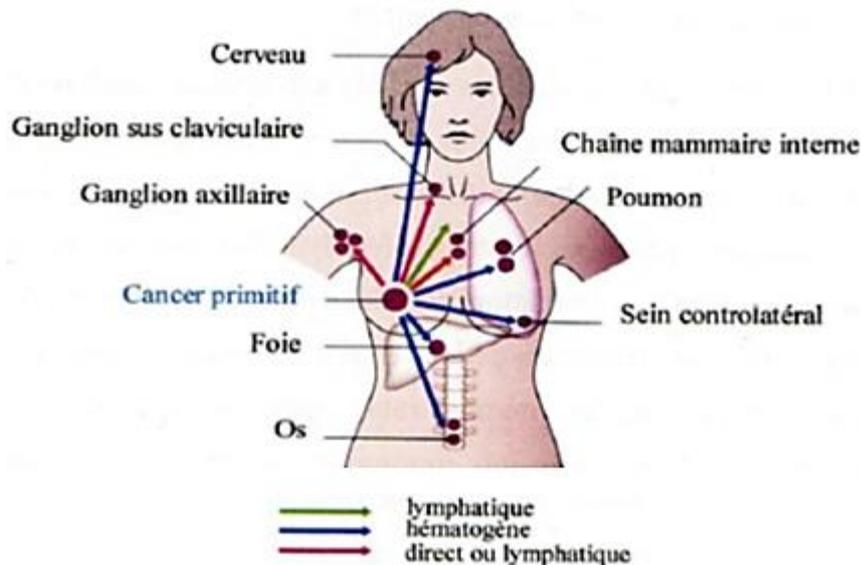
Selon la localisation de l'affection, il existe différents types de cancer du sein. Les cellules cancéreuses peuvent rester dans les canaux (carcinomes canalaire) ou les lobules (carcinome lobulaire). Ils sont dits non-invasifs quand la tumeur n'a pas franchi la membrane basale qui les entoure et, donc, n'a pas infiltré le tissu voisin *in situ*. Ils sont classés invasifs (infiltrants) lorsque les cellules cancéreuses ont infiltré le tissu qui entoure les canaux et les lobules. Ainsi, on distingue :

- a. **Le carcinome canalaire *in situ* (CCIS)** est un type de cancer du sein confiné à l'intérieur du système canalaire. Il se définit comme un carcinome se développant dans le canal, n'infiltrant pas le tissu conjonctif. Il s'agit d'un type de cancer non invasif précoce et très commun.
- b. **Le carcinome lobulaire *in situ* (CLIS)** se définit comme un carcinome intéressant les canalicules intra-lobulaires comblées et distendues par une prolifération de cellules de petite taille, sans envahissement du tissu conjonctif voisin. Il se caractérise par son caractère multicentrique et sa tendance à la bilatéralisation.
- c. **Le carcinome canalaire infiltrant (CCI)** est le type le plus fréquent de cancer du sein et représente 80% de toutes les tumeurs malignes. Le cancer commence dans les canaux galactophores du sein et se propage dans les tissus environnants. Ce type peut se propager à travers le système lymphatique ou la circulation sanguine vers d'autres parties du corps
- d. **Le carcinome lobulaire infiltrant (CLI)** est la deuxième forme de cancer du sein par ordre de fréquence (5 - 15%). C'est un type de cancer du sein qui apparaît fréquemment comme un épaissement subtil dans la région au-dessus et à l'extérieur du sein. Il est souvent positif aux œstrogènes et à la progestérone. Ces tumeurs réagissent bien au traitement hormonal.

## 2.3. Métastase

La dissémination métastatique du cancer du sein se fait principalement *via* les néovaisseaux lymphatiques. Dans ce cas, les chaînes ganglionnaires sont rapidement envahies avec des localisations au niveau des ganglions axillaires, mammaires internes, sus-claviculaires et ceux de la région du cou et un envahissement régional qui peut aboutir à l'atteinte de la paroi thoracique. La dissémination métastatique se fait également *via* le

nouveau réseau de vaisseaux sanguins et provoque généralement l'apparition des foyers secondaires au niveau des os, des poumons, du foie, du sein controlatéral, ou encore du cerveau (Figure 2).



**Figure 2** : Principaux sites métastatiques du cancer du sein [12]

## 2.4. Formes rares

- Le carcinome tubulaire** est un autre type de cancer assez peu commun, qui se manifeste davantage chez les femmes de 55 ans et plus, appelé tubuleux en raison de l'aspect des cellules au microscope. Il a tendance à être de petite taille et ne se propage souvent qu'aux ganglions lymphatiques des aisselles.
- Le cancer médullaire** se manifeste davantage chez les femmes de moins de 50 ans. Sa bordure est souvent ronde et bien définie, il ressemble parfois à un fibroadénome à la mammographie ou à la palpation lors de l'examen clinique des seins.
- Le carcinome mucineux** est aussi appelé carcinome colloïde. Il se développe plus souvent chez les femmes âgées de 60 à 70 ans et il est formé de cellules cancéreuses qui sécrètent du mucus.
- La maladie de Paget** est caractérisée par une propagation de cellules carcinomateuses au mamelon, représenté par un écoulement sanglant ou eczéma du mamelon. La maladie de Paget du sein témoigne d'un cancer infiltrant ou d'un carcinome intracanalair du sein.

Les carcinomes tubulaires, médullaires, mucineux et de Paget sont des formes de meilleurs pronostic que les carcinomes infiltrants.

- e. **Le cancer Inflammatoire du sein** est rare et très agressif. Il a tendance à se développer en couches ou lamelles et non sous forme de tumeur solide comme le font les types les plus communs de cancer du sein.

Les tumeurs malignes, en dehors des carcinomes primitifs du sein, sont rares. Elles représentent moins de 1% de toutes les tumeurs malignes du sein et constituent un groupe de lésions disparates comportant : les sarcomes phyllodes, les sarcomes mésoenchymateux, les angiosarcomes et les lymphomes non hodgkiniens primitifs du sein [13].

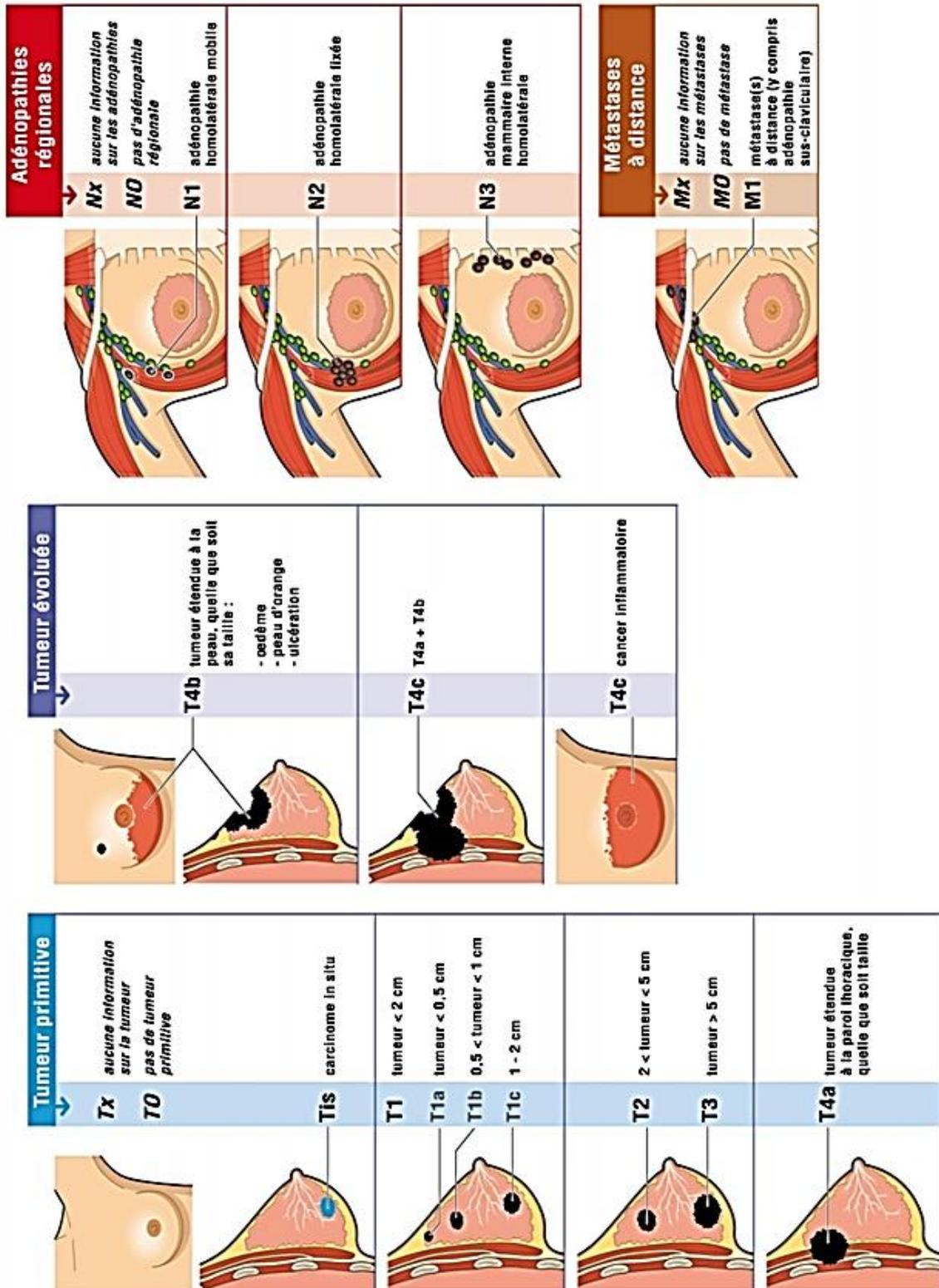
### 3. Classifications des tumeurs mammaires

#### 3.1. Classification TNM

Plusieurs révisions ont été publiées, la dernière étant la septième édition en 2009 [14]. Cette dernière est représentée par la classification TNM (Tumor Node Metastasis). Elle est basée sur le principe de l'extension anatomique déterminé par la clinique et l'histopathologie.

L'indice TNM résume les stades de la maladie, les 3 lettres symbolisent la propagation de la maladie sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques régionaux (N) ainsi qu'à distance pour d'éventuelles métastases (M). Généralement ces lettres sont suivies d'un chiffre variant de 0 à 4 pour T, de 0 à 3 pour le N, et soit 0 soit 1 pour les M (Il y a une corrélation entre l'augmentation du chiffre et le degré de la gravité) (Figure 3) [15].

Figure 3 : Classification TNM [15]



La combinaison de ces trois variables permet de définir le stade d'un cancer, de 0 à IV, qui reflète son agressivité (Tableau 2). La classification du stade ou extension de la tumeur suit un code standard international qui a été lancé en 1954 par l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) [16].

**Tableau 2** : Classification UICC [16]

Le stade	
<b>0</b>	Tis N0 M0
<b>I</b>	T1 N0 M0
<b>IIA</b>	T0 N1 M0 ; T1 N1 M0 ; T2 N0 M0 ;
<b>IIB</b>	T2 N1 M0 ; T3 N0 M0
<b>IIIA</b>	T0 N2 M0 ; T1 N2 M0 ; T2 N2 M0 ; T3 N1 M0 ; T3 N2 M0
<b>IIIB</b>	T4 N0 M0 ; T4 N1 M0 ; T4 N2 M0
<b>IIIC</b>	Tous T N3 M0
<b>IV</b>	Tous T Tous N M1

### 3.2. Classification histologique

Cette classification est décrite par Scarff - Bloom et Richardson [17] puis reprise et modifiée par Elston et Ellis [18]. Elle est adoptée de façon générale dans le cadre des critères de Nottingham [19]. C'est un critère pronostique majeur des cancers du sein. Elle comporte trois catégories de grade : le grade I qui correspond à des cancers bien différenciés, le grade II à des cancers moyennement différenciés et le grade III à des cancers indifférenciés. Ces derniers ont habituellement une évolution plus grave et plus rapide que les cancers différenciés [20].

Les trois grades sont obtenus par l'addition de trois critères : architecture, atypies cytonucléaires et nombre de mitoses. Chaque élément est évalué individuellement et un score de 1 à 3 lui est attribué.

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

- Score total de 3, 4 ou 5 : grade I ;
- Score total de 6 ou 7 : grade II ;
- Score total de 8 ou 9 : grade III.

### 3.3. Classification moléculaire

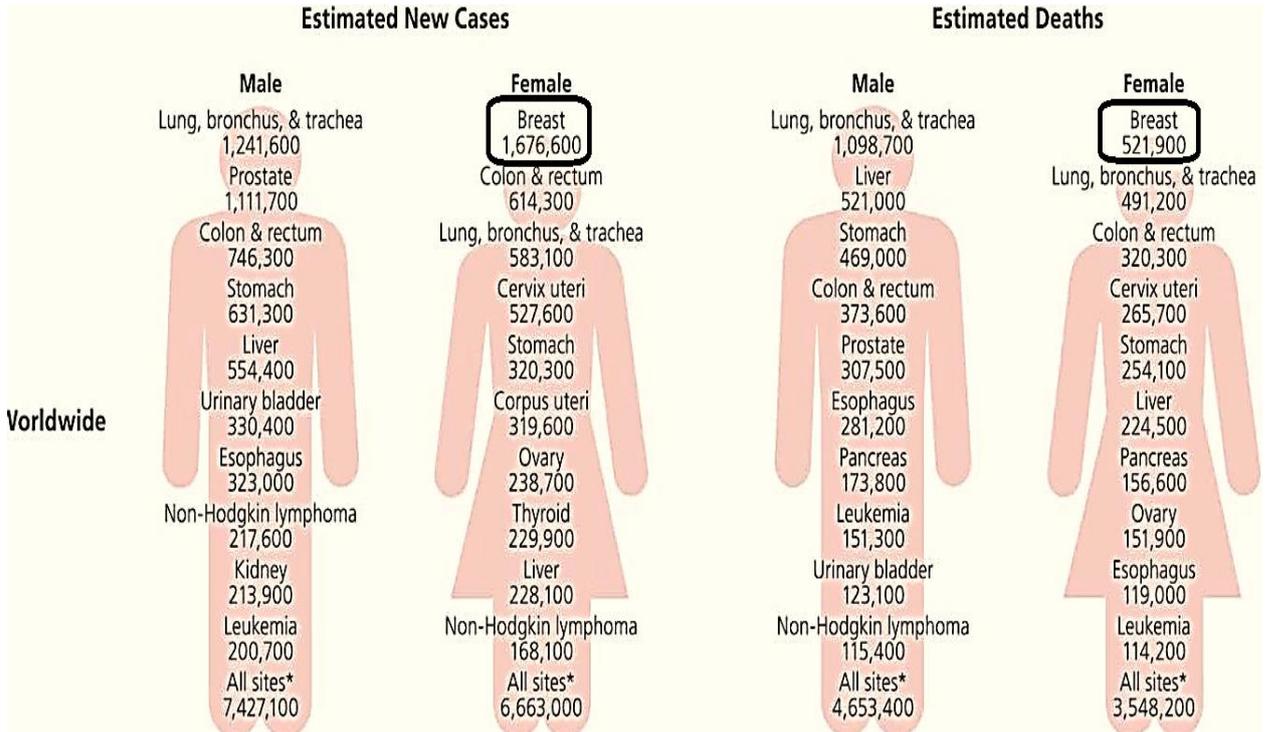
Perou *et al* ont été les premiers à subdiviser les cancers du sein en sous-groupes selon leur profil d'expression génique. Ils ont individualisé tout d'abord deux groupes principaux en fonction de l'expression des récepteurs aux estrogènes (RE). Ils ont identifié quatre types de carcinomes en les comparant au tissu normal : RE+/luminal, basal-like, Erb-B2 et normal-like [21]. D'autres travaux sur différentes plates-formes de micro-array (Affymetrix®, Agilent®), sur des séries indépendantes de cancers du sein, avec des techniques de qPCR ou de microarray sur tissu fixé et inclus en paraffine ont validé ces sous-types moléculaires, ce qui permet de les prendre en compte en clinique [22 - 24].

Plus tard, le développement des analyses génomiques permet d'analyser simultanément l'expression de nombreux gènes (jusqu'à 25 000 gènes) grâce aux puces à ADN ce qui permet de réaliser un "portrait" de chaque tumeur. L'analyse des résultats, par les méthodes de clustering, regroupant les tumeurs en fonction de leur profil d'expression génique. Ces regroupements sont le reflet de mécanismes de corégulation des gènes, ainsi cette expression propose une nouvelle classification dite "moléculaire" en classes ou sous-types dans le cancer du sein [25].

Actuellement, quatre sous-types sont bien individualisés : luminal, basal, HER2+ et normal. Toutefois, certains sous-types apparaissent eux-mêmes hétérogènes et doivent être encore mieux décrits. Pour chaque sous-classe, les marqueurs biologiques exprimés ainsi que les types histologiques des tumeurs ont été étudiés. Ces catégories moléculaires ont des pronostics différents ce qui apporte un intérêt majeur dans le traitement de cancers du sein. [26 - 27]

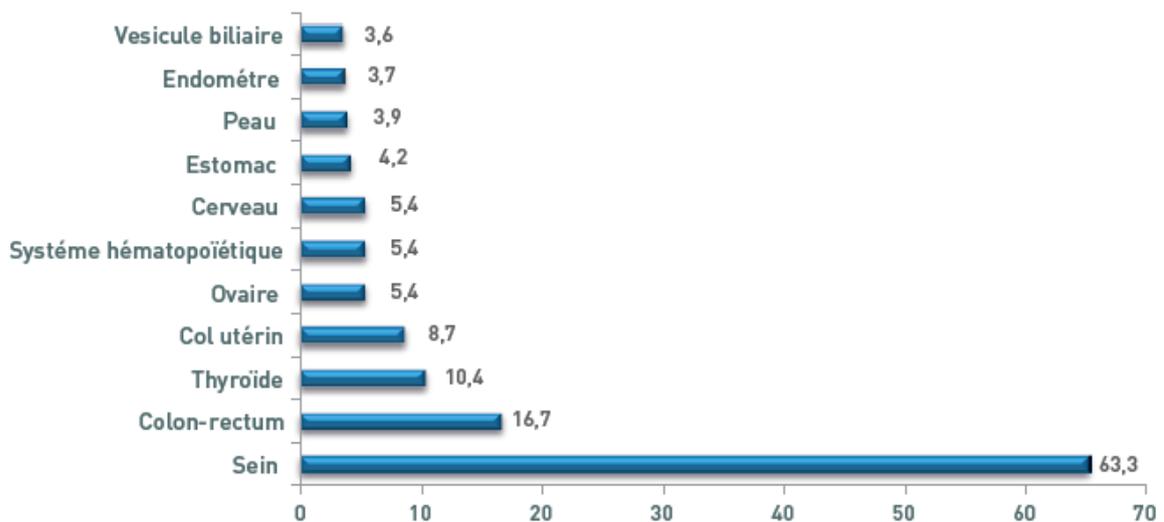
## 4. Données épidémiologiques

Le fardeau mondial du cancer du sein est en augmentation. En 2012, le cancer du sein était diagnostiqué dans 1,7 millions de cas avec 521900 décès [28]. Le cancer du sein est la cause la plus fréquente de décès par cancer chez les femmes. La figure 4 rapporte la position du cancer du sein par rapport à d'autres types de cancers chez les deux sexes



**Figure 4** : Estimation de Nouveaux Cas et de décès de cancer dans le monde, selon le sexe [29]

En Algérie, les données des registres nationaux illustrent une augmentation réelle et régulière de la fréquence du cancer du sein [30].



**Figure 5** : Formes les plus fréquentes de cancers chez la femme en Algérie.

Année 2010 (Plan National du Cancer 2015-2019, 2014)

Le cancer du sein est en forte progression. Il prend des proportions épidémiques inquiétantes avec plus de 9 000 nouveaux cas en 2009, soit 54 nouveaux cas pour 100 000 femmes. En 2014, ce chiffre est estimé à 11 000, soit une augmentation de 500 nouveaux cas par an. Il représente le premier cancer de la femme Algérienne (Plan National du Cancer 2015-2019, 2014). Son incidence connaît une progression exponentielle alarmante depuis environ 20 ans (Figure 5).

### 5. Facteurs de risque

Les facteurs de risque du cancer du sein sont, spécifiquement, liés à la vie reproductrice des femmes. Un risque accru est corrélé à une apparition précoce des règles, à la nulliparité ou à une première naissance à un âge tardif, à une ménopause tardive ainsi qu'à des facteurs hormonaux, qu'ils soient endogènes ou exogènes (facteurs génésiques et hormonaux).

De plus, les femmes présentant des lésions épithéliales prolifératrices, en particulier avec une hyperplasie canalaire ou lobulaire atypique par rapport l'histologie normale, ont quatre à cinq fois plus de risques de développer un cancer du sein.

Des prédispositions génétiques sont représentées dans 5 à 10% des cas. Il existe une prédisposition génétique au cancer du sein, ceci est rencontrée dans des familles à risque de cancer du sein où cette affection se transmet sur le mode autosomique dominant avec une pénétrance limitée, impliquant que des membres d'une même famille peuvent posséder et transmettre ce gène sans développer un cancer. Environ 90% de ces cancers impliquent des mutations des gènes BRCA1 et BRCA2. Des mutations de ces gènes représentent un risque accru de développer un cancer du sein, 60 à 85% des personnes porteuses de cette modification auront un cancer du sein avant 70 ans [31]. L'histoire familiale est un autre critère important qui influence le risque relatif de développer un cancer du sein. En effet, une analyse, de plus de 58 000 cas de cancer du sein et 100 000 contrôles, a permis de déterminer qu'une personne est plus à risque de développer un cancer du sein lorsque ses apparentées au premier degré sont atteintes [32].

D'autres facteurs de risque, potentiellement liés aux hormones telles que l'obésité, ou l'alimentation souvent caractérisée par un apport calorique élevé non contrebalancé par une activité physique suffisante, une consommation élevée de graisse animale totale et

saturée ainsi qu'une alimentation pauvre en fruits et légumes et riche en viande et en alcool [33]. Aussi, les femmes irradiées lors des expositions nucléaires d'Hiroshima et de Nagasaki, en particulier dans la période d'âge de croissance active de la glande mammaire, constituent encore la référence pour l'estimation des facteurs de risque de la plupart des cancers associés aux rayonnements ionisants, y compris le cancer du sein [34].

La figure 6 résume la plupart des facteurs qui sont reconnus pour influencer à divers degrés le risque de développer un cancer du sein [35].

**Figure 6 :** Facteurs modifiant le risque de développer le cancer du sein [35]

<b>Facteurs reproductifs</b>	
Puberté précoce	↑↑
Forte densité mammaire	↑↑
Nulliparité	↑↑
Grossesse après 40 ans	↑
Ménopause tardive	↑
Nombre élevé de grossesse à terme	↓
Allaitement	↓
<b>Facteurs environnementaux et habitudes de vie</b>	
Provenance: Amérique du Nord ou Europe	↑↑
Exposition à des radiations	↑
Prise de contraceptifs oraux	↑
Traitements hormonaux substitutifs	↑
Alimentation riche en gras saturé	↑
Consommation d'alcool	↑
Déficience en folate	↑
Classe socioéconomique élevée	↑
Provenance: Afrique ou Asie	↓↓
Exercice physique	↓
<b>Facteurs génétiques</b>	
Histoire familiale	↑↑
Mutations de forte pénétrance (BRCA1/2)	↑↑
Mutations de faible pénétrance	↑
<b>Autres facteurs</b>	
Âge avancé	↑↑
Affections mammaires antérieures bénignes	↑↑
Grande taille	↑
Poids élevé à la naissance	↑

↑↑: Forte augmentation du risque ↑: Augmentation modérée du risque

↓↓: Forte diminution du risque ↓: Diminution modérée du risque

### **6. Traitement :**

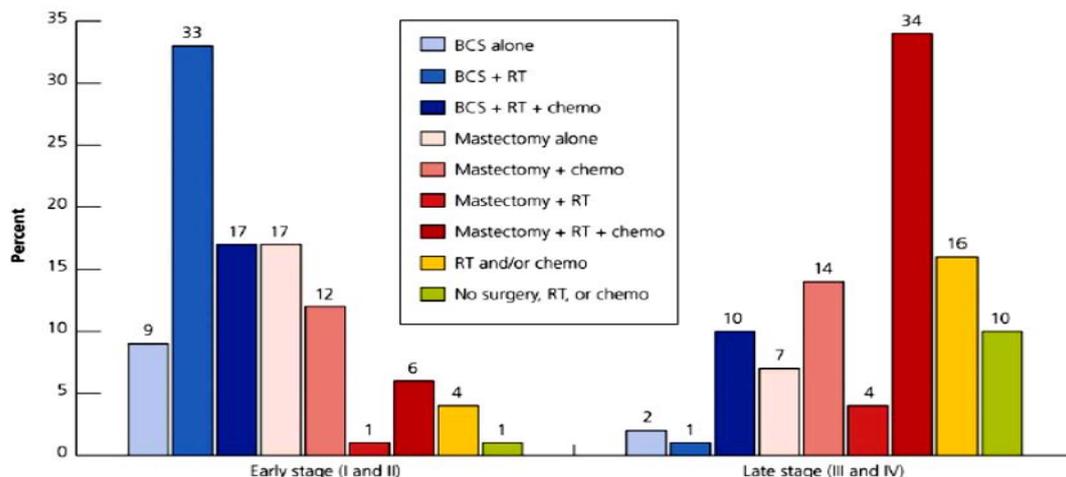
Trois types de traitements sont utilisés pour traiter les cancers du sein : la chirurgie, la radiothérapie et les traitements médicamenteux (chimiothérapie, thérapies ciblées et hormonothérapie). Tous ont pour objectifs, selon les cas de supprimer la tumeur ou les métastases, de réduire le risque de récurrence, de ralentir le développement de la tumeur ou des métastases, de traiter les symptômes engendrés par la maladie.

La démarche thérapeutique est basée sur des caractéristiques liées à la tumeur (classification, histologie, risque métastatique, récepteurs hormonaux) et aux patientes (âge, statut hormonal de ménopause, antécédents médicaux).

La chirurgie et la radiothérapie sont des traitements locorégionaux qui agissent au niveau du sein et des aires ganglionnaires locorégionales (axillaires, sus claviculaires et chaînes mammaires internes). La chimiothérapie est un traitement par voie générale. Ces traitements peuvent être utilisés seuls ou associés les uns aux autres. Certaines molécules sont couramment utilisées en clinique, d'autres font encore l'objet d'études cliniques prospectives. Devant l'apparition de résistances à certains de ces traitements médicaux, la recherche actuelle se tourne vers des thérapies ciblées, qui font l'objet de nombreux essais cliniques (Figure 7) [36].

Si la radiothérapie est le seul traitement complémentaire de l'intervention chirurgicale, le délai de mise en route de la radiothérapie après la chirurgie ne doit pas dépasser 12 semaines. Un délai maximum de 6 mois ne doit pas être dépassé entre la chirurgie et le début de la radiothérapie.

Si, après la chirurgie, une chimiothérapie (associée ou non à une thérapie ciblée selon le statut HER2 de la tumeur) et une radiothérapie sont prescrites, la chimiothérapie est le plus souvent réalisée en premier, du fait que certains médicaments de chimiothérapie entraînent des effets secondaires plus importants lorsqu'ils sont administrés après la radiothérapie. Afin de les éviter, la radiothérapie est entamée une fois que la chimiothérapie est terminée au maximum après 5 semaines. Si une hormonothérapie est indiquée, elle démarre à l'issue de la radiothérapie [37].



**Figure 7 :** Traitement du cancer du sein de la femme selon le stade de la maladie (BCS : Breast Conserving Surgy ; RT : Radiation Therapy ; chemo : chemotherapy) [36].

## 6.1. Chirurgie

Elle est, dans 80% des cas, le traitement de première intention des cancers du sein non métastatique. La chirurgie est de plus en plus performante et moins mutilante. On distingue deux types :

**La tumorectomie :** Chirurgie conservatrice, elle permet d'enlever une tumeur d'une taille habituellement inférieure à 3 cm et de conserver le sein. Cette technique est suffisante si la tumeur est peu avancée. Le traitement se fait désormais le plus souvent en ambulatoire : retour chez soi le jour-même de l'opération.

**La mastectomie :** Cette intervention consiste à retirer le sein avec la tumeur, pour des tumeurs plus volumineuses ou s'il existe plusieurs tumeurs dans le sein. L'ablation d'une partie de la chaîne ganglionnaire située dans l'aisselle près du sein atteint n'est plus réalisée systématiquement. On pratique désormais la technique dite du ganglion sentinelle qui consiste, au cours de l'intervention, avant l'ablation de la tumeur, à extraire les premiers ganglions de la chaîne en périphérie du sein. Si après analyse de ces derniers, aucune cellule cancéreuse n'est retrouvée, le chirurgien peut poursuivre son intervention par une simple tumorectomie. Dans le cas contraire, il doit compléter son geste d'un retrait d'une partie de la chaîne ganglionnaire, ce qui n'est pas sans conséquence pour la qualité de vie post opératoire des patientes.

## **6.2. Chimiothérapie**

Elle est parfois prescrite avant la chirurgie, pour réduire la taille de la tumeur avant son ablation (on parle alors de chimiothérapie néo-adjuvante). Elle intervient aussi souvent après la chirurgie et peut être associée à une radiothérapie ou à une thérapie ciblée, par exemple. La chimiothérapie s'attaque aux cellules en division de l'organisme, notamment les cellules cancéreuses. Elle était uniquement administrée par voie intraveineuse, à l'hôpital. Certaines chimiothérapies sont disponibles en comprimés, la patiente peut les prendre chez elle. Les chimiothérapies s'attaquent certes aux cellules cancéreuses mais aussi aux cellules saines, s'ensuivent de nombreux effets secondaires variables selon les médicaments utilisés, les dosages et les personnes (chacun réagit différemment aux traitements). Ils peuvent également varier d'une cure de chimiothérapie à l'autre. Ils ne sont d'ailleurs pas systématiques.

## **6.3. Radiothérapie**

Elle fait toujours partie du protocole de soins, notamment après une chirurgie conservatrice. Son objectif est de détruire, grâce à une irradiation ciblée, d'éventuelles cellules cancéreuses résiduelles. Ce traitement quotidien s'effectue en général sur une durée de 5 à 6 semaines et ne nécessite pas d'hospitalisation.

## **6.4. Hormonothérapie**

Prescrite dans près 75% des cas de cancers du sein. Elle bloque l'action des hormones féminines telles que les œstrogènes et la progestérone qui agissent sur les cellules en faveur de leur multiplication. Dans la majorité des cas, cette hormonothérapie est administrée en situation adjuvante, après d'autres traitements. Elle vise à limiter le risque de récurrence [38].

## **7. Mécanisme d'action des médicaments anticancéreux**

La chimiothérapie anticancéreuse fait appel à des médicaments qui conduisent soit à l'arrêt de prolifération (médicaments cytostatiques), soit interfèrent avec le fonctionnement cellulaire en inhibant la croissance cellulaire (médicaments cytotoxiques) [39].

## 7.1. Action sur la multiplication cellulaire

Dans la plupart des cas, les agents cytostatiques exercent leur action par l'intermédiaire d'une action sur l'ADN, d'une interaction avec l'ARN ou avec la synthèse des protéines qui interviennent dans la formation du cytosquelette.

### a. Les antimétabolites

Ils inhibent la synthèse des acides nucléiques, soit en inhibant les protéines nécessaires au métabolisme des bases puriques et pyrimidiques, comme par exemple le méthotrexate (MTX ou Ledertrexate®) et le pemetrexed (Alimta®), qui sont des antifolates, ou alors l'hydroxyurée (hydroxycarbamide ou Hydrea®), qui inhibe la ribonucléotide-diphosphate réductase. La substitution aux bases azotées par le 5-Fluorouracile (5-FU) ou la cytarabine (cytosine arabinoside, Ara-C, Aracytine®, Cytarbel®, ou Cytosar®) qui sont des antiprimidiques, ou la 6-mercaptopurine (6-MP, Purinéthol®) et la 6-thioguanine (Lanvis®) qui sont des antipuriques par conséquent l'inhibition de la réplication [40].

### b. Les agents alkylants

Un médicament alkylant agit en substituant un radical alkyl réactif à un proton d'une structure nucléophile hautement réactive de l'ADN. Ces substances créent un lien chimique covalent fort, entre elles-mêmes, et un ou plusieurs groupements (carboxy) d'un acide nucléique que ce soit mono ou double brin. Lors de la division cellulaire, le dédoublement des 2 brins de l'ADN devient difficile à cause de la formation de ponts inter ou intracaténaux non réparables, en conséquence, la réplication est arrêtée au niveau de l'agent alkylant, aboutissant à "l'avortement" de la division cellulaire. Parmi ces médicaments, nous citons le Cyclophosphamide (Endoxan\*™), l'Ifosfamide (HoloXan™), le Melphalan (Alkéran™) ou moutarde à la phényl-alanine, la Procarbazine (Natulan™), le Cisplatine (Cisplatyl™) et l'Oxaliplatine (Eloxatine™) [41].

### c. Les agents intercalants

Ce sont des molécules polycycliques qui s'intercalent entre les plateaux qui constituent deux paires de bases contiguës de l'ADN. La conséquence de l'intercalation est une détorsion de la molécule d'ADN et donc un empêchement de la progression des ARN

et ADN polymérase ainsi qu'une inhibition de la réplication et de la transcription. Il existe différents groupes utilisés en clinique : nous citons les Anthracyclines (doxorubicine (Adriblastine®), Myocet® ou Caelyx®) et la daunorubicine (Cérbine® ou Daunoxome®), les Anthracènes (mitoxantrone (ou Novantrone®)) ou les Phenoxazines (dactinomycine et actinomycine-D (ou Cosmegen®)) [42].

### **d. Les poisons du fuseau mitotique**

Appelés aussi agents tubulo-affines, agissent de manière directe sur les molécules de tubuline indispensable à la constitution du fuseau mitotique et à la migration polaire des chromosomes pendant la mitose. Ces molécules, soit elles inhibent la polymérisation de la tubuline et bloquent ainsi la division mitotique (Vincaalcaloïdes : vinblastine (Velbe®) et vinorelbine (Navelbin®)), ou bien se lient à la tubuline, favorisant ainsi sa polymérisation en microtubules interrompant la mitose : (Taxanes : paclitaxel (Taxol®) et docetaxel (Taxotère®)) [43].

## **7.2. Action sur le fonctionnement cellulaire**

Les thérapies anticancéreuses ciblées reposent sur l'inhibition de la croissance tumorale *via* un marqueur spécifique de la cellule cancéreuse. La dernière révolution dans ce domaine porte sur le criblage spécifique de voies de transduction intracellulaires impliquées dans le développement de certains cancers. On y trouve des anticorps monoclonaux et des inhibiteurs de l'activité protéine-tyrosine kinase.

Les Anticorps monoclonaux se lient au domaine extracellulaire de la cellule cancéreuse, inhibant la croissance tumorale soit directement (par leur activité intrinsèque), soit indirectement en induisant une réponse immunitaire de type ADCC (*Anti body dependant cell mediated cytotoxicity*) ou en activant la cascade du complément. Rituximab (anti-CD20 (MABTHERA®)) Le Trastuzumab (anti-HER2/NEU (HERCEPTIN®)) sont les plus utilisés [44, 45].

Les Inhibiteurs de la tyrosine kinase (l'Imitanib (GLIVEC®)) inhibent, au niveau intracellulaire, l'activité tyrosine kinase des récepteurs aux facteurs de croissance, empêchant la transduction du signal et l'activité proliférative de ces derniers [46].

Un des protocoles préconisé et afin de réduire les résistances précoces, est l'association de drogues possédant des mécanismes d'action différents et, si possible, avec des toxicités non cumulatives. En termes de chimiothérapie conventionnelle, le protocole FEC et FAC : le 5-FU (F), le cyclophosphamide (C) et la doxorubicine (A) ou l'épirubicine (E) ou les taxanes (paclitaxel ou docétaxel) sont les plus utilisés. Ce traitement consiste en une cure de chimiothérapie toutes les trois semaines, en général, six fois de suite. Chaque cure correspond à une séance de perfusion. Chaque séance est suivie de trois semaines de repos avant la séance suivante. Le tableau 3 récapitule les protocoles chimiothérapeutiques les plus utilisés pour le traitement des cancers du sein.

**Tableau 3** : Principaux protocoles utilisés en chimiothérapie dans le cancer du sein [47]

<i>Protocole</i>	<i>Schéma d'administration</i>	Dose	Rythme (J : jour)
<b>FAC 50</b>	Doxorubicine Endoxan 5-Fluorouracile	50 mg/m <sup>2</sup> 500 mg/m <sup>2</sup> 500 mg/m <sup>2</sup>	J1=J21
<b>FEC 100</b>	5-Fluorouracile Epirubicine Endoxan	500 mg/m <sup>2</sup> 100 mg/m <sup>2</sup> 500 mg/m <sup>2</sup>	J1=J21
<b>CMF</b>	Endoxan Methotrexate 5-Fluorouracile	600 mg/m <sup>2</sup> 40 mg/m <sup>2</sup> 600 mg/m <sup>2</sup>	J1 et J8  J1=J21
<b>AC</b>	Doxorubicine Endoxan	60 mg/m <sup>2</sup> 600 mg/m <sup>2</sup>	J1=J21
<b>TAC</b>	Doxorubicine Endoxan Taxotère	50 mg/m <sup>2</sup> 500 mg/m <sup>2</sup> 75 mg/m	J1=J21
<b>FEC/T</b>	FEC100 (3cycles)  Taxotère (3cycles)	500 mg/m <sup>2</sup> 100 mg/m <sup>2</sup> 500 mg/m <sup>2</sup> 100 mg/m <sup>2</sup>	J1=J21
<b>TC</b>	Endoxan Taxotère	500 mg/m <sup>2</sup> 75 mg/m <sup>2</sup>	J1=J21

## II. La pharmacogénétique

### 1. Historique

Historiquement, la pharmacogénétique s'est focalisée sur des protéines intervenant dans l'absorption, le métabolisme et l'élimination de certains médicaments. En effet, c'est en mesurant des concentrations de médicaments dans le sang que l'on a découvert l'existence de « métaboliseurs lents ». À cette époque, les techniques de biologie moléculaire n'étaient pas développées et le phénotypage se basait seulement sur les dosages des molécules mères et/ou des métabolites dans le sang ou les urines.

Dans les années 1950s ont été successivement décrits des syndromes particuliers que l'on rattache à des déficits constitutionnels en différentes protéines : glucose-6-phosphate déshydrogénase et anémie hémolytique aux dérivés de la quinine, apnées à la succinylcholine chez des patients déficients en cholinestérase [48 - 50].

La pharmacogénétique est apparue pour la première fois en 1953 avec la description du phénotype « acétyleur lent » de l'isoniazide, un antituberculeux. Ce phénotype a été rapidement associé à une augmentation de la neurotoxicité de cet antituberculeux couramment prescrit.

Dans les années 1960s, des médecins colligent des effets indésirables survenus chez leurs patients prenant certains médicaments ; ces effets sont associés à des concentrations circulantes très élevées de ces médicaments [51]. C'est en constatant l'élimination, extrêmement lente de quelques médicaments par certains patients, que l'on découvre les enzymes hépatiques responsables du métabolisme des médicaments (cytochromes P450 ou CYP). Les premiers cas décrits soulignent déjà à l'époque que ces phénotypes « métaboliseurs lents » sont rattachés à des modifications d'ordre génétique, car ils se transmettent selon un mode mendélien. Il faut attendre les années 1980 et les progrès de la biologie moléculaire pour l'identification des gènes codant les protéines de ce métabolisme [52]. Les mutations responsables des phénotypes « métaboliseurs lents » sont alors progressivement publiées [53].

C'est avec l'apparition des tests génétiques et le séquençage du génome humain, et au début des années 2000, puis 2003, que la pharmacogénétique a pris un nouvel essor dans le développement et le suivi des médicaments.

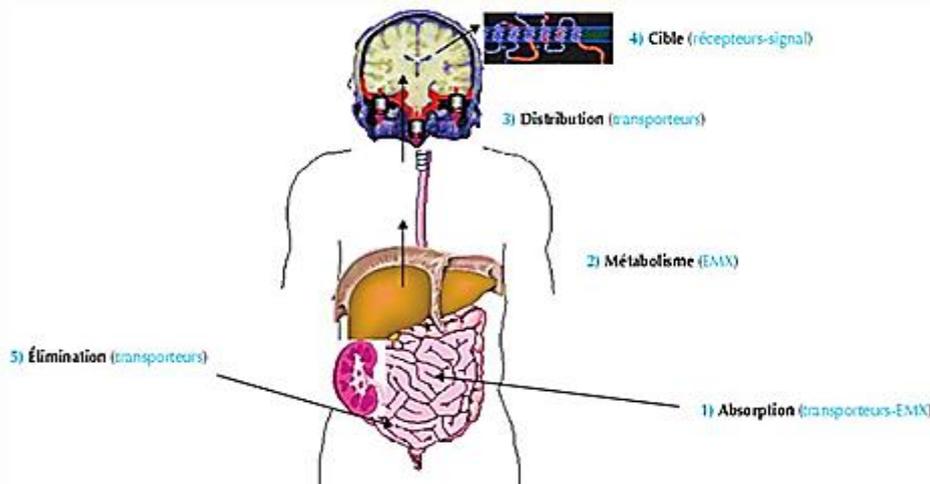
## 2. Notions de pharmacogénétique

La désignation de pharmacogénétique est une compaction de deux termes qui mettent en relation deux notions simples, à savoir que la réponse de l'organisme à un médicament donné (pharmaco-) dépend de la variation de séquence d'un ou de quelques gènes (-génétiq ue). C'est l'étude de l'influence de la variabilité du génome dans la variation interindividuelle de la réponse aux médicaments [54].

Les variations individuelles, dans la réponse aux médicaments, et les effets indésirables de ces derniers sont des problèmes cruciaux. De nombreux facteurs peuvent influencer la réponse du patient au médicament. Le choix du médicament et les doses optimales dépendent de plusieurs facteurs y compris : l'âge, le sexe, le poids corporel, la co-morbidité, les fonctions des organes, les interactions médicamenteuses, le mode de vie, l'origine ethnique, la génétique, l'alimentation...etc [55].

Cependant, la variation génétique peut représenter jusqu'à 95% de la variabilité dans la disposition et l'effet de la drogue [56]. L'attention s'est concentrée sur les polymorphismes génétiques de type SNP, comme cause principale de la variation de la réponse aux médicaments, et sont devenus une cible de recherche représentant de la pharmacogénétique [57].

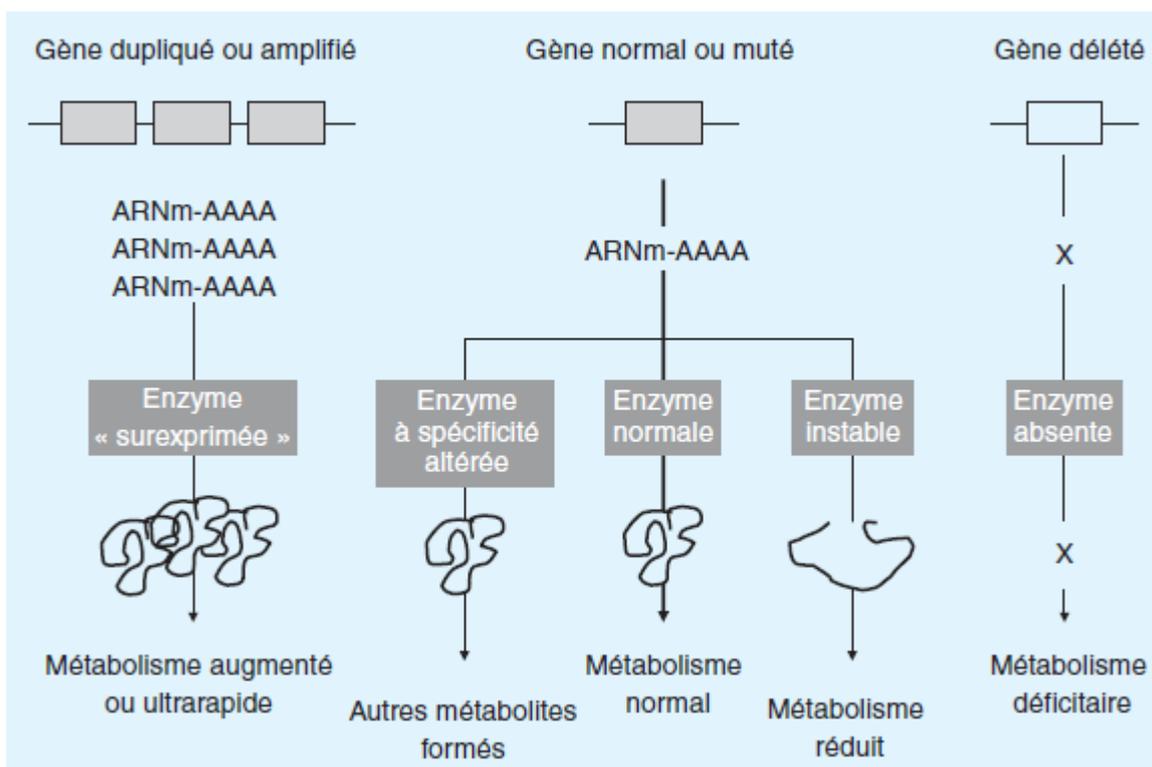
Le développement considérable de la pharmacogénétique, attesté par un nombre croissant, voire exponentiel de publications, qui y sont consacrées depuis une vingtaine d'années, couvre aujourd'hui trois grands domaines qui sont tous impliqués dans la variabilité interindividuelle de la réponse aux médicaments (Figure 8).



**Figure 8** : Champ d'application de la pharmacogénétique [58].

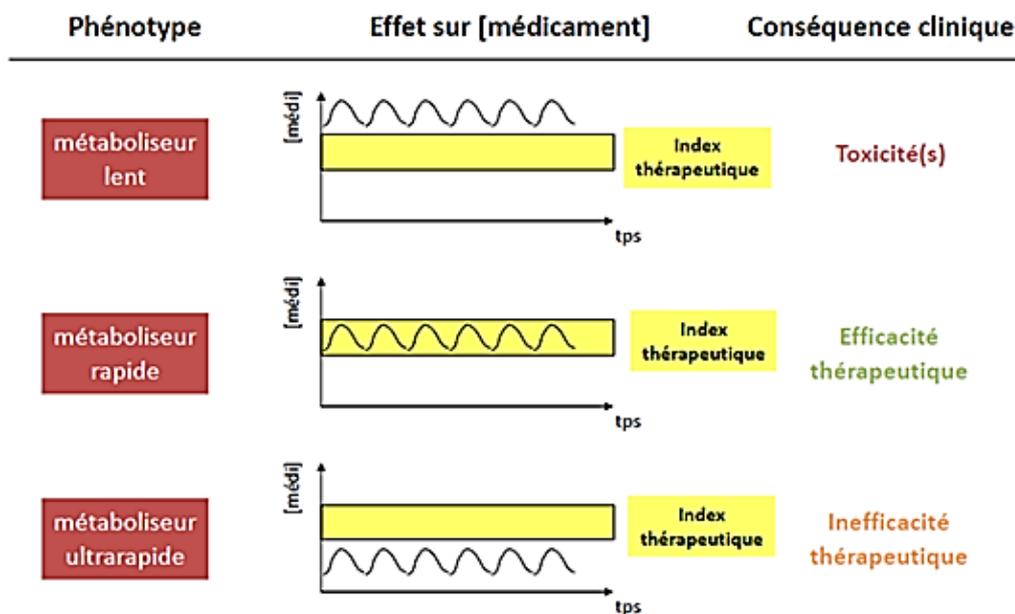
Ces trois domaines sont les suivants : les enzymes du métabolisme des médicaments, les transporteurs transmembranaires de médicaments et les récepteurs ou sites « cibles » de médicaments.

Il ressort de ces constats, que l'enjeu de la discipline « pharmacogénétique » est d'établir la traduction fonctionnelle de l'ensemble des SNP de notre génome et d'en définir les conséquences cliniques potentielles. Les polymorphismes génétiques peuvent être responsables de variations d'expression ou d'activité des enzymes du métabolisme des médicaments. Ils s'expriment dans la population générale sous la forme de différents phénotypes métaboliques, définissant généralement chez des individus deux groupes : ceux ayant des métaboliseurs lents (ML) (déficit d'activité enzymatique) et à métaboliseurs rapides (MR) (activité normale). L'existence de métaboliseurs ultrarapides (MUR) (activité augmentée) ou intermédiaires (MI) (activité réduite) est possible pour certaines enzymes [59]. Ces différents mécanismes moléculaires sont illustrés dans la figure 9.



**Figure 9** : Principaux mécanismes moléculaires des modifications de l'activité des médicaments anticancéreux [60].

Les conséquences cliniques des polymorphismes génétiques dépendent de plusieurs facteurs : administration du médicament sous forme active ou de pro-drogue, activité des métabolites, importance de la voie métabolique polymorphe dans la clairance globale du médicament (figure 10).



**Figure 10** : Conséquence clinique des polymorphismes génétiques

### 3. Pharmacogénétique et pharmacogénomique

Les deux termes « pharmacogénomique » et « pharmacogénétique » sont très souvent utilisés de la même manière ou pour caractériser la même idée [61]. Ils sont fréquemment utilisés dans la littérature concernant la médecine personnalisée. Même s'il n'existe encore aucun véritable consensus sur les définitions propres à chacun de ces termes, il est néanmoins possible de dégager certaines caractéristiques permettant de les distinguer [62, 63].

La pharmacogénomique est un terme, qui a été introduit à la fin des années 1990 et qui peut être définie de manière large comme étant l'étude des variations des effets toxiques ou thérapeutiques des médicaments sur la base d'une analyse des informations contenues dans le génome entier d'un individu. Les études pharmacogénomiques portent, aussi bien, sur les variations interindividuelles des séquences génétiques elles-mêmes que sur les variations de l'expression des gènes.

Par contraste, le terme «pharmacogénétique» est utilisé depuis les années 50 pour désigner les recherches portant sur des gènes candidats spécifiques, susceptibles d'expliquer l'existence de variations dans la manière dont un individu répond à un médicament, en termes d'effets secondaires ou d'efficacité clinique [64].

Les gènes candidats visés dans les études pharmacogénétiques sont sélectionnés en fonction de mécanismes, dont on sait déjà ou dont on suspecte qu'ils sont impliqués dans les prédispositions à développer certaines maladies, ou dans l'absorption, le métabolisme, le transport ou l'excrétion de médicaments. Cette sélection de gènes peut également avoir lieu sur la base de cibles médicamenteuses. Par opposition, la pharmacogénomique suit une approche libre de toute hypothèse et porte sur l'ensemble du génome [65].

Malgré ces différences notables, il existe une interdépendance entre ces deux champs de recherche. Aussitôt que des recherches pharmacogénomiques, portant sur l'ensemble du génome, incluant les notions de transcriptomique et de protéomique, ont permis d'identifier des gènes ou des marqueurs génétiques impliqués dans les mécanismes influençant l'action ou les effets secondaires d'un médicament, chaque gène doit ensuite faire l'objet d'études pharmacogénétiques.

#### **4. Pharmacodynamique des anticancéreux**

La réponse thérapeutique à un traitement dépend principalement de la concentration du principe actif au niveau de son récepteur ou de son site d'action. Le devenir des médicaments dans l'organisme et, en particulier, leur aptitude à atteindre la cible pharmacologique, dépend de paramètres liés à la fois au médicament et au tissu cible.

Bien que les anticancéreux soient extrêmement divergents dans leur structure chimique, physique et dans leur action biologiques, l'ensemble des mécanismes qui influencent leur effets peuvent être catégorisés en:

- a. mécanisme d'action en amont du site d'action de la drogue : ce mécanisme est représenté par les enzymes de détoxification et les transporteurs des drogues.
- b. mécanisme d'action sur le site d'action de la drogue, correspondant essentiellement aux enzymes intervenant dans la biosynthèse et le métabolisme de l'ADN, la réparation de l'ADN et le cycle mitotique.

- c. mécanisme d'action en aval du site d'action de la drogue : Cascade apoptotique et les Chémokines

Les médicaments utilisés en oncologie ont généralement des index thérapeutiques étroits et leur adaptation posologique est de règle pour éviter des effets toxiques tout en préservant une bonne efficacité. La connaissance du métabolisme et des cibles de ces molécules a permis de caractériser des « gènes de susceptibilité » à la toxicité de certains médicaments anticancéreux [66].

### 5. Gènes candidats d'intérêt pharmacogénétiques

Parmi les polymorphismes identifiés, au niveau des gènes intervenant dans le transport ou le métabolisme des médicaments anticancéreux, nous allons citer quelques exemples importants dont l'implication en thérapeutique est désormais très intéressante.

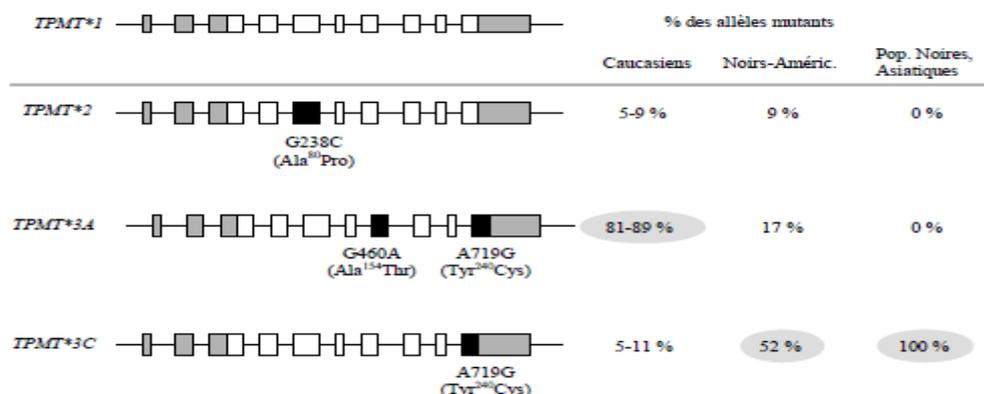
#### 5.1. Gènes de synthèse et de métabolisme des acides nucléiques

##### a. La thiopurine méthyltransférase

La thiopurine S-méthyltransférase (TPMT) est une enzyme cytosolique, qui catalyse la S-méthylation de composés sulfhydryles aromatiques ou hétérocycliques, comme la 6-mercaptopurine et la 6-thioguanine, en utilisant la S-adénosyl L-méthionine (SAM) comme donneur de groupement méthyle. L'activité de la TPMT chez l'homme est extrêmement variable d'un individu à l'autre et partage la population en trois catégories : un groupe majoritaire de sujets pour lesquels l'activité TPMT est élevée (méthyleurs rapides ou MR), un groupe d'individus pour lesquels l'activité est dite intermédiaire (méthyleurs intermédiaires ou MI) et un petit groupe de sujets pour lesquels l'activité TPMT est très réduite (méthyleurs limités ou lents ou ML) [67].

Au total, à ce jour, une trentaine de variants alléliques du gène de la TPMT a été identifiée. Parmi les plus fréquents (Figure 11), on retrouve l'allèle TPMT\*2 comparé à la séquence sauvage du gène (TPMT\*1), porte une mutation faux-sens dans l'exon 5 (G238C, Ala80Pro). Cette variation de séquence modifie la structure tertiaire de la protéine, ce qui altère la stabilité de l'enzyme, et entraîne sa dégradation rapide par protéolyse [68]. L'allèle TPMT\*3A, quant à lui, est porteur de deux mutations faux-sens, G460A (Ala154Thr) et A719G (Tyr240Cys), localisées au niveau des exons 7 et 10, respectivement [69]. Ces trois mutations sont les plus fréquemment rencontrées quelle que

soit l'origine ethnique des individus avec une fréquence élevée. Elles sont à l'origine des allèles non-fonctionnels de la TPMT [70].



**Figure 11** : Structure des allèles non fonctionnels de la TPMT les plus fréquents [70].

Le déficit d'activité TPMT apparaît sans conséquence, tant qu'ils ne sont pas exposés à un substrat exogène de l'enzyme, ce qui laisse supposer l'absence de fonction endogène pour cette enzyme [71].

Il s'est avéré que les enfants porteurs de ces variants, atteints des leucémies et traités par la 6-mercaptopurine ou la 6-thioguanine, ont une activité enzymatique réduite, voire nulle dans les érythrocytes où l'enzyme est normalement présente. Les hétérozygotes ont une activité enzymatique diminuée de moitié et les homozygotes ont une activité nulle. Le risque d'hémato-toxicité dose-dépendante est particulièrement élevé chez les patients présentant un phénotype déficitaire pour la TPMT. Aussi, chez ces patients, il est recommandé d'ajuster la posologie du traitement en diminuant les doses de thiopurines à 5-10 % des doses usuelles [72].

## b. La dihydropyrimidine déshydrogénase

C'est une enzyme de détoxification du 5-FU, qui appartient à la classe des antimétabolites de type antipyrimidique, dont l'action s'effectue essentiellement par l'inhibition de la synthèse de l'ADN. Le 5-FU est métabolisé à plus de 80 % par la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPYD) au niveau hépatique. Cette enzyme intervient, dans la première étape du catabolisme des bases pyrimidiques, en catalysant la réduction des thymines et des uraciles, respectivement en 5,6-dihydrothymine et 5,6-dihydrouracile. Le 5-FU est finalement éliminé sous forme de  $\beta$  alanine fluorée. Il existe une corrélation entre l'activité de la DPYD dans les cellules mononucléées sanguines et la clairance

systémique du 5-FU. La déficience complète de la DPYD s'accompagne d'une toxicité létale de la molécule. Cette déficience est liée à l'existence de différents SNP sur la longueur du gène, tous conduisant à une altération de l'activité de l'enzyme [73].

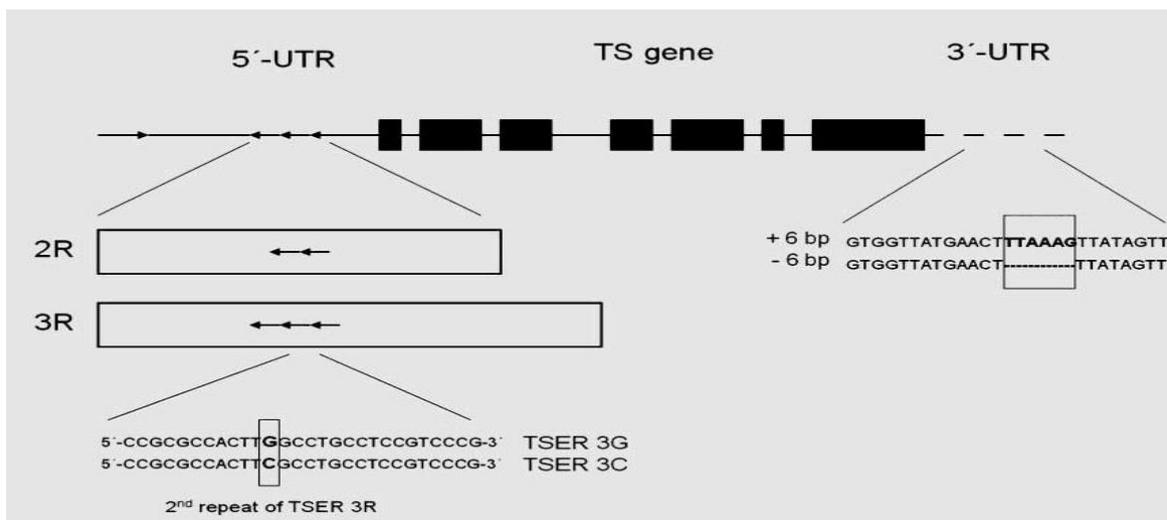
Plus de 30 polymorphismes génétiques dans le gène DPYD ont été rapportés. Parmi ces variants, 20 sont associés à une diminution de l'activité de la DPD[74]. Une faible activité de la DPD entraîne une diminution du catabolisme du 5-FU avec pour corollaire une augmentation de ses métabolites actifs et un risque de toxicité sévère au 5-FU, qui peut être létale. Une diminution d'activité de la DPYD est observée selon les études dans 40 à 60 % des cas de toxicité sévère au 5-FU. Les sujets présentant une diminution de l'activité de la DPYD ont un risque accru de toxicité grade 4 ou létale au 5-FU au minimum multiplié par 4 [74].

Cependant, un allèle apparaît prépondérant : il s'agit d'une substitution intronique d'une zone d'épissage flanquant l'exon 14 (IVS14+1G>A), qui aboutit à l'excision totale de l'exon 14 conduisant à une inactivation complète de l'enzyme. Les hétérozygotes ont un risque de toxicité accru en raison d'une quantité réduite de DPD. Cette mutation est présente chez près de la moitié des patients déficitaires et chez près de 30 % des patients ayant présenté une toxicité de grade 3 ou 4. La fréquence de l'allèle muté est de 0.9% [75].

### **c. La thymidylate synthase**

La thymidylate synthase (TS) est l'enzyme responsable de la transformation par méthylation de la dUMP (deoxyuridine-monophosphate) en dTMP (deoxytimidine-monophosphate), qui est ensuite phosphorylée en thymidine triphosphate TTP, laquelle est incorporée dans l'ADN. C'est une enzyme à deux substrats qui forme avec le dUMP et le méthylène tétrahydrofolate (MTHFR) un complexe ternaire où le MTHFR cède un groupe méthyl au dUMP [76].

Un polymorphisme du gène de la TS, le plus étudié, se situe au niveau de son promoteur : c'est un variant ayant deux au lieu de trois répétition en tandem d'une séquence de 28 paires de base. (Figure 12)



**Figure 12** : Polymorphisme de la TS [77].

L'homozygote 2R/2R présente une expression du gène trois fois supérieure à celle du variant 3R/3R: il en résulte une différence significative de la réponse des patients traité par 5-FU. Les patients présentant des taux bas de TS dans la tumeur avaient une survie significativement plus longue. Ce polymorphisme apparait particulièrement intéressant en raison de sa prévalence, l'allèle 2R ayant une fréquence d'environ 36% chez les caucasiens [78].

La TS constitue la cible du 5-FU et de certains analogues foliques. Le 5-FU, après sa transformation en 5-FdUMP (5 Fluorodeoxyuridine-monophosphate), qui, en se comportant comme un analogue du dUMP, inhibe la TS. Son niveau d'expression est inversement corrélé à la réponse au 5-FU [79].

#### **d. La méthylène TétraHydrofolate Réductase**

La MTHFR est une enzyme qui catalyse la conversion du 5, 10-méthylènetétrahydrofolate (5,10- MTHF) en 5-méthylènetétrahydrofolate (5-MTHF). Par la suite, le 5-MTHF provoque une reméthylation de l'homocystéine en méthionine qui est nécessaire pour la méthylation de l'ADN et la synthèse des purines. En outre, le complexe inhibiteur crucial dans l'activité du 5-FU comprend le 5,10-MTHF, conjointement avec la TS et dUMP [80].

Parmi les polymorphismes délétères dans le gène de la MTHFR, deux polymorphismes ont été repérés. Ces SNP modifient fonctionnellement le produit protéique. Ils sont responsables des taux plus faibles du 5,10- MTHF et associées à une

réduction de 70% à 40% de diminution de l'activité catalytique. L'impact des polymorphismes de la MTHFR sur l'efficacité du 5-FU a été rapporté *in vitro* et *in vivo* [81].

Le premier polymorphisme observé dans l'exon 4 est une substitution d'une C en T en position 677 et correspondant à un changement d'une Alanine en Valine en position 222 de la protéine. Des résultats contradictoires ont été relevés à partir de quelques études qui ont déterminé les effets cliniques de ce polymorphisme dans les traitements avec les fluoropyrimidines. Le second est la substitution A1298C (Glu429Ala), repéré dans l'exon 7 et réduit également l'activité de la MTHFR, mais, apparemment, moins sévèrement que C677T [82].

En résumé : la figure 13 représente le métabolisme du 5-FU et illustre l'intervention du DPYD, MTHFR et TS dans ces voies métaboliques

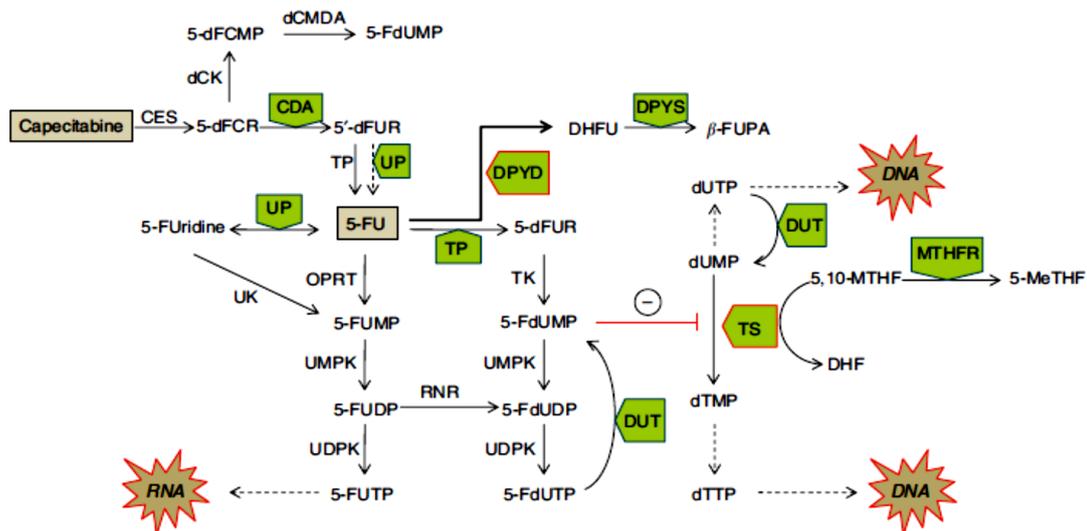
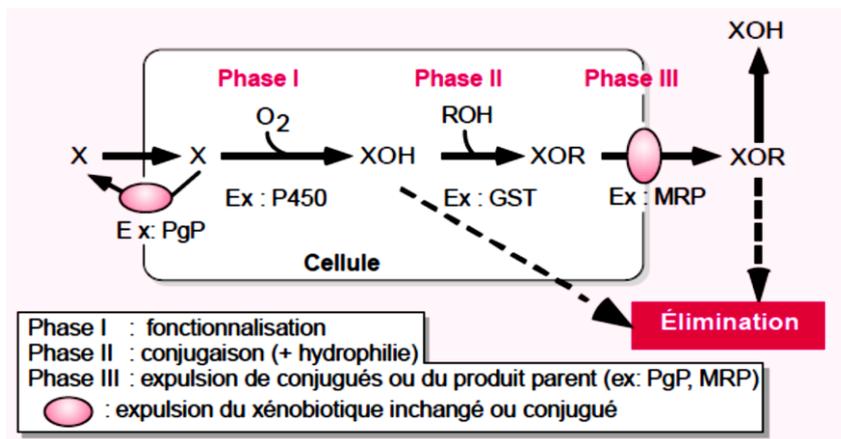


Figure 13: Métabolisme du 5-FU [80].

## 5.2. Gènes des enzymes du métabolisme et du transport de médicaments

Les médicaments sont généralement des molécules hydrophobes, qui pénètrent facilement dans la cellule. Ils peuvent en être expulsés par des protéines transmembranaires comme la Pgp (P-glycoprotéine) ou être métabolisés par fonctionnalisation (Phase I, exemple : les cytochromes P450) puis/ou par conjugaison (Phase II, exemple : les glutathion-transférases), en produits plus hydrophiles, ce qui facilite leur élimination hors de la cellule. L'élimination peut être directe ou effectuée par

l'intermédiaire de protéines comme les MRP (Multidrug Resistance Proteins) (Figure 14).



**Figure 14** : Représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques [83].

## 5.2.1. Gènes des enzymes du métabolisme

### a. Les cytochromes P450

Les cytochromes P450 (CYP450) sont des enzymes de phase I, ils ont été les plus étudiés sur le plan pharmacogénétique [84 - 86]. Pour les gènes CYP2A6 et CYP2D6, des duplications complètes ont été décrites, conduisant à un métabolisme accéléré des substrats et donc à une moindre efficacité thérapeutique par augmentation de la quantité de protéines. Dans le cas particulier de CYP2D6, un individu a exprimé jusqu'à treize copies du même gène. À l'inverse, le cytochrome CYP3A4, qui métabolise de nombreux anticancéreux (taxanes, irinotécan, vinca-alcaloïdes, cytophosphamide) ne semble pas présenter de polymorphisme doté de conséquences fonctionnelles : ce sont les conditions environnementales qui sont à l'origine des différences individuelles considérables de son activité. Cependant, le retentissement clinique a été longtemps controversé [87].

### b. L'UDP-glucuronoxyltransférase 1A1

L'UDP-glucuronoxyltransférase 1A1 (UGT 1A1) est une enzyme de phase II, elle est impliquée dans la détoxification de composés endogènes, comme la bilirubine et exogènes, comme certains médicaments, dont l'irinotécan, ou plus exactement le métabolite actif de ce dernier, le SN-38. Il existe un variant au niveau du promoteur du gène de l'enzyme, concernant le nombre de séquences TA dans la TATA box : Il s'agit de l'insertion d'un couple TA au niveau de la région (TA)<sub>6</sub>TAA du promoteur du gène



prédisposition au cancer ou encore dans le cadre de la résistance aux médicaments antinéoplasiques [91].

Le second polymorphisme est le C341T qui, se situe au niveau de l'exon 6 du gène. Ce polymorphisme amène également une modification dans la séquence des acides aminés allant d'une alanine vers une valine au codon 114 (Ala114Val), ayant pour impact fonctionnel une diminution de l'activité enzymatique de conjugaison chez les porteurs d'une valine d'environ 20% de son niveau de base [92].

### 5.2.2. Gènes des molécules de transport

La résistance tumorale à la chimiothérapie peut être liée à l'hôte ou aux altérations génétiques ou épigénétiques des cellules malignes. Cette résistance peut s'exprimer d'emblée ou peut être acquise lors du traitement, même après une phase initiale d'efficacité. Parmi les nombreux mécanismes de résistance, la résistance MDR est liée à une diminution de l'accumulation intracellulaire des agents cytotoxiques par accroissement de leur efflux hors de la cellule [93]. Plusieurs travaux ont ainsi montré l'implication probable de la surexpression de protéines de transport, du type MRP, dans la résistance aux traitements thiopuriniques [94 - 96].

Les gènes codant pour ces transporteurs représentent donc de bons gènes candidats dans les variations inter-individuelles de réponse aux traitements.

#### a. Le gène ABCB1

Le gène ABCB1 (ATP Binding Cassette B1) fait partie de la famille des gènes des transporteurs ABC, avec environ 50 membres, et se trouve sur le chromosome 7q21.12 contenant 29 exons.

Au vu de l'importance de la Glycoprotéine P (Pgp) dans le transport de nombreux substrats médicamenteux, des efforts ont été menés pour identifier les polymorphismes qui pourraient expliquer la variabilité interindividuelle de l'expression et des fonctions du transporteur. Certains de ces polymorphismes ont été associés avec une modulation de l'expression et de l'activité d'ABCB1 : quelque uns ont été impliqués dans les variations de la pharmacocinétique de substrats médicamenteux et dans la variabilité de la réponse biologique à ces traitements, et d'autres variants sont associés à la susceptibilité à certaines pathologies [97, 98].

Au total, ce sont 15 polymorphismes qui ont été identifiés dans les 28 exons du gène ABCB1 et six, d'entre eux, ont pour conséquence une altération de la séquence protéique. Les trois polymorphismes les plus courants dans la région codante de la protéine sont : 1236C>T, 3435C>T et 2677G>T/A, où plusieurs allèles ont été rapportés [99].

- 2677G>T/A : Est un polymorphisme triallèle correspond à une substitution d'une Serine en Alanine ou en Thréonine en position 893 de la protéine. Ce SNP a été associé à une augmentation de l'expression de l'ARNm dans les anthérocytes duodénaux. Par contre, l'homozygotie, pour l'allèle 2677T, a également été associée à une plus forte expression de la protéine dans les tumeurs colorectales [100]. Les chercheurs ont montré une augmentation de l'activité du transporteur dans des cellules exprimant le variant 893Ser in vitro. Bien que le mécanisme ne soit pas clair, il a été montré que certains résidus Sérine d'ABCB1 sont sujets à phosphorylation par la protéine kinase C. Il a été proposé que la modification de l'activité d'ABCB1 chez les porteurs du variant 893Ser, est liée à la phosphorylation du résidu Serine [101].
- 1236C>T : c'est un polymorphisme silencieux (Gly412Gly) dans l'exon 13 du gène MDR1. Bien que de nombreuses études aient entrepris de caractériser les associations phénotypiques potentielles pour ce SNP, les résultats restent controversés [102, 103]. Cependant, il a été montré qu'une meilleure réponse aux médicaments était associée aux homozygotes mutés CC [103].
- 3435C>T: Il s'agit également d'une mutation silencieuse (Ile1145Ile) dans l'exon 26 du gène ABCB1. En 2000, une étude réalisée par Hoffmeyer *et al.* impliquait que l'allèle 3435T générerait une fonction modifiée de la Pgp, et montre une association du génotype TT avec une faible expression de Pgp dans l'intestin [104]. Outre, d'autres chercheurs associent l'allèle muté à une diminution de l'expression d'ABCB1 dans le rein et dans les lymphocytes, selon lesquels le variant 3435T réduirait la stabilité de l'ARNm, bien qu'il soit sans effet sur la séquence protéique. Il doit correspondre à une séquence régulatrice de l'expression du gène ou bien être associée à une autre mutation, non encore identifiée, dans un haplotype précis [105].

### b. Les transporteurs SLC

Les transporteurs SLC «SoLute Carrier» sont des transporteurs actifs secondaires ou indirects. Ils n'utilisent pas directement l'ATP, mais l'énergie produite par une différence de potentiel électrochimique (un gradient d'ions) créé par un transport actif primaire. Quatre transporteurs du type SLC ont été décrits à ce jour comme potentiels pharmacogénétiques : SLC28A2 (CNT2), SLC28A3 (CNT3), SLC29A1 (ENT1) et SLC29A2 (ENT2) [106].

Les gènes codant pour ces quatre transporteurs sont tous polymorphes. Des mutations faux sens ont été identifiées sur le gène SLC28A2, mais ne semblent pas avoir de conséquences physiologiques, ce qui pourrait s'expliquer en partie par la redondance d'activité entre SLC28A1 et SLC28A2. Cependant, il a été démontré que, pour certains variants de SLC28A2, bien que leur fonction de transport ne soit pas altérée, leur spécificité de substrat peut être modifiée. Une mutation affectant le promoteur de SLC28A2 a, également, été caractérisée et est à l'origine d'une augmentation de l'expression de la protéine ayant pour conséquence une toxicité importante pour les traitements au Méthotrexate [107].

Une dizaine de mutations faux-sens ont été identifiées sur le gène SLC28A3. Parmi elles, une seule a un impact fonctionnel sur la protéine. Cette mutation, la G1099A (Gly367Arg), affecte un domaine très conservé de la protéine, impliqué dans la reconnaissance des substrats et diminue de 80 à 85 % la capacité de transport des purines et des pyrimidines [108].

Parmi les 39 mutations mises en évidence à ce jour sur le gène SLC29A1, seules quatre modifient la séquence codante mais qui n'ont pas encore été fonctionnellement analysées. Des polymorphismes situés en amont du site d'initiation de la transcription ont également été décrits. Parmi eux, les mutations -1345C>G et -1050G>A qui augmentent de façon significative l'expression de la protéine [109].

Cinq mutations affectant la séquence codante ont été identifiées sur le gène SLC29A2. L'une de ces mutations correspond à une délétion de 2 pb à l'origine de la synthèse d'une protéine tronquée non fonctionnelle et deux autres, c.551-556del (Délétion Gly185 et Val186) et c.13G>T (Asp5Tyr), codent pour une protéine dont la fonction de transport est significativement diminuée [110].

## 5.3. Gènes de réparation d'ADN

Un ensemble de mécanismes de réparation complexes permet à la cellule de détecter et réparer les dommages afin de sauvegarder l'intégrité de son génome et d'assurer sa survie. Chez l'humain, il existe cinq mécanismes majeurs de réparation de l'ADN : la réparation par excision de base « Base Excision Repair: BER », la réparation par excision de nucléotide « Nucleotid Excision Repair: NER », la réparation des mésappariements (MMR), la réparation des cassures double brin « Double Strand Break Repair: DSBR » et la réparation des agents pontant l'ADN « Cross-Link Repair: CLR ».

Dans les cancers, ces différents systèmes de signalisation et de réparation des lésions d'ADN sont fréquemment inactivés et contribuent ainsi à leur instabilité génomique et à leur progression. Ils peuvent être cependant aussi activés dans de nombreuses tumeurs et être aussi à l'origine d'une résistance aux traitements anticancéreux dont l'efficacité repose dans la majorité des cas, sur leur capacité à générer des lésions sur l'ADN [111].

La réparation par excision de base ou BER est une voie qui implique un certain nombre d'enzymes, dont l'une est XRCC1 (X-Ray Repair Cross Complementing 1). Un polymorphisme dans l'exon 10 du gène XRCC1 a montré une association avec la réponse au traitement, notamment, les dérivés du platine (Cisplatine, Carboplatine and Oxaliplatine). Ce polymorphisme était un SNP codant pour une arginine ou une glutamine au codon 399 [112]. Dans une étude de 61 patients atteints de cancer colorectal recevant un traitement avec 5-FU et Oxaliplatine, 73% des patients qui ont répondu avaient le génotype Arg/Arg, comparé à 66% des non répondeurs, qui avaient soit le génotype homozygote Glu ou hétérozygotes. La conséquence fonctionnelle de cela est la capacité réduite de réparation de l'ADN [113].

ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementation group 1) a été rapporté pour avoir plusieurs SNPs associés. Le gène ERCC1 code pour une hélicase, qui est essentielle à la voie de réparation de l'excision nucléotidique (NER). Dans une méta-analyse d'un total de 22 études incluant 2846 patients atteints de cancer colorectal traité par une chimiothérapie à l'Oxaliplatine. Le taux de survie a été analysé selon le génotype. Pour le polymorphisme C118T, les patients homozygotes CC ont montré une meilleure survie par rapport aux génotypes TT et CT [114].

Un polymorphisme a récemment été identifié sur le gène Xeroderma pigmentosum group D (XPD) ou ERCC2 impliqué dans le phénomène NER : une mutation A751C conduit à une substitution Lys>Glu et à une augmentation de l'efficacité de l'enzyme. Les variantes homozygotes Glu ont présenté une survie cinq fois plus brève que les homozygotes Lys [115].

D'autres membres du groupe ERCC (ERCC3, 4 et 5) ont été associés à un risque accru de divers cancers, mais leur rôle pharmacogénétique est moins bien documenté.

Les polymorphismes dans le gène hMSH2 ont été associés à une sensibilité accrue aux agents endommageant l'ADN. Cependant, d'autres gènes de réparation des mésappariements (MLH1) ont été notés pour conduire à la fois à l'inhibition de la topoisomérase et à la résistance des agents alkylants. Une étude qui a utilisé des lignées cellulaires de cancer du sein a démontré que la perte de la fonction MSH2 ou MLH1 a entraîné une résistance aux inhibiteurs de la topoisomérase II comme la doxorubicine et l'épirubicine [116].

Ainsi, la réparation des lésions sur l'ADN s'effectue de façon directe (sans incision de l'ADN) par alkylation faisant intervenir une enzyme : la O<sup>6</sup>-méthyle-guanine-méthyle-transférase (MGMT) qui s'est avérée influençant la fonction thérapeutique du temozolomide et améliore la survie du patient. Certaines études ont utilisé le statut de méthylation MGMT comme outil de stratification [117 - 119].

Dans de nombreuses formes de cancer humain, il a été montré que la MGMT était sous exprimé. S'il y a une expression accrue de cette enzyme, ceci peut conduire à une résistance aux agents anticancéreux, tels que Dacarbazine, Temozolomide, Nitrosureas et Streptozotocin. Dans les gliomes, le statut MGMT prédit une meilleure réponse tumorale à l'agent alkylant et une survie globale prolongée. Dans une étude impliquant des patients inopérables, une meilleure réponse tumorale au temozolomide a été observée chez des patients atteints de glioblastome avec hyperméthylation. Un polymorphisme fonctionnel (Gly160Arg), observé dans 15% des cas de population Japonaise, a considérablement réduit l'inactivation par MGMT comparé à l'allèle sauvage [120].



# ***Patient et méthodes***

## Patients et méthodes

Dans le cadre de nos travaux sur la pharmacogénétique du cancer du sein, la stratégie méthodologique utilisée consiste en une analyse structurale de gènes candidats, basée sur le criblage de leurs séquences codantes. Ces analyses sont éventuellement complétées par des études de corrélation phénotype/génotype.

Notre recherche est une étude prospective, portant sur 117 sujets. L'échantillonnage a été recruté au sein du service d'oncologie médicale du Centre Hospitalier Universitaire Ben Badis de Constantine (CHUC), et la réalisation pratique du travail s'est effectuée au niveau du laboratoire de recherche de Biologie et de Génétique Moléculaire (Université Constantine 3) ainsi qu'au niveau du laboratoire de Biologie spécialisé et oncogénétique située à l'Institut Régionale du Cancer (ICM) de Montpellier, France.

### 1. Echantillonnage

Le recrutement des sujets a été réalisé au niveau du service d'oncologie médicale du CHUC. Des critères d'exclusion et d'inclusion ont été établis pour cette population.

- **Les sujets inclus :** sont des femmes ayant un cancer du sein tout âge confondu, et bénéficiant d'une chimiothérapie (néo-) adjuvante avec un protocole contenant le 5-FU (F), le cyclophosphamide (C) et la doxorubicine (A) : FAC ou l'épirubicine (E) : FEC.
- **Les sujets exclus :** nous avons écarté tout patient atteint d'un autre cancer et non traité par un protocole de chimiothérapie FAC / FEC. Les sujets fatigués, difficile à piquer et/ou qui ont les veines déshydratées ainsi ceux qui ont refusé de signer notre fiche de consentement.

Un questionnaire comprenant toutes les données nécessaires est établi pour la population d'étude (Annexe 1). Tous les renseignements nécessaires sont enregistrés après consultation du dossier médicale et interrogation de la patiente. Toutes les patientes participant à notre recherche ont fourni un consentement éclairé et signé, explicitant les implications et les limites de leur participation à l'étude (Annexe 2). Chaque patiente était suivie au service d'oncologie médicale du CHUC.

## 2. Stratégies d'évaluation de la réponse tumorale

Pour évaluer la réponse tumorale de manière objective, il est nécessaire d'estimer précisément la masse tumorale initiale à laquelle toutes les évaluations ultérieures seront comparées. Les mêmes méthodes et techniques (cliniques, biologiques et radiologiques) de mesure doivent être utilisées lors de chaque évaluation tumorale avant, pendant et après le traitement étudié. Seules les réponses décrites et confirmées après au moins 4 semaines seront prises en compte pour définir la réponse globale.

- **Critères de réponse :**

Il existe 2 types de critères de l'évaluation tumorale : les critères de l'OMS et les critères RECIST (*RESPONSE EVALUATION CRITERIA IN SOLID TUMORS*) [121]. Les critères OMS utilisés depuis 1979, ont été supplantés par le groupe RECIST fondé en 1994 par plusieurs groupes de recherche clinique en cancérologie dont les objectifs sont de réviser et de modifier les critères originaux de l'OMS afin de créer de nouveaux critères dit de références simplifiés pour évaluer la réponse tumorale dans les tumeurs solides [122].

Dans un premier temps, nous avons retenu les critères utilisés pour déterminer objectivement la réponse tumorale sur les lésions cibles comme suit:

- ✓ **la réponse complète** est représentée par la disparition de toutes les lésions cibles.
- ✓ **la réponse partielle** indique une diminution d'au moins 30% de la somme des plus grands diamètres de chaque lésion cible, en prenant pour référence la somme initiale des plus grands diamètres.
- ✓ **la progression tumorale** est mentionnée lors de l'augmentation d'au moins 20% de la somme des plus grands diamètres de chaque lésion cible, en prenant pour référence la plus petite somme des plus grands diamètres, rapportée depuis le début du traitement, ou l'apparition d'une ou de plusieurs nouvelles lésions.
- ✓ **la stabilité tumorale** est notée par une diminution tumorale insuffisante pour définir une réponse partielle et/ou augmentation tumorale inférieure à celle nécessaire pour définir une progression tumorale, en prenant pour référence la plus petite somme des plus grands diamètres depuis le début du traitement.

Dans un second temps, nous avons inclus dans les critères précédents pour la détermination objective de la réponse tumorale sur les autres lésions mammaires :

- ✓ **la réponse complète** est la disparition de toutes les autres lésions et normalisation des marqueurs tumoraux.
- ✓ **la réponse incomplète/stabilité tumorale** est représentée par la persistance d'une ou de plusieurs autres lésions et/ou la persistance de la valeur du marqueur tumoral au-dessus des valeurs normales
- ✓ **la progression tumorale** est évoquée lors de l'apparition d'une ou de plusieurs nouvelles lésions et/ou progression franche des autres lésions existantes.

La réponse globale se définit comme la réponse tumorale rapportée depuis le début du traitement jusqu'à la progression, la récurrence ou la rechute de la maladie, en prenant pour référence, pour définir une progression tumorale, la plus petite mesure rapportée depuis le début du traitement.

Le tableau 4 donne toutes les possibilités de réponse globale en tenant compte de toutes les combinaisons possibles de réponses tumorales sur les lésions cibles et les autres lésions.

**Tableau 4** : Détermination de la réponse tumorale globale [122]

Lésions cibles	Autres lésions	Nouvelles lésions	Réponses globales
RC	RC	Non	RC
RC	Réponse incomplète/S	Non	RP
RP	Non-P	Non	RP
S	Non-P	Non	S
P	Toute réponse	Oui ou non	P
Toute réponse	P	Oui ou non	P
Toute réponse	Toute réponse	Oui	P

RC=Réponse complète; RP=Réponse partielle; S=stabilité tumorale; Non-P=non progression; P=progression tumorale

### 3. Etude moléculaire

Différentes techniques relatives à l'étude moléculaire ont été mise en place: une extraction de l'ADN, la spectrophotométrie, une technique de polymérisation en chaîne PCR (*Polymerase Chain Reaction*), une PCR quantitative en temps réel ou HRM (*High*

*Resolution Melting*), une méthode de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), et le séquençage directe.

### 3.1. Prélèvement sanguin

Le prélèvement sanguin doit respecter les critères suivants :

- Le prélèvement s'est effectué sur les patientes répondant aux critères d'inclusions de notre étude.
- L'accord de la patiente et l'obtention de son consentement sont obligatoires.
- Le prélèvement est réalisé dans un tube EDTA (*Ethylen Diamin tetra acetic Acid*) sous vide.

### 3.2. Extraction de l'ADN

Il s'agit d'obtenir des acides nucléiques adaptés aux tests à pratiquer et dont la qualité doit être compatible avec le type d'analyse programmé. L'extraction de l'ADN à partir d'un prélèvement sanguin est une technique permettant d'isoler l'ADN contenu dans les leucocytes. La méthode d'extraction choisie est une extraction au NaCl à 4M.

Les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN. Ils sont séparés du sang total par une lyse hypotonique et traités ensuite par le Sodium dodécyle sulfate (SDS) afin de dénaturer les lipoprotéines membranaires et les enzymes lysosomiales et libère ainsi l'ADN tout en préservant sa structure et une protéinase K; La pelote d'ADN est formée par précipitation avec l'éthanol glacé. L'ADN est solubilisé en phase aqueuse. (Annexe 6)

### 3.3. Estimation qualitative et quantitative d'ADN

#### ➤ estimation qualitative

La pureté de l'ADN extrait est appréciée en mesurant la densité optique des extraits à 260 et 280 nm qui correspondent, respectivement, aux longueurs d'onde d'absorption des acides nucléiques et des protéines, en effectuant le rapport de DO à 260 nm sur la DO à 280 nm.

- Si le rapport  $DO_{260}/DO_{280}$  est compris entre 1.6 et 2  $\Rightarrow$  l'ADN est suffisamment pur.
- Si le rapport  $DO_{260}/DO_{280} > 2 \Rightarrow$  l'ADN est contaminé par les ARN.

- Si le rapport  $DO_{260}/DO_{280} < 1,6 \Rightarrow$  l'ADN est contaminé par les protéines.

L'ADN pur est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation, et dans le cas de contamination par des ARN ou par des protéines, une réextraction est nécessaire pour un bon usage.

➤ **estimation quantitative**

La densité optique à 260 nm permet de calculer la concentration de l'ADN sachant que :

$$\mathbf{1 \text{ unité de } DO \text{ 260 nm} = 50 \text{ } \mu\text{g} / \mu\text{l d'ADN double brin}}$$

En prenant en considération que l'ADN obtenu est dilué à 1/100, la quantité obtenue est multipliée par 100 et la concentration est calculée selon la formule suivante :

$$\mathbf{[ADN] \text{ } \mu\text{g} / \mu\text{l} = \text{facteur de dilution} \times DO \text{ 260} \times 50 \text{ } \mu\text{g} / \mu\text{l}}$$

*Exemple :*

Pour un ADN solubilisé dans 1000  $\mu\text{l}$  de l'eau distillée ayant une  $DO_{260 \text{ nm}}$  de 0,139 la concentration est 6,95  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Considérant que l'ADN est dilué à 1/100 (10  $\mu\text{l}$  de l'ADN dilué dans 990  $\mu\text{l}$  d'eau stérile), donc le facteur de dilution est égal au rapport de volume total (1000 $\mu\text{l}$ ) sur le volume d'ADN (10 $\mu\text{l}$ ) soit un facteur de dilution égal à 100.

Donc le résultat portant la concentration finale est de  $6,95 \times 100 = 695 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

#### 4. Choix des gènes

Les gènes candidats que nous avons pris pour cette étude ont été choisis en fonction de leur implication dans la résistance à la chimiothérapie à base des trois molécules utilisées dans le traitement du cancer du sein : le 5-FU (F), le cyclophosphamide (C) et la doxorubicine (A) ou l'épirubicine (E). (Tableau 5)

**Tableau 5** : Présentation des polymorphismes de l'étude

<b>Gène et localisation</b>	<b>Le polymorphisme</b>	<b>Médicament</b>	<b>Fonction du produit du gène</b>
<b>DPYD 1p22</b>	DPYD*2A (IVS14+1G >A) rs3918290	5-FU	Enzyme impliqué dans la dégradation des pyrimidines et l'uracile analogue utilisé en chimiothérapie, le 5-FU
<b>MTHFR 1p36.3</b>	C677T (p.Ala222Val) rs1801133  A1298C (p.Glu429Ala) rs1801131	5-FU	Enzyme responsable du métabolisme du folate nécessaire pour la méthylation de l'ADN et la synthèse des purines
<b>GSTP1 11q13.2</b>	A313G (p.Ile105Val) rs1695	Cyclophosphamide	Enzyme de détoxification et de phase II du métabolisme des médicaments
<b>ABCB1 7q21.1</b>	G2677T/A (p.Ser893Ala/Thr) rs2032582  C3435T (p. Ile1145Ile) rs1045642	Les anthracyclines	Transporteur de drogues; Impliqués dans le transport des agents cytotoxiques hors de la cellule

## 5. Analyse moléculaire

Les différentes techniques de génotypage qui ont été utilisées pour la caractérisation des marqueurs génétiques de notre étude sont :

- Une technique de PCR RFLP.
- PCR quantitative en temps réel.
- Une technique de séquençage directe.

### 5.1. Génotypage par PCR-RFLP

Pour la mise en évidence des polymorphismes : IVS14+1G>A du gène DYPD, C677T et le A1298C du gène de la MTHFR et I105V du gène GSTP1 ; nous avons procédé à un génotypage par la PCR/RFLP qui s'est déroulé selon les étapes suivantes :

- Une amplification par PCR.
- Un contrôle des produits PCR par une électrophorèse sur gel d'agarose
- Une digestion du produit de PCR par l'enzyme de restriction spécifique à chaque polymorphisme.
- Une migration électrophorétique sur gel d'agarose pour la séparation des produits de digestion.

#### 5.1.1. Amplification par PCR

La réaction de polymérisation du fragment d'ADN cible est réalisée en utilisant les réactifs suivants : Un kit *Biomatik* contenant une enzyme de polymérisation la *Taq* DNA Polymérase utilisée à une concentration de 5 U/ $\mu$ l, tampon 10X nommé PCR Reaction Buffer  $Mg^{+2}$  Free et d'un  $MgCl_2$  utilisé à une concentration stock de 25 Mm. De désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) dont la concentration de la solution stock est de 25 mM pour chaque base. Le mélange réactionnel est complété par l'ajout des amorces spécifiques à la séquence d'ADN à amplifier (Tableau 6).

De manière générale, le déroulement de l'amplification comporte une dénaturation de 5 min à une température de 94°C à 96°C, cette procédure est communément appelée *hot start* et un cycle d'amplification produit trois températures différentes:

- **une dénaturation** : la première étape s'effectue à la même température de dénaturation initiale. À cette température, l'ADN matriciel, qui sert de matrice au cours de la réplication, est dénaturé : les liaisons hydrogènes ne peuvent pas se maintenir à une température supérieure à 80°C et les ADN doubles brins se dénaturent en ADN simples brins.
- **une hybridation** : la deuxième étape s'effectue à une température généralement comprise entre 50 et 70°C, dite température d'hybridation des amorces. La diminution de la température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider. Les amorces qui sont de courtes

séquences monocaténaire complémentaires à la région encadrant la séquence d'intérêt, s'hybrident aux brins d'ADN matriciel.

- **une élongation** : la troisième période s'effectue à une température de 72°C, dite température d'élongation. À 72°C, la *Taq* polymérase se lie aux ADN monocaténaire amorcés et catalyse la réplication en utilisant les dNTPs.

Les conditions d'amplification sont caractéristiques à chaque gène (Tableau 6). Parallèlement un échantillon sans ADN (blanc) est inclus dans la série à amplifier et sert de contrôle négatif.

**Tableau 6:** Représentation des différentes amorces spécifique de chaque SNP et leurs programmes de PCR

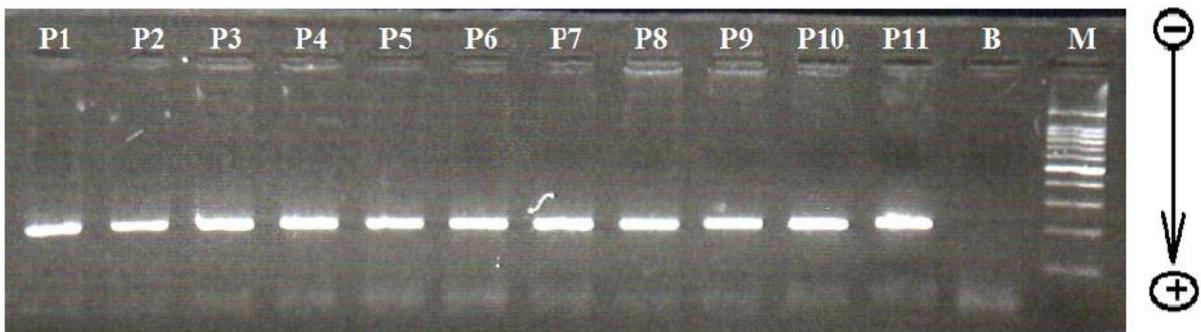
Gène et polymorphismes	Amorces	Programme de PCR
<b>DPYD</b> <b>IVS14 + 1 G&gt;A</b> <b>rs3918290</b> <b>DPYD*2A</b>	5'-ATCAGGACATTGTGACATATGTTTC-3' 5'-CTTGTTTTAGATGTTAAATCACACATA-3'	<b>Dénaturation</b> 5 min à 95°C <b>35 Cycles</b> : 15 sec à 95°C 15 sec à 60°C 25 sec à 72°C <b>Elongation</b> 8 min à 72°C
<b>MTHFR</b> <b>p.Ala222Val</b> <b>C677T</b> <b>rs1801133</b>	5'-TGAAGGAGA AGG TGTCTG CGG GA-3' 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'	<b>Dénaturation</b> 5 min à 94°C <b>30 Cycles</b> : 30 sec à 94°C 30 sec à 65°C 30 sec à 72°C <b>Elongation</b> 10 min à 72°C
<b>MTHFR</b> <b>P.Glu429Ala</b> <b>A1298C</b> <b>rs1801131</b>	5'-GGAGTGTGCCCTGACCTCT-3' 5'-CCACTCCAGCATCACTCAC -3'	<b>Dénaturation</b> 5 min à 95°C <b>35 Cycles</b> : 30 sec à 95°C 30 sec à 60°C 45 sec à 72°C <b>Elongation</b> 10 min à 72°C
<b>GSTP1</b> <b>p.I105V</b> <b>(c.330A&gt;G)</b> <b>rs1695</b>	5'- ACCCCAGGGCTC TAT GGG AA -3' 5'- TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT -3'	<b>Dénaturation</b> 5 min à 95°C <b>35 Cycles</b> : 30 sec à 95°C 30 sec à 55°C 30 sec à 72°C <b>Elongation</b> 10 min à 72°C

## 5.1.2. Contrôle des produits PCR

En amont du dépistage des mutations par RFLP, les fragments cibles sont amplifiés par PCR. La conformité de la PCR, c'est-à-dire l'amplification spécifique du fragment et l'absence de contamination, est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (2 g d'agarose dans 100 ml de TBE 1X (Tris Borate EDTA) (Tris base 45 mM, Acide Borique 25 mM, EDTA 12,5 mM, pH 8) additionné de 10 µl du Bromure d'Ethidium (BET). Le gel est déposé sur une plaque d'une cuve horizontale.

Dans chaque puits du gel, nous déposons 10 µl de produits PCR en présence de 2 µl du Bleu de Bromophénol (BBP) qui permet de suivre le front de migration. Les fragments d'ADN chargés négativement migrent dans un champ électrique et la migration de la cathode et vers l'anode dépend de leurs tailles. Le système est soumis sous un courant de 60 à 100 volts pendant 30 à 45 mn.

Après la migration, le gel est soumis au rayon UV et photographié. Les molécules de BET s'intercalent entre les bases nucléotidiques de l'ADN et émettent une coloration rouge. Les fragments amplifiés sont visibles sous forme de bandes fluorescentes de même taille pour chaque gène (Figure 16). Ce contrôle permet de confirmer la bonne réussite de l'amplification aussi de vérifier si une éventuelle contamination de l'ADN est survenue grâce au contrôle négatif (apparition de bande dans le puits du blanc).



**Figure 16** : Résultat observé d'un contrôle des produits PCR (gène MTHFR : A1298C),  
 B : le contrôle négatif, P : patient, M : marqueur de taille (100 pb)

## 5.1.3. Digestion enzymatique des produits PCR

Les produits PCR sont soumis à une digestion enzymatique par une enzyme de restriction spécifique pour la détection de chaque polymorphisme.

La préparation du milieu réactionnel de digestion se fait selon les conditions de manipulation de chaque enzyme. (Tableau 7)

**Tableau 7:** Processus de digestion enzymatique pour chaque gène

Gène et polymorphismes	Enzyme de restriction	Préparation du mélange réactionnel	Conditions d'incubation
<b>DPYD</b> <b>IVS14 + 1 G &gt;A</b> <b>rs3918290</b> <b>DPYD*2A</b>	<i>NdeI</i> Kit Thermo Scientific FastDigest™	18 µl H <sub>2</sub> O 2 µl tampon10X 10 µl DNA (pPCR) 2 µl enzyme	≥60 min à 37°C
<b>GSTP1</b> <b>p.I105V (c.330A&gt;G)</b> <b>rs1695</b>	<i>Alw26I</i> Kit Thermo Scientific FastDigest™	17 µl H <sub>2</sub> O 2 µl 10X Fast Digest 10 µl DNA (pPCR) 1 µl enzyme	Une nuit à 37°C Optionnel : 5 min à 65°C
<b>MTHFR</b> <b>p.Ala222Val</b> <b>C677T</b> <b>rs1801133</b>	<i>HinfI</i> Kit Thermo Scientific FastDigest™	17 µl H <sub>2</sub> O 2µl tampon10X 10µl DNA (pPCR) 1 µl enzyme	Une nuit à 37°C
<b>MTHFR</b> <b>P.Glu429Ala</b> <b>A1298C</b> <b>rs1801131</b>	<i>MboII</i> Kit Thermo Scientific FastDigest™	17 µl H <sub>2</sub> O 2 µl tampon10X 10 µl DNA (pPCR) 1 µl enzyme	Une nuit à 37°C

#### 5.1.4. Electrophorèse des produits de la digestion

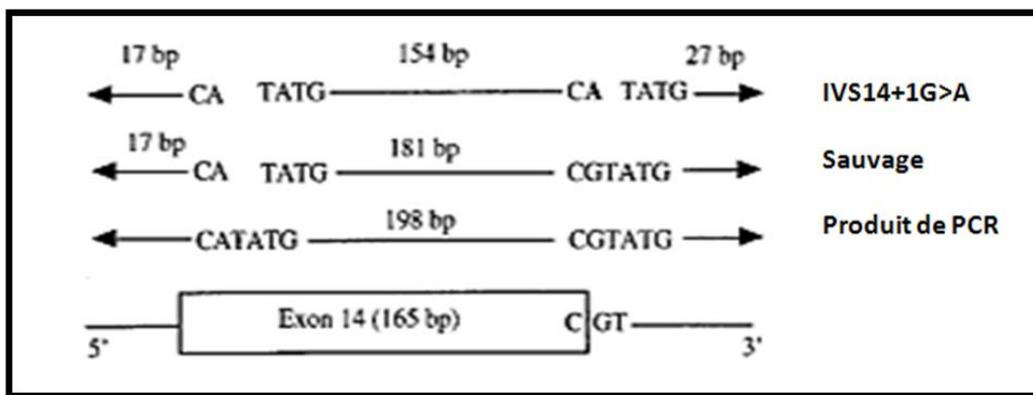
Les fragments d'ADN digérés par l'enzyme de restriction sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 3% pour les polymorphismes IVS14 + 1 G >A du gène DPYD, C677T du gène de la MTHFR et I105V du gène GSTP1. Par contre la séparation des fragments de digestion pour le polymorphisme A1298C du gène de la MTHFR est faite sur un gel d'agarose NuSieve 3:1 à 4%.

La migration des fragments d'ADN dépend de leurs tailles : plus le fragment a une grande taille, moins la migration électrophorétique par rapport au puits d'inclusion est importante. A l'inverse des fragments de petite taille ont une distance de migration plus

élevée. Lorsqu'on obtient une nette séparation des différents fragments du marqueur de taille, le gel est photographié après transillumination aux UV.

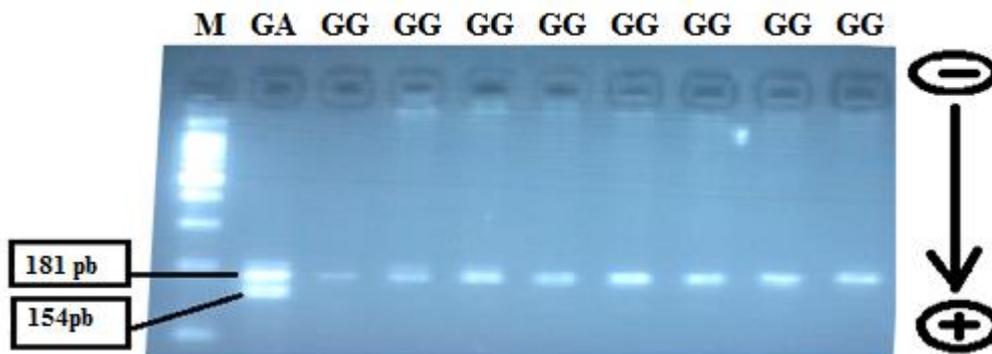
### a. Profils de digestion du gène DPYD :

La taille de l'amplicon était de 198 pb. L'enzyme de restriction *NdeI* reconnaît et clive la séquence 5'-...CATATG...-3'. La présence d'une mutation IVS14+1G>A crée un site de coupure pour l'enzyme de restriction *NdeI* (Figure 17). A ce moment il est possible de définir le génotype de chaque échantillon : Le génotype homozygote sauvage (GG) est représenté par une seule bande de 181 pb, les homozygotes mutés (AA) avec une bande de 154 pb et les hétérozygotes (GA) sont visualisés par deux bandes de 154 pb et de 181 pb.



**Figure 17** : Profil de restriction par *NdeI*

Ci-dessous, le profil électrophorétique des résultats obtenus (Figure 18).

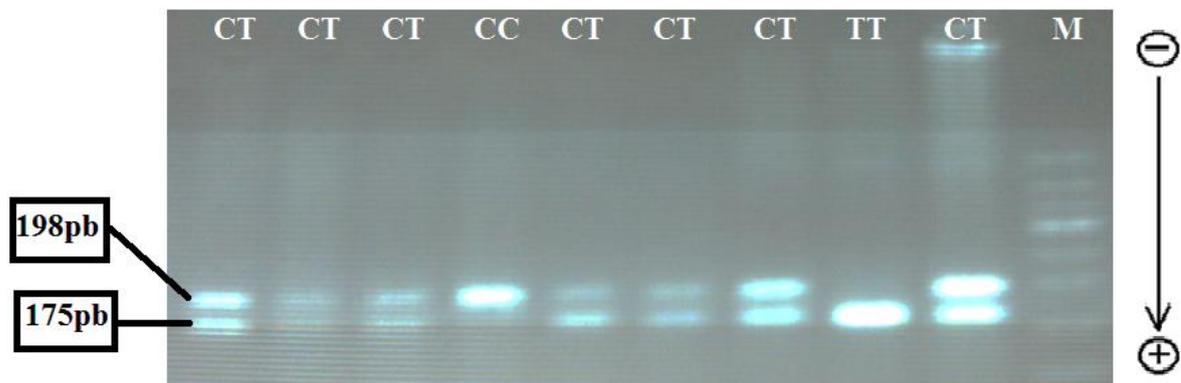


**Figure 18** : Photographie d'un profil de digestion du polymorphisme IVS14 + 1 G > A du gène de la DPYD ; M : un marqueur de poids moléculaire de 100 pb.

**b. Profils de digestion du gène MTHFR**

- **le polymorphisme C677T**

L'enzyme de restriction *HinfI* reconnaît et clive la séquence 5'-GATTC-3'. La présence d'une mutation C677T crée un site de coupure pour l'enzyme de restriction *HinfI*, le profil électrophorétique (RFLP) est représenté dans la figure 19 pour chacun des génotypes : le génotype homozygote TT, une bande correspondant à un fragment d'ADN de 175 pb, le génotype hétérozygote CT avec deux fragments d'ADN de 175 pb et 198 pb et le génotype homozygote de type sauvage CC donnant une bande de 198 pb.

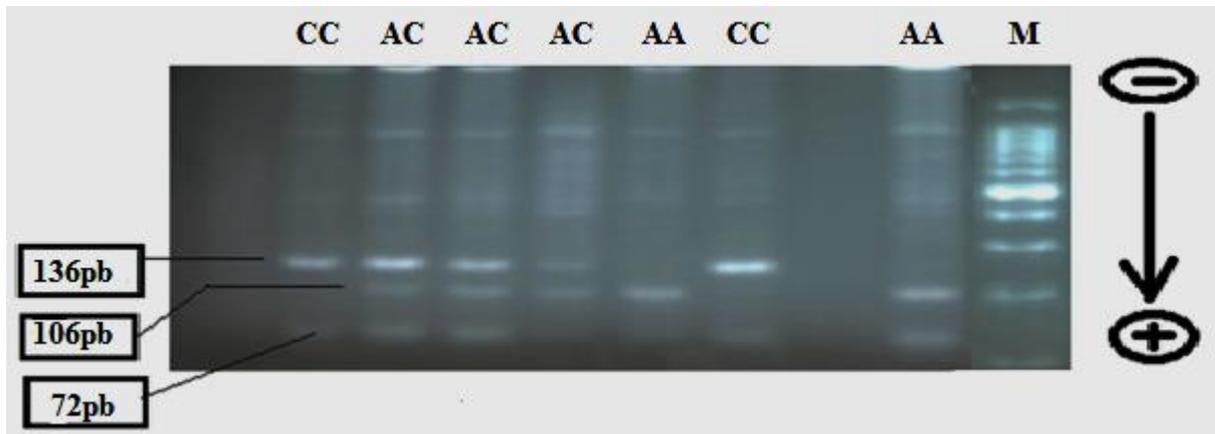


**Figure 19** : Photographie d'un profil de digestion du polymorphisme C677T du gène de la MTHFR

- **le polymorphisme A1298C**

Pour la mise en évidence du polymorphisme A1298C, le produit PCR de taille de 236 pb est digéré par l'enzyme de restriction *MboII* qui reconnaît et clive la séquence 5'...GAAGA (N)<sub>8</sub>...3'. La présence d'une cytosine en position 1298 au lieu d'une adénine abolit un site de restriction pour la *MboII*. Nous avons observé le résultat de la digestion de l'amplicon: Le génotype homozygote sauvage AA donne quatre fragments de 106, 72, 30, et 28 pb, alors que le génotype muté CC donne trois fragments à 136, 72 et 28 pb, le fragment de 136 pb étant la somme des deux fragments 106 et 30 pb comprenant le site de la mutation. Chez les hétérozygotes AC la digestion donne les fragments de 136, 106, 72, 30 et 28 pb. Cependant, il est à noter que dans les différents profils de migration, les fragments de 30 et de 28 pb ne seront pas visibles sur le gel.

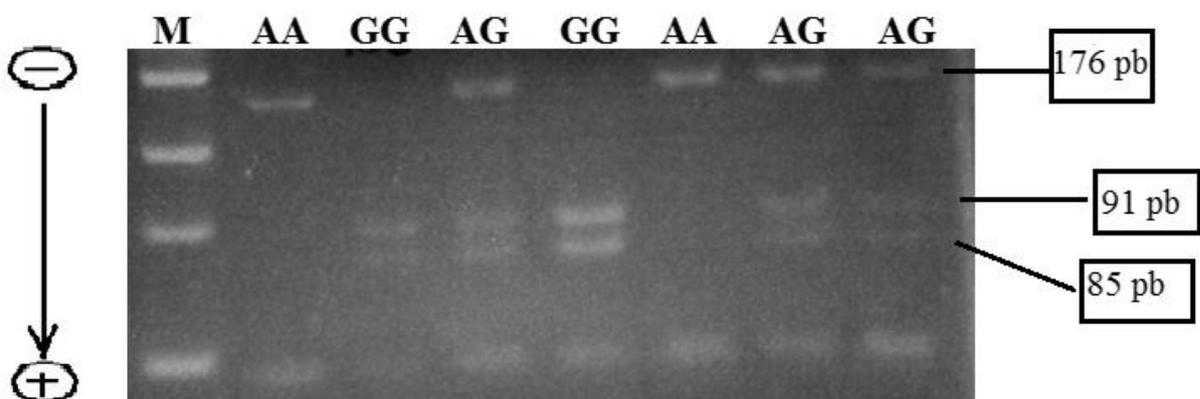
Le profil de digestion pour le locus A1298C du gène MTHFR est photographié (Figure 20).



**Figure 20** : Photographie d'un profil de digestion du polymorphisme A1298C du gène de la MTHFR ; M : un marqueur de poids moléculaire de 50 pb.

### c. Profils de digestion du gène GSTP1 :

Après amplification par PCR classique d'un fragment de l'exon 5 du GSTP1, nous avons obtenu un amplicon de taille de 176 pb. L'enzyme de restriction *Alw26I* est spécifique de la reconnaissance de la séquence 5'...GTCTC(N)<sub>5</sub>...3'. Elle permet de mettre en évidence la substitution A313G créant un site de coupure. S'il y a mutation, la digestion produit deux fragments de 91 et de 85 pb et, par conséquent, on peut faire la différence avec les sujets homozygotes sauvages qui donnent une bande à 176 pb, tandis que les hétérozygotes portent trois bandes distinctes de 176, 91 et 85 pb. (Figure 21)



**Figure 21** : Photographie d'un profil de digestion du polymorphisme A313G du gène GSTP1. M : un marqueur de poids moléculaire de 50 pb.

## 5.2. Génotypage par séquençage

La possibilité d'analyser les deux polymorphismes G2677T/A et C3435T du gène ABCB1 repose d'une part de la PCR-RFLP et d'autre part du séquençage directe.

La mise en évidence du polymorphisme tri-allélique G2677T/A par PCR RFLP a nécessité la réalisation de deux réactions différentes à la fois par leurs amorces et leurs enzymes de restriction, ce qui augmente le coût et allonge la durée. Aussi nous sommes nous invertis dans le séquençage directe.

Le séquençage de l'ADN, consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné. Dans un premier temps, le brin d'ADN à séquencer est amplifié, l'amplification s'effectue par une PCR quantitative en temps réel ou PCR HRM. Cette étape est suivie d'une purification des produits PCR et enfin une PCR séquence sera réalisé.

Cette démarche a été utilisée pour la mise en évidence des polymorphismes G2677T/A et C3435T du gène ABCB1. Chacun des deux polymorphismes du gène aura ces amorces spécifiques encadrant la région d'intérêt (Tableau 8)

**Tableau 8** : Les amorces spécifiques de chaque polymorphisme du gène ABCB1

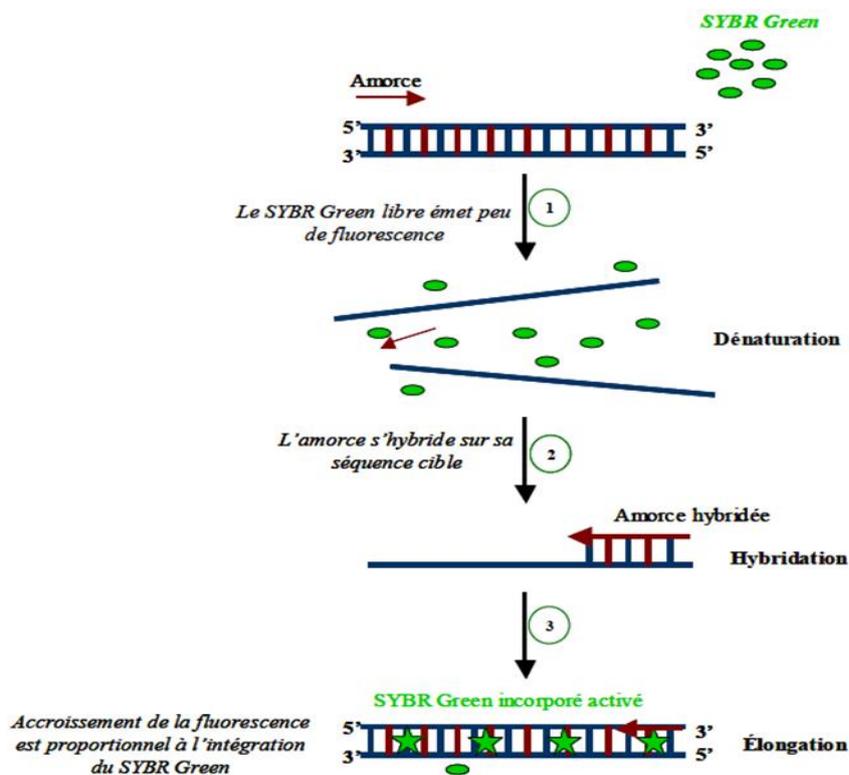
Gène et polymorphismes	Amorces
<b>ABCB1</b> <b>G2677T/A</b> <b>p. Ser893Ala/Thr</b> <b>rs2032582</b>	5'- ATTGCAATAGCAGGAGTTGT-3' 5'- CTGGCTTTGCTACTTTCTGT-3'
<b>ABCB1</b> <b>C3435T</b> <b>p. Ile1145Ile</b> <b>rs1045642</b>	5'- ACAATTATGACCTTGTTGGG-3' 5'-TTCTCTTCACTTCTGGGAGA-3'

### 5.2.1. Amplification par PCR quantitative en temps réel

La technologie de la PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est

directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR (Bustin SA, 2000). Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (*Double-stranded DNA binding dyes: Lightcycler assay*) comme le *SYBR Green* et les sondes fluorescentes. Dans notre cas, le choix a porté sur le *SYBR Green*.

Durant la dénaturation, le *SYBR Green* libre exhibe peu de fluorescence. À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au double brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel (Figure 22).

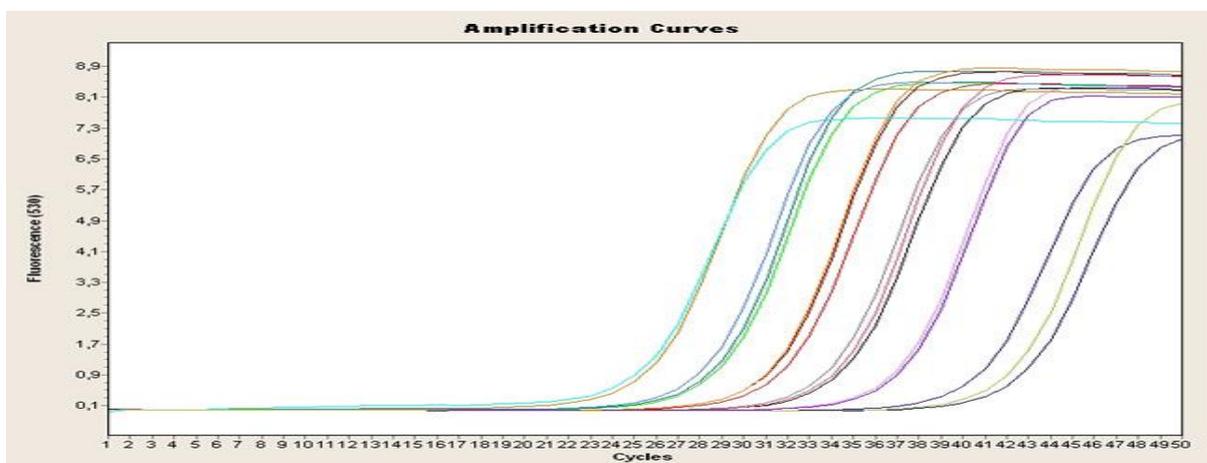


**Figure 22** : Principe de la PCR-HRM (*Double-stranded DNA binding dyes: Lightcycler assay*) : méthode du *SYBR Green* [123]

La réaction de PCR est réalisée dans un volume final de 20 µl, comprenant 10 ng/µl d'ADN, 200 nM de chaque amorce (*euofins MWG Operon, Ebersberg, Allemagne*) spécifique pour chaque polymorphisme (tableau 07), 3 mM de MgCl<sub>2</sub> et le master mix à 1X final «*LightCycler 480 HRM* », contenant le *SYBR green*, les dNTPs et une *Taq* polymérase (*Quantitect SYBR Green PCR ; Qiagen*). Le programme de PCR comporte 3

étapes : une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, suivie par un programme d'amplification de 45 cycles (20s à 95°C, 20s à 55°C, 30s à 72°C) avec une lecture unique de la fluorescence de SYBR green en fin de chaque élongation, terminé par un programme de courbe de fusion : dénaturation à 95°C, renaturation des brins d'ADN par abaissement progressive de la température à 95°C pendant 5 s, 65°C pendant 30s, 40°C pendant 5 s, puis dénaturation lente par élévation de la température de 65°C à 95°C à 0,1°C/s, avec une lecture de la fluorescence en continu.

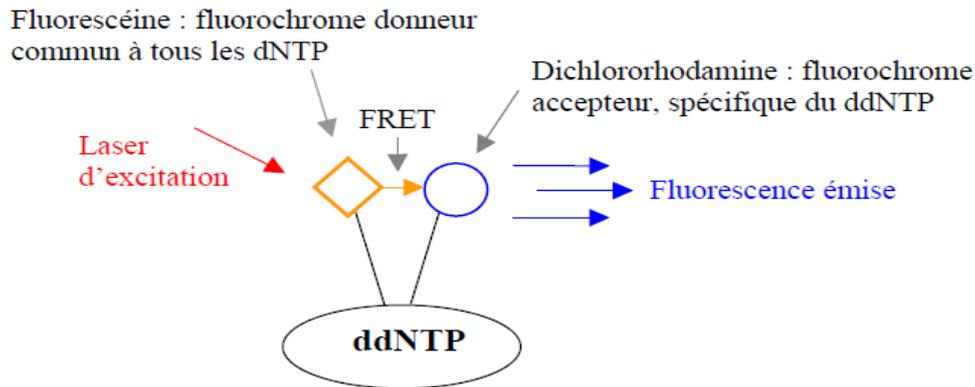
Les résultats sont analysés par la méthode Fit Point à l'aide du logiciel *LightCycler* 480 version 1.3.0.0705. La courbe de fusion, à la fin du programme, permet de vérifier la spécificité de chaque amplification (Figure 23).



**Figure 23** : Représentation de la courbe de fusion

### 5.2.2. Principe du séquençage

Pour le séquençage, nous avons employé la méthode de Sanger (méthode de terminaison en chaîne par colorant terminateur) sur appareils d'analyse génétique à 16 capillaires 3130XL de la compagnie Applied Biosystems par l'utilisation de la technologie Big Dye Terminator® (Applied Biosystems : ABI). Cette technologie utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un linker : un fluorochrome donneur et un fluorochrome accepteur, ce dernier est différent pour chaque type de ddNTP (Figure 24).



**Figure 24** : Mécanisme de fluorescence par la technique de transfert d'énergie par résonance.

Le principe fondamental de la méthode de Sanger a été l'utilisation de didésoxynucléotides triphosphates (ddNTP) comme terminateurs de chaîne d'ADN (interrupteurs de chaîne ou « Terminators » en anglais), ces ddNTP sont les nucléotides de terminaison de chaîne, dépourvu d'un groupe 3'-OH nécessaire pour la formation d'une liaison phosphodiester entre deux nucléotides au cours de l'élongation des brins d'ADN. En effet, lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP au lieu d'un dNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide : L'allongement de la chaîne est alors interrompu et la synthèse du brin d'ADN s'arrête.

Les quatre nucléotides passent dans le même tube capillaire. Chaque ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) est marqué par un fluorochrome différent dont le spectre d'émission est spécifique. Une analyse spectrale va différencier les fluorochromes, associer la base correspondante et donc définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial. Le brin allongé se termine par incorporation d'un didéoxynucléotide marqué par un fluorochrome différent selon la base présente (A, T, C ou G). Leur taille est ensuite déterminée par électrophorèse assisté par un ordinateur.

### **Purification enzymatique du produit de PCR**

L'ADN génomique des fragments du gène de chaque individu destinés au séquençage est amplifié par PCR HRM sur microplaques à 96 puits. Avant de pouvoir séquencer notre amplicon, il est indispensable de purifier les fragments amplifiés en enlevant les restes des dNTP et d'amorces non incorporées. La purification est faite par la

méthode AMPure à EXOSap-IT fonctionnant sur le principe de « nettoyage enzymatique ».

Pour une purification de 3 µl de produit de PCR on ajoute 1.2µl du mélange enzymatique du kit "ExoSAP-IT " Réf. US77705. Il est soumis au programme DIGEST qui se déroule comme suit : une phase de digestion 15 min à 37°C suivie d'une inactivation des enzymes 15 min à 80°C.

### 5.2.3. Réaction de séquence

Les produits de purification récupérés étaient dilués au 1/10<sup>ème</sup> et ainsi des quantités uniformes des fragments d'ADN à séquencer étaient soumises à une seconde réaction de PCR appelée la réaction de séquence (Tableau 9), cette réaction visant l'incorporation des nucléotides marquées au fluorochrome spécifique à chaque base.

**Tableau 9** : Marquage du produit de PCR purifié

	<b>Volume (µl)</b>	<b>Conditions de la PCR séquence</b>
<b>Ready Reaction Premix V1.1(2.5X)</b>	0.5	96°C 2 min
<b>BigDye Sequencing Buffer (5X)</b>	1.75	96°C 10 sec
<b>Amorce F ou R (1 µM)</b>	1.5	50°C 5 sec
<b>Eau</b>	qsp 8 (4.25)	60°C 2 min
<b>Template = produit de PCR purifié</b>	2	4°C

} x25

Les produits de PCR purifiés étaient ensuite purifiés une seconde fois par un kit Big Dye Terminator Purification Kit.

### 5.2.4. Purification des produits de séquençage

- Mélanger les billes de Xterminator au vortex jusqu'à obtenir une solution homogène avant de prélever le volume requis.
- Préparer un mélange de purification contenant (pour une purification) : 45 µl de solution SAM et 10 µl de Xterminator solution
- Dans une microplaque, déposer les 10µl de solution de séquence puis rajouter 55 µl du mélange de purification/puits. Agiter assez régulièrement la solution de purification pour avoir une solution homogène.

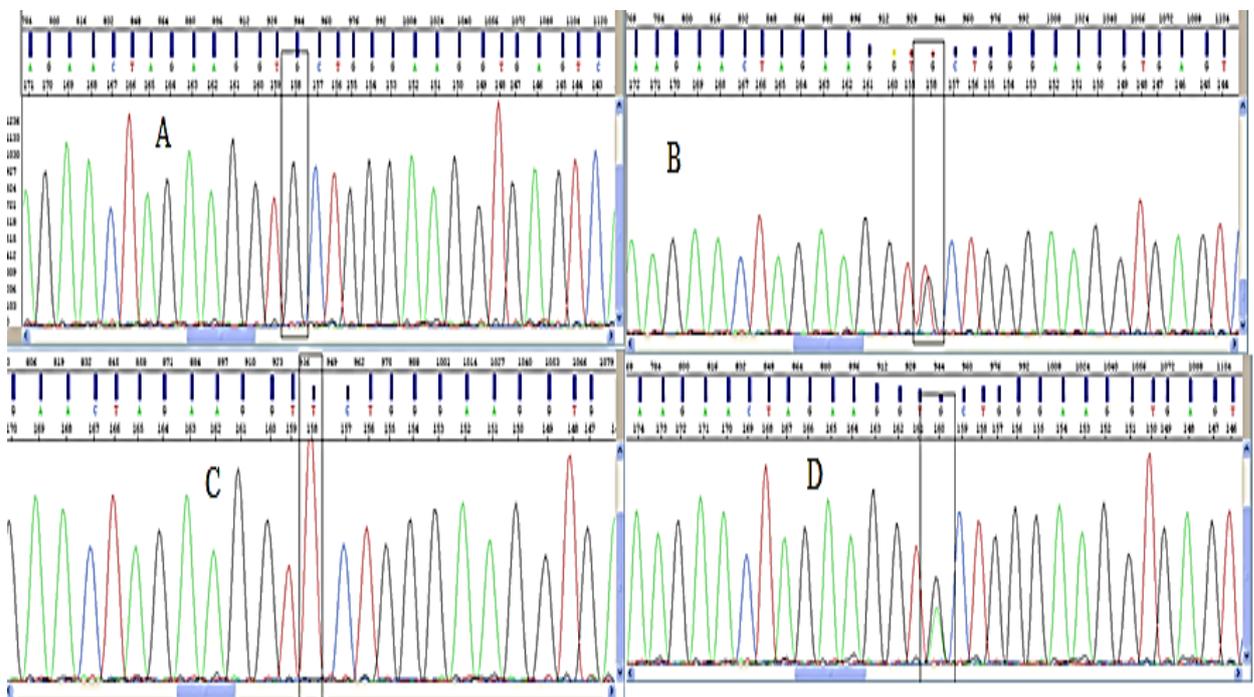
- Recouvrir la plaque d'un film adhésif.
- homogénéiser 30 min à 2000 tr/min.
- Les plaques ainsi préparées sont mises dans le séquenceur.

### 5.2.5. Analyse des séquences

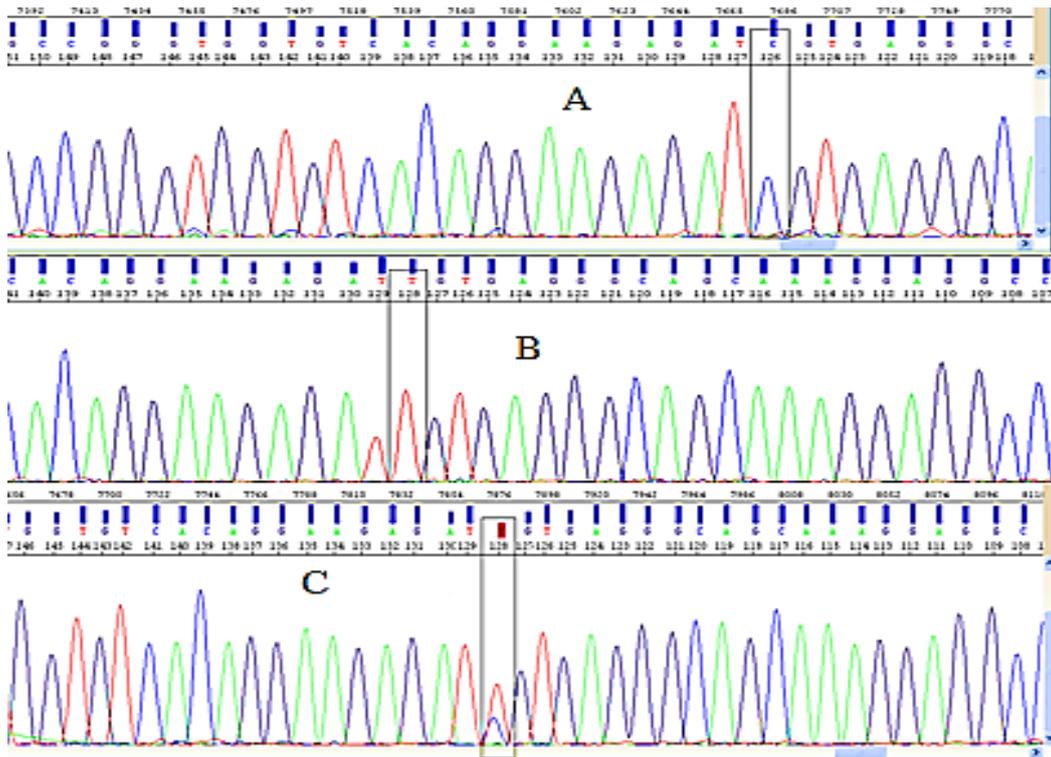
Les produits de séquençage purifiés sont traités par un automate pour une migration par électrophorèse à capillaires. Les données recueillies lors de la résolution de la migration sont transférées sur un serveur informatique à partir duquel les séquences sont analysées.

Toutes les séquences réalisées ont été lues à l'aide de KB<sup>TM</sup> Basecaller v1.2 du logiciel SeqScape v2.5.

Les figures 25 et 26 montrent un exemple des profils obtenus des deux polymorphismes G2677T/A et C3435T, respectivement. Nos séquençages sont supposés être de bonne qualité.



**Figure 25** : Profil de séquençage obtenu pour le polymorphisme G2677T/A du gène ABCB1 ; A : un homozygote GG, B : un hétérozygote GT, C : un homozygote TT, D : un hétérozygote GA



**Figure 26 :** Profil de séquençage obtenu pour le polymorphisme C3435T du gène ABCB1;  
 A : un homozygote CC, B : un homozygote TT, C : un hétérozygote CT.

## 6. Analyse statistique

Avant toute analyse statistique, il est réalisé une évaluation de l'équilibre de Hardy Weinberg (Hardy Weinberg Equilibrium : HWE) ou encore appelé équilibre panmictique pour éviter des erreurs importantes, dues à un biais de génotypage ou de sélection.

Dans ce travail, nous avons effectué une étude statistique d'association entre les SNP et la réponse au protocole de polychimiothérapie à base de trois molécules (FAC ou FEC) chez des patientes atteintes de cancer du sein. L'étude statistique est basée sur le test  $\chi^2$  et le calcul de l'odds ratio (OR) dans le but de :

- déterminer s'il existe une association significative entre les polymorphismes étudiés et la réponse au traitement : ceci se fait par la comparaison du nombre de fois où l'allèle est observé chez les patients ayant une réponse complète par rapport au nombre de fois où il est présent chez les patients n'ayant pas répondu au traitement.
- estimer l'intensité de cette association par le calcul d'OR

L'analyse statistique réalisée dans le cadre de notre étude, a été principalement basée sur des comparaisons de fréquences alléliques des gènes étudiés entre les patients répondeurs et les patients non répondeurs à la chimiothérapie. Ces analyses statistiques ont été réalisées grâce à l'utilisation de logiciel Microsoft Excel 2010 (pour le calcul des fréquences génotypique et alléliques) et par le logiciel Epi-info version 6.0 (Afin d'évaluer la signification de l'association entre le taux de réponse au traitement et la présence des différents SNP de l'étude).

### Calcul des fréquences alléliques

#### **Fréquence allélique chez les Patient répondeurs**

$Fr = (\text{nombre des homozygotes répondeurs} \times 2) + \text{le nombre des hétérozygotes répondeurs}$   
 $/\text{le nombre total de la population des répondeurs} \times 2$

#### **Fréquence allélique chez les Patient non répondeurs**

$Fnr = (\text{nombre des homozygotes non répondeurs} \times 2) + \text{le nombre des hétérozygotes non répondeurs}$   
 $/\text{le nombre total de la population non répondeurs} \times 2$

Pour calculer l'OR nous avons établi une table de contingence croisé 2X2 (ci-dessous) , on notera la répartition en patients répondeurs - patient non répondeurs et porteurs - non porteurs de l'allèle testé.

	<b>Patients répondeurs</b>	<b>Patients non répondeurs</b>	<b>Total</b>
<b>Présence de facteur présumé de risque</b>	a	b	a+b
<b>Absence de facteur présumé de risque</b>	c	d	c+d
	a+c	b+d	a+b+c+d

L'odds ratio se calcule par :

$$OR = \frac{A \ D}{B \ C}$$

Une valeur seuil de significativité est fixée à 0.05. Au-delà de ce seuil, la différence observée est considérée comme étant due au hasard. Le risque relatif ainsi que l'intervalle de confiance à 95% (IC 95%) ont été aussi calculés.



# *Résultats et* **discussion**

## 1. Caractéristiques clinico-pathologiques de la population étudiée :

Notre étude prospective a porté sur une population de patientes diagnostiquées d'un cancer de sein sur une période comprise entre 2011 à 2013, la cohorte étudiée comporte 117 patientes, toutes ces patientes ont eu un prélèvement initial permettant l'étude des polymorphismes prévus, la quasi-totalité (95,5%) des patientes était en bon état général à au moment de mise en route du protocole chimiothérapeutique.

Les résultats concernant les caractéristiques clinico-pathologiques de ces patientes présentent les facteurs pronostiques composés de données cliniques, telles que l'âge de la patiente, les types de cancers : canalaire infiltrant (CCI), lobulaire infiltrant (CCL) et mucineux (CM), la taille tumorale importante et l'envahissement ganglionnaire regroupés dans la classification de l'Union Internationale Contre le Cancer en stade UICC, auxquelles s'ajoutent le grade histopronostique de Scarff Bloom et Richardson (SBR) et le statu hormonal. (Tableau 10)

**Tableau 10 :** Caractéristiques clinico-pathologiques de la population d'étude

Caractéristiques		Nombre (%)
Age	> 40	83 (70,94)
	≤ 40	34 (29,06)
Type histologique	CCI	99 (84,62)
	CLI	9 (7,69)
	Mixte	7 (5,98)
	CM	2 (1,71)
Stade UICC	IIA	4 (3,42)
	IIB	45 (38,46)
	IIIA	24 (20,51)
	IIIB	29 (24,79)
	IV	15 (12,82)
Grade SBR	I	16 (13,68)
	II	52 (44,44)
	III	49 (41,88)
Récepteurs œstrogène	Négatifs	61 (52,14)
	Positifs	56 (47,86)
Récepteurs progestérone	Négatifs	61 (52,14)
	Positifs	56 (47,86)

La moyenne d'âge de notre échantillon était de 47,40 ans, avec des extrêmes entre 28 et 75 ans. El Saghir *et al* (2007), ont repris la totalité des recherches faites entre les années 1990 et 2000 dans les pays arabes, constatant que l'âge médian dans la majorité de ces pays était inférieur ou égal à 50 ans [124]. Ainsi, dans une autre méta-analyse publiée par Najjar et Easson en 2010 à partir de 28 articles consacrés au cancer du sein dans le monde arabe incluant Arabie saoudite, Bahrain, Qatar, Koweït, Émirats, Oman, Yémen, Iraq, Syrie, Jordanie, Liban, Égypte, Lybie, Algérie, Tunisie, Maroc et Soudan, montre qu'au moment du diagnostic, l'âge médian était de 45,40 ans [125].

Dans notre étude, 70,94 % des patientes étaient d'un âge > 40 ans. L'incidence du cancer du sein augmente rapidement avec l'âge pendant les années de reproduction, puis ralentit sensiblement après 50 ans, l'âge moyen à la ménopause [126]. En effet, les femmes âgées de 40 ans sont en période préménopausique et commencent à avoir des cycles anovulatoires ou des cycles au cours desquels il y a ovulation, sans que celle-ci s'accompagne pour autant d'une production adéquate de progestérone; les œstrogènes ne sont pas alors contrebalancés. L'action est prépondérante dans la cancérogénèse du sein.

Selon la littérature, le cancer du sein se développe le plus souvent autour de 55 ans. Près de 50% des cancers du sein sont diagnostiqués entre 50 et 69 ans et environ 28% sont diagnostiqués après 69 ans. Le risque de cancer du sein chez les jeunes femmes est peu élevé, environ 10 % des cas de cancer du sein se manifestent chez les femmes âgées de moins de 35 ans et près de 20% avant 50 ans. [127]

La prédominance du CCI est retrouvée à 84,62 % dans notre population d'étude. Les CLI à 7,96 %. Burstein *et al* (2004) montrent 80 % des cas dans son échantillon présentaient un CCI. Le CLI représente 5 à 15 % de l'ensemble des types histologiques de cancers du sein, ces types peuvent être plus ou moins différenciés. [128]

Dans notre échantillon, 12,82 % de la population ont un site métastatique unique, le reste demeure confiné au sein (Tableau 10). Le protocole thérapeutique mis en place, pour chaque patiente, dépend du stade de la pathologie. Ainsi, dans la majorité des cas, il s'agissait de première ligne de traitement (84,62%), les autres patientes ont bénéficié d'une chimiothérapie palliative ou adjuvante.

L'objectif immédiat de la chimiothérapie primaire est le rétrécissement de la tumeur et le bénéfice du traitement conservateur chez les patientes, qui sont par ailleurs candidates à la chirurgie mutilante. D'autre part, un autre aspect important dans l'évaluation de la valeur de cette stratégie est d'éviter le risque de rechutes locales. [129]

Cependant, ces traitements vont tenir compte du statut hormonal : Les récepteurs hormonaux et le statut HER2 sont les facteurs prédictifs les plus pertinents pour le choix de la modalité de traitement, puisque les tumeurs, ayant une expression diminuée ou un degré élevé d'expression de récepteurs hormonaux, sont considérées comme répondeurs endocriniens et peuvent recevoir, seulement, une hormonothérapie ou une combinaison d'hormonothérapie et de chimiothérapie. [130]

Pour chaque individu, le choix de la thérapie adjuvante doit tenir compte des avantages potentiels, des effets secondaires possibles et des préférences des patientes. La prise de décision est développée pour aider la communication médecin-patient.

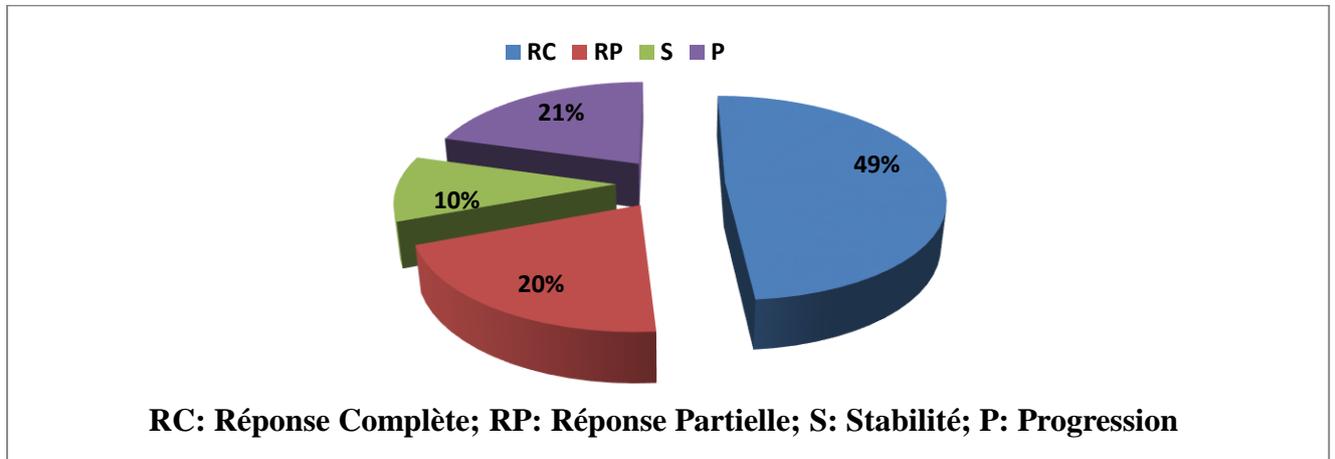
La chirurgie conservatrice (tumorectomie) est préconisée comme traitement standard du cancer du sein au stade précoce.

La chimiothérapie en préopératoire (néoadjuvante) est dédiée aux patientes atteintes de cancers du sein inflammatoires ou inopérables. Son utilisation s'est étendue aux patientes atteintes de cancers opérables mais localement avancés. Le traitement néoadjuvant est indiqué pour le cancer du sein localement avancé (stades IIIA-B) y compris le cancer du sein inflammatoire et pour les grandes tumeurs opérables pour réduire la taille de la tumeur afin d'exécuter la chirurgie. Un des avantages de l'utilisation de la chimiothérapie avant la chirurgie est qu'environ un quart des patientes ont démontré la possibilité de conserver leur sein. [131]

La chimiothérapie adjuvante joue un rôle important dans la prise en charge des patientes atteintes de cancer du sein, surtout lorsque le risque de récurrence après thérapie locale est estimé supérieur à 10% sur 10 ans. Les essais cliniques effectués au cours des 20 dernières années, ont montré que la chimiothérapie adjuvante réduit significativement le risque de récurrence et prolonge la survie globale. [132]

Les protocoles utilisés pour les patientes inclus dans notre étude combinent le 5-FU (F), le cyclophosphamide (C) et la doxorubicine (A) : FAC ou l'épirubicine (E) : FEC.

Ces protocoles sont les plus souvent utilisés en première ligne chimiothérapeutique. La réponse objective au traitement est d'environ 49% (Figure 27), ce qui correspond aux données habituellement rapportées avec ce type de protocole. [133]



**Figure 27** : Représentation des taux de réponse observés dans la population d'étude

L'association de plusieurs molécules dans un protocole de chimiothérapie représente le pilier du traitement dans le cancer de sein. Elle peut être responsable d'une augmentation du taux de réponse, ainsi que d'une augmentation de la survie des patientes. De ce fait il a été montré que l'association FAC ou FEC induit des pourcentages élevés de réponses objectives durables chez des populations avec le cancer du sein. [134, 135]

Dans le cas de la résistance dans les carcinomes mammaires, l'échec du protocole FAC/FEC peut être lié à un échappement des cellules cancéreuses en inhibant le système immunitaire. [136]

## 2. Résultats moléculaires

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à étudier les polymorphismes génétiques liés à la variabilité de la réponse à un même traitement, le plus fréquemment administré à des patientes atteintes de cancer du sein. Nous avons sélectionné les polymorphismes à étudier parmi des gènes décrits dans différentes études supposés avoir un impact important dans l'apparition des résistances. Dans ce contexte, nous décrivons les variantes génétiques dans les gènes DPYD, MTHFR, GSTP1 et ABCB1, impliqués dans le métabolisme et le transport associés de molécules composantes de chimiothérapie FAC ou FEC, et qui pourrait être prédictifs de la réponse de ces médicaments. [137, 138]

A partir des résultats ainsi obtenu, les fréquences génotypiques et alléliques ont été calculées, dans un premier temps, sur la population total et sur les deux populations voir répondeurs et non répondeurs, dans un second temps.

### 2.1. Analyse RFLP :

La recherche des polymorphismes : IVS14+1G>A du gène DPYD, C677T et A1298C du gène de la MTHFR et I105V du gène GSTP1 s'est effectué par une PCR-RFLP.

#### a. Le polymorphisme IVS14+1G>A du gène DPYD

Les résultats du génotypage du polymorphisme IVS14+1G>A du gène DPYD sont résumés au tableau 11.

**Tableau 11** : Résultats de génotypage du polymorphisme IVS14 + 1 G >A du gène de la DPYD (N=117)

Gène et polymorphisme	Génotypes	Nombre (%)	Fréquences alléliques
DPYD:IVS14 + 1 G >A (rs3918290)	GG	113 (96,58)	F(G) = 0,98
	GA	4 (3,42)	
	AA	0 (0)	F(A) = 0,02

Selon nos résultats, des mutations ont été retrouvées chez 4 patientes à l'état hétérozygotes, aucun homozygote muté n'a été observé, la fréquence de l'allèle muté du gène de la DPYD était de 0,02%. Le polymorphisme IVS14+1G>A du gène DPYD a fait l'objet d'études approfondies dans de nombreux groupes géographiquement, racialement et ethniquement différents.

En commençant par l'étude sur une population tunisienne ayant pour objectif de déterminer les variations génétiques touchant le gène de la DPYD. Aucun allèle DPYD\*2A na été observé (IVS 14+1G>A) [139], par ailleurs, aucune mutation n'est observée dans des études sur des populations Britanniques, Taiwanaise, Japonaise, Egyptiennes et Afro-Américaines. Alors que la fréquence de cette mutation est de 2,2%,

1,2% et 0,91% respectivement dans les populations Finlandaise, Néerlandaise et Allemande. Il semble que cette mutation soit représentative des populations nord-européennes. [140]

### b. Les polymorphismes C677T et A1298C du gène de la MTHFR

Nous avons opté pour l'étude de deux polymorphismes C677T et A1298C du gène MTHFR qui sont incriminés dans de nombreuses pathologies et pouvant éventuellement montré une implication dans la réponse aux chimiothérapies anticancéreuses. Les résultats de génotypage sont représentés dans le tableau 12

**Tableau 12** : Résultats de génotypage des polymorphismes C677T et A1298C du gène de la MTHFR (N=117)

Gène et polymorphisme	Génotypes	Nombre (%)	Fréquences alléliques
MTHFR : C677T (rs1801133)	CC	49 (41,88)	F(C) = 0,65
	CT	53 (45,29)	
	TT	15 (12,83)	F(T) = 0,35
MTHFR : A1298C (rs1801131)	AA	69 (58,97)	F(A) = 0,74
	AC	36 (30,77)	
	CC	12 (10,26)	F(C) = 0,26

La répartition des génotypes dans notre population est corrélée aux données rapportées habituellement dans la littérature. Pour les fréquences alléliques du gène de la MTHFR décrites sont, 33.3% et 28.2% pour le 677T et 1298C respectivement, statistiquement égaux à ce que nous avons observé (F(T) = 35% et F(C) = 26%). [141]

Il a été montré que l'allèle 677T et les fréquences des génotypes 677TT suit un gradient géographique décroissant dans le sens sud-nord : les Indiens avec 10.08% [142] et 12 groupes minoritaires Chinois avec 45.2% [143]. Globalement, l'allèle 677T est plus élevé en Europe avec une fréquence allant de 24,1 à 64,3%, suivie par l'Amérique du Nord (6-64,3%), l'Asie de l'Est (2-55%), l'Amérique du Sud (2-48,7%), Asie (2,5-45%), Afrique (0-35,5%), Sibérie (8-31,5%) et Océanie (2,9-28,6%). [144]

Contrairement au premier polymorphisme de la MTHFR, le polymorphisme A1298C n'a pas été beaucoup prospecté. Les données récentes rapportent que l'allèle muté est retrouvé avec un intervalle allant de 13 à 32.3% chez les Africains ce qui concorde avec notre résultat. Globalement, l'allèle C a été observé à haute fréquence en Asie de l'Est allant de 18 à 70%, suivi de l'Asie (17-44,6%), l'Europe (24-40%), la Sibérie (38%), Amérique du Sud (0-15%) et Amérique du Nord (14,7%). [142]

### c. Le polymorphisme A313G du gène GSTP1

Concernant le polymorphisme A313G du gène GSTP1, les résultats de fréquences génotypique et alléliques obtenus pour notre échantillon sont récapitulés dans le tableau 13.

**Tableau 13** : Résultats de génotypage du polymorphisme A313G de la GSTP1 (N=117)

Gène et polymorphisme	Génotypes	Nombre (%)	Fréquences alléliques
GSTP1:A313G (I105V) (rs1695)	AA	54 (46,15)	F(A) = 0,66  F(G) = 0,34
	AG	46 (39,32)	
	GG	17 (14,53)	

Il est à remarquer que pour l'allèle muté G, dans la population tunisienne est exactement conforme à celle de notre étude (F(G) = 0,34). [145]

La fréquence de l'allèle muté est faible par rapport aux fréquences signalées pour des pays Africains. La fréquence de l'allèle G de l'I105V du gène de la GSTP1 au Cameroun, au Gambie et au Ghana était de (0,46), (0,53) et (0,50), respectivement. Le même qu'au Bénin, Burkina Faso et au Gabon. [146]

Les données montrent qu'il existe des différences ethniques distinctes en rapport avec la fréquence du polymorphisme I105V du gène de la GSTP1. La fréquence de l'allèle muté était de 0,14-0,53 chez les Africains, de 0,23-0,37 chez les Caucasiens, de 0,08-0,33 chez les Asiatiques et de 0,16-0,41 chez les Indo. [147]

Ainsi, l'allèle muté est moins fréquent chez les Asiatiques que chez les Caucasiens [148]. Une absence complète du génotype mutant homozygote a également été rapportée dans une des études au Japon [149]. Une observation menée par une autre étude concernant la distribution des génotypes I105V de GSTP1 révèle qu'elle varie significativement dans les populations Asiatiques, mais moins chez les Africains, l'Européens et les Indos. [150]

### 2.2. Analyse par séquençage des polymorphismes G2677T/A et C3435T du gène ABCB1

Le séquençage direct a permis la mise en évidence des deux polymorphismes G2677T/A et C3435T du gène ABCB1. Cette méthode permet une meilleure résolution.

Le tableau 14 résume les résultats du génotypage de ces deux polymorphismes.

**Tableau 14** : Résultats du génotypage des polymorphismes G2677T/A et C3435T du gène ABCB1 (N = 117)

Gène et polymorphisme	Génotypes	Nombre (%)	Fréquences alléliques
ABCB1 : G2677T/A (rs2032582)	GG	67 (57,27)	F(G) = 0,77
	GT	45 (38,46)	
	TT	3 (2,56)	F(T) = 0,22
	GA	2 (1,71)	
	AA	0 (0)	F(A) = 0,01
ABCB1 : C3435T (rs1045642)	CC	56 (47,86)	F(C) = 0,51
	CT	8 (6,84)	
	TT	53 (45,30)	F(T) = 0,49

Il ressort de ces fréquences une nette une prédominance de l'allèle sauvage dans le polymorphisme G2677T/A.

Le génotype 2677GG est supérieur à 81% dans les populations africaines, contre 10-32% chez les Indiens d'Amérique, les Mexicains, les Italiens, les Asiatiques et les Caucasiens. Selon dbSNP, l'allèle 2677A est relativement rare, allant de 0 à 17% dans différentes populations ethniques. [151]

Les fréquences alléliques du polymorphisme C3435T sont équivalentes. La distribution du polymorphisme C3435T est fortement influencée par l'ethnie. Le polymorphisme C3435T présente des différences de fréquence des allèles interethniques plus importantes, l'allèle 3435C se situant entre 34 et 90% à travers les populations. La fréquence des homozygotes CC est très élevée parmi la population africaine. Dans la littérature, Les populations Ghanéennes, Kenyanes, Afro-Américaines et Soudanaises étudiées ont des fréquences de 83%, 83%, 84% et 73%, respectivement, pour l'allèle C. Les populations, Britannique, Portugaise, Sud-asiatique, Chinoise et Saoudienne ont des fréquences plus basses de l'allèle C comparativement au groupe africain, respectivement 48%, 43%, 34%, 53% et 55%. [152]

Le tableau 15 illustre en partie la différence de fréquences des polymorphismes G2677T/A et C3435T du gène ABCB1 chez différentes populations.

**Tableau 15** : Fréquences génotypiques des deux polymorphismes d'ABCB1 en fonction des populations. [153]

<b>rs2032582</b>	<b>G2677W</b>	<b>GG</b>	<b>GW</b>	<b>WW</b>
	Asiatique	21%	60%	19%
	Euro Caucasienne	31%	50%	19%
	Afro Américaine	72%	22%	2%
	Hispanique	31%	53%	16%
<b>rs1045642</b>	<b>C3435T</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>
	Asiatique	31%	51%	18%
	Euro Caucasienne	22%	50%	28%
	Afro Américaine	62%	34%	4%
	Hispanique	30%	49%	21%

### 2.3. Corrélations Réponses / Génotypes

Les patientes inclus dans notre série d'étude ont reçu une chimiothérapie combinée de type FAC ou FEC toutes les 3 semaines (3 à 9 cures). L'évaluation clinique du traitement a été réalisée en utilisant la directive RECIST (version 1.1) [122]. La réponse clinique a été évaluée par un examen physique en utilisant un étalon avant chaque cycle de

traitement. Les patientes présentant une RC ont été classées comme répondeurs alors que les patientes avec RP, S et P sont considérées comme non répondeurs. (Figure 27)

### a. Corrélation réponse/polymorphisme IVS14 + 1G >A (rs3918290) de la DPYD

Le gène DPYD codant pour la DPD est localisé sur le chromosome 1 en position 1p22 et comprend 23 exons. À ce jour, plus de 30 polymorphismes génétiques dans le gène DPYD ont été rapportés. Parmi ces variants, 20 sont associés à une diminution de l'activité de la DPD. La variante DPYD\*2A est la plus étudiée elle est également appelée DPYD: IVS14+1G> A, c.1905 + 1G> A, ou rs3918290. Il s'agit d'un polymorphisme d'un seul nucléotide à la limite intronique de l'exon 14, qui conduit à un défaut d'épissage, aboutissant à de l'excision de l'exon entier, par conséquent il en résulte une protéine non fonctionnelle. [154]

La corrélation du génotype IVS14 + 1G> A et la population répondeurs / non répondeurs est consignée dans le tableau 16.

**Tableau 16** : Association entre le polymorphisme IVS14 + 1G >A (rs3918290) de la DPYD et la réponse clinique à la chimiothérapie

IVS14 + 1G >A (rs3918290)  Génotype	Répondeurs		Non répondeurs		OR	p value
	n	%	n	%		
<b>GG</b>	53	92,98	60	100	-	-
<b>GA</b>	4	7,02	0	0	0,00 (0.00-1,43)	----
<b>AA</b>	0	0	0	0	-	-
<b>TOTAL</b>	57	100	60	100	-	-
<b>Allèle G</b>	110	96,49	120	100	-	-
<b>Allèle A</b>	4	3,51	0	0	0,00 (0.00-1,44)	----

Les données de la littérature relatent que cette mutation a un effet délétère chez les patients présentant un cancer du sein et traité par les antimétabolites de type fluoropyromidine. Une faible activité de la DPD entraîne une diminution du catabolisme du 5-FU avec pour corollaire une augmentation de ses métabolites actifs et un risque de

toxicité sévère au 5-FU qui peut être létale. Une diminution d'activité de la DPD est retrouvée selon les études dans 40 à 60 % des cas de toxicité sévère au 5-FU. L'activité DPD *in vitro* dans les cellules tumorales était significativement liée à la sensibilité 5-FU; Plus l'activité enzymatique est faible, plus la cytotoxicité est grande. Seuls 1 à 3% de la dose de 5-FU administrée s'est convertie en métabolites cytotoxiques, avec environ 80% de la dose administrée dégradée ou excrétée dans l'urine. [155 - 157]

L'enzyme DPD est la première étape dans la voie catabolique qui convertie le 5-FU en dihydrofluorouracile. Ce dernier est ensuite converti en fluoro- $\beta$ -uréidopropionate et fluoro- $\beta$ -alanine, qui sont ensuite excrétés dans l'urine (<http://www.pharmgkb.org/pathway/PA150653776>).

Le génotype homozygote GG de même que les hétérozygotes GA, confère le phénotype sauvage c'est-à-dire une protéine DPD active sur la pharmacocinétique des anticancéreux, ce qui ressort de notre corrélation génotype – réponse (tableau 16). Dans notre population l'absence du génotype muté AA ne nous permet pas de tirer de conclusion.

Ainsi, Les homozygotes mutés pour le polymorphisme rs3918290 sont considérés comme déficients en DPD. Les hétérozygotes ont une activité DPD intermédiaire ou partielle (~50% de l'activité normale) et ceux qui n'ont aucun allèle muté sont susceptibles d'avoir une activité normale [158]. Offer *et al* (2014), ont mesuré la sensibilité relative au 5-FU des cellules exprimant les variations du gène DPYD et ont confirmé que DPYD\*2A est catalytiquement inactif. [159]

Cependant, le rôle de l'activité tumorale DPD a récemment été évalué dans le contexte clinique. Pour les patients atteints de cancer de la tête et du cou, l'activité DPD était détectable dans tous les échantillons de tumeurs, cette activité n'a pas été influencée par le stade de la tumeur. Les patients ayant une réponse complète à la chimiothérapie à base du 5-FU ont présenté des activités de DPD tumorales inférieures par rapport à des patients partiels ou non-répondants. [160]

D'autre part, les fluoropyrimidines sont surtout utilisées en combinaison avec divers autres médicaments antinéoplasiques. Les schémas thérapeutiques peuvent

également influencer sur l'importance de l'activité du DPD et sur le risque de toxicité. Il peut y avoir d'autres facteurs moins courants qui affectent le risque de toxicité. [161]

### **b. Corrélation réponse/polymorphisme C677T (rs1801133) et A1298C (rs1801131) de la MTHFR**

La MTHFR est une enzyme clé dans la régulation des taux de folate intracellulaire, qui intervient dans la conversion irréversible du 5,10-MTHF en 5-MTHF. Des études expérimentales et cliniques ont démontré que l'équilibre du 5,10-MTHF et du 5-MTHF est un facteur crucial de la cytotoxicité induite par le 5-FU [162, 163]

Le gène MTHFR présente des polymorphismes parmi lesquels, les plus communs, 677C> T et 1298A> C qui modifient l'activité enzymatique de la MTHFR et éventuellement la sensibilité de 5-FU. *In vitro* ; il a été démontré que le polymorphisme C677T est lié à une diminution de l'activité enzymatique de la MTHFR jusqu'à 70% chez les individus homozygotes TT et de 40% chez les hétérozygotes. Ainsi, le variant A1298C résulte en un abaissement modéré de l'activité de la MTHFR (60%). [164]

Les variants MTHFR mutés peuvent théoriquement favoriser une augmentation des concentrations intracellulaires de 5,10-MTHF en raison de la diminution de l'activité enzymatique. Par conséquent, les tumeurs présentant des variantes de MTHFR déficientes (677T ou 1298C) peuvent être plus sensibles à la cytotoxicité du 5-FU. [165]

Plusieurs études, dont la majorité ont été menées sur des patients atteints de cancer du côlon, ont tenté de clarifier le rôle prédictif possible de ces deux SNP de la MTHFR sur l'activité des fluoropyrimidines et les résultats cliniques ont montré des résultats contradictoires. [166 - 169]

Nos résultats révèlent que la présence de l'allèle muté T à l'état homozygote ou hétérozygotes est corrélée à la non réponse au 5-FU (Tableau 17). Par ailleurs, suite à notre enquête auprès des patientes et au vu de donnée les concernant, les patientes portant le génotype homozygote TT ou hétérozygote CT du polymorphisme C677T du gène de la MTHFR ont montré un état de récurrence.

**Tableau 17** : Association entre le polymorphisme C677T (rs1801133) de la MTHFR et la réponse clinique à la chimiothérapie.

C677T (rs1801133) Génotype	Répondeurs		Non répondeurs		OR	p value
	n	%	n	%		
CC	31	51,38	18	30	-	-
CT	22	38,60	31	51,67	2,43(1,02-5,84)	<b>0,02</b>
TT	4	7,02	11	18,33	4,74(1,15-21,03)	<b>0,01</b>
<b>TOTAL</b>	57	100	60	100	-	-
<b>Allèle C</b>	84	73,68	67	55,83	-	-
<b>Allèle T</b>	30	26,32	53	44,17	2,21(1,23-3,99)	<b>0,004</b>

Conformément à nos données, plusieurs équipes ont remarqué un effet positif de l'allèle T [170, 171]. Nos résultats sont aussi concordent avec les résultats *in vitro* qui suggèrent que les patients avec le génotype TT auraient une activité MTHFR réduite par rapport à ceux des génotypes CC et CT, diminuant l'activité antitumorale des fluoropyrimidines.

Cependant, certaines études ont montré un effet négatif sur la réponse ou la survie en relation avec l'allèle 677T [172, 173]. D'autres n'ont observé aucune influence du variant 677T. [174, 175]

Concernant le polymorphisme A1298C du gène de la MTHFR, nous n'avons pas remarqué une différence significative de la réponse au traitement chimiothérapeutique pour les génotypes mutés et sauvages du polymorphisme A1298C. Ce polymorphisme serait sans effet sur l'évolution tumorale (Tableau 18).

**Tableau 18** : Association entre le polymorphisme A1298C (rs1801131) de la MTHFR et la réponse clinique à la chimiothérapie

A1298C (rs1801131) Génotype	Répondeurs		Non répondeurs		OR	p value
	n	%	n	%		
AA	36	36,16	33	55	-	-
AC	16	28,07	20	33,33	1,09 (0,45-2,64)	0,83
CC	5	8,77	7	11,67	1,53 (0,38-6,25)	0,50
<b>TOTAL</b>	57	100	60	100	-	-
<b>Allèle A</b>	88	77,19	86	71,67	-	-
<b>Allèle C</b>	26	22,81	34	28,33	1,34 (0,71-2,52)	0,33

Bien que, peu de travaux aient été réalisés avec la variant A1298C. *In vitro*, une étude expérimentale, sur des lignées cellulaires de cancer du sein et du cancer du côlon de diverses origines, a rapporté une plus grande efficacité du 5-FU dans les lignées cellulaires homozygotes pour le variant 1298C, comparé aux cellules homozygote 1298A. [176]

Quoique les résultats des études *in vitro* et les résultats des études cliniques ne peuvent pas être directement comparés. Une explication possible de ces divergences peut être due à la disponibilité dans les cellules de 5,10-MTHF, qui dépend non seulement du génotype de la MTHFR, mais aussi d'autres cofacteurs, tels que l'apport alimentaire en folate. [177]

### c. Corrélation réponse/polymorphisme A313G (rs1695) du gène GSTP1

Les gènes GSTP1 appartiennent à la famille GST et codent pour les protéines détoxification de phase II de nombreux xénobiotiques, y compris les agents chimiothérapeutiques utilisés dans le traitement du cancer du sein comme le cyclophosphamide et les anthracyclines. Il existe des polymorphismes fonctionnels fréquents des gènes codant pour la GSTP1 : la substitution A313G résultant en une modification d'acides aminés Ile en Val au codon 105 qui est associée à une activité catalytique spécifique des substrats inférieurs et à une stabilité thermique plus faible. [178 - 179]

Nos expériences montrent que le nombre de répondeurs est égale au nombre de non répondeurs quelque soit le génotype de la patiente (Tableau 19). Nous pouvons dire, vu le nombre de non répondeurs, l'influence entre ce polymorphisme, dans sa totalité, et la réponse en faveur de la combinaison des trois molécules anticancéreuses (F, A/E, C) dans le cancer du sein est négative.

**Tableau 19 :** Association entre le polymorphisme A313G (rs1695) de la GSTP1 et la réponse clinique à la chimiothérapie

A313G (rs1695) Génotype	Répondeurs		Non répondeurs		OR	p value
	n	%	n	%		
AA	26	51,61	28	46,67	-	-
AG	23	40,35	23	38,33	0,93 (0,39-2,20)	0,83
GG	8	14,04	9	15	1,04(0,31-3,56)	0,93
TOTAL	57	100	60	100	-	-
Allèle A	75	65,79	79	65,83	-	-
Allèle G	39	34,21	41	34,17	1,00 (0,56-1,78)	0,99

Des études ont montré que le statut de la GSTP1 est impliqué dans la réponse à la chimiothérapie dans divers cancers. Ils ont montré que les individus porteurs de l'allèle muté G sont défectueux pour l'activité de détoxification des métabolites des médicaments utilisés pour traiter le cancer colorectal, le cancer de la vessie, l'ostéosarcome et le cancer du sein [180 - 182]

Les génotypes à activité réduite (105Val) subiront une dose efficace plus élevée d'agents chimiothérapeutiques, entraînant une survie améliorée, probablement en raison d'une meilleure réponse à la chimiothérapie [183]. Cependant, une survie plus courte chez les patients ayant une capacité réduite pour la détoxification médiée par la GSTP1 pourrait s'expliquer par une toxicité plus sévère pour la thérapie. [184, 185]

Quelques recherches ont été menées chez les patients chinois de cancer du sein ; d'autres sur des populations des pays occidentaux qui ont étudiés l'association des GSTP1 à la réponse chimiothérapeutique et à la survie du cancer du sein, mais les résultats sont contradictoires. [186 - 189]

### **d. Corrélation réponse/polymorphisme G2677T/A (rs2032582) et C3435T (rs1045642) du gène ABCB1**

La Glycoprotéine P (Pgp), codant par le gène ABCB1 appelé encore MDR1, a été abondamment étudiée au cours de ces dernières années. Les transporteurs ABC ouvrent un champ d'investigation important dans le domaine de la pharmacocinétique des anticancéreux en particulier les anthracyclines, et dans la compréhension des mécanismes de chimiorésistance en cancérologie. [190]

Il s'agit d'un transporteur capable d'expulser de nombreux médicaments anticancéreux. La variation génétique dans le gène ABCB1 est connue pour altérer la stabilité de l'ARNm ou l'activité d'épissage. [191, 192]

Les trois polymorphismes de type SNP, les plus courants dans la région codante pour la protéine de ABCB1, sont 1236C>T (rs1128503), 3435C>T (rs1045642) et 2677G>T/A (rs2032582), situés, respectivement, au niveau des exons 12, 21 et 26. Ils se produisent à des fréquences alléliques élevées et créent un haplotype commun. Par conséquent, ils ont été les plus largement étudiés comme étant associés à la réponse des anticancéreux. [193, 194]

Dans la prolongation de notre recherche, nous rapportons l'effet de deux polymorphismes 3435C>T (rs1045642) et 2677G>T/A (rs2032582) sur l'efficacité de la chimiothérapie avec un protocole combiné sur nos patientes.

Nos résultats ne sont pas concluants, aucun lien entre la réponse tumorale et les polymorphismes étudiés d'ABCB1 n'est mis en évidence (Tableaux 20 et 21).

**Tableau 20** : Association entre le polymorphisme G2677T/A (rs2032582) du gène ABCB1 et la réponse clinique à la chimiothérapie.

G2677T/A (rs2032582)  Génotype	Répondeurs		Non répondeurs		OR	p value
	n	%	n	%		
<b>GG</b>	30	52,64	37	61,67	-	-
<b>GT</b>	25	43,86	20	33,33	0,65 (0,28-1,49)	0,26
<b>TT</b>	1	1,75	2	3,33	1,62 (0,11-47,63)	0,69
<b>GA</b>	1	1,75	1	1,67	0,81(0,02-31,22)	0,88
<b>AA</b>	0	0	0	0	-	-
<b>TOTAL</b>	57	100	60	100	-	-
<b>Allèle G</b>	86	75,44	95	79,17	-	-
<b>Allèle T</b>	27	23,68	24	20	0,80 (0,41-1,57)	0,49
<b>Allèle A</b>	1	0,88	1	0,83	0,91 (0,02-33,68)	0,94

Le polymorphisme 2677G>T/A entraîne un changement de Ser en Ala ou en Thr à la position 893 de la protéine, mais l'effet de ces changements sur la fonction de la protéine est incertain. [195]

L'influence des SNP de P-glycoprotéine (Pgp) sur la réponse des patients a été étudiée de manière plus approfondie dans le cancer de l'ovaire, où Marsh et ses collègues (2007) ont évalué 27 polymorphismes de 16 gènes impliqués dans les voies des taxanes et de platine, y compris le ABCB1 chez 914 patientes. Aucune association significative n'a été observée avec le génotype 2677G>T/A du gène ABCB1 et la réponse, la toxicité ou la survie sans progression. [196]

Les implications cliniques de ce polymorphisme restent controversées. Des chercheurs ont prétendu que l'allèle mutant 2677T est un prédicteur positif de neurotoxicité induite par un médicament, du fait que la capacité diminuée de Pgp à empêcher l'accumulation du médicament dans le système nerveux central [197]. En revanche, cet allèle mutant a également été associé à une incidence plus faible d'effets indésirables de médicament [198]. Dans une étude incluant 230 patientes ayant un cancer du sein et traitées par une chimiothérapie AC, les allèles sauvages du variant 2677G>T/A ont été

associés à la réponse au traitement. Les porteurs de l'allèle 2677A ont montré un temps de progression et de survie significativement plus court dans la population de l'étude par comparaison aux homozygotes de type sauvage GG. [199]

**Tableau 21** : Association entre le polymorphisme C3435T (rs1045642) de gène ABCB1 et la réponse clinique à la chimiothérapie.

C3435T (rs1045642) Génotype	Répondeurs		Non répondeurs		OR	p value
	n	%	n	%		
CC	26	45,62	30	50	-	-
CT	3	5,26	5	8,33	1,44(0,26-8,59)	0,63
TT	28	49,12	25	41,67	0,77(0,34-1,76)	0,50
TOTAL	57	100	60	100	-	-
Allèle C	55	48,25	65	54,67	-	-
Allèle T	59	51,75	55	45,83	0,79 (0,46-1,36)	0,36

Concernant le polymorphisme C3435T du gène ABCB1 (Tableau 21), notre résultat est en accord avec une étude menée sur des patientes atteintes de cancer du sein et traitées par une chimiothérapie néoadjuvante de type FAC et ne montre aucune association entre le polymorphisme C3435T du gène ABCB1 et la réponse au traitement [200]. Cependant, l'allèle 3435T a été associé à une réduction de l'expression de la P-gp, bien qu'il soit silencieux. [201]

Le polymorphisme C3435T revêt un intérêt potentiel, notamment, en pharmacologie malgré le fait qu'il soit muet car n'entraînant pas de changement de la séquence en acide aminés de P-gp. En effet, différentes hypothèses ont été mises en évidence. L'existence d'un lien entre ce polymorphisme et l'expression des transcrits du gène MDR1, la possibilité d'une influence d'un triplé synonyme sur le processus d'épissage ou le contrôle du processus de traduction [202]. D'autres auteurs suggèrent qu'il est, également, possible que certains des SNP augmentent la stabilité de l'ARNm et, par conséquent, entraînent une augmentation de l'expression des protéines et / ou un changement de l'affinité du substrat par rapport au transporteur Pgp. [203 - 205]

Un rôle cliniquement significatif pour ABCB1 est prouvé actuellement chez les femmes avec le cancer de l'ovaire portant l'allèle muté et recevant les chimiothérapies à base d'anthracycline. Cet allèle améliore la réponse et la survie sans progression. [206]

En outre, une faible expression de la Pgp a été observée dans les cellules tumorales de cancer du sein des sujets avec l'allèle T, comparés aux homozygotes CC, donc une réduction de l'élimination cellulaire et les concentrations plasmatiques de médicaments chimiothérapeutiques devenu plus élevées. Par conséquent, le traitement par des agents anticancéreux, en particulier ceux qui utilisent des substrats de Pgp, peut affecter négativement l'efficacité du traitement chez les personnes atteintes de l'allèle T. [207, 208]



# **Discussion**

## **générale**

La prise en charge d'une patiente atteinte d'un cancer du sein reste une préoccupation des oncologues en premier lieu mais également de toute la communauté scientifique. Le dépistage permet d'identifier des tumeurs infra-cliniques de bon pronostic, les progrès de la chirurgie sont indéniables et les traitements médicaux sont en pleine évolution : nouvelles hormonothérapies, nouveaux antimitotiques, anticorps monoclonaux. Cependant le cancer du sein continue à être la première cause de mortalité chez la femme. Ces facteurs, histologiques, cliniques et moléculaires, sont insuffisants pour rendre compte de l'hétérogénéité de la maladie, conduisant un certain nombre de patientes vers des thérapeutiques inadaptées, toxiques ou inefficaces.

La dynamique actuelle de recherche et de développement des biotechnologies dans le domaine de l'oncologie est en phase de production de techniques permettant la détermination de caractéristiques génétiques, constitutionnelles (propres à l'individu) ou somatiques (liées au développement de la maladie), qui permettent d'estimer la réponse d'un patient à un traitement donné. Le but est d'identifier l'origine génétique de la variabilité interindividuelle de la réponse aux médicaments afin de permettre un traitement adapté à chaque patient. Le rôle des polymorphismes génétiques apparaît de plus en plus clairement dans la tolérance à de nombreux médicaments anticancéreux, et aboutit à des applications pratiques. Les progrès liés à la pharmacogénétique en termes de sécurité d'administration de certains médicaments sont déjà accessibles.

Dans le contexte de la prescription des médicaments conventionnels au cours du traitement de cancer du sein, notre travail a porté sur l'étude de polymorphismes génétiques pouvant représenter des critères moléculaires prédictifs de réponse à ces médicaments : 5-FU (F), le cyclophosphamide (C) et la doxorubicine (A) ou l'épirubicine (E).

Contrairement à de nombreuses études qui se basent sur un protocole comportant une seule classe d'anticancéreux, nous avons recruté des patientes qui ont bénéficié de protocole présentant différentes classes au même temps. L'évaluation comporte un double intérêt en permettant de voir les effets conjugués des molécules : notre travail a tenté d'expliquer les variations inter-individuelles de réponse au traitement chimiothérapeutique FAC ou FEC, et ainsi d'améliorer l'utilisation de ces molécules en termes d'efficacité en prospectant les polymorphismes génétiques des gènes DPYD, MTHFR, GSTP1 et ABCB1 et en déduisant leur implication

La pharmacocinétique des trois molécules du traitement a été étudiée chez 117 patientes en cours de traitement. Les enzymes du métabolisme analysés étaient DPYD, MTHFR et GSTP1, le transporteur était ABCB1 et parmi eux 6 variants. La répartition des différents polymorphismes était comparable à celle connue et décrite au préalable dans la littérature et sont reconnus comme des déterminants majeur de cette réponse. [209]

Nous rapportons une corrélation de IVS14 + 1G >A (rs3918290) de la DPYD et le polymorphisme C677T (rs1801133) de la MTHFR à une chimiorésistance lié au 5-FU. Ces résultats montrent que l'utilisation du test de pharmacogénétique s'inscrirait dans le cadre d'une démarche de « désescalade thérapeutique », une majorité de patientes étant susceptible de bénéficier d'une chimiothérapie aux effets secondaires moins lourds mais avec une efficacité comparable à celle incluant le 5-FU.

Le test de pharmacogénétique est susceptible de discriminer les femmes atteintes de cancer du sein en deux groupes: de patientes de « bon pronostic » pour lesquelles une chimiothérapie spécialisée en particulier avec 5-FU pourrait être envisagée et de patientes de « mauvais pronostic » pour lesquelles une chimiothérapie avec 5-FU ne peut être préconisée. [210]

En effet, d'une part la détection d'un déficit en DPYD et / ou en MTHFR ne contre-indique pas le plus souvent le traitement par fluoropyrimidines, il s'agit fréquemment d'un déficit partiel, d'intensité variable et le traitement par fluoropyrimidine est possible, sous couvert de précautions rigoureuses. D'autre part, le gène le plus souvent décrit comme étant responsables de la résistance au traitement avec la chimiothérapie du 5-FU, en plus de la DPYD et la MTHFR, est la TS, de plus d'autres polymorphismes de ces mêmes gènes pourraient être impliqués. [211]

Bien que nos résultats pour les autres variants : A1298C (rs1801131) du gène de la MTHFR, I105V (rs1695) du gène GSTP1, G2677T/A (rs2032582) et C3435T (rs1045642) du gène ABCB1, ne signalent aucune association avec une modification de la pharmacocinétique du protocole chimiothérapeutique FAC ou FEC, nous ne pouvons pas écarter leur implication dans une éventuelle non réponse au traitement car la population de non répondeurs demeure relativement importante mais statistiquement non significative.

Cependant, de nombreuses études montrent qu'il persiste malgré tout une discordance entre le phénotype et le génotype pour certains individus atteints d'un cancer

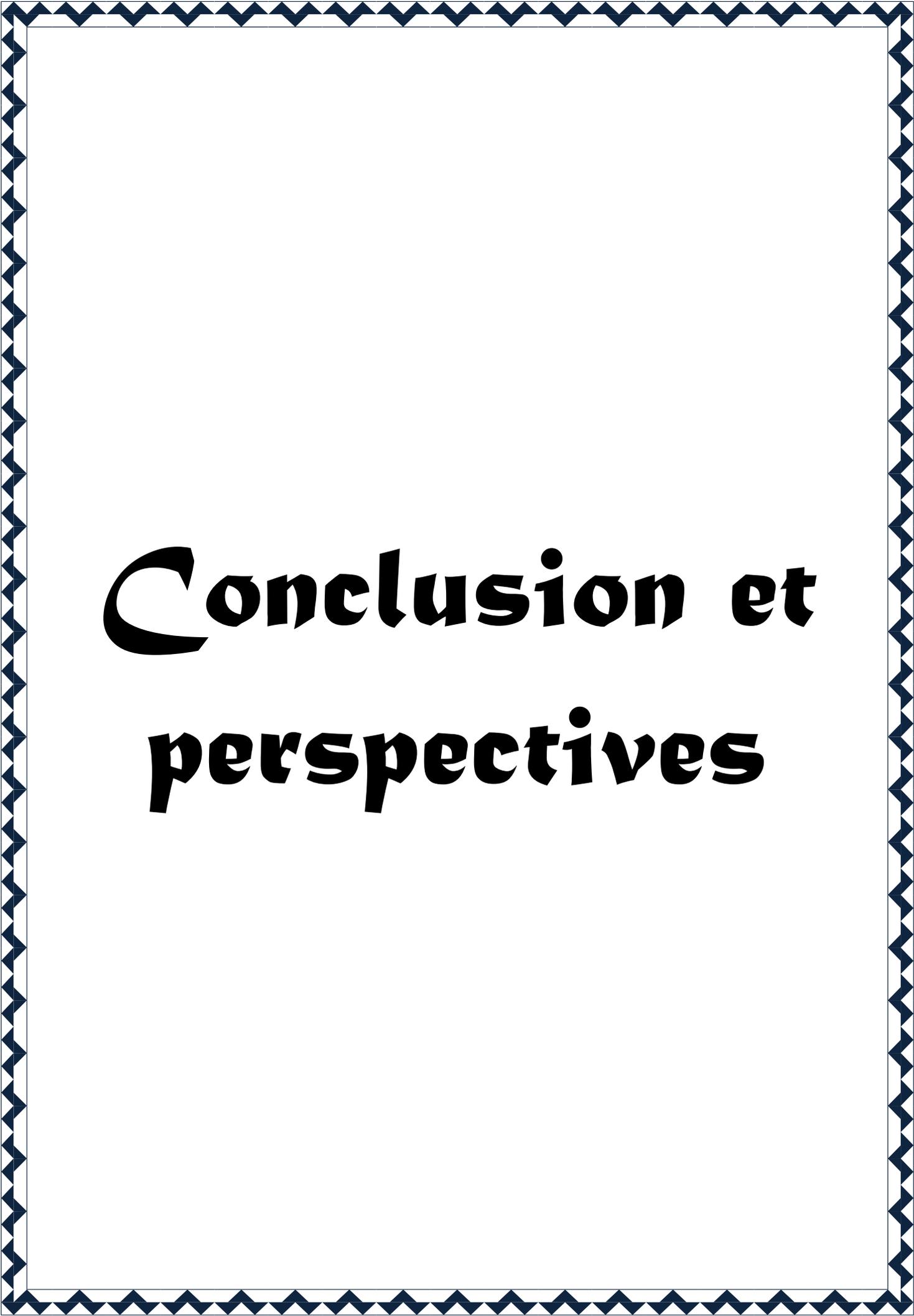
du sein. De plus, les mutations identifiées dans les gènes intervenant dans les mécanismes de pharmacodynamie de médicament ne permettent pas d'expliquer la large variabilité d'activité enzymatique observée au sein des métaboliseurs rapides, voire des métaboliseurs intermédiaires. [212] [213] [214] [215]

Nos travaux n'ont pas cherché à identifier toutes les voies métaboliques et les polymorphismes rapportés comme modulant la pharmacologie des anticancéreux essentiellement le 5-FU, l'Epirubicine, la Doxorubicine et le Cyclophosphamide. Notre approche a été pragmatique car les gènes DPYD, MTHFR, GSTP1 et ABCB1 étaient identifiées comme prioritaires modulants la clairance de ces molécules.

Il apparaît de plus en plus évident que plusieurs protéines en fonction de situation physiologiques, voir tumorales différentes modifient de façon conjointe la pharmacocinétique du traitement étudié. C'est ainsi que plusieurs études rapportent l'effet des cytochromes P450 et même d'autres variants d'autres gènes ou de ces même gènes prospectés dans notre étude. [216] [217] [218]

Il apparaît difficile de déduire, à partir des données dont nous disposons, les stratégies moléculaires qui pourraient effectivement prévaloir la prédiction du devenir du traitement, d'autant qu'elles impliquent des acteurs moléculaires différents. L'étude multicentrique de validation prospective du test de pharmacogénétique n'ayant pas encore débuté en Algérie, une stratégie de collaboration par le biais des oncologues est en cours d'initiation et ceci est nécessaire avant que nous puissions prédire la réponse basée sur le profil génétique d'un patient.

L'administration d'un anticancéreux qui se révélerait non seulement inefficace mais pourrait entraîner de sérieux effets indésirables comme une cardio-toxicité, une neutropénie une neuro-toxicité ou pneumo-toxicité ainsi des stratégies visant à augmenter spécifiquement l'expression de gènes sous exprimés chez les mauvais répondeurs pourrait être développée.



# **Conclusion et perspectives**

Le cancer du sein reste, malgré les progrès des traitements et l'apparition des thérapies ciblées, la première cause de mortalité par cancer chez la femme. L'étude des altérations génomiques des cellules tumorales a mis en évidence leur relation avec le pronostic et l'efficacité des traitements.

La compréhension de l'origine de la variation inter-individuelle dans la réponse aux médicaments demeure une approche difficile. La grande variabilité de l'efficacité des médicaments et des réactions indésirables aux médicaments chez les patients est un déterminant majeur de leur utilisation clinique mais la réglementation et le retrait-de-marché inefficaces et un goulot d'étranglement dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques, les enjeux restent l'apanage des firmes pharmaceutiques.

Dans le contexte de la prescription des médicaments conventionnels au cours du traitement de cancer du sein, notre travail a eu comme objectif d'étudier certains polymorphismes génétiques pouvant représenter des critères moléculaires prédictifs de réponse aux médicaments des chimiothérapies dans le cancer du sein tels que 5-FU, les anthracyclines et le cyclophosphamide. L'objectif a été de proposer d'emblée un modèle pharmacogénétique, afin d'aider le clinicien dans le meilleur choix thérapeutique pour chaque patient. Cela concerne une optimisation de sa prise en charge, en évitant potentiellement un traitement inutile, toxique et coûteux ou au contraire en le justifiant même au prix d'une toxicité attendue, mais en raison d'un bénéfice évalué comme très probable.

Dans notre étude, plusieurs SNP apparaissent significativement liés à la réponse après chimiothérapie (rs1801133 de la MTHFR et rs3918290 de la DPYD) et, par conséquent, l'intérêt d'une approche basée sur la pharmacogénétique pour identifier de nouveaux biomarqueurs pronostiques et prédictifs, dans la perspective d'une individualisation des traitements médicamenteux et l'amélioration du taux de réponse à la chimiothérapie.

Ces résultats montrent la nécessité de poursuivre ces recherches afin de confirmer l'impact des polymorphismes génétiques sur l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques de cancers du sein de type FAC ou FEC.

Eu égard à ces nouvelles possibilités ouvertes par la génétique et la biologie moléculaire, la validation clinique d'un grand nombre de tests de pharmacogénétique et la mise au point de nouvelles technologies de génotypage (puces à ADN...) vont contribuer au

développement rapide de la pharmacogénétique dans la pratique médicale courante. Ainsi, la dimension propre de cette étude ne portant que sur un nombre limité de cas, une grande étude est nécessaire pour vérifier nos résultats.

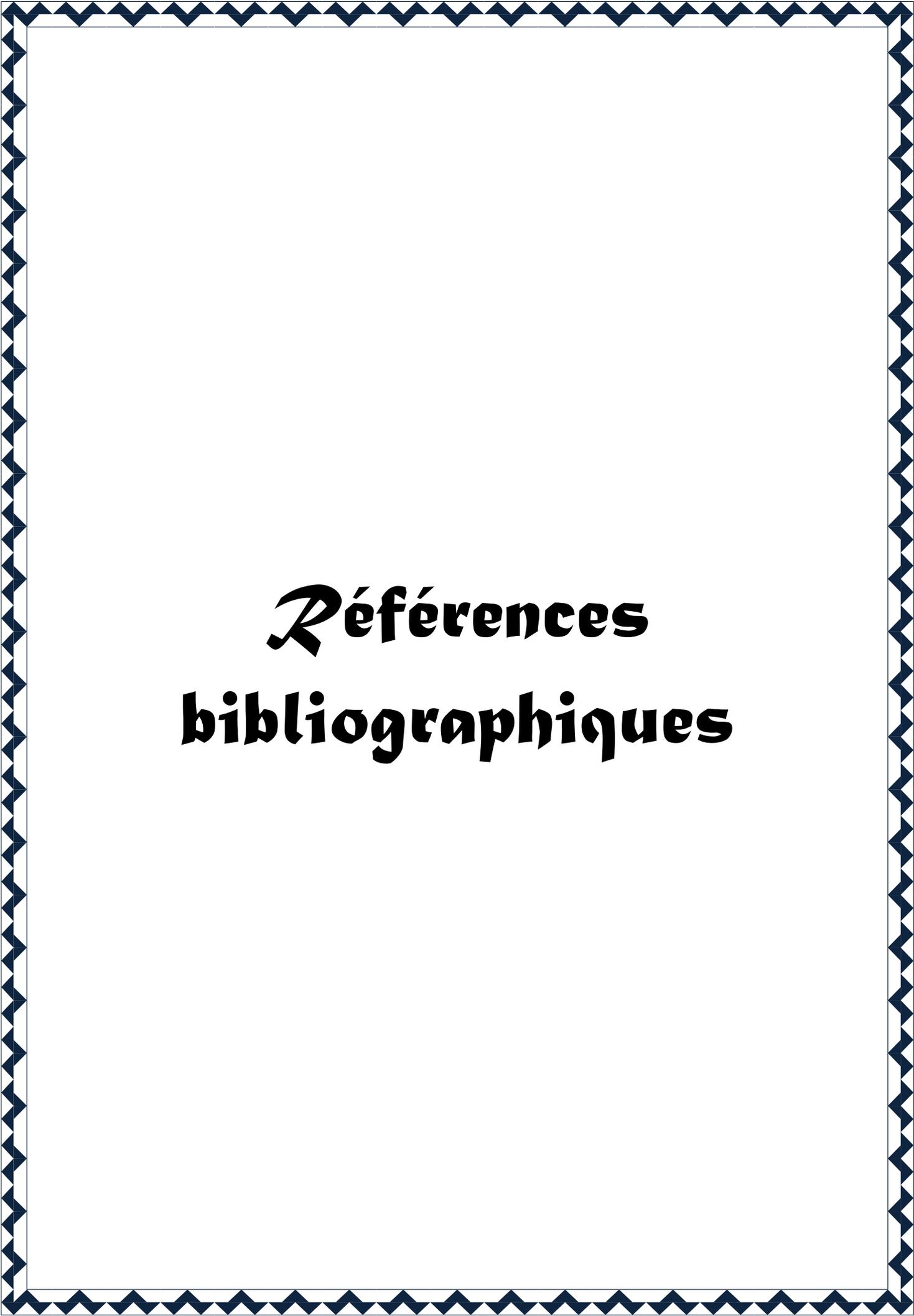
En outre, certains polymorphismes constitutionnels sont non seulement prédictifs de la réponse tumorale au traitement mais aussi de la toxicité des chimiothérapies, de ce fait, il sera plus utile de revoir les mêmes résultats en analysant les effets toxiques secondaires de la chimiothérapie.

Le recul nécessaire à l'appréciation de l'impact des traitements sur la survie sans progression et la survie globale fait également partie des objectifs de la poursuite de ce travail.

Souhaitant poursuivre l'exploration de l'hypothèse générée par nos résultats concernant le lien entre polymorphismes génétiques, pharmacocinétique des anticancéreux et réponse complète, nous prévoyons :

- ✓ D'analyser les données de survie sans récurrence et de survie globale lorsque nous atteindrons un recul suffisant.
- ✓ D'explorer l'importance éventuelle d'autres polymorphismes concernant les protéines impliquées dans la pharmacocinétique des médicaments de la chimiothérapie.
- ✓ Poursuivre l'approche d'une médecine personnalisée intégrant l'optimisation de la délivrance et l'efficacité d'un traitement repose donc sur l'intégration de la pharmacogénomique.

Cette étude identifie des pistes différentes de réflexion dans la recherche de facteurs prédictifs à la chimiothérapie combinant plusieurs molécules voir les antipyrimidines et les anthracyclines dans la thérapeutique du cancer du sein. Cependant, cette brève revue n'est qu'un reflet instantané de la prise en charge d'une patiente atteinte d'un cancer du sein et mérite d'être régulièrement réactualisée.



# *Références* bibliographiques

01. **Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F.** Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015; 136: E359-E386.
02. **Rodríguez-Antona C, Taron M.** Pharmacogenomic biomarkers for personalized cancer treatment. *J Intern Med.* 2015; 277: 201-217.
03. **Li J, Bluth MH.** Pharmacogenomics of drug metabolizing enzymes and transporters: implications for cancer therapy. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine.* 2011; 4: 11-33.
04. **Savonarola A, Palmirota R, Guadagni F, Silvestris F.** Pharmacogenetics and pharmacogenomics: role of mutational analysis in anti-cancer targeted therapy. *The Pharmacogenomics Journal.* 2012; 12: 277-286.
05. **Tortora GJ, Derrickson B.** Les glandes mammaires du sein. In *Principes d'anatomie et de physiologie*, De boeck : John Wiley et Son. 2007. 969-1018.
06. **Polyak, K.** On the birth of breast cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1552: 1-13.
07. **Wainsten JP.** *Le Larousse Médical*, 5eme édition, Larousse. Paris. 2009; 865-867.
08. **Elaine N, Hoehn MK, Moussakova L, Lachaine R.** Anatomie et physiologie humaine, Adaptation de la 8ème édition Américaine. *Nouveaux horizons.* Paris. 2010; 1215-1217.
09. **Siegel R, Naishadham D, Jemal A.** Cancer Statistics. *CA CANCER J CLIN.* 2013; 63: 11-30.
10. **Rivenbark AG, Coleman WB.** Field cancerization in mammary carcinogenesis — Implications for prevention and treatment of breast cancer. *Experimental and Molecular Pathology.* 2012; 93: 391-398.
11. **Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, Lingle WL, Degnim AC, et al.** Benign Breast Disease and the Risk of Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353: 229-237
12. **Mombelli S.** *Cancers du sein et Immunologie anti-tumorale.* Université De Reims Champagne-Ardenne. Thèse de doctorat. 2014 : 26

13. **Olsson H.** Tumour biology of a breast cancer at least partly reflects the biology of the tissue/epithelial cell of origin at the time of initiation - a hypothesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 74: 345-350.
14. **Scoazec JY, Sabourin JC.** The seventh edition of the TNM classification. *Annales de pathologie.* 2010; 30 : 2-6
15. **Farge D, Georges C, Ducros A, Deranlot J.** *Sémiologie médicale.* Université Paris Diderot - Paris 7. 2012.
16. **Sobin LH, Wittekind C.** International Union Against Cancer (UICC). TNM classification of malignant tumours. *BREAST TUMOURS.* 7<sup>th</sup> ed. 2009. New York: John Wiley & Sons.
17. **Bloom HJG, Richardson WW.** Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1 409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer.* 1957 ; 11: 359-377.
18. **Elston CW, Ellis IO, Pinder SE.** Pathological prognostic factors in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1999; 31: 209-223.
19. **Simpson JF, Gray R, Dressler LG, Cobau CD, Falkson CI, Gilchrist KW, Pandya KJ, Page DL, Robert NJ.** Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189. *J Clin Oncol.* 2000; 18: 2059-2069.
20. **Amat S, Penault-Llorca F, Cure H, Le Bouedec G, Achard JL, Van Praagh I, Feillel V, MouretReynier MA, Dauplat J, Chollet P.** Scarff-BloomRichardson (SBR) grading: A pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy. *Int J Oncol.* 2002; 20: 791-796.
21. **Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslén LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D.** Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; 406: 747-752.
22. **Veer LJ, Dai H, Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH.** Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002; 415: 530-536.

23. **Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D**, Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci*. 2003; 100: 8418-8423.
24. **Diehn M, Sherlock G, Binkley G, Jin H, Matese JC, Hernandez-Boussard T, Rees CA, Cherry JM, Botstein D, Brown PO, Alizadeh AA**. SOURCE: a unified genomic resource of functional annotations, ontologies, and gene expression data. *Nucleic Acids Res*. 2003; 31: 219-223.
25. **Birnbaum D, Bertucci F, Ginestier C, Tagett R, Jacquemier J, Charafe-Jauffre**. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous?. *Int J Oncol*. 2004; 25: 249-258
26. **Lamy PJ, Romieu G, Rouanet P, Jacot W**. Classification moléculaire des cancers du sein : utilité en clinique. *Médecine Nucléaire*. 2010; 34: 32-43.
27. **Lacroix MB, Bullier B, Labrot HG, Ferron S, Lippa N, Grogan GM**. Corrélations imagerie-facteurs pronostiques — classification moléculaire des cancers du sein. *Journal de Radiologie Diagnostique et Interventionnelle*. 2014 ; 95: 230-236.
28. **Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F**. GLOBOCAN 2012, version 1.0. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013.
29. **Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Tieulent JL, Jemal A**. Global Cancer Statistics, 2012. *CA CANCER J CLIN*. 2015; 65: 87-108.
30. **Djedi H, Bouzid K**. Cancer du sein en Algérie, Données épidémiologiques. *Journal de la Société Algérienne d'Oncologie Médicale*. 2012; 2: 5-7.
31. **Reynier JC**. Prédisposition génétique aux cancers du sein et de l'ovaire Importance des résultats des tests. *médecine/sciences*. 2011; 27: 257-261.
32. **Saunders C, Vijay V, Stein J, Baum M**. Setting up a breast cancer family history clinic. *Ann R Coll Surg Engl*. 1999; 81: 393-398.
33. **Mezzetti M, La Vecchia C, Decarli A, Boyle P, Talamini R, Franceschi S**. Population Attributable Risk for Breast Cancer: Diet, Nutrition, and Physical Exercise. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998; 90: 389-394.

34. **Verger P, Hubert Ph, Bard D.** L'évaluation des effets des faibles doses de rayonnements ionisants : apports de l'épidémiologie. *l'ACOMEN*. 1998; 4: 287-297.
35. **Khan N, Afaq F, Mukhtar H.** Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. *Cancer Lett*. 2010; 293: 133-143.
36. **DeSantis CA, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, Alteri R, Robbins AS, Jemal A.** Cancer Treatment and Survivorship Statistics. 2014. *CA CANCER J CLIN*. 2014; 64: 252–271
37. **Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, Cardoso F.** Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2013; 1: 1–17.
38. **Baselga J, Cortes J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH,** Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2012; 366: 109-119.
39. **Espinosa E , Zamora P, Feliu J, González Barón M.** Classification of anticancer drugs - a new system based on therapeutic targets. *Cancer Treatment Reviews*. 2003; 29: 515-523.
40. **Lansiaux A.** Les antimétabolites. *Bulletin du Cancer*. 2011; 98: 1263-1274.
41. **Pourquier P.** Alkylating agents. *Bulletin du Cancer*. 2011; 98: 1237-1251.
42. **Brana MF, Cacho M, Gradillas A, Pascual-Teresa B, Ramos A.** Intercalators as Anticancer Drugs, *Current Pharmaceutical Design*. 2001; 7: 1745-1780.
43. **Mooberry SL.** Microtubules as a target for anticancer drugs. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*. 2011; 9: 7-9.
44. **Krop IE, Beeram M, Modi S et al.** Phase I Study Trastuzumab-DM1 in Patients With Breast Cancer. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*. 2010; 28: 2698- 2704.
45. **Sievers EL, Senter PD.** Antibody-Drug Conjugates in Cancer Therapy. *Annual Review of Medicine*. 2013; 64: 15-29.
46. **Zwick E, Bange J, Ullrich A.** Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends in Molecular Medicine*. 2002; 8: 17-23.
47. **Mailliez A, Vennin P,** Neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: Aims, regimens, evaluation, impacts. *Imagerie de la femme*. 2010; 20: 33-37.

48. **Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE, Alving AS.** Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science*. 1956; 124: 484-485.
49. **Motulsky AG.** Drug reactions, enzymes and biochemical genetics. *Journal of the American Medical Association*. 1957;165: 835-837.
50. **Kalow W, Genest K.** A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase; determination of dibucaine numbers. *Can J Biochem Physiol*. 1957; 35: 339-346.
51. **Kalow W, Saunders C.** Pharmacogenetics. Heredity and the response to drugs. W. B. Saunders, Philadelphia. 1962. 231
52. **Gonzalez FJ, Vilbois F, Hardwick JP, McBride OW, Nebert DW, Gelboin HV, Meyer UA.** Human debrisoquine 4-hydroxylase (P450IID1): cDNA and deduced amino acid sequence and assignment of the CYP2D locus to chromosome 22. *Genomics*. 1988; 2: 174–179.
53. **Meyer UA.** Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *THE LANCET*. 2000; 356: 1667-1671.
54. **Johnson JA.** Pharmacogenetics: potential for individualized drug therapy through genetics. *TREND in genetics*. 2003; 19: 660-666.
55. **Brockmoller J, Tzvetkov M V.** Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008; 64: 133-157.
56. **Wiechec E, Hansen L.** The effect of genetic variability on drug response in conventional breast cancer treatment. *European Journal of Pharmacology*. 2009; 625: 122–130.
57. **Meyer MR, Maurer HH.** Absorption, distribution, metabolism and excretion pharmacogenomics of drugs of abuse. *Pharmacogenomics*. 2011; 12: 215-233.
58. **Becquemont L.** La pharmacogénétique dans l'exercice médical quotidien. *Médecine thérapeutique*. 2005; 11: 438-445.
59. **Loriot MA, Beaune P.** La pharmacogénétique : le lien entre gènes et réponse aux médicaments. *Med Sci*. 2004; 20: 634-636.
60. **Allorge D, Loriot MA.** La pharmacogénétique ou la promesse d'une médecine personnalisée : variations du métabolisme et du transport des médicaments. *Annales de Biologie Clinique*. 2004; 62: 499-511.

61. **Evans WE, Mcleod HL.** Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med.* 2003; 348: 538-549.
62. **Nebert DW, Zhang G, Vesell ES.** From human genetics and genomics to pharmacogenetics and pharmacogenomics: past lessons, future directions. *Drug metabolism reviews.* 2008; 40: 187-224.
63. **Ventola CL.** Role of Pharmacogenomic Biomarkers In Predicting and Improving Drug Response; Part 1: The Clinical Significance of Pharmacogenetic Variants. *Pharmacology & Therapeutics.* 2013; 38: 545-551.
64. **Ozdemir V, Lerer B.** Pharmacogenomics and the promise of personalized medicine. *Pharmacogenomics, Second Edition.* 2005. CRC Press; New York: 13-50.
65. **Weng L, Zhang L, Peng Y, Huang RS.** Pharmacogenetics and pharmacogenomics: a bridge to individualized cancer therapy. *Pharmacogenomics.* 2013; 14: 315-324.
66. **Wilkinson GR.** Drug therapy: Drug Metabolism and Variability among Patients in Drug Response. *N Engl J Med.* 352; 21: 2211- 2221.
67. **Wang L, Weinshilboum R.** Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: insights, challenges and future directions. *Oncogene.* 2006. 13; 25: 1629-1638.
68. **Tai HL, Fessing MY, Bonten EJ, Yanishevsky Y, d'Azzo A, Krynetski EY, Evans WE.** Enhanced proteasomal degradation of mutant human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) in mammalian cells: mechanism for TPMT protein deficiency inherited by TPMT\*2, TPMT\*3A, TPMT\*3B or TPMT\*3C. *Pharmacogenetics.* 1999; 9: 641-50.
69. **Kotur N, Stankovic B, Kassela K, Georgitsi M, Vicha A, Leontari I, Dokmanovic L, Janic D, Krstovski N, Klaassen K, Radmilovic M, Stojiljkovic M, Nikcevic G, Simeonidis A, Sivolapenko G, Pavlovic S, Patrinos GP, Zukic B.** 6-mercaptopurine influences TPMT gene transcription in a TPMT gene promoter variable number of tandem repeats-dependent manner. *Pharmacogenomics.* 2012; 13: 283-295.
70. **Chouchana L, Narjoz C, Roche D, Golmard JL, Pineau B, Chatellier G, Beaune P, Loriot MA.** Interindividual variability in TPMT enzyme activity: 10 years of experience with thiopurine pharmacogenetics and therapeutic drug monitoring. *Pharmacogenomics.* 2014; 15: 745-757.

71. **Coenen MJ, de Jong DJ, van Marrewijk CJ, Derijks LJ, Vermeulen SH, Wong DR, Klungel OH, Verbeek AL, Hooymans PM, Peters WH, te Morsche RH, Newman WG, Scheffer H, Guchelaar HJ, Franke B.** Identification of Patients With Variants in TPMT and Dose Reduction Reduces Hematologic Events During Thiopurine Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2015; 149: 907-917.
72. **Ansari A, Elliott T, Baburajan B, Mayhead P, O'Donohue J, Chocair P, Sanderson J, Duley J.** Long-term outcome of using allopurinol co-therapy as a strategy for overcoming thiopurine hepatotoxicity in treating inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008; 28: 734.
73. **Kuilenburg AB, Meijer J, Tanck MW, Dobritzsch D, Zoetekouw L, Dekkers LL, Roelofsen J, Meinsma R, Wymenga M, Kulik W, Büchel B, Hennekam RC, Largiadèr CR.** Phenotypic and clinical implications of variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1862: 754-762.
74. **Morel A, Boisdrion-Celle M, Fey L, Soulie P, Craipeau MC, Traore S, Gamelin E.** Clinical relevance of different dihydropyrimidine dehydrogenase gene single nucleotide polymorphisms on 5-fluorouracil tolerance. *Mol Cancer Ther*. 2006; 5: 2895-2904.
75. **Amstutz U, Froehlich TK, Largiadèr CR.** Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity. *Pharmacogenomics*. 2011; 12: 1321-1333.
76. **Jakobsen A, Nielsen JN, Gyldenkerne N, Lindeberg J.** Thymidylate Synthase and Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphism in Normal Tissue As Predictors of Fluorouracil Sensitivity. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 1365-1369.
77. **Lurje G, Manegold PC, Ning Y, Pohl A, Zhang W, Lenz HJ.** Thymidylate synthase gene variations: predictive and prognostic markers. *Mol Cancer Ther*. 2009; 8: 1000-1007.
78. **Wilson PM, Danenberg PV, Johnston PG, Lenz HJ, Ladner RD.** Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2014; 11: 282-298.

79. **Gibson TB, Becerra C, Chu E.** Polymorphisms in the Thymidylate Synthase Gene Predict Response to 5-Fluorouracil Therapy in Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*. 2006; 5: 321-323.
80. **Loganayagam A, Arenas Hernandez M, Corrigan A, Fairbanks L, Lewis CM, Harper P, Maisey N, Ross P, Sanderson JD, Marinak AM.** Pharmacogenetic variants in the DPYD, TYMS, CDA and MTHFR genes are clinically significant predictors of fluoropyrimidine toxicity. *Br J Cancer*. 2013; 108: 2505-2515.
81. **Etienne MC, Milano G, Maindrault F, Chibaudel B, Formento JL, Francoual M, Lledo G, André T, Mabro M, Mineur L, Flesch M, Carola E, Gramont A,** Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and FOLFOX response in colorectal cancer patients, *Br J Clin Pharmacol*, 2010; 69: 58-66.
82. **Thomas F, Motsinger-Reif AA, Hoskins JM, Dvorak A, Roy S, Alyasiri A, Myerson RJ, Fleshman JW, Tan BR, McLeod HL.** Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms and toxicity to 5-FU-based chemoradiation in rectal cancer. *Br J Cancer*. 2011; 105: 1654-1662.
83. **Beaune PH, Lorient MA.** Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques : aspects métaboliques. *médecine/sciences*. 2000 ; 16 : 1051-1056.
84. **Daly AK.** Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2003; 17: 27-41.
85. **Kirchheiner J, Seeringer A.** Clinical implications of pharmacogenetics of cytochrome P450 drug metabolizing enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007; 1770: 489-494.
86. **Yalcintepe S, Ozdemir O, Silan C, Ozen F, Uludag A, Candan F, Silan F.** The CYP4502D6 \*4 and \*6 alleles are the molecular genetic markers for drug response: implications in colchicine non-responder FMF patients. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2016; 41: 281-286.
87. **Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE.** Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012; 54: 1271-1294.
88. **Palomaki GE, Bradley LA, Douglas MP, Kolor K, Dotson WD.** Can UGT1A1 genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic

- colorectal cancer treated with irinotecan? An evidence-based review. *Genet Med.* 2009; 11: 21-34.
89. **Catalano RB, O'Dwyre PJ.** Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 and Irinotecan: Practical Pharmacogenomics Arrives in Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology.* 2006; 24: 4534-4538.
90. **Laborde E.** Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death and Differentiation.* 2010; 17: 1373-1380.
91. **Hezova R, Bienertova-Vasku J, Sachlova M, Hezova R, Bienertova-Vasku J, Sachlova M, V Brezkova, Vasku A, Svoboda M, Radová L, Kiss I, Vyzula R, Slaby O.** Common polymorphisms in GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and susceptibility of colorectal cancer in the Central European population. *Eur J Med Res.* 2012; 17: 17-22.
92. **Russo A, Francelin PR, Galbiatti ALS, Raposo LS, Maníglia JV, Pavarino EC, Goloni-BertolloEM.** Association between GSTP1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms involved in xenobiotic metabolism and head and neck cancer development. *Molecular Biology Report.* 2013; 40: 4181–4188.
93. **Cals L, Bertrand F, Maille N, Tchiknavorian X.** Mécanismes de résistance- Données générales. *Oncologie.* 2005; 7: 403-405.
94. **Wielinga PR, Reid G, Challa EE, van der Heijden I, van Deemter L, de Haas M, Mol C, Kuil AJ, Groeneveld E, Schuetz JD, Brouwer C, De Abreu RA, Wijnholds J, Beijnen JH, Borst P.** Thiopurine metabolism and identification of the thiopurine metabolites transported by MRP4 and MRP5 overexpressed in human embryonic kidney cells. *Mol Pharmacol.* 2002; 62: 1321-1331.
95. **Reid G, Wielinga P, Zelcer N, De Haas M, Van Deemter L, Wijnholds J, Balzarini J, Borst P.** Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Mol Pharmacol.* 2003; 63: 1094-1103.
96. **Bruhn O, Cascorbi I.** Polymorphisms of the drug transporters ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC3 and their impact on drug bioavailability and clinical relevance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014; 10: 1337-1354.

97. **Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, Altmana RB.** Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics*. 2011 ; 21: 152-161.
98. **Roden DM, Russell A, Wilke RA, Kroemer HK, Stein CM.** Pharmacogenomics: The genetics of variable drug responses. *Circulation*. 2011; 123: 1661-1670.
99. **De Iuliis F, Salerno G, Taglieri L, Scarpa S.** Are pharmacogenomic biomarkers an effective tool to predict taxane toxicity and outcome in breast cancer patients? Literature review. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015; 76: 679-690.
100. **Yi SY, Hong KS, Lim HS, Chung JY, Oh DS, Kim JR, Jung HR, Cho JY, Yu KS, Jang IJ, Shin SG.** A variant 2677A allele of the MDR1 gene affects fexofenadine disposition. *Clin Pharmacol Ther*. 2004; 76: 418-427.
101. **Haufroid V.** Genetic polymorphisms of ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC2 and their impact on drug disposition. *Current drug targets*. 2011; 12: 631-646.
102. **Balcerczak E, Panczyk M, Piaskowski S, Pasz-Walczak G, Salagacka A, Mirowski M.** ABCB1/MDR1 gene polymorphisms as a prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2010 ; 25: 1167-1176.
103. **Schaich M, Kestel L, Pfirrmann M, Robel K, Illmer T, Kramer M, Dill C, Ehninger G, Schackert G, Krex D .** A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients. *Ann Oncol*. 2009; 20: 175-181.
104. **Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U.** Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 3473-3478.
105. **Bochud M, Eap CB, Maillard M, Johnson T, Vollenweider P, Bovet P, Elston RC, Bergmann S, Beckmann JS, Waterworth DM, Mooser V, Gabriel A, Burnier M.** Association of ABCB1 genetic variants with renal function in Africans and in Caucasians. *BMC Medical Genomics*. 2008; 1: 21.

106. **Inoue K, Yuasa H.** Molecular basis for pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in rheumatoid arthritis therapy. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2014; 29: 12-19.
107. **Lima A, Bernardes M, Azevedo R, Monteiro J, Sousa H, Medeiros R, Seabra V.** SLC19A1, SLC46A1 and SLCO1B1 polymorphisms as predictors of methotrexate-related toxicity in Portuguese rheumatoid arthritis patients. *Toxicol Sci.* 2014; 142: 196-209.
108. **De Mattia E, Giuseppe T, Polesel J, Mario D, Giuseppe C, VittorinaZ, Buonadonna A; Dreussi E, Cecchin E.** Pharmacogenetics of ABC and SLC transporters in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line FOLFIRI treatment. *Pharmacogenetics and Genomics.* 2013; 23: 549-557.
109. **Franke RM, Gardner ER, Sparreboom A.** Pharmacogenetics of Drug Transporters. *Current Pharmaceutical Design.* 2010; 16: 220-230.
110. **Owen RP, Lagpacan LL, Taylor TR, De La Cruz M, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, Giacomini KM.** Functional characterization and haplotype analysis of polymorphisms in the human equilibrative nucleoside transporter, ENT2. *Drug Metab Dispos.* 2006; 34: 12-15.
111. **Hosoya N, Miyagawa K.** Targeting DNA damage response in cancer therapy. *Cancer Sci.* 2014; 105: 370-388.
112. **Gan Y, Li XR, Chen DJ, Wu JH.** Association between polymorphisms of XRCC1 Arg399Gln and XPD Lys751Gln genes and prognosis of colorectal cancer in a Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13: 5721-5724.
113. **Stoehlmacher J, Ghaderi V, Iobal S, Groshen S, Tsao-Wei D, Park D, Lenz HJ.** A polymorphism of XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer, *Anticancer Res.* 2001; 21: 3075-3079.
114. **Yin M, Yan J, Martinez-Balibrea E, Graziano F, Lenz HJ, Kim HJ, Robert J, Im SA, Wang WS, Etienne-Grimaldi MC, Wei Q.** ERCC1 and ERCC2 polymorphisms predict clinical outcomes of oxaliplatin-based chemotherapies in gastric and colorectal cancer: a systemic review and meta-analysis. *Clin Cancer Res.* 2011; 17: 1632-1640.
115. **Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, Mey V, Laan AC.** Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in

- gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 1797-1803.
116. **Fedier A, Schwarz VA, Walt H, Carpini RD, Haller U, Fink D.** Resistance to topoisomerase poisons due to loss of DNA mismatch repair. *Int J Cancer.* 2011; 93: 571-476.
  117. **Bush ZM, Longtine JA, Cunningham T, Schiff D, Jane JA Jr, Vance ML, Thorner MO, Laws ER Jr, Lopes MB.** Temozolomide treatment for aggressive pituitary tumors: correlation of clinical outcome with O(6)-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation and expression. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95: E280-E290.
  118. **Takahashi Y, Nakamura H, Makino K, Hide T, Muta D, Kamada H, Kuratsu J.** Prognostic value of isocitrate dehydrogenase 1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation, and 1p19q co-deletion in Japanese malignant glioma patients. *World J Surg Oncol.* 2013; 11:284.
  119. **Smrdel U, Popovic M, Zwitter M, Bostjancic E, Zupan A, Kovac V, Glavac D, Bokal D, Jerebic J.** Long-term survival in glioblastoma: methyl guanine methyl transferase (MGMT) promoter methylation as independent favourable prognostic factor. *Radiol Oncol.* 2016; 10: 394-401.
  120. **Zhang J, Stevens M, Bradshaw T.** Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Current Molecular Pharmacology.* 2012; 5: 102-114.
  121. **Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG.** New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors (RECIST Guidelines). *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92: 205-216.
  122. **Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaertsc J, Schwartzd LH, Sargente D, Fordf R, Danceyg J, Arbuckh S, Gwytheri S, Mooneyg M, Rubinsteing L, Shankarg L, Doddg L, Kaplanj R, Lacombec D, Verweijk J.** New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER.* 2009; 45 : 228 -247.
  123. **Morrison TM, Weis JJ, Wittwer CT.** Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR green I monitoring during amplification. *Biotechniques .* 1998; 24: 952-962.

124. **El Saghir NS, Khalil MK, Eid T, El Kinge AR, Charafeddine M, Geara F, Seoud M, Shamseddine AI.** Trends in epidemiology and management of breast cancer in developing Arab countries: a literature and registry analysis. *Int J Surg.* 2007; 5 : 225-233.
125. **Najjar H, Easson A.** Age at diagnosis of breast cancer in Arab nations. *Int J Surg.* 2010; 8: 448-452.
126. **Key TJ, Verkasalo Pk, Banks E.** Epidemiology of breast cancer. *THE LANCET Oncology.* 2001; 2: 133-140
127. **Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, Wang Y, Marcom PK, Marks JR, Febbo PG, Nevins JR, Potti A, Blackwell KL.** Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol.* 2008; 26:3324-3330.
128. **Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM.** Ductal Carcinoma in Situ of the Breast. *N Engl J Med.* 2004; 350: 1430-1441.
129. **Teshome M, Hunt K.** Neoadjuvant therapy in the treatment of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2014 ; 23: 505-523.
130. **Bonotto M, Gerratana L, Iacono D, A Minisini, K Rihawi, G Fasola, F Puglisi.** Treatment of Metastatic Breast Cancer in a Real-World Scenario: Is Progression-Free Survival With First Line Predictive of Benefit From Second and Later Lines?. *The Oncologist.* 2015; 20: 719-724.
131. **Pruthi S, Boughey J, Brandt K, Degnim A, Dy G, Goetz M, Perez E, Reynolds C, Schomberg P, Ingle J.** A multidisciplinary approach to the management of breast cancer, Part 2: Therapeutic considerations. *Mayo Clin Proc.* 2007; 82: 1131-1140.
132. **Kataja V, Castiglione M.** Primary breast cancer: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology.* 2009; 20 : iv10–iv14.
133. **Senechal C, Reyat F, Malhaire C, Marchand V, Bidard FC, Sigal B, Pierga JY.** Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *La Lettre du Cancérologue.* 2011 ; XX : 428-536.
134. **Roché H, Fumoleau P, Spielmann M, Canon JL, Delozier T, Serin D, Symann M, Kerbrat P, Soulié P, Eichler F, Viens P, Monnier A,**

- Vindevoghel A, Campone M, Goudier MJ, Bonneterre J, Ferrero JM, Martin AL, Genève J, Asselain B. Sequential adjuvant epirubicin-based and docetaxel chemotherapy for node-positive breast cancer patients: the FNCLCC PACS 01 Trial. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 5664-5671.
135. Jones S, Holmes FA, O'Shaughnessy J, Blum JL, Vukelja SJ, McIntyre KJ, John E, Pippin JE, Bordelon JH, Kirby RL, Sandbach J, Hyman WJ, Richards DA, Menzel RG, Boehm KA, Meyer WG, Asmar L, Mackey D, Riedel S, Muss H, Savin MA. Docetaxel with cyclophosphamide is associated with an overall survival benefit compared with doxorubicin and cyclophosphamide: 7-year follow-up of US Oncology Research Trial 9735. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 1177-1183.
136. Ji H, Xuan Q, Yan C, Liu T, Nanding A, Zhang Q. The prognostic and predictive value of the lymphocyte to monocyte ratio in luminal-type breast cancer patients treated with CEF chemotherapy. *Oncotarget.* 2016; 7: 34881-34889.
137. Westbrook K, Stearns V. Pharmacogenomics of Breast Cancer Therapy: An Update. *Pharmacol Ther.* 2013 ; 139: 1-11.
138. Huang R, Ratain M. Pharmacogenetics and Pharmacogenomics of Anticancer Agents. *CA Cancer J Clin.* 2009 ; 59: 42-55.
139. Ben Fredj R, Gross E, Chouchen L, B'Chir F, Ben Ahmed S, Neubauer S, Kiechle M, Saguem S. Analyse génétique du gène de la dihydropyrimidine déhydrogénase (DPYD) dans la population tunisienne. *Comptes rendus – Biologies.* 2007; 330: 764-769.
140. Süzen HS, Yüce N, Güvenç G, Duydu Y, Erke T. TYMS and DPYD polymorphisms in a Turkish population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005; 61: 881-885.
141. Castro R, Rivera I, Ravasco P, Jakobs C, Blom Hj, Camilo Me, De Almeida It. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T and 1298A→C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine. *Q J Med.* 2003; 96: 297-303.
142. Saraswathy KN, Asghar M, Samtani R, Murry B, Mondal PR, Ghosh PK, Sachdeva MP. Spectrum of MTHFR gene SNPs C677T and A1298C: a study among 23 population groups of India. *Mol Biol Rep.* 2012; 39: 5025-5031.

143. **Yang B, Liu Y, Li Y, Fan S, Zhi X, Lu X, Wang D, Zheng Q, Wang Y, Wang Y, Sun G.** Geographical Distribution of MTHFR C677T, A1298C and MTRR A66G Gene Polymorphisms in China: Findings from 15357 Adults of Han Nationality. *PLOS ONE*. 2013; 8: e57917- e57928.
144. **Wang X, Fu J, Li Q, Zeng D.** Geographical and Ethnic Distributions of the MTHFR C677T, A1298C and MTRR A66G Gene Polymorphisms in Chinese Populations: A Meta-Analysis. *PLOS One*. 2016; 18: e0152414.
145. **Hanene C, Jihene L, Jamel A, Kamel H, Agnès H.** Association of GST genes polymorphisms with asthma in Tunisian children. *Mediators Inflamm*. 2007; 2007: 19564.
146. **Yen-Revollo JL, Van Booven DJ, Peters EJ, Hoskins JM, Engen RM, Kannall HD, Ofori-Adjei D, McLeod HL, Marsh S.** Influence of ethnicity on pharmacogenetic variation in the Ghanaian population. *The Pharmacogenomics Journal*. 2009; 9: 373-379.
147. **Dunna NR, Vuree S, Kagita S, Surekha D, Digumarti R, Rajappa S, Satti V.** Association of GSTP1 gene (I105V) polymorphism with acute leukaemia. *J Genet*. 2012; 17: e60-e63.
148. **Kunak SC, Ada AO, Karacaoglan V, Soydas E, Bilgen S, Iscan M.** Drug/Xenobiotic metabolizing enzyme polymorphisms in a Turkish population. *Afr. J. Pharm. Pharmacol*. 2012; 6: 2068-2074.
149. **Kiyohara C, Wakai K, Mikami H, Sido K, Ando M, Ohno Y.** Risk modification by CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms in the association of environmental tobacco smoke and lung cancer: a case-control study in Japanese nonsmoking women. *Int. J. Cancer*. 2003; 107: 139-144.
150. **Sharma A, Pandey A, Sharma S, Chatterjee I, Mehrotra R, Sehgal A, Sharma JK** Genetic polymorphism of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) in Delhi population and comparison with other global populations. *Meta Gene*. 2014; 2: 134-142.
151. **Wu H, Kang H, Liu Y, Tong W, Liu D, Yang X, Lian M, Yao W, Zhao H, Huang D, Sha X, Wang E, Wei M.** Roles of ABCB1 gene polymorphisms and haplotype in susceptibility to breast carcinoma risk and clinical outcomes. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 2012; 138: 1449-1462.

152. **Wang J, Wang B, Bi J.** Significant association between ABCB1 gene C3435T polymorphism and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 126: 815-817.
153. **Brambila-Tapia AJ.** MDR1 (ABCB1) polymorphisms: functional effects and clinical implications. *Rev Invest Clin.* 2013; 65: 445-454.
154. **Caudle KE, Thorn CF, Klein TE, Swen JJ, McLeod HL, Diasio RB Schwab M.** Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2013; 94: 640-645.
155. **Milano G, McLeod HL.** Can dihydropyrimidine dehydrogenase impact 5-fluorouracil-based treatment?. *European Journal of Cancer.* 2000; 36: 37-42.
156. **Deenen MJ, Cats A, Mandigers CM, Soesan M, Terpstra WE, Beijnen JH, Schellens JH.** Prevention of severe toxicity from capecitabine, 5-fluorouracil and tegafur by screening for DPD-deficiency. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2012; 156:A4934.
157. **Terrazzino S, Cargnin S, Del Re M, Danesi R, Canonico P, Genazzani A.** DPYD IVS14+1G>A and 2846A>T genotyping for the prediction of severe fluoropyrimidine-related toxicity: a meta-analysis. *Pharmacogenomics.* 2013; 14: 1255–1272.
158. **Henricks LM, Lunenburg C, Meulendijks D, Gelderblom H, Cats A, Swen JJ, Schellens J, Guchelaar HJ.** Translating DPYD genotype into DPD phenotype: using the DPYD gene activity score. *Pharmacogenomics.* 2015; 16: 1275–1284.
159. **Offer SM, Fossum CC, Wegner NJ, Stuflesser AJ, Butterfield GL, Diasio RB.** Comparative functional analysis of DPYD variants of potential clinical relevance to dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *Cancer Res.* 2014; 74: 2545–2554.
160. **Etienne MC, Cheradame S, Fischel JL, Formento P, Dassonville O, Renée N, Schneider M, Thyss A, Demard F, Milano G.** Response to Fluoro-uracil therapy in cancer patients: the role of tumoral dihydro-pyrimidine dehydrogenase activity. *J Clin Oncol.* 1995; 13: 1663 - 1670.
161. **Saif MW.** Dihydropyrimidine Dehydrogenase Gene (DPYD) Polymorphism among Caucasian and non-Caucasian Patients with 5-FU- and Capecitabine-

- related Toxicity Using Full Sequencing of DPYD. *Cancer Genomics and Proteomics*. 2013; 10: 89-92.
- 162. De Mattia E, Toffoli G.** C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalization. *Eur J Cancer*. 2009; 45: 1333-1351.
- 163. Marcuello E, Altés A, Menoyo A, Rio ED, Baiget M.** Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy?. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006; 57: 835-840.
- 164. Weisberga IS, Jacquesb PF, Selhubb J, Bostomc AG, Chena Z, Ellisonsd RC, Eckfeldte JH, Rozen R.** The 1298A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis*. 2001; 156: 409-415.
- 165. Gusella M, Frigo AC, Bolzonella C, Marinelli R, Barile C, Bononi A, Crepaldi G, Menon D, Stievano L, Toso S, Pasini F, Ferrazzi E, Padrini R.** Predictors of survival and toxicity in patients on adjuvant therapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009; 100: 1549-1557.
- 166. Suner A, Buyukhatipoglu H, Aktas G, Kus T, Ulasli M, Oztuzcu S, Kalender ME, Sevinc A, Kul S, Camci C.** Polymorphisms in the MTHFR gene are associated with recurrence risk in lymph node-positive breast cancer patients. *Onco Targets Ther*. 2016; 9: 5603- 5609.
- 167. Taflin H, Wettergren Y, Odin E, Carisson G, Derwinger K.** Gene polymorphisms MTHFRC677T and MTRA2756G as predictive factors in adjuvant chemotherapy for stage III colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2011; 31: 3057–3062.
- 168. Afzal S, Jensen SA, Vainer B, Vogel U, Matsen JP, Sørensen JB, Andersen PK, Poulsen HE.** MTHFR polymorphisms and 5-FU-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2009; 20: 1660-1666.
- 169. Zhang W, Press OA, Haiman CA, Yang DY, Gordon MA, Fazzone W El-Khoueiry A, Iqbal S, Sherrod AE, Lurje G, Lenz HJ.** Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and sex-specific survival in patients with metastatic colon cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 3726-3731.

170. **Lee KH, Chang HJ, Han SW, Oh DY, Im SA, Bang YJ, Kim SY, Lee KW, Kim JH, Hong YS, Kim TW, Park YS, Kang WK, Shin SJ, Ahn JB, Kang GH, Jeong SY, Park KJ, Park JG, Kim TY.** Pharmacogenetic analysis of adjuvant FOLFOX for Korean patients with colon cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013; 71: 843-851.
171. **Custodio A, Moreno-Rubio J, Aparicio J, Gallego-Plazas J, Yaya R, Maurel J, Rodríguez-Salas N, Burgos E, Ramos D, Calatrava A, Andrada E, Díaz-López E, Sánchez A, Madero R, Cejas P, Feliu J.** Pharmacogenetic predictors of outcome in patients with stage II and III colon cancer treated with oxaliplatin and fluoropyrimidine-based adjuvant chemotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2014; 13: 2226-2237.
172. **Chaturvedi P, Tulsyan S, Agarwal G, Lal P, Agrawal S, Mittal RD, Mittal B.** Relationship of MTHFR and NQO1 Pharmacogenetics and Chemotherapy Clinical Outcomes in Breast Cancer Patients. *Biochem Genet.* 2015; 53: 211-222.
173. **Derwinger K, Wettergren Y, Odin E, Carlsson G, Gustavson B.** A study of the MTHFR gene polymorphism C677T in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2009; 8: 43-48.
174. **Long S, Yang X, Liu X, Yang P.** Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and susceptibility for cervical lesions: a meta-analysis. *PLoS One.* 2012; 7: e52381.
175. **Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, Rulli E, Canestrari E, Santini D, Catalano V, Ficarelli R, Maltese P, Bissoni R, Masi G, Schiavon G, Giordani P, Giustini L, Falcone A, Tonini G, Silva R, Mattioli R, Floriani I, Magnani M.** Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4-chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 1247-1254.
176. **Sohn KJ, Croxford R, Yates Z, Lucock M, Kim YI.** Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96: 134-144.
177. **Kawakami K, Ruskiewicz A, Bennett G, Moore J, Watanabe G, Iacopetta B.** The folate pool in colorectal cancers is associated with DNA

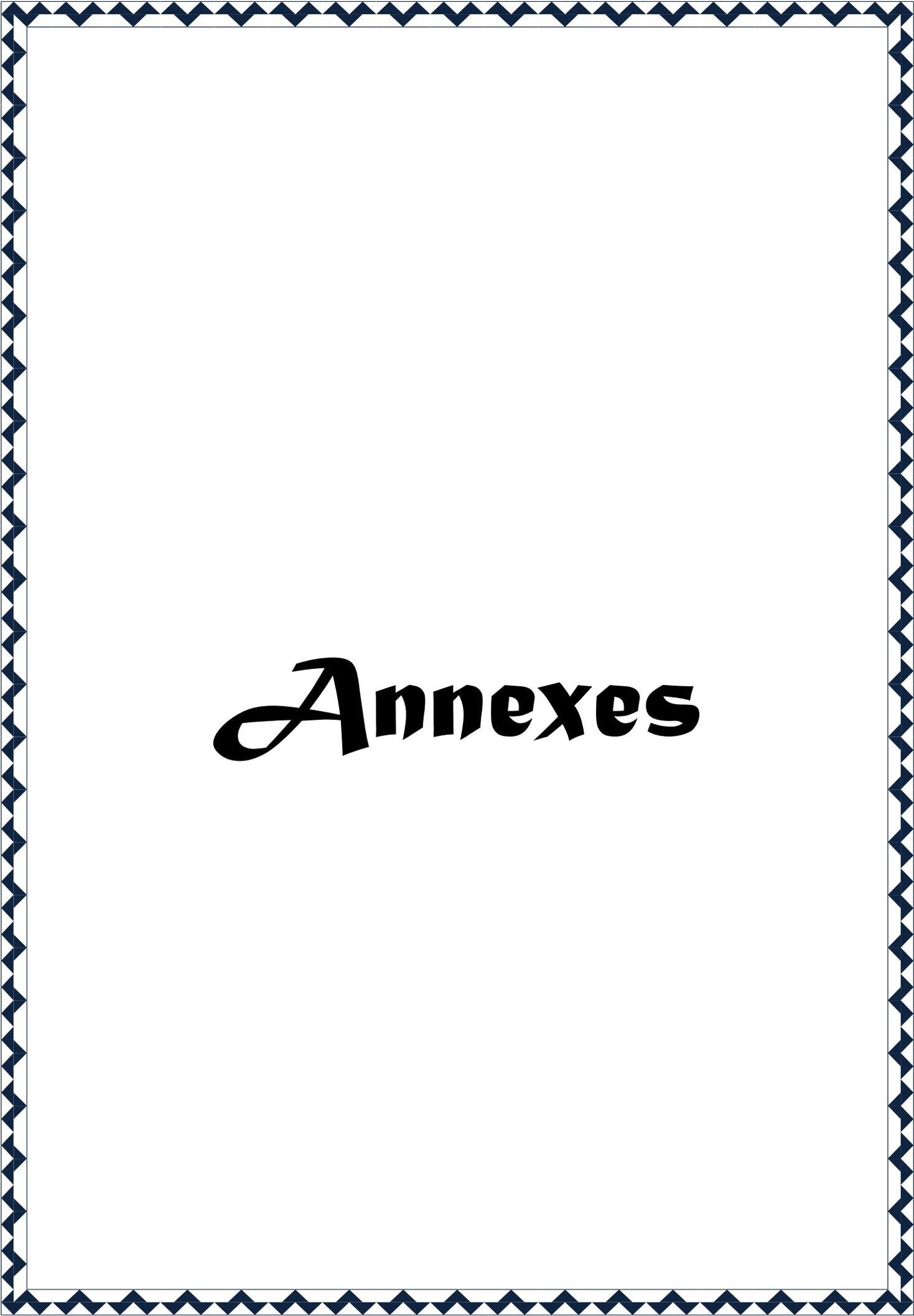
- hypermethylation and with a polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase. *Clin Cancer Res.* 2013; 9: 5860-5865.
- 178. Romero A, Martín M, Oliva B, de la Torre J, Furio V, de la Hoya M, García-Sáenz JA, Moreno A, Román JM, Diaz-Rubio E, Caldés T.** Glutathione S-transferase P1 c.313A > G polymorphism could be useful in the prediction of doxorubicin response in breast cancer patients. *Ann Oncol.* 2012; 23: 1750-1756.
- 179. Oliveira AL, Rodrigues FF, Santos RE, Aoki T, Rocha MN, Longui CA, Melo MB.** GSTT1, GSTM1, and GSTP1 polymorphisms and chemotherapy response in locally advanced breast cancer. *Genet Mol Res.* 2010; 9: 1045-1053.
- 180. Wang J, Wang T, Yin GY, Yang L, Wang ZG, Bu XB.** Glutathione S-transferase polymorphisms influence chemotherapy response and treatment outcome in breast cancer. *Genet Mol Res.* 2015; 22: 11126-11132.
- 181. Kap EJ, Richter S, Rudolph A, Jansen L, Ulrich A, Hoffmeister M, Ulrich CM, Brenner H, Chang-Claude J.** Genetic variants in the glutathione S-transferase genes and survival in colorectal cancer patients after chemotherapy and differences according to treatment with oxaliplatin. *Pharmacogenet Genomics.* 2014; 24: 340-347.
- 182. Funke S, Timofeeva M, Risch A.** Genetic polymorphisms in GST genes and survival of colorectal cancer patients treated with chemotherapy. *Pharmacogenomics.* 2010; 11: 33-41.
- 183. Ekhardt C, Rodenhuis S, Smits PHM, Beijnen JH, Huitema A.** An overview of the relations between polymorphisms in drug metabolising enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment. *Cancer Treatment Reviews.* 2009; 35: 18-31
- 184. Yang G, Shu XO, Ruan ZX, Cai QY, Jin F, Gao YT, Zheng W.** Genetic polymorphisms in glutathione-S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and survival after chemotherapy for invasive breast carcinoma. *Cancer.* 2005; 103: 52-58.
- 185. Tran A, Bournerias F, Le Beller C, Mir O, Rey E, Pons G, Delahousse M, Tréluyer JM.** Serious haematological toxicity of cyclophosphamide in relation to CYP2B6, GSTA1 and GSTP1 polymorphisms. *Br J Clin Pharmacol.* 2008; 65: 279-280.

186. **Oliveira AL, Rodrigues FF, Santos RE, Rozenowicz RL, Barbosa de Melo M.** GSTT1, GSTM1, and GSTP1 polymorphisms as a prognostic factor in women with breast cancer. *Genet. Mol. Res.* 2014; 13: 2521-2530
187. **Duggan C, Ballard-Barbash R, Baumgartner RN, Baumgartner KB, Bernstein L, McTiernan A.** Associations between null mutations in GSTT1 and GSTM1, the GSTP1 Ile(105)Val polymorphism, and mortality in breast cancer survivors. *Springerplus.* 2013; 2: 450.
188. **Zhang X, Li M, Wang H, Niu W, Wu Z, Shi G, Jianmiao He J, Wu J.** Polymorphism in glutathione S-transferase P1 (GSTP1) on the effect of epirubicin or doxorubicin chemotherapy among breast cancer. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2013; 7: 54-57.
189. **Mishra A, Chandra R, Mehrotra PK, Bajpai P, Agrawal D.** Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphism and response to neoadjuvant chemotherapy (CAF) in breast cancer patients. *Surg. Today.* 2011; 41: 471-476.
190. **Kerb R.** Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Letters.* 2006; 234: 4-33.
191. **DeGorter MK, Xia CQ, Yang JJ, Kim RB.** Drug Transporters in Drug Efficacy and Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 2012; 52: 249-273.
192. **Cascorbi I.** Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacology & Therapeutics.* 2006; 112: 457-473.
193. **Wolking S, Schaeffeler E, Lerche H, Schwab M, Nies AT.** Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature. *Clin Pharmacokinet.* 2015; 54: 709-735.
194. **Sparreboom A, Danesi R, Ando Y, Chan J, Figg WD.** Pharmacogenomics of ABC transporters and its role in cancer chemotherapy. *Drug Resistance.* 2003; 6: 71-84.
195. **Swart M, Ren Y, Smith P, Dandara C.** ABCB1 4036A>G and 1236C>T Polymorphisms Affect Plasma Efavirenz Levels in South African HIV/AIDS Patients. *Front Genet.* 2012; 3: 236.

196. **Marsh S, Paul J, King CR**, et al. Pharmacogenetic Assessment of Toxicity and Outcome After Platinum Plus Taxane Chemotherapy in Ovarian Cancer: The Scottish Randomised Trial in Ovarian. *Cancer J Clin Oncol*. 2007; 25: 4528-4535.
197. **Yamauchi A, Ieiri I, Kataoka Y, Tanabe M, Nishizaki T, Oishi R, Higuchi S, Otsubo K, Sugimachi K**. Neurotoxicity induced by tacrolimus after liver transplantation: relation to genetic polymorphisms of the ABCB1 (MDR1) gene. *Transplantation*. 2002; 74: 571-572.
198. **Gervasini G, Carrillo JA, Garcia M, San Jose C, Cabanillas A, Benitez J**. Adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) (multidrug resistance 1) G2677T/A gene polymorphism is associated with high risk of lung cancer. *Cancer*. 2006; 107: 2850-2857.
199. **Bray J, Sludden J, Griffin MJ, Cole M, Verrill M, Jamieson D, Boddy AV**. Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *Br J Cancer*. 2010; 16: 1003-1009.
200. **George J, Dharanipragada K, Krishnamachari S, Chandrasekaran A, Sam SS, Sunder E**. A single-nucleotide polymorphism in the MDR1 gene as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2009; 9: 161-165.
201. **Kafka A, Sauer G, Jaeger C, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, Deissler H**. Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Int J Oncol*. 2003; 22: 1117-1121.
202. **Ashariati A**. Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predict response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer with Her2/neu expression. *Acta Med Indones*. 2008; 40:187-191.
203. **Zhou Z, Chen Q, Zuo D, Wang H, Hua Y, Cai Z**. ABCB1 (rs1128503) polymorphism and response to chemotherapy in patients with malignant tumors-evidences from a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8: 265-272.
204. **Haerian BS, Roslan H, Raymond AA, Tan CT, Lim KS, Zulkifli SZ, Mohamed EH, Tan HJ, Mohamed Z**. ABCB1 C3435T polymorphism and the

- risk of resistance to antiepileptic drugs in epilepsy: a systematic review and meta-analysis. *Seizure*. 2010; 19: 339-346.
205. **Wang Z, Wang T, Bian J.** Association between MDR1 C3435T polymorphism and risk of breast cancer. *Gene*. 2013; 10: 94-99.
206. **Hamidovic A, Hahn K, Kolesar J.** Clinical significance of ABCB1 genotyping in oncology. *J Oncol Pharm Pract*. 2010; 16: 39-44.
207. **Kim HJ, Im SA, Keam B, Ham HS, Lee KH, Kim TY, Kim YJ, Oh DY, Kim JH, Han W, Jang IJ, Kim TY, Park IA, Noh DY.** ABCB1 polymorphism as prognostic factor in breast cancer patients treated with docetaxel and doxorubicin neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Sci*. 2015; 106: 86-93.
208. **Tulsyan S, Mittal RD, Mittal B.** The effect of ABCB1 polymorphisms on the outcome of breast cancer treatment. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2016; 9: 47-58.
209. **Carels N, Spinassé LB, Tilli TM, Tuszyński JA.** Toward precision medicine of breast cancer. *Theor Biol Med Model*. 2016; 13: 7.
210. **Van Kuilenburg AB, Etienne-Grimaldi MC, Mahamat A, Meijer J, Laurent-Puig P, Olschwang S, Gaub MP, Hennekam RC, Benchimol D, Houry S, Letoublon C, Gilly FN, Pezet D, Andre T, Faucheron JL, Abderrahim-Ferkoune A, Vijzelaar R, Pradere B, Milano G.** Frequent intragenic rearrangements of DPYD in colorectal tumours. *Pharmacogenomics J*. 2015; 15: 211-218.
211. **Cavic M, Krivokuca A, Boljevic I, Brotto K, Jovanovic K, Tanic M, Filipovic L, Zec M, Malisic E, Jankovic R, Radulovic S.** Pharmacogenetics in cancer therapy - 8 years of experience at the Institute for Oncology and Radiology of Serbia. *J BUON*. 2016; 21: 1287-1295.
212. **Nasr R, Sleiman F, Awada Z, Zgheib NK.** The pharmacoepigenetics of drug metabolism and transport in breast cancer: review of the literature and in silico analysis. *Pharmacogenomics*. 2016; 17: 1573-1585.
213. **Majchrzak-Celińska A, Baer-Dubowska W.** Pharmacoepigenetics: an element of personalized therapy?. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016; 28: 1-12.
214. **Hertz DL, Rae JM.** Pharmacogenetic Predictors of Response. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 882: 191-215.

215. **Rodríguez-Vicente AE, Lumbreras E, Hernández JM, Martín M, Calles A, Otín CL, Algarra SM, Páez D, Taron M.** Pharmacogenetics and pharmacogenomics as tools in cancer therapy. *Drug Metab Pers Ther.* 2016; 31: 25-34.
216. **Bartlett JM, McConkey CC, Munro AF, Desmedt C, Dunn JA, Larsimont DP, O'Malley FP, Cameron DA, Earl HM, Poole CJ, Shepherd LE, Cardoso F, Jensen MB, Caldas C, Twelves CJ, Rea DW, Ejlertsen B, Di Leo A, Pritchard KI.** Predicting Anthracycline Benefit: TOP2A and CEP17-Not Only but Also. *J Clin Oncol.* 2015; 20: 1680-1687.
217. **Rofaiel S, Muo EN, Mousa SA.** Pharmacogenetics in breast cancer: steps toward personalized medicine in breast cancer management. *Pharmgenomics Pers Med.* 2010; 3: 129-143.
218. **Vulsteke C, Pfeil AM, Schwenkgenks M, Pettengell R, Szucs TD, Lambrechts D, Peeters M, van Dam P, Dieudonné AS, Hatse S, Neven P, Paridaens R, Wildiers H.** Impact of genetic variability and treatment-related factors on outcome in early breast cancer patients receiving (neo-) adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide, and docetaxel. *Breast Cancer Res Treat.* 2014; 147: 557-570.



# *Annexes*

## Annexe 1

# Questionnaire

PATIENT N° :

Date d'entrée :

### *Renseignements*

Nom :

Prénom :

Sexe :

Âge :

Poids et taille :

Adresse :

Profession :

Marié ou célibataire :

Nombre d'enfants :

Etat du cycle menstruel :

Contraception orale :

### *Antécédents familiaux :*

Cancer du sein :

Autres Cancers :

### *Examen de la tumeur :*

Localisation :

Type histologique :

*Récepteurs hormonaux :* RE :

RP :

HER2 :

*Marqueurs tumoraux*

CA 15.3 :

*Chimiothérapie :*

adjuvante :

néoadjuvante :

palliative :

Médicaments:

Dose:

Adriamycine (ou épirubicine)

.....

5-Fluorouracile

.....

Andoxan

.....

Nombre de cures:

.....

### *Réponse à la chimiothérapie*

Réponse complète :  Réponse partielle :  Stabilité :  Progression :

## Annexe 2

Laboratoire de Génétique et de Biologie Moléculaire et service d'Oncologie Médicale

Chef de laboratoire : Pr N. ABADI

# Formulaire de consentement pour étude génétique

**Je soussigné(e) : Nom** ..... **Prénom** .....

Certifie avoir été pleinement informé(e) par le : **Dr/Pr T.FILALI**

1. Des raisons et des conditions de l'étude génétique me concernant
  2. Du caractère strictement confidentiel des résultats qui seront obtenus
  3. Que ces études se limiteront à la recherche d'une anomalie génétique dans le cadre du cancer du sein
  4. Que ces études seront réalisées par un laboratoire spécialisé et agréé
  5. Que je pourrais avoir connaissance par mon médecin traitant des résultats ainsi que toute information confidentielle me concernant
- **Donne mon accord pour l'enregistrement des données médicales nécessaires à ces études**
  - **Accepte que le prélèvement puisse être utilisé pour ces examens.**

Fait à : Constantine

Le :

.....

Signature du patient  
prescripteur

Nom et signature du médecin

Cachet du service

## Annexe 3

### Méthode d'extraction d'ADN au NaCl

#### 1. Préparation des leucocytes

1. Dans un tube Falcon de 50 ml .mettre le sang et compléter à 25 ml avec du TE 20:5 laisser 10 min dans la glace
2. Centrifuger 10 min à 3900g (3800 rpm)
3. Aspirer le surnageant avec la trompe à vide
4. Ajouter quelques ml de TE 20 :5 au culot et le remettre en suspension avec une pastille stérile.
5. Compléter à 25 ml avec du TE 20 :5 et laisser 10 min dans la glace.
6. Centrifuger dans les mêmes conditions que la première fois.
7. Aspirer le surnageant avec une trompe à vide : Obtention d'un culot des leucocytes (si on veut s'arrêter à ce niveau les mettre dans un tube nunc de 1.5 ml avec du TE10 :1 et les conserver à -20° dans le frigo)

#### 2. Extraction de l'ADN

1. Transvaser le culot de leucocytes dans un tube Falcon de 15 ml
2. Ajouter 3 ml de tampon de lyse (NaCl 400 mM, EDTA 2mM, Tris 10Mm, pH=8.2) en dilacérant le culot avec une passette stérile
3. Ajouter 200 µl de SDS à 10%
4. Ajouter 100 µl de protéinase K à 10 mg /ml
5. Agiter le tube sur une roue à 37°C une nuit
6. Le lendemain .refroidir dans la glace
7. Ajouter 1 ml de NaCl 4 M et agiter vigoureusement à la main
8. Remettre 5 min dans la glace (précipitation des protéines)
9. Centrifuger 15 min à 2500 rpm
10. Transvaser le surnageant dans un tube Falcon de 15 ml. Ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi (environ 8 ml) et agiter en retournant le tube plusieurs fois : la pelote d'ADN se forme
11. Laisser éventuellement 30 min à -20°C si la pelote ne se forme pas
12. Récupérer la pelote d'ADN avec une pipette pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol à 70%.
13. Mettre la pelote dans un tube nunc

#### 3. Solubilisation

Ajouter entre 300 et 1000 µl de l'eau distillée stérile selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée. Laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jours).

## Annexe 4

### Préparation des solutions

**-TE 20:5** :(Tris 20mM, EDTA 5Mm, pH 7.5)

- Tris : 2.422g /l
- EDTA : 1.86g/l
- Ajuster le pH avec HCL 1N

**-TE 10:1** :( Tris 10mM, EDTA 1Mm, pH 7.4)

- Tris : 0.606 g
- EDTA : 0.1869 g pour 500 ml.
- Ajuster le pH avec de l' HCL 1N

**-Tampon de lyse : NaCl 400 mM.**

- Tris : 10mM
- EDTA : 2mM.
- pH8.2

**-TBE 10X:**

- Tris 108 g.
- Acide borique 55 g.
- EDTA 9.3 g.
- Qsp H<sub>2</sub>O 1L.

## Résumé :

La médecine personnalisée est un concept visant à adapter le traitement d'une pathologie à chaque individu grâce à une meilleure connaissance des causes de variabilités interindividuelles.

Dans le domaine de l'oncologie, le constat d'une très grande variabilité de la réponse à un médicament, en termes d'efficacité et de toxicité, est depuis longtemps un problème de santé publique. Cette variabilité interindividuelle peut provenir de polymorphismes génétiques impliqués dans la cinétique des médicaments. Certains SNP sont associés à une efficacité meilleure ou réduite du traitement. L'objectif de ce travail était la recherche de biomarqueurs moléculaires prédictifs de l'efficacité des chimiothérapies les plus administrées dans le cancer du sein. Nous avons étudié la contribution des polymorphismes IVS14+1G>A du gène de la DPYD, A313G du gène de la GSTP1, C677T et A1298C du gène de la MTHFR G2677T/A et C3435T du gène ABCB1 dans la réponse à une chimiothérapie de type FAC ou FEC dans le cancer du sein.

Notre échantillon comporte 117 patientes. Les réponses du traitement ont été évaluées et le génotypage des différents polymorphismes est réalisé par PCR RFLP et séquençage direct.

Notre étude confirme qu'il y a une corrélation significative entre les polymorphismes IVS14+1G>A du gène de la DPYD, C677T du gène de la MTHFR et la réponse au traitement ( $p < 0,05$ ). Ces résultats confirment la valeur de ces polymorphismes comme prédicteurs de l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques de type FAC ou FEC pour les patients atteints de cancer du sein et, par conséquent, nos résultats montrent l'intérêt d'une approche basée sur la pharmacogénétique pour identifier de nouveaux biomarqueurs pronostiques et prédictifs, dans la perspective d'un traitement personnalisé.

## **Abstract:**

Personalized medicine is a concept designed to adapt the treatment of pathology to each individual through a better knowledge of the causes of inter-individual variabilities.

In the domain of oncology, the finding of great variability in the response to a drug, in terms of efficacy and toxicity, is far to be new. This inter-individual variability can come from genetic polymorphisms involved in the kinetics of drugs. Some SNPs are suggested to be associated with improved or reduced efficacy of treatment. The aim of this study was to search for molecular markers that were predictive of the most effective chemotherapy regimens in breast cancer. We studied the contribution of polymorphisms IVS14 + 1G> A of DPYD gene, A313G of GSTP1 gene, C677T and A1298C of MTHFR gene, G2677T/A and C3435T of ABCB1 gene in response to FAC or FEC breast cancer's chemotherapy.

Our cohort included 117 patients. Treatment outcomes were evaluated and genotyping of the various polymorphisms was carried out by RFLP PCR and direct sequencing.

Our study confirms that there is a significant correlation between the polymorphisms IVS14 + 1G> A of DPYD gene, C677T of MTHFR gene and response to treatment ( $p < 0.05$ ). These results confirm the value of these polymorphisms as predictors of the efficacy of FAC or FEC chemotherapeutic treatments for breast cancer patients and, therefore, the benefit of a pharmacogenetic approach to identify new prognostic and predictive biomarkers, with a view to personalized treatment.

## ملخص

الطب الشخصي هو مفهوم لتكييف العلاج إلى كل فرد من خلال معرفة أفضل لأسباب التباين بين الأفراد.

في مجال علم الأورام، الإنتباه إلى وجود التباين الشديد في الإستجابة للدواء، من حيث الفعالية ومن حيث السمية، منذ فترة طويلة أصبح مشكلة صحية عامة. هذا التباين بين الأفراد يمكن أن يكون بسبب التباين في الأشكال الجينية التي تساهم في حركية الأدوية. ويرتبط بعض تعدد الأشكال النووية المنفردة مع زيادة أو تقليل فعالية العلاج. الهدف من هذا العمل هو البحث عن المؤشرات الحيوية الجزيئية التنبؤية لفعالية العلاج الكيميائي المستعمل في علاج سرطان الثدي.

درسنا مساهمة الأشكال  $IVS14+1G>A$  للمورثة  $DPYD$  ،  $A313G$  للمورثة  $GSTP1$ ،  $C677T$  و  $A1298C$  للمورثة  $MTHFR$  و  $G2677T/A$  و  $C3435T$  للمورثة  $ABCB1$  في الإستجابة إلى نوع من العلاج الكيميائي  $FAC$  أو  $FEC$  في سرطان الثدي.

تشمل العينة 117 مريضا. تم تقييم الإستجابات للعلاج وأجري التنميط الجيني لمختلف الأشكال النووية المنفردة باستعمال تقنية  $PCR$   $RFLP$  والتسلسل المباشر.

تؤكد هذه الدراسة أن هناك علاقة ذات دلالة إحصائية بين تعدد الأشكال  $IVS14+1G>A$  للمورثة  $DPYD$  و  $C677T$  للمورثة  $MTHFR$  والإستجابة للعلاج ( $p < 0,05$ ). تؤكد هذه النتائج قيمة هذه الأشكال النمطية كمنبئ لفعالية العلاج الكيميائي  $FAC$  أو  $FEC$  لمرضى سرطان الثدي، وبالتالي نتائجا تظهر قيمة منهجية تقوم على علم الوراثة الدوائي لتحديد مؤشرات حيوية منذرة وتنبؤية جديدة في منظور شخصية العلاج.

<b>Présenté par : SEDRATI-ZAAF Khadidja</b>	Date de soutenance : 29 – 06 – 2017															
<b>TITRE : Etude pharmacogénétique du cancer du sein</b>																
<b>Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur en sciences en génétique des pathologies humaines</b>																
<p><b>Résumé :</b></p> <p>La médecine personnalisée est un concept visant à adapter le traitement d'une pathologie à chaque individu grâce à une meilleure connaissance des causes de variabilités interindividuelles.</p> <p>Dans le domaine de l'oncologie, le constat d'une très grande variabilité de la réponse à un médicament, en termes d'efficacité et de toxicité, est depuis longtemps un problème de santé publique. Cette variabilité interindividuelle peut provenir de polymorphismes génétiques impliqués dans la cinétique des médicaments. Certains SNP sont associés à une efficacité meilleure ou réduite du traitement. L'objectif de ce travail était la recherche de biomarqueurs moléculaires prédictifs de l'efficacité des chimiothérapies les plus administré dans le cancer du sein. Nous avons étudié la contribution des polymorphismes IVS14+1G&gt;A du gène de la DPYD, A313G du gène de la GSTP1, C677T et A1298C du gène de la MTHFR G2677T/A et C3435T du gène ABCB1 dans la réponse une chimiothérapie de type FAC ou FEC dans le cancer du sein.</p> <p>Notre échantillon comporte 117 patientes. Les réponses du traitement ont été évaluées et le génotypage des différents polymorphismes est réalisé par PCR RFLP et séquençage direct.</p> <p>Notre étude confirme qu'il y a une corrélation significative entre les polymorphismes IVS14+1G&gt;A du gène de la DPYD, C677T du gène de la MTHFR et la réponse au traitement (<math>p &lt; 0,05</math>). Ces résultats confirment la valeur de ces polymorphismes comme prédicteurs de l'efficacité des traitements chimiothérapeutique de type FAC ou FEC pour les patients atteints de cancer du sein et, par conséquent, nos résultats montrent l'intérêt d'une approche basée sur la pharmacogénétique pour identifier de nouveaux biomarqueurs pronostiques et prédictifs, dans la perspective d'un traitement personnalisé.</p>																
<p><b>Mots clés : cancer du sein, pharmacogénétique, polymorphisme, chimiothérapie, réponse, génotypage, phénotypage.</b></p>																
<b>Laboratoire de recherche : Laboratoire de biologie et de génétique moléculaire</b>																
<p><b>Membres du Jury :</b></p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 30%;"><b>Présidente :</b></td> <td style="width: 30%;">SATTA. D</td> <td style="width: 40%;">Prof. Université des Frères Mentouri, Constantine 1</td> </tr> <tr> <td><b>Directeur de thèse :</b></td> <td>ABADI. N</td> <td>Prof. Université Constantine 3</td> </tr> <tr> <td><b>Examineurs :</b></td> <td>AMEDAH. S</td> <td>Prof. Université des Frères Mentouri, Constantine 1</td> </tr> <tr> <td></td> <td>BOURAS. M</td> <td>Prof. Université de Batna 2</td> </tr> <tr> <td></td> <td>FILALI. T</td> <td>Prof. Université Constantine 3</td> </tr> </table>		<b>Présidente :</b>	SATTA. D	Prof. Université des Frères Mentouri, Constantine 1	<b>Directeur de thèse :</b>	ABADI. N	Prof. Université Constantine 3	<b>Examineurs :</b>	AMEDAH. S	Prof. Université des Frères Mentouri, Constantine 1		BOURAS. M	Prof. Université de Batna 2		FILALI. T	Prof. Université Constantine 3
<b>Présidente :</b>	SATTA. D	Prof. Université des Frères Mentouri, Constantine 1														
<b>Directeur de thèse :</b>	ABADI. N	Prof. Université Constantine 3														
<b>Examineurs :</b>	AMEDAH. S	Prof. Université des Frères Mentouri, Constantine 1														
	BOURAS. M	Prof. Université de Batna 2														
	FILALI. T	Prof. Université Constantine 3														