

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA

RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة محمد بوقرة بومرداس

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA DE BOUMERDES



Faculté des sciences

Département de Biologie

Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de MASTER II

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : Biotechnologies et Pathologies Moléculaires

THEME

Analyse du polymorphisme insertion/délétion du gène *ECA* au cours du cancer de la prostate dans une cohorte de la population Algérienne.

Présentée par :

M^{me} BOUTICHE Bouchera et M^{me} KENAOUI Hadjer

Soutenu publiquement le : **08/11/2020**

Devant le jury composé de :

Mr MESSAOUDENE. J	MCB (FS/UMBB)	Présidente
Mme ISSAAD.N	MAB (FS/UMBB)	Examinatrice
Mme BOUKERCHA.A	MCB (FS/UMBB)	Promotrice
Mme GHOZALI.N	Doctorante (FS/UMBB)	Invitée

Année universitaire :
2019/2020

Remerciements

D'abord je profite de cette occasion pour adresser mes sincères remerciements à Madame le Professeure **TOUIL-BOUKOFFA.C** Directrice du Laboratoire LBCM « Cytokines et NO Synthase » à l'université de HOUARI BOUMEDIENE (USTHB), de nous avoir chaleureusement ouvert les portes de son laboratoire pour la réalisation de ce mémoire de fin d'études.

Nous tenons à remercier chaleureusement **Mme le professeur MESBAH-AMROUN.H** membre de l'équipe Cytokines et NO Synthases de l'USTHB et sa doctorante **Madame AITABDESLAM.K**, pour leur disponibilité, et leur présence tout au long de ce travail.

Nous tenons également à remercier vivement **Mr MESSAOUDENE. J**, chef du département de biologie et chef de la spécialité Biotechnologie et Photologies Moléculaires ainsi qu'à l'ensemble du personnel pédagogique, technique et administratif du département de BIOLOGIE de l'Université M'HAMED BOUGARA de BOUMERDES.

Nos sincères remerciements vont aux membres de jury;

À **Mr MESSAOUDENE** chef du département de biologie et chef de la spécialité Biotechnologie et Photologies Moléculaires de BOUMERDES qui a eu la bonté d'être président de ce jury. Assurée de l'intérêt que vous portez à ce travail, nous restons convaincue que votre présence nous assurerons de la valorisation et de la teneur de notre travail. Éternels respects et nos sincères gratitude.

À **Mme ISSAAD**, enseignante à l'université de BOUMERDES d'avoir fait l'honneur de juger ce travail et pour le temps qu'elle a consacré pour l'examiner.

A **Mme GHOZALI**, Doctorante à l'université de BOUMERDES d'avoir accepté notre invitation et d'avoir fait l'honneur de juger ce travail et pour le temps qu'elle a consacré pour l'examiner.

Nous remercions notre promotrice : **Mme BOUKERCHA. A**; pour la confiance qu'elle nous avons accordé en acceptant d'encadrer ce travail. Nous lui sommes reconnaissantes pour sa patience, ses encouragements, sa sympathie et sa disponibilité à tout moment. Ses conseils, ses commentaires, ses corrections et ses qualités scientifiques ont été très précieux pour mener à bien ce travail, Enfin, nous avons été extrêmement sensibles à ses qualités humaines, à sa rigueur, à son professionnalisme. Nous sommes infiniment heureux et honorées d'avoir faisant notre mémoire sous sa direction. Aucune expression de gratitude ne sera suffisante pour vous exprimer nos respects et nos reconnaissances.

Mes sincères remerciements aux participants volontaires de l'étude : les témoins et plus particulièrement les patients, Avec des vœux pour un prompt rétablissement.

Nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour achever ce travail.

Dédicaces

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail

À ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais

Jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite

*Et tout mon respect : **mon cher père Ali.***

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit

Non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre

*Heureuse: **mon adorable mère Naima.***

*A ma **chère sœur Romy** et mes chères proches amies **Sarah, Chaima ,***

***Amira, youssra** qui n'ont pas*

Cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes

Études. Merci pour votre amitié et pour Les moments agréables que nous avons passés

Que Dieu les

protège et leurs offre la chance et le bonheur.

*A mes très chers frères **Anis et Wassim***

*A mon adorable petite frère **Iyad** qui sait toujours comment*

Procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

*A mon très cher fiancé **Sidali***

Tes sacrifices, ton soutien moral m'ont permis de

Réussir mes études. Puisse ce Travail être le

Témoignage de ma reconnaissance et de mon amour

Sincère et Fidèle.

A mes grands-mères, mes oncles et mes tantes. Que Dieu leur donne

Une longue et joyeuse vie.

A tous les cousins, les voisins et les amis que j'ai connu jusqu'à

Maintenant.

Merci pour leurs amours et leurs encouragements.

*Sans oublier mon binôme **Hadjer** pour son soutien moral, sa patience*

et sa compréhension tout au long de ce projet

Bouchra

Dédicaces

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A ma Mère Razika , Je te remercie pour ta tendresse, ton amour et ton affection. Je tiens particulièrement aujourd'hui à te dire combien ton rôle a été primordial tout au long de mes études et combien je suis fière d'être ta fille.

A Mon Cher papa Abd el kader Aucun témoignage ne saurait t'exprimer ma gratitude pour tous les sacrifices que tu as consentis pour faire de moi ce que je suis. Je te remercie pour ton soutien et tes précieux conseils. Ton amour m'est éternel.

A Mon prof de primaire Ismail Assia J'ai le plaisir de dédier ce travail merci chaleureusement Que Dieu le protège.

A Mes sœurs, Zineb, Warda, Keltoum, Lina et mes frères Amine et Mohamed Taki el din Tous les mots ne pourraient exprimer la gratitude, l'amour, la reconnaissance et le respect que j'ai pour vous. Merci pour tout pour votre amour, la confiance et l'énergie que vous m'avez donnée... merci d'être toujours à mes côtés, vous m'avez toujours encouragé et soutenu dans mes choix, grâce à vous j'ai pu tracer mon chemin et aboutir à mes objectifs. Je prie Dieu le tout puissant de vous accorder santé, et beaucoup de bonheur.

A Mes très chères amies Rym et salam , J'ai le plaisir de dédier à chacune de vous ce modeste travail Merci pour votre présence, votre amitié, votre compréhension, votre patience et vos encouragements. Puisse Dieu vous combler de bonheur, de santé et de réussite.

A Mes cousins, Malak, Wafa, Anfel, Imane, Nour el houda, Ihsane, Asma , Sabrina , Abla, Hanane, Ahlem, et à ma sœur de cœur Selma Lefki, merci chaleureusement à vous avec mes cordiales salutations.

A Tous mes amies Madina, Amel, Sarah, Sabrine, Meriem, Maya, Mouna, Salamou, Zineb, Riadh, qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes Études. Et sans oublier Madame Ghouzali Nour el Houda merci pour votre aide et ta présence à tout moment. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.

A Tous Mes chères élèves et A tous l'équipe de l'école Adjyel el Tawfik merci pour l'encouragement.

A ma copine ma sœur et ma belle Binôme, Bouchera Merci pour votre amitié, travail, patience, et ta présence à tous moment. Et ta compréhension tout au long de ce projet.

A tous La famille Kenaoui et La famille Rabrab Merci.

Hadjer

Sommaire

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
Chapitre I : Rappel bibliographique	
I. Le cancer de la prostate	2
I.1. Anatomie-physiologie de la prostate.....	2
I.2. Physiopathologie du cancer de la prostate.....	3
I.2.1. Carcinogénèse.....	3
I.2.2. Dépistage et Diagnostic.....	5
I.2.3. Classification.....	5
I.3. Epidémiologie du cancer de la prostate.....	8
I.4. Etiologie du cancer de la prostate.....	9
I.5. La génétique dans le cancer de la prostate.....	10
I.6. Angiogenèse et cancer de la prostate.....	11
II. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)	13
II.1 Le système rénine angiotensine (RAS).....	13
II.2. Structure de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)	14
II.3. Le gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)	15
II.4. Les polymorphismes génétiques du gène de conversion de l'angiotensine (ECA)	15
II.5. Angiotensine II et carcinogénèse.....	17
II.6. Angiotensine II dans les cancers urologiques	20
Chapitre II : Matériel et Méthodes	
I. Matériel	21
I.1. Matériel biologiques.....	21
I.1.1. Echantillonnage	21

I.1.2. Prélèvements sanguins	21
II. Méthodes.....	22
II.1Extraction de l'ADN génomique aux solvants organiques(phénol/chloroforme).....	22
II.2. Dosage et contrôle de qualité de l'ADN génomique.....	23
II.2.1 Dosage par spectrophotométrie	23
II.2.2. Contrôle de qualité par électrophorèse sur gel d'agarose	24
II.3. Amplification du gène d'intérêt par PCR (polymerase Chain Reaction).....	24
II.4. Analyse statistique.....	25
Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale.....	26
Chapitre III : Résultats	
III.1. Résultats de l'extraction des acides nucléiques	27
III.1.1. Contrôle de qualité par électrophorèse sur gel d'agarose.....	27
III.1.2. Détermination de la concentration et la pureté d'ADN par spectrophotométrie.....	28
III.2. Résultats de l'amplification des acides nucléiques par PCR.....	28
III.3. Analyse des fréquences génotypiques du polymorphisme I/D du gène ECA	29
III.4. Analyse des fréquences Alléliques du polymorphisme I/D du gène ECA.....	30
III.5. Association entre le polymorphisme I/D du gène ECA et les données cliniques	31
5.1 Corrélation entre le génotype et le score de Gleason	31
5.2 Corrélation entre les génotypes et le caractère métastatique.....	32
5.3. Corrélation entre les génotypes et les stades du cancer.....	33
Chapitre IV : Discussion	
Discussion.....	34
Chapitre V: Conclusion et perspective	
Conclusion	42
Références bibliographiques	43
Annexe	

Liste des figures

Figure.1: (a) Schéma de la localisation de la prostate et (b) de sa structure et (c) son organisation.....	2
Figure.2: Mécanisme moléculaire de l'interaction androgène-RA.....	3
Figure.3: Microenvironnement tumoral et mécanisme d'apparition de sites secondaire.....	4
Figure.4 : Schéma des différents grades histologique de Gleason.....	6
Figure.5 : Cancer de prostate en Algérie.....	8
Figure 6 : Localisations chromosomiques des gènes de prédisposition au cancer de la prostate.....	10
Figure 7: représentation de l'angiogenèse tumorale dans le cancer de la prostate.....	11
Figure 8: Le système Rénine Angiotensine.....	13
Figure 9 : structure de l'ECA	14
Figure 10: Locus du gène de l'ECA.....	15
Figure.11 : Les différents polymorphismes du gène ECA et leurs positions génétiques.....	16
Figure.12 : Rôle potentiel de l'Angiotensine II dans le cancer.....	18
Figure13 : Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale.....	26
Figure.14: Profil électrophorétique représentatif des ADNs génomiques extraits par « Phénol/Chloroforme » chez les témoins.....	27
Figure.15: Profil électrophorétique représentatif des ADNs génomiques extraits par « Phénol/Chloroforme » chez les patients.....	27
Figure.16: Profil électrophorétique représentatif des produits de PCR après amplification.....	28
Figure.17: Représentation graphique des fréquences génotypiques du Polymorphisme I/D du gène ECA dans les groupes témoins et patients CaP.....	29

Figure.18: Représentation graphique des fréquences alléliques du polymorphisme I/D du gène ECA dans les groupes témoins et patients CaP.....	30
Figure.19: Représentation graphique des fréquences du score de Gleason en fonction des génotypes du polymorphisme I/D du gène ECA.....	31
Figure.20: Représentation graphique de la distribution des fréquences génotypiques du polymorphisme I/D en fonction du caractère métastatique.....	32
Figure.21: Représentation graphique des fréquences des stades de cancer en fonction des génotypes du polymorphisme I/D du gène ECA.....	33

Liste des Tableaux

Tableau I: la classification des stades du cancer de prostate selon le score de Gleason.....	6
Tableau II : Classification TNM de la septième édition de l'UICC de 2009.....	7
Tableau III : les différents groupes de classification en fonction de taux de risque.....	7
Tableau. IV : Les caractéristiques démographiques des sujets intégrés à l'étude.....	21
Tableau V : Conditions d'amplification par PCR d'une partie de l'intron 16 du gène ECA.....	25
Tableau VI : Fréquences génotypiques du polymorphisme I/D du gène ECA.....	29
Tableau VII : Fréquences alléliques du polymorphisme I/D du gène ECA.....	30
Tableau. VIII: Distribution des génotypes en fonction du score de Gleason chez les patients.....	31
Tableau IX: Distribution des fréquences métastatiques en fonction des génotypes I/D.....	32
Tableau X : Distribution des génotypes en fonction des stades du cancer chez les patients CaP...	33
Tableau XI : Comparaison du protocole d'amplification utilisé par Rigat et celui de notre étude...	37

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribo-nucléique	NTE: NaCl-tris EDTA
Ang I : l'angiotensine I	PCR: polymérase Chain Reaction
AR : récepteur aux androgènes	PK:ProtéinaseK
Bcl2 : B-Cell Lymphoma-2	PSA: Prostatic specific antigen
bFGF : basic Fibroblast Growth Factor	SDS :Dodécylsulfate de sodium
CAF : les fibroblastes associés au cancer	SNP : Polymorphisme nucléotidique simple
CaP : cancer de prostate	SRA : Système Rénine Angiotensine
D : délétion	STAT: Stimulateur Transcription et Activateur Traduction
DHT : Dihydro-testostérone	TBE:Tris-Borate EDTA
DMSO : Diméthylsulfoxyde	TE: Tris-EDTA
dNTP : désoxy-adénine tri-phosphate	TGF: Transforming growth factor
ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine	TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha
EDTA : Ethylène Diamine Tétracétique Acid	TNM: Tumors, Nodes, Metastasis
EGF : Epidermal Growth Factor	VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
Erk1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinases	uPA : urokinase plasminogène activation
FGF: Fibroblast growth factor	
GWAS : genome-wide association study	
HGF : l'Hepatocyte Growth factor	
I : insertion	
IGF1: Insulin Growth Factor	
IL: Interleukine	
MAP: Mitogen-activated protein kinase	
MMPs : métalloprotéinases matricielles	
NaCl : Chlorure de sodium	
NCBI : Centre national d'information sur la biotechnologie	
NF- κ B : Nuclear Factor- κ B	

INTRODUCTION

Introduction

Le cancer de la prostate (CaP) est l'une des premières causes de décès chez les hommes. Le nombre de cas semble en augmentation à travers le monde et en Algérie, où il se place à la 3ème place des cas de cancers masculins (**GLOBOCAN, 2018**). Il constitue ainsi un réel problème de santé publique, notamment du fait de son évolution insidieuse et rapide dans certains cas, qui réduit les chances de thérapie et met en jeu le pronostic vital du patient.

Le CaP est un cancer très hétérogène avec une forte variabilité de la progression entre les patients. La progression tumorale est très fortement associée au processus de l'angiogenèse. Il est rapporté un déséquilibre en faveur des facteurs pro angiogéniques, corrélés dans le cancer de la prostate au stade tumoral, ainsi qu'à la progression métastatique, qui pourraient très probablement être le reflet de variations génétiques de certains composants clés du processus.

La génétique du patient semble être un facteur affectant le risque de développer ce cancer mais aussi sa progression. Les études d'association pangénomique (GWAS) ont identifié plus de 160 loci de prédisposition, et plusieurs polymorphismes génétiques répartis sur le génome.

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) est une metallopeptidase jouant un rôle dans le processus d'angiogenèse. Le gène de l'enzyme ECA présente de nombreuses variations génétiques. La principale variation décrite pour la première fois en 1990, est un polymorphisme de type insertion (I) / délétion (D) (**Rigat *et al.*, 1990**), qui influencerait son expression et pourrait par conséquent influencer sur le processus tumoral. Il est à noter que plusieurs études ont associé ce polymorphisme à des cancers humains (**Medeiros, 2004 ;Rocken, 2005**).

Partant de ces constatations, notre travail s'inscrit dans le cadre d'un projet sur la susceptibilité génétique au cours du CaP. Il est la continuité d'un travail entamé en 2018. Toutefois, nous avons observé une remise en question du protocole établi par l'équipe de Rigat (**Rigat *et al.*,1990**) et suivie au cours des analyses moléculaires précédemment réalisées.

Ainsi, nos objectifs ont été les suivants :

- Confirmer les résultats précédemment réalisés, par modification du protocole expérimental pour l'analyse moléculaire.
- Analyser la mutation I/D du gène *ECA* et la détermination de sa fréquence (génotypique et allélique), dans le cadre d'une étude Cas/Témoins, sur une cohorte de patients Algériens atteints du CaP.
- Rechercher des corrélations entre l'analyse génétique et les caractéristiques cliniques des patients CaP, pour mettre en évidence son éventuelle implication dans le caractère invasif de la tumeur et son agressivité.

RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES

I. Cancer de la prostate :

I.1. Anatomie-physiologie de la prostate : structure et fonction :

La prostate est une glande exocrine de l'appareil reproducteur mâle des mammifères, assurant la fabrication du liquide séminal (constituant du sperme). Très petite à la naissance, elle se développe lors de la puberté, puis augmente de volume avec l'âge, sous l'action de la testostérone. Elle se situe sous la vessie, en avant du rectum et en arrière du pubis, au carrefour des voies urinaires et génitales et séparées des structures adjacentes par une bande de collagène appelée capsule prostatique. (**Figure.1a**) (McNeal, 1988).

Bien que macroscopiquement homogène, la prostate comporte cinq zones anatomiques. Deux fibromusculaires et trois glandulaires : périphériques, centrales et de transition, représentant respectivement 70, 25 et 5% de la prostate (**Figure.1b**) (Abate.,2000 ; Wadhera *et al.*, 2013). La zone périphérique est constituée de glandes entourées par un stroma peu dense et de cellules musculaires espacées, et représente la zone la plus touchée par le cancer (70% des cas). La zone centrale comporte des glandes de grande taille et irrégulières, appelées glandes principales ou sub-mucosales, entourées par un stroma très dense. Elle est rarement à l'origine du développement de cancers (10% des cas), mais joue un rôle important dans l'hypertrophie bénigne de la prostate. Entre les deux se trouve la zone de transition qui contient les glandes dites mucosales. Elle est le siège de 20% des cancers prostatiques (McNeal, 1988).

L'ultra structure de la prostate montre un stroma fibromusculaire et un épithélium glandulaire composé de cellules basales riche en cellules souches, de cellules épithéliales sécrétrices où s'interfère des cellules neuroendocrines, sécrétrices d'hormones et de neuropeptides qui régulent la croissance, la différenciation et l'activité sécrétrice de l'épithélium prostatique cellules sécrétrices, de et de cellules neuroendocrines (**Figure.1c**) (Abrahamsson *et al.*, 1996).

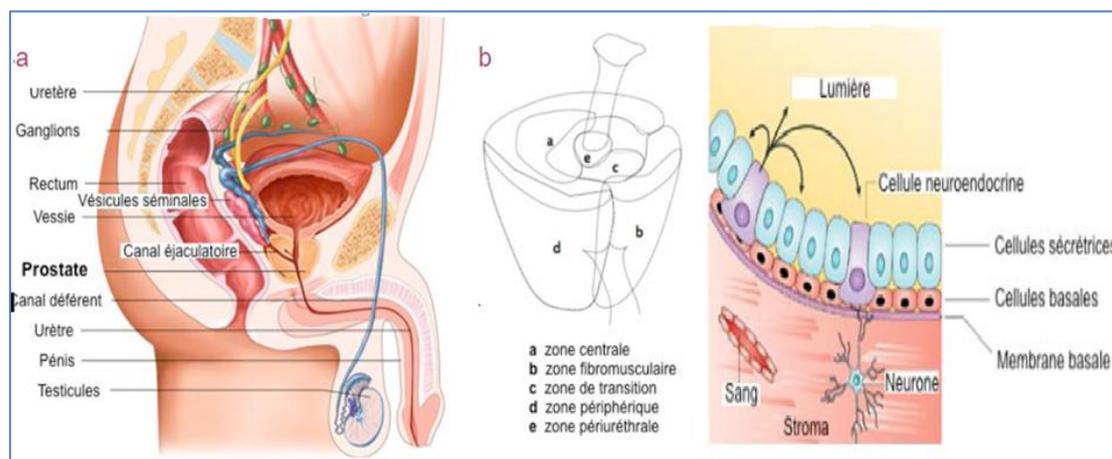


Figure.1 : (a) localisation de la prostate (b) sa structure et (c) son organisation. (Adapter de Abrahamsson *et al.*, 1996 ; Abate-Shen *et al.*,2000, Wadhera *et al.*, 2013).

I.2. physiopathologie du cancer de la prostate :

I.2.1. Carcinogénèse

Le plus fréquent des cancers prostatiques est l'adénocarcinome (~90%), avec une localisation multifocale (Debré, 2009), se développant à partir des cellules épithéliales. Un déséquilibre en faveur d'une prolifération excessive et un déficit d'apoptose est décrit. Les cellules souches prostatiques expriment de forts taux de la protéine anti-apoptotique Bcl₂ (Salm *et al.*, 2005).

La prolifération cellulaire dans la prostate est sous la dépendance des androgènes, notamment la testostérone. Le récepteur aux androgènes (AR) est essentiel dans la croissance et le développement normal de la glande, mais sa fonction initiale semble détournée au profit de la cancérisation. Les récepteurs aux androgènes ainsi que la testostérone, semblent hautement exprimés dans les tissus cancéreux. (D'Amico *et al.*, 2001 ; Lamont *et al.*, 2005)

L'activation du récepteur après liaison de son ligand (DHT : dihydro-testostérone obtenu après métabolisation de la testostérone par l'enzyme 5-alpha réductase), entraîne un changement conformationnel qui l'active et permet sa translocation nucléaire et sa liaison à des gènes qui augmentent la survie et la prolifération cellulaire (Simpson E.R *et al.*, 1997) (Figure.02).

Parmi les gènes cibles se trouve le gène d'une sérine protéase (l'Antigène Spécifique de la Prostate (PSA). Impliquée dans liquéfaction du sperme (Cleutjens *et al.*, 1996 ; Schuur *et al.*, 1996), elle favoriserait, cependant la carcinogénèse. En libérant le facteur de croissance IGF1 elle favorise la prolifération cellulaires et en clivant des composants de la membrane basale, faciliterait l'invasion tumorales et la formation de métastases (Loneran *et al.*, 2011).

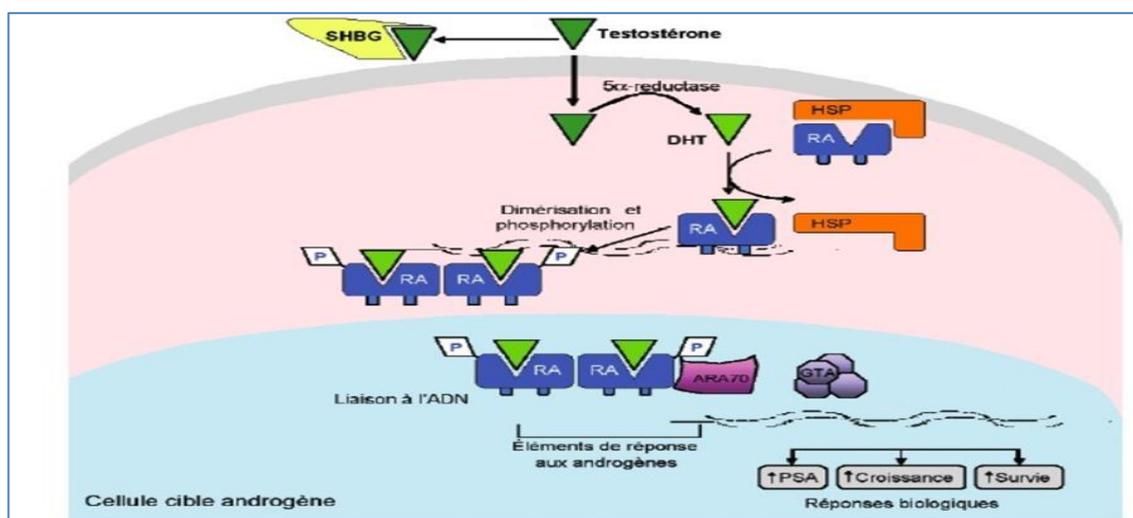


Figure. 2: Mécanisme moléculaire de l'interaction androgène-RA

(Feldman *et al.*, 2001).

En l'absence d'androgènes, une stimulation alternative existe. Des facteurs de croissance telle que l'EGF et l'IGF, stimulent le récepteur aux androgènes, via la voie des *MAP Kinase*. Aussi, les interleukines (IL-6 et IL-8 en particulier) sont capables de phosphoryler une *JanusKinase* qui stimule le récepteur aux androgènes via un activateur de la transcription (STAT-3) (Lonergan *et al.*, 2011).

Le microenvironnement tumoral joue un rôle clé dans le développement du cancer. De nombreuses cellules immunitaires sont acheminées au foyer tumoral. Par exemple, une forte infiltration par les macrophages protumorigènes TAM (Tumor associated macrophages) qui favorisent l'angiogénèse et l'invasion tissulaire, est rapportée (Maman et Witz, 2018).

Aussi, les fibroblastes associés au cancer (CAF) sécrètent des métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui favorisent le remodelage et la dégradation de la matrice extracellulaire. Les CAF sécrètent également le TGFβ, qui favorise la transition épithéliale à mésenchymateuse dans les cellules cancéreuses. Ce qui permet leur entrée dans la circulation sanguine et lymphatique, et deviennent alors des cellules tumorales circulantes. Les cellules du cancer de la prostate sont connues pour leur tropisme au poumon, au cerveau et plus particulièrement à l'os (Figure.2) (Maman et Witz, 2018).

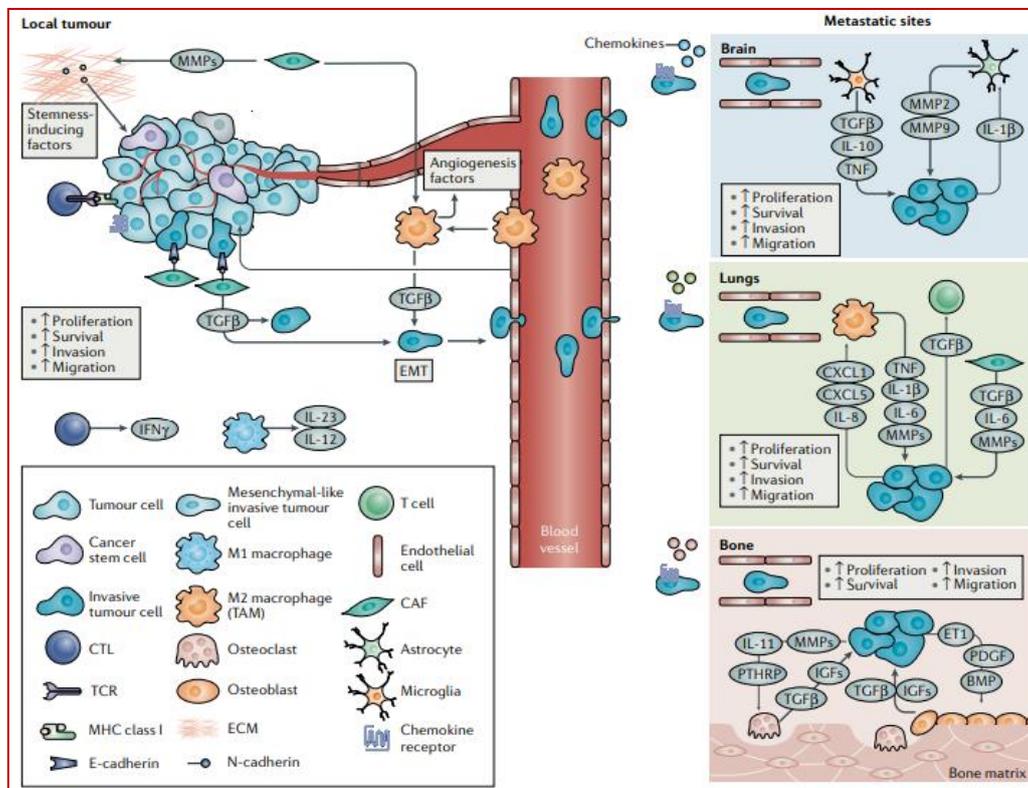


Figure.3: Microenvironnement tumoral et mécanisme d'apparition de sites secondaire (Maman et Witz, 2018).

I-2-2-Dépistage et Diagnostic du cancer de la prostate :

Le dépistage du cancer de la prostate implique la réalisation de tests médicaux en l'absence de symptômes ou de signes cliniques de la maladie (Arnauld Villers *et al.*, 2003). Ces tests incluent le toucher rectal, qui permet une palpation de la prostate pour détecter des modifications de volume, de la forme et/ou de la consistance. Ces modifications sont caractéristiques d'une anomalie de la prostate. Aussi, un dosage du PSA total sérique est couramment effectué (Un seuil de 4ng/ml a été retenu comme une indication). Dans ce cas, ils sont suivis par la réalisation de tests plus approfondies du tissu prostatique (biopsie et analyse anatomo-pathologique). Ce dépistage est conseillé dans le cas de patients à risques, ayant des antécédents familiaux de cancers. Le dépistage a pour objectif d'identifier des cancers à un stade précoce (localisé), de manière à augmenter les chances de réussite thérapeutique (traitement curatif) et améliorer la qualité de vie du patient (Arnauld *et al.*, 2003).

Toutefois, la mise en évidence du cancer peut se faire plus tardivement, lors de l'apparition de signes cliniques marquant l'extension de la maladie à d'autres organes. Les motifs de consultations sont souvent des douleurs osseuses, des problèmes urinaires, ou encore une insuffisance rénale. A ce moment-là, la recherche de preuves du cancer est essentielle. Elle se base sur un diagnostic biologique (dosage du PSA sérique, biopsie et analyse anatomo-pathologique du tissu prostatique), les tests d'imagerie médicale (échographie, scanner, IRM) et scintigraphie osseuse. L'analyse de ces données permet de diagnostiquer avec certitude le cancer et de faire une classification pour déterminer l'étendue des lésions, l'évolution de la maladie et la prise en charge thérapeutique (Arnauld Villers *et al.*, 2003).

I.2.3. Classification :

La classification du cancer de la prostate se base sur l'extension tumorale en utilisant le score de Gleason, et la classification TNM.

✓ Le score de Gleason :

Est un score histo-pronostic basé sur l'observation microscopique du tissu prostatique après biopsie. Une échelle de grade allant de 1 à 5 est utilisée, pour refléter le degré d'anomalie des tissus. 1 représente un tissu proche de la normale et 5 un tissu irrégulier synonyme d'agressivité du cancer (Gleason *et al.*, 1974) (Figure.3). Différents grades peuvent coexister dans un même tissu, le score est alors calculé en additionnant les deux grades plus fréquents (le premier chiffre représente le grade le plus abondant). Dans les cas où un seul grade dominant existe, le score est calculé en prenant le grade observé X2.

En théorie, le score de Gleason s'exprime sur une échelle de 2 à 10, mais en pratique, comme les grades 1 et 2 sont considérés comme du tissu sain, on ne rencontre que des scores allant de 6 à 10. De façon générale, plus les scores sont élevés, plus la tumeur est agressive et croît rapidement (signe de mauvais pronostic) (Salomon *et al.*, 2010).

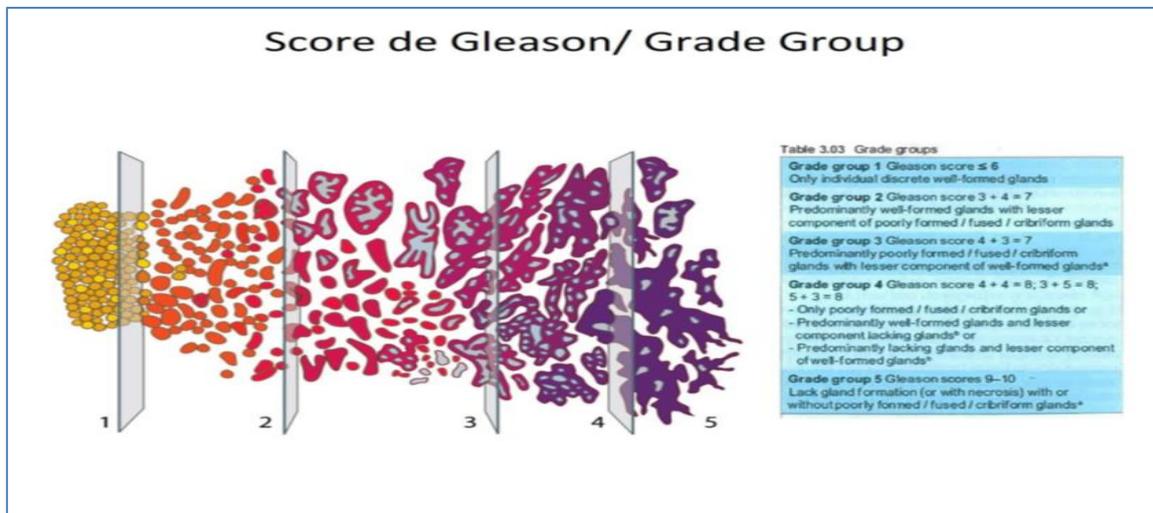


Figure.4 : Schéma des différents grades histologique de Gleason.

(Annales de Pathologie, octobre 2008).

Depuis quelques années, une nouvelle classification est utilisée pour grader l'agressivité du cancer de la prostate: Groupe de grades. Elle permet de simplifier le classement en 5 groupes (Tableau. I) (Salomon *et al.*, 2010).

Tableau. I : Dernière évolution du score de Gleason (les groupes de grades)

	Groupe de grade 1	Groupe de grade 2	Groupe de grade 3	Groupe de grade 4	Groupe de grade 5
Les scores de Gleason	Score de Gleason ≤ 6	Score de Gleason $3+4 = 7$	Score de Gleason $4+3 = 7$	Score de Gleason $4+4 = 8$ $3+5 = 8$ $5+3 = 8$	Score de Gleason de 9 à 10

✓ La classification TNM

Elle permet l'évaluation du stade tumoral, en considérant la taille de la tumeur (T: Tumor), la présence de cellules cancéreuses ganglionnaires (N: pour Nodes) et la présence de métastases (M: pour Metastasis). Les examens d'imagerie évaluent l'extension locale et régionale et la scintigraphie osseuse pour les métastases à distance (Salomon *et al.*, 2010).

Tableau. II : Classification TNM de la septième édition de l’UICC de 2009

Tumor

T₀ : absence de tumeur	T1 : tumeur non palpable et non visible à l'imagerie	T2 : tumeur limitée à la prostate	T3 : Extension extra capsulaire	T4 : Extension à d'autres organes adjacents
	T1a : Tumeur occupant moins de 5% du tissu prélevé	T2a : Tumeur de taille inférieure à la moitié d'un lobe	T3a : Extension tumorale extra capsulaire	
	T1b : Tumeur occupant plus de 5 % du tissu prélevé	T2b : Tumeur occupant plus de la moitié d'un lobe	T3b : extension tumorale au niveau des vésicules séminales.	
	T1c : Tumeur découverte en raison d'une élévation du taux de PSA	T2c : Tumeur atteignant les deux lobes		

Les cancers de la prostate sont classés en 4 stades:

- Cancer localisé : stade T1 /T2
- cancer localement avancé : T3 /T4 N0, M0
- cancer avec atteinte ganglionnaire pelvienne : stade N1, M0
- cancer métastatique : stade M1.

Nodes

N0 : Absence de ganglions	N1 : Atteinte ganglionnaire(s) régionale(s)
----------------------------------	--

Metastasis

M0 : absence de métastases	M1 : métastases à distance
	M1a : ganglions non régionaux
	M1b : ganglions osseux
	M1c : autres sites

✓ Une troisième classification existe il s'agit de la classification d'AMICO :

Elle associe la classification TNM, le score de Gleason et la valeur du PSA (Prostate Specific Antigen) pour évaluer le risque évolutif des formes localisées mises en évidence par la classification TNM. Afin de mieux guider la prise en charge. D'Amico a proposé de classer les cancers en trois groupes en fonction de leur risque de progression (**Salomon *et al.*, 2010**).

Tableau. III : Classification en fonction de taux de risque (**D'Amico *et al.*, 2003**)

Le Taux du Risque	Risque faible	Risque intermédiaire	Risque élevé
La valeur du PSA	PSA ≤ 10ng/ml et score de Gleason ≤ 6 et stade clinique ≤ T2a.	PSA compris entre 10 et 20ng/ml ou score de Gleason de 7 (3 + 4 ou 4 + 3) ou stade T2b.	PSA > 20 ng/ml ou score de Gleason ≥ 8 ou stade clinique ≥ T2c.

I.3. Epidémiologie du cancer de la prostate :

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le cancer de la prostate, est le 3ème cancer le plus fréquent chez les hommes de plus de 50 ans à l'échelle mondiale après le cancer du poumon et le cancer colorectal. Il a été enregistré 1 276 106 nouveaux cas en 2018, soit 7,1% des cas de cancers comptabilisés (**Globocan, 2018**).

Selon des résultats présentés lors de la réunion annuelle de (l'American Association for cancer research, en 2019), les taux d'incidence et de mortalité par cancer de la prostate diminuent ou se stabilisent dans la plupart des régions du monde. C'est aux Etats-Unis que le recul du taux de cancers de la prostate a été le plus notable, les taux d'incidence du cancer de la prostate ont augmenté entre les années 1980 et le début des années 1990, puis ont diminué entre le milieu des années 2000 et 2015, principalement en raison de l'utilisation accrue du dépistage. Le dépistage étant moins disponible dans les pays à faible revenu contribue au diagnostic à un stade avancé et à des taux de mortalité plus élevés (**Congrès de l'American association for cancer research (AACR, Atlanta 29 mars au 3 avril 2019)**).

En Algérie, le cancer de la prostate se palace au 3ème rang des cancers en terme de prévalence sur les 5 dernières années, avec une prévalence de 5 788 cas. Il vient après le cancer du poumon et le cancer colorectal(**Figure.6**)(**Globocan, 2018**). Toutefois, il tend à être surclassé. Il a été enregistré 2 578 nouveaux cas de cancer de la prostate, en 2018, soit près de 11% de tous les nouveaux cas de cancer chez les hommes en Algérie (**Globocan, 2018**). De plus, ces chiffres pourraient être bien en dessous de la réalité, du fait de l'absence d'un enregistrement exhaustif des cas pris en charge en milieu libéral.

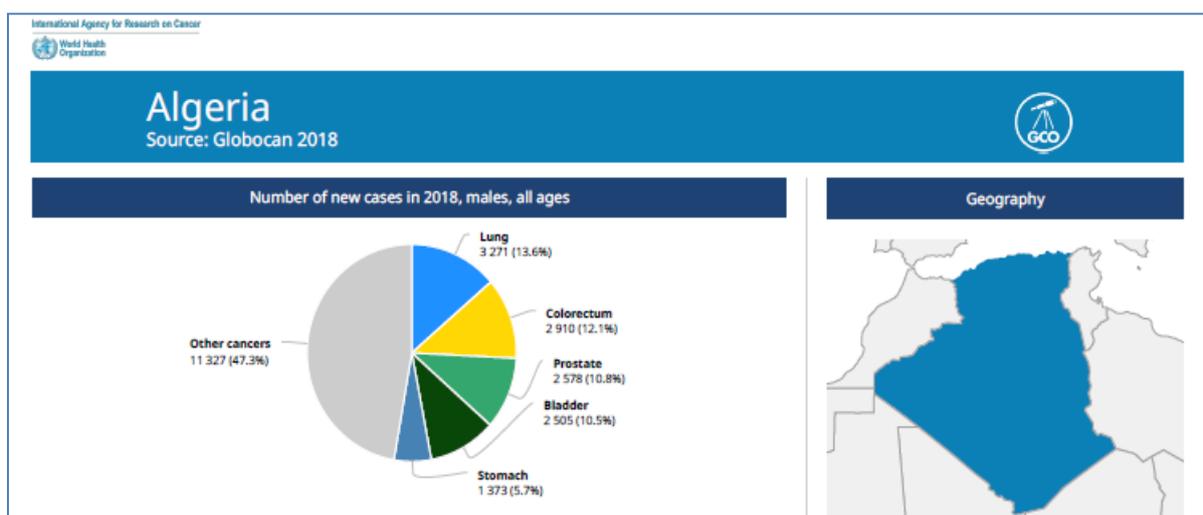


Figure. 5 : Cancer de prostate en Algérie (**Globocan 2018**)

I.4. Etiologie du cancer de la prostate :

Les causes précises du cancer de la prostate restent actuellement peu connues. Cependant, elles semblent être en lien avec l'âge avancé, l'ethnie, l'alimentation (consommation de graisses et viande animales), ou encore les antécédents familiaux (**Grönberg, 2003 ; Ravery *et al.*, 2008; Song-Yi *et al.*, 2015**). Le lien avec des facteurs infectieux (notamment le HPV : *Human Papilloma Virus*) a été apporté (**Vergne *et al.*, 2008**).

L'implication de certains facteurs environnementaux semble très probable, comme l'exposition à certaines substances chimiques tel que : le cadmium, l'arsenic, les fumées de diesel, certains pesticides et insecticides, ou encore les différents produits chimiques présents dans l'environnement des travailleurs du nucléaire et de l'aérospatiale (**Barry *et al.*, 2011**).

Aussi, il est décrit l'implication de facteurs de risques communément identifiés dans divers cancers comme le manque d'activité physique, l'obésité, le tabagisme et l'alcool (**Pernar *et al.*, 2019**). Aussi, des taux bas de vitamine D, et des taux élevés d'androgène circulant sont corrélés à une augmentation du risque de CaP (**Cussenot *et al.*, 2004**).

Toutefois, les études réalisées concernant les facteurs de risques au cours du cancer de la prostate restent peu concordants et ne permettent pas de conclure à un risque avéré. Elle plaide en faveur d'une forme multifactorielle du cancer prostatique, où les facteurs génétiques semblent jouer un grand rôle, sous l'influence de facteurs environnementaux (épigénétique). Cela peut expliquer les fréquences plus élevées dans certaines populations ou régions du monde ou encore l'existence de différences inter-individu (cancer agressif avec évolution rapide et une mauvaise réponse aux traitements, chez certains patients)

I.5. La génétique dans le cancer de la prostate :

De multiples études, en particulier des études épidémiologiques, des études sur les jumeaux et des études d'association à grande échelle du génome (GWAS), ont démontré une composante génétique de l'étiologie du cancer prostatique. Les études épidémiologiques ont établi que des antécédents familiaux de CaP augmentent considérablement le risque (**Wang *et al.*, 2018**).

Les formes familiales de cancers de la prostate sont observées dans près de 20% des cas. Le risque relatif pour un parent du premier degré (père, fils, frère) varie de 1,6 à 11 selon le nombre d'apparentés atteints, les liens familiaux, et l'âge au diagnostic du porteur (**Cussenot et Cancel-Tassin, 2004 ; Jain *et al.*, 2009**).

Un autre argument en faveur d'une composante génétique est l'agrégation conjointe du cancer de la prostate avec d'autres types de cancers (exemple cancer du sein) dans certaines familles. Différentes études épidémiologiques ont observé un risque d'environ 1,5 fois plus élevé dans des familles où deux cancers coexistent (**Valeri , et al., 2000**).

Constatant que le risque de CaP était plus élevé chez des individus ayant un frère atteint que chez ceux ayant leur père atteint, il a été évoqué un modèle autosomique récessif, ne résultant pas de l'action d'un gène à forte pénétrance mais plutôt de l'association de plusieurs gènes ayant un effet cumulatif (**Gudmundsson et al.,2007 ; Gudmundsson et al.,2008**).

Les GWAS ont identifié plus de 160 locus de susceptibilité au cancer de la prostate repartit sur les différents chromosomes (**Figure.5**). Les premiers locus à avoir été identifiés sont les locus HPC1 (Hereditary Prostate Cancer 1) (**Xu J. 2000**) et PcaP (Predisposing for Prostate cancer) (**Cancel-Tassin et al., 2001**) sur le chromosome 1.

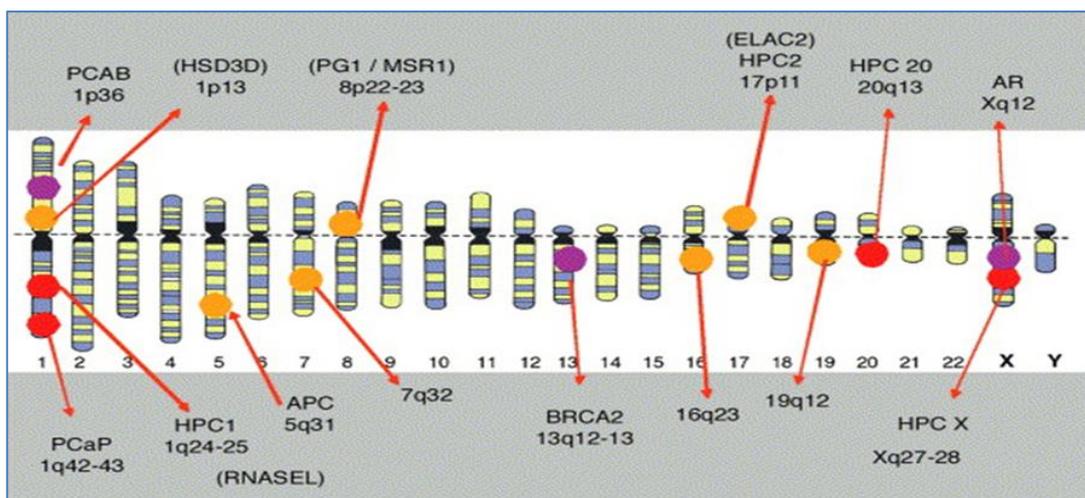


Figure.6 : Localisations chromosomiques des gènes de prédisposition au CaP (**Fournier et al., 2004**).

L'analyse de ces locus a permis d'identifier plusieurs gènes de prédisposition, faisant ressortir une prédisposition polygénique. Il a été identifié des changements récurrents du nombre de copies d'ADN, des réarrangements, des fusions génétiques mais le plus souvent des mutations comme les polymorphismes mono-nucléotidique (SNP) (**Wang et al., 2018**).

Les gènes les plus touchés par ces mutations sont des gènes de régulation hormonale, de réparation d'ADN, ou impliqués dans les processus d'angiogenèse et de néo vascularisation (**Cussenot et al., 2004**). Ce dernier est un mécanisme clé permettant à la tumeur de survivre et se développer, mais aussi de métastaser à d'autres organes.

I.6. Angiogenèse et cancer de la prostate :

L'angiogenèse est un processus, physiologique multifactoriel, finement régulé entre facteurs pro et anti angiogéniques. Elle permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, depuis un réseau préexistant. Il est rapporté un déséquilibre en faveur des facteurs pro-angiogéniques au cours du cancer, afin de répondre aux besoins métaboliques des cellules cancéreuses. Ce déséquilibre est corrélé, dans le CaP au : stade clinique, score de Gleason, stade tumoral, ainsi qu'à la progression métastatique (Murphy *et al.*, 2005 ; Tomic *et al.*, 2011).

Les cellules tumorales proches des vaisseaux sanguins vont sécréter divers facteurs tel que : le Vascular Epidermal Growth Factor (VEGF), le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), des cytokines (TNF α , TGF β), l'Hepatocyte Growth factor (HGF) et de l'urokinase plasminogène activator (uPA), ainsi que des metaloprotéinases (MMPs) et beaucoup d'autres facteurs (A). Ces molécules stimulent les cellules endothéliales quiescentes à acquérir des propriétés migratoires et prolifératives : *i*) cellules de front qui bourgeonnent à partir du vaisseau existant et se dirigent vers la source du signal angiogénique (site de la tumeur) et *ii*) cellules de soutien qui prolifèrent en arrière, permettant l'allongement du vaisseau (B). Les vaisseaux néoformés vont infiltrer la tumeur (C) et permettre la migration de cellules tumorales (métastases) et leur extravasation vers d'autres tissus comme l'os donnant lieu à la création de sites secondaires du cancer (D) (Figure.7) (Li *et al.*, 2010).

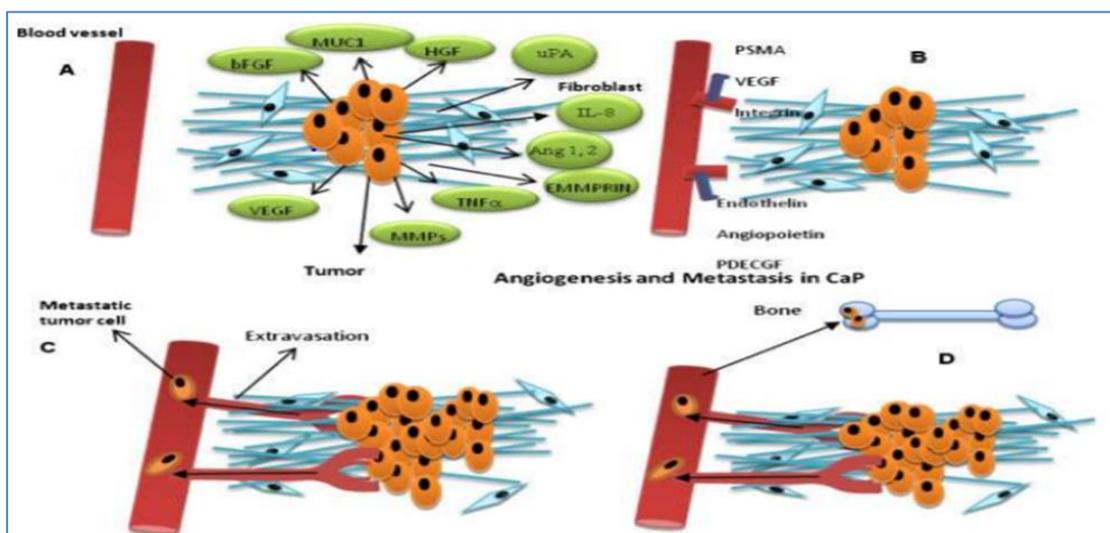


Figure.7: Représentation de l'angiogenèse tumorale dans le cancer de la prostate (Li *et al.*, 2010).

L'expression de ces facteurs pro-angiogéniques est souvent dérégulée dans le cancer. La présence de mutations pourrait influencer leur expression et conduire à une variation interindividuelle du risque et de la progression de la maladie.

- Le VEGF (Vascular endothelial growth factor) est le régulateur le plus important de l'angiogenèse. Ses concentrations sont élevées dans les cas de métastases. Des études ont recherchées des mutations dans la région promotrice du gène, et les ont corrélées au risque et/ou à la progression tumorale (**Langsenlehner et al., 2008, VanCleave et al., 2010**).

- Les cytokines sont des éléments clés de l'angiogenèse (notamment le TGF β et le TNF α). L'altération de l'expression du TGF β favorise le développement tumoral par stimulation de l'angiogenèse et suppression du système immunitaire (**Zhu, B et al., 2005**). Le TGF β est fortement exprimé dans le CaP et conduit à la promotion de la tumeur et aux métastases (**Kambhampati et al., 2005**). Deux polymorphismes ont été identifiés (C-509T et T+29C) et associés à une surexpression sériques (**Grainger et al., 1999 ; Yokota et al., 2000**).

Le TNF α facilite l'angiogenèse en stimulant la prolifération des cellules endothéliales et en régulant l'expression des facteurs pro-angiogéniques (**Wu et al., 2010**). Des polymorphismes au niveau du promoteur du gène sont associés à un grade tumoral plus élevé et à un risque accru de progression tumorale et de métastase (**Kesarwani et al., 2009**).

- L'interleukine 8 est corrélée avec le score de Gleason, le stade tumoral et la densité des micro-vaisseaux. Il est rapporté une élévation d'IL8 chez les patients atteints CaP avec métastases osseuses. Une étude rapporte un plus faible risque de sévérité au CaP en présence d'une mutation au niveau du promoteur du gène (+251) (**Lehrer et al., 2004**).

- Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) joueraient un rôle important dans le cancer en facilitant le remodelage vasculaire, la néovascularisation et la désamination métastatique (**Belotti et al., 2003**). Une récente méta analyse associe des polymorphismes de MMP3 et MMP9 au CaP (**Zhou et al., 2018**).

- Urokinase plasminogène activation (uPA) est un système sérine protéinase impliqué dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Il joue un rôle dans la néovascularisation et l'invasion tumorale. Des mutations de ce gène, ont été associées aux cancers (**Xu et al., 2015**). Un polymorphisme nucléotidique de la région 3'UTR du gène a été associé au risque de CaP et à un score de Gleason élevé (**Mittal et al., 2005**).

- L'angiotensine II, générée à partir d'un précurseur après action de l'ECA (Enzyme de conversion de l'angiotensine), est impliquée dans la prolifération cellulaire et l'angiogenèse (**Willis et al., 2011**). Des polymorphismes au niveau du gène de l'enzyme ont été rapportés, donnant lieu à des niveaux d'activité d'ECA plus importants (**Ruiter et al., 2011**), et qui pourraient influencer l'évolution du CaP.

II. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) :

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) ou dipeptide carboxy-peptidase est un membre du système rénine-angiotensine (RAS), exprimé de manière ubiquitaire dans de nombreux tissus. Elle possède plusieurs substrats dont l'angiotensine I, tétradécapeptide et bradykinine, mais son action principale est de convertir l'angiotensine I (Ang I) en un peptide actif angiotensine II (Ang II), dans le système RAS (**Lafolie *et al.*, 2004**).

II.1. Le système rénine angiotensine (RAS) :

Le système rénine-angiotensine (RSA) est une cascade hormonale coordonnée dans le contrôle des fonctions cardiovasculaire, rénale et surrénale qui régit l'équilibre hydrique et électrolytique du corps, ainsi que la pression artérielle. La rénine circulante (enzyme protéolytique) provenant des cellules juxta-glomérulaires rénales agit sur l'angiotensinogène produit par le foie pour produire de l'Ang I. Cette Ang I est convertie à son tour en Ang II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) généralement présente sur le lit vasculaire endothélial des vaisseaux sanguins (**Carey *et al.*, 2003**).

L'angiotensine II libérée agit sur des récepteurs spécifiques (AT1 et AT2) transmembranaires couplés à des protéines G. Ils régulent la pression artérielle en induisant une vasoconstriction, la réabsorption NaCl/H₂O et en augmentant la volémie par l'intermédiaire de l'aldostérone (**Abdull *et al.*, 2010**).

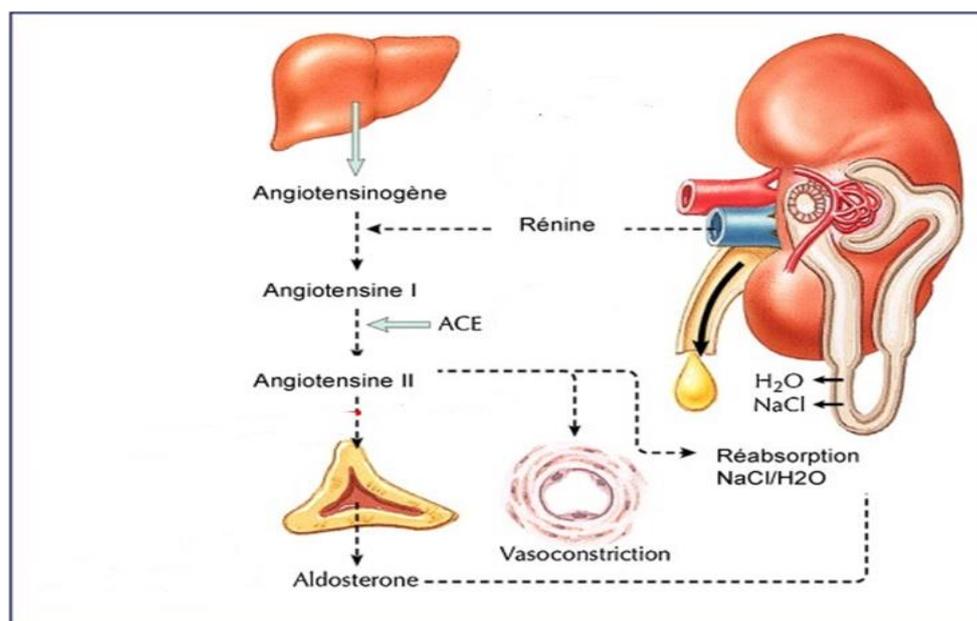


Figure.8: Le système Rénine Angiotensine (**Verhoest *et al.*, 2014**).

II.2. Structure de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA):

L'ECA est une métallo-enzyme appartenant à la famille des carboxypeptidases à zinc, dont l'activité enzymatique est dépendante de la présence d'anion et en particulier de chlore. Il modifie la conformation allostérique du site actif et lui donne sa spécificité pour les substrats dipeptidiques. L' ECA est de distribution ubiquitaire, exprimée par les cellules endothéliales, épithéliales, et neuronale. Elle est initialement synthétisée sous forme d'un précurseur avec un peptide signal qui est clivé pour donner la molécule mature (**Hittinger et al., 1997**).

L'enzyme est une protéine hautement glycosylée, qui existe essentiellement sous une forme membranaire, pourvue de peptide d'ancrage, avec un poids moléculaire de 160 kDa. Elle peut également apparaître sous une forme soluble dans la circulation suite au clivage de l'ECA membranaire par l'enzyme ECA-sécrétase, une forme circulante soluble légèrement plus petite avec un PM de 140 kDa, et une forme testiculaire de PM 90 kDa sont décrites (**Laraqui, 2006 ; Dially, 2011**)

L'étude de la séquence de l'ECA membranaire met en évidence une structure protéique (**Figure.9**) comportant 3 domaines distincts. Un court domaine intracellulaire carboxy-terminal (24aa), un domaine transmembranaire hydrophobe (20aa) servant d'ancrage de la protéine dans la membrane cellulaire et un domaine extracellulaire composé de deux sites homologues (60% d'homologie). Ils constituent les sites catalytiques de l'enzyme, qui possèdent des activités dipetidyl carboxypeptidase et endoprotéolytique, ce qui expliquerait la multitude de substrats potentiels de l'ECA (**Dially, 2011**).

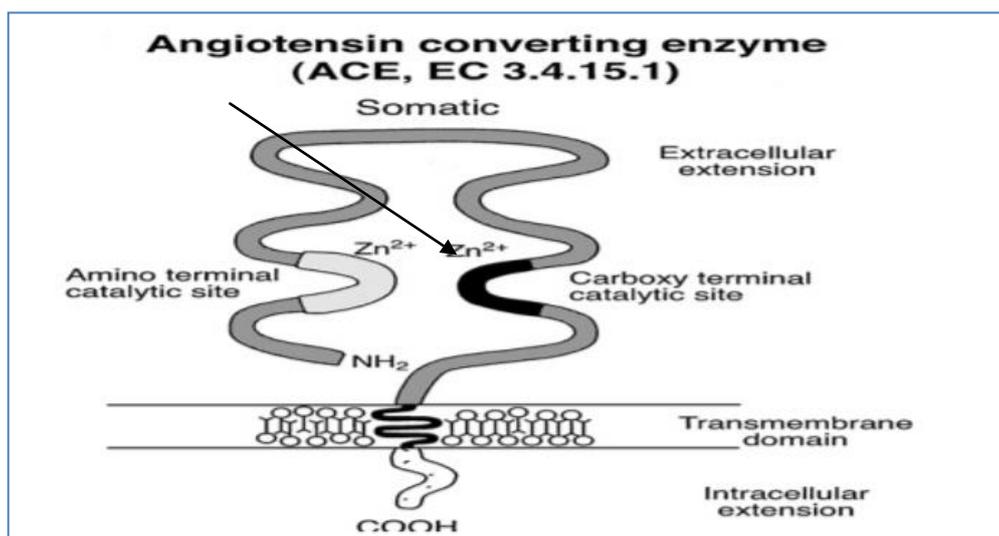


Figure.9 : Structure de l'Enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) (**Dzau et al., 2001**)

II.3. Le gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) :

Le gène de l'ECA est situé sur le bras long du chromosome 17 (**17q23.3**) et mesure environ **21kb**. Il est composé de 26 exons et 25 introns (**Figure.10**). La longueur des exons varie de 88 Pb (exon 16) à 481 Pb (exon 26). La taille des introns varie de 150pb (introns 17 et 25) à 2000pb (intron 20). L'épissage alternatif donne lieu à deux isoforme : i) une ECA somatique largement distribuée dans l'organisme, en utilisant les exons de 1 à 26 à l'exception de l'exon 13, ii) une ECA testiculaire, utilisant les exons 13 à 26, qui est requise pour la fertilité masculine (**Sayed-Tabatabaei et al., 2006**). Le transcrit mature de la forme la plus répandue, ayant une taille de 4.3Kb, est traduit en un peptide de 1340 aa (**Laraqui et al ; 2006**).

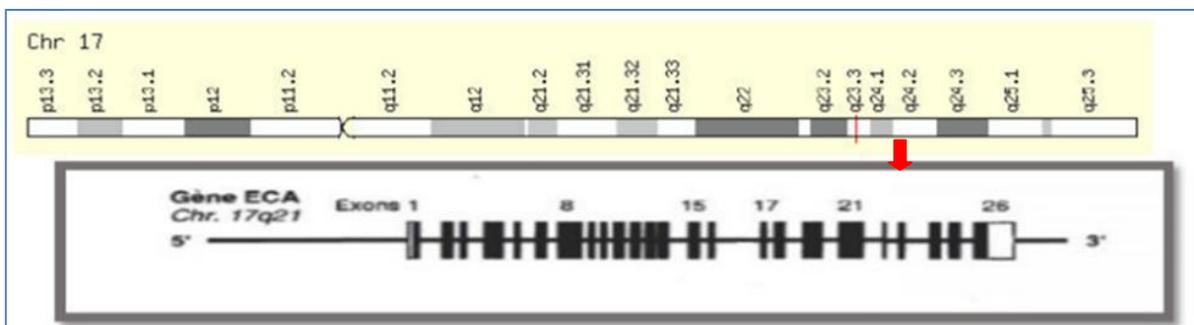


Figure.10: Localisation chromosomique et structure du gène ECA
(Lefebvre, 2008).

II.4. Polymorphismes génétiques du gène ECA :

De nombreux polymorphismes existent dans le gène ECA (**Figure.11**), actuellement il est répertorié plus de 160 polymorphismes génétiques, dont la plupart sont de type SNPs. Seulement 34 de ces polymorphismes sont situés dans les régions codantes; dont 18 sont des mutations faux-sens (**Sayed-Tabatabaei et al. 2006**).

En 1990, Rigat et ses collaborateurs ont observé l'insertion d'une séquence Alu de 287 pb, au sein de l'intron 16 (**NCBI réf. SNP ID: rs1799752**). La séquence Alu appartient à une famille d'ADN modérément répétitive possédant en général un site de restriction pour l'enzyme AluI. La fonction réelles de ces séquences Alu est actuellement peu connue (**Laraqui et al ., 2006**).

Le premier polymorphisme à avoir été décrit dans ce gène est un polymorphisme d'Insertion / Délétion (I/D) en fonction de cette séquence Alu de 287pb. Ce polymorphisme semble influencer le niveau d'activité de l'ACE, qui augmente de 2 fois chez les porteurs homozygotes de l'allèle de délétion (DD), par rapport aux porteurs de l'allèle homozygote d'insertion (II). Les porteurs ID présentent quant à eux une activité ACE intermédiaire (**Rigat *et al.*, 1990**).

L'impact mécanistique de cette mutation a initialement été attribué à un déséquilibre de liaison avec un autre polymorphisme plutôt qu'à un effet direct, au vu de sa localisation intronique (**Rigat *et al.*, 1990**). Plus récemment, il a été décrit que l'insertion va aboutir à l'exonisation de l'intron, et provoquer une transcription d'un ARNm plus long, mais induire un codon de terminaison prématuré et entraîner une protéine tronquée, affectant par conséquent l'activité de l'enzyme (**Purwaningroom *et al.*, 2015**).

Le polymorphisme I/D a été associé à diverses maladies (cardiaques et neuro-dégénératives) ainsi qu'aux cancers tels que les cancers du poumon, du sein, du larynx, ainsi que celui de la prostate (**Ruiter *et al.*, 2011**).

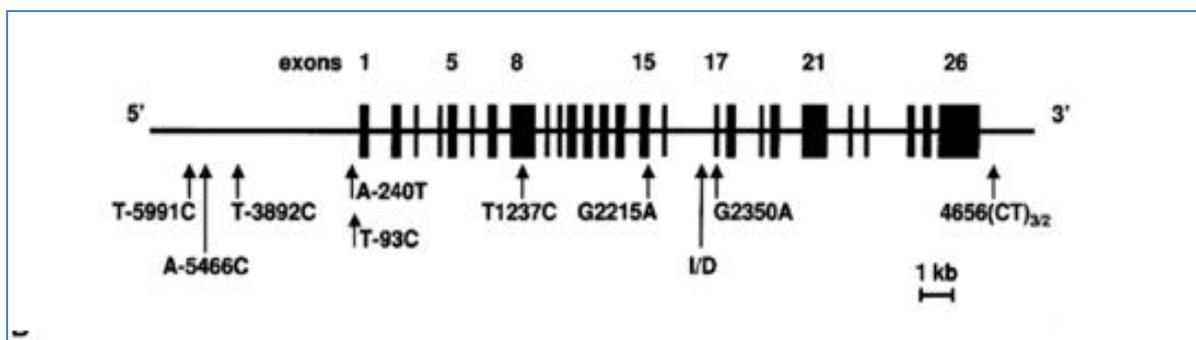


Figure.11 : Les différents polymorphismes du gène ECA et leurs positions génétiques (**Sayed-Tabatabaei *et al.* 2006**).

II.5. Angiotensine II et carcinogénèse :

De nombreux cancers présentent une forte concentration du récepteur de l'angiotensine II (AT1R) au niveau des tissus tumoraux et ce dans divers cancers (sein, estomac, vessie, astrocytome, glioblastome, ovaire, utérus, spino-cellulaire, pancréas, rein, prostate, surrénale), démontrant ainsi un lien entre carcinogénèse, agressivité tumorale (tumeurs de stade et de grade élevés) et action de l'angiotensine II (**Dolley-Hitze et al., 2013**).

Essentiel à la néo-vascularisation au sein de la tumeur et à la croissance tumorale, l'Ang-II est capable d'induire l'expression du VEGF-A et ainsi favoriser la néo-angiogénèse au sein de nombreuses tumeurs (**Kosugi et al., 2007**) (**Anandanadesan et al., 2008**). L'Ang-II est également impliquée dans la prolifération cellulaire via l'activation de plusieurs cascades moléculaires : la voie PI3-kinase/Akt (**Zhao et al., 2010**), NF- κ B (Nuclear Factor- κ B)(**Kinoshita et al., 2009**), PAX2 (PairedHomeobox 2), STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) et JAK (Jun Activating Kinase) (**Bose et al., 2009**). Il a également été démontré une implication de la voie de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) dans différents modèles cellulaires endothéliaux, après transactivation du récepteur par AT1-R et Erk1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases) (**Fujiyama et al., 2001 ; Uemura et al., 2003**). Enfin, l'Ang-II est capable d'inhiber certaines voies de l'apoptose via AT1-R(**Zhao et al., 2010**) , notamment en augmentant la survivine et en supprimant l'activité de la caspase-3 via l'activation de la voie PI3-kinase/Akt (**Ohashi et al., 2004**) (**Figure.12**).

Le rôle d'AT2-R dans les mécanismes de tumorigénèse reste actuellement incertain. Il semblerait en effet qu'une spécificité d'action soit dépendante du type de cancer, avec un effet soit pro soit anti-oncogène. (**Dolley-Hitze et al., 2013**).

A la différence d'AT1-R, seules quelques tumeurs agressives semblent exprimer AT2-R telles que le glioblastome (**Arrieta et al., 2008**), le carcinome rénal (**Dolley-Hitze et al., 2010**) ou les cancers gastriques (**Rocken et al., 2007**). Toutefois, il est décrit la capacité de AT2-R à induire la production de l'oxyde nitrique (NO) pour diminuer la pression artérielle, et les quantités de NO produite par la NOS inductible pourraient mettre en avant un mécanisme pro-inflammatoire probable pour le développement de cancer par le biais de l'Ang II.

Aussi, l'utilisation d'inhibiteurs de l'ECA ou d'antagonistes des récepteurs de type 1 à l'Ang-II (ARA-2) dans des modèles expérimentaux de cancers ont démontré des effets anti -tumoraux, appuyant de ce fait les effets de l'Ang II et de son rôle clé au cours de la carcinogénèse.

Dans des modèles tumoraux chez la souris, l'utilisation des ARA-2 montre un net ralentissement de la croissance tumorale (Huang *et al.*, 2008), ainsi que de la progression métastatique dans les cancers digestifs (Neo *et al.*, 2010). La prolifération cellulaire au sein de nombreuses tumeurs est également inhibée (mélanome, ostéosarcome, sein), via l'activation de la voie Erk1/2 associée à la transactivation de l'EGFR (Wasa *et al.*, 2011 ; Du Net *et al.*, 2012). Parmi les autres mécanismes anti-tumoraux incriminés, il est décrit une diminution de la lymphoangiogénèse par les ARA-2 (Wang *et al.*, 2008), une induction de l'apoptose (Wang *et al.*, 2010) mais aussi une limitation de l'activation de la voie TGF- β dans un modèle murin de cancer du pancréas (Arnold *et al.*, 2012).

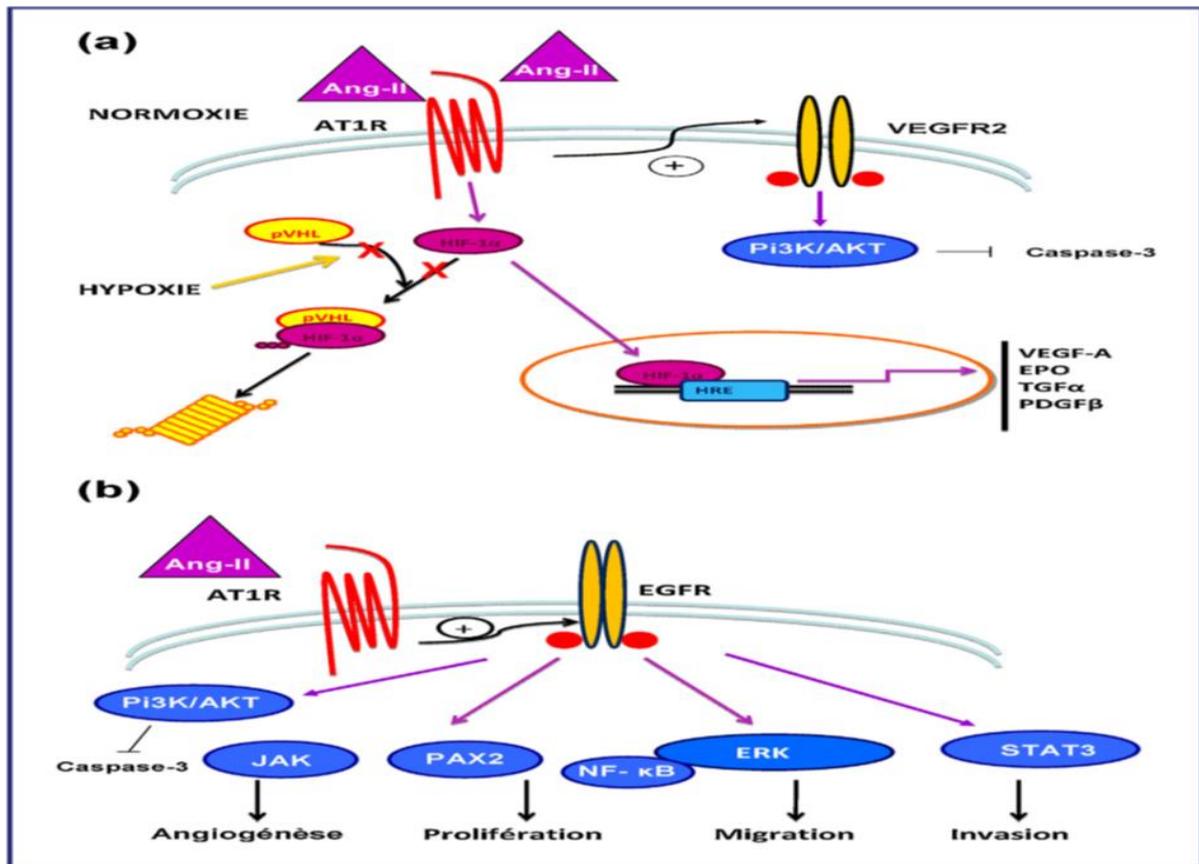


Figure.12 : Rôle potentiel de l'Angiotensine II dans le cancer (Ohashial *et al.*, 2004).

II.6. Angiotensine II dans les cancers urologiques :

L'implication de l'Ang-II a été étudiée dans de nombreux cancers. Dans le domaine plus spécifique de l'urologie, plusieurs travaux ont également pu démontrer leur rôle potentiel dans la carcinogenèse.

- Dans le cancer de la vessie

Peu de travaux portent actuellement sur le lien entre cancers de vessie et l'Ang II. L'étude sur un modèle cellulaire de tumeur vésicale humaine traité par un antagoniste des récepteurs de l'Ang II a montré une sous-expression du VEGF et de l'IL8 en IHC. Cette constatation in vitro était confirmée sur un modèle animal, avec un ralentissement de la croissance tumorale et de la densité microvasculaire chez les souris traitées (**Kosugi et al., 2006**). La combinaison d'un ARA-2 à un traitement anti-cancéreux conventionnels des cancers de vessie, peut potentialiser les effets du traitement cytotoxique en inhibant l'angiogénèse et en induisant plus d'apoptose (**Kosugi et al., 2007 ; Kosugi et al., 2009**).

- Dans le cancer du rein

Dans un modèle de xénogreffe de cancer du rein, il a été observé que la prise d'inhibiteur d'ECA entraînait une réduction de la taille tumorale (**Hii et al., 1998**). De la même façon, la prise d'ARA-2 diminuait le développement et le nombre de métastases pulmonaires, mais réduisait également la concentration de VEGF circulant comme le nombre de néovaisseaux dans les localisations secondaires chez la souris (**Miyajima et al., 2002**).

Chez l'homme, dans une série rétrospective sur 84 patients opérés d'un cancer du rein, un lien entre agressivité tumorale (grade Fuhrman 4) et le niveau d'expression d'AT1-R a été mis en évidence, par immunohistochimie et par Western Blot (**Dolley-Hitze et al., 2010**). Aussi, une études utilisant des inhibiteurs de l'ECA et des antagonistes du récepteur de l'Ang II, associés aux traitements anticancéreux présentaient une meilleure réponse au traitement anti-angiogénique et avaient une survie sans progression significativement (**Keizman et al., 2011**). Dans le cancer du rein, la pertinence de cette association est renforcée par le fait que les antagonistes des récepteurs de l'Ang II sont capables d'inhiber la sécrétion de VEGF (**Becker et al., 1999**).

- Dans le cancer de prostate

Il a été en effet constaté en PCR quantitative une surexpression de l'ARN messager d'AT1-R de patients atteints de cancer de prostate, comparativement au niveau d'expression dans du tissu prostatique non cancéreux. AT1-R transactivait alors le récepteur à l'EGF, conduisant à une activation de la voie Erk (**Uemura et al., 2003**). Ceci est d'autant plus intéressant que l'amplification de l'EGFR est fréquemment associée à la progression tumorale et que des stratégies thérapeutiques comme l'Herceptine® (trastuzumab : AC monoclonal) utilisée dans le cancer du sein et ciblant spécifiquement l'EGFR ont été développés (**Deshayes et al., 2005**). D'autres voies moléculaires ont également été explorées, et l'Ang II était capable d'induire la surexpression de PAX2 impliqué dans la croissance tumorale. L'utilisation alors d'un ARA-2 entraînait un blocage de cette voie (**Bose et al., 2009**).

Dans un modèle cellulaire de cancer de prostate résistant à la castration, AT1-R se trouvait surexprimé entraînant une surexpression de HIF-1 α et d'Ets-1 dans le noyau (**Kosaka et al., 2010**). Le blocage par un ARA-2 in vivo engendrait alors une suppression de l'expression du VEGF, du taux de PSA dans le sang ainsi que de la croissance tumorale chez la souris castrée (**Kosaka et al., 2007**). Dans d'autres travaux utilisant un modèle murin de xénogreffe, l'administration d'antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II entraînait de façon identique un ralentissement de la croissance tumorale ainsi que de l'angiogenèse (**Uemura et al., 2003**).

Une étude clinique pilote a été réalisée chez 23 patients présentant un cancer de prostate résistant à la castration. L'association d'un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II, à un blocage androgénique complet, a permis une discrète amélioration des symptômes douloureux ainsi qu'une diminution du taux de PSA (**Uemura et al., 2005**).

MATERIEL ET METHODES

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe cytokines et NO Synthase /immunité et pathogénie du professeur C. Touil Boukoffa (LBCM-FSB-USTHB), en collaboration avec le service d'urologie du CHU Tizi-Ouzou, du service d'oncologie médicale de l'hôpital de Rouïba, et du CPMC de l'hôpital Mustapha Pacha d'Alger.

I. Matériel

I.1 Matériel biologique

I.1.1. Echantillonnage :

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'un projet sur la susceptibilité génétique au cours du cancer prostatique dans la population Algérienne. Il est la continuité d'un travail entamé en 2018 avec de précédentes promotions de Masters.

Nous avons augmenté l'échantillonnage de la dernière étude cas-témoins réalisée. Nous avons analysé 131 prélèvements sanguins, effectués sur des sujets volontaires. Tous les participants ont signé un consentement libre et éclairé, après explication des objectifs et du devenir du prélèvement. Les prélèvements se répartissent comme suit : 71 prélèvements de sujets sains, indemnes de toutes pathologies apparentes, ne présentant aucun antécédent familial de cancer ou de problèmes de la prostate, et 60 patients atteints d'adénocarcinome prostatique.

Les données nécessaires pour notre enquête, sont recueillies à partir d'un interrogatoire (fiche de renseignement) avec le donneur et/ou le médecin traitant. Les caractéristiques démographiques des sujets intégrés à l'étude sont présentées dans le **Tableau. IV**

Tableau. IV : Les caractéristiques démographiques des sujets intégrés à l'étude.

	Patients	Témoins
Nombre	60	71
Moyen d'âge	68.83±9.43	55.65 ± 7.97
Age moyen du début de la maladie	64.57±10,21	/

II.1.2. Prélèvements sanguins :

Un prélèvement sanguin (5ml) sur tube à EDTA (Ethylène Diamine Tétra-acetic Acid), est réalisé. Le tube est codé et maintenu à +4°C. Après centrifugation (2500rpm/10min), le culot cellulaire est utilisé pour l'analyse génétique et le plasma est congelé -45°C.

Réactifs biologiques

- **Protéinase K (PK)** : une sérine protéase fongique (*Tritirachium album*), utilisée pour digérer les protéines associées à l'ADN et inactiver les nucléases endogènes.
- **Taq polymérase** : enzyme isolée d'une bactérie thermophile (*Thermus aquaticus*). Elle assure l'étape d'élongation au cours de la PCR et résiste à l'étape de dénaturation à 95°C.

II. Méthodes :**II.1. Extraction d'ADN génomique aux solvants organiques (phénol/chloroforme)****Principe :**

L'extraction au phénol chloroformé est une technique basée sur le principe de la solubilité différentielle des acides nucléiques entre deux phases non miscibles : l'ADN est soluble dans la phase aqueuse et les contaminants (protéines, lipides) dans la phase organique. Le phénol est un déprotéinisant puissant qui va dénaturer et solubiliser les protéines, et dans lequel l'ADN n'est pas soluble. Le chloroforme va éliminer les traces de phénol emportées avec la phase aqueuse (**Sambrook *et al.*,1989**).

Mode opératoire :

➤ Lyse des globules rouges

Le culot récupéré après centrifugation est complété à 50ml avec une solution hypotonique TE (Tris/EDTA) et centrifugés à 2500rpm/20min. Le surnageant est éliminé et le culot de leucocyte est récupéré pour l'extraction d'ADN.

➤ Lyse des globules blancs

Le culot de leucocytes est traité par 1.5ml d'une solution NTE (NaCl, Tris ; EDTA) en présence d'une concentration finale de 0.5% de SDS et de 200µg/ml de protéinase K. Après homogénéisation, le mélange est incubé au bain-marie à 56°C pendant une nuit.

➤ Extraction d'ADN au phénol-chloroforme

Après incubation au bain-marie, le lysat des leucocytes est récupéré et traité par du phénol volume à volume, puis centrifugé à 10 000rpm/10min. La phase aqueuse est récupérée et traitée une seconde fois au phénol, puis soumise à une double extraction au chloroforme. L'ADN est précipité au NaCl et à l'éthanol, puis récupéré, rincé et séché. Il est re-suspendu dans un volume adéquat d'une solution de conservation et maintenu à +4°C.

II-3 Contrôle de qualité de l'ADN génomique extrait:**II-3-1-Dosage par spectrophotométrie :****• Principe :**

Il est basé sur la mesure des propriétés d'absorption de la lumière par une substance, selon la loi de Beer-Lambert, qui établit une proportionnalité entre la concentration d'une solution, l'absorbance de celle-ci et la longueur du trajet parcouru par la lumière dans la solution (Maro *et al.*,2005).

$$\text{Loi de Beer-Lambert : } A = e * l * c$$

A : Absorbance (nm)

e : Coefficient d'extinction molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

l: Largeur de la cuve (cm)

c : Concentration de la solution (mol/L).

Ainsi, la concentration en ADN est déterminée par mesure de la DO à la longueur d'onde de 260nm (pic d'absorbance des acides nucléiques). L'absorbance est proportionnelle à la concentration en ADN (une unité DO à 260nm correspond à une concentration d'ADN double brin de 50ng/ml). Toutefois, il est nécessaire de déterminer si l'ADN extrait est contaminé par des protéines, ou certains composés de l'extraction. La DO à 280 nm (pic d'absorption des protéines) est réalisée et un rapport $DO_{260/280nm}$ est calculé. L'ADN pur devra présenter un ratio compris entre 1.8 et 2. L'absorption à 230nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances comme les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Dans le cas d'échantillons purs, le ratio $DO_{260/230nm}$ devrait être d'environ 2.

Mode opératoire :

Pour le dosage des acides nucléiques extrait, une dilution au centième est réalisée pour des lectures aux différentes longueurs d'onde (230, 260 et 280 nm). Les acides nucléiques extraits ont tous présenté un rapport $DO_{260/280nm}$ compris entre 1,6 et 2, et un rapport $DO_{260/230nm}$ aux alentours de 2, certifiant de leur pureté.

II-3-2-Contrôle de qualité par électrophorèse sur gel d'agarose :**Principe :**

L'électrophorèse sur gel d'agarose consiste à faire migrer dans un gel soumis à un champ électrique des molécules chargées. Les groupes phosphates chargés négativement font de l'ADN une molécule polyanionique, qui migre vers l'anode. La vitesse de migration ainsi que la distance parcourue sont inversement proportionnelle à la taille des fragments. Elles également influencées par la concentration en agarose et l'intensité du courant électrique appliqué (Fangman *et al.*, 1978).

Mode opératoire :

L'analyse qualitative de l'ADN génomique extrait, est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, pour vérifier que l'ADN extrait n'a pas été dégradé au cours de l'extraction. L'agarose est dissout en présence de bromure d'éthidium (BET) et laissé à polymériser. Les échantillons sont déposés dans les puits du gel en présence 1/5^{ème} de tampon de charge (bleu de Bromophénol et glycérol) et migrent à 120V/30min. En fin de migration l'ADN est visualisé sous lumière UV.

II-4-Amplification du gène d'intérêt par PCR (polymerase Chain Reaction)**Principe :**

La PCR est une technique d'amplification d'ADN *in vitro*, en imposant des cycles thermiques (dénaturation, hybridation, élongation) à un mélange réactionnel contenant une ADN polymérase thermostable (Taq polymérase), une matrice d'ADN (échantillon à analyser), des dNTPs et un couple d'amorce spécifique qui bordent la séquence d'intérêt.

Chaque brin d'ADN est dupliqué puis chaque copie est utilisée comme une nouvelle matrice lors des cycles suivants. Le cycle est répété un grand nombre de fois afin d'obtenir une multiplication exponentielle de la séquence voulue (Mullis *et al.*, 1985).

Les produits amplifiés sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. La taille des fragments est estimée par rapport à un marqueur de poids moléculaire, ayant migré en même temps, permettant ainsi de déduire par comparaison le génotype de chaque individu.

Mode opératoire

La recherche du polymorphisme I/D du gène de l'ACE a été effectuée par amplification PCR d'une région de l'intron 16. Un milieu réactionnel de PCR, d'un volume final de 50µl a été préparé. Il comprend les éléments essentiels selon des concentration prédéfinies par la première équipe ayant mis en évidence ce polymorphisme en 1990 (**Rigat *et al.*, 1990**) : ADN matriciel à génotypes, ADN polymérase thermostable (Taq polymérase 1 unité), des désoxyribonucléotides (dNTPs 0.5mM de chaque), un tampon réactionnel (Tampon Tris-HCl 10mM à pH 8.4, KCl 50mM, MgCl₂ 3mM, gélatine 0.1mg/ml, H₂O), et une concentration suffisante en amorces sens et anti-sens (10pmoles). Le mélange réactionnel préparé, est soumis à un programme d'amplification spécifique (**Tableau. V**).

Toutefois, au cours de la réalisation de notre bibliographie, nous avons pu observer une remise en question du protocole établi par Rigat en 1990 (**Rigat *et al.*, 1990**). Certaines études rapportent un mauvais génotypage des échantillons ID qui apparaissent DD (induisant une surestimation de l'allèle D). Nous avons remédié à cela en rajoutant du DMSO (5%) au mélange réactionnel, et nous avons comparé nos résultats à ceux réalisés sans DMSO.

Tableau. V : Conditions d'amplification par PCR d'une partie de l'intron 16 du gène ECA

Position	Polymorphisme de l'intron 16 du gène ECA	Polymorphisme
Amorce (pb)	F : 5'CTGGAGACCACTCCCATCATTCT-3' R : 5'GTGGTCGCCATCACATTGGTCAGAT-3'	Insertion/ délétion
Etape 1	Dénaturation initiale 95C°/5min	
Etape 2	Dénaturation 94C° / 1min Hybridation 58C° / 1min Elongation 72C°/ 2min	Cycle répété X30
Etape 3	Elongation finale 70C°/5min	

II- 4-Analyse statistique

L'analyse statistique est réalisée par le logiciel GraphPadPrism 7.01, en utilisant le test exact de Fisher. Les valeurs retrouvées permettront d'affirmer que à : $p < 0,05$, la différence est statistiquement significative (*) avec un risque d'erreur de 5%.

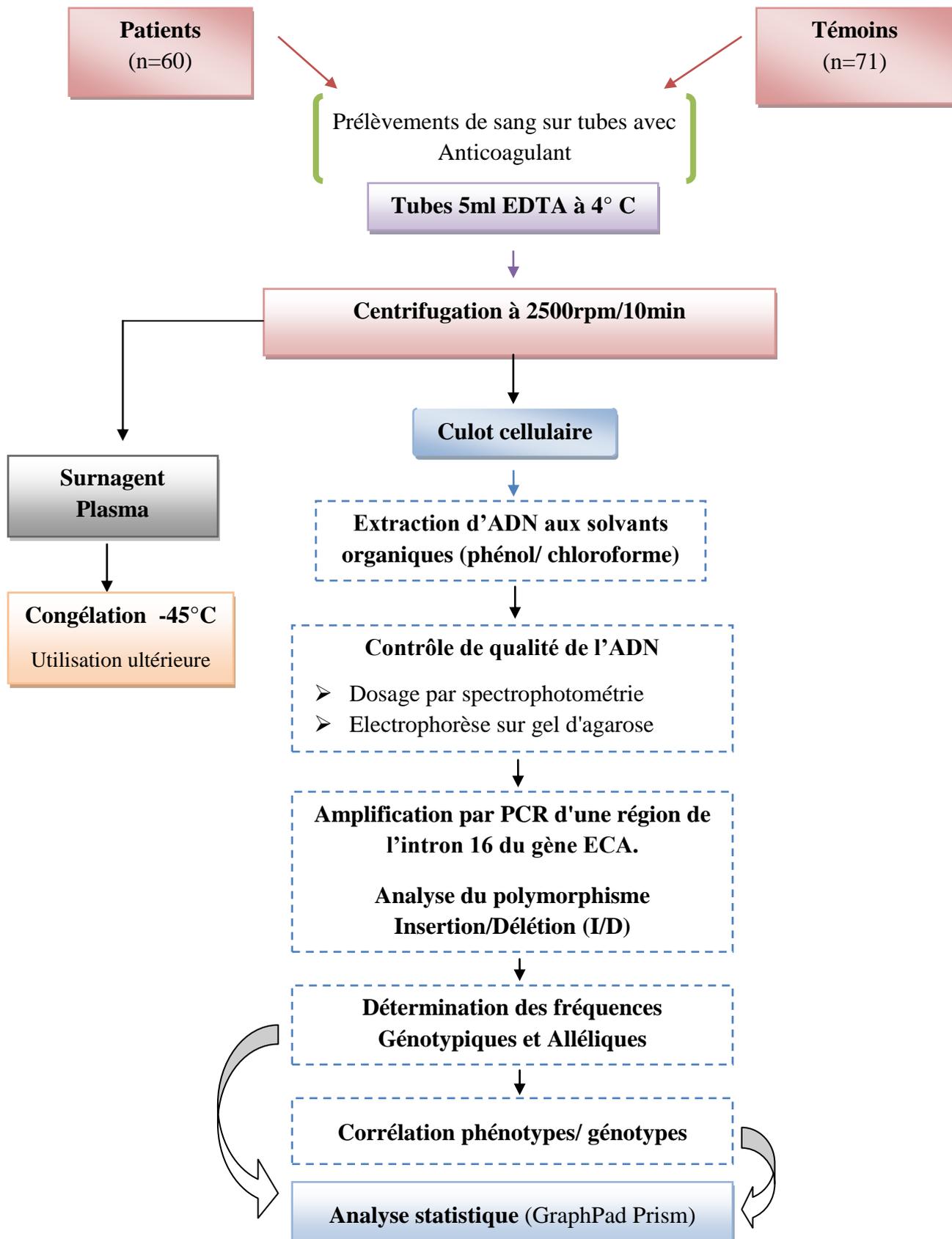


Figure.13 : Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale

RESULTATS

Résultats et interprétation

1. Résultats de l'extraction des acides nucléiques :

1.1. Contrôle de qualité par électrophorèse sur gel d'agarose :

L'extraction d'ADN constitue une étape cruciale et déterminante pour l'analyse moléculaire. L'objectif étant d'avoir un matériel génétique (ADN) non dégradé et dépourvu de contaminants pouvant interférer avec la suite de l'analyse génétique à savoir la PCR.

L'efficacité de l'extraction a été établie sur la base du poids moléculaire et de l'intensité des bandes obtenues, par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Les profils électrophorétiques obtenus indiquent que les acides nucléiques se présentent sous forme d'une bande intense, qui migre lentement (ADN de haut poids moléculaire) et qui se présentent sans ou avec très peu de trainées, attestant d'un bon matériel génétique non dégradé, durant les différentes étapes d'extraction (**Figure.14** et **Figure.15**).

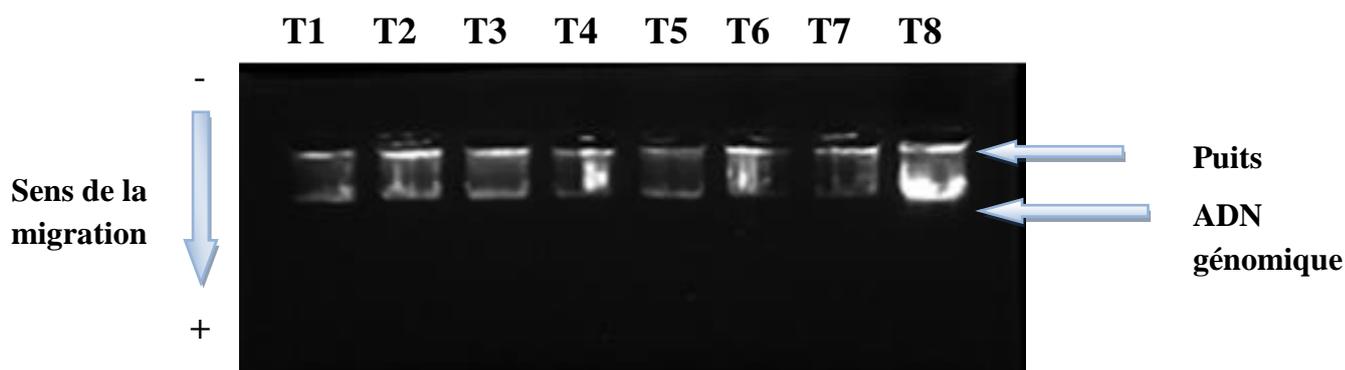


Figure.14: Profil électrophorétique représentatif des ADNs génomiques extraits par « Phénol/Chloroforme » chez les témoins. T: Témoin

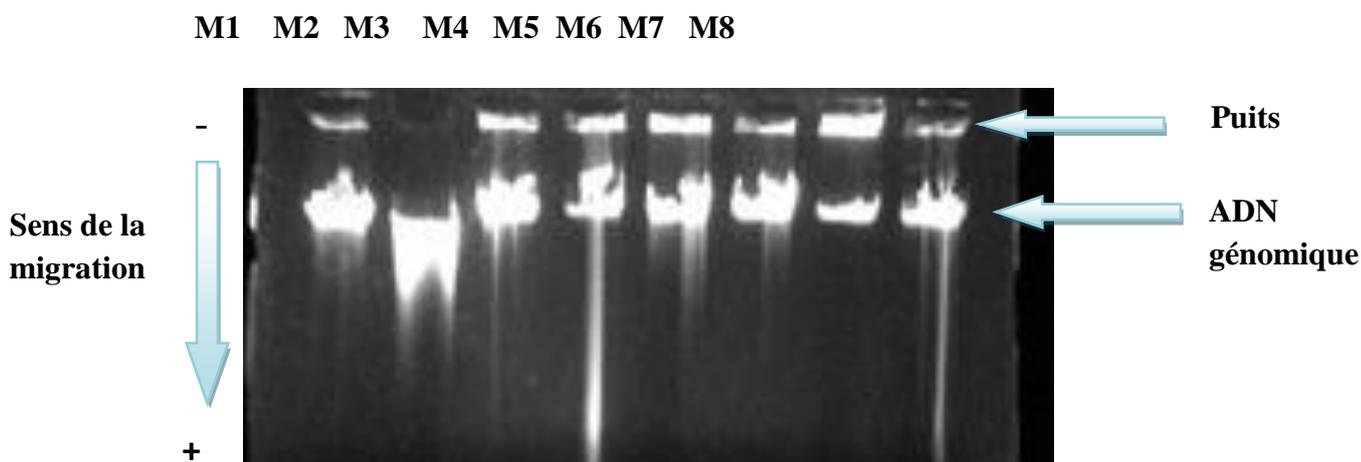


Figure.15: Profil électrophorétique représentatif des ADNs génomiques extraits par «Phénol/Chloroforme » chez les patients. P: Patients CaP.

Résultats et interprétation

1.2. Détermination de la concentration et la pureté d'ADN par spectrophotométrie :

Les échantillons extraits ont montré un rapport de pureté DO 260/280 compris entre 1,6 et 2 ainsi qu'un rapport DO260/230 aux alentours de 2. Le dosage des échantillons d'ADN à 260nm révèle des concentrations élevées, qui dépassent 1µl/ml, établis sur la base de la loi : 1unité DO à 260 = 50ng/ml d'ADN double brin. Ces données attestent de l'efficacité de l'extraction, de la pureté de l'ADN génomique et de la faisabilité de l'analyse moléculaire.

2. Résultats de l'amplification des acides nucléiques par PCR :

L'amplification d'une partie de l'intron 16 du gène d'intérêt (ECA) et l'analyse des produits d'amplification obtenus est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Les produits analysés, indiquent des profils à une ou deux bandes de tailles différentes, identifiées par comparaison au marqueur de poids moléculaire (Mpm), migrant en parallèle. L'électrophorèse met en évidence la présence des trois génotypes possibles du gène ECA, dans notre cohorte. Les résultats sont illustrés en **Figure.16**.

On note la présence :

- ✓ d'une bande unique de 477pb pour le génotype homozygote insertion (I/I).
- ✓ d'une bande unique de 190pb pour le génotype homozygote délétion (D/D).
- ✓ le profil hétérozygote insertion/délétion (I/D) est observé sous forme de deux bandes avec des tailles respectives de 190 pb et de 477 pb.

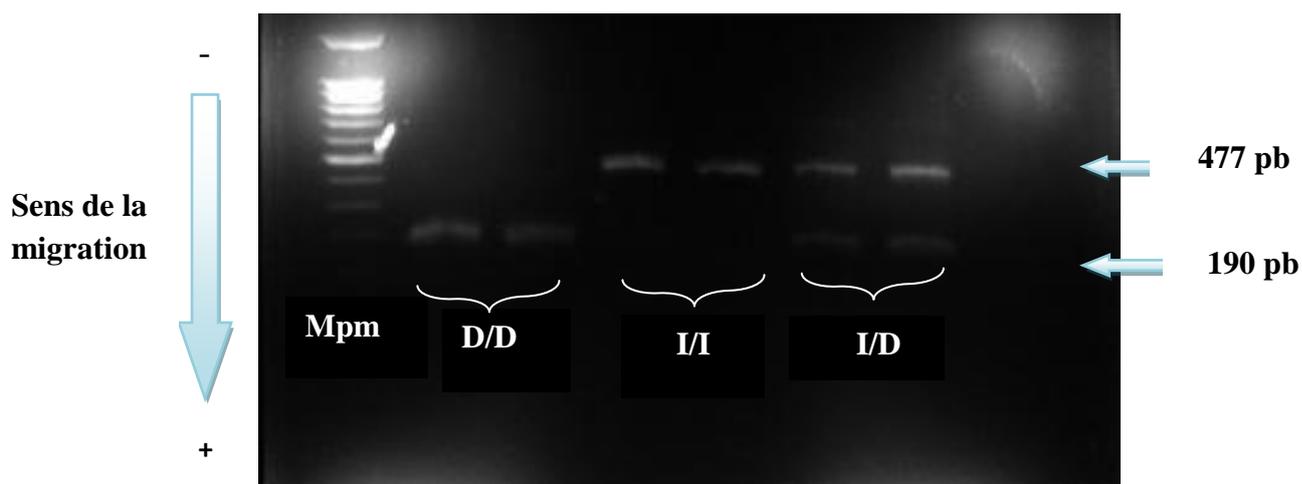


Figure.16: Profil électrophorétique représentatif des produits de PCR après amplification

Mpm: Marqueur de poids moléculaire ; I : Insertion ; D : Délétion ; pb : paires de bases

Résultats et interprétation

La remise en question du protocole établi par Rirgat en 1990 (Rigat et al.,1990), et qui décrit un mauvais géotypage des échantillons ID, apparaissant DD sur l'électrophorèse, a été pris en considération en rajoutant du DMSO (5%) pendant la PCR. Nos résultats ont mis en évidence que sur les 31 patients CaP précédemment géotypes DD, les 31 sont ressortis DD soit 100% des échantillons analysés, après ajout de DMSO.

3. Analyse des fréquences géotypiques du polymorphisme I/D du gène ECA :

L'analyse du polymorphisme insertion/délétion du gène ECA a été effectuée sur un groupe de témoins (n=71) de patients CaP (n=60). Après analyse moléculaire, le calcul des fréquences géotypiques a été réalisé et les résultats représentés en **Tableau.VI** et **Figure.17**.

Tableau. VI : Fréquences géotypiques du polymorphisme I/D du gène ECA

Géotypes	Témoins (%) N= 71	Patients (%) N=60	Valeur de P	OR (95% ; IC)
II	4 (5.6 %)	8 (13.3 %)	ns $p= 0.14$	2.57 (0.73-9.03)
DD	40 (56.4 %)	31 (51.6 %)	ns $p= 0.60$	0.8 (0.42-1.65)
ID	27 (38.0%)	21 (35%)	ns $p=0.85$	0.87 (0.42-1.79)

(I: Insertion ; D: Délétion ; ns : non significative, OR : Odd Ratio, IC : intervalle de confiance).

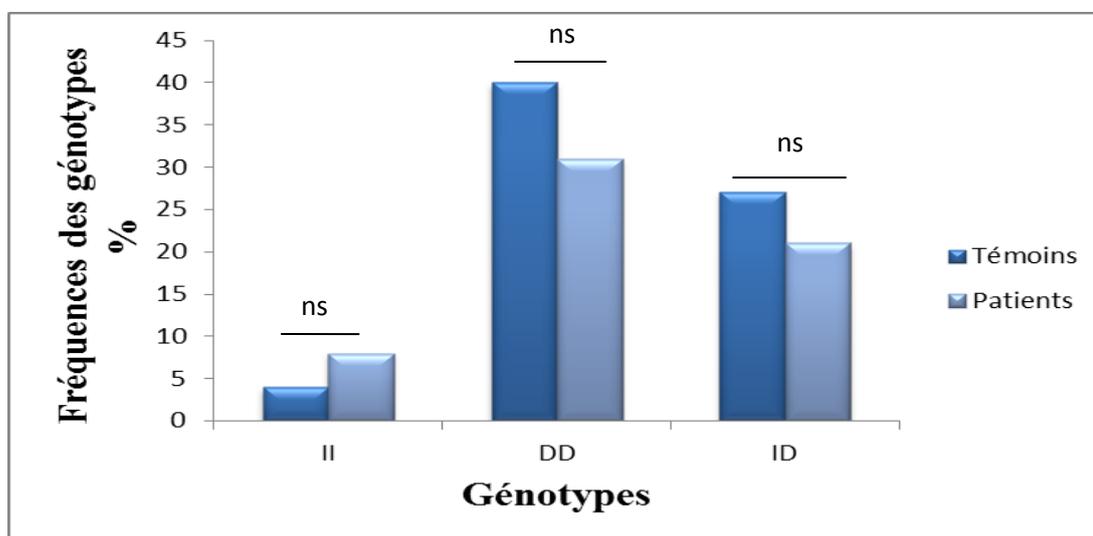


Figure.17: Représentation graphique des fréquences géotypiques du Polymorphisme I/D du gène ECA dans les groupes témoins et patients CaP.

- Nos résultats mettent en évidence la présence des trois types de géotype dans la population Algérienne aussi bien témoins que patients CaP.
- Nos résultats montrent une répartition différente, des géotypes entre patients et témoins et ce pour les différents géotypes. Toutefois l'étude statistique ne révèle aucune différence significative ($p > 0.05$).

Résultats et interprétation

4. Analyse des fréquences alléliques du polymorphisme I/D du gène ECA :

Après analyse du génotype et le calcul des fréquences génotypiques, qui ne font ressortir aucune différence flagrante, nous avons entrepris d'analyser les fréquences alléliques. Les résultats sont représentés en **Tableau.VII** et en **Figure.18**.

Tableau. VII : Fréquences alléliques du polymorphisme I/D du gène ECA

Génotypes	Témoins n(%)	Patients n(%)	Valeur de <i>p</i>	OR (95%, IC)
D	107 (75.3%)	83 (69.1%)	<i>p</i> =0.21 ns	0.7 (0.41-1.21)
I	35 (24.6%)	37 (30.8%)	<i>p</i> = 0.27 ns	1.36 (0.79-2.34)

(I: Insertion ; D: Délétion ; ns : non significative, OR : Odd Ratio, IC : intervalle de confiance).

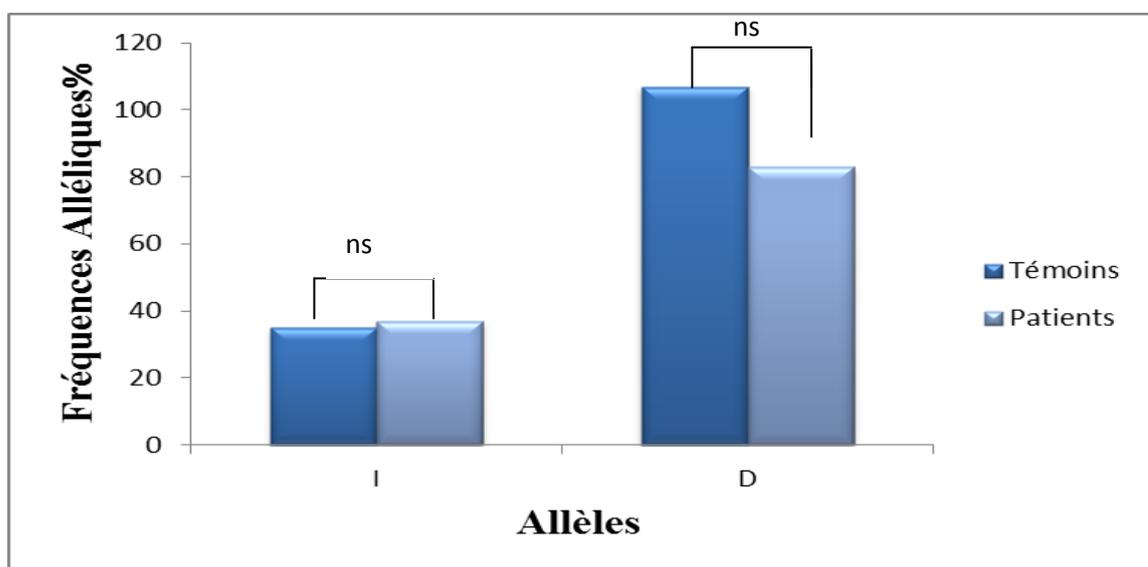


Figure.18: Représentation graphique des fréquences alléliques du polymorphisme I/D du gène ECA dans les groupes témoins et patients CaP.

- Nos résultats montrent de légères différences dans la répartition des fréquences alléliques entre patients CaP et témoins, pour l'allèle D les fréquences est de (75.3% vs 69.1%) et pour l'allèle I elle est de (24.6 % vs 30.8%).
- L'analyse statistique ne révèle néanmoins aucune différence significative ($p > 0.05$), indiquant une répartition homogène entre patients et témoins, probablement due au fait que ce gène soit très polymorphe.

Résultats et interprétation

5. Association entre le polymorphisme I/D du gène ECA et les données cliniques :

Etant donné l'implication de l'angiotensine II dans la carcinogénèse, nous avons essayé de mettre en évidence la potentielle association du polymorphisme du gène ECA avec certaines caractéristiques en rapport avec l'invasion tumorale, comme l'hétérogénéité tissulaire (à travers le score de Gleason), et l'apparition des métastases et le stade clinique.

5.1. Corrélation entre le génotype et le score de Gleason :

Nous avons entrepris dans un premier temps d'analyser l'association des génotypes au score de Gleason. Les résultats sont représentés en **Tableau.VIII** et en **Figure.19**.

Tableau.VIII : Distribution des génotypes en fonction du score de Gleason chez les patients

Génotypes	Gleason < 7	Gleason ≥ 7	Valeur de p
DD (n=31)	6 (19.4%)	25 (80.6%)	**** $p < 0.0001$
ID (n=21)	3 (14.3%)	18 (85.7%)	**** $p < 0.0001$
II (n=8)	2 (25%)	6 (75%)	ns $p = 0.13$

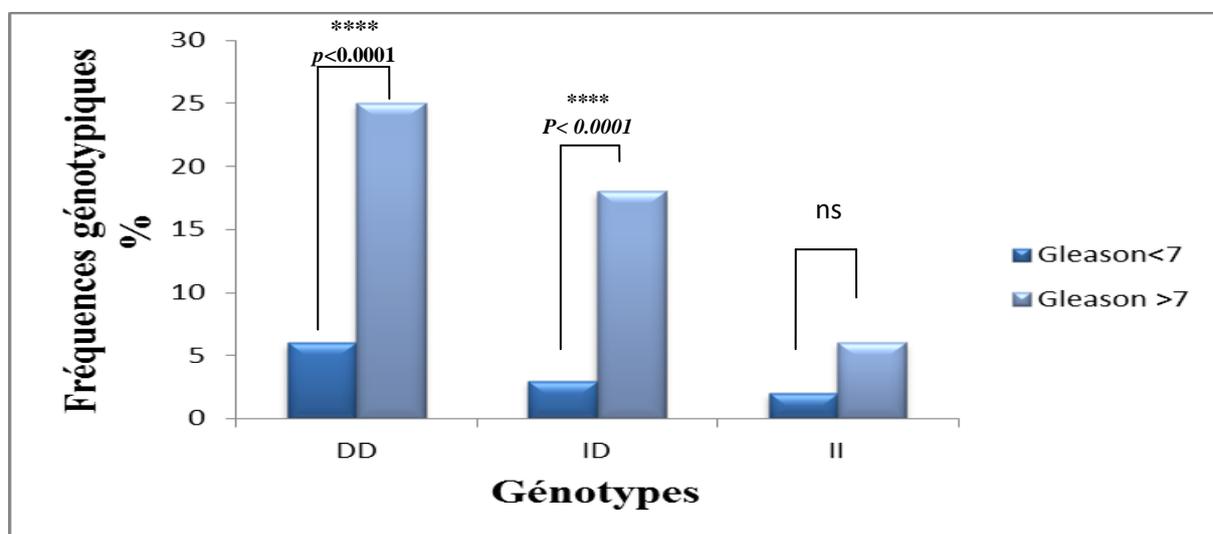


Figure.19: Représentation graphique des fréquences du score de Gleason en fonction des génotypes du polymorphisme I/D du gène ECA.

- Nos résultats montrent que les génotypes DD et ID sont très hautement significativement associés à un score de Gleason ≥ 7 ($p < 0.0001$). Contrairement au génotype II, plus retrouvé dans les scores de Gleason < 7 , mais reste néanmoins non significative d'un point de vue statistique ($p > 0.05$).
- Il est à noter que le stade de Gleason supérieur à 7 correspond aux cancers prostatiques de haut grade, considérés comme étant agressifs et à risque évolutif.

Résultats et interprétation

5.2. Corrélation entre les génotypes et le caractère métastatique

Nous avons entrepris dans un deuxième temps d'analyser l'association des génotypes avec le caractère métastatique (présence (M1) ou absence (M0) de métastases). Les résultats sont représentés en **Tableau XI**, et en **Figure.20**.

Tableau. XI: Distribution des fréquences métastatiques en fonction des génotypes I/D

	M0 n (%)	M1 n (%)	Valeur de P
DD (n=31)	10 (32.2%)	21 (67.7%)	* p=0.0105
ID (n=21)	5 (19.4%)	16 (76.1%)	** p=0.0017
II (n=8)	2 (25%)	6 (75%)	ns p= 0.1319

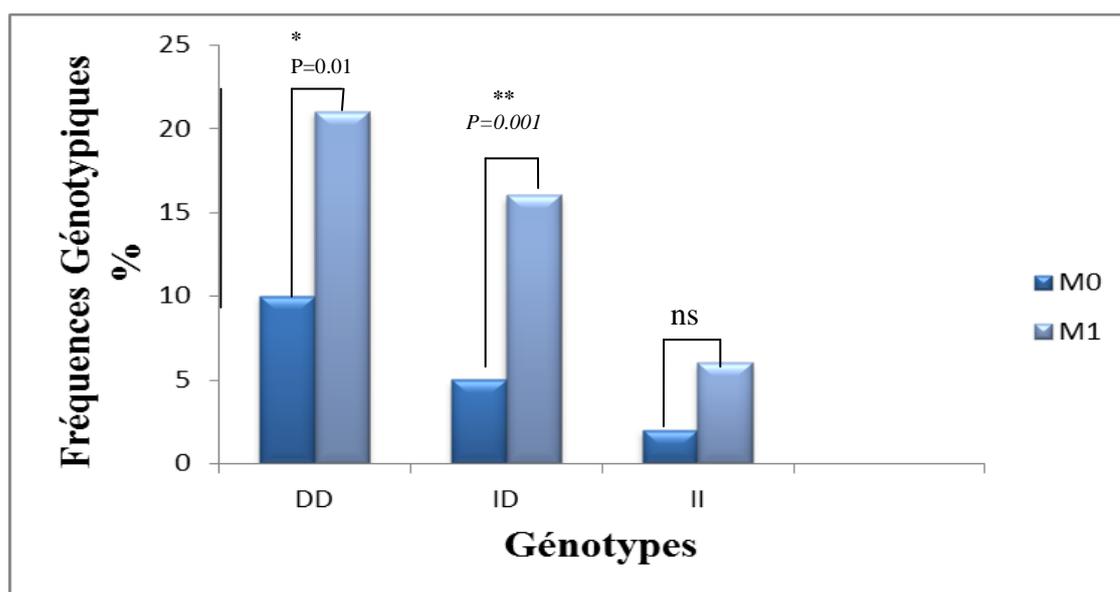


Figure.20: Représentation graphique de la distribution des fréquences génotypiques du polymorphisme I/D en fonction du caractère métastatique.

- Nos résultats montrent que les génotypes DD et ID sont plus associés au caractère métastatique (M1), de manière significative ($p < 0.05$).
- Le génotype II bien qu'il soit plus présent dans le caractère métastatique (M1) il reste néanmoins non significatif d'un point de vue purement statistique.

Résultats et interprétation

5.3. Corrélation entre les génotypes et les stades du cancer :

Nous avons entrepris d'analyser l'association des génotypes au stade du cancer, les stades I, II et III étant les stades les moins évolués. Les résultats sont représentés sur le **Tableau.X** et la **Figure.21**.

Tableau. X : Distribution des génotypes en fonction des stades du cancer chez les patients CaP

	Stade I+II+III	Stade IV	Valeur de P
DD (n=31)	10 (32.25%)	21 (67.74%)	$p=0.010$ *
ID (n=21)	4 (19.04%)	17 (80.95%)	$p= 0.0001$ ***
II (n=8)	2 (25%)	6 (75%)	$p= 0.1319$ ns

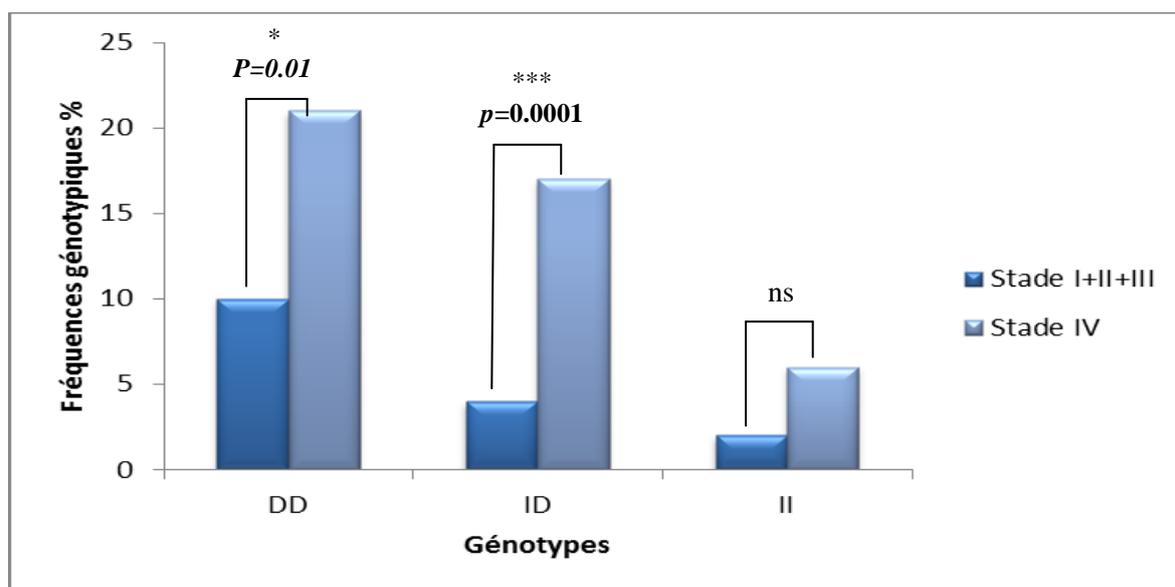


Figure.21: Représentation graphique des fréquences des stades de cancer en fonction des génotypes du polymorphisme I/D du gène ECA.

- Nos résultats montrent que le génotype DD et ID sont significativement plus associés au stade le plus évolué du cancer de la prostate (Stade IV) ($p<0.05$).
- Le génotype II semble plus fréquents chez les patients au stade IV, bien que la différence soit observable, elle reste néanmoins non significative d'un point de vue statistique ($p>0.05$)

DISCUSSION

Discussion

Le cancer de la prostate (CaP) est une tumeur maligne qui se développe au dépens de l'épithélium prostatique, puis envahit la prostate, avant de se disséminer rapidement à d'autres organes, par voie lymphatique et sanguine (**Cunningham et al., 2003**). En termes de prévalence, il se positionne en 3^{ème} position des cas de cancers masculins dans notre pays (Globocan, 2018), et devient ainsi un réel problème de santé publique, d'autant plus du fait de son évolution insidieuse et rapide dans certains cas. Cela réduit les chances de thérapie et met en jeu le pronostic vital du patient diagnostiqué.

Le CaP est un cancer très hétérogène avec une forte variabilité de la progression entre les patients (**Boyd et al., 2012**). La progression tumorale est très fortement associée au processus de l'angiogenèse (**Amankwah et al., 2012**), qui pourraient très probablement être le reflet de variations génétiques de certains composants clés de ce processus.

Comme dans les différentes pathologies du monde moderne actuel, la composante génétique semble être une base sous-jacente à tous les processus délétères identifiés. Le CaP est l'un des cancers les plus héréditaires avec 20% de formes familiales (**Mucci et al., 2016**). Aussi l'existence de la comorbidité de ce cancer avec d'autres cancers met en exergue la part de la génétique (**Borre et al., 1998 ; Tomic et al., 2001 ; Murphy et al., 2005 ; Duggan et al., 2007**). Les études d'association pan génomique (GWAS) ont permis d'identifier plus 160 locis de prédisposition, et plusieurs polymorphismes répartis sur l'ensemble du génome (**Sayed-Tabatabaei et al., 2006**).

Dans le cancer de la prostate il est décrit des cancers dit « peu agressifs » associés à une évolution clinique favorable et une faible capacité de progression. D'autres sont au contraire dit « agressives », associés à une évolution clinique plus importante, et plus rapide avec un potentiel métastatique, difficilement identifiable au préalable (**Ploussard et al., 2011**).

L'angiogenèse est un mécanisme clé qui peut influencer l'évolution du CaP; les vaisseaux néoformés vont infiltrer la tumeur et permettre la migration de cellules tumorales (métastases) et leurs extravasation vers des sites secondaires (**Li Y et al., 2010 ; Maman et al., 2018**).

L'expression des facteurs pro angiogéniques est souvent dérégulée et accentuée dans le cancer. La présence de polymorphismes pourrait être une des causes. Ils influenceraient leur expression et par conséquent le processus d'angiogenèse, conduisant éventuellement à une variation interindividuelle du risque et de la progression de la maladie.

Discussion

L'angiotensine II, dont l'expression est sous le contrôle de l'enzyme de conversion ECA, joue un rôle dans le processus d'angiogenèse. Ainsi, les polymorphismes influant sans expression pourraient favoriser le processus d'angiogenèse et par conséquent le CaP et son évolution.

Le gène de l'ECA est soumis à divers variations génétiques, dont le polymorphisme I/D, fortement décrit et très souvent recherché, au niveau de l'intron 16 du gène (**Soubrier *et al.*, 1988**).

Ces constatations, associées au manque de données publiées quant à la génétique du CaP dans la population Algérienne (seules 4 publications associant le CaP à la génétique ont été répertoriées (**Esteban *et al.*, 2005 ; Fernández-Santander *et al.*, 2016 ; Novillo *et al.*, 2018 ; Benabdelkrim *et al.*, 2018**)), nous ont poussé à entreprendre cette étude.

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'un projet sur la susceptibilité génétique au cours du CaP. Pour cela nous avons entrepris une étude Cas/Témoins, associant 60 patients CaP et 71 sujets sains. Notre travail est la continuité d'un travail entamé en 2018, afin d'examiner de plus près l'association entre ce cancer et les variations génétiques du gène ECA, dans un échantillon de la population Algérienne.

Rigat et ses collègues ont été les premiers à décrire une méthode de détection du polymorphisme ACE Insertion/ Délétion (I/D) par PCR (**Rigat *et al.*, 1990**). Toutefois, lors de la réalisation de notre bibliographie, nous avons observé une remise en question du protocole établi et ce par divers équipes qui rapportent un mauvais génotypage des échantillons ID qui apparaissent DD, induisant une surestimation de l'allèle D (**Shanmugam *et al.*, 1993 ; Ueda *et al.*, 1996 ; Odawara *et al.*, 1997 ; Koyama *et al.*, 2008 ; Saracevic *et al.*, 2013**). Bien que la raison exacte reste inconnue divers hypothèses ont été émises.

Certains auteurs proposent la formation d'une structure secondaire stable de la région d'insertion pendant la PCR et l'interférence consécutive avec l'activité de la Taq polymérase (**Chiang *et al.*, 1998**). D'autres ont décrit un pourcentage élevé de paires de bases guanine-cytosine (GC) dans la séquence d'insertion (I) Alu, ce qui entraîne une dénaturation inefficace de l'ADN (**Shanmugam *et al.*, 1993**). Ces paramètres empêcheraient ainsi le positionnement de l'amorce pour faire apparaître l'allèle d'insertion (I) au profit de l'allèle de délétion (D).

Ainsi, pour confirmer les résultats précédemment réalisés, nous avons modifié le protocole expérimental pour l'analyse moléculaire. En se basant sur les recherches déjà établis, il est proposé divers méthodes comme :

Discussion

l'utilisation du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 5% (**Shanmugam *et al.*, 1993**), faire un cycle de PCR plus long, utiliser des amorces plus longues et changer les températures de fusion (**Saracevic *et al.*, 2013**), ou utiliser de préférence des amorces spécifiques au polymorphisme d'insertion (**Lindpaintner *et al.*, 1995**).

Nous avons opté dans notre travail pour l'ajoutant de DMSO à 5% au mélange réactionnel. Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est un composé organo-sulfuré avec une polarité élevée qui est utilisé en PCR pour perturber la formation de la structure secondaire dans la matrice d'ADN. Le DMSO peut se lier à l'hydrogène aux rainures majeures et mineures de l'ADN matrice et déstabilise par conséquent la structure en double hélice (**Simon *et al.*, 2009**). Ceci est particulièrement utile dans les modèles avec une teneur élevée en GC car la force accrue de la liaison hydrogène augmente la difficulté de dénaturer la matrice et provoque la formation de structures secondaires intermoléculaires plus facilement, qui peuvent entrer en compétition avec l'hybridation de l'amorce (**Chakrabarti *et al.*, 2001**).

Nos résultats nous ont permis de confirmer les résultats précédemment réalisés, et ce en comparant les données avec et sans utilisation de DMSO à 5% dans le protocole d'amplification par PCR. Ainsi, le génotypage semble correcte avec ou sans ajout de DMSO.

Toutefois, cela pourrait être le reflet de l'échantillonnage réduit que nous avons réalisé. Sur un plus grand effectif les erreurs de génotypage auraient pu apparaître. Sur 131 échantillons analysés dans cette étude, 71 ont été génotypés comme homozygotes DD.

Contrairement à nos résultats certaines études rapportent des données différentes suite à l'utilisation du protocole de Rigat et ses collaborateurs. En 1993, l'équipe de Shanmugam est la première à rapporter une erreur de génotypage dans le protocole de Rigat et l'amplification prédominante de l'allèle D sur un échantillonnage de 9 patients. Tous ont été génotypés homozygotes DD en utilisant le protocole de Rigat et al., mais en répétant l'amplification par ajout de DMSO à 5%, tous les génotypes DD sont apparus ID. Ce résultat a été confirmé en utilisant des amorces spécifiques du polymorphisme insertion (**Shanmugam *et al.*, 1993**).

Aussi, Ueda et ses collègues ont analysé 1238 échantillons, sur les 335 génotypés comme homozygotes DD, 35 ont été mal génotypés, soit une erreur de 10% (**Ueda *et al.*, 1996**).

De même, sur 248 échantillons génotypés en 1997 par Odawara et son groupe de recherches, 88 ont été classés comme homozygotes DD. Sur ces 88 échantillons, 60 ont été mal génotypés soit plus de 60% d'erreur (**Odawara M *et al.*, 1997**).

Discussion

En 2007, l'équipe de Koyama a analysé 335 échantillons selon la méthode proposée par Rigat et génotypé 95 échantillons en homozygotes DD dont 77 correctement génotypés et 18 mal génotypés, soit un taux de 19% (**Koyama *et al.*, 2008**).

Plus récemment, Sracevic, montre que sur 200 échantillons analysés, 57 DD ont été détectés et sont correctement génotypés, et cela en rapportant des modifications au protocole de Rigat : comme un changement avec des amorces plus longues, et une augmentation du nombre de cycles de PCR (**Sracevic *et al.*, 2013**).

Pour expliquer nos résultats qui ne montrent pas de différences entre l'ajout de DMSO et son absence dans le protocole, nous avons établi un tableau comparatif avec la méthode de Rigat (**Tableau.XI**). Nous remarquons une différence qui est la présence d'une étape de dénaturation initiale de 5min qui est inexistante dans le protocole de Rigat. Cette étape pourrait permettre une meilleure ouverture de la molécule d'ADN et un meilleur positionnement des amorces, faisant ainsi apparaître le génotype ID au lieu du DD, observé dans la méthode de Rigat.

Tableau. XI : Comparaison du protocole d'amplification utilisé par Rigat et celui de notre étude

	Méthode de Rigat	Méthode utilisée dans notre étude
Amorces	5' CTGGAGACCACTCCCATCC1TTC 3'	5' CTGGAGACCACTCCCATCC1TTC3'
	5'GATGTGGCCATCACATTCGTCAG 3'	5' GATGTGGCCATCACATTCGTCAG 3'
Protocole PCR	(1) (inexistante) (2) Dénaturation 94C° / 1min Hybridation 58C° / 1min Elongation 72C° / 2min (3) (inexistante)	(1) Dénaturation initiale 95C°/5min (2) Dénaturation 94C° / 1min Hybridation 58C° / 1min Elongation 72C° / 2min (3) Elongation finale 70C°/5min
Nombre échantillons	199	130
Mélange réactionnel	Standard	Standard + ou - DMSO à 5%

Discussion

Le CaP a bénéficié de nombreuses études et approches génétiques pour identifier et étudier des marqueurs de prédisposition, dont le séquençage à haut débit. Le gène ECA a attiré une attention particulière. De nombreuses études rapportent son implication dans la pathogenèse de plusieurs cancers, comme le cancer du sein (**Haiman et al., 2003**) gastrique et colorectal (**Rocken et al., 2005**), ou encore dans le gliome (**Benenemissi et al., 2019**), en influençant la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, la différenciation et l'apoptose (**Willis et al., 2011**).

Le polymorphisme I/D, le plus décrit du gène ECA (**Soubrier et al., 1988**), semble très hétérogène à travers les études réalisées, et pourraient être due à la variabilité du background génétique entre les populations.

Ainsi, il nous a paru intéressant d'analyser ce polymorphisme (I/D) du gène ECA dans le cadre d'une étude cas-témoins (60 Cas /71 Témoins). L'analyse moléculaire réalisée par PCR nous a permis de déterminer les fréquences alléliques et génotypiques, et de répondre dans un premier temps à la question de savoir si ce polymorphisme existe dans la population Algérienne et à quelle fréquence et dans un deuxième temps d'analyser la fréquence chez les patients atteints de CaP, et de l'associer aux caractéristiques cliniques de la maladie.

Nos résultats montrent que le polymorphisme ID existe dans la population Algérienne. Nous détectons la présence des trois génotypes DD, ID et II. Les résultats de notre étude ont montré que chez les témoins le génotype homozygote DD était dominant avec une fréquence de 56.4 %, suivi par l'hétérozygote ID 38 % puis le génotype homozygote II 5.6%.

Contrairement à la population Caucasienne Européenne il est rapporté une plus grande fréquence du génotype ID suivie des génotypes DD et II, à des fréquences équivalentes (**Barly et al., 1994**). De même pour les populations libanaise, avec une prédominance du génotype ID suivie du DD et du II (**Asmahan et al., 2020**).

Aussi, dans une récente étude sur la population Algérienne, il est rapporté une plus grande fréquence du génotype ID suivie des génotypes DD et II (**Benenemissi et al., 2019**). Malgré la même origine, nos résultats montrent une différence entre les deux études ; cela pourrait être le reflet d'un faible échantillonnage de nos témoins ou la différence de la sous population (nous travaillons sur une cohorte du centre Algérien alors que l'autre étude est une étude de l'Est Algérien). Ces données confirment la nécessité d'un échantillonnage plus large et multicentrique plus représentatif de notre population Algérienne.

Discussion

Au même titre que le génotype DD, l'allèle D est le plus représenté dans le groupe témoins, avec des fréquences respectives de 75.3% versus 24.6% pour l'allèle I. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études antérieures, sur la population générale arabe et africaine, qui rapportent des fréquences de l'allèle D plus élevées (64% chez les soudanais, 73% chez les somaliens, 61% chez les émiratis, 71% chez les omanais, 66% chez les saoudiens 83% chez les égyptiens et 63.7% chez les libanaises) (**Bayoumi et al., 2006 ; Abdel-Aziz et al., 2012 ; Al-Harbi et al., 2015**)(**Asmahan et al ; 2020**)

Des résultats différents ont été observés dans d'autres populations. Dans la population chinoise par exemple, la répartition des deux allèles semble équivalente (50%) (**Wang et al., 2012**). Aussi, le génotype DD semble inexistant dans la population Samoa (Polynésie occidentale) et la tribu indienne Yanomami (Amérique du Sud), donnant lieu a une prédominance de l'allèle I (**Barly et al., 1994**).

Les différences inter ethnique de distribution des génotypes et des allèles semblent claires. Elles pourraient être le reflet de pressions sélectives. Les recherches sur le génome humain mettent en évidence l'importance de la sélection naturelle, qui serait le reflet de fortes pressions alimentaires, climatiques ou encore d'agents pathogènes, s'exerçant sur certains gènes, pour permettre une adaptation à l'environnement (**Vasseur et al., 2013**). Dans le mode de vie actuel, ces mutations deviendrait au contraire délétères chez certaines personnes et favoriseraient l'apparition de pathologies.

Ainsi, en se basent sur ce principe il est essentiel de connaitre les caractéristique de notre population Algérienne. Ce qui est valable dans une population ne l'ai pas forcément dans une autre, d'où l'intérêt des analyses génétiques.

Dans le cadre de notre étude cas/témoins, nos résultats mettent en évidence la présence de la mutation I/D du gène ECA chez les patients atteints de CaP, avec des fréquences génotypiques respectives de 51.6 % DD, 35% ID et 13.3% pour le II. Toutefois, la répartition entre patients et témoins semble équivalente et ne présente aucune différence statistique ($p>0.05$). Les résultats d'une récente Meta analyse rapportent que ce polymorphisme est différemment associé dépendamment des populations. Il serait ainsi associé qu'aux populations asiatique et latine (**Wang et al., 2018**).

Nos résultats vont dans le même sens que divers études ayant analysé le polymorphisme I/D du gène ACE dans le CaP dans la population Iranienne (**Hasanzad et al., 2012**), la population Mexiquaine (**Sierra et al., 2009**).

Discussion

Notre incapacité à monter des différences dans les fréquences génotypiques nous a poussés à analyser les fréquences alléliques. Bien que des différences soient observables, elles restent néanmoins non significatives d'un point de vue statistique ($p > 0.05$).

Il est rapporté que pour des polymorphismes relativement fréquents (50 % chez les témoins) il est nécessaire de travailler sur de grandes cohortes. Des estimations du nombre de sujets nécessaires pour détecter des ORs compris entre 1,2 et 1,5 avec une puissance statistique de 80 %, indiquent que 500 à 2 000 cas et témoins sont nécessaires (**Brennan, 2002**).

Etant donné la capacité du gène ECA à influencer sur divers mécanismes à travers l'Ang II, et la capacité du polymorphisme I/D de ce gène à moduler son expression. Nous avons analysé dans notre étude sa corrélation avec certaines caractéristiques en rapport avec l'invasion de la tumeur; à savoir l'hétérogénéité tissulaire (à travers le score de Gleason) et l'appariation des métastases et le stade tumoral (à travers les données de classification TNM).

Nos résultats montrent que les génotypes DD et ID sont associés à un score de Gleason ≥ 7 d'une manière très hautement significative ($p < 0.0001$). Contrairement au génotype II, qui est plus retrouvé dans les scores de Gleason < 7 , mais reste néanmoins statistiquement non significative ($p > 0.05$). Un stade de Gleason supérieur à 7 correspond aux cancers prostatiques de haut grade, considérés comme étant agressifs et à risque évolutif (**Salomon et al., 2010**).

Les études ayant analysé cette stratification sont celles sur la population Iranienne et Chinoise, mais aucune d'elles ne décrit de résultat significatif (**Hasanzad et al., 2012, Wang et al., 2012**).

La corrélation du polymorphisme I/D du gène ECA au caractère métastatique a rapporté des résultats intéressants. Nos résultats montrent que chez les patients présentant des génotypes DD et ID, le caractère métastatique est plus fréquemment retrouvé (67.7% et 76.1% respectivement) avec une association significative ($p < 0.05$). Le génotype II, ne montre pas d'association au caractère métastatique (50% chez les M1 et les M0).

Nos résultats sont en accord avec ceux retrouvés par Yigit et al., 2007 sur la population Turque, mettant en avant que le caractère métastatique est plus fréquent chez les patients présentant des génotypes DD et ID que le génotype II. Contrairement à nos résultats, ils rapportent que le génotype DD est le plus associé aux métastases suivi par le génotype ID. Le génotype II est quant à lui associé à 0% de métastases (**Yigit et al., 2007**).

Discussion

Nos résultats vont de le même sens que ceux de Wang et al., sur la population Chinoise qui décrivent une association significative du génotype DD avec le cancer agressif (métastatique) (OR = 2.214 95%CI (1.169, 4.194), $p = 0.014$) (Wang *et al.*, 2012).

L'association de ce polymorphisme au caractère métastatique a également été rapportée dans le cancer gastrique (Rocken *et al.*, 2005) et le cancer du sein (Haiman *et al.*, 2003).

Le génotype DD est associé à des niveaux élevés d'ECA circulants, conduirait à l'angiogenèse selon nombreuses études (Chung *et al.*, 2003 Medeiros *et al.*, 2004), et cette angiogenèse pourrait avoir des effets préjudiciables en favorisant les métastases dans le CaP.

Nos résultats montrent que les génotypes DD et ID sont significativement plus associés aux stades les plus évolués du cancer de la prostate (Stade IV) ; le génotype II, quant à lui ne montre aucune association ($p > 0.05$). Il est retrouvé à des fréquences équivalentes (50%) aussi bien dans le stade IV que dans les stades moins évolutifs du CaP.

Peut d'études se sont intéressées au stade tumoral. Seul l'étude de Yigit qui met en évidence l'association du génotype II aux stades les moins évolutifs T1 et T2 (Yigit *et al.*, 2007).

Ainsi, le polymorphisme I/D pourrait influencer le CaP par la capacité de l'allèle D à augmenter la transcription du gène de l'ACE comparativement à l'allèle I, conduisant à de plus grande concentrations de l'Ang II (Suehiro *et al.*, 2004). L'Ang II, en se liant à ses récepteurs, fortement exprimés au niveau du tissu prostatique (Dolley-Hitze *et al.*, 2013), influencerait la progression tumorale, a travers la transactivation des récepteurs VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) et EGFR (epidermal growth factor receptor), favorisant ainsi la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, la migration et l'invasion cellulaire (Fujiyama *et al.*, 2001; Uemura *et al.*, 2003)

Ces constatations nous poussent à aller vers recherches thérapeutiques, et tester les bloqueurs du système RAS, notamment l'angiotensine II et l'enzyme ECA, chez les patients mutés. L'utilisation des Inhibiteurs de l'ECA (IEC) a montré des propriétés anti-tumorales et sont considérés comme étant de nouvelles thérapies antinéoplasiques (Lever *et al.*, 1998 ; Abali *et al.*, 2002). De même, les inhibiteurs du RAS ont provoqué des réductions de la croissance et de l'angiogenèse dans les lignées cellulaires tumorales (Uemura *et al.*, 2003, Fujita *et al.*, 2005). Aussi, cette classe médicamenteuse est un traitement largement utilisé et connu dans la prise en charge de l'hypertension artérielle. Ainsi, il serait facile de les utiliser pour les patients mutés dans le gène ECA en association avec la thérapie déjà existante.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Le CaP représente un réel problème de santé publique, car touchant de plus en plus de personnes dans notre pays. Le CaP est un cancer insidieux évoluant le plus souvent de manière très lente. Il pose un sérieux problème aux cliniciens, car amenant le patient à se faire diagnostiquer à des stades avancés de la maladie. D'un autre côté, le CaP est considéré comme un cancer très hétérogène avec une forte variabilité de la progression entre les patients, pour qui il est difficile de prédire l'évolution.

Le diagnostic du CaP se base essentiellement sur un examen pathologique (score de Gleason et classification TNM). Cependant, l'examen invasif ne convient pas pour détecter le stade précoce de ce cancer et encore moins son évolution. Par conséquent, il serait intéressant d'introduire une analyse génétique, peu invasive, qui viendrait soutenir l'arsenal déjà existant.

Du fait que notre étude soit une continuité d'un travail entamé en 2018, nos résultats nous ont permis de confirmer ceux précédemment obtenus, par modification du protocole expérimental en utilisant du DMSO à 5%.

Nos résultats montrent la présence du polymorphisme I/D dans la population Algérienne, à travers l'existence des trois génotypes possibles (DD, ID et II).

Nos résultats mettent en évidence des différences dans la répartition des fréquences de la forme délétion du polymorphisme I/D du gène ECA, entre patients CaP et témoins. Cette délétion est significativement associée, dans notre étude, aux formes évoluées (stade IV) et agressives du CaP, présentant des scores de Gleason supérieurs à 7 et un caractère métastatique.

Au vues de nos résultats et dans le but d'approfondir la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliquant des facteurs génétiques, il serait intéressant :

- d'élargir l'échantillonnage à travers un recrutement multicentrique, plus représentatif de la population Algérienne, permettant une interprétation plus juste et précise.
- d'améliorer le protocole expérimental par l'utilisation d'amorces spécifiques au polymorphisme d'insertion.
- d'analyser d'autres polymorphismes de ce gène mais aussi des polymorphismes d'autres gènes et de les corrélés à plus de caractéristiques cliniques du CaP.
- d'utiliser des modèles murins et/ou cellulaires pour saisir l'impact de la mutation et son action
- de tester les inhibiteurs de l'enzyme ECA comme un traitement, chez les patients muté dans le gène ECA.

BIBLIOGRAPHIE

Références Bibliographiques

A

Abali, Hüseyin et coll. "Anciens antihypertenseurs comme nouveaux antinéoplasiques: inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I et antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II de type 1." *Hypothèses médicales* 59.3 (2002): 344-348.

Abate-Shen, C and M.M Shen 'Molecular genetics of prostate cancer. "GenesDev14 (19),2410-2434, (2000)

Abrahamsson, P. A. Neuroendocrine differentiation and hormone-refractory prostate cancer. *Prostate Supp*16., 3-8, (1996)

Amankwah, K., Klerkx, L., Oosting, S. J., Sakyi-Dawson, O., Van der Zijpp, A. J., & Millar, D. Diagnosing constraints to market participation of small ruminant producers in northern Ghana: An innovation systems analysis. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 60, 37-47,(2012).

Amundadottir LT, Patrick Sulem, Julius Gudmundsson, Agnar Helgason, Adam Baker, Bjarni A Agnarsson. A common variant associated with prostate cancer inEuropean and African populations. *Journal Nature genetics*,.vol.38, 652-658, (2006)

Anandanadesan R, Gong Q, Chipitsyna G, Witkiewicz A, Yeo CJ, Arafat HA. Angiotensin II induces vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells through an angiotensin II type I receptor and ERK1/2 signaling. *J Gastrointest Surg*; 12:57-66. (2008)

Arnauld VILLERS, Xavier RÉBILLARD, Michel SOULIÉ, Jean-Louis DAVIN, Patrick COLOBY, Jean-Luc MOREAU, Arnaud MEJEAN, Jacques IRANI, Christian COULANGE, Philippe MANGIN, Dépistage du cancer de la prostate, Recommandations de l'Association Française d'Urologie (AFU)., 13 209-214, (2003)

Arnold SA, Rivera LB, Carbon JG, Toombs JE, Chang CL, Bradshaw AD, et al. Losartan slows pancreatic tumor progression and extends survival of SPARC-null mice by abrogating aberrant TGFbeta activation. *PLoS One*.;7:31384.(2012)

Arrieta O, Pineda-Olvera B, Guevara-Salazar P, Hernandez-Pedro N, Morales-Espinosa D, Ceron-Lizarraga TL, et al. Expression of AT1 and AT2 angiotensin receptors in astrocytomas is associated with poor prognosis. *Br J Cancer*.;99:160-6.(2008)

B

Ballestar, E., & Esteller, M. Methyl-CpG-binding proteins in cancer: blaming the DNA methylation messenger. *Biochemistry and cell biology*, 83(3), 374-384,(2005)

Références Bibliographiques

- Barry KH, Koutros S, Andreotti G, Sandler DP, Burdette LA, et coll, Genetic variation in nucleotide excision repair pathways genes, pesticide exposure and prostate cancer risk. *Environ Health Perspect*, 119; 1726-1732, (2011)
- Becker BN, Kondo S, Chen JK, Harris RC. Tyrosine kinase inhibition affects type 1 angiotensin II receptor internalization. *J Recept Signal Transduct Res.*;19:975-93,(1999)
- Belotti, Paola Paganoni, Luigi Manenti, Angela Garofalo, Sergio Marchini, Giulia Taraboletti, and Raffaella Giavazzi. Matrix Metalloproteinases (MMP9 and MMP2) Induce the Release of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by Ovarian Carcinoma Cells: Implications for Ascites Formation. *CANCER RESEARCH* 63, 5224 –5229, (2003)
- Benabdelkrim, M., Djeflal, O., & Berredjem, H. GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and susceptibility to prostate cancer: a case-control study of the Algerian population. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 19(10), 2853,(2018)
- Benenemissi, I. H., Sifi, K., Sahli, L. K., Semmam, O., Abadi, N., & Satta, D. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphisms and the risk of glioma in an Algerian population. *The Pan African Medical Journal*, 32,(2019)
- Borre, M., Offersen, B. V., Nerstrøm, B., & Overgaard, J. Microvessel density predicts survival in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. *British journal of cancer*, 78(7), 940-944,(1998)
- Bose SK, Gibson W, Giri S, Nath N, Donald CD. Angiotensin II up-regulates PAX2 oncogene expression and activity in prostate cancer via the angiotensin II type I receptor. *Prostate.*;69:1334-42.(2009)
- Boyd, D., & Crawford, K. Critical questions for big data: Provocations for a cultural, technological, and scholarly phenomenon. *Information, communication & society*, 15(5), 662-679,(2012)
- Brennan P, Gene-environment interaction and aetiology of cancer: what does it mean and how can we measure it? *Carcinogenesis*, 23 : 381-387, (2002)

C

- Cancel-Tassin G, Latil A, Valéri A, Mangin P, Fournier G, Berthon P and Olivier Cussenot., PCAP is the major known prostate cancer predisposing locus in families from south and west Europe. *Eur J Hum Genet*, 9: 135-142, (2001)
- Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev.* 2003 Jun;24(3):261-71. doi: 10.1210/er. PMID: 12788798, (2003)
- Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438, 932-936, (2005)
- Chakrabarti, R. et CE Schutt.. L'amélioration de l'amplification PCR par des sulfones de bas poids moléculaire. *Gène*.274: 293-298,(2001)

Références Bibliographiques

- Chakrabarti, S., & Fombonne, E. Pervasive developmental disorders in preschool children. *Jama*, 285(24), 3093-3099, (2001)
- Chung LWK and Zhau HE/ Stromal-epithelial interaction. In : *Prostate Cancer: Biology, Genetic and the New Therapeutics* (2003)
- Cleutjens, K. B., van Eekelen, C.C., van der Korput, H.A., Brinkmann, A.O., and Trapman, J. Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter, (1996)
- Cunningham, J. K., & LIU, L. M. Guidelines for measuring impacts of methamphetamine precursor chemical regulations: a reply to Reuter and Caulkins (2003). *Addiction*, 98(10), 1463-1464, (2003)
- Cussenot O, Cancel-Tassin G. Facteurs de risque génétique pour le cancer de la prostate. *Med Sci (Paris)*; 20, 562-568, (2004)

D

- D'Amico, A. V., Schultz, D., Silver, B., Henry, L., Hurwitz, M., Kaplan, I., Beard, C.J., and Renshaw, A.A. The clinical utility of the percent of positive prostate biopsies in predicting biochemical outcome following external-beam radiation therapy for patients with clinically localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49, 679-684, (2001)
- Debré B. Office parlementaire d'évaluation des politiques de santé. Rapport sur le dépistage et le traitement du cancer de la prostate. 318 Sénat. 152 Assemblée nationale. (2009).
- Delattre, A., Vanthieghem, N., Abu al-Asaad, A., Carlig, N., & De Haro Sanchez, M. Un fragment du livre III des Helléniques de Xénophon conservé au Caire. *Mélanges*, 6, (2020)
- Deshayes F, Nahmias C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrinol Metab*; 16:293-9, (2005)
- Deshayes F, Nahmias C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrinol Metab*; 16:293-9, (2005)
- Diall, E., Vitouley, H. S., Mungube, E. O., Allegye-Cudjoe, O., Bocoum, Z., Diarra, B., ... & Sidibe, I. Improved PCR-RFLP for the detection of diminazene resistance in *Trypanosoma congolense* under field conditions using filter papers for sample storage. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(7), e1223, (2011)
- Dolley-Hitze T, Jouan F, Martin B, Mottier S, Edeline J, Moranne O, et al. Angiotensin-2 receptors (AT1-R and AT2-R), new prognostic factors for renal clear-cell carcinoma? *Br J Cancer*; 103:1698-705, (2010)
- Dolley-Hitze T, Verhoest G, Jouan F, Le Pogamp P, Arlot-Bonnemains Y, Oger E, et al. Récepteurs de type 1 à l'angiotensine-2 (AT1R) et cancers. *Nephrol Ther*; 9:85-91, (2013)

Références Bibliographiques

Du N, Feng J, Hu LJ, Sun X, Sun HB, Zhao Y, et al. Angiotensin II receptor type 1 blockers suppress the cell proliferation effects of angiotensin II in breast cancer cells by inhibiting AT1R signaling. *Oncol Rep.*;27:1893-903,(2012)

Du N, Feng J, Hu LJ, Sun X, Sun HB, Zhao Y, et al. Angiotensin II receptor type 1 blockers suppress the cell proliferation effects of angiotensin II in breast cancer cells by inhibiting AT1R signaling. *Oncol Rep.*;27:1893-903, (2012)

Dzau, V. J., Bernstein, K., Celermajer, D., et al. The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. *American Journal of Cardiology*, 88(9), 1-20,(2001)

E

Eeles, R. A., Kote-Jarai, Z., Giles, G. G., Al Olama, A. A., Guy, M., Jugurnauth, S. K., ... & Field, H. I. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nature genetics*, 40(3), 316, (2008)

F

Fangman, W. L. Separation of very large DNA molecules by gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 5(3), 653-665, (1978)

Feldman, B. J., & Feldman, D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(1), 34-45, (2001)

Fujiyama S, Matsubara H, Nozawa Y, Maruyama K, Mori Y, Tsutsumi Y, et al. Angiotensin AT(1) and AT(2) receptors differentially regulate angiotensin-2 and vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis by modulating heparin binding-epidermal growth factor (EGF)-mediated EGF receptor transactivation. *Circ Res*;88:22-9,(2001)

G

Gainger, D.J et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 93-97.8, (1999)

Gleason, D.F. Histologic grading of prostate cancer. A perspective. *Hum. Pathol.* 23,273-279, (1974)

Gong Q, Davis M, Chipitsyna G, Yeo CJ, Arafat HA. Blocking angiotensin II Type 1 receptor triggers apoptotic cell death in human pancreatic cancer cells. *Pancreas.*;39:581-94, (2010)

Références Bibliographiques

Grönberg, H. Prostate cancer epidemiology. *The Lancet*, 361(9360), 859-864, (2003)

Gudmundsson, A., & Andrew, R. E. Mechanical interaction between active volcanoes in Iceland. *Geophysical Research Letters*, 34(10), (2007)

H

Haiman CA, Henderson SO, Bretsky P, Kolonel LN, Hendrson BE : La variation génétique dans l'angiotensine I enzyme de conversion (IEC) et le risque de cancer du sien : la cohorte multi-ethnique. *Cancer Res*, 63 : 6984-6987.(2003)

Hasanzad LA, Yuan JM, Sun CL, van den Berg D, Seow A, Lee HP, YuMC:L'enzyme de conversion I-(ACE) polymorphisme du gene et le risque de cancer du la prostate chez les hommes chinoises à Singapour. *Cancer Res*,63 : 573-578,(2012)

Hii SI, Nicol DL, Gotley DC, Thompson LC, Green MK, Jonsson JR. Captopril inhibits tumour growth in a xenograft model of human renal cell carcinoma. *Br J Cancer.*;77:880-3,(1998)

Hittinger L., Corvol P. et al. Hormones, coeur et vaisseaux. Paris, Inserm, 448 p, (1997)

Huang W, Wu YL, Zhong J, Jiang FX, Tian XL, Yu LF. Angiotensin II type 1 receptor antagonist suppress angiogenesis and growth of gastric cancer xenografts. *Dig Dis Sci.*;53:1206-10, (2008)

J

Jain, S., Kamimoto, L., Bramley, A. M., Schmitz, A. M., Benoit, S. R., Louie, J., ...&Jasuja, S. Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April–June 2009. *New England journal of medicine*, 361(20), 1935-1944, (2009)

K

Kambhampati, S. et al. Growth factor involved in prostate cancrinogenesis. *Front. Biosci.*, 10,1355-136, (2005)

Keizman, D., Huang, P., Eisenberger, M. A., Pili, R., Kim, J. J., Antonarakis, E. S., ... & Carducci, M. A. Angiotensin system inhibitors and outcome of sunitinib treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma: a retrospective examination. *European journal of cancer*, 1955-1961,47(13), (2011)

Kesarwani, P. et al. Polymorphisms in tumor necrosis factor-A gene and prostate cancer risk in North Indian cohort. *J. Urol.*, 182,2938-2943, (2009)

Kinoshita J, Fushida S, Harada S, Yagi Y, Fujita H, Kinami S, et al. Local angiotensin II-generation in human gastric cancer: correlation with tumor progression through the activation of ERK1/2, NF-kappaB and survivin. *Int J Oncol.*34:1573-82, (2009)

Références Bibliographiques

- Kosaka, T &Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J. O., ..MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *science*, 316(5827), 1039-1043,(2007)
- Kosaka, T., Oya, M., Mikami, S., Nishimoto, K., Nakagawa, K., Li, D., ...&Ogishima, T. Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(5), 2296-230, (2010).
- Kosugi M, Miyajima A, Kikuchi E, Horiguchi Y, Murai M. Angiotensin II type 1 receptor antagonist candesartan as an angiogenic inhibitor in a xenograft model of bladder cancer. *Clin Cancer Res.*;12:2888-93, (2006)
- Kosugi M, Miyajima A, Kikuchi E, Kosaka T, Horiguchi Y, Murai M, et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonist enhances cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity in mouse xenograft model of bladder cancer. *Urology.*;73:655-60, (2009)
- Kosugi, M., Miyajima, A., Kikuchi, E., Kosaka, T., Horiguchi, Y., &Murai, M. Effect of angiotensin II type 1 receptor antagonist on tumor growth and angiogenesis in a xenograft model of human bladder cancer. *HumanCell*, 20(1), 1-9, (2007)
- Koyama RG, Castro RM, De Mello MT, Tu fi k S, Pedrazzoli M (2008) Détection simple de grands InDeLS par DHPLC: le gène ACE comme modèle. *J BiomedBiotechnol*: 562183,(2008)

L

- Lafolie F ; Chetboul V. Etude de la tolérance de l'administration concomitante du ramipril, de la propentofylline et du furosemide chez des chiens insuffisants cardiaques de stades ii et iii de la classification nyha, école nationale vétérinaire d'Alfort thèse, 27, (2004)
- Lamont, M., & Bail, C. A. Sur les frontières de la reconnaissance. Les catégories internes et externes de l'identité collective. *Revue européenne des migrations internationales*, 21(2), 61-90, (2005).
- Langsenlehner, T. et al. Single nucleotide polymorphisms and haplotypes in the gene for vascular endothelial growth factor and risk of prostate cancer, (2008)
- Laraqui, A. Etude des Facteurs Métaboliques et Polymorphismes Génétiques Prédisposant à la Survenue de l'Athérosclérose Coronaire. Mohammed V-AGDAL, (2006)
- Lehrer, E. L. Religion as a determinant of economic and demographic behavior in the United States. *Population and development review*, 30(4), 707-726, (2004)
- Lever, A. F., Hole, D. J., Gillis, C. R., McCallum, I. R., McInnes, G. T., MacKinnon, P. L., ... & Robertson, J. W. Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer?. *The Lancet*, 352(9123), 179-184,(1998)
- Lindpaintner, K., Pfeffer, M. A., Kreutz, R., Stampfer, M. J., Grodstein, F., LaMotte, F., ...&Hennekens, C. H.A prospective evaluation of an angiotensin-converting–enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *New England Journal of Medicine*, 332(11), 706-712,(1995)

Références Bibliographiques

Lonergan, K. M., Kennett, J. Y., Gibb, E. A., Vucic, E. A., Enfield, K. S., Stewart, G. L., ... & Lam, W. L. Human cancer long non-coding RNA transcriptomes. *PloS one*, 6(10), e25915, (2011)

M

Maman, S., & Witz, I. P. A history of exploring cancer in context. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(3), 13-30, (2018)

McNeal, J. E., Redwine, E. A., Freiha, F. S., & Stamey, T. A. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma: correlation with histologic pattern and direction of spread. *The American journal of surgical pathology*, 12(12), 897-906, (1988)

Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Lobo F, Morais A, Oliveira J and Lops C: Linkage of Angiotensin I-Converting enzyme gene insertion/deletion polymorphisme to the progression of human prostate cancer. *J Pathol* 202:330-335, (2004)

Mittal, R., & Iaccarino, G. Immersed boundary methods. *Annu. Rev. Fluid Mech.*, 37, 239-261, (2005)

Miyajima A, Kosaka T, Asano T, Seta K, Kawai T, Hayakawa M. Angiotensin II type I antagonist prevents pulmonary metastasis of murine renal cancer by inhibiting tumor angiogenesis. *Cancer Res.*;62:4176-9, (2002)

Mucci, L. A., Hjelmborg, J. B., Harris, J. R., Czene, K., Havelick, D. J., Scheike, T., ... & McIntosh, C. Familial risk and heritability of cancer among twins in Nordic countries. *Jama*, 315(1), 68-76, (2016)

Murphy, R. A., & Rembold, C. M. The latch-bridge hypothesis of smooth muscle contraction. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 83(10), 857-864, (2005)

Murphy-Lejeune, E., & Castellotti, V. L'étudiant européen voyageur, un novel "étranger". *Didier*, (2005)

N

Neo JH, Ager EI, Angus PW, Zhu J, Herath CB, Christophi C. Changes in the renin angiotensin system during the development of colorectal cancer liver metastases. *BMC Cancer.*;10:134, (2010)

Novillo, A., Romero-Lorca, A., Gaibar, M., Rubio, M., & Fernández-Santander, A. Tamoxifen metabolism in breast cancer treatment: Taking the focus off the CYP2D6 gene, (2016)

Références Bibliographiques

O

Odawara, M., Matsunuma, A., & Yamashita, K. Mistyping frequency of the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and an improved method for its avoidance. *Human genetics*, 100(2), 163-166,(1997)

Odawara, M., Tamaoka, A., Mizusawa, H., & Yamashita, K.. A case of cluster headache associated with mitochondrial DNA deletions. *Muscle & nerve*, 20(3), 394-395,(1997)

Ohashi H, Takagi H, Oh H, Suzuma K, Suzuma I, Miyamoto N, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt regulates angiotensin II-induced inhibition of apoptosis in microvascular endothelial cells by governing survivin expression and suppression of caspase-3 activity. *Circ Res.*;94:785-93, (2004)

P

Pernar, Claire H., et al. "A prospective study of the association between physical activity and risk of prostate cancer defined by clinical features and TMPRSS2: ERG." *European urology* 76.1 33-40,(2019):

Ploussard, G., Epstein, J. I., Montironi, R., Carroll, P. R., Wirth, M., Grimm, M. O., ...& Van Der Kwast, T. H. The contemporary concept of significant versus insignificant prostate cancer. *European urology*, 60(2), 291-303,(2011)

Purwaningroom Dian Laila, Mohammad Saifurrohman, Nashi Widodo, Jayarani Fatimah Putri, Mifetika Lukitasari Alteration of splicing pattern on angiotensin-converting enzyme gene due to the insertion of Alu elements *Int J Comput Biol*, 4 (2), (2015)

R

Ravery, V., Dominique, S., Panhard, X., Toubanc, M., Boccon-Gibod, L., & Boccon-Gibod, L. The 20-core prostate biopsy protocol—a new gold standard?. *The Journal of urology*, 179(2), 504-507, (2008)

Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F., An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest.*, 86: 1343-1346, (1990)

Rocken C, Rohl FW, Diebler E, Lendeckel U, Pross M, Carl-McGrath S, et al. The angiotensin II/angiotensin II receptor system correlates with nodal spread in intestinal type gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*;16:1206-12, (2007)

Röcken, C., Lendeckel, U., Dierkes, J., Westphal, S., Carl-McGrath, S., Peters, B., ...& Ebert, M. P. The number of lymph node metastases in gastric cancer correlates with the angiotensin

Références Bibliographiques

I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism. *Clinical cancer research*, 11(7), 2526-2530,(2005)

Rodriguez, P. C., Ernstoff, M. S., Hernandez, C., Atkins, M., Zabaleta, J., Sierra, R., & Ochoa, A. C. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer research*, 69(4), 1553-1560,(2009)

Ruiter R, Visser LE, Van Duijn CM, Stricker BH. Le polymorphisme d'insertion / suppression de l'ECA et le risque de cancer, une revue et une méta-analyse de la littérature. *Cibles de médicaments contre le cancer Curr.* 11 (4): 421-30, (2011)

Ruiter, R. et al. The ACE insertion/deletion polymorphism and risk of cancer, a review and meta-analysis of the literature. *Curr.Cancer DrugTargets*, 11, 421-430, (2011).

S

Salm, S.N., Burger, P.E., Coetzee, S., Goto, K, Moscatelli, D., and Wilson, E maintains. L. TGF-“beta” maintains dormancy of prostatic stem cells in the proximal region of ducts. *J cell Biol*170,81-90, (2005)

Salomon L, Azria D, Bastide C, Beuzeboc P, Cormier L, Cornu F, et al. Comité de Cancérologie de l'AFU. Recommandations en onco- urologie : cancer de la prostate. *Prog Urol* 2010;20:S217-51, (2010)

Saracevic, A., Simundic, A. M., Celap, I., &Luzanic, V. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism genotyping error: the cause and a possible solution to the problem. *Molecular biology reports*, 40(7), 4459-4463,(2013)

Sayed-Tabatabaei F.a., B.a.Oostra, a. Isaacs, C.M.VanDuijn, and J.C.M Witteman, “ACE polymorphism”, *Circ.Res.*, vol.98,pp. 1123-1133, (2006)

Sayed-Tabatabaei, F. A., Oostra, B. A., Isaacs, A., Van Duijn, C. M., &Witteman, J. C. M. ACE polymorphisms. *Circulation research*, 98(9), 1123-1133,(2006)

Schuur, J. H., Selzer, P., &Gasteiger, J. The coding of the three-dimensional structure of molecules by molecular transforms and its application to structure-spectra correlations and studies of biological activity. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 36(2), 334-344, (1996)

Schweigert, D., Cicenias, S., Bruzas, S., Samalavicius, N. E., Gudleviciene, Z., &Didziapetriene, J. The value of MMP-9 for breast and non-small cell lung cancer patients' survival.*Advances in medical sciences*, 58(1), 73-82, (2013)

Shanmugam, V., Sell, K. W., &Saha, B. K. Mistyping ACE heterozygotes. *Genome Research*, 3(2), 120-121,(1993)

Sharma, P., Carter, N. D., &Barly, J. Polymorphisms in the gene encoding angiotensin I-converting enzyme and relation-ship to its post-tranlation product in general infarction. *J Hum Hypertension*, 8(8), 633-634,(1994)

Références Bibliographiques

Sharma, P., Carter, N. D., & Barly, J. Polymorphisms in the gene encoding angiotensin I-converting enzyme and relation-ship to its post-tranlation product in general infarction. *J Hum Hypertension*, 8(8), 633-634,(1994)

Simon, LS, LM Grierson, Z. Naseer, AA Bookman et J. ZevShainhouse. Efficacité et sécurité du diclofénac topique contenant dudiméthylsulfoxyde (DMSO) par rapport à celles du placebo topique, du véhiculeDMSO et du diclofénac oral pour l'arthrose du genou. *Douleur* 143: 238-245,(2009)

Simpson, E. R. & Carani, C., Qin, K., Simoni, M., Faustini-Fustini, M., Serpente, S., Boyd, J.,...Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *New England Journal of Medicine*, 337(2), 91-95, (1997)

Song, S., Uddin, M. A., Lee, T. H., Xu, S., Park, S. Y., Kim, T.,& Woo, H. Y. Interplay of intramolecular noncovalent coulomb interactions for semicrystalline photovoltaic polymers. *Chemistry of Materials*, 27(17), 5997-6007, (2015)

Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., Hubert, C., Allegrini, J., John, M., Tregear, G., & Corvol, P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(24), 9386-9390,(1988)

Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., Hubert, C., Allegrini, J., John, M., Tregear, G., & Corvol, P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(24), 9386-9390,(1988)

Suehiro T, Morita T, Inoue M, Kumon Y, et al. Increased amount of the angiotensin-converting enzyme (ACE) mRNA origination from the ACE allele with deletion. *Hum Genet* 115 :91-96,(2004)

T

Tomic, T., Botton, T., Cerezo, M., Robert, G., Luciano, F., Puissant, A., ...& Tartare-Deckert, S. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell death & disease*, 2(9), e199-e199, (2011).

U

Ueda, Y., Hirai, S. I., Osada, S. I., Suzuki, A., Mizuno, K., & Ohno, S. Protein kinase C δ activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *Journal of Biological Chemistry*, 271(38), 23512-23519,(1996)

Uemura H, Hasumi H, Kawahara T, Sugiura S, Miyoshi Y, Nakaigawa N, et al. Pilot study of angiotensin II receptor blocker in advanced hormone-refractory prostate cancer. *Int J Clin Oncol.*;10:405-10,(2005)

Références Bibliographiques

Uemura H, Ishiguro H, Nakaigawa N, Nagashima Y, Miyoshi Y, Fujinami K, et al. Angiotensin II receptor blocker shows antiproliferative activity in prostate cancer cells: a possibility of tyrosine kinase inhibitor of growth factor. *Mol Cancer Ther.*;2:1139-47, (2003)

V

Valeri, A. M., Hines, W. H., Markowitz, G. S., Radhakrishnan, J. A. I., Kambham, N., & D'AGATI, V. D. Lithium nephrotoxicity: a progressive combined glomerular and tubulointerstitial nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11(8), 1439-1448, (2000)

VanCleave, T.T. et al. Interaction among variant vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor in relation to prostate cancer risk. *Prostate*, 70,341-352, (2010)

Vasseur, E., & Quintana-Murci, L. The impact of natural selection on health and disease: uses of the population genetics approach in humans. *Evolutionary applications*, 6(4), 596-607, (2013)

W

Wadhera, P. An introduction to acinar pressures in BPH and prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 10(6), 358, (2013).

Wang L, Cai SR, Zhang CH, He YL, Zhan WH, Wu H, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers on lymphangiogenesis of gastric cancer in a nude mouse model. *Chin Med J (Engl.)*;121:2167-71, (2008)

Wang ZY, Li HY, Jiang ZP, Zhou TB. Relationship between angiotensin-converting enzyme insertion/ deletion gene polymorphisms and prostate cancer susceptibility. *J Can Res Ther*; 14, Suppl S2:375-80 (2018)

Wang, X., Spandidos, A., Wang, H., & Seed, B. PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update. *Nucleic acids research*, 40(D1), D1144-D1149, (2012)

Wang, Z. L. Toward self-powered sensor networks. *Nano Today*, 5(6), 512-514, (2010)

Wasa J, Sugiura H, Kozawa E, Kohyama K, Yamada K, Taguchi O. The tumor suppressive effect of angiotensin II type 1 receptor antagonist in a murine osteosarcoma model. *Anticancer Res.*;31:123-7, (2011)

Willis, L.M. et al. Angiotensin receptor blockers and angiogenesis clinical and experimental evidence. *ClinSci (Lond)*, 120, 307-319, (2011)

Références Bibliographiques

Wu, Y. et al. TNF-alpha/NF-KappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br. J. Cancer*, 102,639-644.-7878. Balkwill, F. (2009) Tumour necrosis factor and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 9,361-37, (2010)

X

Xu J. combined analysis of hereditary prostate cancer linkage to 1q24-25: results from 772 hereditary prostate cancer families from the international consortium for prostate Genetics. *Am J Hum Genet*, 66 :945-957, (2000).

Xu Z, Meng LL, Lin J, Ling Y, Chen SX, Lin N. Association between the polymorphisms of urokinase plasminogen activation system and cancer risk: a meta-analysis. *Onco Targets Ther*, 8:2493-2502, (2015)

Y

Yigit B, Bozkurt N, Narter F, Yilmaz H, Yucabas E and Isbir T: Genetic polymorphism of angiotensin I-converting enzyme (ACE) and prostate cancer risk. *Adv Mol Med* 2: 65-68, (2007)

Yokota, M. et al. Association of a T29->C polymorphism of the transforming growth factor-beta 1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Circulation*, 101, 2783-2787., 668, (2000)

Z

Zhou Y, Chen X, Cai L, Yang Y, Sui G, Fu S. Angiotensin II/angiotensin II type I receptor (AT1R) signaling promotes MCF-7 breast cancer cells survival via PI3-Kinase/Akt pathway. *J Cell Physiol.*; 225:168-73, (2010)

Zhou, H., & Zhu, X. Association between matrix-metalloproteinase polymorphisms and prostate cancer risk: a meta-analysis and systematic review. *Cancer management and research*, 10, 5247. (2018).

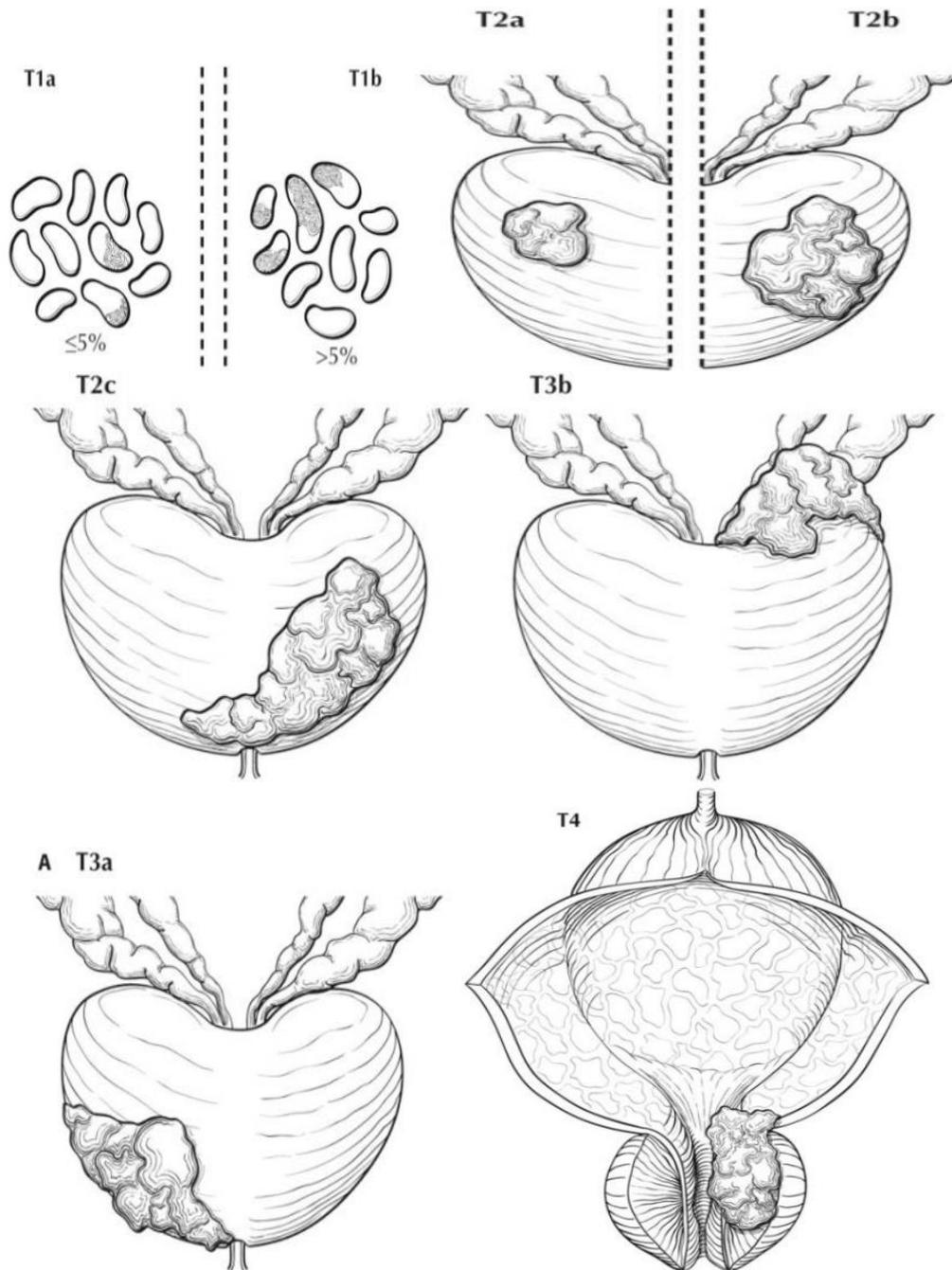
Zhu, B. et al. Transforming growth factor beta and prostate cancer. *Cancer Treat. Res.*, 126, 157-173. Zhao C, Yan W, Zu X, Chen M, Liu L, Zhao S, et al Association between endothelial nitric oxide synthase 894G>T polymorphism and prostate cancer risk: a meta-analysis of literature studies. *Tumour Biol* 2014;35:11727-33, (2005)

ANNEXES

Annexe

Annexe.1

Classification anatomopathologique (pTNM) :



Annexe

Annexe.02

Matériel, produits et appareils nécessaires à la réalisation des expériences

Matériels nécessaires	Produits	Appareils
- Les gants	- EDTA	- Centrifugeuses
- Tube de 15 ml et 50 ml	- Tris	- Bain Marie
- Falcon	- NaOH	- Appareil à glace
- Eppendorfs	- HCl	- pH Mètre
- Embouts bleu et jaunes	- SDS	- Balance
- Pipettes pasteur	- NaCl	- Thermocycleur
- Bêchers	- Protéinase K (20mg/ml)	- Electrophorèse verticale
- Éprouvettes	- Alcool 100%	- Electrophorèse Horizontale
- Portoirs	- TEMED	
- Micropipettes	- BET	
	- Phénol/chloroforme	
	- NTE (0.5%)	
	- TBE (0.5X-1X)	
	- DMSO (5%)	
	- Gel d'agarose	

Annexe

Annexe.03

Préparation des solutions

- **Solution de lyse des Hématies :**

Tris 30.28g

EDTA 23.26g

- **Solution de lyse des leucocytes :**

Nacl 30.28g

Tris 30.28g

EDTA 23.26g

SDS.....0.5%

Protéine K200µg /ml

- **Préparation du tampon TBE 1X :**

Tris 10,78 g

Acide borique 5,50 g

EDTA 0,58 g

- **Préparation de gel d'agarose 1% :**

Agarose 0.4g

TBE 40ml

} Chauffer à 150°C

يعتبر سرطان الغدة التناسلية الرجالية من أخطر السرطانات و أشدها خبثا, فهو يحتل المرتبة الثانية من حيث نسبة الوفيات في الجزائر و عالميا. خصائصه المرضية تعتبر أكثر وضوحا مقارنة بعدوانيته و كيفية تطوره. يرتبط تطور الورم ارتباط وثيق بعملية تكون الأوعية الدموية فهو يتأثر بالأساس الجيني بحيث ان هذا المرض له عدة اختلافات بين المصابين لهذا السبب ركزنا في دراستنا على المكونات الوراثية و الجنية حيث قمنا بتجارب على 131 شخص 60 منهم حامل للمرض و 71 شخص سليم و قد لجنا لاستعمال تقنية سلسلة تفاعلات البوليميراز PCR لفحص الارتباط بين سرطان الغدة التناسلية و النمط I/D للجين ECA و ارتباطه المحتمل بالخصائص السريرية للمرض و بما ان هذه الدراسة هي تكملة للعمل الذي بدأ عام 2018 فقد سعينا أولًا للتأكيد النتائج السابقة من خلال تعديل البروتوكول التجريبي (استخدام 5% DMSO) تشير نتائجنا الى وجود ثلاثة انماط للجين ECA (DD, ID, II) بالنسبة للأشخاص المعنيين حيث ترتبط متغيرات DD و ID بالمراحل الأكثر تقدما للسرطان (المرحلة الرابعة) و درجة الغليسون اكبر من سبعة (Gleason >7) و كذلك انتشار السرطان من العضو الرئيسي الى الأعضاء الأخرى. و منه يمكن ان نعتبر التحليل الجيني للجين ECA عند المرضى تحليلا روتينيا طفيفا يساعد في التشخيص و يكون مؤشر جيد لتطور الورم.

المفتاح: سرطان الغدة التناسلية. الانزيم ACE . سلسلة تفاعلات البوليميراز (PCR) .

Résumé :

Le cancer de la prostate (CaP) est la malignité la plus courante chez les hommes. Il se classe en 2eme position en termes de mortalité par cancers dans le monde et en Algérie. Sa physiopathologie est bien caractérisée, contrairement à son agressivité et son évolution. La progression tumorale est fortement associée au processus angiogénique et semble être sous l'influence d'une base génétique sous-jacente. Dans notre étude cas/témoins (60 patients CaP vs 71 témoins) nous avons recherché par PCR à examiner l'association entre le CaP et le polymorphisme I/D du gène ECA et sa potentielle association aux caractéristiques cliniques de la maladie. Du fait que notre étude soit la continuité d'un travail entamé en 2018, nous avons recherché à confirmer les résultats précédents, par modification du protocole expérimental (utilisation du DMSO 5%). Nos résultats montrent la présence des trois variants du gène ECA (DD, ID et II) dans notre population. Les variants DD et ID sont significativement plus associés au stade le plus évolués du cancer (Stade IV), ainsi qu'au score de Gleason > 7 et au caractère métastatique. Le génotypage des patients pour le gène ACE pourrait devenir une analyse de routine, peu invasive, utilisée comme marqueur de prédiction de la progression tumorale.

Mots clés : Cancer de la prostate (CaP), Polymorphisme, PCR, gène ECA, DMSO.

Abstract:

Prostate cancer (CaP) is the leading cancer among men. Represents the second most common malignancy in terms of mortality in Algeria and the world. His pathophysiology is well characterized, contrary to his aggressiveness and evolution. Tumor angiogenesis is a crucial factor associated with tumor growth and progression with an underlying genetic basis. In our case/control study (60 CaP vs 71 controls), PCR was used to look for any possible association between CaP and I/D polymorphism of the ECA gene and its potential association with the clinical features of the disease. Since our study is a continuation of work begun in 2018, we sought to confirm the previous results, by modifying the experimental protocol (use of DMSO 5%). Our results show the presence of the three variants of the ECA gene (DD, ID and II) in the study population. DD and ID variants are significantly more associated with the most advanced stage of cancer (Stage IV), as well as Gleason score > 7 and metastatic character. Patient genotyping for the ACE gene could become a routine, less invasive and used as a predictor marker of tumor progression.

Keywords: Prostate cancer (CaP), Polymorphism, PCR, ECA gene, DMSO.