



**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
جامعة أبو بكر بلقايد - تلمسان  
**Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM**  
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et des Sciences de la Terre**  
et de l'Univers  
**Département de Biologie**



# Thèse

Présentée par  
**Mme SALMI Takwa**

En vue de l'obtention du  
**Diplôme : de Doctorat**

**Option : Biologie Moléculaire**

## Thème

**Identification des variants génétiques associés au cancer du sein en population Algérienne**

Soutenue le 09/07/2023, devant le jury :

Présidente : Mme Dennouni-Medjati Nouria.	Pr, Université de Tlemcen
Examineur : Mr Cherrak Ahmed Sabri.	MCA, Université de Tlemcen
Examinatrice : Mme TABET AOUL Nacera.	Pr, Université d'Oran 1
Examinatrice : Mme Mejdoub Amel.	MCA, université d'Oran 1
Directrice de thèse : Mme SAHI-DALI YUCEF Majda.	Pr Université de Tlemcen

*Année universitaire 2022/2023*

## Dédicaces

*Je tiens à dédier ce modeste travail :*

*A mes chers parents, A mon cher frère.*

*A mon cher mari et ma petite princesse.*

*A mes chers amies (s), mes tantes (oncles), cousines(s) ...*

*A toute la famille SALMI, OUZZANI , BEHA ET BOUCHENDOUKA*

*Aux personnes que j'aime...*

*A toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.*

## Remerciements

Je remercie ALLAH, de m'avoir donnée la force, le courage et la patience durant ces années d'études, pour la réalisation de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent....

A ma directrice de thèse, Madame **DALI-SAHI Majda**, professeur à l'université de Tlemcen, pour la confiance qu'elle m'a accordée au cours de la réalisation de ce travail de recherche. Je lui suis très reconnaissante pour sa disponibilité J'espère avoir été digne de la confiance que vous m'avez accordée et que ce travail soit à la hauteur de vos espérances.

A Madame **DENNOUNI-MEDJATI Nouria**, professeur à l'université de Tlemcen, qui d'abord m'a fait l'honneur d'accepter d'être la présidente du jury de soutenance, ensuite pour sa gentillesse, son aide, ses orientations.

Également, à Madame **TABET AOUL Nacera**, professeur à l'université d'Oran 1, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail et d'être membre du jury. Je suis très reconnaissante pour votre investissement dans l'évaluation de ce travail. Veuillez trouver ici, l'assurance de ma profonde considération.

A Monsieur **CHERRAK AHMED SABRI**, maître de conférences à l'université de Tlemcen que Je remercie vivement, d'avoir accepté de juger ce présent travail, afin de l'enrichir.

A Madame **Mejdoub Amel**, maître de conférences à l'université d'Oran 1, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail et d'être membre du jury, . Je suis très reconnaissante pour votre investissement dans l'évaluation de ce travail. Veuillez trouver ici, l'assurance de ma profonde considération.

A Monsieur **HAREK Yahia**, professeur à l'université de Tlemcen, directeur du laboratoire de Chimie Analytique et d'Electrochimie, de l'université de Tlemcen, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, et aidée pour la réalisation des travaux de recherche.

Une partie de ce travail a été réalisée en collaboration avec l'Unité Fonctionnelle de Toxicologie au CHU de Lille. Je remercie chaleureusement le professeur **Delphine ALLORGE**, le Docteur **Benjamin HENNART**, pour leur participation très efficace et appréciable. Je vous adresse mes sincères remerciements.

A monsieur **Drissi Amin**, Docteur à l'école « gène life science » de Sidi Bel Abbes, de m'avoir offert la chance de réaliser mon travail de génétique.

Au professeur **Salima FERCHICHI** et toute l'équipe de l'unité de recherche 'Biologie clinique et moléculaire : AZZA Dendana,, Aida Thabouti et Malak Derghouthi et principalement au Docteur **Bahia Wael** de la faculté de pharmacie de Monastir, université de Monastir, Tunis, pour leur contribution.

## Résumé

Cette étude nous a permis d'identifier un nouvel indicateur d'agressivité tumorale dans le cancer du sein (CS). C'est une recherche approfondie sur le statut du tryptophane (TRP) et son métabolisme.

Selon le type histologique de nos patientes atteintes du CS, notre population d'étude est subdivisée en deux sous populations : Les CS les plus fréquents (Carcinome Canalaire Infiltrant, Carcinome Lobulaire Infiltrant et mixte) et les CS de fréquence histologique rare (Carcinome in situ, Mucineux, le papillome, le phylloïde).

Dans notre étude le taux plasmatique du TRP qui participe à la survenue du CS est en association avec un âge inférieur à 58ans et une glycémie supérieure à 1.6 g/l. Nous avons rapporté aussi que le TRP est un facteur corrélé aux facteurs de risques de CS

L'activité enzymatique de l'IDO1 représente un facteur lié aux biomarqueurs et aux paramètres d'agressivité tumorale (RE, RP, KI67,T, N, grade SBR) ainsi qu'à l'inflammation et au diabète chez nos patientes atteintes du CS.

Dans ce travail nous avons réalisé une étude sur le polymorphisme génétique de l'IDO1 au cours du CS pour la première fois dans une population Algérienne, ainsi que son impact sur les biomarqueurs du CS.

Nous avons déterminé quatre SNP faux sens (R56P, R58T, V59I, R100P) pathogènes à haut risque sur la fonction de l'IDO1, qui touchent le domaine de relieur hémique ainsi que l'efficacité de la thérapie chez nos patientes.

Parmi les SNP ainsi déterminés chez nos patientes atteintes du CS, trois SNP qui sont connus (R56P, R58T, R100P) et une nouvelle mutation non décrite (V59I) de l'exon 2 de l'IDO1.

L'analyse de simulation de la dynamique moléculaire montre clairement que ces SNP faux sens identifiés, avaient un effet stabilisant significatif sur l'IDO1. Cela est confirmé par les données RMSF des acides aminés de l'IDO1 muté, qui sont inférieures par rapport à celles de l'IDO1 sauvage. Par conséquent l'IDO1 muté est plus compacte.

**Mots clés :** Cancer du sein ; Tryptophane, IDO1, Ouest Algérien, polymorphisme exonique, polymorphisme intronique, polymorphisme du site d'épissage, variabilités histologiques

## Abstract

In this study, a new indicator of tumor aggressiveness in breast cancer (BC) has been identified. This is a thorough research on the status of tryptophan (TRP) and its metabolism

According to the histological type of our patients with BC, our study population is divided into two subtypes Carcinoma histologically more frequent (Ductal invasive carcinoma, lobular invasive carcinoma and mixed) and rare histological frequency cancers (lobular carcinoma in situ, papilloma, colloid, phylloid)

In our study, the plasma level of TRP, which contributes to the occurrence of BC, is associated with an age below 58 years and a blood sugar level above 1.6 g/l. We have also noted that TRP is a factor correlated with BC risk factors.

The enzyme activity of IDO1 represent a significant correlation to tumor biomarkers and aggressiveness parameters (ER, PR, Ki-67, SBR grade, tumor size, lymph node invasion) as well as inflammation and diabetes in our BC patients.

In this work we carried out a study on the genetic polymorphism of IDO1 during Breast Cancer for the first time in an Algerian population, as well as its impact on BC biomarkers.

We identified four missense SNP (R56P, R58T, V59I, R100P) with high-risk pathogens on IDO1 function, which affect the heme binding domain.

Among the SNP identified in our patients with BC, three SNP are known (R56P, R58T, R100P) and a new mutation (V59I) in exon 2 of IDO1.

The simulation analysis of molecular dynamics shows a significant stabilizing effect of the identified SNP on IDO1. This is confirmed by the RMSF data of mutated IDO1 amino acids, which are lower than the wild IDO1.

**Keywords :** breast cancer , tryptophan, indoleamine 2,3-dioxygenase 1, West Algeria, exonic polymorphism, intronic polymorphism, Splicing site polymorphism, Histological variability

### الملخص

تناول هذا البحث دراسة حول سرطان الثدي في الجزائر و تعد هذه دراسة معمقه في المتابوليزم للتربتوفان (TRP) اعتمادا على النوع النسيجي لمرضى السلطان تنقسم عينة الدراسة إلى قسمين: سرطان الثدي لأكثر انتشارا و سرطان الثدي النادر

يرتبط حدوث مرض سرطان الثدي لمستوى التربتوفان الذي بدوره يرتبط بسن حدوث المرض و الاصابه بداء السكري. أجرينا في هذا العمل دراسة حول الطفرات التي تلحق بالجين إندوليامين 2,3-ديوكسيجيناز (IDO1) عند مرض سرطان الثدي و تعد أول دراسته عن الجين IDO1 مرض سرطان الثدي في الجزائر. تم التوصل لأربعة طفرات مؤثره في وظيفة عمل الجين IDO1 (R56P ، R58T ، V59I ، R100P) و من بين هذه الطفرات الاربعه المذكوره قد تم اكتشاف طفرة جديدة (V59I) لم ترد في الدراسات السابقه (المتواجده في القطعه الداله 2 للجين IDO1).

مخاطر عالية على وظيفة IDO1 ، والتي تؤثر على مجال رابط الهيم من بين SNPs التي تم تحديدها على هذا النحو في مرضانا الذين يعانون من CS ، ثلاثة SNPs معروفة (R56P ، R100P ، R58T) وطفرة جديدة غير موصوفة (V59I) من exon 2 من IDO1.

**الكلمات المفتاحية:** سرطان الثدي; التربتوفان ، إندوليامين 2,3-ديوكسيجيناز ، غرب الجزائر , الطفرات الوراثيه, القطع الداله, القطع غير الدال ، النوع النسيجي

## Production scientifique

### 1. Les articles publiés

**Salmi T.**, dali-sahi M., guermouche B., dennouni-medjati N., hennart B., lenski, M., & allorge, D. Status of indoleamine-2, 3-dioxygenase 1 in infiltrating ductal carcinoma of breast cancer: a new prognostic indicator for aggressive tumors.:World Cancer Reserch Journal 2021; 8:e2098

Merad-boudia HN, Dali-Sahi M, Kachekouche Y, Dennoun-Medjati N, **Salmi T**, Meziane PA, Treatment of high blood pressure in diabetic patients and risk of undernutrition in a population in extreme Western Algeria, Journal of Drug Delivery and Therapeutics.2021; 11(1):8-12

### 2. Communications (proceeding)

**T.SALMI** , M.Dali-Sahi, Y. Kechekouche, N.Dennouni-Medjati: La prévalence de la dénutrition chez les patientes atteintes le cancer du sein . Journées francophones de la nutrition. 28-30 Novembre 2018 Nice (France )

### 3. Communications internationales et nationales

M. Dali-Sahi, D. Benmansour, **T.SALMI** , Y. Kechekouche N.Dennouni-Medjati: New Molecular tumor markers, hormonal, and anthropometric risk factors in breast cancer in Algerian population. 4 th International conference on computational and experimental Science Engineering.4-8 October 2017 Antalya/Turkey

**T.SALMI** , M.Dali-Sahi, Y. Kechekouche : L'effet du facteur lipidique dans la survenue du cancer du sein chez les diabétiques .séminaire national de biochimie et journée Doctoriales de biologie et santé université de science de la nature et de la vie (FSNV) USDB1 de Blida (Algerie ) .19-20 juin 2018.

Y. Kechekouche, M.Dali-Sahi, **T.SALMI**: Facteurs de risque hématologiques associés à l'hyperglycémie chez les diabétique de type 2 . .séminaire national de biochimie et journée Doctoriales de biologie et santé université de science de la nature et de la vie (FSNV) USDB1 de Blida (Algerie ) .19-20 juin 2018.

Y. Kechekouche, M.Dali-Sahi, M.BELHADJ, **T.SALMI**, N.Dennouni-Medjati: Apport alimentaire et statut en magnésium chez les cardiopathies diabétique de l'ouest Algérien . Workshop international sur les sciences agriculture, l'agro-alimentaire et la nutrition.13-14 Novembre 2018.

**T.SALMI** : L'association de la dénutrition et les paramètre anthropométrique chez les patientes atteintes du cancer du sein dans la région de Tlemcen et d'Alger . Doctorales des science de la nature et de la vie SNV/STU .8 Décembre 2018 Tlemcen (Algérie).

Y. Kechekouche, M.Dali-Sahi, **T.SALMI**, N.Dennouni-Medjati: Evaluation de l'association de la glycémie et les paramètres hématologiques chez une population diabétique . Doctorales des science de la nature et de la vie SNV/STU .8 Décembre 2018 Tlemcen (Algérie).

**T.SALMI**, M.Dali-Sahi, N.Dennouni-Medjati, Y. Kecekouche , H. Boulouar : L'effet de la dégradation du tryptophane par l'enzyme l'indoleamine 2-3 dioxygénase dans la survenue du cancer du sein .Congrès international de Biotechnologie et valorisation de bio ressources . 20-23 Mars 2019 Tabarka - Tunis .

**T.SALMI**, M.Dali-Sahi, Y. Kecekouche , H. Boulouar, N.Dennouni-Medjati : L'effet des lipides et de la contraception orale dans la survenue du cancer du sein . 2ème congrès international d'onco-épidémiologie EHU Oran .26-6-2019 Mostaganem (Algerie).

N.AMRAOUI, M. Dali-Sahi, **T.SALMI**: Autisme, épilepsie et retard mental pourraient avoir un lien .3ème congrès Marocain de neurophysiologie. 29-30 novembre 2019 .

N.AMRAOUI, M. Dali-Sahi, **T.SALMI**: Inhibition of VEGF during Angiogenesis. international Congress of Biosciences 2019 Biotechnology and cancer. 7-8 December 2019 Oran (Algeria).

**T.SALMI**, N BEREZAG, M.Dali-Sahi, Y. Kecekouche: L'effet protecteur de la rapamycine et ses analogues dans le cancer du sein .1<sup>er</sup> symposium National moléculaire et biotechnologie. 18-19 Décembre 2019 Blida (Algeria).

**T.SALMI**, M.Dali-Sahi, N.AMRAOUI , N.Dennouni-Medjati : Les caractères cliniques et hormonaux des patientes atteintes du carcinome papillaire du sein (VPH) dans une population Algérienne . Premières journées internationales d'oncologie médicale du CLCC de Sidi Bel Abbes (Algerie). Mars 2020.

**T.SALMI**, M.Dali-Sahi, N.AMRAOUI , N.Dennouni-Medjati : L'effet de l'hypertension artérielle et l'âge dans la survenue du cancer du sein dans une population Algérienne. 17<sup>ème</sup> congrès international de l'hypertension artérielle . 15-16 Février 2020 Alger (Algeria).

N.AMRAOUI, M. DALI-SAHI, **T.SALMI** , N.Dennouni-Medjati, M.BENYAROU, S. GHALEM : thérapie antiangiogénique ciblant le VEGF. 3ème congrès Magrébin de médecin nucléaire d'Alger .13-14 Novembre 2020, Algerie

**T.SALMI**, M.Dali-Sahi, N.AMRAOUI , N.Dennouni-Medjati : La thérapie ciblée du cancer du sein en oncologie .3ème congrès Magrébin de médecin nucléaire d'Alger.13-14 novembre 2020 Alger (Algeria).

**T.SALMI**, M.Dali-Sahi, N.AMRAOUI , N.Dennouni-Medjati: Les biomarqueurs tumoraux du cancer du sein: KI67,RE, RP et HER2 . 5ème congrès international de Biochimie et de génétique médicales . 2et 3 juillet 2021 à l'hôtel Mercure-Alger, Algérie.

## Table des matières

Dédicaces .....	II
Remerciements .....	III
Résumé .....	IV
Production scientifique .....	VI
Liste des figures .....	X
Liste des tableaux .....	XI

### Introduction générale

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

### Matériel et méthodes

1. La population d'étude.....	8
2. La détermination des taux plasmatique de TRP et de KYN.....	8
2. L'identification des variants de l'IDO 1 .....	9
3. Séquençage d'une région du gène IDO1 .....	9
4. Effet phénotypique des SNP sur l'IDO1 .....	10
5. Simulation de la dynamique moléculaire de la protéine IDO1: .....	11
6. Etudes statistiques .....	13
8 Justification de l'étude .....	14

### Résultats et discussion

1. Description de la population de l'étude.....	13
1.1 Les caractéristiques de la population d'étude.....	13
1.2 La variabilité histologique selon les biomarqueurs et l'agressivité tumorale.....	16
2. prédiction du statut du TRP.....	18
2.1 La concentration plasmatique du TRP.....	18
2.2 Distribution de la concentration du TRP chez les témoins et les cas.....	19
2.3 Le statut du TRP en fonction de l'agressivité et aux biomarqueurs tumoraux ....	21
2.4. Distribution des paramètres du métabolisme de TRP selon le statut moléculaire des patientes atteintes du CS .....	24
2.5 Analyse de l'association entre le taux plasmatique de TRP et le statut hormonal des patientes atteintes de CS .....	25
2.6 L'âge, le taux de glycémie, le taux de TRP comme facteurs prédéctifs dans le survenue du CS.....	25
2.7 Discussion .....	28

<b>3. L'activité enzymatique de l'IDO 1 et l'agressivité tumorale.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1. La distribution de la concentration de l'IDO 1.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2 L'activité enzymatique de l'IDO1 associée à l'agressivité et aux biomarqueurs tumoraux du CS.....</b>	<b>33</b>
<b>3.3. L'activité enzymatique de l'IDO 1 et le statut hormonal des patientes atteintes du CS .....</b>	<b>35</b>
<b>3.4 L'activité enzymatique de l'IDO 1 et l'inflammation .....</b>	<b>35</b>
<b>3.4.1 l'activité enzymatique de l'IDO 1 et l'obésité.....</b>	<b>36</b>
<b>3.5 L'activité enzymatique de l'IDO 1 et le diabète de type II au cours du CS.....</b>	<b>36</b>
<b>3.6 Discussion .....</b>	<b>39</b>
<b>4. Variants génétiques d'IDO1 associés au CS .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1. La fréquence allélique des différents SNP en fonction de l'expression enzymatique de l'IDO1 au cours du CS .....</b>	<b>43</b>
<b>4.2. L'association des différents polymorphismes aux biomarqueurs du CS .....</b>	<b>44</b>
<b>4.3. Prédiction des effets possibles des SNP sur l'IDO1 .....</b>	<b>47</b>
<b>4.4 Estimation de la conservation évolutive des résidus de l'IDO1 .....</b>	<b>50</b>
<b>4.5. Analyse de simulation de la dynamique moléculaire de l'IDO 1 .....</b>	<b>51</b>
<b>4.5.1 la synthèse de l'IDO1 muté .....</b>	<b>51</b>
<b>4.5.2 Evaluation des effets des SNP sur la conformation de stabilité de l'IDO1.....</b>	<b>52</b>
<b>4.6 Discussion.....</b>	<b>55</b>
<b>5. Discussion générale .....</b>	<b>59</b>
<b>Conclusion et perspectives</b>	
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>65</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>67</b>
<b>Annexes</b>	
<b>Annexes.....</b>	<b>79</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Distribution de la concentration plasmatique de TRP dans la population d'étude ..	19
<b>Figure 2:</b> Analyse de variance des concentrations de TRP chez les patientes atteintes du CS20	
<b>Figure 3:</b> La Fréquence des ATCD F et ATCD P selon le taux plasmatique de TRP .....	21
<b>Figure 4:</b> Les plans des ACP et des dendrogrammes des différents facteurs de l'agressivité et les biomarqueurs du CS.....	23
<b>Figure 5:</b> Corrélation entre le taux plasmatique de TRP et le KI67 chez les patientes atteintes du CS.....	23
<b>Figure 6:</b> Analyse de variance des moyennes des taux de TRP selon le statut moléculaire des patientes atteintes du CS .....	24
<b>Figure 7:</b> La courbe ROC du modèle des facteurs prédéctifs (TRP,KYN,IDO1,age, glycémie) associé à la survenue du CS .....	27
<b>Figure 8:</b> Corrélation entre l'activité enzymatique de l'IDO1 et le KI67 et l'âge de survenue du CS.....	33
<b>Figure 9:</b> Corrélation entre l'activité enzymatique de l'IDO1 et l'IMC .....	35
<b>Figure 10:</b> La courbe ROC du modèle des facteurs prédictifs associés au diabète de type 2 dans le CS.....	38
<b>Figure 11:</b> Observation de la région chr8:39917600-39918311 de l'espèce homo sapine, les données du site dbSNP ncbi .....	42
<b>Figure 12:</b> Analyse des résidus d'acides aminés conservés de l'IDO1, la barre de couleur de codage montre la représentation du schéma de score coloration de la conservation .....	51
<b>Figure 13:</b> L'évaluation temporelle de la RMSD en fonction du temp del'IDO1 sauvage et l'IDO1 muté à 50 ns. L'IDO1 sauvage est représenté en noir et l'IDO1 muté, en rouge.....	52
<b>Figure 14:</b> Graphes RMSD du squelette sur toute la simulation. L 'IDO1 sauvage est en noir et l'IDO1 muté en rouge .....	53
<b>Figure 15:</b> Rayon de giration des structures de l'IDO1 muté et sauvage en fonction du temps. L'IDO1 sauvage est représenté en noir et l'IDO1 muté en rouge .....	54

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Caractéristiques générales de la population d'étude.....	14
<b>Tableau 2:</b> Caractéristiques cliniques, tumorales des patientes atteintes du CS .....	16
<b>Tableau 3:</b> L'expression des biomarqueurs du CS (RH, HER2, KI67) en fonction des paramètres de l'agressivité tumorale dans la population des cancers rares et fréquents. ....	18
<b>Tableau 4 :</b> Distribution de la concentration plasmatique du TRP en fonction des facteurs de l'agressivité tumorale et les biomarqueurs du CS.....	22
<b>Tableau 5:</b> Régression multiple du statut hormonal en fonction du taux plasmatique du TRP chez les patientes atteintes du CS.....	25
<b>Tableau 6:</b> Résultats du modèle de régression logistique des facteurs prédictifs (TRP, KYN, IDO1, glycémie) dans la survenue du CS .....	26
<b>Tableau 7:</b> Test d'adéquation de l'ajustement .....	26
<b>Tableau 8:</b> Mesures d'association entre la variabilité de réponse et les facteurs prédéctifs du CS (TRP,KYN,IDO1, âge, glycémie) .....	27
<b>Tableau 9:</b> Les niveaux de l'activité enzymatique de l'IDO1 en fonction des facteurs de l'agressivité et des biomarqueurs du CS .....	32
<b>Tableau 10:</b> Résultats de la régression nominale de l'association plasmatique de l'IDO1 et les différents facteurs du CS .....	34
<b>Tableau 11:</b> Analyse de la variance de l'IDO1 selon l'âge de ménopause .....	35
<b>Tableau 12:</b> Le TRP et ses métabolites en fonction de l'IMC:.....	36
<b>Tableau 13:</b> Analyse de la variance de l'IDO1 selon l'obésité .....	36
<b>Tableau 14:</b> Les résultats du modèle de régression logistique des facteurs prédictifs (TRP, KYN, IDO1, âge ) dans la survenue du diabète au cours du CS.....	37
<b>Tableau 15:</b> Test d'adéquation de l'ajustement.....	37
<b>Tableau 16:</b> Les mesures d'association entre la variable de réponse (taux de glycémie ) et les facteurs prédictifs au cours du CS (TRP, KYN, IDO1, âge).....	38
<b>Tableau 17:</b> Les variants génétiques d'IDO1 chez les patientes atteintes du CS .....	43
<b>Tableau 18:</b> La fréquence allélique des différents SNP en fonction de l'expression enzymatique d'IDO1.....	44

<b>Tableau 19:</b> Les différents polymorphismes selon les biomarqueurs du CS .....	46
<b>Tableau 20:</b> Les SNP pathogènes à haut risque de l'IDO1 .....	47
<b>Tableau 21:</b> Prédiction des effets possibles sur la stabilité de l'IDO1 .....	47
<b>Tableau 22:</b> Les propriétés des résidus sauvages et mutés des différents SNP de l'IDO1 au cours du CS .....	49
<b>Tableau 23:</b> Les différents types de liaisons des résidus de l'IDO1 sauvage et muté .....	50
<b>Tableau 24:</b> La conservation évolutive des résidus des différents SNP de l'IDO1 .....	51

## Liste des abréviations

**ACP:** Analyse des Composantes Principales  
**ADN:** acide désoxyribonucléique.  
**ANOVA:** Analyse Of Variance  
**ATCDF:** Antécédents familiaux  
**ATCDP:** Antécédents pathologiques  
**AUC:** area under curve.  
**BRCA:** Breast Cancer Mutations  
**CC:** Carcinome colloïde  
**CCI:** Carcinome Canalaire Infiltrant  
**CIS:** Carcinome in situ  
**CI:** confidence interval  
**CLI:** Carcinome Lobulaire Infiltrant  
**CO:** Contraceptif oral  
**CP:** Carcinomes papillaires  
**CS:** Cancer du sein  
**EGF:** Epider-mal Growth Factor  
**ESI+:** positifs electrosprayionization  
**HER2:** Human Epidermal Growth Factor Receptor 2  
**HTA:** Hyper tension artérielle  
**IDO1:** indoleamine 2,3 dioxygénase 1  
**IDO2:** indoleamine 2,3 dioxygénase 2  
**IGF:** Insulin like growth factor  
**IHC:** Immunohistochimie  
**IMC:** Indice de la masse Corporelle  
**K/T:** ratio Kynurénine/Trptophane.  
**KYN:** Kynurénine  
**LC-MS/MS-:**Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry  
**OMS:** Organisation Mondiale de la Santé  
**OR:** odds ratio  
**PDB:** Protein Data Bank  
**RE:** Récepteur d'oestrogène  
**RH:** Récepteurs Hormonaux  
**RP:** Récepteur de Progestérone  
**SBR:** Grading de Scarff-Bloom et Richardson  
**ROC:** receiver operating characteristic.  
**RMSD:** déviation quadratique moyenne  
**RMSF :** fluctuations de la moyenne quadratique  
**Rg :** Rayon de giration  
**SNP:** single nucleotide polymorphism  
**TRP:** tryptophane  
**TNM:** Taille, Nodules, Métastase  
**TPS:** Tumeurs phyllodes du sein

**TDO2:** tryptophan 2,3 dioxygénase 2.

**TFP:** taux des faux positifs.

**TVP:** taux des vrais positifs.

**UCSC :** université de Californie Santa Cruz



# *Introduction générale*

## *Introduction générale*

Le cancer du sein (CS) est un type de tumeur hétérogène. C'est le cancer féminin le plus courant, représentant un tiers des cancers féminins. Avec la morbidité la plus élevée et la deuxième cause de mortalité liée au cancer chez les femmes dans le monde (Eliyatkin et al. 2015)

Dans le monde, le nombre de nouveaux cas augmente chaque année : 1.1 million femmes sont diagnostiquées et 410,000 femmes en meurent (Yuan et al. 2019). Le CS est actuellement la première cause de morbidité et de mortalité par cancer chez les femmes algériennes (Gaceb et al. 2018)

La mortalité par CS s'avère être plus élevée dans le cas des cancers dits agressifs ou de mauvais pronostic tels que le cancer du sein de la femme jeune et le CS triple négatif (TNG) (Tan et al. 2022)

Les CS sont classés morphologiquement selon certains critères : taille, type histologique, capacité d'envahissement ganglionnaires, présence des récepteurs hormonaux (Le récepteur d'œstrogène (RE) et le récepteur de progestérone (RP)) et la surexpression de epidermal growth factor receptor 2 (HER2) (Schnitt 2010) .

Cependant les progrès des approches transcriptomiques et histopathologiques ont permis une classification plus affinée. Les données transcriptomiques ont permis de distinguer six types de cancers du sein : les cancers luminaux A (ER+ et/ou PR+, HER2-, faible Ki67), luminaux B (ER+ et/ou PR+, HER2+ ou HER2- avec haut Ki67), HER2+ (ER/PR-, HER2+) et TNG (ER/PR-, HER2-)(Prat et al. 2010). Ce dernier présente un comportement agressif et un mauvais pronostic des patientes(Kim et al. 2017) (Tan et al. 2022)

Les principales raisons d'appliquer un système de classification histologique au CS sont d'obtenir une corrélation avec le pronostic et la biologie tumorale(Rakha et al. 2010). Les carcinomes invasifs peuvent être subdivisés en fonction de leur degré de différenciation .Ceci est réalisé en évaluant le type histologique et le grade histologique (Eliyatkin et al. 2015)

Le système de classification défini par Pierre Denoix (TNM) est applicable à tous les types de cancer et les paramètres de tumeur. Les recherches montrent que la taille (T) et l'envahissement ganglionnaire (N) sont des facteurs pronostiques importants qui sont associés aux différents types histologiques ainsi qu'à l'expression des récepteurs hormonaux (RH).(Boisserie-Lacroix et al. 2013).

Le classement histologique (T, N) est associé au type histologique ainsi qu'à des modifications moléculaires telles que les RH et HER2 (Boisserie-Lacroix et al. 2013).

Le rôle des RH en tant que facteur pronostique et cible thérapeutique est largement pratiqué. Le RE est une cible thérapeutique pour les CS ER positifs. Plusieurs recherches montrent que les facteurs hormonaux et le grade de la tumeur (grade SBR) ont une influence sur le type histologique (Dewi et al. 2017; Gómez-Cebrián et al. 2021; Schnitt. 2010)

Une nouvelle approche est d'identifier une nouvelle classification des diverses entités biologiques du CS, basée sur la signature du métabolome tumoral, une nouvelle méthode avec sélection de métabolites (Tang et al. 2014; Ye et al. 2019)

## *Introduction générale*

Les acides aminés et leurs métabolites ont attiré une attention considérable en tant que nouveaux biomarqueurs prometteurs de diverses maladies ; tels que les maladies inflammatoires, le diabète, les troubles mentaux et le cancer (Ye et al. 2019)

En général, divers cancers ont été signalés comme étant liés aux changements du profil du tryptophane (TRP) et de ses métabolite (Li et al. 2022; Liu et al. 2020; Lyon et al. 2011; Soliman et al. 2013; Gómez-Cebrián et al. 2021) .Ces dernières années, la métabolique à fournir des informations cliniquement précieuses sur les altérations métaboliques qui offrent de nouvelles perspectives sur la pathologie du CS et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques (Gómez-Cebrián et al. 2021; Ye et al. 2019).

Le L-tryptophane (L-TRP) est un acide aminé essentiel ayant différentes fonctions biologiques importantes. En plus de participer à la biosynthèse des protéines, le TRP est métabolisé chez les mammifères selon diverses voies, à savoir celles de la sérotonine et de la kynurenine (KYN) Dans cette dernière, le TRP est catabolisé en produits finaux tels que l'acide nicotinique, la niacine (vitamine B3) et le nicotinamide adéninedinucléotide (NAD+) (Platten et al. 2019).

Plus de 95 % du TRP est dégradé via la voie de la KYN.(Stone, Stoy, et Darlington 2013) L'augmentation de la KYN et de ses métabolites aux propriétés immunomodulatrices est le principal mécanisme de la tolérance immunitaire dans le catabolisme du TRP (Li et al. 2022).

Il a été démontré que la voie de la KYN est impliquée dans la régulation du microenvironnement immunosuppresseur dans les tumeurs humaines (Merlo et al. 2020).

La dégradation du TRP produit des effets immunosuppresseurs à cause de l'épuisement du TRP qui a stimulé l'intérêt pour le ciblage thérapeutique des principales enzymes, l'indoleamine 2,3 -dioxygénase 1 (IDO1), IDO2 et tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO2) limitant la vitesse de dégradation (Peyraud et al. 2022).

La structure de TDO2 et d'IDO1 est différente, bien qu'elle catalyse la même réaction du TRP en *N*-formyl-kynurénine. TDO2 fonctionne comme un homotétramère de 320 kDa, tandis que IDO1 fonctionne comme une enzyme monomère de 41 kDa. Ils sont antigéniquement différents et partagent peu d'homologie par séquence d'acides aminés . La réaction catalytique est également différente entre les deux enzymes (Katz et al. 2008)

Les études cristallographiques de l'IDO1 humain révèlent une structure à deux domaines de domaines  $\alpha$ -hélicoïdaux avec un groupe hème situé au centre (Merlo et al. 2020). L'activité catalytique de TDO2 ne dépend pas de l'hème ou du superoxyde pour l'activité, tandis que l'IDO1 dépend de l'hème et d'un donneur d'électrons pour l'activité. Le fragment hème d'IDO1 fournit un anion superoxyde pour donner de l'oxygène au TRP. (Katz et al. 2008)

La TDO2 joue un rôle central dans la régulation du métabolisme du TRP dans le CS, et elle prédit un mauvais pronostic chez les patientes atteinte du CS, ce qui suggère que TDO2 pourrait aussi être une nouvelle cible d'immunothérapie prometteuse pour le CS (Liu et al. 2020)

IDO2 a une activité catabolisant du TRP beaucoup plus faible que IDO1, Il a été récemment identifiée comme une enzyme apparentée à IDO1 avec un schéma d'expression et une régulation moléculaire légèrement différents

En réalité l'IDO1 est largement exprimé dans différents types de tissus par rapport à l'IDO2 et TDO2 . L'expression d'IDO2 est limitée au foie, aux reins et aux cellules présentant l'antigène (cellules dendritiques et cellules B) (Merlo et al. 2020).Le TDO2 est exprimé principalement dans le foie (Liu et al. 2020)

La relation entre le catabolisme élevé du TRP et la cancer était décrit pour la première fois dans les années 1950 dans l'urine de patients atteints d'un cancer de la vessie (Boyland et Williams 1955). D'autres études ont trouvé du TRP urinaires élevés dans le CS, le cancer de la prostate, le lymphome de Hodgkin et la leucémie (Boyland et Williams 1955; Wolf, Madsen, et Price 1968).

Il a été démontré que les cellules cancéreuses du sein peuvent échapper aux réponses immunitaires, par divers mécanismes immunosuppresseurs, tels que la modulation de l'expression de l'IDO1 (Asghar et al. 2021).

La plupart des recherches à ce jour se focalisent sur l'IDO en tant qu'enzyme centrale et immunobiologiquement pertinente qui catalyse 95% du TRP en KYN (Heng et al. 2020)

De plus, le catabolisme du TRP mesuré dans le sérum et d'autres fluides biologiques peuvent servir de biomarqueurs pour surveiller l'évolution du CS et la réponse au traitement.(Prendergast et al. 2011).

Ce travail se veut d'aborder l'impact du catabolisme du TRP dans la survenue du CS. Une expression élevée d'IDO1 a été décrite dans plusieurs tumeurs humaines et modèles de tumeurs de souris (Merlo et al. 2020) .

On pense que la fonction inhibitrice d'IDO1 se fait principalement par l'induction de cellules régulatrices T, bien que des études récentes aient décrit une nouvelle fonction d'IDO1 dans la néovascularisation inflammatoire, qui pourrait être tout aussi importante, sinon plus, dans certains contextes tumoraux (Merlo et al. 2020).

Il existe des preuves solides que la suppression des réponses immunitaires antitumorales dans les lésions précancéreuses et les cancers établis par le catabolisme du TRP favorise la croissance tumorale (Muller et al. 2008) .

L'activation d'IDO diminue la concentration du L-TRP dans l'environnement cellulaire. La faible teneur en cet acide aminé essentiel provoque l'arrêt de la biosynthèse des protéines. En d'autres termes, la baisse de L-TRP est considérée comme un mécanisme de défense induit par l'IFN- $\gamma$  dans les cellules immunocompétentes durant la réponse immunitaire. L'IFN- $\gamma$  est une cytokine essentielle de l'immunité innée et adaptative pour lutter contre les infections virales, et est impliqué dans les processus d'immuno-surveillance et d'échappement des tumeurs(Watcharanurak et al. 2014).

L'activation de l'IDO 1 se fait via l'IFN- $\gamma$  des cellules dendritiques ou macrophages. De plus la déplétion en L-TRP et l'effet pro-apoptotique de certains catabolites du L-TRP telle que la kynurénine est aussi importante. Selon différentes études, de nombreuses tumeurs humaines expriment de manière constitutive l'IDO 1. (Watcharanurak et al. 2014).

L'activation de l'IDO peut également inhiber la réponse des lymphocytes T lors d'une stimulation mitogénique *in vitro* et *in vivo*. (Grohmann, Fallarino, et Puccetti 2003; Munn et al. 2002).

Des études récentes considèrent que le profil du TRP et de la KYN peuvent-être des indicateurs d'un taux élevé de prolifération et sont corrélés avec certains sous-types moléculaires du CS (Eniu et al. 2019).

Le taux plasmatique du TRP et de la KYN ainsi que l'activité enzymatique d'IDO1 sont significativement plus faibles chez les patientes atteintes du CS par rapport à ceux des témoins (Onesti et al. 2019)

L'expression élevée de l'IDO1 est liée au mauvais pronostic dans différents types de cancers. Il a été corrélé au type histologique, au statut hormonal et aux différents types moléculaires (Asghar et al. 2021). Une diminution significative des concentrations du TRP entre le groupe des patientes atteintes du CS et le groupe témoin était positivement corrélée avec la progression du CS (Eniu et al. 2019).

Les tumeurs histologiquement similaires du sein peuvent avoir des pronostics différents et répondre différemment au traitement, en raison du métabolisme tumoral différent (Gómez-Cebrián et al. 2021).

La classification OMS 2012 a actualisé et individualisé les différents sous types histologiques par rapport à la classification OMS 2003, en prenant en considération la morphologie, l'immunophénotypie et l'expression moléculaire des tumeurs.

Vingt-deux entités nouvelles ont été ajoutées dans le carcinome infiltrant spécifique par rapport aux types histologiques non spéciaux. Le carcinome canalaire infiltrant (ancienne nomination de l'OMS 2003) devient le carcinome infiltrant non spécifique (TNS) (nouvelle nomination de l'OMS 2012). C'est le type le plus fréquent qui représente 60 à 75 % de toutes les tumeurs du sein. Il est caractérisé par l'absence des caractères morphologiques, contrairement aux types histologiques spéciaux qui représentent 20 à 25 % de toutes les tumeurs du sein. Les sous types les plus courants des carcinomes spécifiques sont, le lobulaire, le papillaire et le mucineux (Eliyatkin et al. 2015).

Le métabolisme des acides aminés dans le CS montre une différence dans le statut hormonal (RE- et RE+) des patientes (Gómez-Cebrián et al. 2021; Greene et al. 2019). La KYN et l'IDO1 sont élevés dans les tumeurs RE- par rapport aux tumeurs RE+ (Tang et al. 2014).

Cette différence peut avoir un impact direct sur le comportement tumoral et les phénotypes cliniques des patientes (Lyon et al. 2011; Soliman et al. 2013).

Il est connu que le RE joue un rôle central dans le développement et la progression du CS car il améliore la prolifération, la survie et l'invasion des cellules tumorales du sein (Deroo 2006).

L'expression du RE supprime également une caractéristique maligne des cellules cancéreuses du sein en inhibant l'induction de l'IDO1. Les recherches montrent aussi un degré élevé d'infiltration des cellules T dans les tumeurs ER-négatives (Dewi et al. 2017) .

L'IDO1 montre une forte corrélation avec les marqueurs des cellules T. La différence d'expression de l'IDO1 entre le CS ER-positif et ER-négatif peut être médiée par différents niveaux de médiateurs inflammatoires (IFN $\gamma$ ) libérés par les lymphocytes T qui induisent l'IDO1 (Dewi et al. 2017; Muller et al. 2008, 2008; Watcharanurak et al. 2014).

Dewi et al ont montré une corrélation inversée entre le promoteur IDO1 méthylé et l'expression de l'ARNm de l'IDO1 l'hyperméthylation des îlots CPG (au sein du site de liaison STAT1) du promoteur IDO1 dans les ER positives par rapport au ER négative, conduisant à une induction plus forte de l'IDO1, puis une production accrue de KYN et enfin à une suppression accrue de l'immunité antitumorale (Dewi et al. 2017).

Le RE a été identifié comme un régulateur négatif de l'expression de l'IDO1, le taux plasmatique de l'IDO1 ainsi que le taux plasmatique de la KYN qui étaient plus faibles chez les patientes avec RE + par rapport aux patientes avec RE- (Dewi et al. 2017).

La voie de la KYN a été également explorée dans différents stades tumoraux (Gómez-Cebrián et al. 2021; Onesti et al. 2019; Soliman et al. 2013). La plupart des études classent le CS selon le grade histologique de la tumeur (grade SBR1, grade SBR2, grade SBR3, grade SBR4) et le système de classification TNM (Eliyatkin et al. 2015). Ces 2 facteurs expliquent ainsi l'agressivité des tumeurs du sein (Greene et al. 2019).

Le grade SBR classé 1, le moins agressif, regroupe les types histologiques lobulaires, tubulaires, cribriformes ainsi que le type moléculaire luminal A. Le grade histologique 2 ou 3 le plus agressif regroupe le type micropapillaire, médullaire, métaplasique, adénoïde kystique, sécrétoire, apocrine, lobulaire pléomorphe, métaplasique ainsi que certains types moléculaires, le luminal A, B, basal like (Eliyatkin et al. 2015).

Le type histologique spécifique caractérise la tumeur moins agressive (Eliyatkin et al. 2015). La dégradation plus rapide du TRP dans les tumeurs plus grandes et un taux plasmatique du KYN qui est significativement plus faible chez les patientes qui ont un stade T3 et T4 par rapport au stade T1 et T2 (Onesti et al. 2019).

L'expression de kynurine (enzyme qui dégrade la KYN) est aussi inversement liée au stade de la tumeur. La kynurine supprime la prolifération des cellules du CS, la croissance et le développement des tumeurs. Elle peut fonctionner comme un suppresseur de tumeur dans le CS (Heng et al. 2020). L'expression élevée de l'IDO1 peut jouer un rôle crucial dans la progression tumorale (Lyon et al. 2011).

Malgré les recherches sur la voie de la KYN au cours du CS, aucun travail n'a été mené sur le polymorphisme génétique (SNP) de l'IDO1 au cours du CS.

L'IDO1 est codé par le gène INDO situé sur le chromosome humain 8p12.-p11 (Kadoya et al. 1992). Il comprend 10 exons couvrant 15 kb et il code pour une protéine de 403 acides aminés (Katz et al. 2008).

Le gène INDO humain a révélé une variabilité génétique qui peut contribuer à des différences d'activité IDO1 entre les individus (Arefayene et al. 2009).

Arefayene et al ont séquencé 96 échantillons d'ADN. six variantes de l'IDO1 ont été identifiées, dont deux polymorphismes faux sens situés dans les exons 1 et 3. La protéine codée par le SNP de l'exon 3 présentait une perte presque complète d'activité enzymatique de l'IDO1 ; Tandis que l'autre SNP codée par l'exon 1 démontrant la présence d'un allèle non

fonctionnel du gène IDO1 (Arefayene et al. 2009). L'étude des SNP dans l'exon 3 était ciblée dans plusieurs maladies y compris sclérose (Tardito et al. 2013)

Dans la littérature, les études des polymorphismes génétiques de l'IDO1 ont été trouvées, associées principalement à certaines pathologies, cancer de la prostate, sclérose, maladie de Crohn, hépatite C, tuberculose, parkinson, cancer du cerveau, maladies cardiovasculaires (Cao et al. 2022; Galvão-de Almeida et al. 2011; Han, He, et Zhang 2020; Lee et al. 2014; Li et al. 2019; Tardito et al. 2013; Török et al. 2022, Kechkouche. 2021).

En outre, la variation peut avoir un effet significatif sur la réponse clinique aux inhibiteurs de l'IDO qui peuvent inhiber l'IDO2 aussi bien ou mieux que l'IDO1 elle-même à cause des SNP (Muller, Metz, et Prendergast 2007). Metz et al ont identifié deux SNP qui abolissent l'activité catabolique du TRP. L'un des SNP, Y359X, génère un codon stop prématuré. L'autre SNP, R248W, est structurellement analogue au résidu R231 clé conservé dans l'IDO humain (Metz et al. 2007).

Ces deux polymorphismes sont largement représentés dans les populations humaines, avec jusqu'à 50 % des individus (Metz et al. 2007). La présence fréquente de ces SNP suggère qu'il pourrait y avoir des avantages évolutifs dans les populations humaines pour modifier les activités de l'IDO2 (Metz et al. 2007)

Différents outils de prédiction sont disponibles pour évaluer l'effet prédictif des SNP non synonymes ou non-sens ou faux sens, la fonction de l'IDO1 (Oliver et al. 2017)

### **Les objectifs**

Nous avons jugé utile, devant la rareté des études pronostiques sur le CS en Algérie, d'apporter des données non encore enregistrées. Dans cette étude nous nous intéresserons à la valeur prédictive et/ou pronostique de différents facteurs qui ont été étudiés ou qui le sont encore actuellement. Chaque facteur peut être potentiellement à la fois prédictif et pronostique

Nous avons aussi comparé et analysé des données sur les différents types histologiques et moléculaires des CS rares. Il s'agit aussi de décrire les principales caractéristiques des cancers rares et de tester l'association des paramètres cliniques histopronostiques et des biomarqueurs du cancer du sein sur la variabilité histologique de notre population

En effet, le statut du TRP et son métabolisme, tout comme l'hétérogénéité biologique des marqueurs de l'agressivité tumorale, requièrent des études plus approfondies afin de pouvoir faire preuve de concept du ciblage du métabolisme du TRP et de la modulation de l'activité de l'IDO1 au cours du CS, comme un nouvel indicateur pronostique de l'agressivité tumorale.

Malgré des avancées considérables dans notre compréhension de cette voie métabolique, un certain nombre de questions reste en suspens, tournant principalement autour de l'IDO1 en tant qu'enzyme clé du catabolisme du tryptophane, et les cibles moléculaires et les mécanismes responsables des effets biologiques de la déplétion en TRP et de l'accumulation des métabolites du TRP.

L'objectif principal de notre étude est d'identifier un nouvel indicateur d'agressivité tumorale dans le CS. Pour cela nous avons quantifié le TRP et la KYN dans le plasma des

## *Introduction générale*

patientes atteintes d'un CS et des témoins pour prédire l'impact du catabolisme du TRP dans la survenue du CS.

Nous avons profilé les métabolites extraits du plasma de patientes atteintes d'un CS et des témoins à l'aide de la technique LC-MS/MS peu invasive des échantillons à base de sang, pour améliorer les méthodes et les indicateurs utilisés pour le diagnostic du CS.

Nous avons déterminé les corrélations entre le TRP et l'IDO1 en fonction des caractéristiques tumorales et les biomarqueurs du CS (grade SBR, TNM, HR, HER2, KI67)

Nous avons aussi étudié l'activité enzymatique de l'IDO1 chez les patientes atteintes du CS ainsi que l'association de l'IDO1 avec l'agressivité tumorale et avec les biomarqueurs du cancer du sein (HR, HER2, KI67) ainsi qu'avec l'âge de survenue du CS, le diabète et l'IMC ; ce qui pourrait améliorer le diagnostic du CS.

Nous avons identifié des polymorphismes génétiques dans le gène de l'IDO1 qui participent à l'augmentation de l'activité enzymatique de l'IDO1 au cours du CS.

Nous avons analysé l'association entre les différents polymorphismes identifiés de l'IDO1 et les biomarqueurs du CS, inexistante dans les études sur le CS.

Nous avons déterminé les effets phénotypiques des SNP sur la fonction de l'IDO1

Dans notre travail, nous avons aussi déterminé une des causes de résistance aux inhibiteurs de l'IDO1 ; ce sont les polymorphismes qui touchent le domaine de relieur hémique.

Afin de comprendre l'impact des différents SNP sur la stabilité de la structure de la protéine IDO1, une analyse de simulation de la dynamique moléculaire a été réalisée.



# *Matériel et méthodes*

### **1. La population d'étude**

Il s'agit d'une étude de cas témoins, menée auprès de 352 patientes atteintes du CS, recrutées dans le service de gynécologie de Tlemcen et 166 patientes ne présentant aucune pathologie cancéreuse.

Le recrutement des témoins sains et des volontaires pour l'étude de la population générale s'est fait au niveau du laboratoire central du CHU de Tlemcen.

Les sujets malades n'ont été éligibles pour l'étude qu'après obtention de leur consentement. Ce protocole d'étude a été approuvé par le comité d'éthique de l'université de Tlemcen.

Le recueil des données a été fait au moment du diagnostic. L'échantillonnage a eu lieu durant la période allant de septembre 2018 à mars 2020. Le consentement de toutes les participantes a été obtenu après les avoir informées des objectifs de l'étude.

Le dossier médical a servi de support d'informations recueillies. Les informations recueillies regroupaient les données sociodémographiques, cliniques, les données histopronostiques (la classification TNM, le grade SBR) et les biomarqueurs du cancer du sein (RH, HER2, Ki-67) (questionnaire annexe).

### **2. La détermination des taux plasmatique de TRP et de KYN:**

- **Le prélèvement :** Le sang veineux a été prélevé le matin dans des tubes d'héparine pour le dosage du TRP et de la Kyn
- **Le dosage par LC-MS/MS :** Le protocole analytique, basé sur la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) a été développé avec de légères modifications, en se référant aux méthodes déjà précisées précédemment
- 50 µL du plasma a été mélangé et centrifugé à 11800 tr/min, 4°C, pendant 8 min ; après l'addition de 50 µL d'acétonitrile pour la précipitation du TRP D5 de 50µM (isotopes CDN, Pointe-Claire, Canada), comme standard interne.(Schefold et al. 2009; Yamada et al. 2008)
- Après centrifugation, un volume de 50 µL de surnageant a été ajouté à 600 µL de l'eau désionisée et 10 µL
- Ce dernier mélange a été injecté sur un système UPLC-MS/MS (Acquity TQ-XS Detector, Waters, Milford, MA) équipé d'une colonne CSH Phenyl-Hexyl. 12,1x100 mm-1,7 µm (Waters, Milford, Etats Unis).
- Les modes positifs électrosprayionization (ESI+) et Multiple Reaction Monitoring (MRM) sont utilisés pour l'ionisation et la détection de chaque transition des molécules à quantifier.
- Le logiciel Masslinks (Waters) a été utilisé pour l'acquisition et le traitement des données.

## 2. L'identification des variants de l'IDO 1

- **Le prélèvement** : Le sang veineux a été prélevé le matin dans des tubes EDTA (Ethylène Diamine Tétra-Acétique). Nous avons recueilli 15 mL du sang
- **L'extraction d'acide désoxyribonucléique (ADN)** : Nous avons utilisé la technique Salting out. Elle a été choisie en raison de sa rapidité, sa facilité ainsi que l'absence du risque de toxicité par des produits dangereux tels que le phénol (Miller et al., 1988) (protocole annexe).
- **Conception des amorces** : Les paires d'amorces ont été conçues en utilisant primer3 (Rozen et Skaletsky 2000); nous avons validé notre conception par une PCR in vitro disponible dans le site élaboré par l'université CALIFORNIA SANTA CRUZ (UCSC Génome Browser) (Karolchik et al. 2003) .
  - AGAGTAGTCAGGAGGATT (Forward primer 5'-3') –
  - TGCATGATGCAGTTATAATGC (Reverse primer 5'-3')

## 3. Séquençage d'une région du gène IDO1

Nous avons réalisé un séquençage de sang dans les deux sens de la région du chromosome 8 ( 8p11.21)

- La séquence de référence : la séquence de référence a été obtenue par une PCR in vitro à partir du site web UCSC Génome Browser

```
>chr8:39917600+39918311  
AGAGTAGTCAGGAGGATTTTAGTGAAACCTTTGAGGTGAACTTTGAAAAG  
CTGCAAATGGCAGTGTTTGAAGAGAGAGGAAGAGGTGGAACACAGAGAGG  
GTCCTTCAGCCCTGCGTGTGCAGATGACAAGACAGAGGCTGGTGTTCAG  
ACAGGTAAGCCATATGCCAGGGCAACATTGCACAGAATGGATGTGAAGGC  
AAGGCATACTATCAGTGGGAAGCCAAATCTACAATAACTGCTACTACTAA  
ATAAAGATCTTTTTTTTTTTTCAAGGAAAATCTACCTGATTTTTTATAATG  
ACTGGATGTTTCATTGCTAAACATCTGCCTGATCTCATAGAGTCTGGCCAG  
CTTCGAGAAAGAGTTGAGAAGGTTTGACATATGTATTACATTTGTCTTCT  
TGTATAGCTTCTTAACATTGTTAACTTGGTTTTGAAGCATAAAACATTAC  
TGAGATTGATTTGAGTCAATTGCTCCATTTGTTTTTCAGTTAAACATGCTC  
AGCATTGATCATCTCACAGACCACAAGTCACAGCGCCTTGACACGTCTAGT  
TCTGGGATGCATCACCATGGCATATGTGTGGGGCAAAGGTCATGGAGATG  
TCCGTAAGGTTTTGGAGATTTTCTCAGATTTCTTATGCTATGTGACAGATT  
TTCATCTAATTTACATTTAACTTTCCAAAATTTTCTAAAAGCATTATAA  
CTGCATCATGCA
```

- La taille de notre amplicon est de 712 pb
- Les séquences ont été alignées par :
  - clustol Omega (Madeira et al. 2022)
  - Gear-Genomics (Rausch et al. 2020)
- **Récupération, extraction et cartographie des SNP du gène IDO1**

Les informations sur les SNP du gène ont été obtenues à partir Single Nucleotide Polymorphism database 2.0 Build 153 (bdSNP ) du Centre national de biotechnologie Information (NCBI) (Bhagwat. 2010)

#### **4. Effet phénotypique des SNP sur l'IDO1**

Dans la présente étude, divers outils ont été utilisés pour prédire la pathogénicité des mutations faux-sens sur les régions codantes et de déterminer l'impact fonctionnel des divers SNP

- **UniProt :**

La séquence de la protéine IDO1 a été obtenue à partir de la base de données UniProt considérée comme la plus fiable et la base de données non ambiguë pour les séquences protéiques (Bairoch et al. 2005).

- **Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT):**

un algorithme utilisé pour prédire la nature délétère des SNP humains basée sur l'homologie des séquences et les propriétés physiques des acides aminés. Le score varie de 0 à 1. La substitution d'acides aminés est prédite dommageable si le score est  $\leq 0,05$ , et tolérée si le score est  $> 0,05$  (Ng et Henikoff 2003).

- **polymorphisme phentyping (PolyPhen-2) :**

Le score PolyPhen-2 prédit l'impact possible d'une substitution d'acide aminé sur la structure et la fonction d'une protéine humaine. Ce score représente la probabilité qu'un remplacement soit dommageable. Le score PolyPhen-2 varie de 0,0 (toléré) à 1,0 (délétère). Les valeurs plus proches de 1,0 sont prédites avec plus de confiance comme étant délétères (Adzhubei et al. 2010)

Remarque : les scores PolyPhen-2 et SIFT utilisent la même plage, de 0,0 à 1,0, mais avec des significations opposées. Une variante avec un score PolyPhen de 0,0 devrait être neutre. Une variante avec un score SIFT de 1,0 devrait être neutre.

- **Prediction of Protein Stability Changes for Single Site Mutations from Sequences (MUPRO) :**

La stabilité des protéines est la caractéristique de base qui affecte la fonction, l'activité et la régulation des molécules biologiques. La stabilité d'une protéine est

quantifiée par l'énergie libre standard ( $\Delta G$ ) de repliement. Cette énergie est définie par la différence entre l'énergie libre entre l'état replié et déplié de la protéine. Les prédicteurs  $\Delta\Delta G$  basés principalement sur des modèles de régression utilisés pour estimer quantitativement les changements d'affinité de liaison lors des mutations

Le déploiement est un indice clé de la stabilité des protéines. En examinant l'influence de mutation sur l'énergie libre, la modification de la stabilité des protéines pourrait être déterminée avec précision par le serveur Mupro.

Si la valeur  $\Delta\Delta G > 0$  signifie une augmentation de la stabilité de la protéine mutée c à d que la protéine n'est pas stable. Si la valeur de  $\Delta\Delta G < 0$  indique une diminution de la stabilité de la protéine mutée c à d que la protéine est stable ( $\Delta\Delta G = \Delta G$  de la protéine mutée -  $\Delta G$  de la protéine sauvage) (Cheng, Randall, et Baldi 2006; Geng et al. 2019).

- **Have (y) Our Protein Explained (HOPE):**

est un web de nouvelle génération .Application pour l'analyse automatique des mutants. HOPE recueille des informations à partir d'un large éventail de sources comprenant des calculs sur les coordonnées tridimensionnelles (3D) de la protéine via le serveur WHAT IF , annotations de séquences de la base de données UniProt et prédictions à l'aide du serveur DAS (Distributed Annotation System).HOPE construit un résultat hétérogène un rapport avec texte, figures et animations.

Le rapport évaluera l'effet de la mutation sur les caractéristiques suivantes : contacts établis par le résidu muté, domaines structuraux dans lesquels se trouve le résidu, modifications sur ce résidu et variants connus pour ce résidu et une courte conclusion basée uniquement sur les propriétés des acides aminés (Venselaar et al. 2010)

- **ConSurf :**

qui évalue l'effet fonctionnel de Substitutions d'acides aminés dans les protéines basées sur la conservation évolutive. Le serveur ConSurf utilise une méthode bayésienne empirique pour révéler les zones importantes pour la fonction et la structure de la protéine. Le score de conservation varie de 1 à 9, le grade 1 se référant élevé (Ashkenazy et al. 2010)

## **5. Simulation de la dynamique moléculaire de la protéine IDO1:**

Afin de comprendre l'impact des différents SNP sur la stabilité de la structure de la protéine, divers outils ont été utilisés pour

- **Protein Data Bank (PDB) :**

la synthèse de l'IDO1 muté : La structure cristallographique tridimensionnelle de l'IDO1 a été obtenue à partir de la base de données PDB (code PDB : 5WU) qui était utilisée comme référence (IDO1 sauvage) avec une résolution de 2.40 Å.

- **Chimera :**

La préparation de la protéine d'IDO1 a été faite par le programme Chimera UCSF (ver 1.14) qui permet de supprimer le ligand d'origine lié à l'IDO1. Nous avons aussi muté l'IDO1 sauvage par SNP faux sens identifié dans notre population (Pettersen et al. 2004)

- **GROMACS :**

La Simulation et l'analyse des trajectoires de dynamique moléculaire de l'IDO1 ont été faites par le logiciel GROMACS (Ver 5.1), mis en place sur un système Linux. En recourant également au champ de force CHARMM36, il a été procédé à des simulations de dynamique moléculaire (Kutzner et al. 2019)

La solvation pour les complexes protéiques a été réalisée en milieu triclinique. L'énergie du système a été réduite grâce à l'algorithme nommé : Steepest descent. On a soumis la protéine à une solvation au moyen du modèle de solvant TIP3, et on a ajouté 4 ions Na<sup>+</sup> au système, de façon à neutraliser tout le système. Le système présente un écart minimum de 1,5 Å entre chaque bord et chaque atome protéique. On a employé des températures correspondant à 300 K ainsi qu'une pression totale de 1 bar afin que le système se stabilise. Une dynamique moléculaire finale de 50 nanosecondes (ns) est appliquée au système, avec des étapes de . On a employé successivement les outils gmx rms et gmx rmsf afin de mesurer la déviation quadratique moyenne (RMSD) et les fluctuations de la moyenne quadratique (RMSF) de l'IDO1 sauvage et muté (Benson et Daggett 2012).

Remarque : on utilise souvent le graphique RMSD dans le but de connaître la stabilité d'un complexe, en sachant que plus la RMSD est faible, plus la stabilité de la protéine est importante. Les renseignements significatifs sur la stabilité du complexe sont apportés par les trajectoires RMSF. Lorsque les fluctuations de la trajectoire sont importantes, cela correspond à une flexibilité accrue et à des liaisons peu stables. À l'inverse, si la valeur est faible ou que l'on observe des fluctuations légères, cela révèle qu'il existe des zones correctement structurées au sein du complexe, d'où une déformation réduite (Benson et Daggett 2012).

## **6. Etudes statistiques :**

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Minitab 16.

Les variables qualitatives sont présentées en valeurs absolues et/ou pourcentages (%). Leur comparaison a été faite par le test Khi-deux, alors que les variables quantitatives sont présentées en moyenne  $\pm$  écart type et comparées par le test t de student et une analyse à un facteur (ANOVA) qui a été utilisée pour la comparaison entre plus de deux moyennes. La normalité a été évaluée à l'aide du test de. Quand la valeur de P est supérieure à 0,05, la distribution est Gaussienne, où les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  écart type, et les tests choisis paramétriques.

- Les caractéristiques cliniques, histopronostiques et biomarqueurs du cancer du sein ont été comparés en fonction du taux plasmatique du TRP, KYN et de l'IDO1 par des tests students ,ANOVA. Une p-value inférieure à 0,05 a été considérée comme significative (Lakens et Caldwell 2019).
- Des corrélations de Pearson des régressions linaires simples et multiples,desACP, ainsi que la régression logistique nominale (Saporta 2006) ont été utilisées pour tester l'association entre le taux plasmatique du TRP, KYN et de l'IDO1 et les facteurs de risque du cancer du sein .Une valeur de P <0.005 a été considérée comme statiquement significative. Les valeurs de l'IDO1 a été divisé en quartile (Q1=4,9, la médiane = 6, 24,Q3=8,32 maximum=42,88).
- Les régressions logistiques binaires ont été utilisées afin d'établir des modèles prédictifs du CS à l'aide des facteurs mesurés (la variable de réponse est ici notée Y, qui dénombre les sujets atteints du CS et les témoins , CS étant la valeur de référence. Une p-value inférieure à 0,05 a été considérée comme significative (Nakache Jean-Pierre 2003)
- Les courbes receiver operating characteristic (ROC) et les area under curve (AUC) ont permis d'évaluer les capacités prévisionnelles des modèles choisis .Une valeur de l'AUC élevée signifie que le modèle sépare bien les malades des non malades (Nakache Jean-Pierre 2003).
- Un test de khi 2 a été utilisé pour tester les associations entre le polymorphisme génétique avec l'expression de l'IDO1 ainsi qu'avec les caractéristiques histopronostiques et biomarqueurs du cancer du sein. P <0.005 a été considérée comme statiquement significative. (Leclerc. 1975).

## **8 Justification de l'étude**

Il s'agit d'une approche méthodologique du lien avec le statut en TRP des patientes atteintes de CS .

Ce travail présente les travaux de thèses réunis dans des chapitres, pour répondre aux questions posées en introduction. Environ 140 articles et documents ont constitué la base documentaire de cette recherche.

La doctorante a assuré les travaux de thèse au niveau du laboratoire de Chimie Analytique et électrochimie (Tlemcen, Algérie), pour la partie génétique a été réalisée au niveau de l'école gène life science (Sidi Bel Abbes, Algérie). L'étude in Silico des effets des différents SNP a été réalisé à l'unité de recherche en « Biologie clinique et moléculaire » UR17ES29 (Faculté de de pharmacie de Monastir, université de Monastir, Tunisie



## *Résultats et discussion*

## **1. Description de la population de l'étude**

### **1.1 Les caractéristiques de la population d'étude**

Les caractéristiques de la population étudiée (cas et témoins) sont présentées dans le tableau 1. C'est une étude réalisée sur une population de 352 sujets atteints du CS et appartenant à la région de l'Ouest Algérien (Tlemcen) et 166 Témoins, afin d'étudier les caractéristiques Anthropométriques et biologiques de cette population. (Tableau 1).

Il ressort de cette étude que 81% de la population générale présentent une ménarche tardif ( $\geq 12$  ans). l'âge de ménarche présente une différence significative entre les cas et les témoins ( $p=0.006$ ) (Tableau 1).

64% de la population d'étude ont un IMC  $\geq 26$  KG/M<sup>2</sup>, il existe une différence significative entre les cas et les témoins ( $p= 0.039$ ) (Tableau 1)

74% de la population d'étude ont une glycémie  $\geq 1.2$ . Notre analyse montre une différence entre les cas et témoins (Tableau 1).

Cependant nous ne relevons aucune différence significative entre les cas et les témoins concernant les autres paramètres d'inclusions (Tableau 1) .  
(Tableau 1) .

**Tableau 1:** Caractéristiques générales de la population d'étude.

<b>Paramètres</b>	<b>La population générale</b>	<b>Cas</b>	<b>Témoins</b>	<b>P value</b>
<b>Age (ans)</b>				
<45	27% (142)	29% (103)	24% (39)	0.42
≥45	73% (376)	71% (249)	76% (127)	
<b>Ménopause(ans)</b>				
Oui	29% (148)	26% (92)	34% (56)	0.21
Non	71% (370)	74% (260)	66% (110)	
<b>Ménarche (ans)</b>				
<12	19% (99)	14% (49)	30% (50)	<b>0.00</b>
≥12	81% (419)	86% (303)	70% (116)	
<b>IMC (KG/M<sup>2</sup>)</b>				
≤25	36% (56)	31% (12)	37% (44)	<b>0.03</b>
(26-29.9)	31% (48)	23% (9)	34% (39)	
≥30	33% (51)	46% (18)	29% (33)	
<b>Glycémie (g/l)</b>				
<1.26	26% (40)	41% (16)	21% (24)	<b>0.00</b>
≥1.26	74% (115)	59% (23)	79% (92)	
<b>TRP (µmol/l)</b>				
<54.5	50% (83)	48% (17)	50% (63)	0.70
≥54.5	50% (83)	52% (22)	50% (63)	
<b>ATCD P</b>				
Avec	62% (320)	63% (220)	60% (100)	0.66
Sans	38% (198)	37% (132)	40% (66)	
<b>ATCD F</b>				
Avec CS	27% (137)	25% (87)	30% (50)	0.42
Sans CS	73% (381)	75% (265)	70% (116)	

**KG/M<sup>2</sup>** :Kilogramme/maitre<sup>2</sup> ; **g/l** : gramme/litre; **µmol/l** :micromole/litre

La classification histologique nous a permis de définir deux catégories selon la fréquence d'apparition des cancers dans notre population : les CS de fréquence élevée et les CS de fréquence histologique rare .

Les cancers fréquents du sein représentent 87% des cas (307 cas), le carcinome canalaire infiltrant (CCI) été prédominant représente 79 % (277 cas).

Pour les cancers de fréquence histologique rares du sein, nous les retrouvons à 13% (45 cas) répartis respectivement en : carcinome in situ (DCIS) 6.5% (23 cas) des cas, le papillome (PM) 3% (11 cas); le mucineux MC ( ou colloïde) 2% (8 cas) et le phylloïde (PT cas) 1.5% (3 cas ).

L'âge moyen des patientes qui présentent les cancers les plus fréquents est de 50 ± 11ans. L'âge moyen des patientes qui présentent un cancer de fréquence rare est de 47±11ans.

## ***Résultats et discussion***

Les trois quart (72 %) des cas exprimant un cancer fréquent ont un âge  $\geq 45$ ans, de même plus de la moitié (69 %) des cas exprimant un cancer rare ont un âge  $\geq 45$ . ( $p=0.6$ ) (Tableau 2).

Explorer par les paramètres d'agressivité tumorale (T, N, M et grade SBR), il ressort de notre étude une différence significative quant à la taille tumorale, l'envahissement ganglionnaire et le grade SBR chez les patientes exprimant un cancer fréquent par rapport aux patientes exprimant un cancer rare ( $p < 0.05$ ) (Tableau 2).

Une taille tumorale supérieur à 2 cm (T2-T4) est retrouvée chez 85% des cas exprimant un cancer fréquent et chez 73% des cas exprimant un cancer rare ( $p=0.03$ ) (Tableau 2).

La moitié (49%) des cas exprimant un cancer rare ont un envahissement ganglionnaire. De même chez 68% des cas exprimant un cancer fréquent ( $p = 0,006$ ) (Tableau 2).

Un grade SBR élevée (II-III) est retrouvé chez 97% des patientes qui expriment un cancer fréquent et chez 91% des cas qui expriment un cancer rare ( $p=0.03$ ) (Tableau 2).

Concernant les biomarqueurs du CS (RH, HER2 et KI67) notre analyse montre une différence significative dans l'expression des RH, des HER2 chez les patientes qui ont un cancer fréquent par rapport aux patientes qui ont un cancer rare (Tableau 2).

65% des cancers fréquent et 78 % des cancers rares sont des RH positives ( $p=0.04$ ). L'oncogène HER2 est négative chez 86% des cancers rares et chez 60% des cancers fréquents ( $p=0.00$ ) (Tableau 2).

Pour l'indice mitotique KI67 ; 48% des patientes expriment un KI67  $\geq 20$  (Tableau 2).

**Tableau 2:**Caractéristiques cliniques, tumorales des patientes atteintes du CS

Paramètres	Population des cas (352)	Cancers fréquent (307)	Cancers rares (45)	P value
<b>L'âge</b>				
<45 ans	29% (101)	28 % (87)	31% (14)	0,642
≥45ans	71% (251)	72 % (220)	69 % (31)	
<b>L'âge de ménarche</b>				
<12 ans	14% (49)	14% (42)	16% (07)	0,692
≥12ans	86% (303)	86 % (265)	84% (38)	
<b>La ménopause</b>				
Oui	26% (92)	25% (77)	33% (15)	0.21
Non	74% (260)	74% (230)	66% (30)	
<b>Taille tumorale(Tcm)</b>				
T1	17% (59)	15 % (47)	27 % (12)	<b>0,03</b>
T2 -T4	83% (293)	85 % (260)	73 % (33)	
<b>Ganglions</b>				
N0	34% (120)	32 % (97)	51 % (23)	<b>0,00</b>
N1	66% (232)	68 % (210)	49 % (22)	
<b>M</b>				
M0	88% (312)	88 % (271)	91 % (41)	0,48
M1	12% (40)	12% (36)	09 % (04)	
<b>Grade SBR</b>				
SBRI	3% (11)	02 % (7)	09 % (04)	<b>0,03</b>
SBRII-SBRIII	97% (341)	98 % (300)	91 % (41)	
<b>RE</b>				
RE+	66% (234)	65 % (199)	78% (35)	<b>0,04</b>
RE-	34% (118)	35 % (108)	22 % (10)	
<b>RP</b>				
RP+	66% (232)	64 % (197)	78 % (35)	<b>0,02</b>
RP-	34% (120)	36 % (110)	22 % (10)	
<b>HER2</b>				
HER2+	37% (129)	40 % (123)	14 % (06)	<b>0,00</b>
HER2-	63% (223)	60 % (184)	86 % (39)	
<b>KI67</b>				
< 20	75% (108)	48 % (148)	60% (27)	0,21
≥20	92% (178)	52 % (160)	40 % (18)	

**T1** : ≤2 cm ; **T2** : ≥2 cm ; **N0** : envahissement ganglionnaires négatif ; **N1** : envahissement ganglionnaires positif ; **M0** : sans métastase, **M1** : avec métastase ; **SBRI** : tumeur moins agressive. **SBRII-SBRIII**: tumeur plus agressivees .

### 1.2 La variabilité histologique selon les biomarqueurs et l'agressivité tumorale

Notre population d'étude est caractérisée par une variété de phénotype hormonale (RH).

Dans la population des cancers rares, les patientes de phénotype RE négative sont 2 fois plus associé à une taille tumorale supérieur à 2 cm et 4 fois plus associé aux grade

SBR élevée par rapport au patientes de phénotype RE+ ( $p=0.001$ ; OR=2.42;  $p=0.04$ ; OR=4.19 respectivement). Tandis que dans la population des cancers fréquents ne montrent aucune association (OR<2) (Tableau 3).

L'analyse de la régression binaire montre aussi que les patientes présentant un CS rare et n'expriment pas les RE sont 4 fois plus associé à l'envahissement ganglionnaire comparativement aux patientes qui expriment un RE+ ( $p=0.02$  ; OR=4.46) (Tableau 3).

Concernant l'expression des RP dans les cancers rares, l'analyse de la régression montre aussi que l'absence des RP est associée aux paramètres d'agressivité tumorale par rapport à l'expression des RP (Tableau 3).

Tandis que l'absence des RP dans les cancers fréquents ne montre aucune association (Tableau 3).

Les patientes qui ont un cancers rares et sont de phénotype RP- sont associé 3 fois plus à une taille tumorale  $\geq 2$ cm, 7 fois plus au grade SBR élevée et 4 fois plus à l'envahissement ganglionnaire comparativement aux patientes qui sont de phénotype RP+ ( $p=0.00$  ; OR=2.79 ;  $P=0.01$  ; OR=7 ;  $p=0.02$ , OR=4 respectivement) (Tableau 3).

Les patientes qui ont un cancers rares et sont de phénotype RP- sont associé 3 fois plus à une taille tumorale  $\geq 2$ cm, 7 fois plus au grade SBR élevée et 4 fois plus à l'envahissement ganglionnaire comparativement aux patientes qui sont de phénotype RP+ et aucune association dans la population des cancers fréquents (Tableau 3) .

Concernant l'indice de prolifération tumorale KI67 l'expression élevée du ki67  $\geq 20$  sont 2 fois plus associé à une taille tumorale supérieur à 2 cm par rapport aux patientes qui ont un ki67 <20 (OR=2.19 ;  $p=0.02$ ) et aucune association dans la population des cancers fréquents (Tableau 3)

L'expression du ki67 ne montre aucune association avec les autres paramètres d'agressivité tumorale ( $p>0.05$ ) (Tableau 3)

**Tableau 3:** L'expression des biomarqueurs du CS (RH, HER2, KI67) en fonction des paramètres de l'agressivité tumorale dans la population des cancers rares et fréquents.

Paramètres	Cancers fréquents	Cancers rares
	OR (Z ; P-value ; CI 95%)	OR (Z ; P-value ; CI 95%)
	<b>RE (RE-/RE+)</b>	
<b>Taille tumorale</b>	1.45 (2.84; 0.00; 1.12-1.88)	2,42 (2,38 ; 0,01 ; 1.16-5.01)
<b>Grade SBR</b>	1.49 (1.72; 0.08; 0.94-2.35)	4.19 (2.04 ; 0.04 ; 1.05-1.16)
<b>Ganglions</b>	1.62 (2.64 ; 0.00 ; 1.13-2.33)	4.46 (2.19; 0.02 ; 1.16-17.07)
	<b>RP (RP-/RP+)</b>	
<b>Taille tumorale</b>	1.36 (2.38 ; 0.00 ; 1.05-1.76)	2.79 (2.65 ; 0.00 ; 1.30-5.96)
<b>Grade SBR</b>	1.89 (2.93 ; 0.00 ; 1.25-3.14)	7.19 (2.56 ; 0.01 ; 1.58-32.60)
<b>Ganglions</b>	1.64 (2.69 ; 0.00 ; 1.14-2.36)	4.46 (2.19 ; 0.02 ; 1.16-17.07)
	<b>KI67(&lt;20/ ≥20)</b>	
<b>Taille tumorale</b>	1.56 (3.12 ; 0.00 ; 1.18-2.07)	2.19 (2.28 ; 0.02 ; 1.11-4.31)
<b>Grade SBR</b>	1.22 (0.88 ; 0.37 ; 0.77-1.92)	2.08 (1.40 ; 0.162 ; 0.74-5.8)
<b>Ganglions</b>	1.19 (0.97 ; 0.33 ; 0.83-1.70)	1.07(0.14 ; 0.89 ; 0.39-2.93)

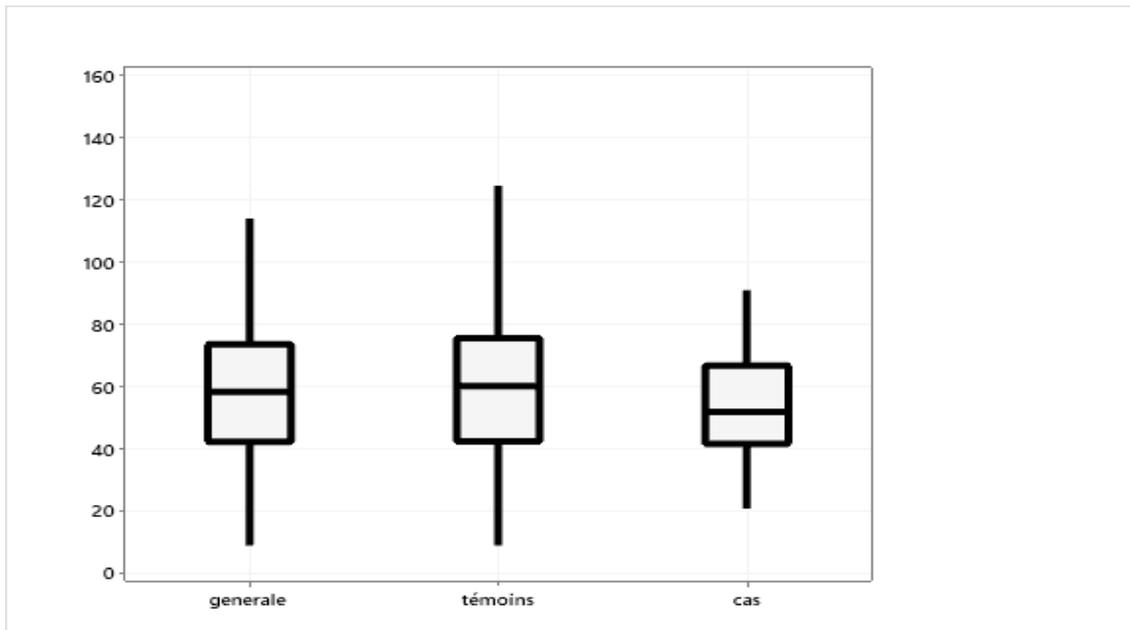
**OR:** odds ratio, **IC:** intervalle de confiance.

## 2. prédiction du statut du TRP

### 2.1 La concentration plasmatique du TRP

La figure 1 représente la distribution (médiane, quartiles) dans la population générale, la population témoins et la population cancéreuse (figure 1).

En ce qui concerne le métabolisme du TRP, la concentration moyenne plasmatique de TRP dans la population générale était de  $59.32 \pm 24.015 \mu\text{mol/L}$ , dans la population cancéreuse était de  $54.456 \pm 18.96 \mu\text{mol/L}$  et de  $60.83 \pm 24.015 \mu\text{mol/L}$  chez les témoins (figure 1).



**Figure 1:** Distribution de la concentration plasmatique de TRP dans la population d'étude

## 2.2 Distribution de la concentration du TRP chez les témoins et les cas

Nous avons réparti la population cancéreuse et la population témoins en fonction de la concentration plasmatique du TRP, en utilisant la médiane en 2 catégories : une population à dégradation accrue du TRP et une population à concentration élevée.

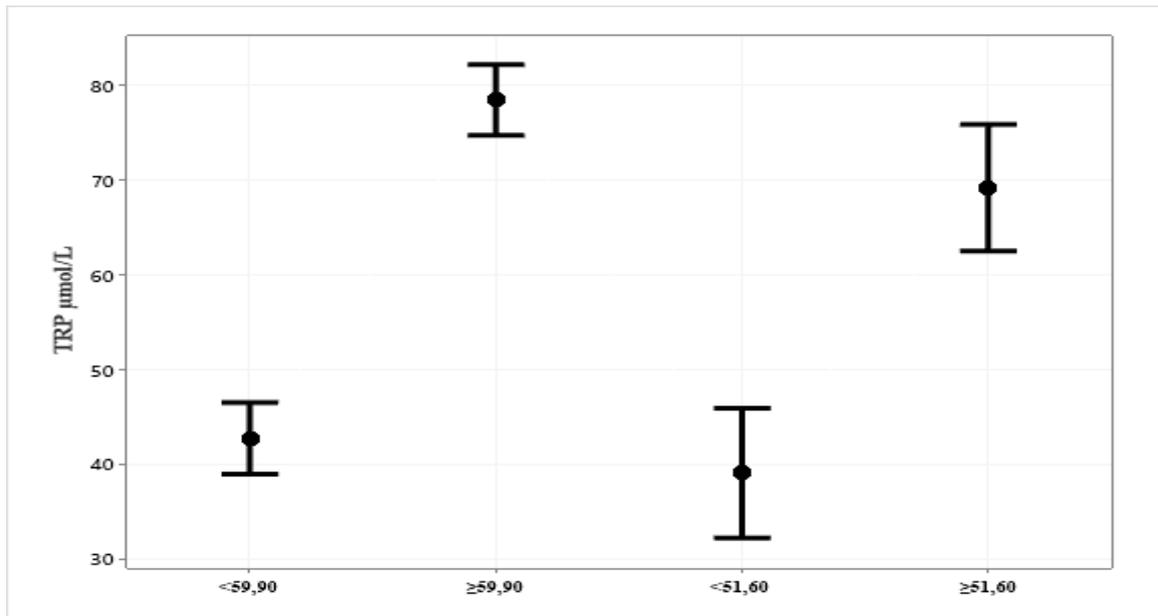
La figure 2 illustre la distribution de la concentration plasmatique du TRP en fonction de la médiane.

La concentration médiane pour l'ensemble de la cohorte est de 54,5  $\mu\text{mol/l}$ .

En particulier, la concentration médiane pour les patientes atteintes du CS est de 51.60 $\mu\text{mol/L}$  (Figure 2).

Tandis que la concentration médiane pour les témoins est de 59.90  $\mu\text{mol/l}$  (Figure 2).

L'analyse de variance montre une différence significative dans la concentration plasmatique du TRP entre les témoins et les cas ( $p=0.004$ ), les témoins avaient des taux plasmatiques plus élevés par rapport aux cas (Figure 2).

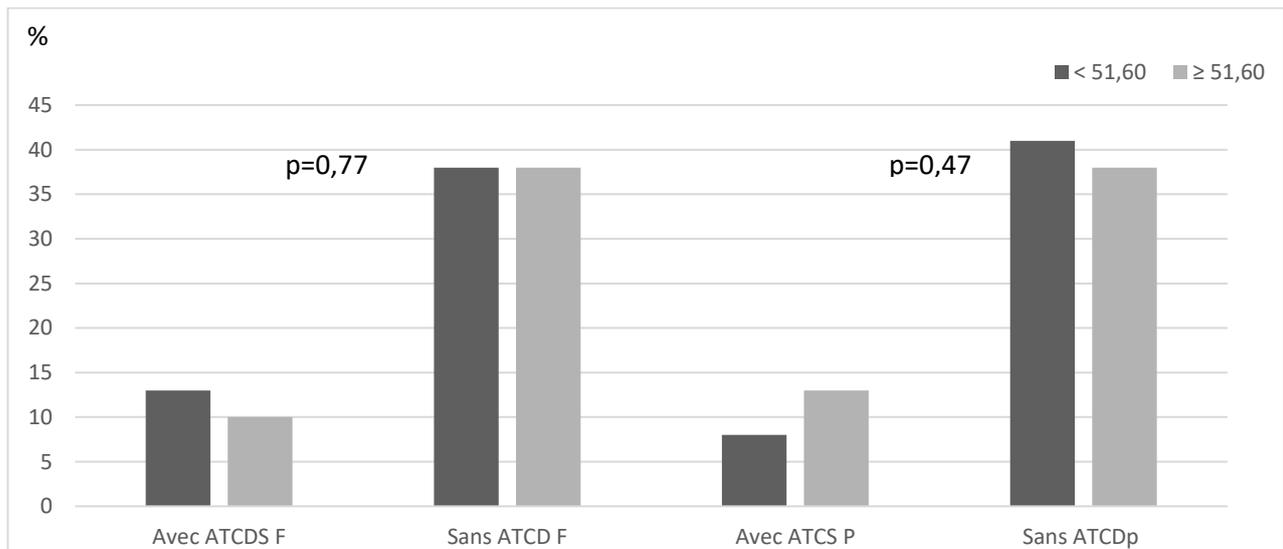


**Figure 2:** Analyse de variance des concentrations de TRP chez les patientes atteintes du CS

Dans notre population 23% (9 cas) ont un cancer dans la famille (ATCD F). 10% ont une concentration plasmatique de TRP faible ( $<5.6$ ) (Figure 3).

Le test khi2 ne montre aucune différence significative entre les patientes exprimant une concentration plasmatique élevée de TRP et la présence des ATCD F de cancer ( $p=0.77$ ) (Figure 3).

Concernant la présence des antécédents personnels (ATCD P) de diabète ; 23% des patientes ont des ATCD P. 13% présentent une concentration faible de TRP. Le test khi2 ne montre aucune différence significative entre la présence de diabète et le taux plasmatiques de TRP ( $p=0.47$ ) (Figure 3).



**Figure 3:** La Fréquence des ATCD F et ATCD P selon le taux plasmatique de TRP

### 2.3 Le statut du TRP en fonction de l’agressivité et aux biomarqueurs tumoraux

Le tableau 4 résume la distribution de la concentration plasmatique du TRP selon les paramètres de l’agressivité tumorale et les biomarqueurs du CS (Tableau 4).

Nous n’avons pas trouvé une différence significative du taux plasmatique du TRP en fonction de toutes les caractéristiques tumorales du CS ( $p > 0.05$ ) (Tableau 4).

Dans la population à concentration élevée de TRP, l’analyse des moyennes, montre une différence significative entre les cas et les témoins (Tableau 4).

La concentration est significativement plus élevée chez les cas avec une  $p = 0.047$  (Tableau 4).

Dans la population à concentration élevée du TRP, les patientes présentent une concentration moyenne du TRP plus élevée que les témoins (Tableau 4)

Notre analyse montre que la dégradation accrue du TRP est significativement plus élevée dans les tumeurs agressives ( $p = 0.00$ ). Dans la population à dégradation accrue toutes les patientes avaient une taille supérieure à 5 cm (T2-T3) (Tableau 4).

Dans la population à dégradation accrue du TRP, Les patientes avec RE- ont une moyenne de concentration de TRP très faible par rapport aux patientes avec RE+ (Tableau 4).

La dégradation du TRP était aussi plus élevée chez les patientes qui ont une surexpression du KI67  $\geq 20\%$  ( $p < 0,05$ ) (Tableau 4).

**Tableau 4 :** Distribution de la concentration plasmatique du TRP en fonction des facteurs de l'agressivité tumorale et les biomarqueurs du CS

Les paramètres	TRP (µmol/l)					
	Moyenne ± écart type			p value		
	Population totale		<51.6 (µmol/l)		≥51.6 (µmol/l)	
<b>Age</b>						
≤45 ans	46.61±17.19	0,19	37.53±12.46	0.93	64.79±3.34	0.82
>45 ans	57.79±19.54		39.41±8.37		69.88±143.32	
<b>Taille tumorale (T cm)</b>						
T1	69.56±20.41	<b>0,00</b>	0		69.56±2.04	0.69
T2-T4	53.63±19.13		39.01±9.00		69.07±14.08	
<b>Ganglions</b>						
N0	60.49±24.72	0,50	28.759 (1 cas)		71.07±15.66	0.79
N1	53.76±18.52		39.58±8.90		68.77±13.39	
<b>Grade SBR</b>						
SBRI	55.22±18.48	0,54	40.62±8.02	0.07	69.82±13.66	0.27
SBRII-II	50.93±22.25		30.42±10.75		66.30±13.34	
<b>RE</b>						
RE+	53.15±17.42	0,49	40.46±8.34	<b>0.03</b>	68.57±12.15	0.81
RE-	59.49±24.80		26.74±2.84		70.40±16.96	
<b>RP</b>						
RP+	53.47±17.62	0,56	40.76±8.64	0.14	68.57±12.15	0.81
RP-	57.72±23.80		32.47±8.10		70.40±16.96	
<b>HER2</b>						
HER2+	56.85±22.48	0,76	38.72±13.24	0.97	68.94±19.18	0.98
HER2-	54.10±18.75		39.05±8.90		69.12.84	
<b>KI67</b>						
<20	60.35±16.90	<b>0,00</b>	40.38±10.19	0.54	69.52±13.56	
≥20	42.66±17.81		37.78±8.13		61.42 (1 CAS)	

**µmol/l** :micromole/litre **T1** : ≤2 cm ; T2 : ≥2 cm ; **N0** : envahissement ganglionnaires négatif ; **N1** : envahissement ganglionnaires positif ; **SBRI** : tumeur moins agressive. **SBRII-SBRIII**: tumeur plus agressives .

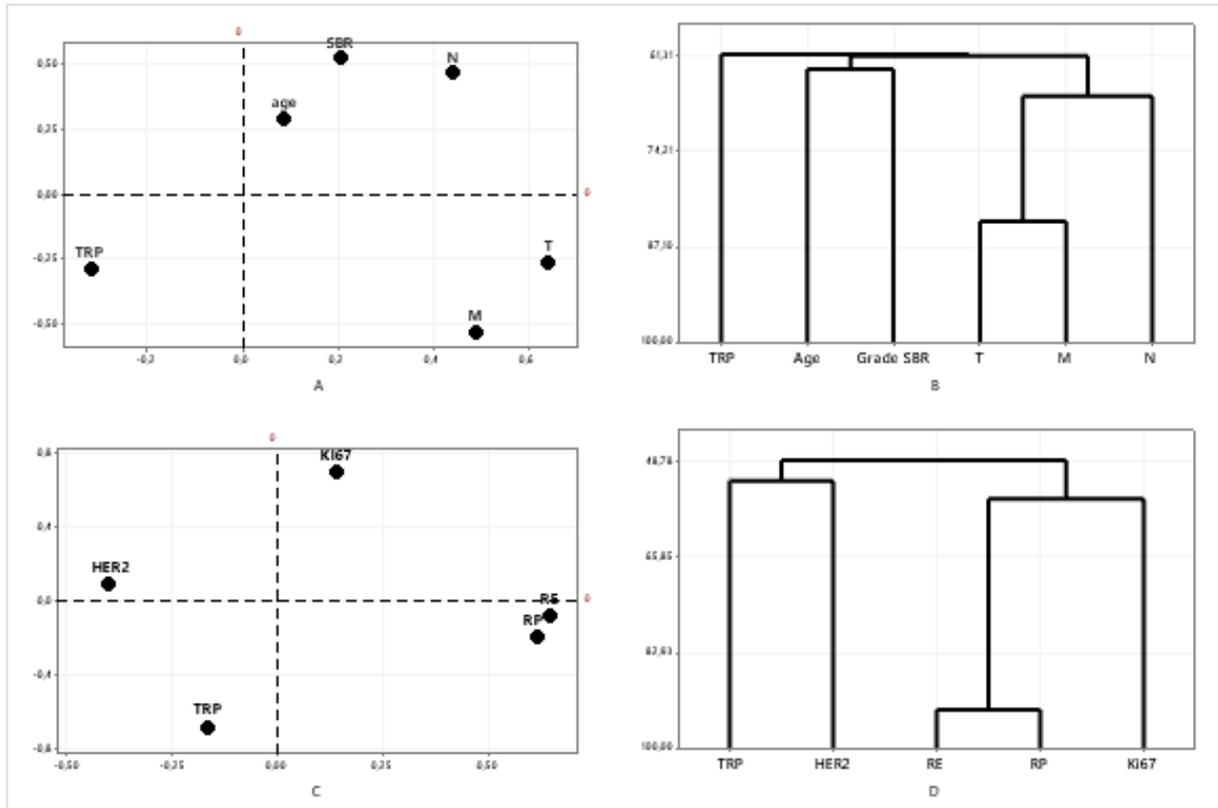
La figure4 ci-dessous présente des Plans d'ACP 1-2 et des dendrogrammes de taux plasmatique de TRP selon les différents facteurs d'agressivité et biomarqueurs du CS.

Dans la figure 4.A le plan ACP avec une inertie de 54%, montre une corrélation inversée entre la concentration plasmatique du TRP et l'envahissement ganglionnaire( $r=-37\%$ ,  $p=0.02$ ). 90% des patientes (35 cas) ont un envahissement ganglionnaire, parmi elles 51% (18 cas) présentent une dégradation accrue du TRP (figure 4.A-B).

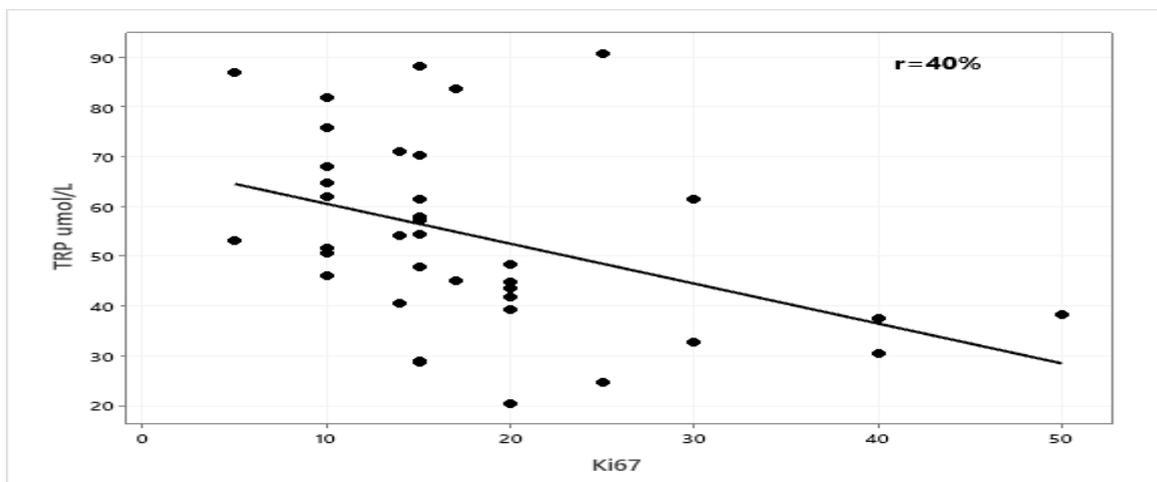
Le TRP montre aussi une liaison inversée avec le grade SBR (figure 4.B).On note une dégradation accrue de TRP chez les patientes avec un grade SBR III (proche de signification  $p=0.07$ ) par rapport aux patientes avec un grade SBR II. (Tableau 4-figure 4.A-B.)

Dans la figure 4.C le plan ACP 1-2 avec une inertie de 84% montre aussi une corrélation inversée entre la concentration plasmatique du TRP et le KI67 ( $r=40\%$  ;  $p=0.011$ ) (figure-4-c et figure 5). Les patientes avec un taux plasmatique faible de TRP présentent un KI67 élevé  $\geq 20$  ( $p<0.005$ ) (Tableau 4).

Le dendrogramme montre aussi une liaison du TRP avec HER2. Ces 2 facteurs s'opposent avec l'expression des RH (figure 4.D). 43% des patientes avec RE+ présentent un taux faible de TRP ( $p=0.037$ ) (Tableau 4).



**Figure 4:** Les plans des ACP et des dendrogrammes des différents facteurs de l'agressivité et les biomarqueurs du CS

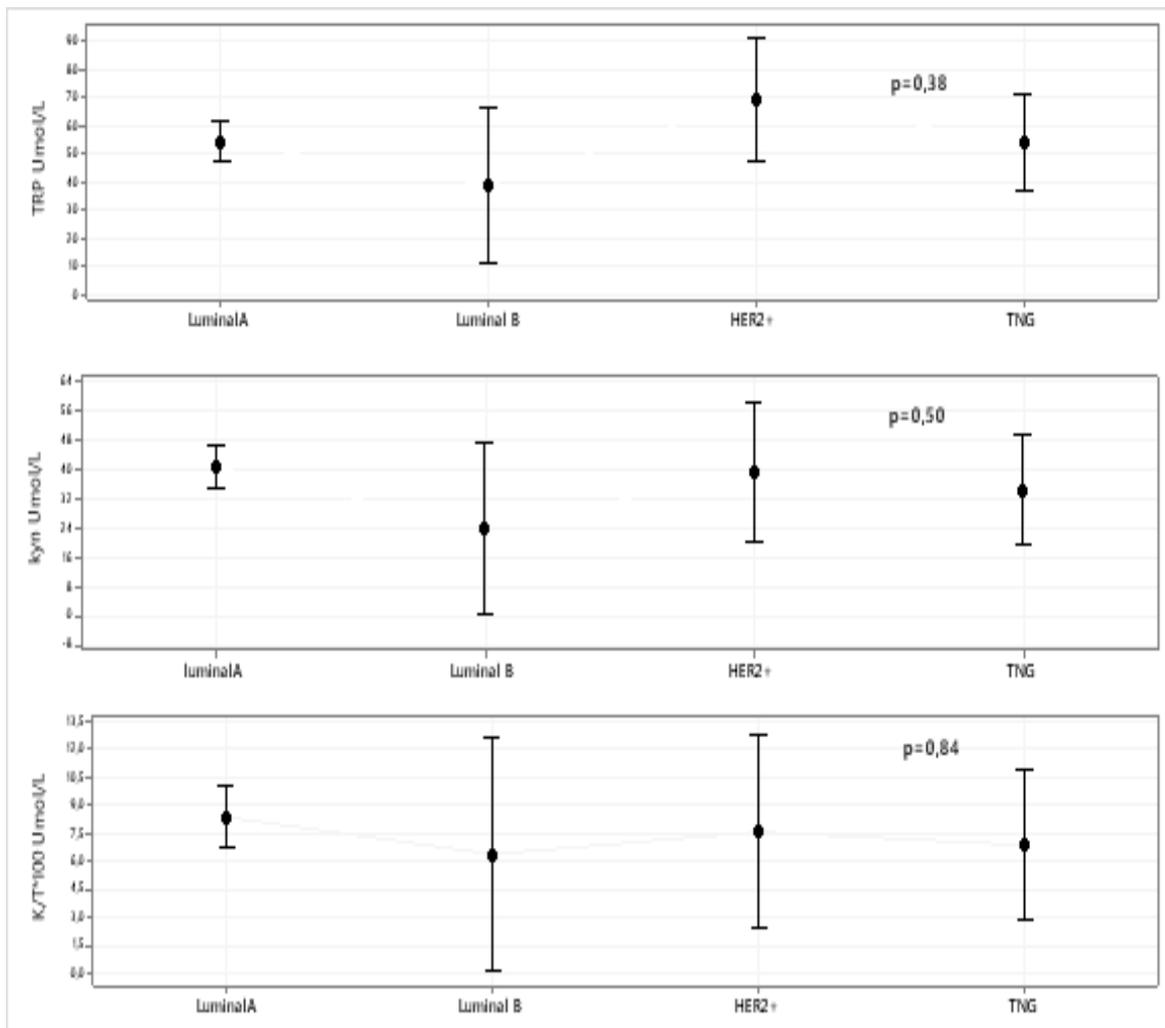


**Figure 5:** Corrélation entre le taux plasmatique de TRP et le KI67 chez les patientes atteintes du CS

#### 2.4. Distribution des paramètres du métabolisme de TRP selon le statut moléculaire des patientes atteintes du CS

Les niveaux des concentrations plasmatiques de TRP, KYN et IDO sont distribués selon le statut moléculaire des patientes atteintes du CS (figure 6).

Nous n'avons pas trouvé une différence significative entre les moyennes des taux plasmatiques du TRP, KYN et IDO 1 entre les patientes exprimant un profil moléculaire différent (Luminal A, Luminal B, HER2+ et TNG) (figure 6).



**Figure 6:** Analyse de variance des moyennes des taux de TRP,KYN,IDO1 selon le statut moléculaire des patientes atteintes du CS.

### 2.5 Analyse de l'association entre le taux plasmatique de TRP et le statut hormonal des patientes atteintes de CS

La régression multiple, montre que le taux plasmatique de TRP est significativement lié ( $p < 0.05$ ) à la ménarche précoce avant 12 ans et à la ménopause tardive ( $\geq 50$  ans) (Tableau 5) avec une équation de régression :

$\text{TRP } (\mu\text{mol/L}) = 42.35 + 17.08 \text{ ménarche} - 8.58 \text{ ménopause} + 7.41 \text{ allaitement} - 12.83 \text{ parité} - 3.69 \text{ prise de CO}$ .

Tandis qu'il n'existe aucune association entre le taux plasmatique de TRP, la durée d'allaitement, la multiparité et la prise de CO ( $p > 0.05$ ) (Tableau 5)

**Tableau 5:** Régression multiple du statut hormonal en fonction du taux plasmatique du TRP chez les patientes atteintes du CS

Facteurs hormonaux endogènes	Coefficients	Coefficients	<i>P value</i>
Constante	42.35	9.94	0.00
Ménarche précoce (<12 ans)	17.08	6.94	<b>0.01</b>
Ménopause tardive ( $\geq 50$ ans)	-8.58	3.75	<b>0.02</b>
Allaitement (24 mois)	7.41	4.85	0.13
Multiparité	-12.83	8.10	0.12
CO ( $\geq 5$ ans)	-3.69	5.13	0.47

CO : contraception orale

### 2.6 L'âge, le taux de glycémie, le taux de TRP comme facteurs prédictifs dans le survenue du CS

Le tableau 6 présente un modèle de prédiction pour tester les facteurs associés au risque de CS qui sont actuellement proposés par la littérature. Le premier modèle ne montre aucune association significative entre le TRP, KYN, IDO1 et risque de développer un CS ( $p > 0.05$ ) (Tableau 6).

Tandis que le modèle 1 était ajusté avec l'Age et la glycémie et rend le facteur TRP significativement associé au risque de CS ( $p > 0.05$ ) (Tableau 6)

**Tableau 6:** Résultats du modèle de régression logistique des facteurs prédictifs (TRP, KYN, IDO1, glycémie, âge ) dans la survenue du CS

Les prédicteurs	Coefficients	Z (Wald)	p-value	OR	IC à 95%
<b>Model1(non ajusté, REF :1)</b>					
Constante	-0.63	-054	-0.59		
TRP (µmol/L)	0.037	1.75	0.08	1.03	(0.99-1.08)
KYN (µmol/L)	-0.34	-1.32	0.18	0.71	(0.42-1.17)
IDO1(µmol/L)	0.12	1.12	0.26	1.13	(0.90-1.41)
<b>Model 2 (ajusté, REF:1)</b>					
Constante	-5.50	-3.36	0.00		
TRP (µmol/L)	0.03	1.97	<b>0.04</b>	1.03	(1-1.08)
KYN (µmol/L)	-0.37	-1.51	0.13	0.68	(0.42-1.11)
IDO1(µmol/L)	0.08	0.90	0.36	1.09	(0.90-1.32)
Age(ans)	0.06	3.26	<b>0.00</b>	1.06	(1.05-1.10)
Glycémie (g/L)	1.01	3.17	<b>0.00</b>	2.75	(1.47-5.13)

**OR:** odds ratio, **IC:** intervalle de confiance,

Les facteurs prédictifs, le taux de TRP, l'âge et le taux de glycémie dans le modèle logistique 2 sont associés au risque de CS ( $p > 0.05$ )

Il apparait que les patientes avec une dégradation accrue de TRP sont plus exposées au risque de CS par rapport aux femmes avec un taux de TRP élevé ( $\geq 54,5 \mu\text{mol/L}$ ) (Tableau 6)

Les patientes avec un taux de glycémie supérieur  $> 1.6 \text{ g/L}$  sont deux fois plus exposées au risque de CS par rapport aux femmes avec une glycémie  $\leq 1.6 \text{ g/L}$  (OR=2; 95% CI=1.47-5.13 ,  $P=0.00$ ).

En tenant compte du facteur âge, les patientes âgées de moins de 58 ans sont pratiquement plus exposées au risque du CS par rapport aux femmes âgées de 58 ans et plus.

Le test d'adéquation de l'ajustement par la méthode de Pearson, somme des carrés d'écart, Hosmer-Lemeshow ( $> 0.05$ ) acceptent le modèle logistique (Tableau 7).

**Tableau 7:** Test d'adéquation de l'ajustement

Test	DL	Khi deux	Valeur de p
Somme des carrés des écarts	149	145,37	0,56
Pearson	149	3624,98	<b>0,00</b>
Hosmer-Lemeshow	8	11,68	0,16

**DL:** degré de liberté

Le D de Somers, le Gamma de Goodman-Kruskal et Tau a de Kendall sont résumés dans le tableau des paires concordantes et discordantes (Tableau 8).

Test de D de Somers (0.66) et le Goodman-Kruskal (0.66) indiquent que le modèle est de meilleures capacités de prévision (Tableau 8).

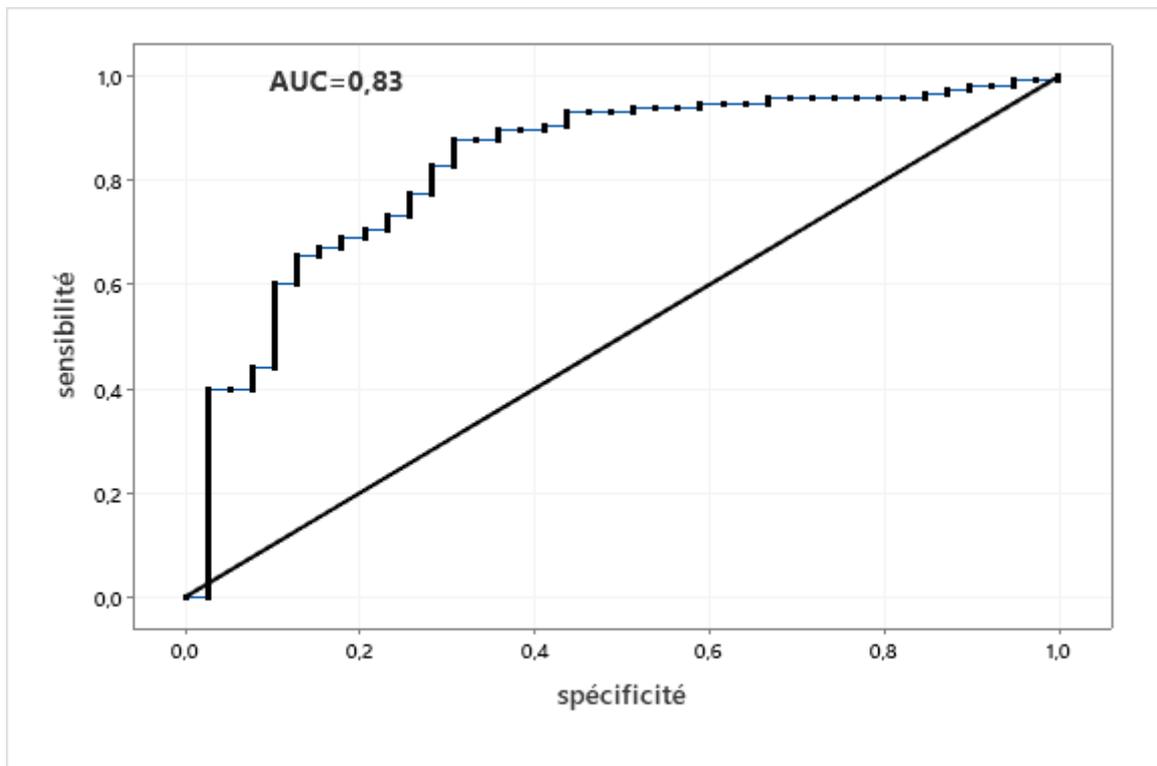
Le Tau a de Kendall donne une capacité de prévision relativement basse (0.25) (Tableau 8).

Pour les capacités prévisionnelles de notre modèle, on note un pourcentage très fort de paires concordantes (83%). (Tableau 8).

**Tableau 8:** Mesures d'association entre la variabilité de réponse et les facteurs prédictifs du CS (TRP, KYN, IDO1, âge, glycémie)

Paires	Nombre	Pourcentage	Mesures récapitulatives	Valeur
Concordantes	3751	82,9	D de Somers	0,66
Discordantes	760	16,8	Gamma de Goodman-Kruskal	0,66
Ex aequo	13	0,3	Tau a de Kendall	0,25
Total	4524	100,0		

Notre modèle de prévision montre avec la Fonction d'efficacité (courbe ROC) un AUC =0.83, la valeur de l'AUC montre que ce modèle logistique a une discrimination excellente (figure 7)



**Figure 7:** La courbe ROC du modèle des facteurs prédictifs (TRP,KYN,IDO1,age, glycémie) associé à la survenue du CS

## **2.7 Discussion**

Dans l'ensemble, il y a peu de recherches sur la dégradation du TRP chez les patientes atteintes du CS. La majorité des études sur le CS n'a pas établi la corrélation entre les caractéristiques tumorales et le taux plasmatique du TRP, KYN, et KYN/TRP ratio, par rapport aux autres types de cancer (Botticelli et al. 2018; Creelan et al. 2013)

Le but de notre étude est d'abord d'analyser le taux plasmatique du TRP et KYN dans le plasma des patientes atteintes du CS et des témoins, puis tester l'association des niveaux d'IDO avec l'agressivité tumorale et les biomarqueurs du CS.

Malgré les recherches effectuées sur l'IDO 1, il s'agit de la première étude en Algérie et en Afrique qui évalue le niveau plasmatique de TRP et son métabolite en fonction des caractéristiques tumorales du CS.

Comme facteur corrélé aux facteurs de risques classiques de CS (envahissement ganglionnaire et l'indice mitotique KI67). Dans notre population d'étude le TRP est aussi associé à l'âge de survenue du CS et à une glycémie supérieure à 1.6 g/L.

La concentration moyenne du TRP dans le sang varie selon les études. Une de ces dernières, indique que les concentrations de TRP libre est entre 40 à 100  $\mu\text{mol/L}$  (Anderson et al. 1987) Une étude plus récente montre que la concentration du TRP libre est entre 50 à 60  $\mu\text{mol/L}$  (Favennec. 2015 ). Cela montre que la concentration plasmatique moyenne de TRP chez les témoins de notre étude est un peu élevée ( $60.82 \pm 24.01$ ). Tandis qu'une autre étude utilise la médiane pour comparer entre la concentration élevée et faible du TRP (Lyon et al. 2011)

En général, divers cancers ont été signalés comme étant liés aux changements du TRP et de ses métabolites dans le corps humain, tel que le CS (Gómez-Cebrián et al. 2021; Li et al. 2022). Dans notre population d'étude il n'existe pas une différence significative dans la concentration plasmatique du TRP entre cas et témoins. Des études précédentes retrouvent des taux plasmatique du TRP significativement plus faible chez les patientes atteintes du BS par rapport au témoins (Greene et al. 2019; Onesti et al. 2019) Tandis que dans l'étude de Lyon et al les femmes atteintes d'un CS avaient des niveaux supérieur de TRP (Lyon et al. 2011) Une diminution significative des concentrations du TRP entre le groupe du CS et le groupe témoin était positivement corrélée avec la progression du CS (Eniu et al. 2019). Toutefois, les résultats de la littérature restent contradictoires.

Les tumeurs histologiquement similaires du sein peuvent avoir des pronostics différents et répondre différemment au traitement, en raison du métabolisme tumoral différent Il existe une différence entre le taux plasmatique du TRP, KYN et de l'IDO1 en fonction de l'agressivité tumorale et en fonction du profil hormonal (Gómez-Cebrián et al. 2021) .

A notre connaissance il existe que deux études sur le CS qui ont déterminé une corrélation entre la concentration plasmatique du TRP , KYN et l'IDO1 avec les

caractéristiques tumorales du CS (grade SBR, TNM, HR, HER2, KI67) (Onesti et al. 2019; Soliman et al. 2013)

Le TRP était significativement plus faible chez les patientes atteintes du CS grade III / IV (Greene et al. 2019). Les mêmes résultats étaient trouvés dans une autre étude qui observe que la dégradation de TRP était plus rapide dans les tumeurs les plus grandes par rapport aux tumeurs de grade II et III. Cette étude compare aussi le niveau du TRP selon la taille tumorale des patientes ; les résultats montrent que le niveau du TRP était élevé dans les tumeurs T1 (<5cm) (Onesti et al. 2019); ce qui concorde avec nos résultats.

Notre analyse montre que la dégradation accrue du TRP est significativement plus élevée dans les tumeurs agressives ( $p=0.00$ ). Dans la population à dégradation accrue, toutes les patientes avaient une taille supérieure à 2 cm (T2-T4).

Plusieurs études ont montré une association entre le microenvironnement tumoral des ganglions lymphatiques et la dégradation du TRP ainsi que l'expression de l'IDO1 dans le CS (Asghar et al. 2021; Ye et al. 2019).

L'IDO et le TDO sont générés par les cellules tumorales endothéliales et immunitaires des ganglions lymphatiques drainant les tumeurs (Liu et Zhai 2021; Opitz et al. 2020) . Notre étude montre une corrélation inversée entre le taux plasmatique de TRP et l'envahissement ganglionnaire ( $r=-37\%$ ,  $p=0.02$ ).

En général le métabolisme des acides aminés dans le CS montre une différence significative selon les biomarqueurs de CS entre les ER- et ER+ (Gómez-Cebrián et al. 2021; Greene et al. 2019). Cette différence peut avoir un impact direct sur le comportement tumoral et les phénotypes cliniques des patientes (Lyon et al. 2011; Soliman et al. 2013). La valeur médiane du taux plasmatique de TRP était plus faible ( $42.00\pm 8.88$   $\mu\text{mol/L}$ ) chez les patientes avec ER- par rapport aux patientes ER+ ( $45.47\pm 11.26$   $\mu\text{mol/L}$ ) avec une p value significative ( $p=0.016$ ) (Onesti et al. 2019).Tangue et al montrent que le taux plasmatique du TRP ne varie pas en fonction du RE+ et RE- mais le niveau de la KYN et l'IDO1 sont élevés dans les tumeurs RE-(Tang et al. 2014). D'autres études montrent que les patientes ER- sont caractérisées par un taux plasmatique du TRP faible (Greene et al. 2019; Onesti et al. 2019). Les moyennes des concentrations de TRP chez les patientes ER- étaient de  $24.74\pm 2.84$   $\mu\text{mol/L}$  ; tandis que chez les patientes ER+ était  $40.46\pm 8.34$   $\mu\text{mol/L}$  avec une  $p=0.037$ .

Selon la littérature, le taux plasmatique du TRP en fonction du statut moléculaire des patientes atteintes du CS, aucune différence n'a été retrouvée dans les quatre sous types moléculaires (Kim et al. 2017; Onesti et al. 2019) ; ce qui concorde avec nos résultats. Les tumeurs TNG sont caractérisées par un taux de TRP plus faible, une concentration de KYN et de l'IDO légèrement élevée (Kim et al. 2017).

Concernant l'oncogène HER2, les études publiées s'intéressent plus, au profil hormonal car ce dernier à un intérêt pronostique et thérapeutique. La valeur médiane du taux plasmatique du TRP était  $43.66\pm 10.16$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $44.93\pm 11.09$   $\mu\text{mol/L}$  chez les patientes HER2+ HER2- respectivement avec une  $p=0.31$ (Onesti et al. 2019). Ce qui concorde avec

non résultats, les patientes avec HER2+ expriment un taux plasmatique moyen de TRP de  $56.85 \pm 22.48$   $\mu\text{mol/L}$  et les patientes avec HER- expriment un taux plasmatique moyen de TRP de  $54.10 \pm 18.75$   $\mu\text{mol/L}$  avec une  $p$  non significative ( $p=0.76$ ).

Une étude a corrélié le KI67 avec 399 métabolites différents. Les résultats montrent de fortes corrélations avec certains métabolites dans les cellules à croissance rapide (Tang et al. 2014). Dans notre étude nous avons trouvé une corrélation inversée entre le taux plasmatique du TRP et le KI67 ( $r=-40\%$  ;  $p=0.01$ ). On observe aussi une dégradation accrue du TRP chez les patientes qui ont l'indice de prolifération KI67 élevé ( $\geq 20$ ). Ces résultats ne concordent pas avec les résultats de Onesti et al qui ne trouvent aucune corrélation dans le taux plasmatique du TRP et l'expression du KI67 (Onesti et al. 2019).

L'étude analytique par régression multiple de la concentration plasmatique de TRP, selon le statut hormonal des patientes atteintes du CS explique une association entre la concentration plasmatique de TRP et la ménarche précoce avant 12 ans ainsi qu'à la ménopause tardive après l'âge de 49 ans. Dans la littérature, la survenue des premières règles avant l'âge de 12 ans, augmente le risque de cancer du sein (Key et al .2001) . Aucune étude n'a analysé le taux plasmatique de TRP selon le statut des hormones endogène des patientes atteintes du CS.

L'étude analytique par régression binaire, effectuée sur les données de la population générale, a montré que la concentration plasmatique de TRP devient un facteur significativement associé au risque de CS après que le modèle est ajusté par la glycémie et l'âge. Cela peut expliquer une éventuelle interaction entre la concentration plasmatique du TRP, le taux de glycémie, l'Age dans la survenue de CS. On peut conclure que le TRP chez la patientes diabétique et âgées de moins de 58ans devient un facteur de risque du CS.

Plusieurs études ont montré une association positive entre la concentration plasmatique de TRP et l'incidence du DT2 (Murr et al. 2015; Wang et al. 2011; Kechkouche. 2021). Dans notre étude les femmes avec un taux de glycémie supérieur  $>1.6$  g/L sont deux fois plus exposées au risque de CS par rapport aux femmes avec une glycémie  $\leq 1.6$  g/L (OR=2,  $P=0.00$ ). Une étude montre que la concentration de TRP circulant chez les femmes diabétiques était inférieure à celle des hommes (Niinisalo et al. 2008; Ulvik et al. 2020).

Le métabolisme de TRP augmente significativement avec l'âge (de Bie et al. 2016). Les résultats de l'étude de régression montrent que les femmes âgées de moins de 58 ans sont pratiquement plus exposées au risque de CS par rapport aux femmes âgées de 58 ans et plus.

### **3. L'activité enzymatique de l'IDO 1 et l'agressivité tumorale**

#### **3.1. La distribution de la concentration de l'IDO 1**

Le tableau 9 résume la distribution de la concentration plasmatique d'IDO 1 exprimée par le rapport KYN/TRP selon les paramètres de l'agressivité tumorale et les biomarqueurs du CS (Tableau 9).

Le taux plasmatique de l'IDO 1 ne montre aucune différence significative entre les cas et les témoins (Tableau 9).

Les patientes âgées de plus de 45 ans ont une expression de l'IDO 1 plus élevée que les femmes patientes jeunes ( $p=0,001$ ) (Tableau 9)

L'expression de l'IDO1 montre une forte expression significative avec l'agressivité tumorale (Tableau 9).

L'IDO est plus élevée chez les patientes qui ont une taille tumorale classée entre T2-T4 ( $8,1\pm 4,28\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ ) par rapport aux patientes qui ont une taille tumorale classée T1 ( $5,5\pm 0,793\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ ) avec une  $p=0,029$  (Tableau 9).

L'expression de l'IDO 1 est aussi plus élevée chez les patientes présentant un envahissement ganglionnaire par rapport aux patientes sans envahissement ganglionnaire ( $p=0,00$ ) (Tableau 9).

Les patientes qui ont un RH+ et HER2-, ont un taux d'IDO1 plus élevé que les patientes RH- et HER2+ respectivement (Tableau 9).

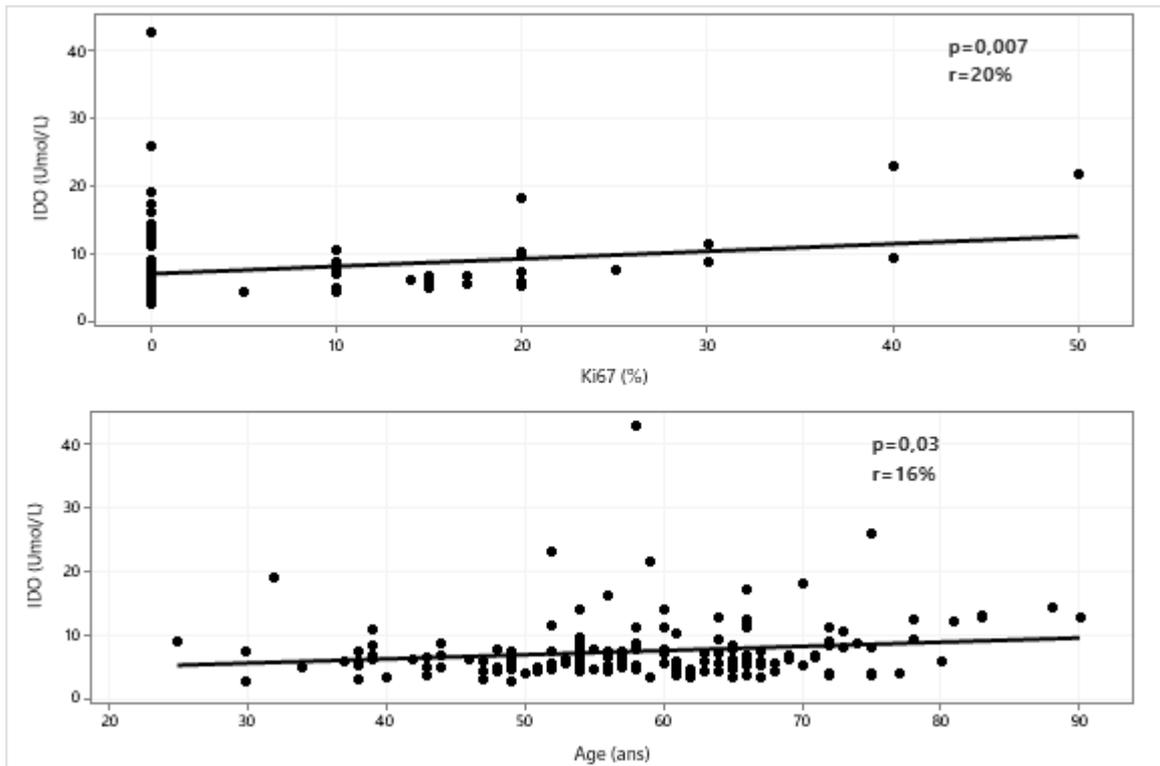
Concernant le KI67, le taux d'expression de l'IDO 1 est plus élevé chez les patientes exprimant un KI67 élevé  $\geq 20$  ( $11,3\pm 5,88\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ ) par rapport aux patientes qui expriment un Ki67 entre [10-20] ( $6,3\pm 1,384\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ ) ( $p=0,00$ ) (Tableau 9)

**Tableau 9:** Les niveaux de l'activité enzymatique de l'IDO1 en fonction des facteurs de l'agressivité et des biomarqueurs du CS

Les paramètres	KYN/TRP*100 (µmol/ µmol)	
	Moyenne ±écart	P value
<b>Cas et témoins</b>		
Témoins	7,367±4,826	0,496
Cas	7,954±4,214	
<b>Age</b>		
≤45 ans	6,5±1,495	<b>0,00</b>
>45 ans	8,1±3,922	
<b>Taille tumorale (T cm)</b>		
T1	5,5±0,793	<b>0,02</b>
T2-T4	8,1±4,288	
<b>Ganglions</b>		
N0	5,7±0,625	<b>0,00</b>
N1	8,2±4,378	
<b>Grade SBR</b>		
SBRI	7,7±4,169	0,37
SBRII-III	9,3±4,51	
<b>RE</b>		
RE+	8,2±4,621	<b>0,00</b>
RE-	7,1±1,966	
<b>RP</b>		
RP+	8,2±4,697	<b>0,00</b>
RP-	7,1±1,841	
<b>HER2</b>		
HER2+	7,1±1,150	<b>0,00</b>
HER2-	8,1±4,490	
<b>KI67</b>		
<20	6,3±1,384	<b>0,00</b>
≥20	11,3±5,88	

**T1** : ≤2 cm ; **T2** : ≥2 cm ; **N0** : envahissement ganglionnaires négatif ; **N1** : envahissement ganglionnaires positif ; **SBRI** : tumeur moins agressive. **SBRII-SBRIII**: tumeur plus agressives .

Le taux plasmatique d'IDO1 montre une corrélation positive avec la KI67 et l'âge de survenue du CS  $p=0.00$  ;  $r=20\%$  ;  $p=0.03$ ,  $r=16\%$  respectivement) (figure 8)



**Figure 8:**Corrélation entre l'activité enzymatique de l'IDO1 et le KI67 et l'âge de survenue du CS

### 3.2 L'activité enzymatique de l'IDO1 associée à l'agressivité et aux biomarqueurs tumoraux du CS

Nous avons réparti notre population d'étude en fonction des quartiles et de la médiane :  $Q1=4.9 \mu\text{mol/L}$ , médian= $6.24 \mu\text{mol/} \mu\text{mol}$ ,  $Q3=8.32 \mu\text{mol/} \mu\text{mol}$ .

L'analyse de la régression logistique nominale montre que les niveaux d'activité enzymatique élevés de l'IDO 1 sont associés aux facteurs de risque de CS qui sont proposés par la littérature à savoir l'âge, l'agressivité tumorale et les biomarqueurs du CS (RE ,RP et KI67) (Tableau 10)

Le taux plasmatique de l'IDO 1 supérieur à  $8,4 \mu\text{mol/L}$  est associé à un âge de survenu du CS égale à  $63 \pm 14$  ans ( $P=0,02$ ,  $OR=1,05$ ) (Tableau 10).

Concernant l'agressivité tumorale, le taux plasmatique de l'IDO1 supérieur à  $6,2 \mu\text{mol/} \mu\text{mol}$  est associé 2 fois plus à la taille tumorale élevée par rapport aux patientes qui ont un taux faible de l'IDO 1 ( $p=0,035$ ,  $OR=2$ ). L'expression de l'IDO 1 supérieure à  $4,9 \mu\text{mol/} \mu\text{mol}$  est aussi associée 2 fois plus au grade SBR (II-III) par rapport aux patientes qui ont un taux faible de l'IDO1 (Tableau 10).

Pour l'envahissement ganglionnaire, l'expression de l'IDO1 supérieure à 8,4 µmol/ µmol est associée 4 fois plus par rapport aux patientes qui ont un taux faible de l'IDO 1 (Tableau 10).

Concernant le taux d'expression de l'IDO1, en fonction des biomarqueurs du CS, le taux plasmatique de l'IDO1 élevé (IDO>6,2 µmol/ µmol), il est associé 5 fois plus au RE+ ( $p=0,024$  ; OR=4,80) et 4 fois plus au RP par rapport aux femmes qui expriment un taux faible de l'IDO. L'expression d'IDO 1 ne montre aucune association avec le HER2 ( $p>0,05$ ) (Tableau 10).

L'expression d'IDO 1 montre aussi une association avec le KI67 ( $p=0,008$  ; OR=1,14), l'IDO supérieur à 4,9 µmol/ µmol est associé par rapport aux femmes qui expriment un taux d'IDO<4,9 µmol/ µmol (Tableau 10).

**Tableau 10:** Résultats de la régression nominale de l'association plasmatique de l'IDO1 et les différents facteurs du CS

Les variables	Coef	Coef Ert	Z	P	OR	IC à 95 %
<b>Age:</b>						
(Q4/Q1)	0,04	0,02	2,29	<b>0,02</b>	1,05	1,01-1,09
(Q3/Q1)	-0,00	0,01	-0,0	0,95	1,00	1,00-1,04
(Q2/Q1)	-0,00	0,01	-0,21	0,83	1,00	0,96-1,03
<b>Taille tumorale</b>						
(Q4/Q1)	0,45	0,25	1,76	0,07	1,58	0,95-2,62
(Q3/Q1)	0,53	0,25	2,11	<b>0,03</b>	2,11	0,95-2,83
(Q2/Q1)	0,45	0,25	1,75	0,08	1,57	0,95-2,60
<b>Ganglions</b>						
(Q4/Q1)	1,32	0,57	2,29	<b>0,02</b>	3,75	1,21-11,65
(Q3/Q1)	1,12	0,58	1,92	0,05	3,09	0,98-9,78
(Q2/Q1)	0,77	0,60	1,27	0,20	2,16	0,66-7,10
<b>Grade SBR</b>						
(Q4/Q1)	0,59	0,29	2,00	<b>0,04</b>	1,82	1,01-3,26
(Q3/Q1)	0,68	0,29	2,31	<b>0,02</b>	1,98	1,11-3,54
(Q2/Q1)	0,61	0,29	2,08	<b>0,03</b>	1,85	1,04-3,31
<b>RE</b>						
(Q4/Q1)	1,12	0,71	1,56	0,11	3,07	0,75-12,53
(Q3/Q1)	1,56	0,69	2,25	<b>0,02</b>	4,80	1,23-18,81
(Q2/Q1)	1,20	0,70	1,71	0,08	3,35	0,84-13,41
<b>RP</b>						
(Q4/Q1)	0,95	0,72	1,31	0,18	2,61	0,62-10,89
(Q3/Q1)	1,44	0,70	2,05	<b>0,04</b>	4,22	1,07-16,72
(Q2/Q1)	1,20	0,70	1,71	0,08	3,35	0,84-13,41
<b>KI67</b>						
(Q4/Q1)	0,13	0,04	2,66	<b>0,00</b>	1,14	1,04-1,26
(Q3/Q1)	0,11	0,04	2,31	<b>0,02</b>	1,12	1,02-1,24
(Q2/Q1)	0,10	0,04	2,14	<b>0,03</b>	1,11	1,01-1,23

**Coef** : Coefficients, **Q1**=4.9 µmol/L, **Q2**=6.24 µmol/ µmol, **Q3**=8.32 µmol/ µmol , **OR**: odds ratio, **IC**: intervalle de confiance.

**3.3. L'activité enzymatique de l'IDO 1 et le statut hormonal des patientes atteintes du CS**

La régression multiple, ne montre aucune association entre l'activité enzymatique de l'IDO les facteurs hormonaux liés à l'imprégnation oestrogénique pré-ménopausique (l'âge de ménarche, l'âge de ménopause, la multiparité, la prise de CO) des patientes atteintes du CS ( $p > 0.05$ ).

Tandis qu'il existe une simple régression ( $r^2 = 15.74\%$ ) entre l'activité de l'IDO 1 et la ménopause tardive ( $\geq 50$  ans) (Tableau 11) avec une équation de régression :  
 $IDO\ 1(\mu\text{mol}/\mu\text{mol}) = 6.68 + 2.14 \text{ ménopause}$

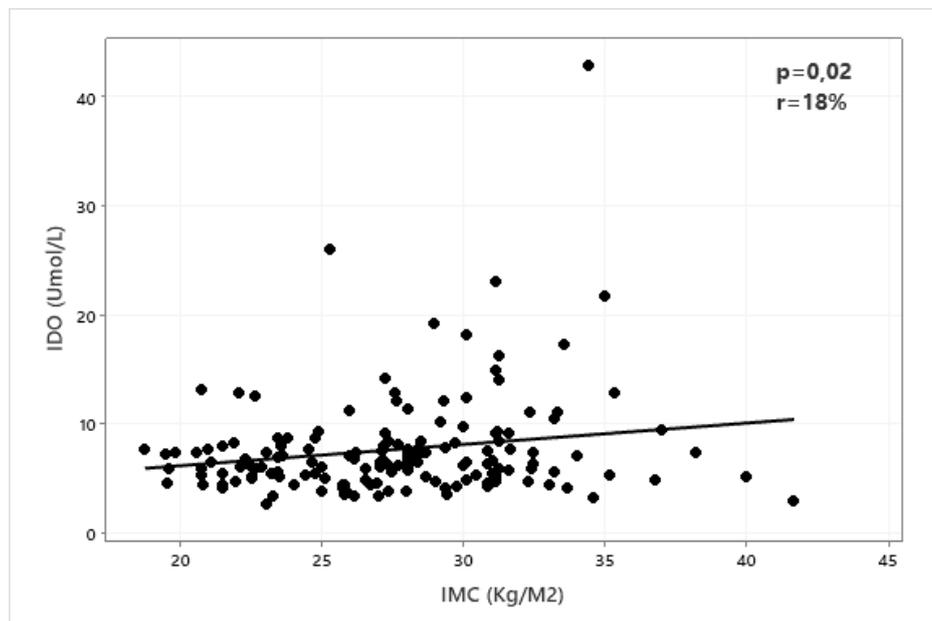
**Tableau 11:** Analyse de la variance de l'IDO1 selon l'âge de ménopause

Source	DL	Somme des carrés	CM	F	P
Régression	1	106,11	106,11	6,72	<b>0,01</b>

**DL :** degré de liberté ; **CM :** somme des carrés du modèle ; **F :** ajustement du modèle

**3.4 L'activité enzymatique de l'IDO 1 et l'inflammation**

La figure ci-dessous présente une faible corrélation entre l'activité enzymatique de l'IDO 1 et l'IMC dans la population générale ( $p = 0.02$  et  $r = 0.018$ ) (figure 9).



**Figure 9:** Corrélation entre l'activité enzymatique de l'IDO1 et l'IMC

Nous avons réparti notre population d'étude en fonction de l'IMC en 3 catégories : population normale avec un IMC 18-24.9 Kg/M<sup>2</sup>, population en surpoids avec un IMC 25-29,9 Kg/M<sup>2</sup> et obèse avec un IMC  $\geq 30$  Kg/M<sup>2</sup> (Tableau 12).

**Tableau 12:** Le TRP et ses métabolites en fonction de l'IMC

Paramètres	[18-24.9]	[25-29]	≥30	P value
<b>TRP (μmol/L)</b>	60.48±18.11	56.94±17.73	54.65±20.04	0.29
<b>KYN (μmol/L)</b>	3.89±1.33	3.77±1.46	4.15±1.87	0.44
<b>IDO1 (μmol/ μmol)</b>	6.71±2.21	7.16±3.95	8.90±6.43	<b>0.04</b>

### 3.4.1 l'activité enzymatique de l'IDO 1 et l'obésité

Il existe une simple régression ( $R^2=3.01\%$ ) entre l'activité de l'IDO 1 et les patientes obèses dans le CS (Tableau13) avec une équation de régression :  
 Obésité ( $\text{Kg/m}^2 = 0.2018 + 0.02080 \text{ IDO } 1(\mu\text{mol}/\mu\text{mol})$ ).

**Tableau 13:** Analyse de la variance de l'IDO1 selon l'obésité

Source	DL	Somme des carrés	CM	F	P
<b>Régression</b>	1	6,183	6,18341	5,06	<b>0,026</b>

**DL** : degré de liberté ; **CM** : somme des carrés du modèle ; **F** : ajustement du modèle

### 3.5 L'activité enzymatique de l'IDO 1 et le diabète de type II au cours du CS

Le tableau 14 présente un modèle de prédiction pour tester les facteurs associés au diabète dans le CS. Le premier modèle ne montre aucune association significative entre le TRP, KYN, l'IDO1 et le diabète au cours du CS ( $p>0.05$ ) (Tableau 14).

Tandis que le modèle 1 étant ajusté avec l'Age, rend le facteur IDO 1 significativement associé au diabète au cours du CS ( $p>0.05$ ) (Tableau 14).

**Tableau 14:** Les résultats du modèle de régression logistique des facteurs prédictifs (TRP, KYN, IDO1, âge ) dans la survenue du diabète au cours du CS

Les prédicteurs	Coefficients	Z	p-value	OR	IC à 95%
<b>Modèle 1(non ajusté, REF 1)</b>					
Constante	-1,45	-1.19	0.23		
TRP (µmol/L)	0.028	1.33	0.18	1.09	(0.98-1.07)
KYN (µmol/L)	-0.57	1.91	0.05	0.56	(0.31-1.01)
IDO1 (µmol/µmol)	0.26	1.91	0.05	1.30	(0.99-1.70)
<b>Modèle 2 (ajusté, REF 1)</b>					
Constante	-2.09	-1.56	0.120		
TRP (µmol/L)	0.03	1.47	0.14	1.03	(0.98-1.07)
KYN (µmol/L)	-0.60	-2.00	0.04	0.54	(0.30-0.98)
IDO1 (µmol/µmol)	0.27	1.99	<b>0.04</b>	1.31	(1.00-1.73)
Age(an)	0.56	1.09	0.27	1.76	(0.63-4.89)

**OR** : odds ratio, **IC**: intervalle de confiance ; **µmol /L**: micromole/litre, **µmol/µmol** : micromole/ micromole ; **REF** : référence

Notre analyse montre que l'activité de l'enzyme IDO1 est associée au diabète (glycémie >1.6g/L) dans le CS (p<0.05) (Tableau 15).

Les patientes avec une activité élevée de l'IDO 1 ( $\geq 6.4 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ ) sont plus exposées aux taux sérique élevés de glycémie dans le CS par rapport aux femmes avec une activité faible de l'IDO 1 ( $< 6.4 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ ) (Tableau 15).

Le test d'adéquation de l'ajustement par la méthode de Pearson, somme des carrés d'écart, Hosmer-Lemeshow ( $>0.05$ ) accepte le modèle logistique (Tableau 15).

**Tableau 15:**Test d'adéquation de l'ajustement

Test	DL	Khi deux	Valeur de p
<b>Somme des carrés des écarts</b>	149	204.77	0,002
<b>Pearson</b>	149	152,99	0,395
<b>Hosmer-Lemeshow</b>	8	2,59	0,958

**DL** : degré de liberté.

Le D de Somers, le Gamma de Goodman-Kruskal et Tau a de Kendall sont résumés dans le tableau des paires concordantes et discordantes (Tableau 16).

Le test de D de Somers (0.23) et le Goodman-Kruskal (0.23) indiquent que le modèle est de bonne capacité de prévision (Tableau 16).

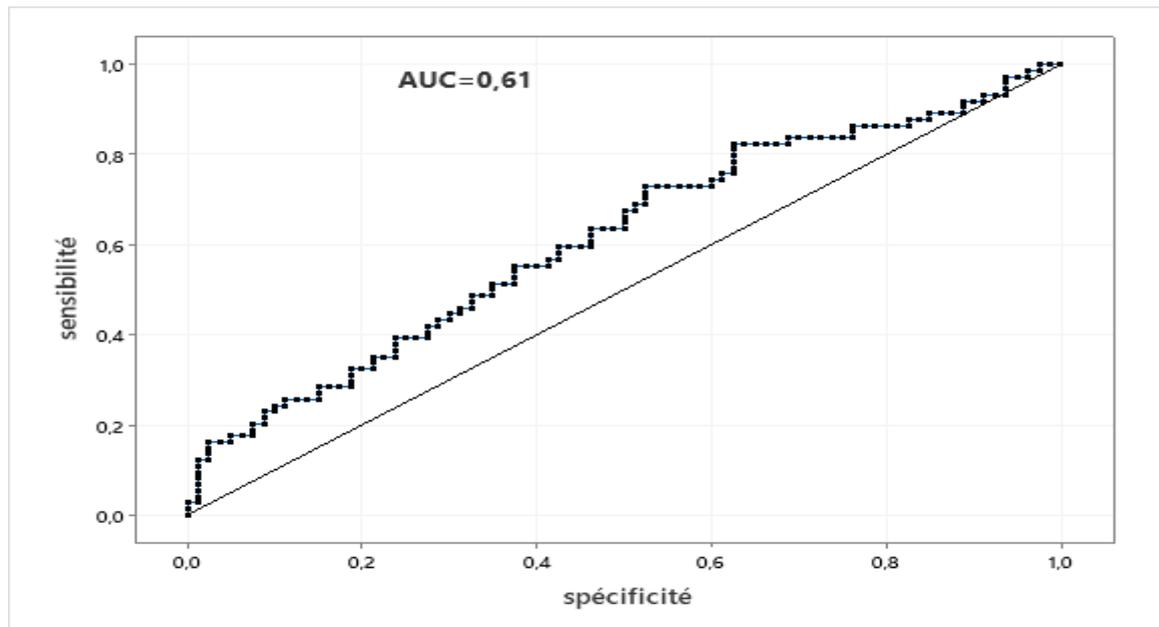
Le Tau a de Kendall donne une capacité de prévision relativement basse (0.12) (Tableau 16).

Pour les capacités prévisionnelles de notre modèle, on note un pourcentage élevé de paires concordantes (61%). (Tableau16).

**Tableau 16:** Les mesures d'association entre la variable de réponse (taux de glycémie ) et les facteurs prédictifs au cours du CS (TRP, KYN, IDO1, âge)

<b>Paires</b>	<b>Nombre</b>	<b>Pourcentage</b>	<b>Mesures récapitulatives</b>	<b>Valeur</b>
<b>Concordantes</b>	3609	61.0	D de Somers	0,23
<b>Discordantes</b>	2244	37.9	Gamma de Goodman-Kruskal	0,23
<b>Ex aequo</b>	67	1.1	Tau a de Kendall	0,12
<b>Total</b>	5920	100,0		

Notre modèle de prévision montre avec la fonction d'efficacité (courbe en ROC) un AUC =0.61. Cette valeur de l'AUC indique que modèle logistique, a une discrimination très acceptable (figure 11).



**Figure 10:** La courbe ROC du modèle des facteurs prédictifs associés au diabète de type 2 dans le CS

### **3.6 Discussion**

L'activité d'IDO 1 est particulièrement immunosuppressive ce qui en fait des cibles thérapeutiques de choix pour le traitement du CS.

Bien que ces mécanismes aient été particulièrement étudiés dans le cadre d'une activation exogène et soutenue du système immunitaire. Ils restent peu ou pas investigués dans la population Algérienne.

Dès lors le but de cette thèse est d'évaluer le niveau d'activité enzymatique exprimé par le rapport TRP/KYN\*100 chez les patientes atteintes du CS et de le comparer avec les individus sains témoins ; ensuite il s'agit de tester l'association des niveaux de l'IDO 1 avec l'agressivité tumorale et les biomarqueurs du CS (HR, HER2, KI67) ; et enfin, on se propose de vérifier s'il existe un éventuel lien entre l'activité enzymatique IDO1, l'obésité et le diabète de type II au cours du CS

Un nouveau lien entre l'obésité et l'activité de l'IDO1 a été établi dans le CS. En effet, les patientes obèses exprimeraient une forte activité enzymatique de l'IDO1, ce qui permet une dérégulation des voies inflammatoires et donc un risque important du développement un CS.

Notre étude rapporte pour la première fois des données non enregistrées sur l'activité enzymatique de l'IDO 1 et le diabète dans le CS.

Ainsi que des données sur l'activité enzymatique de l'IDO1, comme facteur lié aux facteurs de risques classiques du CS (Age, T, N, SBR , RH , KI67) et aussi comme un facteur lié à l'inflammation au cours du CS (obésité et diabète) .

L'activité enzymatique de l'IDO1 est significativement plus élevée chez les patientes atteintes du CS (Lyon et al. 2011). Dans une autre étude est retrouvé plus faible chez les patientes atteintes du CS par rapport aux témoins (Onesti et al. 2019) . Contrairement à Soliman et al qui corrobore nos résultats et montre qu'il n'existe aucune différence significative d'expression de l'IDO1 entre des patientes atteintes du CS et des témoins (Soliman et al. 2013).

Exploré par l'âge la moyenne de l'activité enzymatique d'IDO1 chez nos patientes âgées de plus 45 ans ( $8,1 \pm 3,922 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ ) est plus importante que celle des patientes âgées de moins de 45 ans ( $6,5 \pm 1,495 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ ) avec une p value de 0.001. La régression nominale montre que l'activité enzymatique d'IDO1 supérieure à  $8.4 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$  est associée à un âge de  $63 \pm 14$  ans.

Ce résultat reste controversé, l'activité enzymatique de l'IDO1 est plus élevée chez les femmes âgés de plus de 54 ans (Onesti et al. 2019). Tandis que dans une autre étude, l'activité enzymatique IDO1 ne montre aucune association selon l'âge (Soliman et al. 2013).

Concernant l'activité enzymatique de l'IDO1 selon l'agressivité tumorale, les tumeurs plus grandes sont associées à une faible expression de l'IDO1 (OR = 0.45, 0.22–0.92,  $p=0.028$ ). Les patientes avec une taille tumorale grande ( $\geq 2$ cm), présentent une activité enzymatique très élevée ( $8,1 \pm 4,288 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ ) que celle des patientes avec une taille tumorale inférieure à 2 cm ( $5,5 \pm 0,793 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ ) (Soliman et al. 2013). Dans notre étude, l'analyse de régression montre que le taux plasmatique de l'IDO 1 élevé est associé 2 fois plus à la taille tumorale et au grade SBR élevé ( $p=0,035$ , OR=2 ;  $p=0.021$  ; OR=1.98 respectivement). L'expression de l'IDO1 montre aussi une corrélation positive selon la taille tumorale ( $r=0.30$ ,  $p<0.0001$ ) et une différence significative selon le grade SBR ( $p=0.026$ ) (Onesti et al. 2019).

Récemment, un rôle particulier de l'IDO1 dans la médiation de l'évasion immunitaire tumorale a été révélé. Plus précisément, il a été démontré que les altérations du catabolisme du TRP dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur, permettraient la persistance des cellules tumorales (Liu et Zhai 2021; Opitz et al. 2020). Dans notre étude l'envahissement ganglionnaire est associé à 4 fois plus à une expression de l'IDO1 supérieure à  $8,4 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ . Dans une autre étude la faible expression de l'IDO1 est associée à l'envahissement ganglionnaire (OR = 0.51,  $p=0.028$ ) (Soliman et al. 2013).

Concernant l'expression de l'IDO 1, selon l'expression des RE, Les tumeurs à ER+ sont associées à une expression plus élevée de l'IDO1. Les résultats de l'expression d'IDO 1 selon les RE sont contradictoires (Dewi et al. 2017; Gómez-Cebrián et al. 2021; Greene et al. 2019; Onesti et al. 2019; Soliman et al. 2013; Tang et al. 2014).

Les patientes ER- sont caractérisées par une activité enzymatique de l'IDO élevée (Dewi et al. 2017). Tandis que l'étude de Green et al montre que le taux plasmatique de l'IDO 1 est faiblement exprimé dans les RE- (Greene et al. 2019). Dans notre étude l'expression élevée de l'IDO  $>6,2 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$  est associée 5 fois plus aux RE+ ( $p=0,024$  ; OR=4,80) par rapport aux femmes qui expriment un taux faible de l'IDO1.

Les mêmes résultats retrouvés dans une autre population d'étude qui montrent que l'expression de l'IDO1 était 2 fois plus élevée dans les tumeurs ER+ que dans les tumeurs ER- (OR=2,25, IC(1.26-4,04),  $p=0,006$ ) (Soliman et al. 2013).

Dans la littérature le type moléculaire TNG est caractérisé par une expression de l'IDO1 associée à l'oncogène HER2- (OR=0.29 ;  $p=0.06$ ) comparativement au type HER2+ (OR= 0.76 ;  $p=0.51$ ) et luminal A (Kim et al. 2017). Dans une autre étude l'expression de l'IDO1 n'est pas associée au HER2+ (OR=1.09 ;  $p=0.82$ ) (Soliman et al. 2013). Ce qui concorde avec nos résultats.

L'indice mitotique ki67 est le facteur clé dans les différents types moléculaires (Kim et al. 2017). Dans notre étude nous avons trouvé une corrélation positive entre le taux plasmatique de l'IDO et le Ki67 au cours du CS. On observe aussi que les patientes exprimant un KI67 élevé  $\geq 20$  ont un taux plasmatique plus élevé de l'IDO1 ( $11,3 \pm 5,88 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ ) par rapport aux patientes qui expriment un Ki67  $<20$  ( $6,3 \pm 1,384 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ ). Ces résultats ne

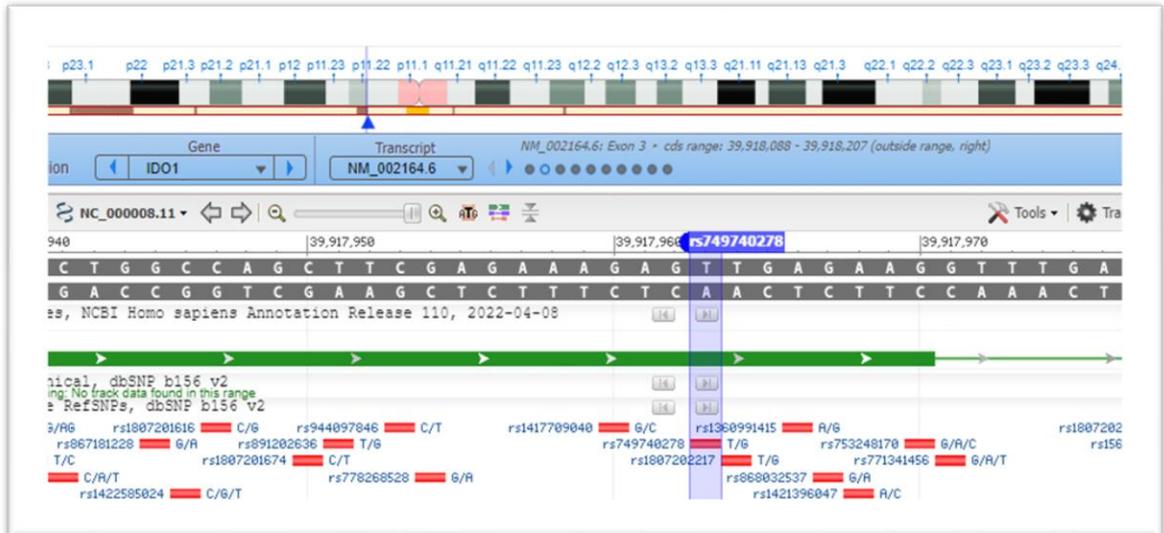
concordent pas avec les résultats de Onesti et al qui ne trouvent aucune corrélation significative d'IDO1 selon L'expression du Ki67(Onesti et al. 2019).

Les processus inflammatoires liés à l'obésité, jouent un rôle clé dans l'initiation et la progression des cancers. L'enzyme IDO1 a été significativement augmentée chez les sujets obèses en raison de l'augmentation du taux de la KYN dans la circulation sanguine (Poulain-Godefroy et al. 2013) Dans notre étude, les patientes obèses sont caractérisées par une activité enzymatique élevée ( $8.90 \pm 6.43 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ ) comparativement aux patientes normales ( $6.71 \pm 2.2 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ ) et en surpoids ( $7.16 \pm 3.95 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ ) ( $p=0.04$ ). L'analyse de régression montre aussi une liaison entre l'expression de l'IDO 1 et l'obésité  $\geq 30$  ( $p=0.06$ ). Notre étude ne concorde pas avec les études qui ne montre aucune association significative de l'IDO1 entre les patientes normales et obèses ( $OR=1.61$  ;  $P= 0.21$ ) (Soliman et al. 2013)

L'étude analytique par régression binaire, effectuée dans la population des patientes atteintes du CS, montre que l'activité enzymatique de l'IDO1 devient un facteur significativement associé au diabète au cours du CS après que le modèle soit ajusté par l'âge. Cela peut expliquer une éventuelle interaction entre l'activité enzymatique de l'IDO1, l'âge et la glycémie dans le CS. Plusieurs études montrent une activité élevée de l'IDO1 chez les diabétiques de type 2 par rapport aux témoins sains (Hussain. 2017; Munipally et al. 2011 ; Kachkouche. 2020). De nombreuses études cliniques ont suggéré l'existence d'une association entre le diabète et différents types de cancers, y compris le CS (Gourine, et Chentouf. 2020; Hardefeldt et al. 2012; Michels et al. 2003). Le risque de survenue du cancer chez les diabétiques de type 2 de sexe féminin est multiplié par 17 ( $OR=17,26$ ;  $p=0,002$ ) (Kachekouche. 2020).

#### 4. Variants génétiques de l'IDO1 associés au cancer du sein

Nous avons réalisé un séquençage de la région du chromosome 8 (chr8:39917600 - 39918311) (figure 12) qui encadre l'exon 2 et 3 ainsi que les bordures introniques de ces derniers. La taille de notre amplicon était de 712 paires de bases (pb)



**Figure 11:** Observation de la région chr8:39917600-39918311 de l'espèce homo sapine, les données du site dbSNP ncbi

Après l'alignement des séquences, nous avons identifié onze (11) SNP qui caractérisent les régions exoniques ; parmi eux cinq (5) SNP qui sont de nouvelles mutations non encore identifiés (-1 rs1265722807 ; +2rs778268528 ; -1rs749740278 ; -1 rs1237179070 ; +2 rs1208422426. Nous avons précisé la position nucléotidique de ces derniers auxquelles il est fait référence au polymorphisme le plus proche (Tableau 17).

Nous avons identifié trois aussi (3) SNP dans les régions d'épissage ; parmi eux deux (2) SNP (+3rs927429393, -1Cov53715201) qui sont des mutations non décrites dans la littérature (Tableau 17) .

Six (6) SNP dans la région introniques dont trois (3) SNP (-1rs1296815788, +3rs927429393,-1COSV105874348) qui sont de nouvelles mutations non décrites

L'allèle muté de certain SNP (Neuf SNP) sont retrouvés chez 100% des patientes atteintes du CS (Tableau 17).

**Tableau 17:** Les variants génétiques d'IDO1 chez les patientes atteintes du CS

Position *	Patientes %	Position chromique	Polymorphisme Identifié	Polymorphisme (dbSNP)	Exon/intron
<b>Variants exoniques</b>					
rs1279819656	20 %	8:39917883	A/C	DEL ACCTGA>-	Exon2
-1 rs1265722807	100%	8 :39917938	G/A		Exon2
rs778268528	100%	8 :39917954	G/C	G>A	Exon2
+2rs778268528	100%	8 :39917956	G/A		Exon2
rs1417709040	50%	8 :39917960	G/C	G>C	Exon2
-1 rs749740278	90%	8 :39917962	G/A		Exon2
rs868032537	100%	8 :39917967	G/A	G>A	Exon2
-1 rs1237179070	20%	8 :39918115	A/C		Exon3
+2 rs1208422426	20%	8 :39918189	T/G		Exon3
rs758835146	100%	8 :39918196	G/A	G>C	Exon3
rs200244502	50%	8 :39918203	G/C	G>A	Exon3
<b>Variants du site d'épissage</b>					
rs758140978	90%	8 :39917873	A/G	A>G	Site d'épissage d'exon2(3')
+3rs927429393	100%	8 :39918215	G/A		Site d'épissage d'exon3 (5')
-1Cov53715201	10%	8 :39918209	T/G		Site d'épissage
<b>Variants introniques (bordures exoniques)</b>					
-1rs1296815788	100%	8 :39917654	A/C		Intron 2
rs1290860232	70%	8:39917652	G/T	G>A	Intron 2
rs1009139308	40 %	8:39917649	G/A	G>A,T	Intron 2
rs192569091	100%	8 :39918002	T/G	T>G	Intron2
+3rs927429393	100%	8 :39918225	G/A		Intron3
-1COSV105874348	70%	8 :39918253	A/C		Intron3

\*Les positions nucléotidiques auxquelles il est fait référence au polymorphisme le plus proche

#### **4.1. La fréquence allélique des différents SNP en fonction de l'expression enzymatique de l'IDO1 au cours du CS**

Le tableau 18 résume le taux plasmatique de l'IDO1 selon la fréquence allélique des différents SNP. Les résultats ne montrent aucune différence significative des SNP entre les patientes exprimant un taux faible et ou élevé d'IDO1 sauf pour rs1290860232 (Tableau18).

42.50% des patientes avec l'allèle muté T exprimant un taux élevé de l'enzyme IDO1 avec une p=0.03 (Tableau18).

**Tableau 18:** La fréquence allélique des différents SNP en fonction l'expression enzymatique de l'IDO1

SNP	IDO1		P value
	<6.24(μmol/ μmol)	≥6.24(μmol/ μmol)	
<b>rs1279819656</b>			
A <sup>a</sup>	30 %	50%	P=0.24
C <sup>b</sup>	12.5%	7.50%	
<b>rs1417709040</b>			
G <sup>a</sup>	20%	30%	P=0.70
C <sup>b</sup>	22.50%	27.50%	
<b>-1rs749740278</b>			
G <sup>a</sup>	7.50%	2.50%	P=0.20
A <sup>b</sup>	14%	55%	
<b>-1rs1237179070</b>			
A <sup>a</sup>	32.50%	47.50%	P=0.63
C <sup>b</sup>	10%	10%	
<b>+2rs1208422426</b>			
T <sup>a</sup>	37.50%	42.50%	P=0.26
G <sup>b</sup>	5%	15%	
<b>rs200244502</b>			
G <sup>a</sup>	20%	30%	P=0.74
C <sup>b</sup>	22%	27%	
<b>rs758140978</b>			
A <sup>a</sup>	2.50%	7.50%	P=0.45
G <sup>b</sup>	40%	50%	
<b>-1Cov53715201</b>			
T <sup>a</sup>	40%	50%	P=0.45
G <sup>b</sup>	2.5%	7.5%	
<b>rs1290860232</b>			
G <sup>a</sup>	25%	15%	<b>P=0.03</b>
T <sup>b</sup>	17.50%	42.50%	
<b>rs1009139308</b>			
G <sup>a</sup>	27%	32.50%	P=0.60
A <sup>b</sup>	15%	25%	
<b>-1COSV105874348</b>			
A <sup>a</sup>	12.50%	17.50%	P=0.94
C <sup>b</sup>	30%	40%	

<sup>a</sup> L'allèle : ancestral, <sup>b</sup> L'allèle : muté

#### 4.2. L'association des différents polymorphismes aux biomarqueurs du CS

Dans ce travail, nous avons évalué, l'impact des polymorphismes observés sur les biomarqueurs du CS.

Les polymorphismes rs1417709040, rs200244502, -1rs749740278 montrent un lien avec les récepteurs hormonaux (RE, RP) (Tableau 19)

## *Résultats et discussion*

L'allèle C muté du polymorphisme rs200244502 était fréquent chez les patientent RE+ et totalement absent chez les patientes RE-, il était aussi associé à l'expression des RP ( $p=0.03$  ; $p=0.01$  respectivement) (Tableau 19).

L'allèle A muté du polymorphisme -1 rs749740278 est associé à l'expression du RE, RP et HER2+, toutes les patientes avec RE+, RP+ et HER2+ possèdent l'allèle A ( $p=0.00$  ;  $p=0.00$  ; $p=0.03$  respectivement ) (Tableau 19).

Le polymorphisme rs1417709040 été associé qu'a l'expression des RE ( $p=0.035$ ) (Tableau 19).

Tandis que le polymorphisme rs1279819656-est associé à l'expression élevée de KI67 ( $P=0.01$ ) (Tableau 19).

Les autres polymorphismes ne montrent aucune association significative avec les biomarqueurs du CS (Tableau 19).

**Tableau 19:** Les différents polymorphismes selon les biomarqueurs du CS

SNP	RE		RP		HER2+		KI67	
	RE-	RE+	RP-	RP+	HER2-	HER2+	<20	≥20
<b>rs1279819656</b>								
A <sup>a</sup>	10%	70%	12.50%	67.50%	40%	40%	50%	30%
C <sup>b</sup>	0%	20%	0%	8%	10%	10%	2.50%	17.50%
<b>P value</b>	P=0.56		P=0.56		P=1		<b>P=0.01</b>	
<b>-1rs1265722807</b>								
A <sup>b</sup>	9.86±5.7		8.7±5.39	7.7±4.05	8.10±4.4.....7.7±3.9		7.4±3.9	8.3±4.4
<b>P value</b>	P=0.51		P=0.71		P=0.77		P=0.46	
<b>rs1417709040</b>								
G <sup>a</sup>	0	50%	2.50%	47.50%	30%	20%	30%	20%
C <sup>b</sup>	10%	40%	10%	40%	20%	30%	20%	12%
<b>P value</b>	<b>P=0.035</b>		P=0.15		P=0.20		P=0.20	
<b>-1rs749740278</b>								
G <sup>a</sup>	10.26%	0%	10.26%	0%	10%	0%	5%	5%
A <sup>b</sup>	10.26%	79.49	12.82%	76.92%	40%	50%	45%	45%
<b>P value</b>	<b>P=0.00</b>		<b>P=0.00</b>		<b>P=0.03</b>		P=1	
<b>-1rs1237179070</b>								
A <sup>a</sup>	10%	70%	10%	70%	30%	50%	42.50%	37.50%
C <sup>b</sup>	2.50%	17.50%	2.50%	17.50%	20%	0%	7.50%	12.50%
<b>P value</b>	P=1		P=1		P=0.00		P=0.42	
<b>+2rs1208422426</b>								
T <sup>a</sup>	10%	70%	10%	70%	40%	40%	37.50%	42.50%
G <sup>b</sup>	0%	20%	2.50%	17.50%	10%	10%	12.50%	7.50%
<b>P value</b>	P=0.56		P=1		P=1		P=0.42	
<b>rs758835146</b>								
A <sup>b</sup>	9.6±5.7		8.72±5.3	7.79±4.05	8.13±4.5	7.71±3.8	7.4±3.9	8.37±4.45
<b>P value</b>	P=0.55		P=0.72		P=0.75		P=0.49	
<b>rs200244502</b>								
G <sup>a</sup>	10%	40%	12.5%	37.50%	30%	20%	17.5%	32.50%
C <sup>b</sup>	0%	50%	12.5%	50%	20%	30%	32%	17.50%
<b>P value</b>	<b>P=0.03</b>		<b>P=0.01</b>		P=0.20		P=0.058	
<b>1Cov53715201</b>								
A <sup>a</sup>	0%	90%	2.50%	87.50%	40%	50%	47.37%	47.37%
C <sup>b</sup>	10%	0%	10%	0%	10%	0%	5.26%	0%
<b>P value</b>	<b>P=0.00</b>		<b>P=0.00</b>		<b>P=0.03</b>		P=0.48	
<b>rs1290860232</b>								
G <sup>a</sup>	0%	40%	2.50%	37.50	20%	20%	17.50%	22.50%
T <sup>b</sup>	10%	50%	10%	50%	30%	30%	32.50%	27.50%
<b>P value</b>	P=0.85		P=0.32		P=1		P= 0.51	
<b>rs1009139308</b>								
G <sup>a</sup>	10%	50%	9.76%	48.78%	20%	40%	32.50%	27.50%
A <sup>b</sup>	0%	40%	2.44%	39.02%	30%	10%	17.50%	22.50%
<b>P value</b>	P=0.08		P=0.29		P=0.01		P=0.51	
<b>-1COSV105874348</b>								
A <sup>a</sup>	2.50%	27.50%	2.50%	27.50%	15%	15%	17.50%	12.50%
C <sup>b</sup>	7.50%	52.50%	10%	60%	35%	35%	32.50%	37.50%
<b>P value</b>	P=0.81		P= 0.60		P=1		P=0.49	

### 4.3. Prédiction des effets possibles des SNP sur l'IDO1

Dans les tableaux suivants nous avons résumé les études in silico réalisées pour prédire les différents effets délétères des SNP retrouvés au cours du CS.

Cette étude est basée sur l'homologie de séquence et les propriétés physiques des acides aminés.

Parmi les onze (11) SNP faux sens identifiés, quatre (4) SNP ont prouvé un effet sur la fonction de la protéine ; dont une nouvelle mutation (-1 rs749740278) non encore enregistrée et trois autres déjà décrites dans la littérature (rs778268528, rs1417709040, rs200244502) (Tableau20)

**Tableau 20:** Les SNP pathogènes à haut risque de l'IDO1

SNP	Séquence	Position	SIFT	Polyphen-2	Remarque
rs1279819656	CTA/CTC	L32L			AA ne change pas
-1 rs1265722807	GAG/AAG	E51K	0.20	0.023	Mutation neutre
rs778268528	CGA/CCA	R56P	<b>0.02</b>	<b>1</b>	<b>Affecte la fonction de la protéine</b>
+2rs778268528	GAA/AAA	E57K	0.23	0.020	Mutation neutre
rs1417709040	AGA /ACA	R58T	0.5	<b>0.93</b>	Mutation neutre
-1 rs749740278	GTT/ATT	V59I	<b>0.00</b>	<b>0.98</b>	<b>Affecte la fonction de la protéine.</b>
rs868032537	AGA/AAA	E60E			AA ne change pas
-1 rs1237179070	ACA/CCA	T71P	0.20	0.005	Mutation neutre
+2 rs1208422426	GGT/GGG	G95G			AA ne change pas
rs758835146	GAT/AAT	D98N	0.70	0.18	Mutation neutre
rs200244502	CGT/CCT	R100P	0.26	<b>1</b>	<b>Affecte la fonction de la protéine</b>

**L** :lysine, **E** :acide glutamique, **K** :lysine , **R** :arginine, **P** :proline, **V** :valine, **I** :Isoleucine, **G** :glycine **T** :théronine, **D** : acide aspartique, **N** :aspargine

Le Tableau 21 résume les résultats sur la stabilité de l'IDO1 muté qui est quantifiée par l'énergie libre standard ( $\Delta\Delta G$ ) (Tableau 21).

Les quatre (4) différents polymorphismes (rs778268528, rs1417709040, rs200244502, -1 rs749740278) qui ont un effet délétère sur l'IDO1, indiquent une diminution de l'énergie de l'IDO1 muté ; Ce qui rende l'IDO1 plus stable (Tableau 21).

**Tableau 21:** Prédiction des effets possibles sur la stabilité de l'IDO1

SNP	$\Delta\Delta G$ (Kcal/mol)	Remarque
<b>R56P</b>	-0,63	La protéine est stable
<b>V59I</b>	-0.40	La protéine est stable
<b>R58T</b>	-1.14	La protéine est stable
<b>R100P</b>	-1.03	La protéine est stable

**R**: arginine, **P** : proline, **V** :valine, **I** : Isoleucine, **T** :théronine

Le tableau 22 compare les propriétés des résidus sauvages et mutés (Tableau 22).

Concernant la taille des résidus des 3 polymorphismes (rs778268528, rs1417709040, rs200244502), elle est caractérisée par un résidu muté plus petit que le résidu sauvage ; Cela entraîne une éventuelle perte d'interactions externes (Tableau 22).

Tandis que le nouveau polymorphisme -1 rs749740278, il est caractérisé par un résidu muté plus grand que le résidu sauvage (tableau 23). La différence de taille entre le résidu de type sauvage et le résidu mutant fait que le nouveau résidu (muté) n'est pas dans la bonne position pour créer la même liaison hydrogène que le résidu sauvage d'origine. (Tableau 22)

Concernant la charge des résidus, les 3 polymorphismes (rs778268528, rs1417709040, rs200244502 ) sont caractérisés par des résidus chargés positivement qui se transforment en résidus mutés neutres (tableau 23).

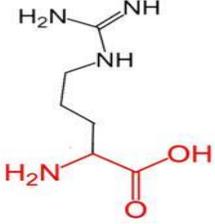
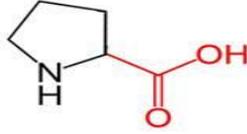
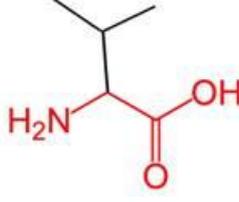
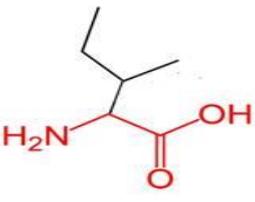
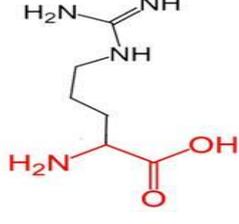
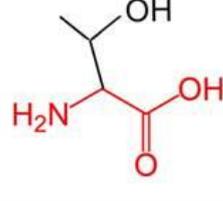
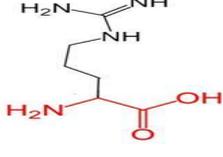
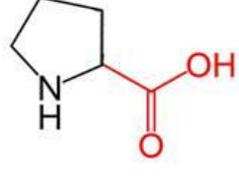
La différence de charge perturbera l'interaction ionique faite par le résidu sauvage d'origine (tableau 23). Cela peut entraîner une perte d'interactions avec d'autres molécules

Les 2 résidus mutés des 2 polymorphismes rs778268528, rs200244502 sont plus hydrophobes que les résidus sauvages (tableau 22).

La différence d'hydrophobicité touche la formation de liaisons hydrogènes qui est affectée par le résidu sauvage (tableau 23)

Les résidus mutés des différents SNP étudiés sont situés dans le domaine de reliure hémique. C'est un domaine qui est important pour la liaison d'autres résidus. Le résidu muté est aussi en contact avec des résidus dans un autre domaine. La mutation pourrait perturber l'interaction entre ces deux domaines et ainsi affecter la fonction de la protéine (Tableau 23)

**Tableau 22:** Les propriétés des résidus sauvages et mutés des différents SNP de l'IDO1 au cours du CS

Résidus	Structures des résidus d'IDO1		Propriétés
	Résidus Sauvages	résidus muté	
<b>R56P</b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>-Le résidu muté est plus petit que le résidu de sauvage.</li> <li>-La charge de résidu muté est neutre, la charge de résidu sauvage est positive</li> <li>-Le résidu muté est plus hydrophobe que le résidu sauvage.</li> </ul>
<b>V59I</b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>-Le résidu muté est plus grand que le résidu sauvage.</li> <li>-Le résidu sauvage a été enfoui dans le noyau de la protéine ; le résidu mutant est plus gros et ne conviendra probablement pas.</li> </ul>
<b>R58T</b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>-Le résidu muté est plus petit que le résidu sauvage.</li> <li>-La charge de résidu muté neutre, la charge de résidu sauvage est positive</li> <li>-Le résidu muté est plus hydrophobe que le résidu sauvage.</li> </ul>
<b>R100P</b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>-Le résidu muté est plus petit que le résidu sauvage.</li> <li>-La charge de résidu muté est neutre, la charge de résidu sauvage est positive.</li> <li>-Le résidu muté est plus hydrophobe que le résidu sauvage.</li> </ul>

**R:** arginine, **P :** proline, **V :**valine, **I :** Isoleucine, **T :**théronine

Notre étude rapporte les effets délétères des polymorphismes sur la fonction de l'IDO1 au cours du CS et montre que les 4 SNP touchent le site de reliure hémique qui est une cible thérapeutique (Tableau 22 -23).

Le changement de l'acide aminé R (Arginine) en P (proline) dans la position 56 perturbe plusieurs types de liaisons effectués par le résidu d'origine (R), ce qui par conséquence touche le site de reliure hémique d'IDO1 (figure 23).

Le changement de l'acide aminé R (Arginine) en T(thréonine ) dans la position 58 provoque les perturbations d'un pont salin effectué par le résidu d'origine (R) à cause de la différence de charge (figure 23)

**Tableau 23:** Les différents types de liaisons des résidus de l'IDO1 sauvage et muté

<b>Résidus d'origine</b>	<b>Les différentes liaisons</b>	<b>Domaines</b>
<b>Le résidu R d'IDO1 sauvage en position 56</b>	1) une liaison hydrogène avec : -Tyrosine en position 90 -Acide aspartique en position 98 -Tyrosine en position 90 -Valine en position 91 2) un pont salin avec : -Acide glutamique en position 60 -Acide aspartique en position 98 -Acide aspartique en position 98	Reliure hémique
<b>Le résidu R d'IDO1 sauvage en position 58</b>	1) un pont salin avec : -Acide aspartique en position 38 -Acide glutamique en position 57	Reliure hémique
<b>Le résidu R d'IDO1 sauvage en position 100</b>	1) une liaison hydrogène avec : -Acide aspartique en position 98 -Valine en position 99 2)Le résidu de type sauvage forme un pont salin avec : -Acide glutamique en position 60 -Acide aspartique en position 98	Reliure hémique

**R:** arginine

#### 4.4 Estimation de la conservation évolutive des résidus de l'IDO1

Le résidu muté du polymorphisme rs1279819656 est situé près d'une position hautement conservée. Le nouveau polymorphisme -1 rs749740278, le seul qui est conservé par rapport aux 3 autres polymorphismes (Tableu24 -figure 12).

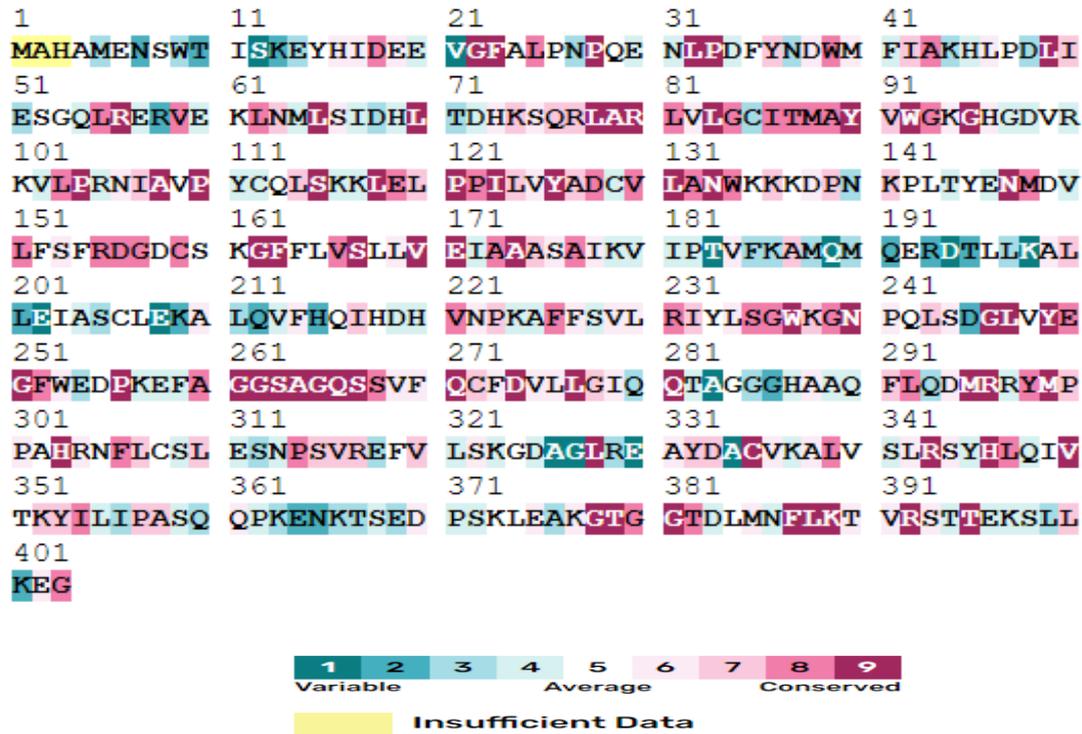


Figure 12: Analyse des résidus d'acides aminés conservés de l'IDO1, la barre de couleur de codage montre la représentation du schéma de score coloration de la conservation

Tableau 24: La conservation évolutive des résidus des différents SNP de l'IDO1

Résidus	Médiane	Sauvage	Muté	Remarques
<b>R56P</b>	3.32	Très conservé	Non conservé	Résidu muté est situé près d'une position hautement conservée
<b>V59I</b>	3.32	Très conservé	Conservé	Cette mutation peut-être pas dommageable pour la protéine. Car les protéines homologues existent avec le même type de résidu muté
<b>R58T</b>	3.32	Non conservé	Non conservé	Dommageable pour l'IDO1
<b>R100P</b>	3.32	Non conservé	Non conservé	Cette mutation n'est pas dommageable pour la structure et la fonction de l'IDO1.

R: arginine, P : proline, V :valine, I : Isoleucine, T :théronine

#### 4.5. Analyse de simulation de la dynamique moléculaire de l'IDO 1

##### 4.5.1 La synthèse de l'IDO1 muté

Après le téléchargement de la structure cristalline de l'IDO1 (code PDB : 5WMU) qui était utilisé comme référence (IDO1 sauvage). Nous avons muté cette dernière par les huit SNP faux sens (E51K, R56P, E57K, R58T, V59I, T71P, D98N, R100P) identifiés chez les patientes atteintes du CS de notre population d'étude.

#### 4.5.2 Evaluation des effets des SNP sur la conformation de stabilité de l'IDO1

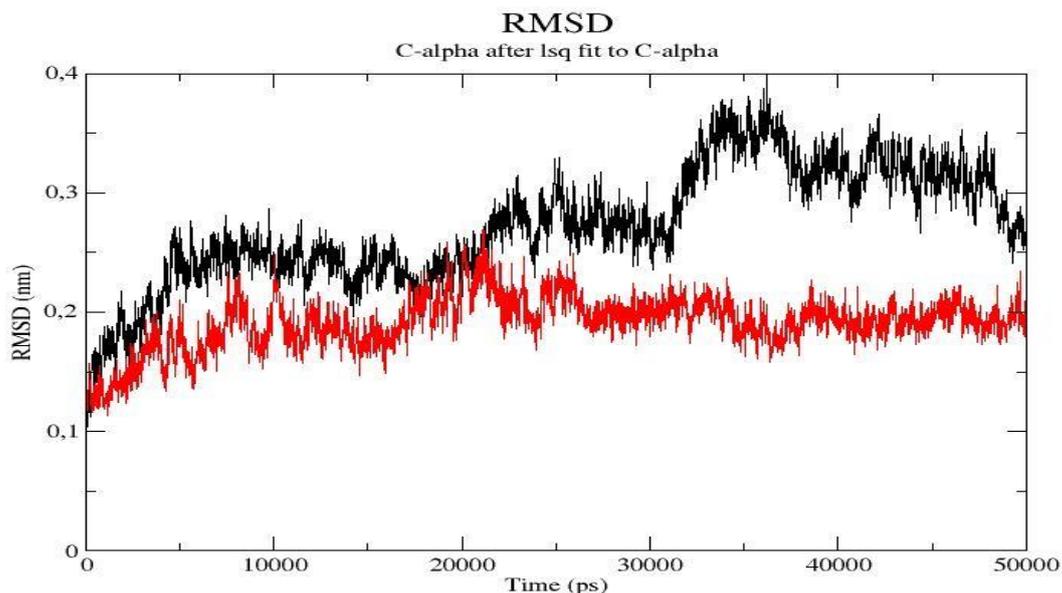
Une simulation de dynamique moléculaire de l'IDO1 sauvage et de l'IDO1 muté a été réalisée pendant 50 ns. Plusieurs paramètres ont été analysés tout au long de la trajectoire de simulation, notamment le RMSD et le RMSF (figure 13-14)

La figure 14 résume les graphes RMSD de la protéine de l'IDO1 non muté (en noir) et de l'IDO1 muté (en rouge) (figure 13)

La valeur RMSD de l'IDO1 muté chez les patientes atteintes du CS est hautement stable par rapport à la protéine IDO1 sauvage. Ceci a montré un type de déviation différent tout au long de la simulation (figure 13).

Lors de la simulation de 24 ns, l'IDO1 muté a montré un RMSD plus stable, autour de 0.15 nm. Tandis que l'IDO1 sauvage subit une augmentation de la valeur RMSD jusqu'à 0.33 nm (figure 13).

L'IDO1 muté et l'IDO1 sauvage montrent une déviation nettement différente au long de la simulation ; Ce qui a entraîné une déviation du squelette d'environ 0.32 nm (IDO1 sauvage) à environ 0.20 nm (IDO1 muté). L'IDO1 muté s'est avéré stabilisé après 27 ns, tandis que l'IDO1 sauvage est instable tout au long de la simulation (figure 13)



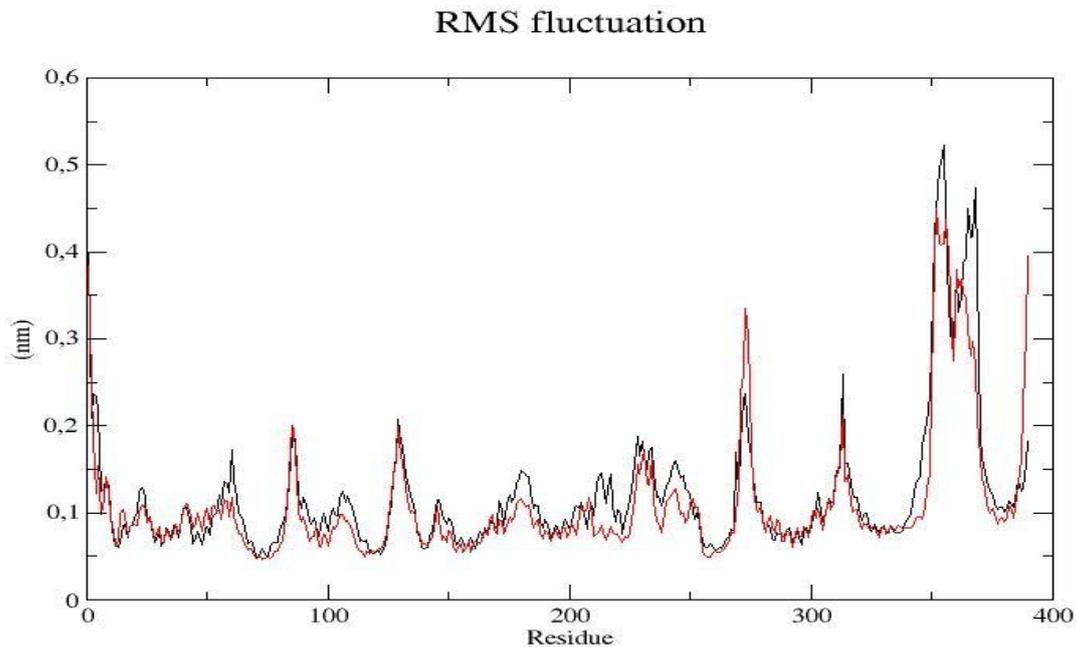
**Figure 13:** L'évaluation temporelle de la RMSD en fonction du temps de l'IDO1 sauvage et l'IDO1 muté à 50 ns. L'IDO1 sauvage est représenté en noir et l'IDO1 muté, en rouge

Ensuite, nous avons analysé comment le mutant affectait le comportement dynamique des résidus grâce au calcul du RMSF de l'IDO1 sauvage et muté (figure 15)

La valeur RMSF de l'IDO1 muté est demeurée en dessous de 0,4 nm tout au long de la simulation, alors que celle de l'IDO1 sauvage dépasse 0,4 nm (figure 15)

On peut déduire que les fluctuations au niveau des résidus, pour la structure de l'IDO1 muté, sont inférieures pour l'ensemble des acides aminés par rapport à celles de l'IDO1 sauvage, en particulier pour les résidus situés entre les positions suivantes : entre 70 et 100, entre 180 et 190, entre 210 et 250, 340 et 360 (figure 15)

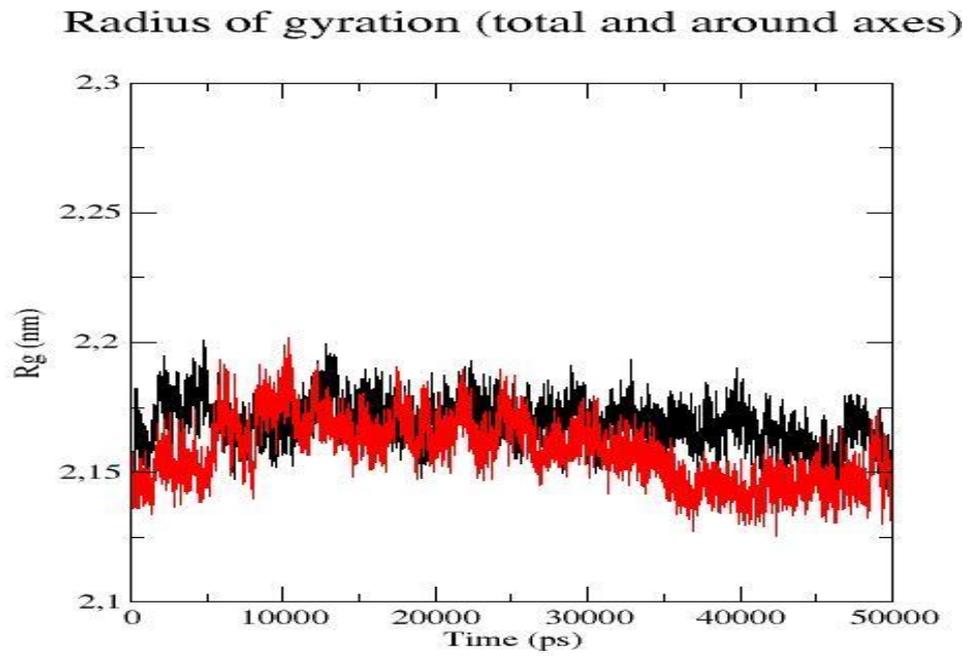
En revanche, au niveau des résidus mutés identifiés entre la position 70 et 10 sont observées des fluctuations maximales du RMSF (figure 15)



**Figure 14:** Graphes RMSD du squelette sur toute la simulation. L'IDO1 sauvage est en noir et l'IDO1 muté en rouge

L'analyse du rayon de giration ( $R_g$ ) a révélé une légère variation du  $R_g$ , démontrant la stabilité de l'IDO1 muté. La structure de l'IDO1 muté est plus compacte avec une moyenne 2.15 nm (figure15).

Tandis que la structure de l'IDO1 sauvage a été moins compacte avec une moyenne de 2.40 nm (figure15).



**Figure 15:** Rayon de giration des structures de l'IDO1 muté et sauvage en fonction du temps. L'IDO1 sauvage est représenté en noir et l'IDO1 muté en rouge

#### **4.6 Discussion**

Les SNP touchant la région codante se répartissent en trois catégories : les SNP synonymes, les SNP non synonymes et les SNP non-sens (Korzeniewski, Hofman, et Brest 2013)

Les SNP synonymes ,du fait de la redondance du code génétique, la substitution d'un codon par un autre codon peut engendrer le même acide aminé (Korzeniewski et al. 2013)

À l'inverse, les SNP non synonymes ou non-sens engendrent, respectivement, l'incorporation d'un acide aminé différent ou l'arrêt de la traduction ; ils modifient donc la structure primaire du polypeptide (Chu et Wei 2019)

La susceptibilité héréditaire aux maladies chez l'homme est le plus souvent associée à des SNP (Wang et Moulton 2001)

Or, si l'on conçoit que les SNP Faux sens de l'IDO1 engendrent des perturbations moléculaires qu'il faut déterminer par des outils de prédiction.

Différents outils de prédiction sont disponibles pour évaluer l'importance fonctionnelle des SNP non synonymes ou non-sens, de l'IDO1 (Oliver et al. 2017)

Le gène IDO1 une enzyme hémique qui catalyse la première étape limitante du catabolisme du TRP en N-formyl-kynurénine. Cette enzyme agit sur plusieurs substrats de TRP, notamment le D-tryptophane, le L-tryptophane, le 5-hydroxy-tryptophane, la tryptamine et la sérotonine. On pense que cette enzyme joue un rôle dans une variété de processus physiopathologiques tels que la défense antimicrobienne et antitumorale, la neuropathologie, l'immunorégulation et l'activité antioxydante . Cette enzyme est nécessaire à la différenciation des cellules T régulatrices (Tang et al. 2021). Le gène de l'IDO1 est situé sur le chromosome 8, est contient 10 exon (Katz et al. 2008)

Il a été rapporté que l'IDO1 est fortement exprimé dans une variété de tumeurs, y compris le CS (Zhai et al. 2018).

Les altérations génétiques qui affectent le gène de l'IDO1 ont été trouvées, associées principalement à certaines pathologies, sclérose, maladie de crohn , hépatite C , tuberculose, parkinson, diabète de type 2 (Cao et al. 2022; Galvão-de Almeida et al. 2011; Han et al. 2020; Lee et al. 2014; Li et al. 2019; Tardito et al. 2013; Török et al. 2022; Kechkouche. 2021).

Parmi les SNP faux sens étudiés on retrouve : rs3824259 ; rs10089084, rs4463407 rs12545877, rs35059413, rs35059413, rs61753677, rs7820268 ; rs7820268, rs9657182, rs34155785 rs7820268, rs35099072, ce dernier SNP a été étudié dans plusieurs maladies (Galvão-de Almeida et al. 2011; Lee et al. 2014; Tardito et al. 2013; Kechkouche. 2021) . Les polymorphismes qui ont été retrouvés dans notre recherche, n'ont jamais été étudiés en association avec d'autres maladies, bien que des polymorphismes du gène IDO1 aient été observés chez la population générale.

Au cours du CS il n'y a aucune recherche sur le polymorphisme de l'IDO1 ; tandis qu'on trouve une recherche sur l'association du génotype de l'IDO2 dans le CS malgré que l'IDO1 est plus exprimé dans le CS par rapport à l'IDO2 (Køllgaard et al. 2012). Ce dernier est un isoenzyme et homologue d'IDO1, situé sur le chromosome 8 et contient 11 exon (Katz et al. 2008)

Dans notre population d'étude nous avons identifié onze (11) polymorphismes exoniques parmi eux six (06) SNP connus (rs1279819656 ; rs778268528 ; rs1417709040 ; rs868032537 ; rs758835146 ; rs200244502 ).

Ainsi que cinq (05) nouveaux polymorphismes (-1 rs1265722807 ; +2rs778268528 ; -1rs749740278 ; -1 rs1237179070 ; +2 rs1208422426) qui n'ont jamais été identifiés.

Les polymorphismes rs778268528 ; rs1417709040 ; rs200244502, et un nouveau polymorphisme -1 rs749740278 ces derniers sont situés dans l'exon 2 et 3. L'exon 3 a été ciblé par plusieurs études dans différentes maladies (Galvão-de Almeida et al. 2011; Lee et al. 2014; Tardito et al. 2013; Kechkouche. 2021).

Les résultats de cette étude, montrent que l'allèle C muté du polymorphisme rs1417709040 est associé au RE ( $p=0.03$ ) caractérisant les patientes qui exprime les RE. L'allèle C du polymorphisme rs200244502 était fréquent chez les patientes RE+ et totalement absent chez les patientes RE-, il était aussi associé à l'expression des RP( $p=0.03$  ; $p=0.01$  respectivement). L'allèle A muté du polymorphisme -1 rs749740278 est associé à l'expression du RE , RP et HER2+, toutes les patientes avec RE+, RP+ et HER2+ possèdent l'allèle A ( $p=0.00$  ;  $p=0.00$  ; $p=0.03$  respectivement ) .

Cette nouvelle mutation identifiée dans notre population est associée à un phénotype particulier chez les patientes avec HER2+ de mauvais pronostic (Ménard et al. 2001)

Concernant la fréquence allélique de polymorphisme rs778268528, l'allèle C muté est retrouvé chez 100% des patientes atteintes du CS

Le gène du RE connu aussi ESR1 est situé sur le chromosome 6 et contient 22 exons (Bhagwat. 2010). Ce gène code pour un RE est un facteur de transcription activé par un ligand. La protéine canonique contient un domaine de transactivation indépendant du ligand N-terminal, un domaine central de liaison à l'ADN, un domaine charnière et un domaine de transactivation dépendant du ligand C-terminal. La protéine codée par ce gène régule la transcription de nombreux gènes inductibles par les œstrogènes qui jouent un rôle dans la croissance, le métabolisme, le développement sexuel. Le RE est considéré aussi comme facteur de risque du CS (Chen, Li, et Ou-Yang 2022)Le RE a été identifié comme un régulateur négatif de l'expression de l'IDO1, le taux plasmatique de l'IDO1 ainsi que le taux plasmatique de la KYN qui étaient plus faibles chez les patientes avec RE + par rapport aux patientes avec RE- (Dewi et al. 2017).

Le promoteur IDO1 est hyperméthylé chez les patientes avec RE+ par rapport aux patientes avec RE-. L'induction de l'IDO1 a été renforcée lors de la déméthylation de l'ADN dans les cellules RE+ mais pas dans les cellules ER- (Dewi et al. 2017). L'association de la surexpression de ER avec la régulation négative épigénétique de l'IDO1 semble être une

caractéristique particulière du cancer du sein, car l'IDO1 n'a pas été supprimé par l'hyperméthylation du promoteur IDO1 en présence d'une expression élevée de ER dans le cancer de l'endomètre et le cancer du cerveau (Chung, Franceschi, et Lambert 2010; Vigneron, van Baren, et Van den Eynde 2015)

Le gène PGR ou RP situé dans le chromosome 11 contient 10 exon. Ce gène code pour un membre de la superfamille des récepteurs stéroïdiens. La protéine a des effets physiologiques reproductifs associés au maintien de la grossesse. Ce gène utilise deux promoteurs distincts et des sites de début de traduction dans le premier exon pour produire plusieurs variantes de transcription (Bhagwat 2010; Gaudet et al. 2009)

Le RP est considéré comme un facteur de risque du CS (Gaudet et al. 2009). Les 2 polymorphismes exoniques retrouvés dans notre population d'étude (rs200244502, -1 rs749740278) sont associés à l'expression des RE et RP, parmi eux un connu et l'autre nouvellement identifié.

Le gène ERBB2 connu sous le nom HER2 situé dans le chromosome 17 contient 35 exons. Ce gène code pour un membre de la famille des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGF) des récepteurs tyrosine kinases (Bhagwat 2010).

Cette protéine n'a pas de domaine de liaison au ligand et ne peut donc pas se lier aux facteurs de croissance. Cependant, elle se lie étroitement à d'autres membres de la famille des récepteurs EGF liés au ligand pour former un hétérodimère stabilisant la liaison du ligand et améliorant l'activation médiée par la kinase des voies de signalisation en aval, telles que celles impliquant la protéine kinase activée par les mitogènes et la phosphatidylinositol-3 kinase (Bhagwat 2010; Liu et al. 2023).

L'IDO1 et l'EGFR ont été exprimés dans le CS, les résultats suggèrent que la prise en compte de l'IDO1 et de l'EGFR comme deux indicateurs pour le traitement du CS ou l'analyse du pronostic, offrent une option potentielle du traitement individuel pour les patientes exprimant un CS avec l'expression d'IDO1 et de l'EGFR (Bi et al. 2014; Hou et al. 2022). Dans notre étude nous avons identifié une nouvelle variation -1 rs749740278 associée à l'expression du HER2+

Le gène MKI67 ou KI67 situé dans le chromosome 17 contient 15 exons . Ce gène code pour une protéine nucléaire. Le KI67 est considéré comme un biomarqueur de prolifération nucléaire , il a des rôles potentiels de pronostic, de prédiction et de surveillance dans le CS(Rimm et al. 2019). Des variants de transcription épissés alternativement ont été décrits. (Bhagwat 2010)

Il n'existe aucune corrélation entre l'expression du KI67 et l'IDO au cours du CS (Onesti et al. 2019). Nous avons aussi trouvé que le SNP exonique (rs1279819656), situé dans l'exon 2 est associé à l'expression élevée de KI67 ( $P=0.01$ ).

L'IDO1 est défini aussi comme une protéine dioxygène  $\alpha$ -hélicoïdale contenant un petit domaine N-terminal (NTD, résidus 1 à 154) et un grand domaine C-terminal (CTD, résidus 155 à 403) (code PDB : 5WMU).

Le CTD est composé d'hélices  $\alpha$ , hélices 3, dont quatre hélices longues qui sont alignées avec le site de l'hème et forment des interactions hydrophobes avec le site voisin (Dorsey et al. 2018).

Depuis la découverte de l'IDO1, les recherches visent à inhiber efficacement et spécifiquement l'IDO1. Le mécanisme de l'IDO1 passe par une réaction séquentielle d'insertion d'oxygène, où l'oxygène moléculaire se lie à l'hème ferreux, puis s'ajoute à travers la double liaison C2-C3 du TRP. Alors que la plupart des inhibiteurs agissent comme des inhibiteurs compétitifs soit en imitant le substrat TRP, soit en se liant au cofacteur de l'hème (Tang et al. 2021).

En 2018 une étude montre que l'IDO1 est lié dynamiquement à son cofacteur hème dans ce qui est probablement une étape critique dans la régulation de cette enzyme. Dans l'inhibition de l'IDO1, le nouveau mécanisme suggère que l'effet d'inhibition de l'IDO1 dans les tumeurs nécessitait le renouvellement de l'IDO1 lié à l'hème. Ce qui affecte la fonction de l'IDO en touchant le domaine de relieur hémique (Dorsey et al. 2018).

Diverses interactions intramoléculaires sont impliquées dans la stabilisation et l'état replié de la protéine, y compris hydrophobe, électrostatique et liaison hydrogène. L'état de stabilité d'une protéine est un facteur clé dans son fonctionnalité appropriée (Zhou et Pang 2018). De toute évidence, de plus en plus de preuves indiquent que la diminution de la stabilité des protéines entraîne une augmentation de la dégradation, du mauvais repliement et de l'agrégation de protéines. En outre, un pliage incorrect et une diminution de la stabilité étaient les principales conséquences de la mutation faux sens pathogène (Bross et al. 1999; Du, Sharma, et Lukacs 2005). Yue et Moulton ont estimé que jusqu'à 25% des SNP pourraient altérer la fonction protéique dans la population humaine en modifiant la stabilité des protéines (Wang et Moulton 2001; Yue et Moulton 2006).

Dans notre étude les résidus mutés sont différents des résidus sauvages par la taille, la charge, l'hydrophobicité. La différence de taille entre le résidu de type sauvage et le résidu mutant, fait que le nouveau résidu muté n'est pas dans la bonne position pour créer la même liaison que le résidu sauvage d'origine. La différence de charge perturbera l'interaction ionique faite par le résidu sauvage d'origine. La combinaison de ces résultats suggère que les SNP délétères, révélés dans notre étude (R56P, R58T, V59I, R100P) peuvent modifier la fonction de l'IDO1 et affecter la pharmacocinétique du métabolisme de la voie de la KYN.

L'introduction ou la perte de charge ou d'hydrophobicité causeraient une répulsion, mauvais repliement ou perte d'interactions (Zhou et Pang 2018)

Les SNP qui ont été conservés dans une perspective évolutive sont plus importants que ceux qui n'ont pas été conservés, parce qu'ils sont structurellement et fonctionnellement importants pour la protéine (Gilis et Rooman 1996). Pour cette raison, le serveur ConSurf a été utilisé pour la conservation évolutive et l'analyse visant à explorer davantage les effets possibles des 4 SNP à risque élevé.

Nos résultats prédisaient que le nouveau SNP V59I détecté est le seul qui soit caractérisé par une conservation évolutive. Les résidus localisés dans la région conservée des protéines sont connus pour jouer un rôle crucial dans plusieurs processus biologiques, en particulier les interactions protéine-protéine (Arshad, Bhatti, et John 2018). En effet, les SNP

retrouvés dans cette région sont considérés comme très dommageables (Doniger et al. 2008; Miller et Kumar 2001).

La structure 3D et la conformation de la protéine jouent un rôle important dans la compréhension des effets globaux des SNP sur la fonction des protéines. Ainsi, l'analyse des différences conformationnelles protéiques a été réalisée par la modélisation HOPE. Les résultats montrent que les 4 mutations R56P, R58T, V59I, R100P conduiraient soit à la perte d'interactions, soit la perturbation structurelle. Cette analyse montre que les 4 SNP ont un impact sur la relieur hémique de l'IDO1. Cet impact est particulier car ce domaine est une cible thérapeutique

Dans notre travail, nous avons aussi déterminé une des causes de résistance aux inhibiteurs de l'IDO1; ce sont les polymorphismes qui touchent le domaine de relieur hémique où nous avons déterminé 3 polymorphismes qui sont connus (rs778268528; rs1417709040; rs200244502) et un nouveau polymorphisme -1 rs749740278 de l'exon 2 identifié.

Ces polymorphismes participent à la résistance de quelques inhibiteurs qui sont à la phase d'essais ou commercialisés. Citons : les dérivés du candésartan cilexétel qui occupent l'entrée du site actif de l'IDO1, mais pas la région de l'hème (Matsuno et al. 2012)

L'antioxydant ebselen se révèle un puissant inhibiteur de l'IDO1 dans les macrophages humains stimulés par l'IFN- $\gamma$  (Koblish et al. 2010) Le ebselen inhibe l'activité de l'IDO1 en réagissant avec les résidus de cystéine de l'IDO1, ce qui modifie la conformation de la protéine et l'environnement de l'hème au site actif (Wang et al. 2019)

La phénylhydrazine a été identifiée comme un inhibiteur de l'IDO1 qui a fortement inhibé l'enzyme IDO1, néanmoins, sa sélectivité pour l'IDO1 par rapport aux autres protéines contenant de l'hème reste à étudier pour éviter les effets hors cible (Tran et al. 2013; Wang et al. 2019).

Des dérivés d'O-benzylhydroxylamine qui imitaient les espèces alkylperoxy ont été conçus sur la base du ressenti oxydatif de TRP par l'IDO1 avec une bonne sélectivité par rapport aux autres enzymes contenant de l'hème (Capece et al. 2012; Malachowski et al. 2016).

Épacadostat (le chémotype hydroxyamidine) a été découvert en tant que pharmacophore clé pour l'inhibition de l'IDO1. La spectroscopie d'absorption confirmait la liaison directe au site de l'hème (Tang et al. 2021; Yue et al. 2009).

L'hydroxyamidine a été découvert en tant que pharmacophore clé pour l'inhibition de l'IDO1 où la spectroscopie d'absorption confirmait la liaison directe au site de l'hème (Yue et al. 2009).

Dans la présente étude, nous avons étudié aussi l'association de la fréquence allélique des 20 SNP trouvés dans l'IDO1 avec l'activité d'IDO1. Un seul SNP intronique, montre une

association avec le taux plasmatique d'IDO1 ( $p=0.03$ ). 42.50% des patientes avec l'allèle muté T exprimant un taux élevé de l'enzyme IDO 1.

Dans cette population d'étude nous avons déterminé aussi six (6) polymorphismes introniques touchant les bordures exoniques, parmi eux 3SNP qui sont connus et trois (3) sont des SNP nouvellement identifiés.

Parmi eux le SNP rs1009139308 montre une association avec les RH, le Ki67 et l'absence du HER2. Ce polymorphisme est situé au niveau de l'intron deux (2).

Parmi les polymorphismes introniques de l'IDO,1 qui sont étudiés le rs7820268, et le rs73619577 sont situés dans l'intron cinq (5) et six (6) respectivement (Tardito et al. 2013; Török et al. 2022)

Le fait qu'une substitution survenant à un site intronique peut affecter la structure et/ou la fonction de la protéine puisqu'il peut affecter l'épissage de l'ARNm (Ward et Cooper 2010).

Nous avons aussi identifié 3 polymorphismes qui touchent le site d'épissage rs758140978 ; +3rs927429393 ; -1Cov53715201.

Afin de comprendre l'impact des différents SNP faux sens (E51K, R56P, E57K, R58T, V59I, T71P, D98N, R100P) identifiés sur la stabilité de la structure de l'IDO1, une simulation de dynamique moléculaire a été réalisée pendant 50 ns. Plusieurs paramètres ont été analysés tout au long de la trajectoire de simulation, le RMSD et le RMSF (Benson et Daggett 2012).

L'information thermodynamique, la plus importante, qui nous indique la force des interactions entre les protéines, est l'affinité de liaison ou l'énergie libre de liaison,  $\Delta G$ . Les modifications de l'affinité de liaison causées par les mutations (c'est-à-dire  $\Delta\Delta G$ ) peuvent montrer l'impact des mutations sur l'IDO1 (Geng et al. 2019).

L'analyse de simulation et le trajet de la dynamique moléculaire nous ont facilité l'étude de l'effet structurel de cette mutation sur la structure de l'IDO1. Le graphique RMSF est effectué pour la compréhension de la flexibilité structurale (Benson et Daggett 2012).

Les données RMSD montrent qu'un type de déviation distinctement différent a été remarqué de l'IDO1 sauvage tout au long de la période de simulation par rapport à l'IDO1 muté, démontrant clairement que les SNP faux sens identifiés (E51K, R56P, E57K, R58T, V59I, T71P, D98N, R100P) avaient un effet stabilisant significatif sur l'IDO1. Cela a été confirmé par les données RMSF qui indiquent que l'IDO1 muté est inférieur pour l'ensemble des acides aminés par rapport à ceux de l'IDO1 sauvage. L'analyse du  $R_g$  a révélé une légère variation du  $R_g$  la structure de l'IDO1 sauvage a été moins compacte avec une moyenne de 2.40 nm.

Ces SNP identifiés dans notre population d'étude affectaient considérablement la conformation de l'IDO1, entraînant l'IDO1 plus compacte et plus stable. Ces SNP réagissent

probablement sur le repliement de l'IDO1 d'origine, ce qui rend probablement l'IDO1 plus réactif impliquant un épuisement plus rapide du TRP au cours du CS

Bien que les SNP décrits n'ont pas été analysés par des tests in vitro et il n'y a pas d'information sur l'impact fonctionnel et la signification de ces mutations dans l'IDO1, les résultats suggèrent que ces variations pourraient faire l'objet d'étude in vit

# *Discussion générale*

## **5. Discussion générale**

Pour mieux comprendre l'influence du polymorphisme du gène codant pour l'IDO1 sur le risque de développer le cancer du sein, nous nous sommes proposés d'identifier les variants génétiques de cette enzyme et son association au cancer du sein et aux phénotypes résultants.

A cette fin, nous avons essayé de comprendre les effets mutationnels sur l'activité moléculaire en aval d'un variant génétique, et de décrire les conséquences sur l'expression de l'IDO1.

Cette approche a permis de décrire les particularités régionales de la population d'études et de mettre en évidence les paramètres à l'origine du CS dans la région de Tlemcen (l'Ouest Algérien).

Elle a aussi montré que la voie du TRP est impliquée dans la survenue du CS dans la population d'étude.

Elle propose aussi que des variants exoniques et introniques découverts, dans notre échantillon de patientes atteintes du CS, peuvent être associés au métabolisme du TRP et constituer un facteur de risque de survenue ou d'aggravation.

En ce qui concerne les particularités de cette population de patientes, subdivisée en deux sous populations selon la fréquence de la répartition histologique à savoir ; les CS les plus fréquents (CCI, CLI est mixte) et les CS de fréquence histologique rare (DCIS, PM, MC ,PT), la classification histologique reste le moyen pour pronostiquer de nombreuses tumeurs ;bien qu'elle soit moins précise que celle qui utilise le grade de la tumeur et le type histologique ensemble (Gudaviciene et al. 2014; Pereira et al. 1995)

La principale raison d'appliquer un système de classification histologique au CS est d'obtenir une corrélation avec les facteurs pronostiques et la biologie tumorale(Rakha et al. 2010) . Les carcinomes invasifs peuvent être subdivisés morphologiquement en fonction de leur degré de différenciation ; Ceci est réalisé de deux manières, en évaluant le type histologique et le grade histologique (Elston 2005; Gudaviciene et al. 2014)

Les cancers fréquents du sein représentent 87% des cas, CCI était prédominant 79 % . Pour les cancers de fréquence histologique rares, nous les retrouvons à 13% répartis respectivement en : DCIS 6.5% des cas, le PM 3% des cas ; MC 2% des cas et le PT 1% des cas .

En Algérie et dans la même région d'étude (l'Ouest Algérien) on trouve plusieurs travaux de recherche qui établissent le profil épidémiologique et histologique du CS .Le CCI est le type histologique le plus fréquent dans la majorité des études (Nait Behloul. 2018 ; Cherbal et al. 2017; Mehemmai et al. 2020; Terki et al .2013.; Heanouï et al. 2017) .

Dans la même région de notre étude le CCI représente 55.4% dans la wilaya d'Oran (Nait Behloul. 2018) et 80% dans une autre recherche dans la wilaya de Tlemcen en 2002 et 2006 (Mesli taleb-bendiab et el kebir. 2013).

Selon la littérature, le DCIS est la forme la plus courante des cancers rares. Le DCIS représente 20 à 25 % des BC nouvellement diagnostiqués dans les populations dépistées avec plus de 60 000 nouveaux cas chaque année aux États-Unis (Canelo-Aybar et al. 2021). Tandis que dans d'autres études le DCIS est détecté à l'autopsie chez 14,7% des cas (Schnitt 2021). Selon une autre étude de Desouki et al, le DCIS représente 1,1% des femmes (Desouki et al. 2013).

Le PC représente environ 0,5 % de ces cancers du sein invasifs (Pal et al. 2010). En raison de la croissance du PC à l'intérieur des canaux, la plupart des tumeurs malignes du PC sont in situ. Selon d'autres études le carcinome papillaire du sein représente environ 0,5 à 2 % des cancers mammaires (Nuñez et al. 2020).

Pour le type histologique MC, c'est un sous-type relativement rare de cancer du sein. Selon la dernière classification de l'OMS des tumeurs du sein, le MC est classé comme un type particulier de cancer du sein et rare de néoplasmes mammaires (Budzik, Fudalej, et Badowska-Kozakiewicz 2021). Le MC se présente souvent comme une masse lobulée qui représente environ 1 à 4 % de tous les cancers du sein (Marrazzo et al. 2020). Dans d'autres études, il représente 1 à 7 % de tous les cancers invasifs du sein (Al Haddad, Awadallah, et Abdel Hadi 2017). Selon l'étude de Di Saverio et al le MC pure, représente environ 2 % des cas ; ce qui concorde avec nos résultats (Di Saverio, Gutierrez, et Avisar 2008).

Le PT représente 8,7 des cas dans une étude rétrospective (entre 2000-2006) qui comporte 3 792 patientes opérées du CS, parmi elles 134 cas représentent des formes rares du CS. Selon les recommandations de l'OMS, les PT ont un polymorphisme large classé histopathologiquement comme bénin, limité ou malin, variant entre 12% et 26% des cas (Peneş et al. 2021). Dans d'autres études les PT représentent moins de 1% de toutes les tumeurs mammaires (Strzypek et al. 2021) ; ce qui concorde avec vos résultats.

La variabilité histologique de notre population est un paramètre important et rarement retrouvée dans le CS.

Nous avons recherché des liens possibles entre les biomarqueurs du cancer du sein (RE, RP, HER2 et Ki67) et les paramètres d'agressivité tumorale (T, N, M, grade SBR) dans les cancers fréquentes et rares.

Dans les cancers rares le modèle a montré une association entre l'absence des RE, RP avec T, N, et le grade SBR.

Le modèle montre aussi une association entre l'expression élevée du KI67 et la taille tumorale.

Tandis que dans les cancers fréquents on ne retrouve aucune association entre l'expression des RE et l'agressivité tumorale.

Quant aux particularités hormonales, on note que dans la sous population de patientes avec cancers rares, le phénotype RE négatif est 2 fois plus associé à une taille tumorale supérieure à 2 cm (T2) et 4 fois plus associé aux grades SBR élevés (II-III) par rapport aux patientes de phénotype RE+.

Tandis que dans la sous population de patientes avec cancers fréquents on ne retrouve aucune association.

Le modèle mathématique montre aussi que les patientes présentant un cancer du sein rare RE négatif sont plus exposées à un envahissement ganglionnaire comparativement aux patientes qui expriment un RE+.

Concernant l'expression des RP dans les cancers rares, le modèle rapporte que l'absence des RP est significativement associée aux paramètres d'agressivité tumorale par rapport aux cancers exprimant les RP.

Tandis que l'absence des RP dans les cancers fréquents ne montre aucune association avec les paramètres d'agressivité tumorale.

L'exploration par l'indice de prolifération tumorale KI67 montre qu'un taux élevé de ce dernier ( $ki67 \geq 20$ ) est 2 fois plus associé à une taille tumorale supérieure à 2 cm chez les patientes avec cancer rare seulement.

Concernant les facteurs classiques (Age, Diabète, IMC) du CS les études sont controversées.

L'âge et les facteurs génétiques, hormonaux et reproductifs contribuent au risque de CS (Ribnikar et al. 2015). Dans notre étude les femmes âgées de moins de 58 ans sont pratiquement plus exposées au risque de CS par rapport aux femmes âgées de 58 ans et plus.

Une fréquence non négligeable est enregistrée entre 35 et 45 ans (âge moyen  $48,78 \pm 1,3$  ans) des femmes atteintes du CS dans la même région que notre étude (menée 2008-2009) (Terki et al. 2012). Une autre étude dans la même région a été menée en 2018 où on retrouve un âge moyen  $50.13 \pm 1.2$  ans (Nait Behloul. 2018).

Cette dernière recherche rejoint les données du registre d'Oran (Mokhtari et al.2016) et celles d'une étude à Tlemcen menée en 2011-2013 (Heanoui et al. 2017).

Certaines études ont trouvé une association significative entre le diabète de type II et le CS (Gourine et Chentouf. 2020; Hardefeldt et al. 2012; Maskarinec et al. 2018).

Tandis que la recherche menée dans l'Est Algérien ne trouve aucune association (avec un  $p=0.2$  et  $OR=0.7$ ) (Nait Behloul. 2018).

Les patientes dans notre étude avec un taux de glycémie supérieur  $>1.6$  g/L sont deux fois plus exposées au risque de CS par rapport aux femmes avec une glycémie  $\leq 1.6$  g/L ( $OR=2$  ;  $95\%$   $CI=1.47-5.13$  ;  $P=0.00$ ).

Pour la première fois une recherche menée dans cette région retrouve une association entre le diabète de type II et le CS.

Dans la littérature on ne trouve aucun travail et analyse sur la variabilité histologique dans la population Algériennes. La majorité des travaux de recherches sont en faveur d'une

étude des facteurs de risque du CS ainsi et des caractéristiques cliniques, tumorales (âge de survenue du CS, statut ménopausique, type histologique et grade histologique) avec les récepteurs hormonaux (RE et RP) ; ainsi que des études sur le BRCA (Cherbal et al. 2017; Mesli taleb-bendiab et El kebir 2013; Terki et al. 2012; Henaoui et al. 2017).

On trouve une seule recherche sur les facteurs de risque hormonaux, anthropométriques, du stress oxydant et des habitudes alimentaires au cours du CS (Fetni. 2020)

Notre étude rapporte les premières données sur l'évaluation du taux plasmatique du TRP comme facteur corrélé aux facteurs de risques de CS en Algérie.

La voie du TRP a été impliquée dans les tumeurs agressives, l'expression élevée de l'IDO1 et la dégradation du TRP étaient observées dans les tumeurs représentant une agressivité tumorale.

Une corrélation inversée a été trouvée entre la concentration plasmatique du TRP avec le grade SBR III. Le taux plasmatique de l'IDO1 supérieur à 4,9  $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$  est aussi associé 2 fois plus au grade SBR III.

La dégradation du TRP était plus rapide dans les tumeurs les plus grandes par rapport aux tumeurs de petite taille (T1). L'expression de l'IDO1 montre aussi une corrélation positive selon la taille tumorale et une différence significative selon le grade SBR

Récemment, un rôle particulier de l'IDO1 dans la médiation de l'évasion immunitaire tumorale a été révélé (Ye et al. 2019).

Plus précisément, il a été démontré que les altérations du catabolisme du TRP dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur, permettraient la persistance des cellules tumorales (Liu et Zhai 2021; Opitz et al. 2020).

Une corrélation inversée a été retrouvée entre le taux plasmatique du TRP et l'envahissement ganglionnaire. Une activité de l'IDO1 supérieure à 8,4  $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$  est associée 4 fois plus à l'envahissement ganglionnaire.

Plusieurs études ont montré une association entre le microenvironnement tumoral des ganglions lymphatiques et la dégradation du TRP ainsi que l'expression de l'IDO1 dans le CS (Liu et Zhai 2021; Opitz et al. 2020).

Dans notre étude l'activité enzymatique de l'IDO1 a été associée aux paramètres d'agressivité tumorale.

Concernant la relation entre les biomarqueurs du CS et le métabolisme du TRP, le taux plasmatique de TRP était plus faible chez les patientes avec ER- par rapport aux patientes ER+ , et on note aussi une faible liaison chez les patientes avec HER2+.

L'activité élevée de l'IDO1 (l'IDO1>6,2  $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ ) est associée 5 fois plus aux RE+ et ne montre aucune association avec HER2+. L'étude de Onesti et al montre que le taux

plasmatique de TRP était plus faible chez les patientes avec ER- par rapport aux patientes ER+ (Onesti et al. 2019). Tandis que l'étude de Tanguet et al montre que le taux plasmatique du TRP ne varie pas en fonction du RE mais le niveau de la KYN et de l'IDO1 sont élevés dans les tumeurs RE- (Tang et al. 2014).

La faible activité de l'IDO1 est associée à l'envahissement ganglionnaire selon Soliman (Soliman et al. 2013).

L'indice de prolifération mitotique KI67 montre une corrélation inversée avec le taux plasmatique du TRP et une corrélation positive avec l'activité enzymatique de l'IDO1. La dégradation du TRP était plus élevée chez les patientes qui ont une surexpression du KI67 >20% et l'association de l'IDO1 était également significativement associée au  $ki67 \geq 20$ .

Cela nous permet de proposer l'IDO1 comme un nouveau biomarqueur pronostique de la progression et du potentiel de prolifération des cellules cancéreuses au cours du CCI du sein dans les populations de l'extrême ouest Algérien.

Concernant les facteurs classiques du CS (Age, IMC et le diabète) en fonction du métabolisme du TRP au cours du CS, notre analyse montre que le statut du TRP chez les patientes diabétiques et âgées de moins de 58ans peut constituer un facteur de risque du CS.

L'activité enzymatique élevée de l'IDO1 ( $\geq 6.4 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ ) était significativement associée à un âge de  $63 \pm 14$  ans et un taux plasmatique élevé de glycémie dans le CS ; ainsi qu'une corrélation avec l'IMC.

La compréhension des relations complexes entre le diabète l'IMC et le CS nécessiterait plus d'intérêt et davantage d'études comportant des données populationnelles sur le mode de vie, les habitudes alimentaires, le niveau d'activité physique, les facteurs de risque communs, l'insulinémie, la résistance à l'insuline et d'autres biomarqueurs ainsi qu'une bonne caractérisation du patient et de son diabète.

Nous avons réalisé une étude génétique sur le polymorphisme de l'IDO1 au cours du CS pour la première fois dans une population Algérienne.

Parmi les études génétiques actuellement réalisées en Algérie on compte l'analyse des gènes BRCA1 et BRCA2. Aujourd'hui les implications de mutations pathogènes sur ces gènes dans les CS sont bien reconnues dans les diverses populations Algériennes. Cela laisse à penser que l'analyse de ces gènes a une place incontournable pour assurer une bonne prise en charge des patients atteints de cancers. (Habak et al. 2022; Mehemmai et al. 2020; Uhrhammer et al. 2008) (Boudiaf et Boudine. 2019)

Dans notre démarche nous avons voulu contourner cette fatalité. Nous avons entrepris de détecter de nouvelles altérations génétiques ; démarche qui devient déterminante afin d'intégrer de nouvelles réflexions sur les stratégies thérapeutiques à adopter pour chaque population et chaque patient.

Par conséquent la place de l'analyse génétique , le polymorphisme de l'IDO1 prend une nouvelle dimension.

Dans notre population d'étude nous avons identifié 11 polymorphismes exoniques parmi eux, six (06) SNP connus (rs1279819656 ; rs778268528 ; rs1417709040 ; rs868032537 ; rs758835146 ; rs200244502) ainsi que cinq (05) nouveaux polymorphismes. (-1 rs1265722807 ; +2rs778268528 ; -1rs749740278 ; -1 rs1237179070 ; +2 rs1208422426) qui n'ont jamais été identifiés.

Quatre (04) SNP ont prouvé un effet sur la fonction de la protéine ; dont une nouvelle mutation (1 rs749740278) non encore enregistrée et trois autres déjà décrites dans la littérature (rs778268528, rs1417709040, rs200244502).

Dans notre travail, nous avons aussi déterminé une des causes de résistance aux inhibiteurs de l'IDO1 ; ce sont les polymorphismes qui touchent le domaine de relieur hémique où nous avons déterminé 3 polymorphismes qui sont connus (rs778268528 ; rs1417709040 ; rs200244502) et un nouveau polymorphisme -1 rs749740278 identifié.

Dans cette population d'étude nous avons déterminé aussi six (6) polymorphismes introniques touchant les bordures exoniques, parmi eux 3SNP qui sont connus et 3 des SNP nouvellement identifiés. Nous avons aussi identifié 3 polymorphismes qui touchent le site d'épissage rs758140978 ; +3rs927429393 ; -1Cov53715201.

Le fait qu'une substitution survenant à un site intronique peut affecter la structure et/ou la fonction de la protéine puisqu'il peut affecter l'épissage de l'ARNm (Ward et Cooper 2010).

Dans ce travail, nous avons évalué, l'impact des polymorphismes observé sur les biomarqueurs du CS. Dans la littérature il n'existe aucune recherche dans ce sens

Les résultats de cette étude, montrent que l'allèle C muté du polymorphisme rs1417709040 est associé qu'à l'expression du RE

L'allèle C muté du polymorphisme rs200244502 était fréquent chez les patientes RE+ et totalement absent chez les patientes RE-, il était aussi associé à l'expression des RP.

L'allèle A muté du polymorphisme -1 rs749740278 est associé à l'expression du RE ,RP et HER2+, toutes les patientes avec RE+, RP+ et HER2+ possèdent l'allèle A

Cette nouvelle mutation identifiée dans notre population est associée à un phénotype particulier chez les patientes avec HER2+ de mauvais pronostic.

Nous avons aussi examiné les effets de la mutation faux sens par la dynamique moléculaire, pour cela nous avons comparé entre le RMSD de l'IDO1 sauvage et le RMSD de l'IDO1 muté identifié (retrouvé dans notre population)

L'IDO1 muté nouvellement identifié chez les patientes atteintes du CS se trouve plus stable que l'IDO1 d'origine (non muté) ; Par conséquence les 4 SNP faux sens (R56P, R58T, V59I, R100P) ont un effet sur le compactage de l'IDO et sur sa stabilité. L'IDO1 chez les patientes atteintes du CS de notre population d'étude peut être plus réactif, et par conséquent dégrade plus rapidement le TRP.



## *Conclusion et perspectives*

## *Conclusion et perspectives*

L'étude du microenvironnement tumoral a pris ces dernières années une place importante dans le domaine de la recherche sur le cancer du sein. En effet, il est désormais admis que le caractère invasif d'un cancer primitif est déterminé non seulement par le génotype des cellules tumorales, mais aussi par leur environnement cellulaire qui module les capacités d'échappement immunitaire.

L'activité de l'IDO est donc particulièrement importante ce qui en fait de biomarqueurs pronostiques de choix.

Notre étude indique l'implication la voie de la dégradation du TRP dans la progression tumorale et le profil des tumeurs agressives.

Nous avons corrélé les biomarqueurs du CS et les paramètres d'agressivité tumorale dans les 2 sous population d'étude (les cancers fréquents et les cancers rares) pour expliquer la variabilité histologique de notre population.

Nous avons pu déterminer la concentration plasmatique de TRP et celle de la Kyn et par la suite nous avons évalué l'activité enzymatique de l'IDO1.

L'activité enzymatique élevée de l'IDO1 est associée à l'agressivité tumorale et aux biomarqueurs (RH et KI67) du cancer canalaire infiltrant du sein.

l'IDO1 est ainsi lié aux facteurs de risques classiques du CS (Age, T, N,SBR,RH,KI67) et aussi un facteur lié à l'inflammation au cours du CS .

Notre étude rapporte, pour la première fois, des données non encore enregistrées sur le lien entre l'obésité, le diabète de type II et l'activité enzymatique de l'IDO 1 au cours du CS.

Le TRP participe à la survenue du CS en association avec un âge inférieur à 58ans et une glycémie supérieure à 1.6 g/l.

Notre étude montre que le statut en TRP est un comme facteur corrélé aux facteurs de risques de CS.

Nous avons déterminé les caractérisations génétiques de l'IDO1 par un séquençage de Sanger ; Ce qui nous a permis d'identifier vingt (20) SNP au cours du CS. Parmi eux onze (11) SNP faux sens

Nous avons évalué l'impact de la fréquence allélique des différents SNP en fonction de l'expression enzymatique d'IDO1.

Certaines altérations génétiques qui affectent le gène de l'IDO1 ont été trouvées associées à certains biomarqueurs du CS

Nous avons pu prédire l'effet phénotypique des différents SNP faux sens pour évaluer l'importance fonctionnelle des SNP sur l'activité de l'IDO1

Nous avons déterminé quatre SNP faux sens (R56P, R58T, V59I, R100P) pathogènes à haut risque sur la fonction de l'IDO1

## *Conclusion et perspectives*

Dans notre recherche sur le polymorphisme génétique nous avons déterminé une nouvelle mutation non décrite -1 rs749740278 (V59I) qui a un effet sur la fonction de l'IDO1. L'allèle A muté de ce polymorphisme est associé à l'expression du RE, RP et HER2+

Dans notre travail, nous avons aussi déterminé une des causes de résistance aux inhibiteurs de l'IDO 1; ce sont les polymorphismes qui touchent le domaine de relieur hémique où nous avons pu déterminer trois polymorphismes qui sont connus (rs778268528 ; rs1417709040 ; rs200244502) et un nouveau polymorphisme -1 rs749740278 de l'exon 2 identifié.

Nous avons montré, par la dynamique moléculaire , que l'IDO1 muté nouvellement identifié chez nos patientes atteintes du CS , est plus compacte et stable que l'IDO1 d'origine

Bien que les SNP déterminés n'ont pas été décrites dans le CS dans d'autres populations et n'ont pas été analysés par des tests in vitro et il n'y a pas d'information sur l'impact fonctionnel et la signification de ces mutations dans l'IDO1. Les résultats suggèrent que ces variations pourraient faire l'objet d'étude in vitro. Il n'y a aucune recherche sur le différent polymorphisme de gène de l'IDO1 au cours du CS.

L'ensemble des résultats obtenus doit être confirmé sur d'autres populations à large échelle.



# *Références bibliographiques*

## Références bibliographiques

- Abdelouahab, A., W. Chetibi, A. Alouiti, et S. Zerrouk. s. d. « Etude épidémiologique et génétique du cancer du sein triple négatif en Algérie ». ».
- Adzhubei, Ivan A., Steffen Schmidt, Leonid Peshkin, Vasily E. Ramensky, Anna Gerasimova, Peer Bork, Alexey S. Kondrashov, et Shamil R. Sunyaev. 2010. « A Method and Server for Predicting Damaging Missense Mutations ». *Nature Methods* 7(4):248-49. doi: 10.1038/nmeth0410-248.
- Al Haddad, Hiyam, Awadia Awadallah, et Maha Abdel Hadi. 2017. « Mucinous Breast Carcinoma: Report of Four Cases and Review of the Literature ». *Clinical and Diagnostic Pathology* 1(4). doi: 10.15761/CDP.1000120.
- Anderson, G. M., D. X. Freedman, D. J. Cohen, F. R. Volkmar, E. L. Hoder, P. McPhedran, R. B. Minderaa, C. R. Hansen, et J. G. Young. 1987. « Whole Blood Serotonin in Autistic and Normal Subjects ». *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines* 28(6):885-900. doi: 10.1111/j.1469-7610.1987.tb00677.x.
- Arefayene, Million, Santosh Philips, Donghua Cao, Sudharani Mamidipalli, Zeruesenay Desta, David A. Flockhart, David S. Wilkes, et Todd C. Skaar. 2009. « Identification of Genetic Variants in the Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO1) Gene, Which Have Altered Enzyme Activity ». *Pharmacogenetics and Genomics* 19(6):464-76. doi: 10.1097/FPC.0b013e32832c005a.
- Arshad, Maria, Attya Bhatti, et Peter John. 2018. « Identification and in Silico Analysis of Functional SNPs of Human TAGAP Protein: A Comprehensive Study ». *PLOS ONE* 13(1):e0188143. doi: 10.1371/journal.pone.0188143.
- Asghar, Kashif, Asim Farooq, Bilal Zulfiqar, et Asif Loya. 2021. « Review of 10 years of research on breast cancer patients: Focus on indoleamine 2,3-dioxygenase ». *World Journal of Clinical Oncology* 12(6):429-36. doi: 10.5306/wjco.v12.i6.429.
- Ashkenazy, Haim, Elana Erez, Eric Martz, Tal Pupko, et Nir Ben-Tal. 2010. « ConSurf 2010: Calculating Evolutionary Conservation in Sequence and Structure of Proteins and Nucleic Acids ». *Nucleic Acids Research* 38(Web Server issue):W529-533. doi: 10.1093/nar/gkq399.
- Bairoch, Amos, Rolf Apweiler, Cathy H. Wu, Winona C. Barker, Brigitte Boeckmann, Serenella Ferro, Elisabeth Gasteiger, Hongzhan Huang, Rodrigo Lopez, Michele Magrane, Maria J. Martin, Darren A. Natale, Claire O'Donovan, Nicole Redaschi, et Lai-Su L. Yeh. 2005. « The Universal Protein Resource (UniProt) ». *Nucleic Acids Research* 33(Database issue):D154-159. doi: 10.1093/nar/gki070.
- Benson, Noah C., et Valerie Daggett. 2012. « A Comparison of Multiscale Methods for the Analysis of Molecular Dynamics Simulations ». *The Journal of Physical Chemistry. B* 116(29):8722-31. doi: 10.1021/jp302103t.
- Bhagwat, Medha. 2010. « Searching NCBI's DbSNP Database ». *Current Protocols in Bioinformatics* Chapter 1:Unit 1.19. doi: 10.1002/0471250953.bi0119s32.
- Bi, Wei-Wei, Wei-Hua Zhang, Gui-Hua Yin, Hong Luo, Shou-Qin Wang, Hongran Wang, Chao Li, Wei-Qun Yan, et De-Zhi Nie. 2014. « Analysis of Indoleamine 2-3 Dioxygenase (IDO) and EGFR Co-Expression in Breast Cancer Tissue by Immunohistochemistry ». *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15(14):5535-38. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.14.5535.

- de Bie, Josien, Jade Guest, Gilles J. Guillemin, et Ross Grant. 2016. « Central Kynurenine Pathway Shift with Age in Women ». *Journal of Neurochemistry* 136(5):995-1003. doi: 10.1111/jnc.13496.
- Boisserie-Lacroix, M., G. Hurtevent-Labrot, S. Ferron, N. Lippa, H. Bonnefoi, et G. Mac Grogan. 2013. « Correlation between Imaging and Molecular Classification of Breast Cancers ». *Diagnostic and Interventional Imaging* 94(11):1069-80. doi: 10.1016/j.diii.2013.04.010.
- Boisserie-Lacroix, M., G. Mac Grogan, M. Debled, S. Ferron, M. Asad-Syed, V. Brouste, S. Mathoulin-Pelissier, et G. Hurtevent-Labrot. 2012. « Radiological features of triple-negative breast cancers (73 cases) ». *Diagnostic and Interventional Imaging* 93(3):183-90. doi: 10.1016/j.diii.2012.01.006.
- Botticelli, Andrea, Bruna Cerbelli, Luana Lionetto, Ilaria Zizzari, Massimiliano Salati, Annalinda Pisano, Mazzuca Federica, Maurizio Simmaco, Marianna Nuti, et Paolo Marchetti. 2018. « Can IDO Activity Predict Primary Resistance to Anti-PD-1 Treatment in NSCLC? » *Journal of Translational Medicine* 16(1):219. doi: 10.1186/s12967-018-1595-3.
- Boudiaf, Radia, et Leia Boudine. 2019. « Étude de la relation entre la longueur du triplet CAG du gène AR (récepteur à l'androgène) et du cancer du sein chez la femme Algérienne ». *Morphologie* 103(342):78. doi: 10.1016/j.morpho.2019.10.041.
- Boyland, E., et D. C. Williams. 1955. « The Estimation of Tryptophan Metabolites in the Urine of Patients with Cancer of the Bladder ». *The Biochemical Journal* 60(Annual General Meeting):v.
- Bross, Peter, Thomas J. Corydon, Brage S. Andresen, Malene M. Jørgensen, Lars Bolund, et Niels Gregersen. 1999. « Protein Misfolding and Degradation in Genetic Diseases ». *Human Mutation* 14(3):186-98. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1999)14:3<186::AID-HUMU2>3.0.CO;2-J.
- Budzik, Michał Piotr, Marta Magdalena Fudalej, et Anna Maria Badowska-Kozakiewicz. 2021. « Histopathological Analysis of Mucinous Breast Cancer Subtypes and Comparison with Invasive Carcinoma of No Special Type ». *Scientific Reports* 11(1):5770. doi: 10.1038/s41598-021-85309-z.
- Canelo-Aybar, Carlos, Alvaro Taype-Rondan, Jessica Hanae Zafra-Tanaka, David Rigau, Axel Graewingholt, Annette Lebeau, Elsa Pérez Gómez, Paolo Giorgi Rossi, Miranda Langendam, Margarita Posso, Elena Parmelli, Zuleika Saz-Parkinson, et Pablo Alonso-Coello. 2021. « Preoperative Breast Magnetic Resonance Imaging in Patients with Ductal Carcinoma in Situ: A Systematic Review for the European Commission Initiative on Breast Cancer (ECIBC) ». *European Radiology* 31(8):5880-93. doi: 10.1007/s00330-021-07873-2.
- Cao, Tingming, Guangming Dai, Hongqian Chu, Chengcheng Kong, Huijuan Duan, Na Tian, et Zhaogang Sun. 2022. « Single-Nucleotide Polymorphisms and Activities of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Isoforms, IDO1 and IDO2, in Tuberculosis Patients ». *Hereditas* 159(1):5. doi: 10.1186/s41065-022-00219-y.
- Capece, Luciana, Ariel Lewis-Ballester, Syun-Ru Yeh, Dario A. Estrin, et Marcelo A. Marti. 2012. « The Complete Reaction Mechanism of Indoleamine 2,3-Dioxygenase as Revealed by QM/MM Simulations ». *The Journal of Physical Chemistry. B* 116(4):1401-13. doi: 10.1021/jp2082825.

## Références bibliographiques

- Chen, Peng, Bo Li, et Ling Ou-Yang. 2022. « Role of estrogen receptors in health and disease ». *Frontiers in Endocrinology* 13.
- Cheng, Jianlin, Arlo Randall, et Pierre Baldi. 2006. « Prediction of Protein Stability Changes for Single-Site Mutations Using Support Vector Machines ». *Proteins* 62(4):1125-32. doi: 10.1002/prot.20810.
- Cherbal, Farid, Chiraz Mehemmai, Khadidja Gassi, Abdelmoumene Guedioura, Yosr Hamdi, Wassila Benbrahim, et Rabah Bakour. 2017. « Abstract 271: Clinicopathological and molecular study of breast cancer in Algerian women from the Aures region: Data from the anti-cancer center of Batna ». *Cancer Research* 77(13\_Supplement):271. doi: 10.1158/1538-7445.AM2017-271.
- Chu, Duan, et Lai Wei. 2019. « Nonsynonymous, synonymous and nonsense mutations in human cancer-related genes undergo stronger purifying selections than expectation ». *BMC Cancer* 19(1):359. doi: 10.1186/s12885-019-5572-x.
- Chung, Sang-Hyuk, Silvia Franceschi, et Paul F. Lambert. 2010. « Estrogen and ERalpha: Culprits in Cervical Cancer? ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 21(8):504-11. doi: 10.1016/j.tem.2010.03.005.
- Creelan, Ben C., Scott Antonia, Gerold Bepler, Timothy J. Garrett, George R. Simon, et Hatem H. Soliman. 2013. « Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and clinical outcome following induction chemotherapy and concurrent chemoradiation in Stage III non-small cell lung cancer ». *Oncoimmunology* 2(3):e23428. doi: 10.4161/onci.23428.
- Deroo, B. J. 2006. « Estrogen Receptors and Human Disease ». *Journal of Clinical Investigation* 116(3):561-70. doi: 10.1172/JCI27987.
- Desouki, Mohamed M., Zaibo Li, Omar Hameed, Oluwole Fadare, et Chengquan Zhao. 2013. « Incidental Atypical Proliferative Lesions in Reduction Mammoplasty Specimens: Analysis of 2498 Cases from 2 Tertiary Women's Health Centers ». *Human Pathology* 44(9):1877-81. doi: 10.1016/j.humpath.2013.02.015.
- Dewi, Dyah L., Soumya R. Mohapatra, Saioa Blanco Cabañes, Isabell Adam, Luis F. Somarribas Patterson, Bianca Berdel, Masroor Kahloon, Loreen Thürmann, Stefanie Loth, Katharina Heilmann, Dieter Weichenhan, Oliver Mücke, Ines Heiland, Pauline Wimberger, Jan Dominik Kuhlmann, Karl-Heinz Kellner, Sarah Schott, Christoph Plass, Michael Platten, Clarissa Gerhäuser, Saskia Trump, et Christiane A. Opitz. 2017. « Suppression of Indoleamine-2,3-Dioxygenase 1 Expression by Promoter Hypermethylation in ER-Positive Breast Cancer ». *Oncoimmunology* 6(2):e1274477. doi: 10.1080/2162402X.2016.1274477.
- Di Saverio, Salomone, Juan Gutierrez, et Eli Avisar. 2008. « A Retrospective Review with Long Term Follow up of 11,400 Cases of Pure Mucinous Breast Carcinoma ». *Breast Cancer Research and Treatment* 111(3):541-47. doi: 10.1007/s10549-007-9809-z.
- Doniger, Scott W., Hyun Seok Kim, Devjane Swain, Daniella Corcuera, Morgan Williams, Shiaw-Pyng Yang, et Justin C. Fay. 2008. « A Catalog of Neutral and Deleterious Polymorphism in Yeast ». *PLOS Genetics* 4(8):e1000183. doi: 10.1371/journal.pgen.1000183.
- Dorsey, Frank C., Karim A. Benhadji, Lillian L. Sams, Debra A. Young, John F. Schindler, Karen L. Huss, Alexander Nikolayev, Carmine Carpenito, David Clawson, Bonita Jones, Andrew L. Faber, James E. Thomas, Steven A. Haney, Gaiying Zhao, William T. McMillen, Tod Smeal, Daniel J. Sall, Michael D. Kalos, Sandaruwan Geeganage, et James R. Henry. 2018. « Abstract 5245:

- Identification and characterization of the IDO1 inhibitor LY3381916 ». *Cancer Research* 78(13\_Supplement):5245. doi: 10.1158/1538-7445.AM2018-5245.
- Du, Kai, Manu Sharma, et Gergely L. Lukacs. 2005. « The  $\Delta$ F508 Cystic Fibrosis Mutation Impairs Domain-Domain Interactions and Arrests Post-Translational Folding of CFTR ». *Nature Structural & Molecular Biology* 12(1):17-25. doi: 10.1038/nsmb882.
- Eliyatkin, Nuket, Evrim Yalcin, Baha Zengel, Safiye Aktaş, et Enver Vardar. 2015. « Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way ». *Journal of Breast Health* 11(2):59-66. doi: 10.5152/tjbh.2015.1669.
- Elston, C. W. 2005. « Classification and Grading of Invasive Breast Carcinoma ». *Verhandlungen Der Deutschen Gesellschaft Fur Pathologie* 89:35-44.
- Eniu, Dan Tudor, Florina Romanciuc, Corina Moraru, Iulian Goidescu, Daniela Eniu, Adelina Staicu, Claudiu Rachieriu, Rareş Buiga, et Carmen Socaciu. 2019a. « The Decrease of Some Serum Free Amino Acids Can Predict Breast Cancer Diagnosis and Progression ». *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 79(1-2):17-24. doi: 10.1080/00365513.2018.1542541.
- Eniu, Dan Tudor, Florina Romanciuc, Corina Moraru, Iulian Goidescu, Daniela Eniu, Adelina Staicu, Claudiu Rachieriu, Rareş Buiga, et Carmen Socaciu. 2019b. « The Decrease of Some Serum Free Amino Acids Can Predict Breast Cancer Diagnosis and Progression ». *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 79(1-2):17-24. doi: 10.1080/00365513.2018.1542541.
- Fetni, Samira. 2020. « Le cancer du sein chez une population de femmes de l'Est algérien: facteurs de risques hormonaux, anthropométriques, du stress oxydant et des habitudes alimentaires ». *Algerian Journal of Health Sciences* 2(4):9-22.
- Gaceb, Hadjer, Farid Cherbal, Rabah Bakour, Abdelhalim Ould-Rouis, et Hassen Mahfouf. 2018. « Clinicopathological and Molecular Study of Triple-Negative Breast Cancer in Algerian Patients ». *Pathology & Oncology Research* 24(2):297-308. doi: 10.1007/s12253-017-0242-2.
- Galvão-de Almeida, Amanda, Lucas C. Quarantini, Aline S. Sampaio, André C. Lyra, Carmen Lívia Parise, Raymundo Paraná, Irismar R. de Oliveira, Karestan C. Koenen, Ângela Miranda-Scippa, et Camila Guindalini. 2011. « Lack of Association of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Polymorphisms with Interferon-Alpha-Related Depression in Hepatitis C ». *Brain, Behavior, and Immunity* 25(7):1491-97. doi: 10.1016/j.bbi.2011.06.001.
- Gaudet, Mia M., Mihaela Campan, Jonine D. Figueroa, Xiaohong R. Yang, Jolanta Lissowska, Beata Peplonska, Louise A. Brinton, David L. Rimm, Peter W. Laird, Montserrat Garcia-Closas, et Mark E. Sherman. 2009. « DNA Hypermethylation of ESR1 and PGR in Breast Cancer: Pathologic and Epidemiologic Associations ». *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 18(11):3036-43. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0678.
- Geng, Cunliang, Li C. Xue, Jorge Roel-Touris, et Alexandre M. J. J. Bonvin. 2019. « Finding the  $\Delta\Delta$ G Spot: Are Predictors of Binding Affinity Changes upon Mutations in Protein–Protein Interactions Ready for It? ». *WIREs Computational Molecular Science* 9(5):e1410. doi: 10.1002/wcms.1410.

## Références bibliographiques

- Gilis, Dimitri, et Marianne Rومان. 1996. « Stability Changes upon Mutation of Solvent- Accessible Residues in Proteins Evaluated by Database-Derived Potentials ». *Journal of Molecular Biology* 257(5):1112-26. doi: 10.1006/jmbi.1996.0226.
- Gómez-Cebrián, Nuria, Inés Domingo-Ortí, José Luis Poveda, María J. Vicent, Leonor Puchades-Carrasco, et Antonio Pineda-Lucena. 2021. « Multi-Omic Approaches to Breast Cancer Metabolic Phenotyping: Applications in Diagnosis, Prognosis, and the Development of Novel Treatments ». *Cancers* 13(18):4544. doi: 10.3390/cancers13184544.
- GOURINE, Mouna, et CHENTOUF, Amina. 2020. « Diabetes and cancer: Epidemiologic and physiopathogenic links ». doi: 10.5281/ZENODO.4181960.
- Greene, Lisa I., Tullia C. Bruno, Jessica L. Christenson, Angelo D'Alessandro, Rachel Culp-Hill, Kathleen Torkko, Virginia F. Borges, Jill E. Slansky, et Jennifer K. Richer. 2019a. « A Role for Tryptophan-2,3-Dioxygenase in CD8 T-Cell Suppression and Evidence of Tryptophan Catabolism in Breast Cancer Patient Plasma ». *Molecular Cancer Research* 17(1):131-39. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0362.
- Greene, Lisa I., Tullia C. Bruno, Jessica L. Christenson, Angelo D'Alessandro, Rachel Culp-Hill, Kathleen Torkko, Virginia F. Borges, Jill E. Slansky, et Jennifer K. Richer. 2019b. « A Role for Tryptophan-2,3-Dioxygenase in CD8 T-Cell Suppression and Evidence of Tryptophan Catabolism in Breast Cancer Patient Plasma ». *Molecular Cancer Research* 17(1):131-39. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0362.
- Grohmann, Ursula, Francesca Fallarino, et Paolo Puccetti. 2003. « Tolerance, DCs and Tryptophan: Much Ado about IDO ». *Trends in Immunology* 24(5):242-48. doi: 10.1016/S1471-4906(03)00072-3.
- Gudaviciene, Daiva, Laura Steponaviciene, Raimundas Meskauskas, Giedre Smailyte, et Eduardas Aleknavicius. 2014. « Rare Types of Breast Carcinoma ». *Open Medicine* 10(1). doi: 10.1515/med-2015-0016.
- Habak, N., M. Ait Abdallah, A. Chikouche, B. Ait Abdelkader, et L. Griene. 2022. « Prévalence des mutations germinales BRCA1/2 dans une population algérienne atteinte de cancer du sein et / ou de l'ovaire. Prevalence of BRCA1/2 germinal mutations in an Algerian population with breast and/or ovarian cancer. »
- Han, Zhijie, Dian He, et Yang Zhang. 2020. « Genetic Variant Rs7820258 Regulates the Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 in Brain Regions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117(39):24035-36. doi: 10.1073/pnas.2007022117.
- Hardefeldt, Prue J., Senarath Edirimanne, et Guy D. Eslick. 2012. « Diabetes Increases the Risk of Breast Cancer: A Meta-Analysis ». *Endocrine-Related Cancer* 19(6):793-803. doi: 10.1530/ERC-12-0242.
- Heng, Benjamin, Ayse A. Bilgin, David B. Lovejoy, Vanessa X. Tan, Heloisa H. Milioli, Laurence Gluch, Sonia Bustamante, Tharani Sabaretnam, Pablo Moscato, Chai K. Lim, et Gilles J. Guillemin. 2020a. « Differential Kynurenine Pathway Metabolism in Highly Metastatic Aggressive Breast Cancer Subtypes: Beyond IDO1-Induced Immunosuppression ». *Breast Cancer Research* 22(1):113. doi: 10.1186/s13058-020-01351-1.
- Heng, Benjamin, Ayse A. Bilgin, David B. Lovejoy, Vanessa X. Tan, Heloisa H. Milioli, Laurence Gluch, Sonia Bustamante, Tharani Sabaretnam, Pablo Moscato, Chai K. Lim, et Gilles J. Guillemin.

- 2020b. « Differential kynurenine pathway metabolism in highly metastatic aggressive breast cancer subtypes: beyond IDO1-induced immunosuppression ». *Breast Cancer Research* 22(1):113. doi: 10.1186/s13058-020-01351-1.
- Hou, Xi-xi, Xiao-qing Gong, Long-fei Mao, Ge Sun, et Jian-xue Yang. 2022. « Design, synthesis and biological evaluation of erlotinib-based IDO1 inhibitors ». *Frontiers in Pharmacology* 13:940704. doi: 10.3389/fphar.2022.940704.
- Kadoya, Akihiko, Shigenobu Tone, Hiroyasu Maeda, Yohsuke Minatogawa, et Ryo Kido. 1992. « Gene Structure of Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189(1):530-36. doi: 10.1016/0006-291X(92)91590-M.
- Karolchik, D., R. Baertsch, M. Diekhans, T. S. Furey, A. Hinrichs, Y. T. Lu, K. M. Roskin, M. Schwartz, C. W. Sugnet, D. J. Thomas, R. J. Weber, D. Haussler, et W. J. Kent. 2003. « The UCSC Genome Browser Database ». *Nucleic Acids Research* 31(1):51-54. doi: 10.1093/nar/gkg129.
- Katz, Jessica B., Alexander J. Muller, et George C. Prendergast. 2008. « Indoleamine 2,3-Dioxygenase in T-Cell Tolerance and Tumoral Immune Escape ». *Immunological Reviews* 222(1):206-21. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00610.x.
- Kim, Sewha, Sanghui Park, Min Sun Cho, Woosung Lim, Byung-In Moon, et Sun Hee Sung. 2017. « Strong Correlation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Expression with Basal-Like Phenotype and Increased Lymphocytic Infiltration in Triple-Negative Breast Cancer ». *Journal of Cancer* 8(1):124-30. doi: 10.7150/jca.17437.
- Koblish, Holly K., Michael J. Hansbury, Kevin J. Bowman, Gengjie Yang, Claire L. Neilan, Patrick J. Haley, Timothy C. Burn, Paul Waeltz, Richard B. Sparks, Eddy W. Yue, Andrew P. Combs, Peggy A. Scherle, Kris Vaddi, et Jordan S. Fridman. 2010. « Hydroxyamidine Inhibitors of Indoleamine-2,3-Dioxygenase Potently Suppress Systemic Tryptophan Catabolism and the Growth of IDO-Expressing Tumors ». *Molecular Cancer Therapeutics* 9(2):489-98. doi: 10.1158/1535-7163.mct-09-0628.
- Køllgaard, Tania, Tobias Wirenfeldt Klausen, Manja Idorn, Rikke Bæk Holmgaard, Per thor Straten, et Mads Hald Andersen. 2012. « Association of a Functional Indoleamine 2,3-Dioxygenase 2 Genotype with Specific Immune Responses ». *Oncolmmunology* 1(4):441-47. doi: 10.4161/onci.19654.
- Korzeniewski, Sylvia, Paul Hofman, et Patrick Brest. 2013. « Des polymorphismes silencieux plutôt bruyants ». *médecine/sciences* 29(2):124-26. doi: 10.1051/medsci/2013292003.
- Kutzner, Carsten, Szilárd Páll, Martin Fechner, Ansgar Esztermann, Bert L. Groot, et Helmut Grubmüller. 2019. « More Bang for Your Buck: Improved Use of GPU Nodes for GROMACS 2018 ». *Journal of Computational Chemistry* 40(27):2418-31. doi: 10.1002/jcc.26011.
- Lakens, Daniel, et Aaron R. Caldwell. 2019. *Simulation-Based Power-Analysis for Factorial ANOVA Designs*. preprint. PsyArXiv. doi: 10.31234/osf.io/baxsf.
- Leclerc, A. 1975. « L'analyse des correspondances sur juxtaposition de tableaux de contingence ». *Revue de Statistique Appliquée*.
- Lee, Alexander, Navya Kanuri, Yuanhao Zhang, Gregory S. Sayuk, Ellen Li, et Matthew A. Ciorba. 2014. « IDO1 and IDO2 Non-Synonymous Gene Variants: Correlation with Crohn's Disease Risk and

## Références bibliographiques

- Clinical Phenotype » édité par D. L. Boone. *PLoS ONE* 9(12):e115848. doi: 10.1371/journal.pone.0115848.
- Li, Mengyu, Man Ki Kwok, Shirley Siu Ming Fong, et Catherine Mary Schooling. 2019. « Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Ischemic Heart Disease: A Mendelian Randomization Study ». *Scientific Reports* 9(1):8491. doi: 10.1038/s41598-019-44819-7.
- Li, Ran, Xuanyang Wang, Yuntao Zhang, Xiaoqing Xu, Lulu Wang, Chunbo Wei, Lin Liu, Ziqi Wang, et Ying Li. 2022. « Analysis of Tryptophan and Its Main Metabolite Kynurenine and the Risk of Multiple Cancers Based on the Bidirectional Mendelian Randomization Analysis ». *Frontiers in Oncology* 12:852718. doi: 10.3389/fonc.2022.852718.
- Liu, Qiang, Jie Zhai, Xiangyi Kong, Xiangyu Wang, Zhongzhao Wang, Yi Fang, et Jing Wang. 2020. « Comprehensive Analysis of the Expression and Prognosis for TDO2 in Breast Cancer ». *Molecular Therapy - Oncolytics* 17:153-68. doi: 10.1016/j.omto.2020.03.013.
- Liu, Xiao-han, et Xiao-yue Zhai. 2021. « Role of Tryptophan Metabolism in Cancers and Therapeutic Implications ». *Biochimie* 182:131-39. doi: 10.1016/j.biochi.2021.01.005.
- Liu, Ye, Pengfei Li, Tianci Jiang, Yue Li, Yu Wang, et Zhe Cheng. 2023. « Epidermal Growth Factor Receptor in Asthma: A Promising Therapeutic Target? » *Respiratory Medicine* 207:107117. doi: 10.1016/j.rmed.2023.107117.
- Lyon, Debra E., Jeanne M. Walter, Angela R. Starkweather, Christine M. Schubert, et Nancy L. McCain. 2011a. « Tryptophan Degradation in Women with Breast Cancer: A Pilot Study ». *BMC Research Notes* 4(1):156. doi: 10.1186/1756-0500-4-156.
- Lyon, Debra E., Jeanne M. Walter, Angela R. Starkweather, Christine M. Schubert, et Nancy L. McCain. 2011b. « Tryptophan Degradation in Women with Breast Cancer: A Pilot Study ». *BMC Research Notes* 4(1):156. doi: 10.1186/1756-0500-4-156.
- Madeira, Fábio, Matt Pearce, Adrian R. N. Tivey, Prasad Basutkar, Joon Lee, Ossama Edbali, Nandana Madhusoodanan, Anton Kolesnikov, et Rodrigo Lopez. 2022. « Search and Sequence Analysis Tools Services from EMBL-EBI in 2022 ». *Nucleic Acids Research* gkac240. doi: 10.1093/nar/gkac240.
- Malachowski, William P., Maria Winters, James B. DuHadaway, Ariel Lewis-Ballester, Shorouk Badir, Jenny Wai, Maisha Rahman, Eesha Sheikh, Judith M. LaLonde, Syun-Ru Yeh, George C. Prendergast, et Alexander J. Muller. 2016. « O-Alkylhydroxylamines as Rationally-designed Mechanism-based Inhibitors of Indoleamine 2,3-Dioxygenase-1 ». *European journal of medicinal chemistry* 108:564-76. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.12.028.
- Marrazzo, Emilia, Federico Frusone, Flavio Milana, Andrea Sagona, Wolfgang Gatzemeier, Erika Barbieri, Alberto Bottini, Giuseppe Canavese, Arianna Olga Rubino, Marco Gaetano Eboli, Carlo Marco Rossetti, Alberto Testori, Valentina Errico, Alessandro De Luca, et Corrado Tinterri. 2020. « Mucinous Breast Cancer: A Narrative Review of the Literature and a Retrospective Tertiary Single-Centre Analysis ». *The Breast* 49:87-92. doi: 10.1016/j.breast.2019.11.002.
- Maskarinec, Gertraud, Angélique Fontaine, Johanna Eyrun Torfadottir, Lorraine L. Lipscombe, Iliana C. Lega, Jonine Figueroa, et Sarah Wild. 2018. « The Relation of Type 2 Diabetes and Breast Cancer Incidence in Asian, Hispanic and African American Populations—A Review ». *Canadian Journal of Diabetes* 42(1):100-105. doi: 10.1016/j.cjcd.2017.02.005.

- Matsuno, Kenji, Hiroshi Yamazaki, Yoshinobu Isaka, Kazushige Takai, Yuka Unno, Naohisa Ogo, Yoshinobu Ishikawa, Satoshi Fujii, Osamu Takikawa, et Akira Asai. 2012. « Novel candesartan derivatives as indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors ». *MedChemComm* 3(4):475-79. doi: 10.1039/c2md00278g.
- Mehemmai, Chiraz, Farid Cherbal, Yosr Hamdi, Abdelmoumene Guedioura, Wassila Benbrahim, Rabah Bakour, et Sonia Abdelhak. 2020. « BRCA1 and BRCA2 Germline Mutation Analysis in Hereditary Breast/Ovarian Cancer Families from the Aures Region (Eastern Algeria): First Report ». *Pathology & Oncology Research* 26(2):715-26. doi: 10.1007/s12253-019-00586-4.
- Ménard, S., S. Fortis, F. Castiglioni, R. Agresti, et A. Balsari. 2001. « HER2 as a Prognostic Factor in Breast Cancer ». *Oncology* 61 Suppl 2:67-72. doi: 10.1159/000055404.
- Merlo, Lauren M. F., James B. DuHadaway, James D. Montgomery, Wei-Dan Peng, Peter J. Murray, George C. Prendergast, Andrew J. Caton, Alexander J. Muller, et Laura Mandik-Nayak. 2020. « Differential Roles of IDO1 and IDO2 in T and B Cell Inflammatory Immune Responses ». *Frontiers in Immunology* 11:1861. doi: 10.3389/fimmu.2020.01861.
- Mesli Taleb-Bendiab, F., et F. Z. El Kebir. 2013. « Histoire familiale du cancer du sein dans l'Ouest algérien : état des lieux ». *Journal Africain du Cancer / African Journal of Cancer* 5(1):27-31. doi: 10.1007/s12558-012-0243-8.
- Metz, Richard, James B. DuHadaway, Uma Kamasani, Lisa Laury-Kleintop, Alexander J. Muller, et George C. Prendergast. 2007. « Novel Tryptophan Catabolic Enzyme IDO2 Is the Preferred Biochemical Target of the Antitumor Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibitory Compound d-1-Methyl-Tryptophan ». *Cancer Research* 67(15):7082-87. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1872.
- Michels, Karin B., Caren G. Solomon, Frank B. Hu, Bernard A. Rosner, Susan E. Hankinson, Graham A. Colditz, JoAnn E. Manson, et Nurses' Health Study. 2003. « Type 2 Diabetes and Subsequent Incidence of Breast Cancer in the Nurses' Health Study ». *Diabetes Care* 26(6):1752-58. doi: 10.2337/diacare.26.6.1752.
- Miller, Mark P., et Sudhir Kumar. 2001. « Understanding human disease mutations through the use of interspecific genetic variation ». *Human Molecular Genetics* 10(21):2319-28. doi: 10.1093/hmg/10.21.2319.
- Muller, Alexander J., Richard Metz, et George C. Prendergast. 2007. « Differential Targeting of Tryptophan Catabolism in Tumors and in Tumor-Draining Lymph Nodes by Stereoisomers of the IDO Inhibitor 1-Methyl-Tryptophan ». *International Congress Series* 1304:250-61. doi: 10.1016/j.ics.2007.07.042.
- Muller, Alexander J., Madhav D. Sharma, Phillip R. Chandler, James B. DuHadaway, Mary E. Everhart, Burles A. Johnson, David J. Kahler, Jeanene Pihkala, Alejandro Peralta Soler, David H. Munn, George C. Prendergast, et Andrew L. Mellor. 2008. « Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(44):17073-78. doi: 10.1073/pnas.0806173105.
- Munn, David H., Madhav D. Sharma, Jeffrey R. Lee, Kanchan G. Jhaver, Theodore S. Johnson, Derin B. Keskin, Brendan Marshall, Phillip Chandler, Scott J. Antonia, Russell Burgess, Craig L. Slingluff, et Andrew L. Mellor. 2002. « Potential Regulatory Function of Human Dendritic Cells

## Références bibliographiques

- Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase ». *Science* 297(5588):1867-70. doi: 10.1126/science.1073514.
- Murr, Christian, Tanja B. Grammer, Marcus E. Kleber, Andreas Meinitzer, Winfried März, et Dietmar Fuchs. 2015. « Low Serum Tryptophan Predicts Higher Mortality in Cardiovascular Disease ». *European Journal of Clinical Investigation* 45(3):247-54. doi: 10.1111/eci.12402.
- Nakache Jean-Pierre. 2003. *Statistique explicative appliquée: analyse discriminante, modèle logistique, segmentation par arbre / Jean-Pierre Nakache,... Josiane Confais,...* Paris: Éd. Technip.
- Ng, Pauline C., et Steven Henikoff. 2003. « SIFT: Predicting Amino Acid Changes That Affect Protein Function ». *Nucleic Acids Research* 31(13):3812-14. doi: 10.1093/nar/gkg509.
- Niinisalo, P., A. Raitala, M. Pertovaara, S. S. Oja, T. Lehtimäki, M. Kähönen, A. Reunanen, A. Jula, L. Moilanen, Y. A. Kesäniemi, M. S. Nieminen, et M. Hurme. 2008. « Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity Associates with Cardiovascular Risk Factors: The Health 2000 Study ». *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 68(8):767-70. doi: 10.1080/00365510802245685.
- Núñez, Denny Lara, Fernando Candanedo González, Mónica Chapa Ibargüengoitia, Rosaura Eugenia Fuentes Corona, Antonio Carlos Hernández Villegas, Mariana Licano Zubiata, Sara Eugenia Vázquez Manjarrez, et Carlos Casian Ruiz Velasco. 2020. « Papillary Lesions of the Breast: A Review ». *Breast Cancer Management* 9(4):BMT52. doi: 10.2217/bmt-2020-0028.
- Oliver, Kathryn E., Sangwoo T. Han, Eric J. Sorscher, et Garry R. Cutting. 2017. « Transformative Therapies for Rare CFTR Missense Alleles ». *Current Opinion in Pharmacology* 34:76-82. doi: 10.1016/j.coph.2017.09.018.
- Onesti, Concetta Elisa, François Boemer, Claire Josse, Stéphane Leduc, Vincent Bours, et Guy Jerusalem. 2019. « Tryptophan Catabolism Increases in Breast Cancer Patients Compared to Healthy Controls without Affecting the Cancer Outcome or Response to Chemotherapy ». *Journal of Translational Medicine* 17(1):239. doi: 10.1186/s12967-019-1984-2.
- Opitz, Christiane A., Luis F. Somarribas Patterson, Soumya R. Mohapatra, Dyah L. Dewi, Ahmed Sadik, Michael Platten, et Saskia Trump. 2020. « The Therapeutic Potential of Targeting Tryptophan Catabolism in Cancer ». *British Journal of Cancer* 122(1):30-44. doi: 10.1038/s41416-019-0664-6.
- Pal, Sumanta Kumar, Sean K. Lau, Laura Kruper, Uzoamaka Nwoye, Carlos Garberoglio, Ravi K. Gupta, Benjamin Paz, Lalit Vora, Eduardo Guzman, Avo Artinyan, et George Somlo. 2010. « Papillary Carcinoma of the Breast: An Overview ». *Breast Cancer Research and Treatment* 122(3):637-45. doi: 10.1007/s10549-010-0961-5.
- Peneș, Nicolae Ovidiu, Anca Lucia Pop, Roxana Georgiana Borș, et Valentin Nicolae Varlas. 2021. « Large borderline phyllodes breast tumor related to histopathology, diagnosis, and treatment management – case report ». *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 62(1):283-88. doi: 10.47162/RJME.62.1.30.
- Pereira, H., S. E. Pinder, D. M. Sibbering, M. H. Galea, C. W. Elston, R. W. Blamey, J. F. Robertson, et I. O. Ellis. 1995. « Pathological Prognostic Factors in Breast Cancer. IV: Should You Be a Typer or a Grader? A Comparative Study of Two Histological Prognostic Features in Operable Breast Carcinoma ». *Histopathology* 27(3):219-26. doi: 10.1111/j.1365-2559.1995.tb00213.x.

- Pettersen, Eric F., Thomas D. Goddard, Conrad C. Huang, Gregory S. Couch, Daniel M. Greenblatt, Elaine C. Meng, et Thomas E. Ferrin. 2004. « UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis ». *Journal of Computational Chemistry* 25(13):1605-12. doi: 10.1002/jcc.20084.
- Peyraud, Florent, Jean-Philippe Guegan, Dominique Bodet, Sophie Cousin, Alban Bessede, et Antoine Italiano. 2022. « Targeting Tryptophan Catabolism in Cancer Immunotherapy Era: Challenges and Perspectives ». *Frontiers in Immunology* 13:807271. doi: 10.3389/fimmu.2022.807271.
- Platten, Michael, Ellen A. A. Nollen, Ute F. Röhrig, Francesca Fallarino, et Christiane A. Opitz. 2019. « Tryptophan Metabolism as a Common Therapeutic Target in Cancer, Neurodegeneration and Beyond ». *Nature Reviews Drug Discovery* 18(5):379-401. doi: 10.1038/s41573-019-0016-5.
- Poulain-Godefroy, Odile, Elodie Eury, Audrey Leloire, Benjamin Hennart, Gilles J. Guillemin, Delphine Allorge, et Philippe Froguel. 2013. « Induction of TDO2 and IDO2 in Liver by High-Fat Feeding in Mice: Discrepancies with Human Obesity ». *International Journal of Tryptophan Research : IJTR* 6(Suppl 1):29-37. doi: 10.4137/IJTR.S11717.
- Prat, Aleix, Joel S. Parker, Olga Karginova, Cheng Fan, Chad Livasy, Jason I. Herschkowitz, Xiaping He, et Charles M. Perou. 2010. « Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer ». *Breast Cancer Research* 12(5):R68. doi: 10.1186/bcr2635.
- Prendergast, G. C., M. Y. Chang, L. Mandik-Nayak, R. Metz, et A. J. Muller. 2011. « Indoleamine 2,3-dioxygenase as a Modifier of Pathogenic Inflammation in Cancer and other Inflammation-Associated Diseases ». *Current medicinal chemistry* 18(15):2257-62.
- Rakha, Emad A., Jorge S. Reis-Filho, Frederick Baehner, David J. Dabbs, Thomas Decker, Vincenzo Eusebi, Stephen B. Fox, Shu Ichihara, Jocelyne Jacquemier, Sunil R. Lakhani, José Palacios, Andrea L. Richardson, Stuart J. Schnitt, Fernando C. Schmitt, Puay-Hoon Tan, Gary M. Tse, Sunil Badve, et Ian O. Ellis. 2010. « Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade ». *Breast Cancer Research* 12(4):207. doi: 10.1186/bcr2607.
- Rausch, Tobias, Markus Hsi-Yang Fritz, Andreas Untergasser, et Vladimir Benes. 2020. « Tracy: basecalling, alignment, assembly and deconvolution of sanger chromatogram trace files ». *BMC Genomics* 21(1):230. doi: 10.1186/s12864-020-6635-8.
- Ribnikar, D., J. M. Ribeiro, D. Pinto, B. Sousa, A. C. Pinto, E. Gomes, E. C. Moser, M. J. Cardoso, et F. Cardoso. 2015. « Breast Cancer Under Age 40: A Different Approach ». *Current Treatment Options in Oncology* 16(4):16. doi: 10.1007/s11864-015-0334-8.
- Rimm, David L., Samuel C. Y. Leung, Lisa M. McShane, Yalai Bai, Anita L. Bane, John M. S. Bartlett, Jane Bayani, Martin C. Chang, Michelle Dean, Carsten Denkert, Emeka K. Enwere, Chad Galderisi, Abhi Gholap, Judith C. Hugh, Anagha Jadhav, Elizabeth N. Kornaga, Arvydas Laurinavicius, Richard Levenson, Joema Lima, Keith Miller, Liron Pantanowitz, Tammy Piper, Jason Ruan, Malini Srinivasan, Shakeel Virk, Ying Wu, Hua Yang, Daniel F. Hayes, Torsten O. Nielsen, et Mitch Dowsett. 2019. « An International Multicenter Study to Evaluate Reproducibility of Automated Scoring for Assessment of Ki67 in Breast Cancer ». *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 32(1):59-69. doi: 10.1038/s41379-018-0109-4.

## Références bibliographiques

- Rozen, S., et H. Skaletsky. 2000. « Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 132:365-86. doi: 10.1385/1-59259-192-2:365.
- Saporta, Gilbert. 2006. *Probabilités, analyse des données et statistique*. Editions TECHNIP.
- Schefold, Jörg C., Jan-Philip Zeden, Christina Fotopoulou, Stephan von Haehling, Rene Pschowski, Dietrich Hasper, Hans-Dieter Volk, Christine Schuett, et Petra Reinke. 2009. « Increased Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Activity and Elevated Serum Levels of Tryptophan Catabolites in Patients with Chronic Kidney Disease: A Possible Link between Chronic Inflammation and Uraemic Symptoms ». *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 24(6):1901-8. doi: 10.1093/ndt/gfn739.
- Schnitt, Stuart J. 2010. « Classification and Prognosis of Invasive Breast Cancer: From Morphology to Molecular Taxonomy ». *Modern Pathology* 23:S60-64. doi: 10.1038/modpathol.2010.33.
- Schnitt, Stuart J. 2021. « Diagnosis of Ductal Carcinoma in Situ in an Era of De-Escalation of Therapy ». *Modern Pathology* 34:1-7. doi: 10.1038/s41379-020-00665-x.
- Soliman, Hatem, Bhupendra Rawal, Jimmy Fulp, Ji-Hyun Lee, Alexis Lopez, Marilyn M. Bui, Farah Khalil, Scott Antonia, Harris G. Yfantis, Dong H. Lee, Tiffany H. Dorsey, et Stefan Ambs. 2013a. « Analysis of Indoleamine 2-3 Dioxygenase (IDO1) Expression in Breast Cancer Tissue by Immunohistochemistry ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 62(5):829-37. doi: 10.1007/s00262-013-1393-y.
- Soliman, Hatem, Bhupendra Rawal, Jimmy Fulp, Ji-Hyun Lee, Alexis Lopez, Marilyn M. Bui, Farah Khalil, Scott Antonia, Harris G. Yfantis, Dong H. Lee, Tiffany H. Dorsey, et Stefan Ambs. 2013b. « Analysis of Indoleamine 2-3 Dioxygenase (IDO1) Expression in Breast Cancer Tissue by Immunohistochemistry ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 62(5):829-37. doi: 10.1007/s00262-013-1393-y.
- Stone, Trevor W., Nicholas Stoy, et L. Gail Darlington. 2013. « An Expanding Range of Targets for Kynurenine Metabolites of Tryptophan ». *Trends in Pharmacological Sciences* 34(2):136-43. doi: 10.1016/j.tips.2012.09.006.
- Strzępek, Łukasz, Patrycja Ciesielska, Katarzyna Karakiewicz-Krawczyk, et Aleksandra Czerw. 2021. « Malignant Phyllodes Tumor of the Breast: Case Report, Tumor Characteristics, Treatment Approach ». *Breast Cancer Management* 10(3):BMT58. doi: 10.2217/bmt-2020-0036.
- Tan, Qiaorui, Sha Yin, Dongdong Zhou, Yajing Chi, Xiaochu Man, et Huihui Li. 2022. « Potential Predictive and Prognostic Value of Biomarkers Related to Immune Checkpoint Inhibitor Therapy of Triple-Negative Breast Cancer ». *Frontiers in Oncology* 12:779786. doi: 10.3389/fonc.2022.779786.
- Tang, Kai, Ya-Hong Wu, Yihui Song, et Bin Yu. 2021. « Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors in clinical trials for cancer immunotherapy ». *Journal of Hematology & Oncology* 14(1):68. doi: 10.1186/s13045-021-01080-8.
- Tang, Xiaohu, Chao-Chieh Lin, Ivan Spasojevic, Edwin S. Iversen, Jen-Tsan Chi, et Jeffrey R. Marks. 2014. « A Joint Analysis of Metabolomics and Genetics of Breast Cancer ». *Breast Cancer Research* 16(4):415. doi: 10.1186/s13058-014-0415-9.

- Tardito, Samuele, Simone Negrini, Giuseppina Conteduca, Francesca Ferrera, Alessia Parodi, Florinda Battaglia, Francesca Kalli, Daniela Fenoglio, Maurizio Cutolo, et Gilberto Filaci. 2013. « Indoleamine 2,3 Dioxygenase Gene Polymorphisms Correlate with CD8+ Treg Impairment in Systemic Sclerosis ». *Human Immunology* 74(2):166-69. doi: 10.1016/j.humimm.2012.11.008.
- Terki, K., N. Messid, I. Meguenni, F. Dablaoui, Z. Djaroud, L. Mokhtari, CHU Oran, et CHU Oran. s. d. « 12 Cancer du sein : épidémiologie 1 et facteurs de risque (EHU0 Oran 2008-2009) ».
- Török, Nóra, Rita Maszlag-Török, Kinga Molnár, Zoltán Szolnoki, Ferenc Somogyvári, Krisztina Boda, Masaru Tanaka, Péter Klivényi, et László Vécsei. 2022. « Single Nucleotide Polymorphisms of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Influenced the Age Onset of Parkinson's Disease ». *Frontiers in Bioscience-Landmark* 27(9):265. doi: 10.31083/j.fbl2709265.
- Tran, Phuong-Thao, Van-Hai Hoang, Shivaji A. Thorat, Sung Eun Kim, Jihyae Ann, Yu Jin Chang, Dong Woo Nam, Hyundong Song, Inhee Mook-Jung, Jiyoun Lee, et Jeewoo Lee. 2013. « Structure-Activity Relationship of Human Glutaminyl Cyclase Inhibitors Having an N-(5-Methyl-1H-Imidazol-1-yl)Propyl Thiourea Template ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21(13):3821-30. doi: 10.1016/j.bmc.2013.04.005.
- Uhrhammer, Nancy, Amina Abdelouahab, Laurence Lafarge, Viviane Feillel, Ahmed Ben Dib, et Yves-Jean Bignon. 2008. « BRCA1 Mutations in Algerian Breast Cancer Patients: High Frequency in Young, Sporadic Cases ». *International Journal of Medical Sciences* 197-202. doi: 10.7150/ijms.5.197.
- Ulvik, Arve, Øivind Midttun, Adrian McCann, Klaus Meyer, Grethe Tell, Ottar Nygård, et Per M. Ueland. 2020. « Tryptophan Catabolites as Metabolic Markers of Vitamin B-6 Status Evaluated in Cohorts of Healthy Adults and Cardiovascular Patients ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 111(1):178-86. doi: 10.1093/ajcn/nqz228.
- Venselaar, Hanka, Tim AH te Beek, Remko KP Kuipers, Maarten L. Hekkelman, et Gert Vriend. 2010. « Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces ». *BMC Bioinformatics* 11(1):548. doi: 10.1186/1471-2105-11-548.
- Vigneron, Nathalie, Nicolas van Baren, et Benoît J. Van den Eynde. 2015. « Expression profile of the human IDO1 protein, a cancer drug target involved in tumoral immune resistance ». *Oncoimmunology* 4(5):e1003012. doi: 10.1080/2162402X.2014.1003012.
- Wang, Thomas J., Martin G. Larson, Ramachandran S. Vasan, Susan Cheng, Eugene P. Rhee, Elizabeth McCabe, Gregory D. Lewis, Caroline S. Fox, Paul F. Jacques, Céline Fernandez, Christopher J. O'Donnell, Stephen A. Carr, Vamsi K. Mootha, Jose C. Florez, Amanda Souza, Olle Melander, Clary B. Clish, et Robert E. Gerszten. 2011. « Metabolite Profiles and the Risk of Developing Diabetes ». *Nature Medicine* 17(4):448-53. doi: 10.1038/nm.2307.
- Wang, Xiu-Xiu, Si-Yu Sun, Qing-Qing Dong, Xiao-Xiang Wu, Wei Tang, et Ya-Qun Xing. 2019. « Recent advances in the discovery of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors ». *MedChemComm* 10(10):1740-54. doi: 10.1039/c9md00208a.
- Wang, Zhen, et John Moulton. 2001. « SNPs, Protein Structure, and Disease ». *Human Mutation* 17(4):263-70. doi: 10.1002/humu.22.

## Références bibliographiques

- Ward, Amanda J., et Thomas A. Cooper. 2010. « The Pathobiology of Splicing ». *The Journal of Pathology* 220(2):152-63. doi: 10.1002/path.2649.
- Watcharanurak, K., L. Zang, M. Nishikawa, K. Yoshinaga, Y. Yamamoto, Y. Takahashi, M. Ando, K. Saito, Y. Watanabe, et Y. Takakura. 2014. « Effects of Upregulated Indoleamine 2, 3-Dioxygenase 1 by Interferon  $\gamma$  Gene Transfer on Interferon  $\gamma$ -Mediated Antitumor Activity ». *Gene Therapy* 21(9):794-801. doi: 10.1038/gt.2014.54.
- Wolf, H., P. O. Madsen, et J. M. Price. 1968. « Studies on the Metabolism of Tryptophan in Patients with Benign Prostatic Hypertrophy or Cancer of the Prostate ». *The Journal of Urology* 100(4):537-43. doi: 10.1016/s0022-5347(17)62566-7.
- Yamada, Kazuo, Takeshi Miyazaki, Tomoko Shibata, Nobumasa Hara, et Mikako Tsuchiya. 2008. « Simultaneous Measurement of Tryptophan and Related Compounds by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 867(1):57-61. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.03.010.
- Ye, Zixiang, Linxiu Yue, Jiachen Shi, Mingmei Shao, et Tao Wu. 2019a. « Role of IDO and TDO in Cancers and Related Diseases and the Therapeutic Implications ». *Journal of Cancer* 10(12):2771-82. doi: 10.7150/jca.31727.
- Ye, Zixiang, Linxiu Yue, Jiachen Shi, Mingmei Shao, et Tao Wu. 2019b. « Role of IDO and TDO in Cancers and Related Diseases and the Therapeutic Implications ». *Journal of Cancer* 10(12):2771-82. doi: 10.7150/jca.31727.
- Yuan, Baowen, Simon Schaffner, Qiuqiong Tang, Matthias Scheffler, Juliane Nees, Jörg Heil, Sarah Schott, Michael Golatta, Markus Wallwiener, Christof Sohn, Therese Koal, Barbara Wolf, Andreas Schneeweiß, et Barbara Burwinkel. 2019. « A Plasma Metabolite Panel as Biomarkers for Early Primary Breast Cancer Detection ». *International Journal of Cancer* 144(11):2833-42. doi: 10.1002/ijc.31996.
- Yue, Eddy W., Brent Douty, Brian Wayland, Michael Bower, Xiangdong Liu, Lynn Leffet, Qian Wang, Kevin J. Bowman, Michael J. Hansbury, Changnian Liu, Min Wei, Yanlong Li, Richard Wynn, Timothy C. Burn, Holly K. Koblish, Jordan S. Fridman, Brian Metcalf, Peggy A. Scherle, et Andrew P. Combs. 2009. « Discovery of Potent Competitive Inhibitors of Indoleamine 2,3-Dioxygenase with in Vivo Pharmacodynamic Activity and Efficacy in a Mouse Melanoma Model ». *Journal of Medicinal Chemistry* 52(23):7364-67. doi: 10.1021/jm900518f.
- Yue, Peng, et John Moulton. 2006. « Identification and Analysis of Deleterious Human SNPs ». *Journal of Molecular Biology* 356(5):1263-74. doi: 10.1016/j.jmb.2005.12.025.
- Zhai, Lijie, Erik Ladomersky, Alicia Lenzen, Brenda Nguyen, Ricky Patel, Kristen L. Lauing, Meijing Wu, et Derek A. Wainwright. 2018. « IDO1 in cancer: a Gemini of immune checkpoints ». *Cellular and Molecular Immunology* 15(5):447-57. doi: 10.1038/cmi.2017.143.
- Zhou, Huan-Xiang, et Xiaodong Pang. 2018. « Electrostatic Interactions in Protein Structure, Folding, Binding, and Condensation ». *Chemical reviews* 118(4):1691-1741. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00305.

# *Annexes*

*Questionnaire*

• **Paramètres anthropométriques**

Age:.....

Poids :..... Taille:..... IMC.....

• **ATCD personnelles**

HTA: Oui  Non  nom du traitement.....

Diabète: Oui  Non  insulino dépendant  Oui  Non  Type d'insuline.....

• **ATCD Familiaux**

néo du sein:  mère  sœur  tante  grand mère

Un autre type de cancer dans la famille :.....

• **Paramètres anthropométriques :**

L'âge des premières règles: <12ans  ≥12ans

L'âge de la ménopause: <50ans  ≥50ans

L'âge du mariage :

L'âge de la première grossesse:

• **Paramètres reproductifs :**

L'allaitement: non  oui  la durée: <1ans  >1ans

Le nombre d'enfants: .....

Le contraceptif oral non  oui  la durée ..... nom de la pilule .....

• **Paramètres anthropo-sociologiques :**

Niveau d'instruction : Analphabète  Primaire  Secondaire  Universitaire

Activité professionnelle: Sans profession  Avec profession  retraité

Situation familiale : Marié  Célibataire  Divorcé

Résultats des analyses

• **Paramètres immunohistochimiques:**

RE : positive  négative  score:.....

RP: positive  négative  score:.....

HER2: positive  négative  score:.....

KI67: .....%.

• **Paramètres histologiques :**

Le type histologique: .....

Le Grade SBR : I  II  III

TNM: T0  T1  T2  T3  T4

N0  N1  N2  N3

M0  M1

Le type d'intervention : Tumorectomie  Mastectomie Sein droit  Sein gauche   
bilatérale

## **. Protocole d'extraction d'ADN**

Il s'agit de l'extraction de l'ADN génomique à partir du sang total, qui a été réalisée par la technique de NaCl « Salting out » (Miller et al, 1988).

### **1. Lyse des globules rouges**

- Réalisée en complétant le volume de sang avec une solution hypotonique (tris-EDTA (T) 10/10 (Tris/acide chlorhydrique (HCl) 10 mM et EDTA 10 mM ; pH = 8,0).
- Après lavage, les tubes sont mis dans la glace pendant 30 minutes (ce qui conduit à l'éclatement des globules rouges )
- centrifugés à 2500 tours/min pendant 15min.
- La centrifugation permet de séparer le surnageant qui contient les débris de globules rouges des globules blancs qui sont précipités au fond du tube formant un culot.
- L'opération de lavage est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un culot blanchâtre (les globules blancs).

### **2. Lyse des globules blancs**

- Le culot de leucocytes est traité par 5 mL de solution de lyse des globules blancs (Tris/HCl 10 mM ; EDTA 0,1 M et le sodium dodécyl sulfate (SDS) 0,5% ; pH = 8,0).
- 100 µl de protéinase K à 20 mg/mL sont additionnés pour digérer les protéines associées à l'ADN nucléaire.
- Après homogénéisation, le mélange est incubé au bain marie à 37°C pendant une nuit.

### **3. Précipitation de l'ADN**

- Deux mL de NaCl 5 M sont ajoutés dans chaque tube. Après une centrifugation de 10 min à 4000 tours/min
- l'ADN est transféré dans un autre tube
- L'ADN est précipité avec deux volumes d'éthanol absolu froid.
- L'ADN est visible à l'oeil sous forme de filaments formant une méduse.
- L'adn est récupérée puis lavée avec une solution d'éthanol à 70%( pour se débarrasser des traces de sels,
- L'ADN est séchée puis dissoute dans des tubes des Eppendorf (en présence de 100 à 600 µl de TE10/1 (Tris/HCl 10 mM et EDTA 1 mM ; pH = 8,0) )
- selon la taille de la méduse. L'ADN est dissout dans le tampon sous agitation douce pendant plusieurs jours.

## **Protocole du PCR**

La PCR est une méthode d'amplification génique spécifique in vitro, Elle utilise de façon répétitive l'activité d'une ADN polymérase thermorésistante (la Taq polymérase) pour synthétiser in vitro la séquence d'ADN à amplifier selon un procédé d'extension d'amorces (oligonucléotides monocaténares complémentaires aux extrémités de l'ADN).

L'ADN est d'abord dénaturé c'est-à-dire séparation des deux brins par chauffage (95° C pendant 30 secondes à 1 minute).

Ensuite, l'hybridation des amorces, c'est l'étape déterminante pour l'efficacité et la spécificité de la PCR. Elle s'effectue généralement à une température autour de 55° C. Cette température dépend de la température de fusion des amorces ( $T_m$ ) qui dépend-elle même de la composition en bases de l'amorce. Puis, la synthèse des deux brins à partir des amorces hybridées dans le sens 5'--- 3' par l'enzyme taq polymérase qui incorporant les quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) en présence d'un tampon adéquat, c'est l'élongation.

Cette étape se fait à 72° C et dure 30 secondes à une minute.

Ces trois étapes (dénaturation, hybridation et élongation) sont répétées plusieurs fois. Après n cycle, le nombre théorique de copies d'ADN obtenues est de  $2^n$  (n: nombre de cycle).

Mais en pratique le nombre de brins est limité à cause de la baisse de certains réactifs, l'augmentation de la viscosité du milieu et la baisse de l'activité de l'ADN polymérase thermostable.

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer et d'identifier des fragments d'ADN, pour déterminer leur taille, pour en estimer la quantité.

Les facteurs les plus importants sont la taille de l'ADN (c'est-à-dire la masse moléculaire), les molécules de petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de grande taille et la charge négative de l'ADN.

La vitesse de migration d'une molécule d'ADN est en fonction de deux paramètres: sa taille et la concentration en agarose du gel (l'augmentation de la concentration d'agarose dans un gel réduit la vitesse de migration), mais le voltage et la force ionique du tampon interviennent également.

Le choix de la concentration du gel d'agarose est en fonction de la taille des fragments d'ADN à séparer. Pour bien évaluer la taille exacte des fragments digérés obtenus, nous avons utilisé un marqueur de taille de 1 Kb (GeneRuler 1 kb DNA ladder by Thermo Fisher Scientific). La migration se fait pendant 1 heure à 100 volts dans un tampon de migration TBE (1X, pH=8,4). La révélation se fait par exposition du gel aux rayons UV (Gel Doc Bio-Rad xR+ ) après coloration au RedSafe qui s'intercale entre les bases d'ADN, devient fluorescent et permet de visualiser directement les fragments de restriction.



# STATUS OF INDOLEAMINE-2,3-DIOXYGENASE 1 IN INFILTRATING DUCTAL CARCINOMA OF BREAST CANCER: A NEW PROGNOSTIC INDICATOR FOR AGGRESSIVE TUMORS

T. SALMI<sup>1</sup>, M. DALI-SAHI<sup>1</sup>, B. GUERMOUCHE<sup>2</sup>, N. DENNOUNI-MEDJATI<sup>1</sup>, B. HENNART<sup>3,4</sup>, M. LENSKI<sup>3,4</sup>, D. ALLORGE<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Laboratory of Analytical Chemistry and Electrochemistry, University of Tlemcen, Tlemcen, Algeria

<sup>2</sup>Department of Biology, Laboratory of Physiology, Physiopathology and Biochemistry of Nutrition, Faculty SNVTU, University Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Tlemcen, Algeria

<sup>3</sup>CHU Lille, Unité Fonctionnelle de Toxicologie, Lille, France

<sup>4</sup>Univ. Lille, ULR 4483 - IMPECS - IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine, Lille, France

**Abstract - Objective:** *The tryptophan pathway has been demonstrated to be involved in tumor progression. Increased expression of indoleamine 2,3-dioxygenases has been observed in several human tumors types, such as breast cancer. In order to study the role of IDO expression as a prognostic marker, the serum tryptophan and kynurenine concentrations and the ratio of kynurenine to tryptophan (K/T) of 165 subjects were compared, and correlations were established.*

**Patients and Methods:** *This is a case-control study involving 39 patients with invasive ductal breast carcinoma. The recruitment period was from January 2018 to December 2019. We investigated the serum tryptophan and kynurenine levels based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).*

**Results:** *Our analysis shows a faster tryptophan degradation in larger tumors. The K/T ratio was significantly associated with breast cancer risk factors (age, tumor size and biomarkers). It was also significantly associated with KI67 ( $r=0.208$ ;  $p=0.007$ ) and with age ( $r=0.166$   $p=0.033$ ) as well. The plasmatic K/T ratio expression greater than  $8.4 \mu\text{mol} / \mu\text{mol}$  was significantly associated with an age of  $63 \pm 14$  years old (OR=1.05, 95% IC 1.01-1.09,  $p=0.02$ ). Regression analysis also shows that higher plasmatic K/T ratio expression was associated*

two times with higher tumour size and SBR grade (OR=2.11, 95% IC 0.95-2.83,  $p=0.035$ ; OR=2, 95% IC 1.11-3.54,  $p=0.02$ , respectively). Subjects with a high K/T ratio ( $>6.2$ ) are associated five times with RE+ and RP+ compared to subjects with a low K/T ratio ( $<4.2$ ) (OR=5, 95% IC 1.23-18.81,  $p=0.02$ ; OR=4.2, 95% IC 1.07-16.72,  $p=0.04$ , respectively). It was also

significantly associated with higher KI67 expression ( $ki67 \geq 20$ ) (OR=1.14, 95% IC 1.04-1.26,  $p=0.008$ ).

**Conclusions:** The K/T ratio can be used as a new prognostic biomarker for the progression and invasiveness of breast invasive ductal carcinoma.

**KEYWORDS:** Kynurenine, Tryptophan, Biomarkers, Infiltrating ductal carcinoma.

**LIST OF ABBREVIATIONS:** IDO- Indoleamine 2,3-Dioxygenase, TRP-tryptophan, KYN- kynurenine, K/T- kynurenine-to-tryptophan ratio, LC-MS/MS- Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry, BC- Breast cancer, HR- Hormone Receptors, ER - Estrogen receptor, PR - Progesterone receptor, CTRL- Healthy Controls, OC- oral contraceptives, T1-tumour size  $\leq 2$  cm, T2-tumour size

NTRODUCTION