

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE BATNA 2
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES ORGANISMES



Thèse en vue de l'obtention du diplôme de
DOCTORAT troisième cycle

Filière

BIOTECHNOLOGIE

Option

Biotechnologie Des Molécules Bioactives Et Pathologie Moléculaire

Thème

**Etude du polymorphisme du gène adrénérgique $\alpha 2A$
(*ADRA2A*) dans le cancer du sein**

Présentée par : KAABI Batoul

JURY		Grade	Université
Président	Salah LAROUÏ	Pr	Univ. Batna 2
Examinatrice	Dalila SATTA	Pr	Univ. Mentouri Constantine
Examinateur	Farid CHERBAL	Pr	USTHB. Alger
Examinatrice	Karima SIFI	MCA	Univ. Constantine 3
Examinatrice	Leila HAMBABA	Pr	Univ. Batna 2
Directrice de thèse:	Ghania BELAALOUÏ	MCA	Université Batna 2

Année universitaire 2015-2016

*À mon très cher père et
très chère mère*

Remerciements

C'est avec une grande fierté, beaucoup de soulagement, une touche de mélancolie et une énorme gratitude que s'achève mon aventure doctorale. Par conséquent, je tiens à utiliser ces quelques lignes afin d'articuler mes remerciements aux personnes qui m'ont offert le soutien moral et technique ayant rendu ce projet possible. Il s'agit d'une tâche dont la complexité réside à la fois à trouver les mots adéquats mais surtout à n'oublier personne. Je vais donc accuser tout oubli de ma part sur la faute d'un épuisement cérébral, et je remercie sincèrement à l'avance toute personne m'ayant apporté un soutien et dont le nom a été accidentellement omis. Toutes mes excuses et merci de votre compréhension.

J'aimerais avant tout remercier ma directrice de thèse **Dr. BELAALOUJ GHANIA**. La généreuse confiance dont vous m'avez témoigné en m'acceptant au sein de ce projet me touche beaucoup et je vous en serai reconnaissante tout au long de ma vie professionnelle. Vous m'avez encadrée et permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions. Je vous remercie également pour toute la disponibilité et la patience dont vous avez fait preuve au cours de ces cinq années, ainsi que pour tout l'enseignement que vous m'avez apporté. Vos encouragements, vos directives et vos conseils, et vos contributions financières m'ont été d'une grande aide. Merci de m'avoir ouvert les yeux sur le monde de la science et d'avoir été pour moi un mentor aussi inspirant et honorable. Merci « CHÈRE MADAME »

Il m'est évidemment très important de remercier tous les membres de mon jury pour avoir si gentiment accepté d'examiner ma thèse. Sachez que votre temps et dévouement sont sincèrement appréciés.

Mes plus sincères et chaleureux remerciements vont à **Mr SAAD EL Aoud, DR.Toumi**, et toute leur équipe, **SOUAD** en particulier, qui m'ont accepté au sein de leur laboratoire, et qui m'ont permis de réaliser ce projet dans les meilleurs conditions, ils ont mis tous leurs service, personnels, équipements et matériels très couteux à mon service, malgré leur temps chargé et précieux. Merci **Mr. SAAD EL AOUD**

Je tiens à remercier **Dr. BENBRAHIM** qui m'a ouvert son service d'oncologie ce qui m'a énormément facilité la collecte d'échantillons, le suivi des malades, et l'examinassions des dossiers médicaux. Ces remerciements, ne seraient pas tout à fait complets sans un mot pour toutes les femmes qui m'ont offert leur temps et leurs SANGS très précieux.

À Monsieur le directeur du service de traumatologie CHU de Batna, **DR. DERDOUS**, je n'oublierai jamais toute l'aide, l'encouragement et les innombrables services que vous m'avez rendus dans le long et douloureux trajet de la maladie de mon cher oncle. Toutes mes gratitudes et respect...

J'aimerais aussi souligner l'appui répété que j'ai reçu de la part de toute l'équipe du service de transfusion sanguine CTS et du service de pédiatrie du CHU de Batna.

D'un point de vue plus personnel, merci infiniment à **mon père** et **ma mère** d'avoir fait de moi la personne que je suis et comme j'ai beaucoup de mal à trouver les mots justes pour vous remercier comme vous le méritez, j'irai au plus simple : par conséquent, et tout simplement, merci beaucoup papa et maman pour l'irremplaçable et inconditionnel soutien moral et financier. Merci pour votre amour, pour tous vos sacrifices, pour tous les enseignements que vous m'avez transmis. Sans vous je n'en serai pas là. J'espère de tout cœur que cet accomplissement contribuera à vous rendre fiers.

Merci à mes sœurs **Soumia et Dhoha** pour leurs immense support et leurs belles attentions tout au long de ces années et qui ont apporté l'équilibre nécessaire au maintien de ma persévérance.

Je remercie aussi ma **belle-mère** pour son soutien, ses encouragements et surtout pour tous les bons repas qu'elle me préparée à chaque fois que je rentrais de loin.

Un dernier merci, et non pas des moindres à **Nacereddine** et **Firas**, mon mari et mon fils. **Braoui** tu as toujours été présent, notamment dans les moments difficiles. Merci d'avoir toujours été à mon écoute, de m'avoir continuellement encouragée et supportée, même lorsque mon travail affectait mon humeur, particulièrement ces derniers temps. Merci pour ta patience. Merci infiniment pour ta présence rassurante et surtout pour ton immense patience devant les heures, les jours, les semaines... passées collée à mon ordinateur. Et merci à **Firas**, qui est venue égayer cette dernière année de thèse.

TABLE DES MATIERES

Remerciements

Table des matières

Liste des figures

Liste des tables

INTRODUCTION GENERALE.....	1
<u>CHAPITRE 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	4
I. La glande mammaire et sa cancérisation	4
I.1. La glande mammaire	4
I.1.1. Anatomie et histologie.....	4
I.1.2. Développement et contrôle.....	5
I.2. Le cancer du sein.....	7
I.2.1. Généralité sur le cancer du sein.....	7
I.2.2. Epidémiologie	9
I.2.3. La tumorigenèse mammaire	11
I.3. Les facteurs génétiques dans le cancer du sein.....	12
I.3.1. Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs.....	13
I.3.2. Activation d'oncogènes.....	14
I.3.3. Gènes ou loci dont le mode de contribution au risque du cancer du sein est inconnu....	15
I.3.4. Phénomènes épigénétiques.....	15
I.4. Facteurs de risque.....	16
I.4.1. Facteurs endogènes.....	16
I.4.2. Facteurs exogènes	19
I.5. Facteurs pronostiques.....	20
I.5.1. Facteurs cliniques.....	20
I.5.2. Facteurs anatomopathologiques.....	24
I.5.3. Facteurs biologiques.....	25
I.6. Stratégies thérapeutiques	26
I.6.1. Chirurgie.....	26
I.6.2. Radiothérapie.....	26
I.6.3. Chimiothérapie.....	27
I.6.4. Hormonothérapie.....	28
II. Les récepteurs adrénergiques	30
II.1. Historique des récepteurs adrénergiques.....	30
II.2. Les récepteurs adrénergiques α_2	33
II.2.1. Transduction du message	34
II.2.2. Localisation des récepteurs α_2 adrénergiques.....	36
II.3. Les récepteurs α_{2A} (α_{2A} -ARs)	37
II.3.1. Structure, fonction et localisation des α_{2A} ARs.....	37
II.3.2. Polymorphisme du gène ADRA2A.....	42
II.3.3. Maladies liées aux récepteurs adrénergiques α_{2A}	46

III. Objectifs du travail de thèse	57
III.1. Contexte de la thèse.....	57
III.2. Objectifs de la thèse	59
CHAPITRE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE.....	60
I. SUJETS MATERIEL ET METHODES.....	61
1. Sujets et Matériel.....	61
1.1. Patientes et témoins.....	61
1.2. Critères d'inclusion.....	61
1.2.1. Les patientes (les cas).....	61
1.2.2. Les témoins.....	61
1.3. Critères d'exclusion.....	62
1.4. Le nombre de sujets nécessaire (NSN).....	62
1.5. Données anatomopathologiques et immuno-histochimiques	62
1.6. Collecte des échantillons.....	63
2. Méthodes.....	64
2.1. Extraction de l'ADN.....	64
2.1.1. Préparation du Buffy coat	64
2.1.2. Purification sur le QIAcube.....	64
2.2. Analyse de la quantité et de la qualité de l'ADN extrait.....	67
2.3. Analyse du polymorphisme du gène <i>ADRA2A</i> : Génotypage par PCR en temps réel.....	67
2.3.1. principe.....	67
2.3.2. Protocole	70
2.4. Analyse statistique	70
II. Résultats	73
1 Fréquences alléliques et génotypiques.....	74
2. Analyse des haplotypes	75
3. L'âge et le statut ménopausique au moment du diagnostic du cancer du sein.....	75
4. Les caractéristiques clinico-pathologique	78
III. Discussion.....	81
Conclusions et perspectives.....	85
Bibliographie	87
Annexes.....	118

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1. Anatomie et structure de la glande mammaire.....</i>	<i>04</i>
<i>Figure 2. Histologie de la glande mammaire normale.....</i>	<i>05</i>
<i>Figure 3. Développement de la glande mammaire.....</i>	<i>06</i>
<i>Figure 4. Classification histologique des carcinomes mammaires.....</i>	<i>08</i>
<i>Figure 5. Incidence du cancer du sein dans les pays Arabes.....</i>	<i>10</i>
<i>Figure 6. Les étapes de la cancérisation mammaire.....</i>	<i>12</i>
<i>Figure 7. Issues des différents sous types moléculaires de cancer du sein.....</i>	<i>23</i>
<i>Figure 8. la famille des récepteurs couplés à la protéine G.....</i>	<i>31</i>
<i>Figure 9. Structure et caractéristiques des trois sous-types $\alpha 2$ AR.....</i>	<i>33</i>
<i>Figure 10. Etapes de la transduction du message adrénérgique.....</i>	<i>34</i>
<i>Figure 11. Vue d'ensemble des divers fonctions spécifiques des sous-types $\alpha 2$-adrénérgiques dérivées de modèles de souris.....</i>	<i>35</i>
<i>Figure 12. Représentation schématique des fonctions des cellules à récepteurs $\alpha 2$-adrénérgiques et des cellules non adrénérgiques</i>	<i>36</i>
<i>Figure 13. Localisation du gène ADRA2A sur le chromosome 10.....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 14. Représentation schématique du récepteur adrénérgique alpha 2A humain.....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 15. Expression de ADRA2A dans les tissus humains (intensités normalisée).....</i>	<i>41</i>
<i>Figure 16. Organisation et la localisation des polymorphismes du gène ADRA2A humain.....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 17. Fréquences de spolymorphismes ADRA2A selon les variations ethniques.....</i>	<i>44</i>
<i>Figure 18. Contrôle de la lipolyse adipocytaire.....</i>	<i>51</i>
<i>Figure 19. Principaux facteurs humoraux et nerveux de contrôle de la sécrétion d'insuline...54</i>	
<i>Figure 20. La purification automatisée de l'ADN.....</i>	<i>65</i>
<i>Figure 21. Procédure de purification d'ADN utilisant les colonnes QIAamp.....</i>	<i>66</i>
<i>Figure 22. Principe de la PCR en temps réel utilisant les sondes Taqman.....</i>	<i>69</i>
<i>Figure 23. Répartition de l'âge de diagnostic du cancer du sein et le NPI par rapport au génotype. Répartition de l'âge d'apparition de la maladie (1a) et NPI (1b) par rapport aux polymorphismes ADRA2A (rs1800544 et rs553668).....</i>	<i>76</i>

LISTE DES TABLES

<i>Table 1. Classification histologique des carcinomes mammaires selon l’OMS.....</i>	<i>8</i>
<i>Table 2. Survie à 5 ans en fonction du T et du N.....</i>	<i>21</i>
<i>Table 3. Classification moléculaire des cancers du sein.....</i>	<i>22</i>
<i>Table 4. Principaux médicaments antimétaboliques utilisés dans les cancers du sein.....</i>	<i>27</i>
<i>Table 5 : Quelques antagonistes et agonistes des récepteurs alpha.....</i>	<i>32</i>
<i>Table 6. Polymorphisme du gène ADRA2A humain.....</i>	<i>45</i>
<i>Table 7. Haplotype du gène ADRA2A.....</i>	<i>46</i>
<i>Table 8. Caractéristiques clinico-anatomiques et moléculaire des patientes atteintes de cancer du sein.....</i>	<i>63</i>
<i>Table 9. SNP étudiés.....</i>	<i>70</i>
<i>Table 10. Amorces et sondes fluorescentes.....</i>	<i>70</i>
<i>Table 11. Distribution des effectifs des génotypes AA, AB et BB pour les patients et les témoins.....</i>	<i>72</i>
<i>Table 12. Fréquences alléliques des polymorphismes du gène ADRA2A chez les patientes et chez les contrôles ainsi que leur association avec le risque du cancer du sein.....</i>	<i>74</i>
<i>Table 13. Fréquences génotypiques des polymorphismes du gène ADRA2A chez les cas et les contrôles et leur association avec le risque du cancer du sein.....</i>	<i>74</i>
<i>Table 14. Fréquences des haplotypes des polymorphismes du gène ADRA2A chez les cas et chez les témoins et leur association avec le risque du cancer du sein</i>	<i>75</i>
<i>Table 15. Association des génotypes avec un âge précoce de survenu du cancer du sein.....</i>	<i>77</i>
<i>Table 16. Association du génotype avec le statut ménopausique.....</i>	<i>78</i>
<i>Table 17. Association du polymorphisme rs1800544 avec les paramètres clinico-pathologiques.....</i>	<i>79</i>
<i>Table 18. Association des haplotypes avec les paramètres clinico-pathologiques.....</i>	<i>80</i>

INTRODUCTION

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme, avec plus de 800 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année dans le monde. Il représente la première cause de mortalité féminine dans la tranche d'âge de 35 à 55 ans constituant ainsi un sérieux problème de santé publique. Il est responsable de 20% des décès dus aux cancers (1).

En Algérie, plus de 45.000 nouveaux cas de cancer sont enregistrés annuellement, indique les dernières statistiques de l'Organisation mondiale de la Santé (WHO). 20 types de cancer sont les plus répandus. Parmi les cinq cancers les plus fréquents chez la gent féminine, à savoir le cancer des ovaires, du col, de l'utérus et du côlon, le cancer du sein représente la première cause de mortalité. En l'absence de vraies statistiques, les spécialistes estiment que pas moins de 10.000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année en Algérie, et ce, généralement chez les femmes de 40 à 49 ans. Ce fait cause environ de 4500 décès! (2)

De nos jours, plusieurs facteurs de risque de développement du cancer du sein sont reconnus, tels que les antécédents familiaux de cancer du sein, l'âge avancé, la puberté précoce, la ménopause tardive, la nulliparité et l'obésité. Mais, aucun facteur n'a pu être impliqué directement dans l'étiopathogénie de ce cancer, à l'exception de la transmission héréditaire de certains gènes de prédisposition, en particulier les gènes BRCA1 et 2, impliqués dans 5-10% des cas de cancer du sein. Néanmoins, certains facteurs étiologiques sont de plus en plus soupçonnés de contribuer au développement du cancer du sein. (3)

En effet, au cours de cette dernière décennie, les études génétiques ont contribué à la compréhension des mécanismes biologiques de cette maladie chez l'Homme, depuis que l'estimation du pronostic est maintenant basée sur les critères clinico-anatomique, immunohistochimiques et sur l'expression génétique de la tumeur (3, 4).

Mais en plus des mutations somatiques acquises de la cellule tumorale, différents variants génétiques de la ligné germinale ont été associés au risque (5) et/ou au pronostic du cancer du sein (6, 7)

Cependant, on estime que ces variant génétiques expliquent seulement 28% des causes du cancer du sein. (5) et très peu est connu concernant le rôle que peut avoir le répertoire génétique germlinal sur le pronostic des patients (7)

Par conséquent, l'identification de mutations génétiques impliquées dans le risque et / ou la progression du cancer du sein est d'une importance cruciale.

Les récepteurs adrénérgiques sont des macromolécules se trouvant dans la membrane des cellules innervées par des neurones adrénérgiques. La fonction physiologique de base de ces récepteurs est de reconnaître les médiateurs adrénérgiques : adrénaline ou noradrénaline. Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés à la protéine G. Ces récepteurs adrénérgiques peuvent être subdivisés en 3 types et chaque type en 3 sous-types : $\alpha 1AR$ ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1D$); $\alpha 2AR$ ($\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$) ; et βAR ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$). Ils sont exprimés par presque tous les organes du corps et codés par différents gènes (8).

Le gène du récepteur adrénérgique $\alpha 2A$ (*ADRA2A*) est un gène dépourvu d'intron localisé sur le chromosome 10q25.2, codant pour une protéine réceptrice de 450 résidus d'acides aminés (9). Ce récepteur est impliqué dans plusieurs fonctions du système nerveux central, du système cardiovasculaire, dans la libération de neurotransmetteurs, l'agrégation plaquettaire, la pression artérielle, la sécrétion d'insuline et la lipolyse (10). Le gène *ADRA2A* comporte plusieurs SNPs. Le SNP C-1291G (rs1800544) est localisé sur le promoteur de ce gène, il serait donc fortement sujet à modifier l'expression de ce dernier. (11) Le rs1800544 a été associée à l'obésité et la distribution des graisses corporelle (12, 13) De même pour un autre SNP le rs553668 qui a également été associé à l'accumulation de graisse corporelle dans la région abdominale (14, 15) ce SNP est localisé dans la région 3'-UTR du gène *ADRA2A*. On l'associe également à la pression sanguine en réponse à des agonistes adrénérgiques (16) à l'obésité et au diabète de type 2 (DT2) (17, 18)

D'autre part, il est maintenant bien établi que l'obésité est un facteur de risque (19, 20) du cancer du sein. Ceci est également valable pour les patients atteints de DT2 qui sont plus susceptibles de développer cette maladie, et ceux d'entre eux qui ont déjà développé ce cancer présentent un mauvais pronostic (21)

Cette double association entre d'une part, l'obésité et le diabète de type 2 avec les polymorphismes du gène *ADRA2A*, et d'un autre côté entre obésité, diabète de type 2 et risque

et / ou pronostic du cancer du sein, nous a incité à mener cette étude visant à enquêter sur la possible association des polymorphismes *ADRA2A* avec le risque de cancer du sein ou ces indicateurs pronostiques. Notre approche a été renforcée par le fait que ces récepteurs adrénergiques $\alpha 2A$ soient exprimés sur des lignées cellulaires de cancer du sein (22, 23). La stimulation de ces récepteurs par des agonistes $\alpha 2$ adrénergiques (23, 24) ou par des catécholœstrogènes (métabolites d'œstrogènes) (25) conduit à une prolifération cellulaire pouvant être inversée par des antagonistes $\alpha 2$ -adrénergiques. (22)

En outre, les mêmes effets d'agonistes / antagonistes $\alpha 2$ adrénergiques ont été reproduit sur des tumeurs mammaires chez des modèles murins de cancer du sein. (26) À notre connaissance, cette étude est la première enquête investiguant l'association des polymorphismes du gène *ADRA2A* de la lignée germinale avec le risque du cancer du sein et/ ces indicateurs pronostiques.

I. La glande mammaire et sa cancérisation

I.1. La glande mammaire

Le sein est une glande exocrine qui se développe au cours de la vie de la femme dont la fonction est la sécrétion lactée suite à la parturition.

I.1.1. Anatomie et histologie

Le sein est une glande exocrine située sur la paroi antérieure du thorax entourée d'un revêtement cutané. (27)

La glande mammaire est structurée par 2 tissus : les canaux excréteurs et le tissu conjonctif qui sont organisés en lobes glandulaires. **(Figure 1)**. (28)

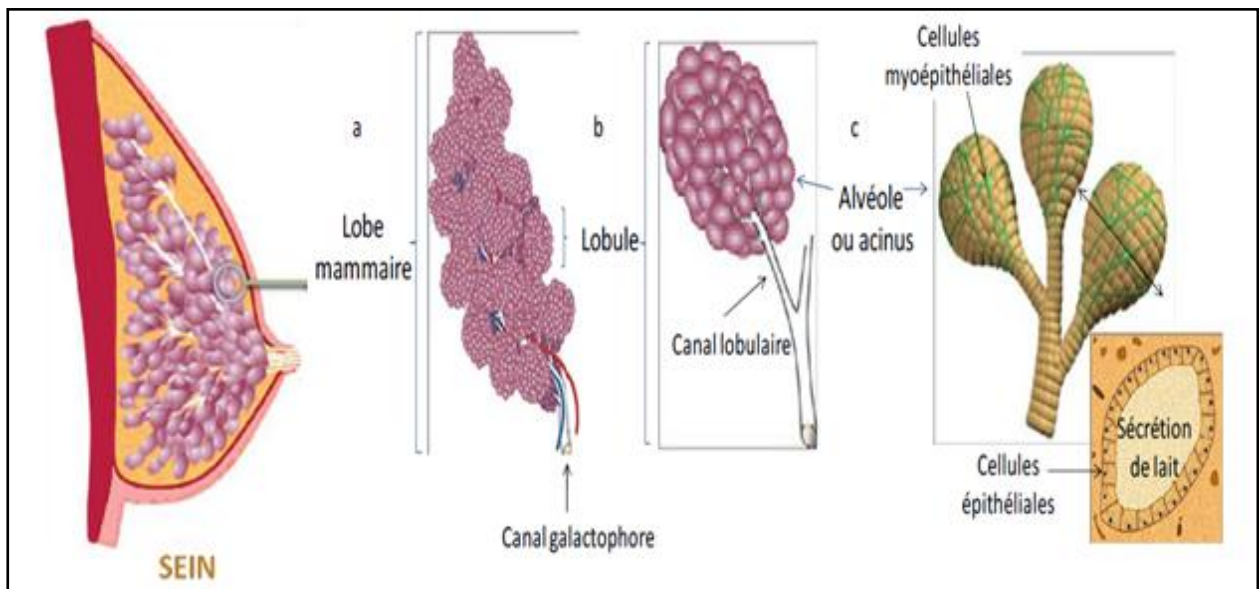


Figure 1. Anatomie et structure de la glande mammaire. (29).

Histologiquement, le système alvéolo-lobulo-canaire est formé d'une assise continue de cellules épithéliales cubiques sécrétrices de lait, doublée d'une couche externe discontinue de cellules myoépithéliales fusiformes contractiles. Ces deux couches cellulaires reposent sur une lame basale. Le tissu conjonctif, appelé tissu palléal, est composé de fibroblastes, d'adipocytes et de matrice (principalement des fibres collagènes) et renferme les nerfs et les vaisseaux sanguins et lymphatiques de la glande **(Figure 2)**.

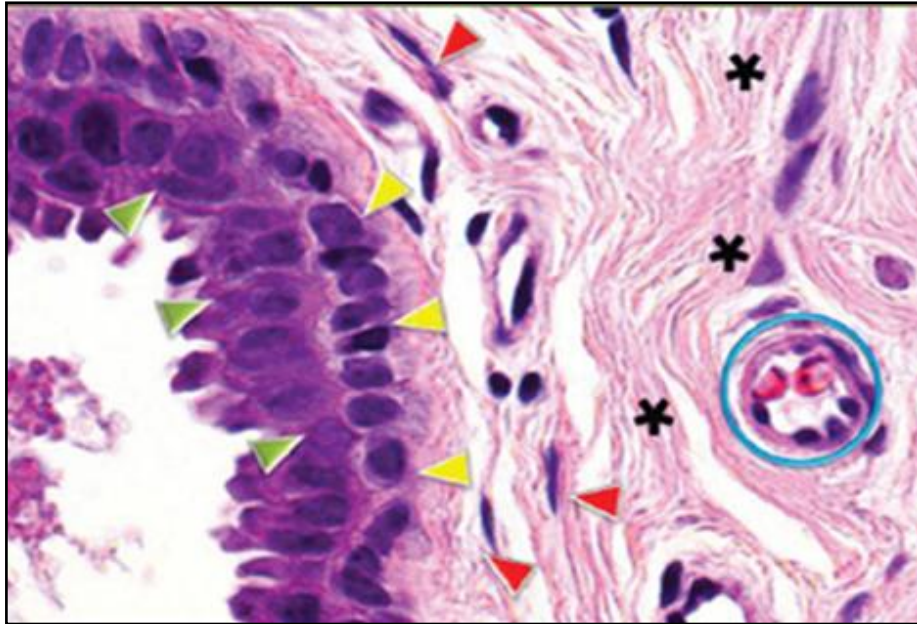


Figure 2. Histologie de la glande mammaire normale.

*Les flèches jaunes indiquent les cellules myoépithéliales du canal, les flèches vertes montrent l'assise de cellules épithéliales du canal, les flèches rouges indiquent les fibroblastes péricanalaux parallèles à la lame basale, les astérisques représentent les fibres de collagène et le cercle bleu une artéριοle. Adapté de *Biology of the mammary gland*: (30)*

I.1.2. Développement et contrôle

Le sein se développe tout au long de la vie de la femme, du stade foetal à la ménopause, sous l'influence des hormones sexuelles (oestrogènes et progestérone) et d'un certain nombre de facteurs de croissance. Après la naissance et jusqu'à la puberté, les modifications morphologiques et histologiques sont modestes.

Durant l'étape pubertaire, les modifications sont importantes mais essentiellement dues à une augmentation du tissu graisseux. Avec la mise en place des cycles menstruels, la glande mammaire est soumise à une alternance d'exposition aux oestrogènes (1ère moitié du cycle) et à la progestérone (2ème moitié du cycle). Ces changements d'équilibres hormonaux sont incapables d'induire le véritable développement de la glande mammaire. Ce sont essentiellement les canaux qui vont se développer et se diviser pour former des bourgeons terminaux. Ces bourgeons terminaux sont à l'origine de nouvelles ramifications qui vont former des bourgeons alvéolaires, on parle alors de lobules de type 1 (**Figure 3**). Au cours de la maturation sexuelle, ces lobules évolueront en lobules de type 2 puis de type 3, et ce

CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

lentement jusqu'à l'âge de 35 ans. La différenciation totale de ces lobules ne pourra être atteinte si aucune gestation ne survient. (27)

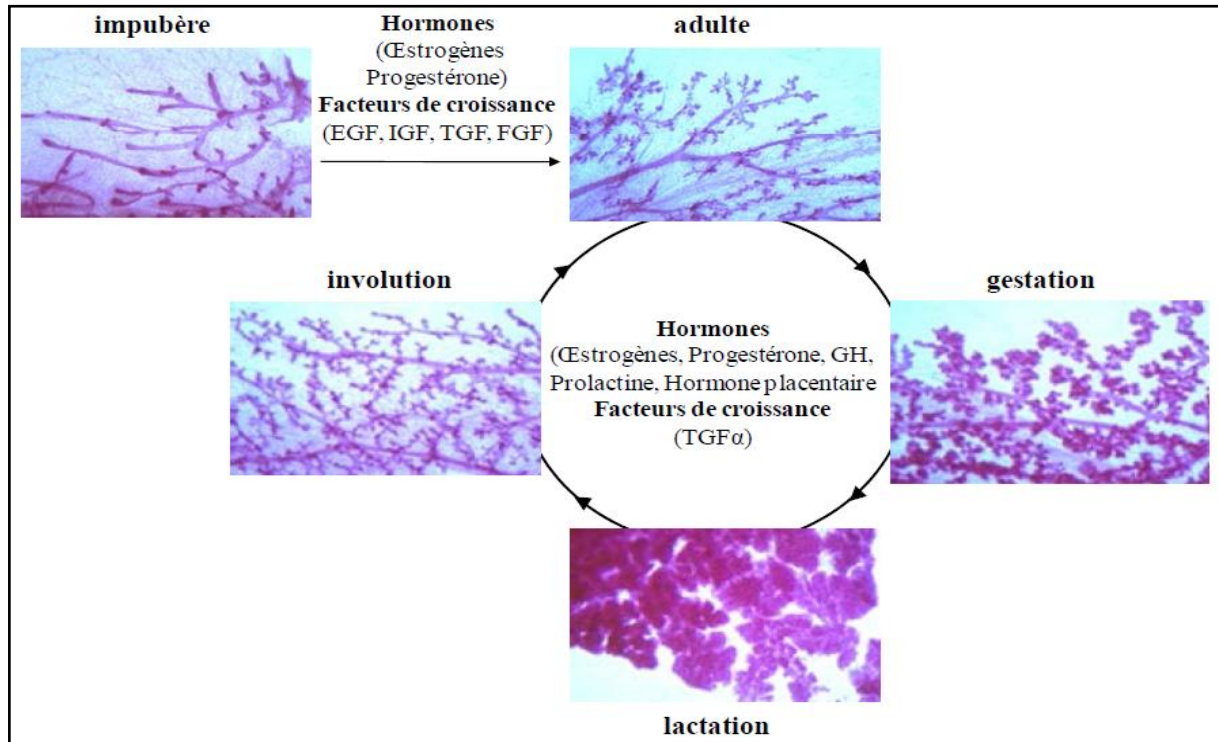


Figure 3. Développement de la glande mammaire.

Sous l'effet des hormones ovariennes et de facteurs de croissance, la glande mammaire développe son arborescence à la puberté. Les photos sont issues de Biology of the mammary gland (glande mammaire murine).(30)

La gestation et la lactation entraînent des modifications importantes du sein. Il augmente de volume, le mamelon devient saillant, l'aréole se pigmente comme le mamelon et prend un aspect grenu. Durant la grossesse, les ramifications terminales des canaux se multiplient et de nombreuses alvéoles se développent (jusqu'à 80 alvéoles par lobule) sous l'influence notamment des hormones œstrogènes/progestérone et de facteurs de croissance tels que le TGF- α (TumorGrowth Factor- α). Les cellules sécrétrices sont totalement différenciées et on parle alors de lobules de type 4. Après l'accouchement, durant 2 à 3 jours, la sécrétion mammaire est fluide et jaunâtre, c'est le colostrum. Au 3^{ème} jour, la sécrétion grasseuse augmente et le colostrum se transforme en lait. Ainsi la glande mammaire n'achève son développement qu'avec la première lactation.

A la ménopause, le déclin des fonctions ovariennes provoque une régression des structures de la glande mammaire : les canaux galactophores sont maintenus, mais les alvéoles restantes ainsi que les lobules continuent de régresser avec l'âge (**Figure 3**). (31)

I.2. Le cancer du sein

I.2.1. Généralité sur le cancer du sein

Le cancer du sein est une pathologie à évolution lente. Le terme de « cancer du sein » ne désigne que les tumeurs malignes, potentiellement agressives, du sein tandis que le terme de « tumeur du sein » désigne à la fois les tumeurs malignes et bénignes. Le terme « carcinome » ou « épithélioma » est parfois utilisé, comme synonyme de « cancer ». En réalité le carcinome est un terme spécifique de morphologie microscopique (histologique) qui désigne les types les plus fréquents du cancer du sein d'origine épithéliale. La plupart des tumeurs malignes du sein sont des adénocarcinomes développés soit à partir des cellules épithéliales des lobules glandulaires (carcinomes lobulaires) soit à partir des cellules épithéliales des canaux galactophores (carcinomes canaux) et représentent environ 98% des carcinomes mammaires. Dans de rares cas, les cellules cancéreuses mammaires prolifèrent en carcinome *in situ* sans rupture de la lame basale, par opposition au carcinome infiltrant (32). Il existe 4 types architecturaux de carcinomes canaux *in situ* (massif, cribriforme, papillaire et comédo) dont le pronostic est favorable. Malheureusement, le carcinome est souvent infiltrant, ses formes les plus fréquentes sont le carcinome canalaire infiltrant (85%) et le carcinome lobulaire infiltrant (5%). Mais il existe d'autres formes rares de carcinomes infiltrants, tels que les carcinomes médullaires, les carcinomes mucineux (ou colloïdes), les carcinomes tubuleux, les carcinomes apocrines et la maladie de Paget (tumeur du mamelon). Les tumeurs malignes en dehors des carcinomes primitifs du sein sont rares, elles représentent moins de 1% de toutes les tumeurs malignes du sein et constituent un groupe de lésions disparates comportant les sarcomes phyllodes, les sarcomes mésoenchymateux, les angiosarcomes et les lymphomes non hodgkiniens primitifs du sein. (33, 34) (**Table1**) et la (**Figure 4**) montre la classification histologique des cancers mammaires préconisée par l'Organisation Mondiale de la Santé (35).

Table1: Classification histologique des carcinomes mammaires selon l'OMS (35).

Tumeurs épithéliales non infiltrantes
Carcinome canalaire in situ (intra-canalaire) (CCIS)
Carcinome lobulaire in situ (CLIS)
Tumeurs épithéliales infiltrantes
Carcinome canalaire infiltrant de forme commune
Carcinome canalaire infiltrant avec composante intra-canalaire prédominante
Carcinome lobulaire infiltrant
Carcinome mucineux
Carcinome médullaire
Carcinome papillaire
Carcinome tubuleux
Carcinome adénoïde kystique
Carcinome sécrétant juvénile
Carcinome apocrine
Carcinome métaplasique de type épidermoïde
Carcinome métaplasique de type à cellules fusiformes
Carcinome métaplasique de type chondroïde et osseux
Carcinome métaplasique de type mixte
Maladie de Paget du mamelon

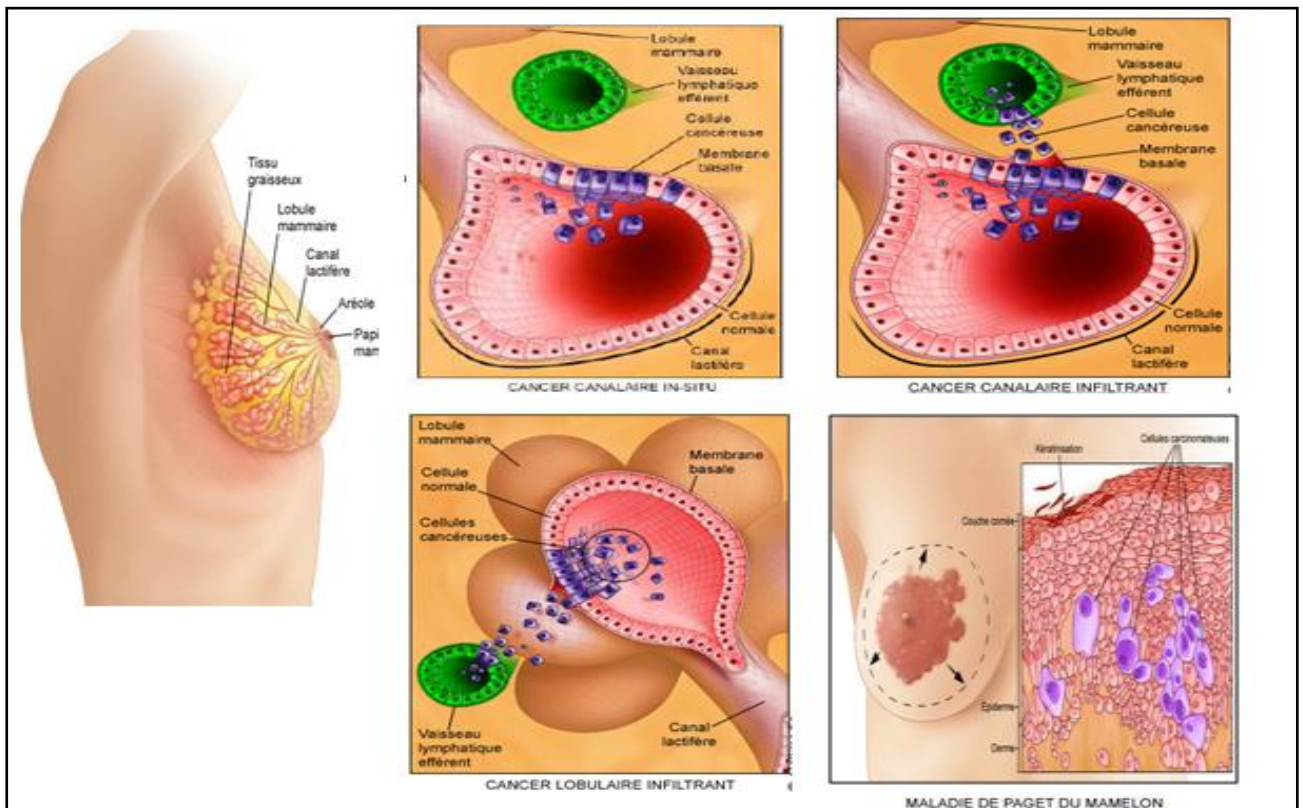


Figure 4. Classification histologique des carcinomes mammaires. (36)

I.2.2. Épidémiologie

Avec ses 1 384 155 nouveaux cas au monde (10,9 % de l'ensemble des cancers) en 2008 et 458 503 décès (6,1% de mortalité par cancer), le cancer du sein est un véritable problème de santé publique à l'échelle mondiale (37, 38). Le cancer du sein représente 22,9 % de l'ensemble des nouveaux cancers féminins et l'on estime qu'une femme a 10 % de probabilité d'être atteinte jusqu'à l'âge de 74 ans.

Entre 1975 et 1995, on a noté un taux d'augmentation de 60 % (25 000 nouveaux cas en 1985) qui peut être liée à un meilleur dépistage (38, 39, 40). Toutefois, Cette incidence n'est pas répartie uniformément, et selon les meilleures données disponibles, il ya de grandes variations de l'incidence, de la mortalité et de la survie entre les différents pays et régions et au sein des régions spécifiques. Car, Bien que plus de la moitié de tous les nouveaux cas de cancer du sein soient diagnostiqués dans le monde industrialisé (Amérique du Nord [excluant le Mexique] et en Europe occidentale), plus des trois quarts des décès liés au cancer se produisent dans les pays en voie de développement. Beaucoup de facteurs complexes sous-tendent ces variations, y compris la structure des populations (par exemple, âge, race et origine ethnique), le style de vie, l'environnement, le statut socioéconomique, la prévalence des facteurs de risque, l'utilisation de la mammographie, le stade de la maladie au moment du diagnostic (plus de 60% des patients sont diagnostiqués au stade III / IV dans les pays en développement), et l'accès aux soins de haute qualité (38, 39, 40,41)

En termes de mortalité, le cancer du sein est responsable de 10000 à 11000 décès par an (35 pour 100 000 femmes). Ces chiffres font du cancer du sein la première cause de mortalité par cancer chez la femme dans le monde (42,43).

En Afrique du Nord et au Moyen-Orient, le cancer du sein est également le premier cancer de la femme. Il représente 14 à 42 % de tous les cancers féminins avec une augmentation exponentielle (44) Son incidence standardisée selon l'âge (ISA) varie entre 9,5 et 54 pour 10⁵ femmes. Ces éléments font que l'Organisation mondiale de la santé (OMS) considère le cancer du sein comme une priorité de santé publique et un problème majeur chez la femme dans cette région du monde (45). En Afrique du Nord, l'incidence élevée des cancers du sein chez la femme jeune représente une réalité épidémiologique où en comparaison avec d'autres registres le cancer du sein est le premier cancer de la femme (**Figure 5**).

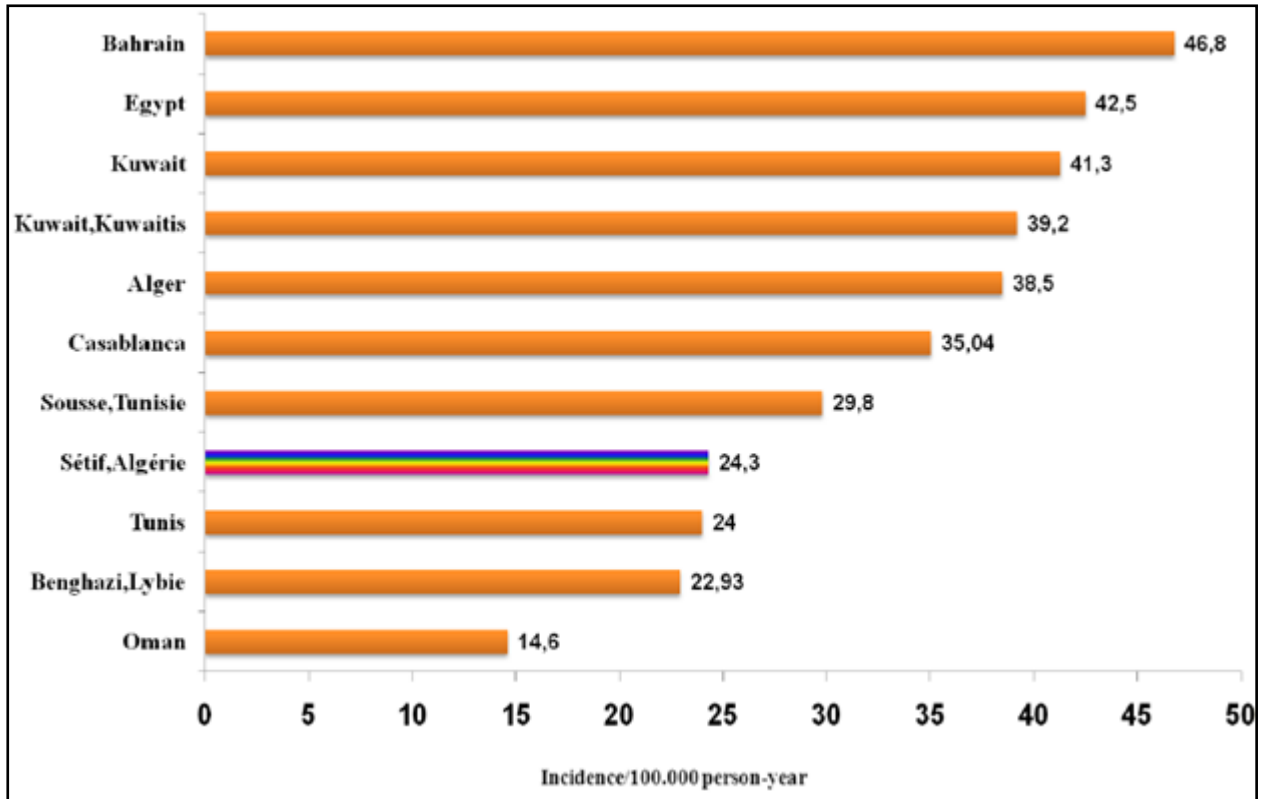


Figure 5. Incidence du cancer du sein dans les pays Arabes. (46)

En Algérie, au moment où l'on commence à enregistrer une diminution notable des maladies infectieuses de nouvelles pathologies sont apparus dont le cancer et les autres maladies chroniques non transmissibles qui s'inscrivent aujourd'hui parmi les nouveaux besoins prioritaires en santé publique 40 000 nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués chaque année avec plus de 25 000 décès. (47)

Parmi ces cancers, le cancer du sein est devenu un problème de santé publique majeur avec une réelle urgence d'intervention et de prise en charge. Le cancer du sein touche les deux sexes avec une nette prédominance féminine. Chaque année, 7500 cas de cancer du sein sont enregistrés avec environ 3500 décès enregistrés chaque année. Le cancer du sein est diagnostiqué à un stade tardif avec un taux de survie bas. Selon le professeur Bendib, sur une série de 683 cas, traités en 2003 au Centre Pierre et Marie Curie on a :

- 40,4% ont moins de 50 ans.
- 02% de femmes présentant un cancer du sein n'ont jamais eu d'enfant.
- 10% de l'ensemble des cancers sont familiaux.
- 70% ont subi l'amputation
- 30% ont bénéficié de traitements conservateurs.

Selon le professeur Bouzid, l'Algérie a enregistré, en 2004, 30 000 nouveaux cas (sein féminin : 4 000 à 7 000 cas)(46)

D'autres études montrent aussi qu'en Algérie, le cancer du sein survient chez les femmes jeunes et en âge de procréer, contrairement aux pays occidentaux. Il est, donc, plus agressif et plus difficile à détecter (48)

À Sétif - Algérie le cancer du sein représente 13,5% de l'ensemble des cancers, où il se place derrière les cancers du col utérin et de la vésicule biliaire (49). A Oran, il représente 30% de l'ensemble des cancers féminin (50). A Batna le registre des cancers de la wilaya (de 2000 à 2006), montre une nette progression des cas de cancer du sein au fil de ces années. (51)

I.2.3. La tumorigenèse mammaire

La tumorigenèse mammaire est un processus évolutif au cours duquel des cellules normales acquièrent des altérations géniques qui les singularisent du tissu environnant, leur conférant un avantage prolifératif et les rendant indépendantes des signaux extérieurs de régulation de l'homéostasie tissulaire. Ce phénomène se fait en 4 étapes (**Figure 6**) :

➤ **L'initiation :**

Évènement initial, souvent antérieur de plusieurs années au diagnostic du cancer. Suite à une altération génique, les cellules vont proliférer de façon anarchique pour former une excroissance tissulaire appelée hyperplasie.

➤ **La promotion :**

Étape au cours de laquelle les cellules initiées continuent de proliférer de façon anarchique menant à la formation du carcinome *in situ*. Durant cette période, les cellules vont accumuler des altérations de leur génome et acquérir alors de nouvelles propriétés biologiques rendant la tumeur de plus en plus agressive.

➤ **La dissémination :**

Les cellules vont dépasser le niveau local, rompre la membrane basale et envahir le tissu péri-adjacent selon un processus actif lié à l'acquisition de nouvelles propriétés biologiques. Les cellules ont perdu leur connexion intercellulaire, ont acquis des capacités migratoires, sont capables de restructurer leur microenvironnement et de développer une angiogenèse tumorale.

➤ La métastase :

Les cellules quittent le sein pour gagner des organes comme le poumon, la plèvre, le foie, les os et le cerveau (52).

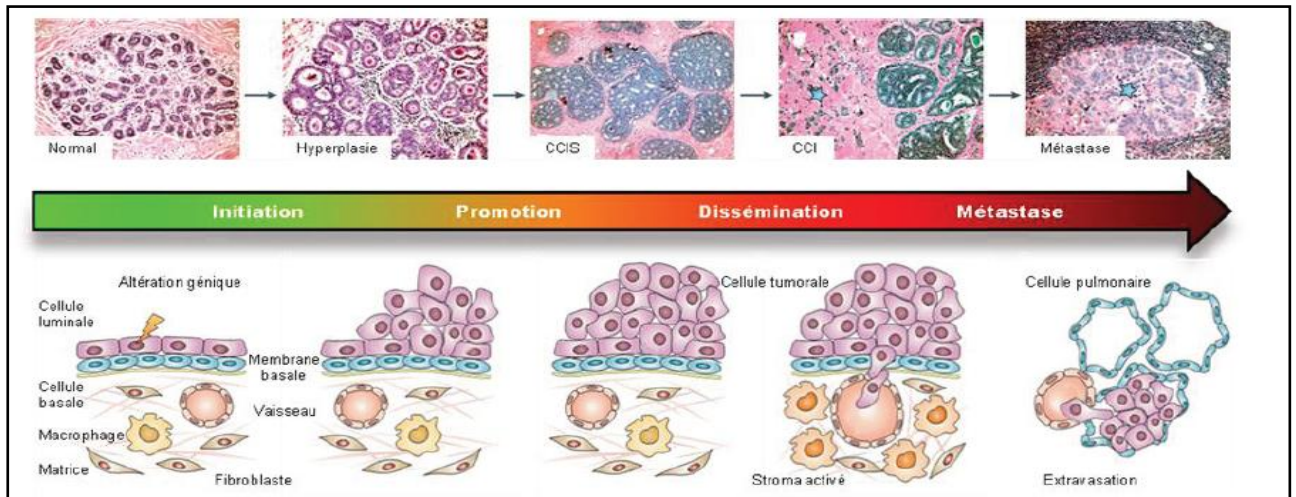


Figure 6. Les étapes de la cancérisation mammaire.

Suite à une altération de leur génome, les cellules de l'épithélium mammaire normal vont être initiées, conduisant à leur prolifération anarchique hyperplasique. Les altérations géniques des cellules initiées vont promouvoir l'apparition d'un carcinome in situ bien circonscrit par la lame basale. Les cellules cancéreuses vont alors commencer à rompre cette membrane basale pour se disséminer dans le tissu conjonctif adjacent formant une tumeur maligne. La tumeur devenue invasive continue de se développer et colonise différents organes pour former des métastases distantes. Les différentes étapes sont illustrées par des coupes histologiques d'un tissu mammaire normal, d'une hyperplasie de la glande, d'un carcinome canalaire in situ, d'un carcinome canalaire invasif et d'une métastase dans un nœud lymphatique. (53).

I.3. Les facteurs génétiques dans le cancer du sein

La cancérogenèse mammaire est un phénomène multifactoriel où la succession d'altérations géniques confèrent aux cellules des avantages sélectifs menant à la progressive transformation des cellules normales en cellules tumorales. Six altérations essentielles dans la physiologie de la cellule citées par *Hanahan et Weinberg* permettent aux cellules transformées de prendre l'ascendant sur les autres cellules : **indépendance vis-à-vis des signaux de croissance cellulaire ou du cycle cellulaire, perte de la sensibilité vis-à-vis des signaux anti-prolifératifs, échappement à l'apoptose, potentiel répliatif illimité, conversion angiogénique, invasion et métastase** (54, 55).

Plusieurs variants génétiques ont été associés au risque de cancer du sein, certains sont à haute pénétrance comme pour les gènes (*BRCA1, BRCA2, TP53, and PTEN*), d'autres sont à pénétrance moyenne comme pour (*CHEK2, ATM, BRIP1, et PALB2*), et environ une vingtaine de variants à pénétrance faible situés dans 19 gènes ou *loci* (56) Dans le développement du cancer

du sein, les altérations génétiques initiatrices provoquent une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs par mutation et une activation d'oncogènes notamment par amplification génique (57).

I.3.1. Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs agissent à différents niveaux de la vie de la cellule. Communément, on les subdivise en 3 groupes, les garants de la stabilité du génome (care takers), les inhibiteurs de la croissance cellulaire au sens large (gate-keepers) et les modulateurs du microenvironnement cellulaire (landscapers). Selon le modèle de Knudson, il est nécessaire que les deux allèles d'un gène suppresseur de tumeur soient altérés pour que la fonction de régulation négative de la prolifération cellulaire soit perdue (58).

Dans la plupart des cas, ce modèle est confirmé par les observations expérimentales. Les tumeurs ne contiennent plus qu'un seul allèle muté, le second allèle ayant été perdu lors d'un remaniement génétique qui a conduit à la délétion d'une partie plus ou moins importante du chromosome (perte d'hétérozygotie).

Voici les exemples de quelques gènes mutés dans le cancer du sein :

- **le gène p53**, considérée comme la gardienne du génome est mutée dans 25% des cancers du sein (*IARC TP53 database, Octobre 2007*) et ses mutations sont associées à un mauvais pronostic (59). P53 est responsable de l'arrêt temporaire du cycle cellulaire permettant la réparation des lésions moléculaires ou l'induction de la mort cellulaire programmée des cellules endommagées. L'inhibition de p53 augmente le pool de cellules en prolifération et la probabilité de leur transformation maligne par déficience de l'induction de l'apoptose.

- **le gène Rb**, premier gène suppresseur de tumeur à avoir été étudié, son expression est aberrante dans pratiquement la moitié des cancers du sein à cause d'une perte d'hétérozygotie ou une perte totale de son expression (60). La protéine Rb intervient dans le contrôle du cycle cellulaire via des mécanismes de phosphorylations et déphosphorylations par les complexes cycline-cdk permettant la libération du facteur de transcription E2F. En conséquence, la perte de fonction de Rb compromet les points clés (check points) du cycle cellulaire, contribue à la prolifération anarchique et donc à l'agressivité des tumeurs mammaires (60, 61).

- **les gènes *BRCA1* et *BRCA2*** (Breast Cancer susceptibility 1 et 2), ce sont des gènes suppresseurs de tumeur dont la mutation prédispose aux cancers du sein (mais aussi celui de l'ovaire, du pancréas et de la prostate), ils sont associés aux formes familiales et par conséquent utilisés dans la prévention du cancer du sein héréditaire (62, 63, 64). Les protéines BRCA sont impliquées dans la réparation de l'ADN, l'activation transcriptionnelle d'autres suppresseurs et le contrôle du cycle cellulaire grâce à leur interaction avec rad51 (enzyme de réparation de l'ADN), p53 et l'ARN polymérase II (65, 66, 67).

I.3.2. Activation d'oncogènes

Dans le cancer du sein, des oncogènes sont majoritairement activés par amplification génique alors que les mutations ponctuelles, les insertions ou les réarrangements géniques sont moins observés (68). Les oncogènes stimulent la prolifération, la survie, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. Ils sont des facteurs de croissance (PDGF), des récepteurs aux facteurs de croissance (EGFR, Met), des adaptateurs de voies de signalisation (Ras, Src), des acteurs de la survie cellulaire (Akt, bcl2), des régulateurs du cycle cellulaire (cyclines) ou des facteurs de transcription (c-myc). Dans le cancer du sein, les proto-oncogènes *c-erbB2*, *c-myc* et *ccnd1* sont les plus fréquemment mutés.

- **le gène *c-erbB2* (*HER2*)**, localisé en 17q21-22 est l'homologue humain du gène *neu* isolé de cellules de neuroblastomes de rat et est le 3^{ème} gène le plus fréquemment amplifié dans les tumeurs mammaires (69). Il fait partie de la famille des récepteurs tyrosine kinase de type I à laquelle appartient l'EGFR (récepteur de l'épithelial growth factor ou ErbB1). HER2 est surexprimé dans 25 à 30 % des cancers du sein, induit la tumorigenèse, est associé à des phénotypes invasifs, à un mauvais pronostic, à une résistance à l'hormonothérapie et à une diminution de l'efficacité des chimiothérapies (70). De plus, l'excellente corrélation entre l'amplification génique de ErbB2 et la surexpression de sa protéine a permis de mettre en place un traitement ciblé basé sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti Her2, le trastuzumab (ou herceptine) (71).

Le locus 17q12-q21, dont fait partie *c-erbB2*, contient aussi le gène de la topoisomérase II alpha, et il s'avère qu'il est amplifié dans une grande majorité des tumeurs mammaires primaires HER2+. Ainsi, la topoisomérase 2 pourrait servir de marqueur du cancer du sein et de

nouvelles approches thérapeutiques plus efficaces pourraient naître grâce à la combinaison d'inhibiteurs de HER2 et de la TOPA2 (72, 73).

- **Le gène *c-myc***, il est localisé en 8q24 et code un facteur de transcription impliqué dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Sa fréquence d'amplification est plus importante dans les tumeurs envahissant les ganglions axillaires et les tumeurs de grade histopronostique élevé (74).

- **Le gène *ccdn1*** (11q13), il code la cycline D1 qui régule le passage G1/S et G2/M et son amplification est retrouvée dans 15 % des carcinomes mammaires (75). Cependant, la cycline D1 est surexprimée au niveau transcriptionnel et protéique dans 50 % des cancers du sein en présence ou en absence d'amplification génique (76). Comme *c-myc*, la surexpression de la cycline D1 seule n'a pas de pouvoir oncogénique suffisant et nécessite des événements additionnels.

1.3.3. Gènes ou *loci* dont le mode de contribution au risque du cancer du sein est inconnu

Ce sont, pour la plupart, des gènes dont les variants sont faiblement associés au risque du cancer du sein. Ils ont été identifiés lors des études d'association à large échelle (genome-wide association studies (GWAS)) ou lors des études de gène candidat (56). C'est ainsi beaucoup de SNP (single nucleotide polymorphisme) ont été associés au risque de CS.

1.3.4. Phénomènes épigénétiques

La cancérisation d'un épithélium normal est causée en premier lieu par une série de sélections clonale de changements génétiques de gènes suppresseurs de tumeur et d'oncogènes. Cependant, il est maintenant établi que des modifications épigénétiques sont importantes et caractérisées dans la carcinogenèse. Ces altérations incluent des modifications globales telles que l'hypométhylation de l'ADN et l'hypoacétylation de la chromatine, des hypométhylations et hyperméthylations spécifiques de gènes et la perte de l'empreinte (77) Ces modifications épigénétiques conduisent à une instabilité chromosomique, c'est-à-dire à une perte chromosomique et des réarrangements responsables de la progression tumorale notamment du cancer du sein (78, 79). Elles touchent des gènes comme *p16*, la cycline D2, *BRCA1*. De plus, les modifications épigénétiques semblent importantes dans la régulation de petits ARN non codants, les miRNA (microRNA) pouvant eux-mêmes contribuer au développement cancéreux

(80, 81). Enfin, ces études sur la contribution des altérations épigénétiques dans la progression tumorale conduisent à l'idée selon laquelle elles pourraient servir de marqueur moléculaire diagnostique, être intégrées dans la classification des tumeurs pour une meilleure réponse aux traitements et servir de nouvelles cibles thérapeutiques (82). Dans le cancer du sein, la corrélation entre quatre altérations épigénétiques trouvées dans les tumeurs primaires et dans le plasma suggère que celles-ci pourraient être utilisées comme marqueur tumoral (83).

I.4. Facteurs de risque

L'étiologie de la majorité des cancers du sein demeure inconnue. Il est possible que de nombreux facteurs, non encore identifiés, soient impliqués lors de l'initiation de cette pathologie. Ces facteurs peuvent être classés en deux catégories : les facteurs endogènes (facteurs propres à l'individu) et les facteurs exogènes.

I.4.1. Facteurs endogènes

Tout d'abord, cette maladie peut être considérée comme étant spécifiquement féminine. Dans 99 % des cas, ce cancer se développe chez la femme. Les autres facteurs sont l'âge, les facteurs génétiques et les facteurs hormonaux.

a. Age

La probabilité de développer un cancer du sein augmente avec l'âge. Environ deux tiers sont diagnostiqués chez des femmes âgées de plus de 55 ans et 10% chez les femmes de moins de 40 ans.

L'âge jeune (< à 35 ou 40 ans selon les séries) est considéré comme un facteur de mauvais pronostic indépendant dans de nombreuses séries : il favorise le risque de rechute à distance mais aussi le risque de rechute loco-régionale (84, 85, 86). Une étude de Canello et son équipe effectuée sur 2970 patientes montre que chez les patientes jeunes (<35ans), il y a moins de tumeurs de type luminal A et plus de triples négatives. L'étude Carolina sur le cancer du sein effectuée sur des Afro-américaines, montre également que les lumorales A et B sont plus fréquentes chez les patientes ménopausées que chez celles qui ne le sont pas (87). À l'inverse, les tumeurs triples négatives sont plus fréquentes chez les femmes de moins de 40 ans (88).

b. Hérité et facteurs génétiques

Seuls 5 à 10% des cas de cancer du sein sont liés à des anomalies génétiques héréditaires. La probabilité qu'une femme de 30 ans, ayant une mère ou une sœur atteinte d'un cancer du sein, développe cette pathologie avant l'âge de 70 ans est comprise entre 7% et 18% (89). Plusieurs gènes impliqués dans la carcinogenèse mammaire héréditaire ont été identifiés. Les principaux sont *BRCA1*, *BRCA2*, *p53*, *PTEN* et ataxia telangiectasia (*AT*). La grande majorité des cancers du sein héréditaires peuvent être attribués aux gènes *BRCA1* et *BRCA2* (90). *BRCA1* est localisé sur le chromosome 17 et code une protéine nucléaire impliquée notamment dans le contrôle de la recombinaison mitotique, dans la ségrégation des chromosomes, la régulation transcriptionnelle ainsi que dans la réparation de l'ADN. Cette protéine agit comme une ubiquitine ligase de type E3 dont les substrats sont certaines histones, la tubuline γ , ER α , NPM1, la sous unité d'ARN polymérase II, l'isoforme A du PR et le facteur TFIIIE (91). *BRCA2* est localisé sur le chromosome 13 et code une histone acétyl transférase impliquée dans la régulation de la transcription avec une fonction suppresseur de tumeur. Elle est impliquée dans la réparation de l'ADN et interagit avec *BRCA1* dans les voies d'activation de la protéine p53. Les femmes portant des mutations de type délétion au niveau de *BRCA1* ou *BRCA2*, présentent un risque considérable de développer un cancer du sein (80%). Ce risque est environ dix fois supérieur à celui de la population générale (92). Le gène *p53* localisé sur le chromosome 17 est un des gènes les plus communément mutés dans les cancers humains (environ 50% des cancers). Les femmes affectées par une mutation de *p53* présentent un risque plus élevé de développer un cancer du sein avant l'âge de 45 ans.

Enfin, les mutations des gènes *PTEN* et *AT*, observées chez des patientes atteintes respectivement du syndrome de Cowden et de l'ataxie télangiectasie, augmentent de 25 à 50% le risque de cancérogenèse mammaire (93).

c. Facteurs hormonaux

Le risque semble dépendre essentiellement du temps d'exposition de l'épithélium mammaire à ces hormones. De nombreuses variables, incluant l'âge des premières règles, celui de la première grossesse et de la ménopause ainsi que le nombre de grossesses, sont à prendre en compte (94). Chez les femmes pré-ménopausées, les œstrogènes sous forme d'œstradiol sont

CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

majoritairement produits par les ovaires. Après la ménopause, les œstrogènes continuent à être produits au niveau du tissu adipeux notamment dans la glande mammaire.

Une ménarche précoce (avant 12 ans) augmente de 10 à 30 % le risque de cancer mammaire. De même, une ménopause tardive élève le risque de 3% pour chaque année dépassant l'âge moyen de la ménopause. Ces résultats s'expliquent par l'augmentation, chez ces femmes, du nombre de cycles ovulatoires. A l'inverse, des grossesses précoces ou nombreuses et des lactations prolongées, diminuent le risque de cancer du sein (89, 93). D'une manière générale, la concentration et le type d'hormones présentes dans le sérum influencent le risque de carcinogénèse mammaire. Ainsi, une augmentation du taux d'oestrone, d'œstradiol et/ou de testostérone est corrélée à une augmentation du risque de cancer du sein (95,96). La progestérone agit par l'intermédiaire de son récepteur (PR), dont il existe deux isoformes (PR A et PR B), transcrites à partir de deux promoteurs différents d'un même gène.

Le rôle des isoformes est mal connu dans la tumeur mammaire mais il apparaît que l'augmentation du rapport A/B induit l'activation des gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire aboutissant à la migration des cellules cancéreuses vers la moelle osseuse ce qui correspond à un phénotype plus agressif (97). Chez les femmes post ménopausées, l'utilisation d'œstrogènes combinés à la progestérone augmente le risque de cancer du sein par rapport aux femmes qui utilisent uniquement des œstrogènes (98,99,100,101)

Les tumeurs du sein peuvent se différencier par la présence ou l'absence de récepteurs des œstrogènes (ER+/-) et de la progestérone (PR+/-). Les tumeurs ER+ / PR+ représentent les tumeurs les plus communes. La présence de ces récepteurs est dépendante de nombreux facteurs, ainsi le nombre de tumeurs contenant les récepteurs aux œstrogènes varie avec l'âge et l'utilisation d'hormone après la ménopause alors que la présence du récepteur de la progestérone varie avec le poids corporel et l'historique de grossesse (102). Contrairement à la prise d'œstrogènes chez la femme post ménopausée la prise d'un traitement oestroprogestatif contraceptif n'augmenterait pas le risque de cancer du sein. Par contre, le traitement hormonal de substitution (THS) augmente le risque de manière significative (risque relatif estimé à 1.5). (103).

I.4.2. Facteurs exogènes

a. Grossesse

Le risque relatif de cancer du sein est de 1.3 pour une femme ayant eu une grossesse après 20 ans, de 1.6 après 25 ans et de 1.9 après 30 ans. Plus la première grossesse est tardive et plus le risque de cancer du sein est élevé. Le développement du sein peut expliquer en partie ces données. En effet, la différenciation maximale du sein ne se produit qu'après la fin de la première grossesse menée à terme ce qui diminue le nombre de lobes de type 1 dont le potentiel prolifératif est très important. L'effet de protection maximale due à une grossesse est quasiment atteint dès la première grossesse et est conservé tout au long de la vie (27).

Il serait dû à une modification de l'empreinte génétique des cellules souches du sein contenues dans les lobules de type 1 lors de la première grossesse. Ces modifications épigénétiques permanentes confèrent à la glande mammaire une protection contre la carcinogénèse. Les modifications épigénétiques correspondent à des activateurs et à des répresseurs, de la transcription de gènes, de l'apoptose, des facteurs de croissance, du contrôle de la division cellulaire, de la réparation de l'ADN, de suppresseur de tumeur et d'antigènes de la surface cellulaire. (104, 105, 106).

b. Contraceptifs oraux

De façon récente, une élévation du risque de cancer du sein liée à la contraception orale a été reconnue (107, 108, 109). Il est vraisemblablement faible et lié à une longue durée de prise d'oestroprogestatifs avant une première grossesse. Certaines études montrent que l'utilisation prolongée de ces contraceptifs peut augmenter le risque du cancer du sein. Néanmoins, cette augmentation du risque disparaît environ dix ans après l'arrêt du contraceptif (110, 111, 112).

En 2014, de nouvelles études américaines viennent pour donner une preuve définitive de l'association du cancer du sein avec la prise prolongée de contraceptifs oraux. En effet, les précédentes études (113) publiée en 2013, notaient que les cas sévères de cancer du sein seraient en constante augmentation depuis 1976 chez les femmes de 25 à 39 ans. Ces résultats étaient confirmés en 2014 (114) grâce aux recherches proposées par une équipe de chercheurs de l'université de Washington basées sur une méthode d'analyse plus rigoureuse, c'est-à-dire

moins liée au témoignage des personnes examinées. Le tout a donc confirmé la corrélation qui existerait entre le cancer du sein et l'usage de contraceptifs oraux.

c. Obésité et régime alimentaire

L'obésité n'entraîne pas un risque accru de cancer du sein chez les femmes jeunes. En revanche, après la ménopause, ce risque est multiplié par deux chez les femmes obèses. Un régime alimentaire riche en graisses augmenterait le risque de cancer du sein. Cette hypothèse est basée sur l'incidence faible du cancer du sein au Japon et dans les pays sous-développés dont les populations consomment moins de graisses. En effet, les graisses favoriseraient le développement d'une flore bactérienne colique capable de transformer ces corps gras en agents cancérigènes potentiels (115). L'alcool, les rayonnements ionisants à dose importante, ainsi qu'un déficit en vitamines A et E pourraient jouer aussi un rôle dans la survenue du cancer du sein (l'alcoolisme augmente le risque d'environ 200% (115, 116).

L'obésité peut s'accompagner d'un diabète de type II caractérisé par une hyperinsulinémie et une résistance à l'insuline due à une diminution de la sensibilité des tissus à l'insuline. Cette dernière diminue la production d'une protéine de liaison des hormones sexuelles (SHBG) ce qui augmente les hormones stéroïdes libres, les œstrogènes libres en particulier. Ce phénomène amplifierait les effets mitogéniques de ces hormones et augmenterait donc le risque de cancer du sein (117). De plus, l'insuline est connue pour améliorer la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et la biodisponibilité de l'œstradiol (118).

I.5. Facteurs pronostiques

Les éléments de pronostic du cancer du sein sont de plusieurs ordres : cliniques, Histologiques anatomopathologiques et biologiques

I.5.1. Facteurs cliniques

a. La classification TNM

Plus la connaissance des tumeurs s'améliore, plus l'hétérogénéité s'accroît. Il est nécessaire de pouvoir regrouper les tumeurs en groupes homogènes sur un plan pronostique et thérapeutique. La classification TNM proposée par Pierre Denoix a le mérite de répondre à ces exigences. Elle a été retenue comme base de classification par le comité de nomenclature et de statistique de l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer). Elle est basée sur le principe de

CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOPHILIQUE

l'extension anatomique déterminée par la clinique et l'histopathologie. A la base du système T (tumeur-tumeur), N (nodes-ganglions), M (metastasis-métastases) il y a l'idée de coder l'extension locale, régionale et générale. D'une façon générale, on associe à ces trois lettres des chiffres (dont la valeur augmente quand augmente la gravité) qui varie de 0 à 4 pour le T, de 0 à 3 pour le N, et sont soit 0 soit 1 pour le M. Cela conduit à un grand nombre de possibilités TNM. (Table 2)

➤ **La taille (T) :**

Tis : tumeur in-situ (non infiltrante),

T1 : tumeur de 2 cm ou moins,

T2 : tumeur de moins de 5 cm, >2 cm,

T3 : tumeur de plus de 5 cm,

T4 : tumeur inflammatoire ou avec extension à la paroi thoracique ou à la peau, quelque soit sa taille.

➤ **Les adénopathies satellites (N) :**

N0 : pas d'adénopathie axillaire,

N1 : adénopathie homolatérale axillaire mobile,

N2 : adénopathie homolatérale axillaire fixée ou mammaire interne,

N3 : adénopathie infraclaviculaire ou supraclaviculaire ou axillaire et mammaire interne

➤ **La métastase distante (M)**

M0 : pas de métastase,

M1 : métastase à distance. (119)

On peut ainsi définir différents stades :

•**Stade 0** : TisN0.

•**Stade 1** : T1N0.

•**Stade 2** : T2N0, T3N0, T0N1, T1N1, T2N1.

•**Stade 3** : T3N1, TxN2, TxN3, T4Nx.

•**Stade 4** :TxNxM1.

Table 2. Survie à 5 ans en fonction du T et du N. (119)

	NO	N1	N2 et N3
T1	96-99%	86-95%	59-67%
T2	84-92%	70-83%	52-63%
T3	82%	70%	45%

Survie à 5 ans des cancers du sein invasifs en fonction de leur taille et de l'envahissement ganglionnaire.

b. Classification moléculaire

Jusqu'à la fin des années 1990, seules les données histologiques et cliniques permettaient de classer les différents types de cancer du sein. Plus récemment, les puces à ADN haut débit ont permis d'y ajouter des caractéristiques moléculaires. Déjà suspectée au vu des données cliniques et histologiques, les premières études d'expression géniques dans les cancers du sein ont montré l'hétérogénéité moléculaire de la maladie. Ainsi, sur la base de l'expression de plus de 8000 transcrits, 5 sous-types ont été identifiés : **Luminal A** et **B**, **basal**, **HER2** et **normal** (120) (Table3). Cette classification a ensuite été validée par plusieurs plateformes d'analyse transcriptionnelle, pour différentes populations de patientes et différentes formes anatomocliniques de la maladie et a permis de dégager des pronostics différents pour chaque sous groupe (**Figure 7**) (121, 122, 123)

Table 3. Classification moléculaire des cancers du sein. (121,123)

Sous type	Fréquence	Description
Luminal A	19-39%	Cancers généralement de bas grade et de bon pronostic, exprimant les récepteurs hormonaux (ER α) et les marqueurs de différenciation luminaire GATA3, KRT8 et KRT18
Luminal B	10-23%	Cas luminaux moins différenciés que les A et plus prolifératifs. Ils sont de grade plus élevé et de pronostic moins favorable
HER2	4-10%	Cancers avec une forte expression de HER2. Ils sont de mauvais pronostic
Basal-like	16-37%	Cancers très prolifératifs, de haut grade et de mauvais pronostic, ils n'expriment ni les récepteurs hormonaux ni HER2 mais expriment fortement des gènes liés à la prolifération (cyclines, CDK), des gènes de différenciation de type basal/myoépithélial (cytokératine 5 et 17, laminine, P-cadherine, caveoline 1) et présentent fréquemment des mutations de p53 et BRCA1.
Normal-like	<10%	Ce dernier sous-type reste assez mal défini. Il regroupe les tumeurs mammaires dont les clusters d'expression géniques sont semblables aux seins normaux et aux fibroadénomes. Les issues cliniques sont floues et pour certains il pourrait s'agir d'un artefact du au prélèvement de cellules normales en plus des cellules tumorales (Brenton et al., 2005)

Description des 5 sous-types basés sur leur expression spécifique de certains gènes

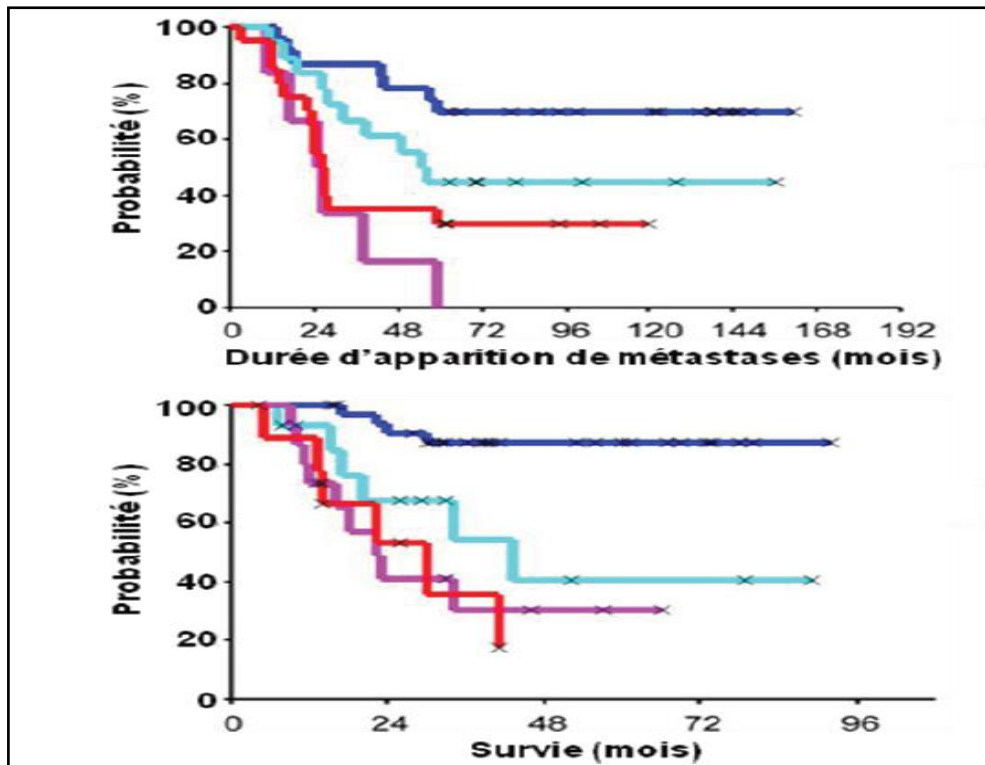


Figure 7. Issues des différents sous types moléculaires de cancer du sein.

Durée d'apparition de métastases distantes et probabilité de survie dans les différents sous-types moléculaires de tumeurs mammaires. En bleu foncé, le sous type luminal A ; en bleu clair, luminal B ; en violet, HER2 et en rouge, basal. Le sous type luminal A est de meilleur pronostic. D'après Sorlie et al., 2003 (123)

c. L'âge

L'âge est le facteur de risque le plus important du cancer du sein, avec une courbe d'incidence monotone augmentant de 30 à 70 ans. Les cancers survenant avant 50 ans représentent 15 à 20% des cancers du sein. A taille égale, le cancer du sein est beaucoup plus agressif chez une femme ménopausée que chez une femme qui ne l'est pas. (124)

d. Le délai de prise en charge

Le retard de prise en charge thérapeutique assombrit nettement le pronostic. Une méta analyse de 87 études, a révélé que les patientes pour lesquelles ce délai était supérieur à 3 mois avaient un taux de survie de 12 % inférieur à celui des femmes prises en charge plus rapidement (124).

I.5.2. Facteurs anatomopathologiques

a. Le type histologique

En général, le type histologique n'est pas un critère utilisé en pratique, même si il est reconnu que certains types histologiques sont de meilleurs pronostics tels que : les carcinomes lobulaires, mucineux (colloïdes) et médullaires. (125)

b. La taille tumorale

Elle est liée à l'envahissement ganglionnaire même si, à statut ganglionnaire identique, l'augmentation de la taille tumorale est associée à un pronostic défavorable. Une taille tumorale supérieure à 2 cm représente un facteur de mauvais pronostic (125).

c. Le grade histopronostique SBR

L'évolution d'un cancer est liée à son degré d'anaplasie par rapport au tissu d'origine. En effet, plus une tumeur est anaplasique plus l'évolution est péjorative. La classification histopronostique la plus utilisée actuellement est le grade de « Scarff, Bloom and Richardson » (SBR) (Bloom and Richardson, 1957), revu par le groupe de Nottingham (126), repris par l'European Community Working group for Breast Pathology et préconisé par l'OMS.

La méthode du *grading* **SBR** consiste à évaluer trois paramètres morphologiques:

- La formation de tubules ou degré de différenciation
- Le pléomorphisme nucléaire ou degré d'anisonucléose
- La fréquence des mitoses.

Un score allant de 1 à 3 est attribué à chacun de ces paramètres. Les différents scores sont additionnés pour obtenir le grade histologique global :

- Grade I = score 3-5 (prognostic favorable)
- Grade II = score 6-7 (pronostic intermédiaire)
- Grade III = score 8-9 (pronostic sombre)

Les cancers de grade I sont mieux différenciés, tandis que les cancers de grade III le sont moins. Les cancers indifférenciés ont habituellement une évolution plus grave et plus rapide que les cancers différenciés. (126)

d. L'envahissement ganglionnaire

Le cancer du sein est très lymphophile. L'envahissement ganglionnaire est habituellement considéré comme le plus important des facteurs pronostiques. Sa présence est corrélée à la taille de la tumeur et au grade SBR. D'autres éléments tels que la taille ganglionnaire, l'importance de l'envahissement et la rupture capsulaire sont également discutés. Actuellement, beaucoup d'équipes s'intéressent au caractère micro métastatique de l'envahissement déterminé par immuno-marquage (127).

I.5.3. Facteurs biologiques

a. Les récepteurs hormonaux

Il existe 2 types de récepteurs hormonaux : les récepteurs à l'oestrogène (ER) et à la progestérone (PR). La première étude de la valeur pronostique des récepteurs aux œstrogènes publiée par Knight en 1977 indiquait une fréquence de récurrence nettement plus importante pour les patientes ER- que pour les malades ER+. Il existe plusieurs méthodes de dosage de ces récepteurs, la référence étant la méthode de dosage immunohistochimique. Il est classique de distinguer les tumeurs de bon pronostic ER+PR+ de celles de mauvais pronostic ER- PR-. Les carcinomes mammaires sont plus ou moins sensibles à l'hormonothérapie en fonction de l'état de ces récepteurs hormonaux.

b. HER2/neu (c-erb B2)

Ce gène HER2/neu est un proto-oncogène qui code pour un récepteur transmembranaire partageant une forte homologie de séquence avec le récepteur pour l'*epidermal growth factor*(EGF) (69, 128). La protéine HER2 est surexprimée suite à l'amplification de son gène dans 15 à 30% des carcinomes mammaires (69). Ces anomalies peuvent être mises en évidence soit par la détection de l'amplification de ce gène dans le noyau par hybridation in situ, soit par analyse du niveau d'expression de ce gène par immuno histochimie (129, 130). Ainsi la détermination du statut d'expression de HER2 dans les carcinomes mammaires aurait une valeur pronostique péjorative et une valeur prédictive de la réponse à la chimiothérapie et/ou à l'hormonothérapie. Il est actuellement connu que les carcinomes mammaires surexprimant HER2 sont habituellement de hauts grades et de mauvais pronostic.

c. L'ADN-ploïdie ou index d'ADN

Cette technique évalue la quantité d'ADN dans les cellules tumorales. Elle permet d'identifier les tumeurs dites aneuploïdes plus agressives par opposition aux tumeurs diploïdes dont le contenu en ADN est normal.

d. Les marqueurs de prolifération

À côté de l'activité mitotique qui doit impérativement être évaluée pour établir le grade SBR, des marqueurs de prolifération peuvent être utilisés, tels que l'analyse de l'expression de Ki67 par immunohistochimie ou la détermination du pourcentage de cellules en phase S (synthétisant l'ADN) par cytométrie en flux ou en analyse d'image (131). Il a été démontré que l'expression de Ki67 dans les carcinomes mammaires est associée à un mauvais pronostic, mais les seuils de positivité varient dans la littérature de 1 à 20 %.

D'autre part, les différentes études ont montré que les taux de rechute et de mortalité étaient augmentés lorsque les tumeurs comportaient une proportion élevée de cellules en phase S (132). Une corrélation positive aurait aussi été démontrée entre le taux de réponse à la chimiothérapie néoadjuvante et le pourcentage de cellules en phase S. (133)

I.6.Stratégies thérapeutiques

L'objectif du traitement du cancer du sein est d'enlever la tumeur et de supprimer toutes les cellules cancéreuses. Il existe différents types de traitements qui peuvent être réalisés seuls ou en associations.

I.6.1.Chirurgie

La chirurgie est le traitement le plus anciennement utilisé pour soigner les cancers du sein. Il en existe 2 types: **la chirurgie conservatrice** (tumorectomie) qui a pour but d'enlever la totalité de la tumeur sans enlever la totalité du sein, et **la mastectomie** qui consiste à enlever tout le sein (134).

I.6.2.Radiothérapie

Comme la chirurgie, la radiothérapie est un traitement local du cancer. Elle consiste à utiliser des rayons qui atteignent la tumeur et détruisent les cellules cancéreuses. Selon la zone à traiter, les rayons utilisés peuvent être différents (photons, rayons X ou électrons). Ces divers

types de rayons peuvent être combinés. La radiothérapie peut être proposée avant une chirurgie du sein (radiothérapie préopératoire) pour diminuer la taille de la tumeur ou après une chirurgie du sein (radiothérapie post-opératoire) pour diminuer le risque de rechute locale (135)

1.6.3. Chimiothérapie

Il s'agit d'un traitement utilisé pour les formes métastatiques pour les quelles la chimio-sensibilité est largement démontrée, et en traitement adjuvant pour les formes non métastatiques. De nombreux médicaments existent et sont prescrits seuls ou en associations. Ils peuvent être classés en 4 familles selon leur mode d'action : les anti-mitotiques qui bloquent les cellules en métaphase aboutissant ainsi à l'apoptose ; les agents alkylants sont des molécules de synthèse qui inhibent la progression de l'ADN polymérase ; les antimétabolites qui perturbent la synthèse de l'ADN en bloquant les enzymes nécessaires à la synthèse des nucléotides et enfin les inhibiteurs de la topoisomérase II qui inhibent la religation des 2 brins d'ADN après le relâchement des contraintes de torsion nécessaires au processus de réplication. La durée optimale de la chimiothérapie est en général de quatre ou six cures. Le taux de réponse est relativement élevé puis qu'il est de 70 à 90% quelque soit l'agent choisi (135).

Table 4. Principaux médicaments antimitotiques utilisés dans les cancers du sein

Classe pharmacologique	DCI	Nom de spécialité
Taxanes	<i>Docétaxel</i>	<i>Taxotère®</i>
	<i>Paclitaxel</i>	<i>Taxol®</i>
Antracyclines	<i>Epirubicine</i>	<i>Farmorubicine®</i>
	<i>Doxorubicine</i>	<i>Adriblastine®</i>
Antracènediones	Mitoxantrone	Novantrone®
Alcaloïdes de pervenche	Vinorelbine	Navelbine®
Agents alkylants	Cyclophosphamide	Endoxan®
	Thiotepa	Thiotepa®
Antimétabolites	Capécitabine	Xeloda®
	Méthotrexate	Ledertrexate®
	5 Fluoro-uracile	5 Fluoro-uracile®

I.6.4. Hormonothérapie

Le traitement médical par hormonothérapie est ancien. En effet, c'est en 1896 que Beatson rapporte 2 cas de régression temporaire de cancers mammaires métastasés après ovariectomie. Dès lors, de nombreuses hormonothérapies ont été mises au point. Ce traitement est, d'une manière générale, bien toléré et peut permettre des survies très prolongées et n'est efficace que dans les tumeurs hormono-dépendantes. Cette hormonosensibilité est déterminée par la présence ou non de récepteurs hormonaux dans les cellules cancéreuses, notamment de récepteurs des œstrogènes (ER) et de la progestérone (PR). La limite permettant de déterminer si une tumeur est ER ou PR positive ou négative a été le sujet de nombreux débats. Actuellement, les résultats des méthodes permettant de quantifier ces récepteurs sont considérés comme positifs si la quantité de récepteurs est supérieure à 10 fmol par mg de protéines cytosoliques. Les patientes présentant des tumeurs ER+/PR+ seraient 80% à répondre à l'hormonothérapie alors que le taux de réponse n'est que de 30 % pour les tumeurs ER+/PR- et de 45 % pour les tumeurs ER- /PR+ (136). Il existe 4 types d'hormonothérapie : soustractive, compétitive, inhibitrice ou additive.

a. Hormonothérapie soustractive

L'hormonothérapie soustractive consiste à supprimer rapidement par castration la source d'œstrogènes que synthétisent les ovaires. La méthode longtemps utilisée fut l'ovariectomie chirurgicale. Cette technique est actuellement remplacée par une ovariolyse radiothérapique. La suppression ovarienne est obtenue dans les 6 à 10 semaines suivant la radiothérapie. Son intérêt est démontré en situation métastatique ou en traitement adjuvant chez les femmes non ménopausées présentant des tumeurs hormono-dépendantes. (136)

b. Hormonothérapie compétitive

Ce type d'hormonothérapie utilise les anti-œstrogènes. Ils bloquent l'action cellulaire des œstrogènes en se fixant à la place de l'œstradiol sur l'ER. Le chef de file est le tamoxifène qui fut mis sur le marché en 1970 et qui reste encore aujourd'hui le composé le plus utilisé dans le traitement des cancers du sein hormono-dépendants. D'autres dérivés ont été synthétisés : le raloxifène, le torémifène ou encore le fulvestrant. (137, 138, 139)

c. Hormonothérapie inhibitrice

On distingue tout d'abord les inhibiteurs hypophysaires gonadotropes. Il s'agit d'agonistes de la LH-RH (facteur de libération de l'hormone lutéinisante) obtenus par synthèse. Ces molécules de demi-vie longue stimulent l'hypophyse en permanence, supprimant le caractère pulsatile de la sécrétion physiologique de la LH-RH par l'hypothalamus. De ce fait, l'hypophyse ne sécrète plus de LH ni de FSH, entraînant une chute de la production d'œstrogènes et de progestérone par les ovaires. Les effets sont identiques à ceux obtenus par castration mais sont réversibles 1 à 2 mois après l'arrêt du traitement (140). Cependant, il existe initialement une augmentation transitoire des gonadotrophines et donc de la synthèse d'hormones sexuelles qui peuvent amener une aggravation brutale de la maladie. Au début, le traitement est donc souvent associé à un inhibiteur des récepteurs des œstrogènes.

L'hormonothérapie inhibitrice fait également appel aux inhibiteurs d'aromatase. L'aromatase est l'enzyme qui catalyse la transformation des androgènes en œstrogènes. Les molécules à activité anti-aromatase agissent soit en prenant la place du précurseur, en l'occurrence les androgènes (inhibiteurs stéroïdiens ou de type I), soit en se liant à l'enzyme et inhibant ainsi toutes les activités enzymatiques liées à celle-ci (inhibiteurs non stéroïdiens ou de type II). Les inhibiteurs actuellement utilisés sont l'anastrozole, le létrozole et l'exemestane plus connus sous les noms de Arimidex®, Femara® et Aromasin®. De récentes études montrent que ces inhibiteurs d'aromatase sont plus efficaces que le tamoxifène (141, 142), mais contrairement à ce dernier, ils n'augmentent pas le risque de cancer de l'endomètre ni de thromboses veineuses. En revanche, ils diminuent fortement la densité minérale osseuse et augmentent le risque de fractures. Actuellement, les inhibiteurs d'aromatase sont utilisés uniquement chez les femmes ménopausées, soit en première ligne de maladie métastatique, soit en situation adjuvante.

d. Hormonothérapie additive

L'hormonothérapie additive consiste à utiliser des progestatifs constituant une hormonothérapie de deuxième ou de troisième intention dans les cancers métastatiques, après échec des anti-œstrogènes ou des inhibiteurs d'aromatase. Leur mode d'action n'est pas clairement défini, mais des études montrent qu'ils diminuent les taux d'ER et d'œstrogènes

circulants. Le taux de réponse est d'environ 30% avec une rémission complète chez 5% de ces patientes (143). Ces agents présentent cependant des effets secondaires non négligeables dont une prise de poids importante, une hypertension artérielle et des risques thromboemboliques.

d. Les thérapies ciblées

De nouvelles stratégies thérapeutiques sont regroupées sous le terme de thérapies ciblées. Elles concernent l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui agissent comme des interrupteurs en bloquant les voies de signalisation surexprimées dans la cellule cancéreuse. L'anticorps monoclonal anti-HER-2 recombinant connu sous le nom de trastuzumab ou Herceptin™ est utilisé dans le traitement du cancer du sein métastatique ou non avec surexpression tumorale de HER-2 (erbB2). Par ailleurs, les essais cliniques avec le Lapatinib ou Tykerb® qui est aussi une molécule inhibitrice de HER-2 ont montré des résultats très prometteurs et la molécule a été mise sur le marché en 2007. Une autre stratégie vise à inactiver la cyclooxygénase-2 (COX-2), dont l'implication dans la progression et l'angiogenèse des tumeurs a été démontrée. Le celecoxib, un inhibiteur sélectif de cette enzyme, a notamment été utilisé en association avec la chimiothérapie entraînant peu d'effets cytotoxiques additionnels mais augmentant le taux de réponse de 20 % (144). Actuellement, les recherches se penchent vers des inhibiteurs des voies de signalisation des facteurs de croissance dont beaucoup interagissent avec l'ER et contrôlent le développement et la croissance des tumeurs (145).

II. Les récepteurs adrénergiques

II.1. Historique des récepteurs adrénergiques

Les récepteurs adrénergiques sont des macromolécules se trouvant dans la membrane des cellules innervées par des neurones adrénergiques (**figure 8**). La fonction physiologique de base de ces récepteurs est de reconnaître les médiateurs adrénergiques : adrénaline ou noradrénaline. (146)

Cette reconnaissance provoque une série d'événements intracellulaires, qui modifient l'activité de la cellule effectrice. Ils ont la caractéristique, lors de leur activation, de faire intervenir un second messager : la protéine G, ainsi que des mécanismes effecteurs : enzymes effectrices ou

CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

canaux ioniques. Ces récepteurs présentent une structure commune, à sept hélices alpha transmembranaires. (147, 148)

L'extrémité amino-terminale de la protéine est extracellulaire. L'extrémité carboxy-terminale est intracellulaire. On peut observer trois boucles extracellulaires (nommées E1, E2 et E3) et trois boucles intracellulaires (I1, I2 et I3). Ces protéines peuvent être sujettes à des modifications post traductionnelles, de type N-glycosylation, acylation par des composés lipidiques. (149,150)

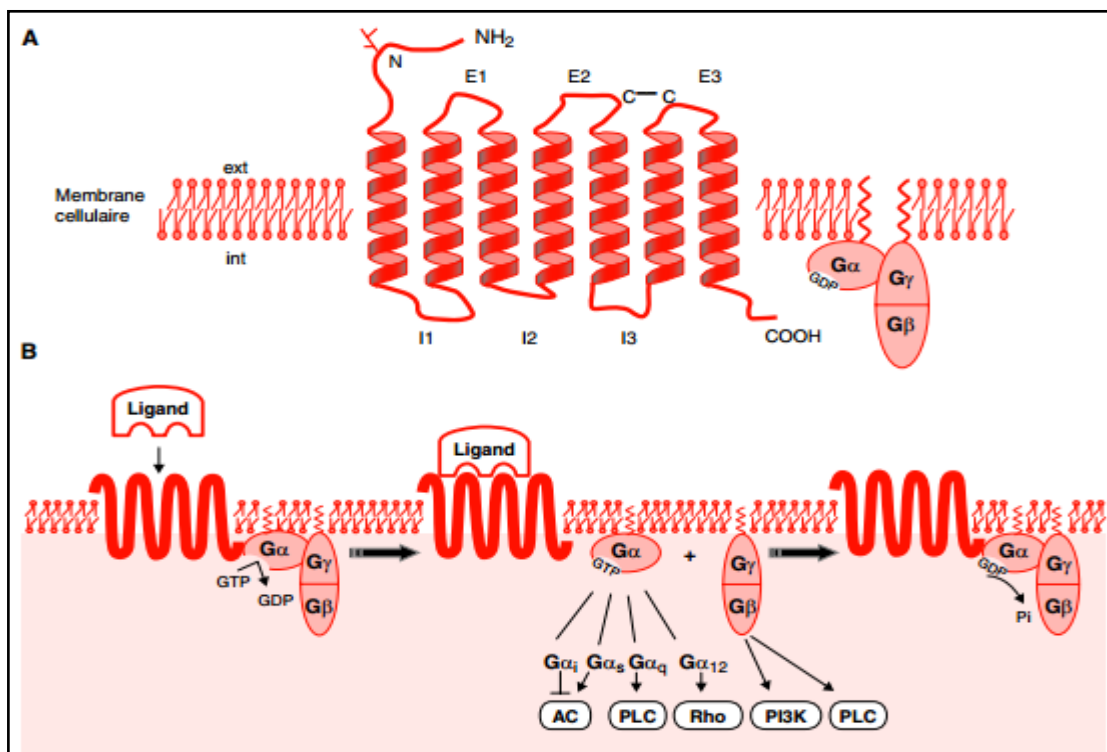


Figure 8. La famille des GPCR. A) Représentation schématique de la structure typique en 7-TM des GPCR, ainsi que la structure d'une protéine G (G α -GDP et G $\beta\gamma$). Les trois boucles extracellulaires des GPCR sont appelées E1 à E3, et les trois boucles intracellulaires I1 à I3. L'extrémité aminée NH₂ de la protéine est du côté extracellulaire et l'extrémité carboxylique COOH du côté intracellulaire. B) Processus d'activation et de désactivation d'un GPCR. De gauche à droite : la liaison d'un ligand au récepteur inactif induit chez ce dernier des changements conformationnels qui sont transmis à la protéine G associée. Il s'en suit un échange GDP/GTP au niveau de la sous unité G qui entraîne la dissociation des sous unités G α et G $\beta\gamma$ et l'activation de messagers secondaires ayant des propriétés biologiques spécifiques : G α_i , inhibition de l'adénylate cyclase (AC); G α_s , activation de l'AC; G α_q , activation des phospholipases C (PLC); G α_{12} , activation des GTPases Rho; G $\beta\gamma$, activation des PLC et des phosphoinositide-3-kinase (PI3K). L'activité GTPase de G α , inhibée par sa liaison au complexe G $\beta\gamma$, permet l'hydrolyse spontanée du GTP en GDP+Pi et le retour à l'état inactif du récepteur.

(151)

Ahlquist en 1948 propose l'existence de deux types de récepteur : α et β . Cette classification est basée sur la capacité de certains agonistes adrénergiques à provoquer soit de l'excitation, soit de l'inhibition sur différents tissus. Par exemple la noradrénaline est connue pour avoir un puissant effet excitateur sur les muscles lisses, l'isoprotérénol dispensant l'effet opposé. Quant à l'adrénaline, elle peut à la fois exciter et inhiber les muscles lisses. Ahlquist propose de

CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

désigner par α et β les récepteurs des muscles lisses qui sous l'action des catécholamines produisent respectivement excitation et inhibition. Les récepteurs adrénergiques forment une famille de protéines très proches les unes des autres. Les séquences d'acides aminés des récepteurs alpha et beta ont environ 30 à 40% d'homologie. (152, 153)

Les récepteurs β ont également été subdivisés plus tard. On distingue les récepteurs β_1 et β_2 . Beaucoup de tissus contiennent les deux types de récepteurs en différentes proportions, souvent un récepteur prédomine établissant ainsi l'organe ou le tissu concerné comme sous contrôle β_1 ou β_2 . Les récepteurs β_1 sont prédominants dans le cœur, associés à une réponse excitatrice. Les différentes molécules activatrices sont : isoproterenol, adrénaline et noradrénaline. Les récepteurs β_2 , sont quant à eux, rencontrés sur les muscles lisses des vaisseaux sanguins et des bronchioles où ils produisent une action inhibitrice (relaxante). La noradrénaline a assez peu d'effet sur les récepteurs β_2 , plus sensible à l'adrénaline ou à l'isoproterenol (154) Après quelques années un troisième récepteur β , le β_3 , a été isolé chez l'homme. Il semble jouer un rôle dans la lipolyse chez l'homme (155)

A l'instar des récepteurs β , les récepteurs α peuvent également être subdivisés. Dans les années 70 une division anatomique fut réalisée en distinguant des récepteurs α_2 présynaptiques puis des récepteurs α_1 post synaptiques. Nous verrons que les récepteurs α_2 ne sont pas que présynaptiques. La subdivision α_1 - α_2 est maintenant faite sur leur sensibilité à certains agents agonistes et antagonistes. Dans le tableau 5, sont indiqués les différents agents et leur action, ils sont dits spécifiques d'un récepteur, mais ce n'est pas tout à fait exact. Lorsque les doses augmentent, un agent spécifique d'un récepteur α_2 pourra agir sur un récepteur α_1 (156). Les sous-types α_1 et α_2 ne présentent pas plus de similitudes entre eux que les sous-types α et β : environ 30 à 40 % (152, 153).

Table 5 : Quelques antagonistes et agonistes des récepteurs alpha (157)

Type de récepteur	Agoniste	Antagoniste
Alpha 1 et alpha 2	Adrénaline Noradrénaline	Tolazoline Phentolamine
Alpha 1	Phenylephrine Methoxamine	Prazosine Corynanthine
Alpha 2	Clonidine Détomidine Médétomidine Romifidine	Yohimbine Idazoxan Atipamezole

Le récepteur adrénergique alpha-2A est l'objet de notre étude, il fait partie des récepteurs α_2 , dont va suivre une description précise de ces récepteurs.

II.2. Les récepteurs adrénergiques α_2

Depuis quelques années quatre sous-types distincts de récepteurs α_2 ont été identifiés : α_2A , α_2B , α_2C et α_2D , cependant il se pourrait que ce dernier soit un homologue du sous-type α_2A (154, 157). Les séquences en acides aminés des domaines transmembranaires des trois récepteurs partagent environ 75% d'homologie. (Figure 9) (149)

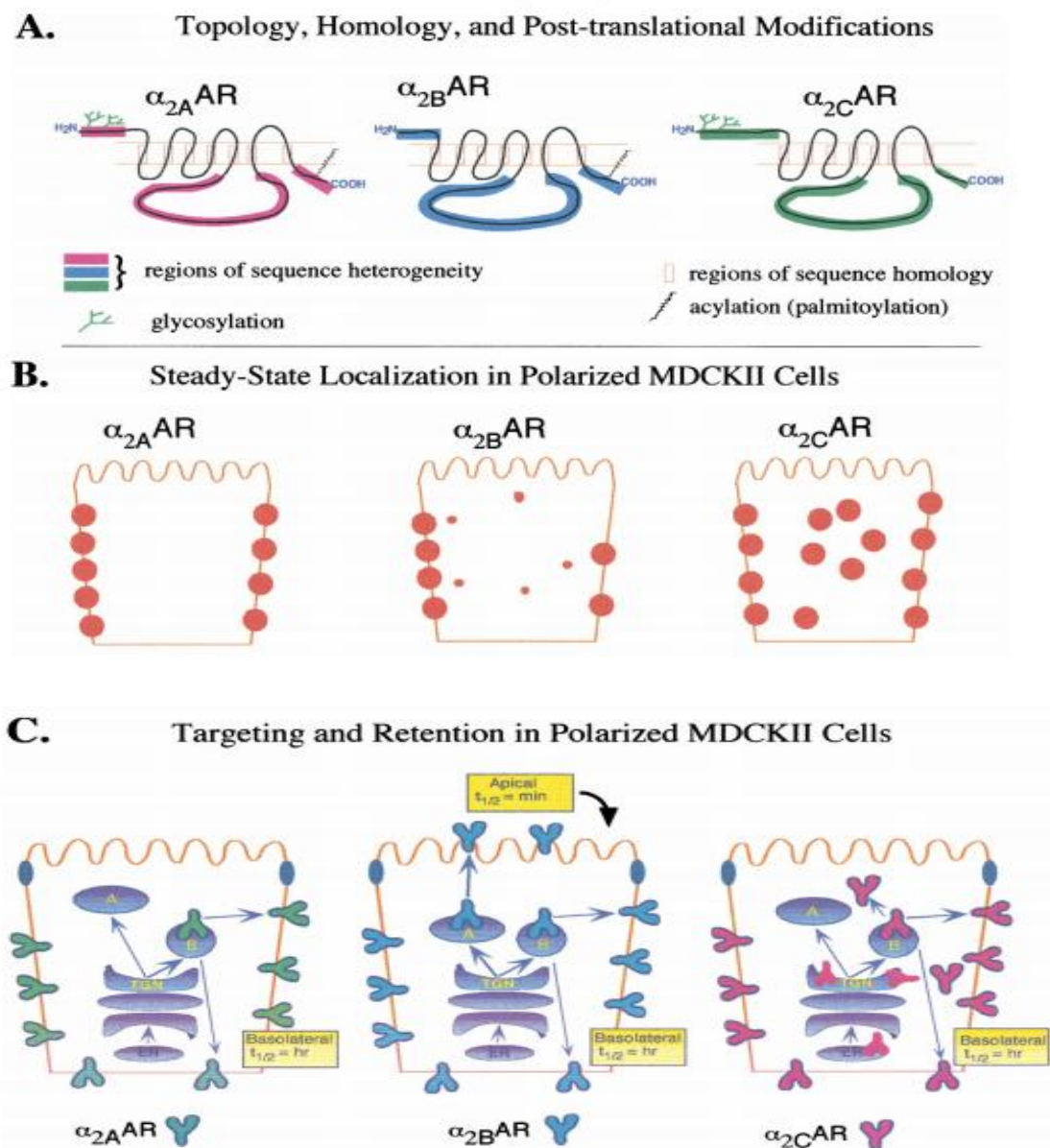


Figure 9. Structure et caractéristiques des trois sous-types α_2AR . (A) la topologie, l'homologie, et les modifications post-traductionnelles sont présentées pour le α_2A , l' α_2B , et α_2C . Les régions présentant la plus grande diversité de séquence sont les régions non-associées à la bicouche, en particulier la troisième boucle cytoplasmique, alors que les zones de plus forte homologie sont les régions hydrophobes couvrant la membrane. (B) localisation à l'état d'équilibre des trois sous-types adrénergiques ;

sont présentés. Le $\alpha 2$ AAR est presque exclusivement sur la surface basolatérale de la cellule. Le $\alpha 2$ BAR est également presque exclusivement basolatérale, mais il existe un petit compartiment endocytaire dans certaines conditions. Le $\alpha 2$ CAR est présent dans la moitié de la surface basolatérale de la cellule et dans la moitié intracellulaire. (c) Les différences dans les voies de trafic sont présentées. Le $\alpha 2$ AAR est directement délivré au domaine basolatéral, où il a un temps de rétention sur la surface cellulaire de 12 h. Le $\alpha 2$ BAR est livré au hasard dans les deux surfaces apicales et basolatérale, mais il est sélectivement retenu basolatéralement, où il a un temps de rétention de 12 heures. La demi-vie de $\alpha 2$ BAR sur la surface apicale est seulement de 15 à 30 min. Le $\alpha 2$ CAR est aussi directement livré à la surface basolatérale et a une demi-vie de 12 heures sur la surface, mais il existe une quantité substantielle de récepteur localisé à l'intérieur de la cellule. ER, réticulum endoplasmique; TGN, appareil de Golgi (152)

II.2.1 Transduction du message

La réponse cellulaire à l'activation des récepteurs $\alpha 2$ est différente selon les sous-types. La transduction du message porté par un $\alpha 2$ -agoniste fait intervenir différentes étapes (154) :

- l'attache du ligand au récepteur : le site de liaison est souvent situé sur les régions transmembranaires des récepteurs. Ce dernier change alors de conformation.
 - Activation de la protéine G : celle-ci est rendue possible par le changement de conformation du récepteur.
 - Stimulation d'un système effecteur par la protéine G.
 - Activité GTPase intrinsèque : entraîne la réassociation des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta/\gamma$.
- (Figure 10)

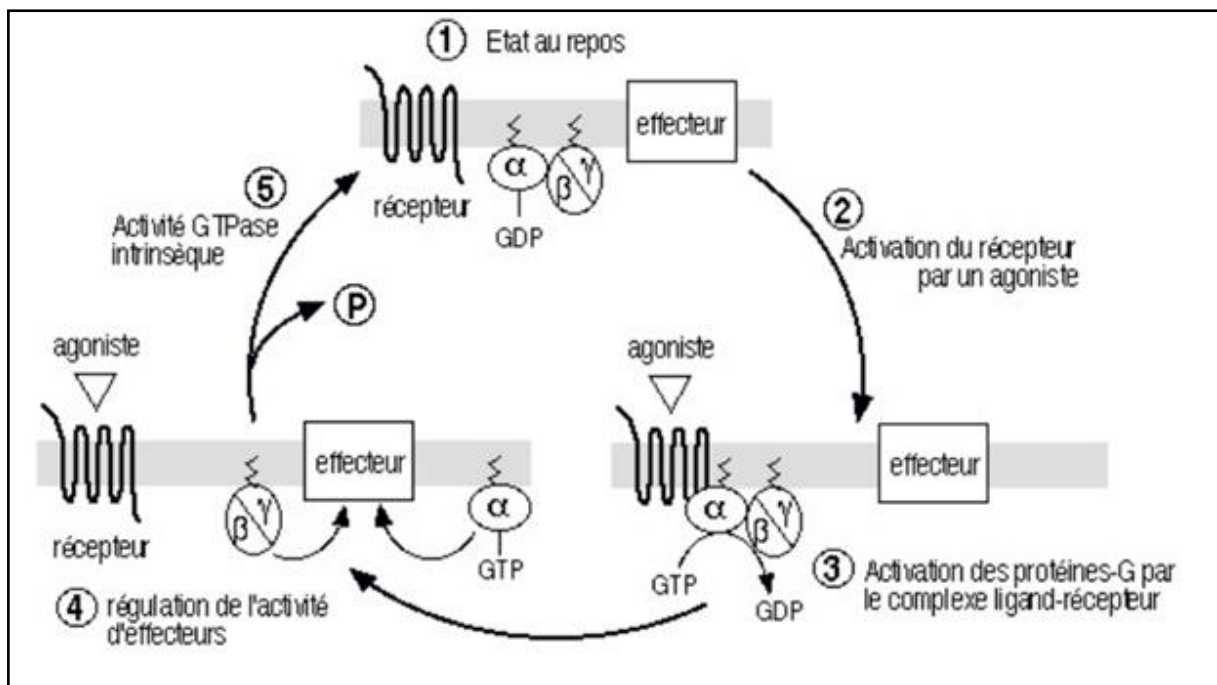


Figure 10 : Etapes de la transduction du message adrénérgique (158)

Les protéines G peuvent être réparties en quatre classes, en fonction des homologies de séquence : G_s , G_i/o , $G_q/11$ et G_{12} . Un certain nombre de mécanismes effecteurs a été décrit :

- inhibition de l'adényl cyclase : soit par l'intermédiaire de la protéine G_i , soit par une faible stimulation directe de G_s .
 - hyperpolarisation de la membrane par activation des canaux K^+ .
 - inhibition des canaux Ca^{2+} voltage dépendant par l'intermédiaire de la protéine G_o .
 - D'autres systèmes de second message : augmentation de l'échange Na^+/K^+ , stimulation de la phospholipase C, mobilisation d'acide arachidonique, augmentation d'hydrolyse des polyphospho-inositides, augmentation de la disponibilité du Ca^{2+} intracellulaire.
- (159)

La figure 11 résume les principales fonctions des récepteurs alpha 2 adrénrgiques.

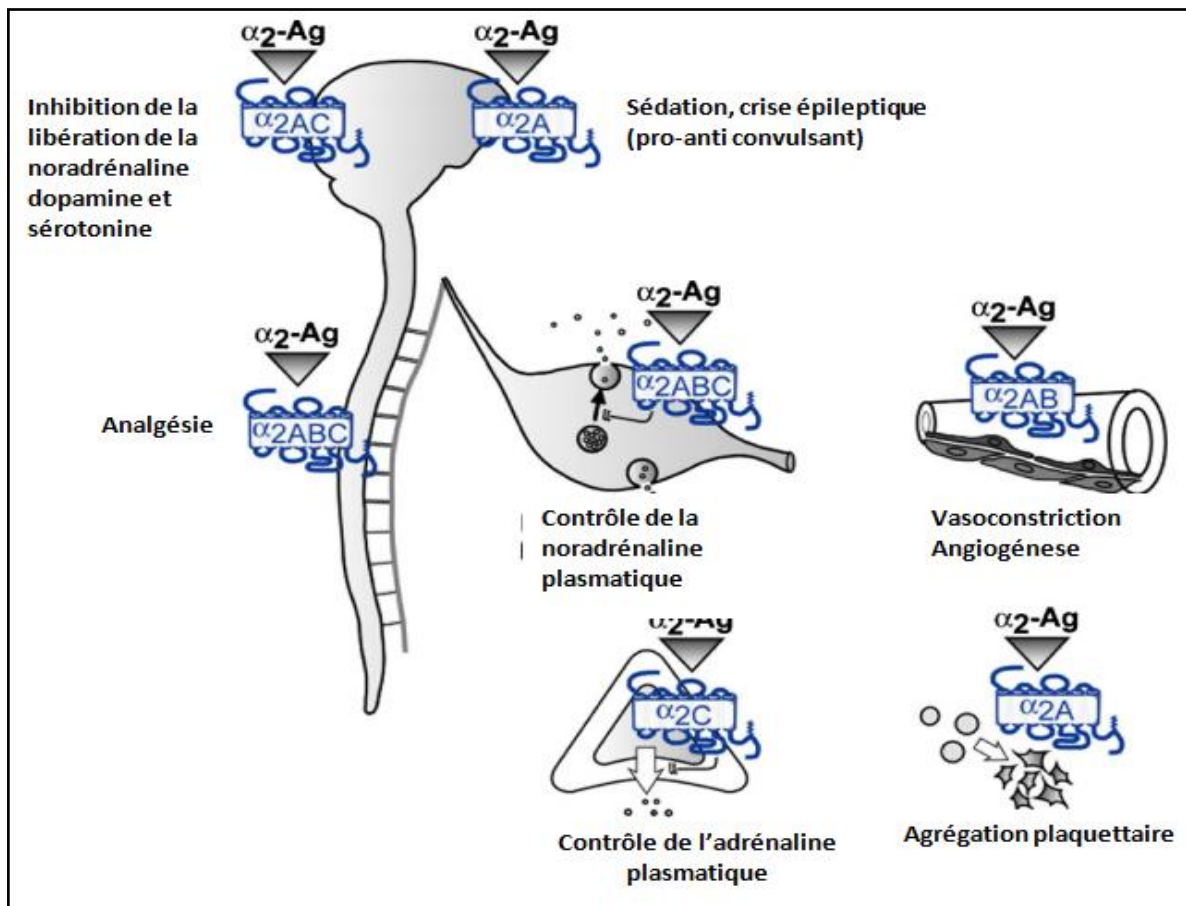


Figure 11. Vue d'ensemble des divers fonctions spécifiques des sous-types α_2 -adrénergiques dérivées de modèles de souris. Abréviations: α_2 -Ag, α_2 -agonistes; α_2A , α_2B , α_2C , sous-types α_2 -adrénergiques. (8)

II.2.2. Localisation des récepteurs α_2 adrénergiques

a. Localisation périphérique

Les récepteurs α_2 du système nerveux périphérique peuvent avoir une localisation présynaptique où ils régulent la libération de neurotransmetteurs (figure 12) et postsynaptique sur des cellules effectrices (160)

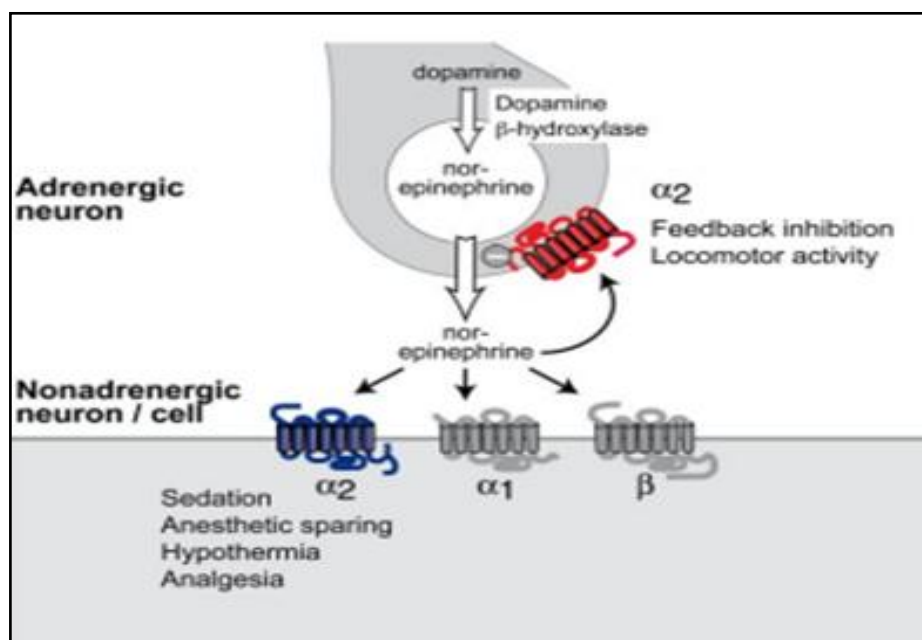


Figure 12. Représentation schématisée des fonctions des cellules à récepteurs α_2 -adrénergiques et des cellules non adrénergiques. En anglais Adrenergic neuron : neurone adrénergique ; Nonadrenergic neuron/cell : neurone / et cellule non adrénergique ; Sédation, anesthetic sparing, hypothermia, analgesia : sédation, anesthésique, analgésie ; Locomotor inhibition : inhibition locomotrice ; feedback inhibition : Rétro-inhibition (161)

Les récepteurs α_2 peuvent agir sur la synapse noradrénergique en régulant la libération de la noradrénaline, on parle alors d'autorécepteurs. Ils peuvent également agir sur d'autres synapses pour inhiber la libération d'autres neurotransmetteurs, on parle alors d'hétérorécepteurs. (162, 163, 164, 165).

La localisation des récepteurs alpha 2 dans les tissus périphériques a été déterminée soit par des analyses pharmacologiques étudiant la réponse de ces récepteurs à différents médiateurs, soit en analysant les liaisons récepteur-ligand marqué par autoradiographie. Cependant, il faut noter que cette dernière ne peut pas détecter les récepteurs exprimés à basse densité ou lorsque ils sont présent dans des cellules ayant une faible masse comparant au tissu analysé (166). Néanmoins, ces études ont confirmé que α_2 ARs ont une localisation

périphérique, notamment dans les plaquettes humaines, glande sous-maxillaire, la rate, les reins, les cellules endothéliales, cellules épithéliales, l'iléon, le canal déférent, veine saphène, les adipocytes. (167, 168). Les α_2 ARs ont également été décrits dans les artérioles coronaires, (169, 170) les glandes salivaires (163, 171) les artérioles, l'œil (172, 173), l'estomac (174), et les cellules du pancréas. (175, 176) Les α_2 ARs sont également présents dans les cellules épithéliales du tubule proximal rénal et côlon (177, 178, 179)

b. Localisation centrale des récepteurs adrénergiques α_2

Une étude réalisée chez l'homme et le rat (180, 181, 182) a permis de déterminer par autoradiographie les sites de liaison à l'[3H]para-aminoclonidine, un alpha-2 agoniste marqué. Chez le rat et l'humain, des récepteurs alpha-2 se trouvent dans les régions impliquées dans la modulation des fonctions autonomes ou dans l'intégration des informations somato-sensorielles avec des mécanismes autonomes. (183) Ces régions sont également liées par des connections réciproques et sont composées principalement de neurones adrénergiques. La complexité de la répartition anatomique des récepteurs alpha-2 au niveau central est à l'image de la complexité et la variété de l'action des alpha-2 agonistes (180)

II.3. Les récepteurs adrénergiques α_2A (α_2A ARs)

II.3.1. Structure, fonction et localisation des α_2A ARs

Les récepteurs alpha-2 A-adrénergiques sont des membres de la superfamille des récepteurs couplés à la protéine G α_2A AR est codée par le gène (ADRA2A), un gène de petite taille sans intron situé sur le chromosome 10q24-q26. (ADRA2A: hCG41806) (**Figure 13**) (184)

Le gène ADRA2A, est hautement homologue aux 2 autres gènes adrénergiques (ADRA2B et ADRA2C). Son unique exon est formé de 3876 paire de base (pb) avec un seul cadre ouvert de lecture (ORF) comportant 1 353 pb, ce gène code une protéine réceptrice de 450 résidus d'acides aminés avec un poids moléculaire de 48957 Da. (**Figure 14**). (9, 185)

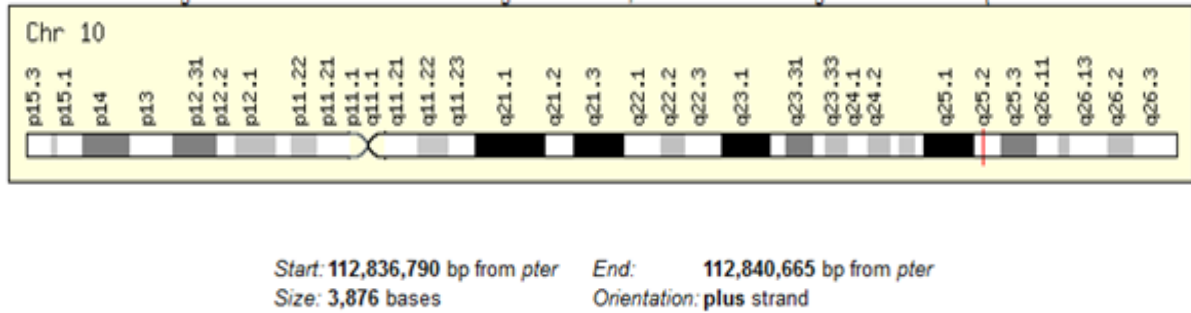


Figure 13. Localisation du gène ADRA2A sur le chromosome 10. (186)

Le séquençage génétique codant les sous-types α_2 adrénergiques a démontré que α_2A et α_2D sont orthologues c'est-à-dire deux séquences génétiques *homologues* de deux espèces différentes, et actuellement il est admis que les espèces de mammifères étudiées sont trois gènes α_2 -adrénergiques : l'un codant pour la α_2A -adrénorécepteurs ; un pour la α_2B -adrénorécepteurs ; et l'autre pour la α_2C -adrénorécepteurs (187). α_2A AR se trouve chez l'homme, le porc et le lapin, alors que le α_2D AR se trouve chez le rat, la souris et la vache (186).

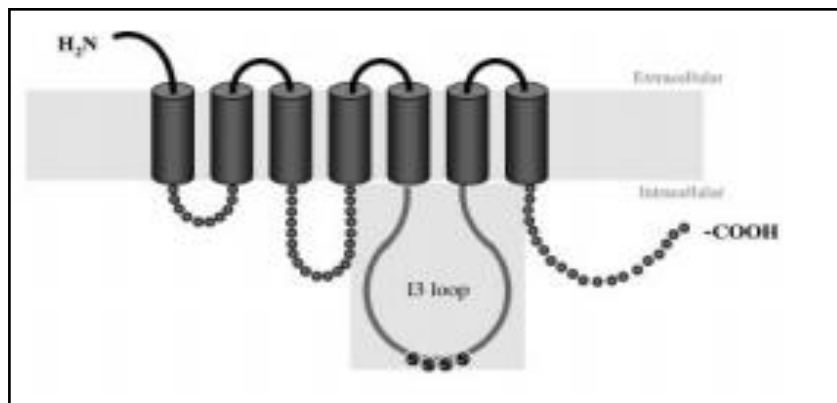


Figure 14. Représentation schématique du récepteur adrénérique alpha 2A humain. La figure illustre la topologie membranaire et les séquences d'acides aminés des premières, deuxième et troisième boucles intracellulaires ainsi que l'extrémité carboxyle de α_2A -AR. La boucle de I3 contient quatre résidus sérine adjacents, désignés par la lettre S sur le schéma, connus pour être des sites spécifiques de phosphorylation de la GRK2. (188)

Les récepteurs α_2A -adrénergiques régulent un grand nombre de fonctions diverses en comparissant avec la plupart des récepteurs couplés à la protéine G. (10)

En effet ils sont des régulateurs importants du tonus sympathique par inhibition sympathique central et périphérique (présynaptique). Ils sont également directement impliqués dans

plusieurs fonctions homéostatiques, y compris la contraction et la relaxation vasculaire des muscles lisses, le contrôle de la vigilance, de l'anxiété et les comportements liés au stress, la perception de la douleur, l'agrégation plaquettaire, la lipolyse et la libération d'insuline. Des souris génétiquement modifiées qui ne manifestent pas le gène $\alpha 2A$ -AR (ADRA2A) ont un phénotype hyper-adrénergique avec pression sanguine accrue, accélération de la fréquence cardiaque, augmentation de la concentration plasmatique de la noradrénaline, et développant une hypertrophie et insuffisance cardiaque. (189, 190)

En outre, ces souris génétiquement modifiées ne présente pas de réponse à la clonidine (une $\alpha 2$ -AR-agoniste) utilisée pour faire diminuer la pression artérielle. (185, 189)

Les récepteurs Alpha2A sont le sous-type prédominant dans le système nerveux central où ils modulent le flux sympathique et sont les médiateurs de l'action anti-hypertensive centrale des $\alpha 2$ -AR agonistes clonidine et andmoxonidine (191,192). Les propriétés analgésiques et sédatifs des agonistes $\alpha 2$ -adrénergiques sont principalement attribuées à l'activation des récepteurs adrénergiques $\alpha 2A$, comme en témoignent les récentes études sur les souris dépourvues de ces récepteurs adrénergiques. (193, 194, 195, 196).

$\alpha 2A$ AR fonctionne comme autorécepteurs (présynaptiques) sur les neurones noradrénergiques, où ils régulent la sécrétion de la noradrénaline (NA), et comme récepteur post-synaptique sur les neurones qui reçoivent une innervation noradrénergique, où ils régulent la libération d'autres neurotransmetteurs (hétérorécepteur). Les $\alpha 2A$ ARs préjonctionnel régulent la libération de noradrénaline à partir des nerfs sympathiques grâce à la rétro action négative au niveau des terminaisons nerveuses présynaptiques. (197,198)

$\alpha 2A$ AR et $\alpha 2B$ AR sont phosphorylés par GRK2 (G Protein-Coupled Receptor Kinase 2) par mécanisme agoniste-dépendant, cette phosphorylation se produit au niveau de 4 serines adjacentes dans la troisième boucle intracellulaire du récepteur $\alpha 2A$ (188, 199). Des études antérieures ont révélé que la troisième boucle intracellulaire $\alpha 2A$ -AR interagit avec un certain nombre de protéines incluant des arrestines (200, 201), des protéines G hétéro trimériques (202), et des spinophilins (203, 204). En fait, il a été suggéré que la spinophilin avait un effet antagoniste sur la phosphorylation des $\alpha 2A$ -AR/GRK2 (150, 205)

L'activation des $\alpha 2A$ -AR pourrait être liée à une bradycardie, une hypotension (206, 207), et une sédation (193). En revanche, $\alpha 2B$ AR contrefait l'hypotension induite par les $\alpha 2A$ AR (208)

Leur activation joue aussi un rôle dans la consolidation de la mémoire de travail (209) affecte le métabolisme des lipides et du glucose (210, 211), la température corporelle (207) l'agrégation plaquettaire (208) des fonctions cognitives telles que l'humeur et le comportement (209) et la concentration des catecholamines plasmatique (210, 211) En réalité le gène ADRA2A est un élément important dans la régulation de ces marqueurs de base de l'activité sympathique. (212)

En outre, des études récentes ont démontré que l'activation α 2A-AR est étroitement liée à la réaction inflammatoire. (213)

Les récepteurs alpha 2A exprimés dans les cellules intestinales participent au contrôle des fonctions épithéliales telles que le transport de l'eau et les solutés et la prolifération cellulaire. (179)

Enfin il s'avère qu'ils sont essentiels pour le développement vasculaire placentaire (214). Les récepteurs alpha 2A semblent être prédominant, dans le cortex cérébral (215, 216). Ils sont particulièrement abondants dans le locus coeruleus, où ils agissent comme des autorécepteurs présynaptiques et somato-dendritique (217). Ceci est d'accord avec ce qui a été observé pour l'ARNm, présent en concentration élevée dans le locus coeruleus et dans les régions du tronc cérébral impliquées dans la régulation de la pression artérielle (218). L'ARNm codant les α 2A-ARa également été identifié dans le mésencéphale, l'hypothalamus, l'amygdale, plusieurs noyaux du tronc cérébral, l'hippocampe, la moelle épinière, le cortex cérébral, dans le cervelet (219) et le septum (220).

Les adréno-récepteurs alpha 2A sont exprimés également dans la rate, les reins, l'aorte, les poumons, les muscles squelettiques, le cœur et le foie. (**Figure 15**) (221)

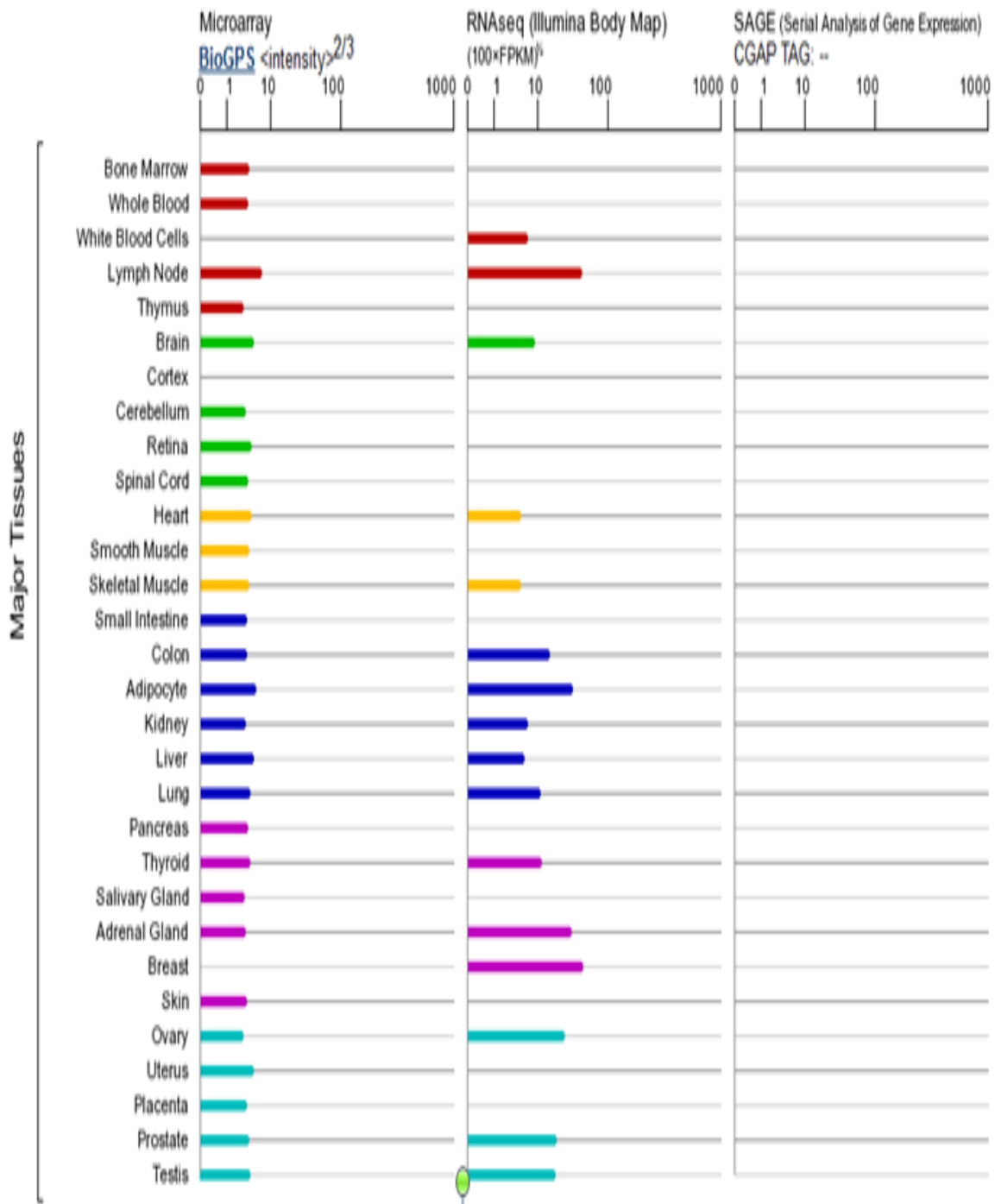


Figure 15a. Expression de ADRA2A dans les tissus humains (intensités normalisées).

(186)

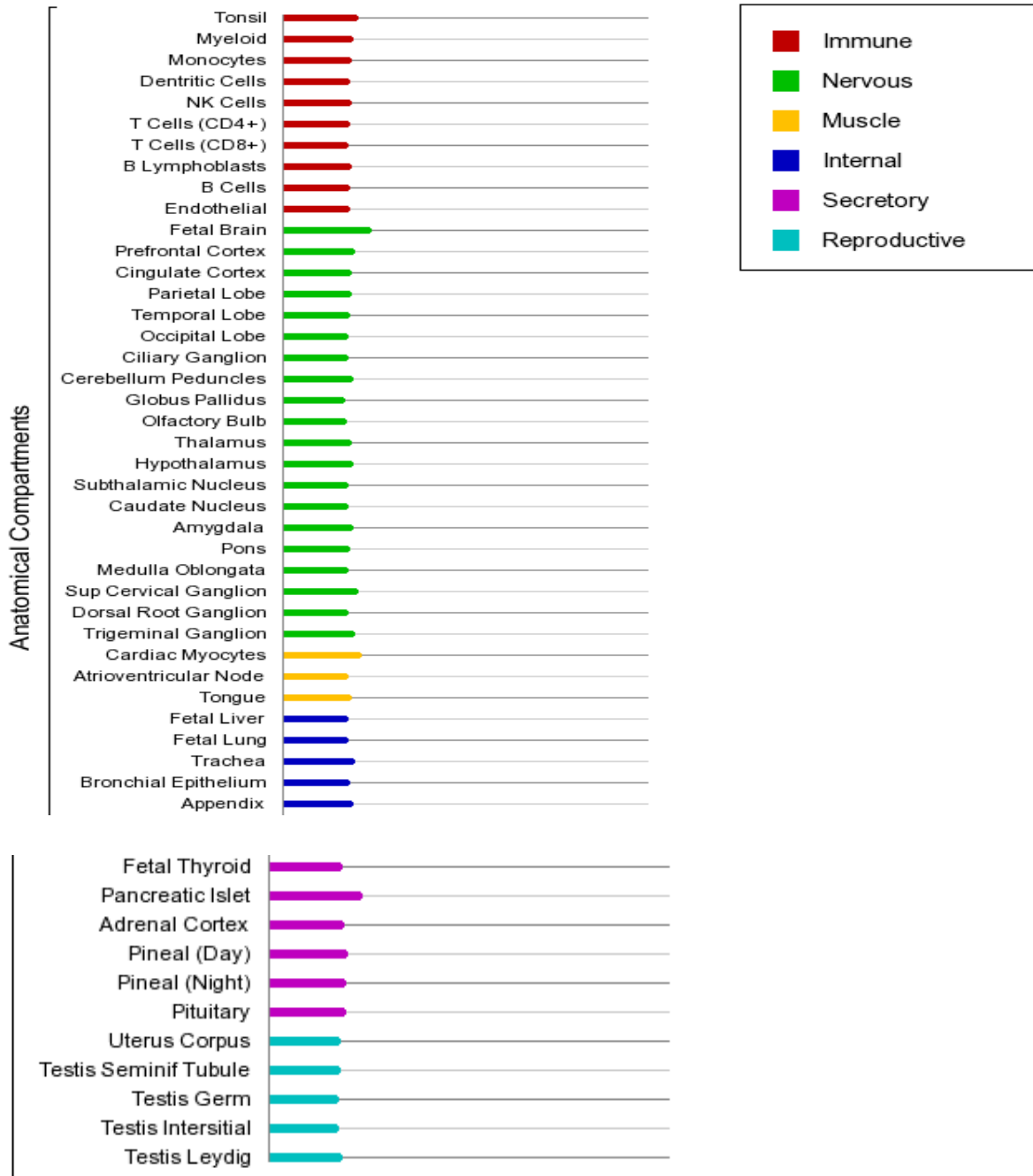


Figure 15b. Expression deADRA2A dans les tissus humains (intensités normalisées).

(186)

II.3.2. Polymorphisme du gène ADRA2A

Comme il a été mentionné dans les paragraphes précédents, les récepteurs adrénérgiques $\alpha 2A$ régulent un très grands nombre de fonctions physiologiques, comprennent l'inhibition présynaptique de neurotransmetteur, l'inhibition et la stimulation de postsynaptique des voies de signalisation du système nerveux central, l'inhibition de la lipolyse dans les adipocytes, la

CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

stimulation de l'agrégation plaquettaire, et l'inhibition de la sécrétion d'insuline à partir de cellules pancréatiques (10) Des phénotypes à caractère familial et des variabilités ethniques sont observés dans un certain nombre de maladies associées à des aberrations des réponses physiologiques précédentes, y compris l'insuffisance cardiaque, l'hypertension, et l'obésité (149, 222, 223). En outre, il existe une vaste variabilité interindividuelle vis-à-vis du degré du risque, de la progression et la réponse au traitement dans ces maladies complexes (224) Ces observations suggèrent l'implication de polymorphismes affectant la transduction du signal adrénergique et de ce fait pourrait être responsable de modifier la susceptibilité aux maladies. En suivant ces hypothèses Kersten M. Small et son équipe ont réalisé une étude détaillée dont le but est l'identification des divers polymorphismes, l'haplotype associé, et l'impact sur l'expression du gène ADRA2A chez différents groupes ethniques (225).

L'étude est basée sur le reséquençage de la totalité du gène ADRA2A à partir d'ADN appartenant à plusieurs groupes ethniques. 16 SNPs distribués dans 17 haplotypes différents et regroupés en deux clades phylogénétiques ont été identifiés. Les figures 16, 17 et les tables (5,6) suivants résument ces résultats.

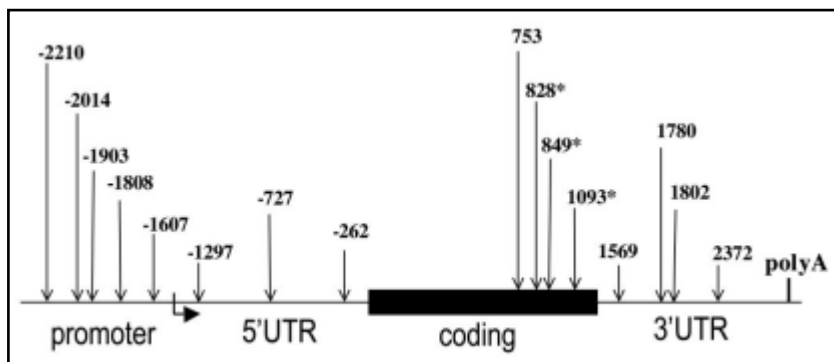


Figure 16. Organisation et localisation des polymorphismes du gène ADRA2A humain. Indiquées : le promoteur 5'UTR, région codante, 3'UTR, et la position de nucléotide du polymorphisme. +1 est l'adénine de la méthionine d'initiation. * : codage Synonyme. (225)

Le premier nucléotide de l'ORF est numéroté nucléotide 1 (qui correspond au nucléotide 2524 de la séquence de référence) avec l'extrémité 5'UTR commençant par le nucléotide 1 et continuant dans la direction opposée (négative). Les polymorphismes identifiés par reséquençage correspondent à une simple substitution nucléotidique. Au total, il y avait 16SNP: cinq dans le promoteur, trois dans l'extrémité 5'UTR, quatre dans la région codante et quatre dans l'extrémité 3'UTR. Le SNP en position 753a été décrit précédemment. C'est la

CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

substitution Asn 251 Lys situé dans la troisième boucle intracellulaire de la $\alpha 2A$ -AR. Le Lys251 confère une inhibition accrue de l'adénylyl cyclase en favorisant significativement la liaison d'agoniste à la protéine G_i (212)

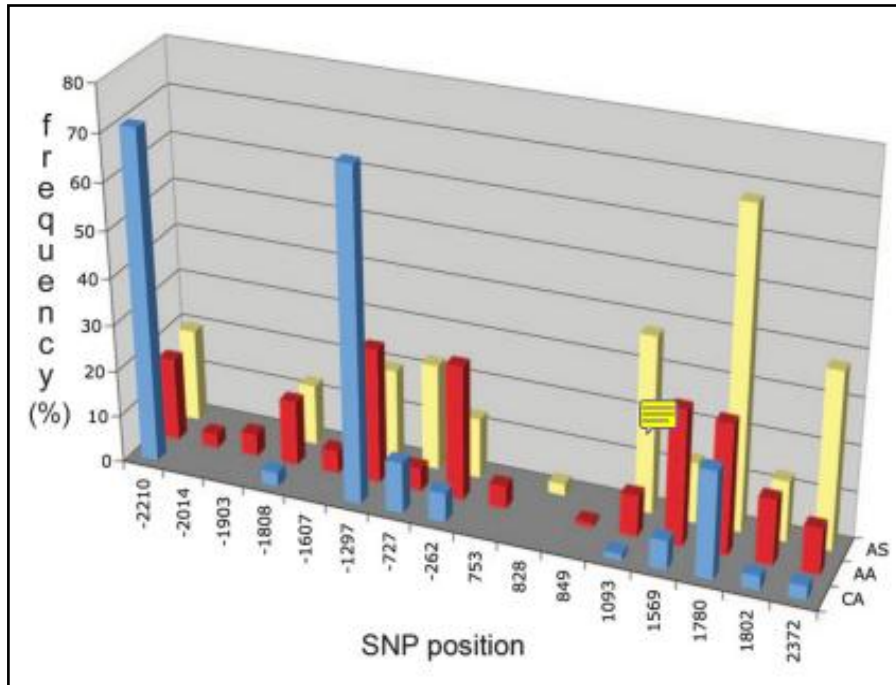


Figure 17. Fréquences des polymorphismes ADRA2A selon les variations ethniques. La position des polymorphismes et les fréquences sont représentées sur les x et y, respectivement, stratifiées par groupe ethnique (axe z). CA, Caucasiens ; Afro-américain; AS, Asiatique. (225)

Il y'a 10 SNPs cosmopolites, étant présent dans les trois groupes ethniques, seulement il existe des différences significatives dans les fréquences alléliques (facilement visualisés par position et groupe ethnique dans la figure 17.

Les SNPs en positions -2210 et -1297 étaient 3 fois plus fréquents chez les Caucasiens par rapport aux deux autres groupes. En effet, chez les Caucasiens. Les allèles T et C présents respectivement dans ces deux positions, sont de loin l'allèle dominant, alors que dans les deux autres groupes ils représentent les allèles mineurs à des fréquences allant de 0,29 à 0,18. De même, les SNPs -727, 1 093, 1780, et 2 372 sont plus fréquents chez les Asiatiques, avec le A à la position 1780 étant l'allèle dominant, seulement dans ce groupe ethnique. Le SNP 1,093 est approximativement 20 fois plus fréquent chez les Asiatiques que chez les Caucasiens ainsi que le 1780 qui est 2 à 3 fois plus fréquent dans chez les Asiatiques, par rapport aux Caucasiens et

A Afro-Américains. Cinq SNPs (-2014, -1903, -1607, 753 et 849) sont présent exclusivement chez les Afro-Américains. (Table 6)

Table 6. Polymorphisme du gène ADRA2A humain. (225)

Position	Base*	Minor allele frequency, %		
		CA (n = 80)	AA (n = 80)	AS (n = 40)
-2210	T/A	71	18	20
-2014	C/T	0	3	0
-1903	G/C	0	5	0
-1808	G/T	3	14	13
-1607	C/G	0	5	0
-1297	C/G	71	29	20
-727	C/G	11	5	23
-262	G/A	6.3	29	13
753	C/G	0	5	0
828	C/T	0	0	2.5
849	C/G	0	1	0
1093	C/A	1.3	8.8	38
1569	C/A	6.3	29	13
1780	G/A	23	28	68
1802	C/A	3	14	13
2372	A/G	3	10	38

La position du polymorphisme est représentée en se basant sur le fait que l'adénine= +1. ; n : nombre de chromosomes génotypés. CA, caucasien; AA, afro-américaine; AS, Asiatique. *La première base de la paire allélique est la plus fréquente dans la population totale.

➤ **Les polymorphismes du gène ADRA2A sont organisés en multiples haplotypes distincts.**

Les 16 SNPs du gène ADRA2A sont présent dans 17 haplotypes avec des fréquences alléliques $\geq 1\%$ dans au moins un groupe. Le tableau 6 montre les fréquences de ces haplotypes stratifiées par groupe ethnique. Il existe cinq haplotypes cosmopolites [2, 4, 9, 13 et 16], huit haplotypes spécifiques aux Afro-Américains, et deux Haplotypes spécifiques aux Asiatiques. Les Afro-Américains comportent la plus grande variation haplotypique, avec 15 des 17 haplotypes possibles représentés. Ces haplotypes ont des fréquences allant de ≈ 1 à 16%. En revanche, les Caucasiens et les Asiatiques exposent moins de variation haplotypique. Sept haplotypes différents sont présents chez les Caucasiens, avec l'haplotype 16 étant majoritaire ($\approx 70\%$) et le reste, présente des fréquences situées entre ≈ 1 et 11%. Chez les Asiatiques, les haplotypes 4, 9, et 16 sont présents à des fréquences comprises entre 20% et 35%, quant aux haplotypes 2, 6, et 13 ils sont moins fréquents (fréquence comprise entre $\approx 2\%$ et 8%). Il faut noter que le groupe formé par les haplotypes 1, 3, 5, 7, 8, 10, 11, 14 et 15 représentent 48% des Afro-

CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Américains par rapport à 5% des Caucasiens. Le polymorphisme à la position 753 est présent seulement dans l'haplotype 11.

Table 7. Haplotype du gène ADRA2A. (225)

Haplotype	Promoter region					5' UTR			Coding region				3' UTR				Frequency, %		
	-2210	-2014	-1903	-1808	-1607	-1297	-727	-262	753	828	849	1093	1569	1780	1802	2372	CA	AA	AS
1	T	C	G	G	C	G	C	G	C	C	C	C	C	G	C	A	0	11.25	0
2	T	C	G	G	C	G	C	G	C	C	C	C	C	A	C	A	10	7.5	7.5
3	T	C	G	G	C	G	C	G	C	C	C	C	A	G	C	A	0	1.25	0
4	T	C	G	G	C	G	C	G	C	C	C	A	C	A	C	G	1.25	8.75	35
5	T	C	G	G	C	G	C	G	C	C	G	C	C	A	C	A	0	1.25	0
6	T	C	G	G	C	G	C	G	C	T	C	A	C	A	C	G	0	0	2.5
7	T	C	G	G	C	G	C	A	C	C	C	C	C	G	C	A	0	1.25	0
8	T	C	G	G	C	G	C	A	C	C	C	C	A	G	C	A	3.75	13.75	0
9	T	C	G	G	C	G	G	G	C	C	C	C	C	A	C	A	11.25	5	22.5
10	T	C	G	G	C	C	C	G	C	C	C	C	C	G	C	A	0	6.25	0
11	T	C	G	G	C	C	C	G	G	C	C	C	C	G	C	A	0	5	0
12	T	C	G	T	C	G	C	A	C	C	C	C	C	G	A	A	0	0	5
13	T	C	G	T	C	G	C	A	C	C	C	C	A	G	A	A	2.5	13.75	7.5
14	T	C	C	G	G	G	C	G	C	C	C	C	C	A	C	A	0	5	0
15	T	T	G	G	C	G	C	G	C	C	C	C	C	G	C	A	0	2.5	0
16	A	C	G	G	C	C	C	G	C	C	C	C	C	G	C	A	70	16.25	20
17	A	C	G	G	C	C	C	G	C	C	C	C	C	G	C	G	1.25	1.25	0

CA, Caucasian; AA, African American; AS, Asian.

Une autre étude a identifié une délétion au sein des récepteurs $\alpha 2A$ (226). Cette délétion est située dans le troisième domaine cytoplasmique du récepteur $\alpha 2A$ -adrénergique, c'est l'élimination des acides aminés 255±260 (Pro-Glu-Arg-Ser-Ala-Gly). Il n'est pas connu si ces délétions ont un impact sur la fonction du récepteur.

II.3.3. Maladies qui ont été associées aux récepteurs adrénérergiques $\alpha 2A$

Les récepteurs adrénérergiques sont la cible de nombreux médicaments traitant diverses maladies et certains paramètres physiologiques tels que l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque, les maladies psychiatriques et neurologiques, l'asthme, la dépression, le glaucome, et la douleur (165, 227). Dans ce qui suit, on donnera l'exemple de certaines maladies liées aux récepteurs adrénérergiques

a. Le syndrome de l'intestin irritable (SII) « Irritable Bowel Syndrome »

Le syndrome de l'intestin irritable est un trouble gastro-intestinal fréquent, associé à une altération des fonctions gastro-intestinales, et une sensibilité viscérale (228). Les symptômes cliniques comprennent des douleurs abdominales, un inconfort, des ballonnements, diarrhée ou constipation et une alternance entre diarrhée et constipation. Le SII affecte environ 15% de

la population adulte (229, 230). Il a été démontré que des agents adrénergiques modifient la fonction motrice et sensorielle du tractus gastro-intestinal humain (231, 232). Ces résultats ont menés à l'identification d'une association significative entre le polymorphisme $\alpha 2A-1291 C > G$ et le SII faisant en sorte que le gène ADRA2A soit un candidat potentiel impliqué dans la physiopathologie du SII. (197)

b. Syndrome des lésions pulmonaires aiguës et le syndrome du stress respiratoire aiguë

Le syndrome des lésions pulmonaires aiguës (ALI : acute lung injury) et le syndrome du stress respiratoire aiguë (SDRA : pour acute respiratory distress syndrome) sont des troubles complexes dus à une sévère réponse inflammatoire dans les poumons avec un taux de mortalité très élevé. Ils sont caractérisés par l'accumulation des neutrophiles, un œdème interstitiel, la perturbation de l'intégrité des cellules épithéliales, et la fuite de protéines dans l'espace alvéolaire et des altérations graves des échanges gazeux. (233) Malgré les progrès récents en soins intensifs, la mortalité reste très élevée de 36,2% à 44% des cas. (234)

Des études ont démontré que la sur-activation du récepteur adrénergique $\alpha 2A-AR$ sur les cellules inflammatoires pourrait être impliquée dans le processus de ces deux syndromes et qu'ils sont étroitement liés à la réponse inflammatoire (235,236). Il a été rapporté aussi que l'utilisation d'antagonistes de ces récepteurs tel que la Yohimbine avait des effets thérapeutiques très significatifs. (213)

c. Trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité

Le trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité (TDAH) est caractérisé par une triade de symptômes : l'inattention, l'hyperactivité et l'impulsivité. (237) Ce dysfonctionnement est fortement héritable et touche de 3 à 5% des enfants d'âge scolaire. (238, 239) Plusieurs études ont démontrées l'association d'un SNP (-1291 C→G) du gène ADRA2A avec le trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité. (240,241, 242, 243, 244, 245)

d. La schizophrénie

La schizophrénie est un trouble mental sévère et chronique appartenant à la classe des troubles psychotiques. Ce trouble apparaît généralement au début de l'âge adulte et affecte environ 0.85 % de la population. (246) Comme les autres psychoses, la schizophrénie se manifeste par

une perte de contact avec la réalité. Les symptômes les plus fréquents en sont une altération du processus sensoriel (hallucination) et du fonctionnement de la pensée (délire). (247)

En 2012, une étude publiée dans le Journal «Psychiatry Research» menée sur plusieurs gènes y compris ADRA2A, a identifiée une relation entre le gène ADRA2A et le risque de schizophrénie. (248)

e. Hypertension artérielle, dépression et suicide

L'hypertension artérielle résulte rarement de la transmission d'un gène anormal chez l'homme. Cette maladie est habituellement provoquée par un certain nombre de traits indépendamment hérités, codés chacun par un gène individuel et qui, une fois combinés contribuent à la résistance vasculaire. En outre, l'environnement peut affecter l'expression de ces traits hérités. En raison de la difficulté d'identification du rôle de ces gènes et de l'environnement dans le développement de l'hypertension artérielle, les investigateurs étudient souvent « des phénotypes intermédiaires » Ces traits séparés résultent de l'expression biochimique et physiologique des mutations dans les gènes dont seuls les produits n'altèrent pas la tension artérielle, mais une fois combinés à d'autres forces environnementales ou épistatiques, avec le temps, conduisent à une tension artérielle élevée. (249)

L'augmentation de la tension artérielle en réponse à un certain nombre de paramètres physiologiques et psychologiques a été rapportée non seulement chez des animaux de laboratoires et les patients présentant de l'hypertension mais également chez les individus en bonne santé qui ont des antécédents familiaux, par conséquent il existe des preuves d'une prédisposition génétique à l'hypertension. (250, 251, 252, 253).

D'une autre part, il existe une évidence que les α_2 -Ars du système nerveux central affectent les voies sympathiques du tonus au niveau du cœur et les vaisseaux sanguins. La clonidine, un agoniste α_2 -Ars, cause une hypotension et une bradycardie une fois administré directement dans les ventricules cérébraux, et réciproquement l'administration de la yohimbine, antagoniste α_2 -Ars, augmente la tension artérielle, la fréquence cardiaque et l'activité sympathique *in vitro*. (254, 255).

La dépression est une maladie chronique qui affecte jusqu'à 20% de la population dans le monde entier (256). Bien que l'origine physiopathologique de cette maladie demeure peu

claire, l'hypothèse monaminergique de la dépression suggère que cette dernière soit associée à une insuffisance des monoamines du cerveau telle que la 5- hydroxytryptamine, (5-HT), et la noradrénaline (NA) (257). Ainsi, les antidépresseurs actuellement utilisés exercent leur effet en augmentant la disponibilité de ces monoamines. Proposé il y'a 30 ans, l'hypothèse des catécholamines dans la dépression suggère que, cette dernière est associée à une réduction des fonctions noradrénergiques au niveau d'importants récepteurs adrénergiques dans le cerveau (258, 259). En conséquence, on a pensé que l'effet inhibiteur presynaptique des récepteurs alpha 2 adrénergiques peut expliquer la diminution de la neurotransmission des catécholamines (260). Récemment, l'hypothèse originale de l'épuisement des catécholamines dans la dépression majeure a été reformulée dans «l'hypothèse de dérèglement" de la dépression, qui met l'accent sur une hypo sensibilité primaire ou régulation négative au niveau du nerf terminal des récepteurs α_2 - ARs (261).

Caroline Muguruza et al., ont caractérisé trois nouveaux dérivés aromatiques synthétique de guanidine et 2-aminoimidazoline (8b, 17bet20b) comme antagonistes α_2 -adrénergiques qui sont en mesure d'augmenter la concentration extracellulaire de la noradrénaline dans le cerveau de rat. Ces résultats suggèrent que ces nouveaux antagonistes α_2 -adrénergiques synthétisés peuvent être utilisés comme antidépresseurs potentiels. (260)

D'un autre coté, la dépression majeure est associée à la régulation positive des récepteurs α_2A adrénergiques dans le tissu cérébral et les plaquettes sanguines. Le règlement homologue de ces récepteurs par des kinases de récepteurs couplées aux protéines G (GRK) pourrait jouer un rôle important dans la pathogenèse et le traitement de la dépression. (262)

En effet, ces suggestions ont été renforcées par les résultats des études menées par Michael Maes et al. qui ont trouvé que la dépression majeure est accompagnée par une diminution de la densité des plaquettes α_2 -AR (263)

Les enquêtes menées sur la densité des α_2AAR dans le trouble dépressif majeur MDD (*Major depressive disorder*) ont révélé des résultats contradictoires dans la littérature. Alors que certaines études ont mis en évidence une augmentation dans cette densité α_2AAR dans le MDD en comparaison avec les témoins (264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277) d'autres en revanche ont démontré des résultats contradictoires (278, 279, 280, 281, 282,283, 284, 285, 286, 287, 288, 289,290)

Le suicide est un problème de santé publique important qui est considéré comme le résultat de l'interaction de différents facteurs de susceptibilité. Des modifications dans le système noradrénergique ont été observées dans des études du cerveau post-mortem des victimes de suicide par rapport aux témoins. Ils suggèrent que la variation au niveau du gène du récepteur adrénergique A2a peut jouer un rôle dans un petit nombre de cas de suicide. (291)

En effet, la grande majorité des études de neurorécepteurs biochimiques dans le suicide ont porté sur les modifications du cerveau post-mortem β -adrénergiques (292, 24, 293, 294), α 1/ α 2-adrénergiques (264, 293, 295, 296) ou les récepteurs de la sérotonine (292, 293, 297, 298, 299)

Des tendances suicidaires ont été également associées à rs11195419, un SNP dans le gène du récepteur alpha2A-adrénergiques (ADRA2A) (300).

f. Obésité et syndrome métabolique

L'obésité est reconnue comme maladie chronique en 1997 par l'OMS. Cette organisation définit « le surpoids et l'obésité comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé ». Cette prise de poids indésirable résulte le plus souvent d'un excès d'apport et/ou d'une diminution des dépenses énergétiques (301). Le principal indicateur de mesure utilisé est **l'indice de masse corporelle** (IMC). Pour les adultes, l'indice de masse corporelle est égal à la masse (exprimée en kilogrammes) divisée par le carré de la taille de la personne (en mètre) :

$$\text{IMC} = \frac{\text{Masse}}{\text{Taille}^2}$$

- Un IMC entre 18,5 et 25 est considéré comme normal chez un adulte.
- Entre 25 à 30, on parle de surpoids (surcharge pondérale).
- Au-delà de 30, on parle d'obésité.
- De 35 à 40, on parle d'obésité sévère et, au-delà de 40, d'obésité morbide.

On peut aussi déterminer l'adiposité d'un individu en mesurant simplement le tour de taille ou en calculant le ratio tour de taille/tour de hanches (302, 303). Ici aussi, la mesure ne permet pas de caractériser avec précision la localisation des dépôts adipeux mais renseigne plutôt sur un développement anormal du tissu adipeux. Il est bien admis que l'obésité conduit généralement

mais pas dans tous les cas à des altérations métaboliques, y compris l'hyperinsulinémie et la résistance à l'insuline (21), qui peut conduire au développement de diabète de type 2, de maladies cardiovasculaires et certaines formes de cancer (304, 305). Bien que rare, l'obésité peut être causée par des mutations de gènes uniques. Cependant, la plus grande proportion de l'obésité est due à des variantes de gènes multiples qui interagissent avec des facteurs de l'environnement en particulier l'alimentation (306, 307). Rappelons que l'activation des récepteurs β -adrénergiques (ADRBs) exprimée dans les adipocytes stimule la lipolyse (304, 308, 309) alors que l'activation des récepteurs α_2 adrénergiques (ADRA2) inhibe la lipolyse. Figure 18. (310)

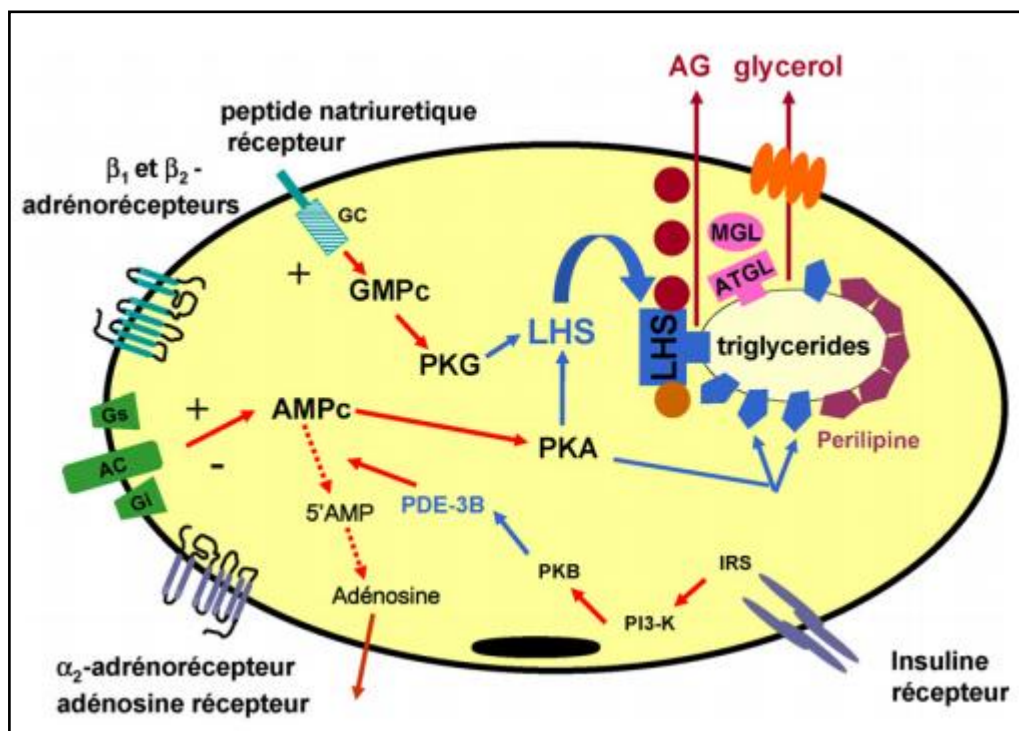


Figure 18. Contrôle de la lipolyse adipocytaire.

AC : adénylyl cyclase ; GC : guanélylyl cyclase ; AG : acides gras ; LHS : lipase hormono sensible ; ATGL : triglycéride lipase adipocytaire ; MGL : monoglycéride lipase ; PKA, PKB et PKG : protéines kinases A, B et G ; PDE-3B phosphodiesterase-3B ; PI3-K : phosphatidyl inositol 3-kinase ; IRS : *insulin receptor substrate*. (311)

D'un autre côté, les 20 dernières années ont été marquées par l'apparition d'un concept nouveau appelé syndrome métabolique. Cette condition est caractérisée par un ensemble de facteurs de risque de développer une maladie cardiovasculaire et/ou un diabète de type 2, incluant l'obésité abdominale, les dyslipidémies athérogènes, l'hypertension artérielle et l'insulino résistance. D'autres anomalies peuvent également être présentes, notamment un état pro-inflammatoire ou encore un état pro-thrombotique, une dysfonction endothéliale, une

microalbuminurie, une stéatose hépatique ou un stress oxydatif élevé (312, 313) Associé à un risque accru de diabète et de maladies cardiovasculaires, le syndrome métabolique est désormais considéré comme l'un des plus importants problèmes de santé publique de notre époque. Bien que multifactorielle, les causes les plus souvent évoquées pour expliquer l'émergence de l'obésité/syndrome métabolique sont une prédisposition génétique associée à un mode de vie « inadapté », où les erreurs alimentaires occupent une place majeure, et où l'inactivité physique s'inscrit dans nos habitudes journalières.

Plusieurs études ont montré la relation entre le gène ADRA2A et l'obésité et/ou le syndrome métabolique :

- **John J. Lima** et al (2007) ont identifiées que des interactions entre le polymorphisme C-1291G (rs1800544) du gène ADRA2A et le polymorphisme Gln27→Glu du gène ADRB2, avaient une forte relation avec l'obésité chez des Afro-Américains. Il existe aussi une relation entre obésité et l'interaction du polymorphisme (ADRA2A) C-1291G avec le gène β_1 adrénergique (ADBR1) chez des sujets de race blanche. Enfin il a été démontré que les polymorphismes des gènes adrénergiques pouvaient être des loci important de susceptibilité à l'obésité et aux altérations métaboliques. (314)
- Ukkola O et al 2001, dans une étude québécoise ont mis en évidence la relation d'un variant du gène ADRA2A le « Dral »(qui correspond au SNP rs553668) et l'accumulation de graisse abdominal. (315)

Il faut noter que la susceptibilité génétique du gène ADRA2A avec l'obésité a seulement été étudiée dans un nombre limité de personnes.

g. Diabète de type 2

Le diabète est défini par l'Association Américaine du Diabète (ADA pour *American Diabetes Association*) comme étant « un groupe de maladies métaboliques caractérisé par une hyperglycémie résultant de dysfonctionnements de la sécrétion d'insuline par les cellules beta pancréatiques, dans l'action de l'insuline ou des deux. L'hyperglycémie chronique s'associe à long terme à des dommages touchant divers organes incluant plus particulièrement les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins » (316).

Le DT2 (diabète non insulino-dépendant) est une pathologie complexe et multifactorielle (317, 318). On parle aussi de maladie polygénique : la survenue d'un DT2 commun (autour de l'âge de 65 ans en moyenne) dépend d'une forte composante environnementale (incarnée par une inactivité physique, une nourriture riche en graisse, le vieillissement, des événements durant la vie fœtale et à la naissance...) interagissant avec un large spectre de variants génétiques situés dans des loci de susceptibilité au DT2 incluant ou non des gènes. Les contributions relatives des variants génétiques et de l'environnement diffèrent considérablement d'un individu à un autre même s'ils ont des phénotypes cliniques très similaires (318). Quoiqu'il en soit, l'obésité reste le facteur de risque principal du DT2. Environ 70% des individus atteints de DT2 sont manifestement obèses au moment du diagnostic, avec le plus souvent une accumulation de graisse au sein et autour de la cavité abdominale. Mais il est important de noter que plus de 50% des personnes obèses ne sont pas atteintes de diabète et qu'un nombre non négligeable de personnes atteintes de DT2 a un indice de masse corporelle (IMC) tout à fait normal. Ainsi un DT2 ne peut être seulement expliqué par l'obésité (318).

Plusieurs facteurs hormonaux et nerveux contrôlent la sécrétion de l'insuline (figure 19) et la stimulation de la libération d'insuline par le glucose implique :

- Pénétration du glucose dans la cellule β par l'intermédiaire d'un transporteur spécifique (isoforme GLUT-2 chez les rongeurs et GLUT-1 chez l'homme).
- Le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate par la glucokinase (considérée, par certains auteurs, comme le « détecteur du glucose » ou *glucose sensor*).
- Une fois phosphorylé, le glucose est utilisé principalement par la voie de la glycolyse et de la respiration oxydative.
- Le métabolisme du glucose dans la cellule β est à l'origine d'une production accrue de protons, d'équivalents réduits (NADH, NADPH, glutathion réduit) et surtout d'intermédiaires phosphorylés à haute énergie (ATP).
- La génération d'ATP conduit à l'inactivation des canaux K^+ /ATP, entraînant une dépolarisation membranaire et l'ouverture de canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, aboutissant finalement à l'augmentation massive de la concentration cytosolique de Ca^{2+} .
- Stimulation de l'exocytose des grains de sécrétion d'insuline. (319)

L'activation des récepteurs α_2 adrénergiques conduit à l'effet inverse, c'est-à-dire l'inhibition de la sécrétion d'insuline. En effet ces récepteurs exprimés dans les cellules bêta pancréatiques, provoquent une polarisation provenant essentiellement du courant sortant d'ions K^+ , en particulier, du canal K^+ dit canal dépendant de l'ATP. (319)

Il a été démontré que la surexpression du gène ADRA2A contribue à une hyperglycémie. (17, 272)

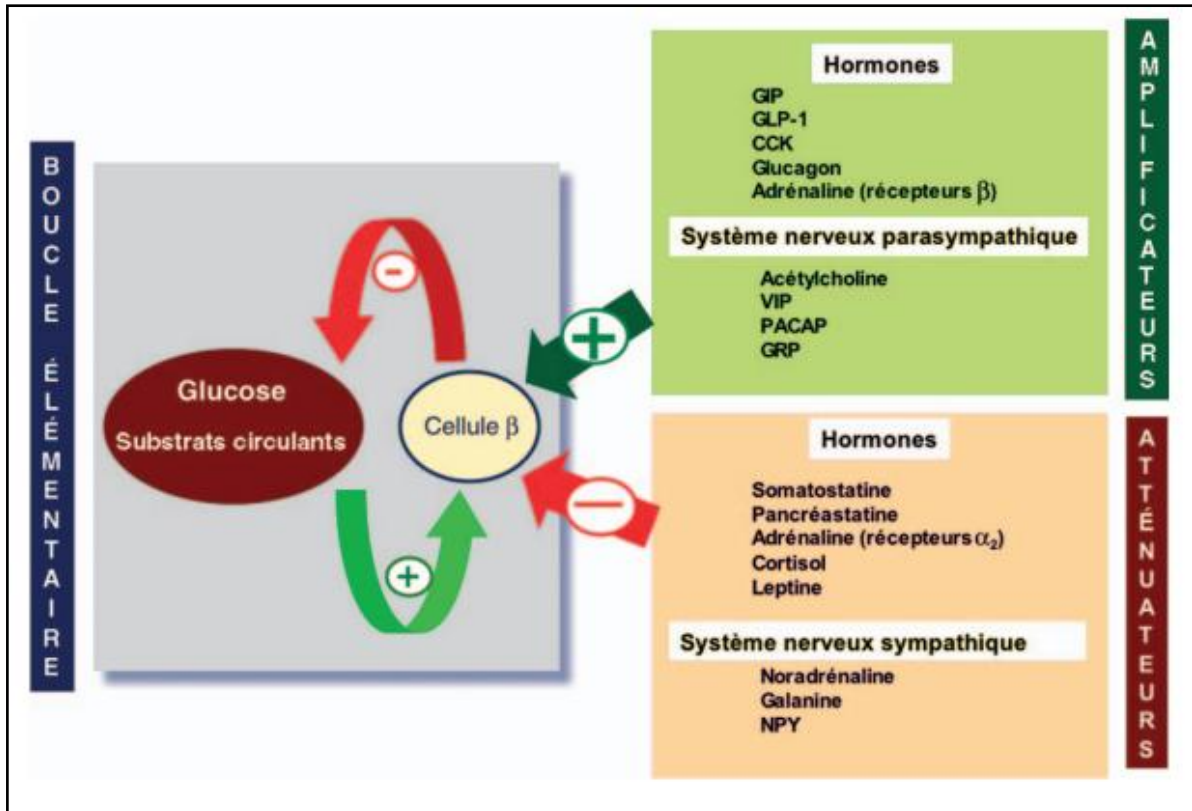


Figure 19. Principaux facteurs humoraux et nerveux de contrôle de la sécrétion d'insuline.

PACAP : pituitary adenylate cyclase activating polypeptide ; VIP : vasoactive intestinal peptide ; GRP : gastrin releasing peptide ; GIP : gastric inhibitory polypeptide ; GLP-1 : glucagon like peptide-1 ; CCK : cholécystokinine ; NPY : neuro peptide Y. (321)

La relation entre ADRA2A et le diabète de type 2 a été observée dans plusieurs études y compris sur des modèles murins de cellules bêta pancréatiques, surexprimant des récepteurs α_2 adrénergiques et qui présentent une intolérance au glucose (320), tandis que des souris génétiquement modifiées pour ne plus exprimer ces récepteurs amélioraient le mécanisme de sécrétion d'insuline (322) prouvant que le gène ADRA2A est un gène candidat pour le diabète de type 2. (17)

Traduisant ces résultats en études sur des populations humaines *Rosengren et al.* ont prouvé l'association du polymorphisme (rs553668) du gène ADRA2A avec une sécrétion modérée d'insuline et un risque très élevé de DT2, (17, 18, 323)

Ces résultats étaient renforcés par ceux observés chez une population suédoise de 1 177 individus. Cette étude cas-témoins comprenait un génotypage qui a été effectué sur des sujets minces et obèses ayant une tolérance normale au glucose (NGT) et des sujets diabétiques DT2. L'expression de l'ARNm du gène ADRA2A a été mesurée dans des îlots pancréatiques isolés de ces individus où l'association de rs553668 à l'obésité et au diabète de type 2 a pu être démontrée. (324)

Un autre polymorphisme du gène ADRA2A, le rs10885122, est associé avec une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, et une grave hyperglycémie à jeun. (325, 326, 327)

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE
THESE

III. Objectifs du travail de thèse

III.1. Contexte de la thèse

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme (328, 329). Sa prise en charge thérapeutique est orientée par une classification classique clinique et anatomopathologique (TNM). Cependant, l'existence d'une divergence pronostic et d'une différence dans la réponse au même traitement chez des patientes appartenant au même groupe a montré la nécessité de nouveaux marqueurs pronostiques. Les plus utilisés actuellement sont des marqueurs moléculaires: récepteurs hormonaux à l'estradiol (RE) et à la progestérone (RP) (330) ou récepteur HER2 (69, 331) ou bien des marqueurs génétiques comme les mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 (332). Certains de ces marqueurs permettent non seulement de se prononcer sur le pronostic (288, 289) mais aussi d'utiliser des traitements adjuvants ciblés (traitement anti-hormonal) (333, 334) ou anticorps anti-HER2 (334). Cependant, ces marqueurs ne sont pas toujours fiables. Ceci s'expliquerait par le fait que le cancer du sein soit une maladie multifactorielle. La recherche de nouveaux marqueurs pronostiques reste donc indispensable.

Le récepteur adrénergique alpha2A participe classiquement à la régulation des systèmes cardiovasculaires et respiratoires. Actuellement, de plus en plus de données nous ont permis de penser à un éventuel rôle de ce récepteur dans le cancer du sein: des liens indirectes existent entre, d'une part, ce récepteur avec le cancer du sein, l'obésité ou le diabète de type 2, et d'autre part, entre le cancer du sein et l'obésité ou le diabète de type 2.

Il est donc justifié de rechercher une association entre des SNP fonctionnels du gène ADRA2A et le cancer du sein.

Des liens indirects existent entre le cancer du sein, le récepteur adrénergique alpha2A (ADRA2A) et un ensemble de troubles métaboliques (diabète, insulino-résistance et obésité).

Ainsi, ADRA2A a été retrouvé sur des lignées de cellules cancéreuses du sein, et son activation augmente la prolifération de ces cellules (23). De plus, il participe à l'effet mitogène des catécholestrogènes (métabolites des oestrogènes) sur ces mêmes lignées (26) d'un modèle murin de tumeurs mammaires a montré que les agonistes d'ADRA2A entraînent une augmentation de la taille tumorale, contrairement à ses antagonistes (25).

CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

D'un autre côté, le polymorphisme d'un SNP (G1780A (3'UT, rs553668)) du gène ADRA2A chez l'Homme a été associé avec l'obésité (12). Et plus récemment, ADRA2A a été impliqué dans la physiopathologie du diabète type 2 (17) : dans un modèle de rats diabétiques ayant une faible sécrétion d'insuline, le gène ADRA2A est significativement surexprimé et les antagonistes du récepteur ADRA2A permettent d'augmenter la sécrétion d'insuline. L'étude du polymorphisme de 19 SNPs du gène ADRA2A chez l'Homme a montré l'association du SNP rs553668 avec une diminution de la sécrétion d'insuline et un haut risque de développer un diabète de type 2.

Plusieurs autres études ont montré un lien entre, d'un côté, le cancer du sein et, d'un autre côté, l'obésité, le diabète ou la résistance à l'insuline. Les mécanismes moléculaires impliqués comprennent l'insuline, le récepteur de l'IGF, mTOR et l'AMPK. Ceci a conduit à des essais cliniques portant sur plusieurs thérapies ciblées dont la Metformine, un ancien traitement du diabète de type 2 (335).

Toutes ces données nous ont laissés penser à une éventuelle association entre un polymorphisme du gène ADRA2A et le cancer du sein. Et comme on peut le constater, le lien entre le cancer du sein et l'ADRA2a n'a été exploré que sur des lignées cellulaires ou chez des souris. La présente étude portant sur cette éventuelle association sera donc la première étude à être réalisée chez l'Homme.

Le choix des SNP à étudier a été basé sur leur implication fonctionnelle. Le gène ADRA2A est un gène dépourvu d'introns localisé sur le chromosome 10q24-q26 (336, 337).

Le SNP C-1291G (rs1800544) est localisé sur le promoteur de ce gène, il serait donc fortement sujet à modifier l'expression de ce dernier. Il a été associé avec l'absence d'inhibition de la sécrétion de cortisol salivaire en réponse à la dexaméthasone ainsi qu'avec l'hyperglycémie à jeun (338)

D'un autre côté, cet SNP a été significativement associé à la susceptibilité au suicide chez les femmes japonaises (339).

Quant au SNP G1780A (rs553668), il est localisé sur la partie 3'UTR du gène ADRA2A. Il a été significativement associé à la réponse adrénérgique au stress chez les sujets sains (340), à la diminution du volume gastrique post-prandial, un composant du phénotype intermédiaire de

la satiété et de l'obésité (341), à l'obésité (342) à une diminution de la sécrétion d'insuline et un haut risque de développer un diabète de type 2 (17) ainsi qu'au déficit de l'attention avec hyperactivité chez l'enfant (120)

Toutes ces données sont autant de preuves du caractère fonctionnel des deux SNP choisis pour faire cette étude.

III.2.Objectifs du travail de thèse

Elaboration d'une étude épidémiologique de type cas-témoin comparant les génotypes de femmes atteintes de cancer du sein et de femmes saines afin de rechercher une éventuelle association des SNP étudiés avec la survenue de la maladie: **Recherche de marqueur de susceptibilité au cancer du sein**. L'étude vise de plus, l'établissement d'une étude statistique étudiant le lien éventuel des marqueurs classiques de gravité de la maladie avec les génotypes retrouvés: **Recherche de marqueur pronostique du cancer du sein**.

I. Sujets, matériels et **méthodes**

I. Sujets, matériels et méthodes

1. Sujets et matériels

1.1. Patientes et témoins

Cette étude, a porté sur une série de 102 femmes saines et 102 femmes algériennes atteintes de cancer du sein diagnostiqué au Centre Anti-Cancer de Batna entre septembre 2012 et juin 2014. La majorité des femmes saines ont été recrutées au niveau du centre de transfusion sanguine de Batna.

Tous les cas étudiés dans ce travail (patientes et témoins) ont été choisies de la même population (Wilaya de Batna). Un consentement écrit et éclairé a été demandé à chacune d'entre elles, afin de prendre toutes les précautions nécessaires pour protéger les informations personnelles et médicales de ces participantes. Ces précautions ont été prises en fonction des principes cités dans l'Association médicale mondiale de Déclaration de Helsinki en 1964 et de ses modifications ultérieures.

Le protocole suivant a été appliqué:

1.2. Critères d'inclusion:

1.2.1. Les patientes (les cas):

- Patientes suivies au niveau Centre Anti-Cancer (CAC) de Batna.
- Diagnostiquées pour un cancer du sein selon les données anatomopathologiques ou cytopathologiques.
- Elles constituent des cas prévalent de la maladie (anciens et nouveaux).
- Age: de 18 à 75 ans.

1.2.2. Les témoins:

- Les femmes témoins sont recrutées parmi des donneuses de sang saines
- Elles ne sont pas apparentées entre elles ni avec les malades.
- Elles ne présentent pas d'histoire personnelle ou familiale de cancer de n'importe quel type.
- Elles sont appariées aux patientes par l'âge et l'origine géographique.

1.3. Critères d'exclusion

Sont exclues de l'étude,

- les témoins apparentées entre elles ou avec et les patientes.
- Les patientes apparentées entre elles ou avec et les témoins.
- Les patientes ayant :
 - Un cancer de n'importe quelle autre nature
 - Une altération de l'une des fonctions:
 - cardiaque (fraction d'éjection < 50%, coronaropathie (ECG avec signes d'ischémie et/ou crises d'angor), troubles du rythme cardiaque (ECG)),
 - respiratoire (dyspnée de repos, fibrose pulmonaire à la radio du thorax),
 - rénale (créatinine < 12 mg/dl)
 - ou hépatique (TGO/TGP > 100 UI/l et/ou bilirubine > 2 mg/dl).
 - Des métastases cérébrales.

Ces critères sont nécessaires surtout pour garantir une absence d'interférence avec l'atteinte du pronostic vital due au cancer du sein.

1.4. Le nombre de sujets nécessaire (NSN)

Le NSN a été estimé à 218 (109 cas et 109 témoins). Il a été calculé grâce au logiciel dédié aux études d'épidémiologie-génétique: Quanto¹version 1.2.4, May 2009. Cependant, et pour des raisons de qualité d'ADN extrait, l'étude s'est portée sur une série de 102 cas et 102 témoins.

1.5. Données anatomopathologiques et immuno-histochimiques

Les données concernant l'âge des patientes, le statut ménopausique ont été obtenues par interrogatoire des malades, quant aux caractéristiques anatomo-cliniques: taille de la tumeur, les métastases ganglionnaires et

de Scraff, Bloom et Richardson (SBR) au moment du diagnostic, l'expression des récepteurs de l'estradiol (RE), de la progestérone (RP) et le statut du gène HER2 ; ils sont obtenus du dossier médical des patientes (Table8). Nous avons utilisé ces données pour classer les patients en quatre sous-types moléculaires: luminale-A, B-luminale, Her-2, et basal-like selon Perou et al. (120)

L'index pronostique de Nottingham (**NPI**) a été calculé selon Todd et al. (343) Puis les patientes ont été séparées en trois groupes pronostiques: groupe de bon pronostic GPG (pour Good

Prognostic Group : **NPI \leq 3,4**), groupe de pronostic Modéré **MPG (3,4 <NPI \leq 5,4)** et le groupe de mauvais pronostic PPG (pour Poor Prognostic Group : NPI>5.4) (Table8).

Table 8. Caractéristiques clinico-anatomiques et moléculaire des patientes atteintes de cancer du sein

Paramètres	Patients	Paramètres	Patients
Age, n (%)		Statut ER, n (%)	
≤ 40 ans	21 (19)	Positif	59 (55)
> 40 ans	87 (81)	Négatif	44 (41)
		inconnu	5 (5)
Statut Ménopausique, n (%)		Statut PR, n (%)	
pré ménopausique	59 (55)	Positive	54 (50)
post ménopausique	49 (45)	Négatif	47 (44)
		inconnu	7 (6)
Taille de la tumeur (cm), n (%)		Statut HER2, n (%)	
< 2	11 (10)	Positif	33 (31)
2 to 5	66 (62)	Négatif	69 (64)
> 5	20 (19)	inconnu	6 (6)
inconnu	10 (9)	Sous-type moléculaire, n (%)	
Statut ganglionnaire, n (%)		Luminal-A	45 (42)
Positive	55 (51)	Luminal-B	18 (17)
Négatif	43 (40)	HER2	15 (14)
inconnu	10 (9)	Basal-like	23 (21)
		inconnu	7 (6)
Stage TNM, n (%)		NPI, n (%)	
TNM III-	43 (40)	GPG	8 (7)
TNM III-IV	50 (46)	MPG	59 (53)
inconnu	15 (14)	PPG	24 (22)
Grade SBR, n (%)		inconnu	19 (18)
1	6 (6)		
2	72 (67)		
3	23 (21)		
inconnu	7 (6)		

1.6. Collecte des échantillons

Le sang périphérique des patientes et des témoins a été recueilli lors de chaque interrogatoire. 4 millilitres de sang ont été recueillis dans des tubes BD Vacutainer® K3E avec EDTA (BD, PL6 7BP, UK). L'extraction de l'ADN suivait toujours la collecte de l'échantillon, cependant dans certains cas où il était impossible d'effectuer cette tâche, les tubes étaient conservés à température ambiante 4°C, en une période n'excédant jamais 5 jours.

2. Méthodes

2.1. Extraction de l'ADN

Avant de procéder à l'extraction de l'ADN, nous avons procédé à l'isolation de la couche leucocytaire afin d'obtenir le meilleur rendement possible en ADN vis-à-vis de la qualité et la quantité.

2.1.1. Préparation du Buffy coat

Le volume sanguin recueilli est de 4ml. Tous les tubes ont été soumis à une centrifugation à 3000 rpm/30mn/température ambiante, ce qui a permis d'obtenir 3 fractions différentes:

- la couche claire supérieure=plasma
- la couche intermédiaire=couche leuco-plaquettaire, contenant des leucocytes concentrés;
- la couche inférieure=érythrocytes concentrés.

C'est ainsi que la couche intermédiaire a été celle que nous avons délicatement récupérée.

2.1.2. Purification sur le QIAcube

L'ADN génomique a été extrait à partir de 200µl de Buffy coat en utilisant le QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN, Basel, Switzerland). Sur l'automate QIAcube. Ce dernier consiste en un poste de travail robotique utilisé pour la purification automatisée d'ADN, l'ARN ou des protéines à l'aide de spin-colonnes kits de QIAGEN.

Le QIAcube utilise une technologie avancée pour traiter les kits QIAGEN de purification, permettant une extraction transparente et automatisée, avec un minimum de manipulation d'échantillons. (Figure 22). Aucun changement de la procédure de purification n'est nécessaire, assurant un démarrage rapide et des résultats immédiats. Toutes les étapes de la procédure de purification sont entièrement automatisées, jusqu'à 12 échantillons peuvent être traités par passage. Jusqu'à 50 µg (25-50µg) d'ADN peuvent être extraits à partir de 200µl de Buffy coat.



Figure 20. La purification automatisée de l'ADN. La purification de l'ADN en utilisant le QIAamp DNA Mini kit peut être entièrement automatisé sur le QIAcube. (351)

La purification de l'ADN génomique sur le QIAcube nécessite les réactifs et matériels motionnés en **annexe 1** : la feuille QIAamp® DNA Blood Mini Accessory Sets,

La purification de l'ADN génomique sur le QIAcube suit les mêmes étapes que la procédure manuelle :

- **Une lyse grâce à la protéase** : Une recherche intensive a montré que cette enzyme est optimale pour une utilisation avec le tampon de lyse fourni dans le QIAamp DNA Blood Mini Kit. (figure 23)
- **L'adsorption sur les membranes de silice** : Les conditions de lyse obtenue grâce aux tampons sont ajustées pour permettre une liaison optimale de l'ADN à la Membrane de silice de QIAamp avant que l'échantillon soit chargé sur ces colonnes. l'ADN est adsorbé sur la membrane de silice QIAamp pendant une brève étape de centrifugation. Les solutés et le PH des tampons s'assurent que les protéines et les différents contaminants pouvant inhiber la PCR, ne soient pas retenus sur la membrane QIAamp.,
- **L'élimination des contaminants résiduels** : l'ADN lié à la membrane est lavée dans 2 étapes de centrifugation. L'utilisation de 2 tampons de lavage différents, tampon AW1 et tampon AW2, améliore de manière significative la pureté de l'ADN élue. Les conditions de lavage assurent l'élimination complète de tous contaminants résiduels sans affecter la liaison de l'ADN à la membrane.

- **L'éluion des acides nucléiques purs** : L'ADN purifié et concentré est élué de la colonne dans le tampon AE(10 mM deTrisCl⁻; EDTA0,5mM; pH 9,0) et ensuite conservé à -20 °C.

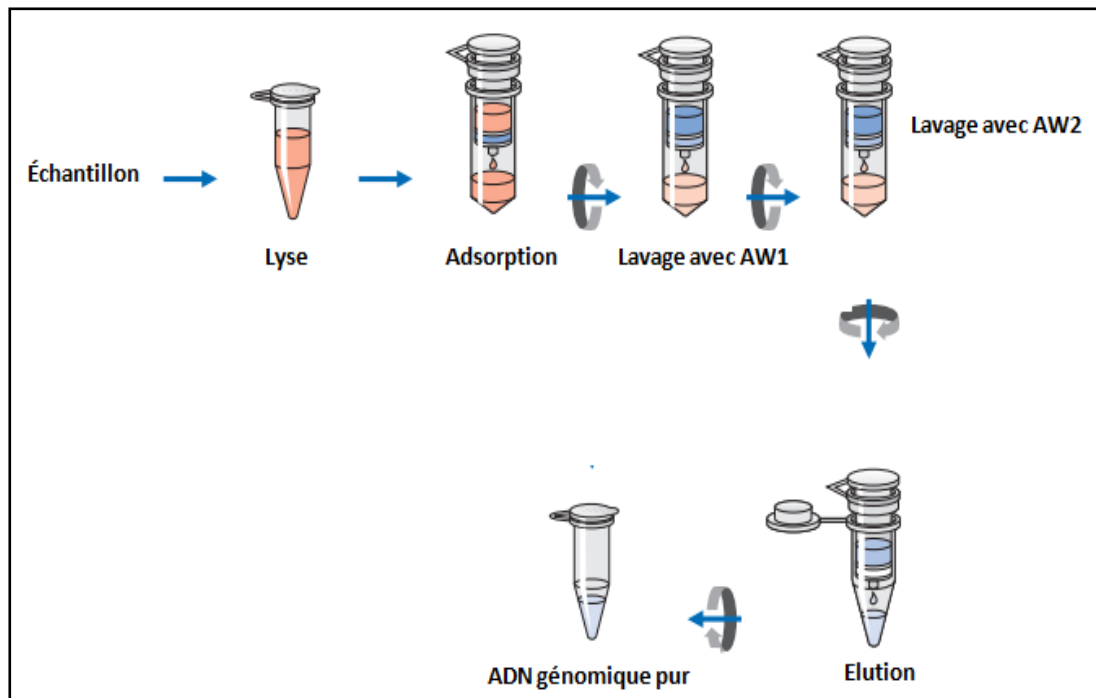


Figure 21. Procédure de purification d'ADN utilisant les colonnes QIAamp

La purification avec l'automate QIAcube suit le protocole suivant (annexe2 : Protocol SHeet) qui correspond brièvement à :

- Pipeter le volume nécessaire de QIAGEN Protéase dans le fond d'un 1,5 ml microtube. Le volume de la protéase est variable en fonction du nombre d'échantillons à purifiés, chaque échantillon nécessite 20 µl de protéase.
- Ajouter 200 µl de buffy coat dans le tube à centrifuger (tube de 1,5 ml), et s'assurer que tous les tampons soient placés correctement dans le QIAcube comme l'indique le manuel d'utilisation. Ces deux premières étapes ont été réalisées manuellement.
- Ajouter 200 µl de Buffer AL et vortexer durant 15 secondes.
- Incubation à 56 ° C pendant 10 min.
- Centrifuger brièvement les tube de 1,5 ml pour récupérer les gouttelettes de l'intérieur du couvercle.
- Ajouter 200 µl d'éthanol (96-100%) à l'échantillon, et mélanger à nouveau avec le vortex pendant 15s.
- Après homogénéisation, centrifuger brièvement les tubes de 1,5 ml pour enlever les gouttes de l'intérieur du couvercle.

- Appliquer soigneusement le mélange de l'étape précédente à la colonne Mini QIAamp (dans un 2 ml tube de collecte) sans mouiller le bord. Fermez le bouchon et centrifuger à 6000 xg (8000 rpm) pendant 1 min. Placer la colonne Mini QIAamp dans un tube propre (fourni) de 2 ml et jeter le tube contenant le filtrat.
- Ouvrir délicatement la colonne Mini QIAamp et ajouter 500 µl de tampon AW1 sans mouiller le bord. Fermez le bouchon et centrifuger à 6000 xg (8000 rpm) pendant 1 min. Placer la colonne QIAamp Mini dans un tube de collecte 2 ml (fourni), et jeter le tube contenant le filtrat.
- Ouvrir délicatement la colonne Mini QIAamp et ajouter 500 µl de tampon AW2 sans mouiller le bord. Fermez le bouchon et centrifuger à pleine vitesse (20 000 x g; 14000 rpm) pendant 3 min.
- Placer la colonne Mini QIAamp dans un tube propre de 1,5 ml et jeter le tube collecteur. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp Mini et ajouter 200 µl de tampon AE. Incuber à température ambiante (15-25 °C) pendant 1 min, puis centrifuger 6000 x g (8000 rpm) pendant 1 min.
- En fin de purification chaque tube contient 100 µl de volume d'élution.

2.2. Analyse de la quantité et de la qualité de l'ADN extrait

L'ADN absorbe la lumière à 260 nm. Cette absorption est proportionnelle à sa concentration. Nous avons mesuré la densité optique à 260 nm et 280 nm pour chaque échantillon à l'aide d'un spectrophotomètre (Bio Photometer 6132, Eppendorf, AG). Le rapport DO₂₆₀ /DO₂₈₀ nm a été établi pour chaque échantillon. Le degré de pureté de l'ADN a été évalué.

2.3. Analyse du polymorphisme du gène *ADRA2A* : Géotypage par PCR en temps réel

2.3.1. Principe

La technique d'amplification de l'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR pour polymerase chain reaction) permet d'amplifier, selon un mode exponentiel, un fragment d'ADN double brin. L'ADN est synthétisé par la polymérase de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* (Taq polymérase) par extension à partir de deux amorces oligonucléotidiques, capables de s'hybrider de part et d'autre de la séquence cible à amplifier, l'une avec le brin sens et l'autre avec le brin anti-sens. (344)

La taille des oligonucléotides utilisés comme amorces est généralement comprise entre 18 et 25 bases. La température utilisée pour l'hybridation des amorces sur la matrice d'ADN est égale à la température de dissociation des brins complémentaires diminuée de 5°C. La température de dissociation est la température à laquelle 50% des molécules d'ADN sont dénaturées par rupture des liaisons hydrogène entre les 2 brins. La réaction de PCR « classique » est réalisée en trois étapes : La première étape implique une dénaturation à température élevée (90 à 96°C) de l'ADN double-brin en simples brins qui serviront de matrice pour la procédure d'amplification. Ensuite, des oligonucléotides enjambant la séquence à amplifier, chacun complémentaire d'un des deux brins d'ADN, sont hybridés à l'ADN matrice à une température qui dépend de la séquence de ces oligonucléotides (37 à 65°C). Synthétisés artificiellement, ces amorces confèrent à la réaction sa spécificité. Leur nature et leur position conditionnent la longueur du segment amplifié et son identité.

La troisième étape est une étape d'élongation de l'ADN à 72°C. Ces cycles thermiques sont réalisés à l'aide d'un thermocycleur qui permet de programmer les différentes températures, la durée de chaque étape et le nombre de cycle (n). Il en résulte à la fin de l'amplification un dédoublement par un facteur de 2^n de la quantité de l'ADN cible.

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique avec pour différence une amplification mesurée non pas en final mais tout au long de la réaction, donc en temps réel. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN alors que la PCR classique ne donne que la mesure finale. (345) Plusieurs systèmes de détection sont utilisés pour la détection ou la quantification du signal fluorescent en temps réel. Ils sont divisés en 2 groupes : les agents intercalants et les sondes. Il existe 4 technologies utilisant des sondes : Taqman ou hydrolyse de sondes, HybProbes (FRET) ou hybridation de 2 sondes, Molecular Beacons ou balises moléculaires et Scorpion ou amorces scorpion. (344)

Notre étude s'est basée sur la technologie utilisant les sondes Taqman, ces sondes sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter), par exemple FAM, et à leur extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher) fluorescent ou non, par exemple

TAMRA, qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité. Au cours de la PCR, si la sonde est hybridée sur sa cible, elle est hydrolysée par l'ADN polymérase. Le reporter ainsi séparé du quencher émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées, mesurable au moment de l'élongation. La spécificité de la réaction est liée à la fois à celle des amorces et à celle de la sonde réduisant significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mésappariements ou des dimères d'amorce. (Figure 24)

Cette technique est très sensible, très spécifique, rapide et permet le multiplexage mais elle manque d'efficacité et de flexibilité lors de mutations variables ou localisées dans les régions comportant des séquences répétées. (345)

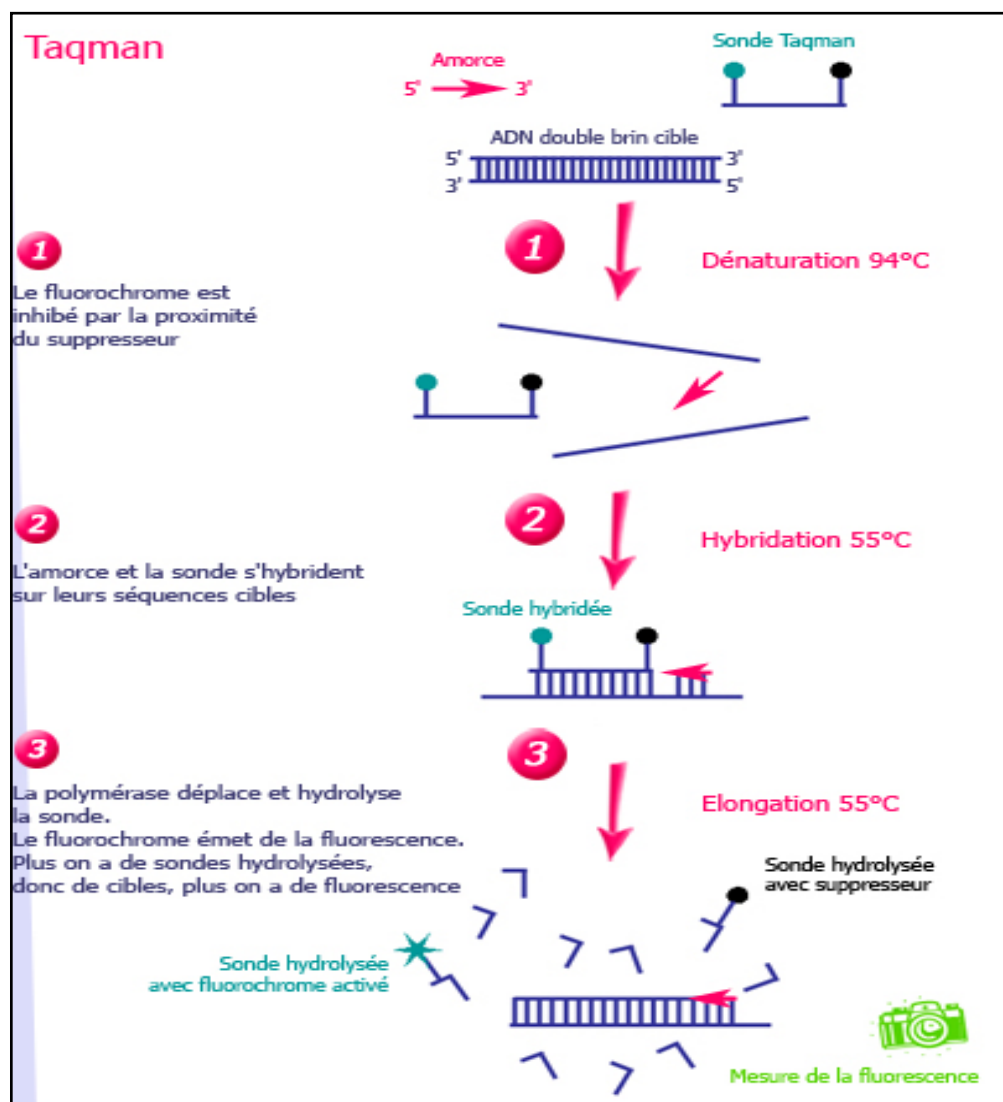


Figure 22. Principe de la PCR en temps réel utilisant les sondes Taqman (345)

2.3.2. Protocole

Les SNP srs1800544 et rs553668 ont été déterminées par discrimination allélique grâce aux sondes Taq Man en utilisant le **TaqMan® SNP Genotyping Assays C_7611979_10 et C_996424_20**, respectivement ((Applied Biosystems, Foster City, CA). (Tableaux 9 et 10).

Une quantité de 20ng d'ADN a été utilisée dans chaque tube de réaction avec le Type-it® Fast SNP Probe PCR master mix (QIAGEN, Basel, Switzerland) pour atteindre un volume final de 25 µl. Le master mix est fourni avec le Type-it Fast SNP Probe PCR Kit 800 (kit PCR pour 800 réactions). Les réactions ont été réalisées dans un thermocycleur en temps-réel, le Rotor Gene1.7.94 (QIAGEN, Basel, Switzerland).

La réaction commence par une étape initiale d'activation de la PCR à 95 °C pendant 5 minutes, suivies par une étape de dénaturation à 95 °C pendant 15s puis par une étape d'hybridation/élongation à 60°C pendant 30s en 45 cycles. Certains échantillons ont été traités en triple afin d'assurer une meilleure reproductibilité.

Table 9. SNP étudiés

SNP		Assay ID
rs1800544	C-1291G	C__7611979_10
rs553668	C1780T	C__996424_20

Table 10. Amorces et sondes fluorescentes.

TaqMan® SNP Assays, Human SM * Assay ID: C__7611979_10	kit Taqman de génotypage SNP comprenant les amorces sens et antisens + les sondes fluorescentes des deux allèles du SNP en question
TaqMan® SNP Assays, Human SM * Assay ID: C__996424_20	

2.4. Analyse statistique

Notre étude a été réalisée dans le cadre d'une étude Cas-Témoins. Ce type d'étude nécessite d'être en possession de centaines de patients atteints de la pathologie à étudier (cancer du sein), et un nombre similaire ou supérieur de témoins. Ces deux cohortes « patients » et « témoins » doivent être les plus possibles similaires aux niveaux de l'âge, de la région géographique. À la suite du recrutement, les études des variants seront réalisées en comparant la distribution des génotypes dans la population « témoins » et « patients ». Une différence de

distribution importante donne une indication sur le rôle possible qu'ils peuvent jouer dans la pathologie étudiée (346)

Comme nous l'avons déjà mentionné l'analyse statistique a été calculée grâce au logiciel dédié aux études d'épidémiologie-génétique: Quanto version 1.2.4, May 2009 (347) pour estimer la taille de l'échantillon.

D'une autre part nous avons utilisé le logiciel SNP stats (348). Pour tester si les fréquences alléliques étaient en équilibre de Hardy-Weinberg (HW). Ce logiciel a également été utilisé pour estimer la fréquence des haplotypes chez les patients et chez les témoins.

Le test du Qui-2 ou le test exact de Fisher (lorsque le nombre de sujets était inférieur à 5) ont été utilisés pour :

- Etudier la distribution des génotypes donnés par chacun des SNP chez les patientes et chez les contrôles par rapport à celle attendue avec l'équilibre de Hardy Weinberg.
- Comparer entre la fréquence de chaque génotype chez les patientes et chez les contrôles.
- Etudier l'association du grade anatomo-clinique avec chaque génotype.

En effet, les études d'association sont basées sur l'analyse directe d'un polymorphisme en comparant la fréquence des génotypes des patients atteints de la pathologie à celle des témoins appariés. Pour cela deux calculs sont réalisés (349)

- Le seuil critique de significativité :Il est calculé par la loi du χ^2 . Le test de χ^2 qui ne peut être réalisé que pour les populations en équilibre d'Hardy-Weinberg, c'est-à-dire que les génotypes doivent être distribués de façon aléatoire dans la population. Cette loi du χ^2 permet de comparer les valeurs obtenues aux valeurs attendues. Le résultat de cette loi, appelé p-value, est compris entre 0 et 1 et correspond à la chance d'obtenir par hasard le même résultat sous l'hypothèse nulle. Un résultat est significatif pour des valeurs inférieures à 5%avec un intervalle de confiance de 95% et un degré de liberté égal à 1.
- L'estimation du risque relatif : Cette estimation du risque relatif est effectuée par le calcul de l'odds ratio (OR) dont un exemple est donné dans le Tableau 11.

Tableau 11. Distribution des effectifs des génotypes AA, AB et BB pour les patients et les témoins.

	Génotypes		
	AA	AB	BB
Témoins	a	c	e
Patients	b	d	f

- L'OR va mesurer le risque, par exemple pour les individus ayant le génotype AB, de développer la pathologie par rapport à ceux possédant le génotype AA. Le calcul de l'OR sera le suivant : Ce calcul du risque relatif est accompagné d'un calcul des bornes de l'intervalle de confiance qui est classiquement fixé à 95% (349).

Le Test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour évaluer si la distribution d'une variable catégorique est la même entre les différents génotypes. Les séries de patientes ont été stratifiées en fonction des facteurs pronostiques (stade TNM, grade SBR, ER, PR, statu des récepteurs HER2, et le sous-type moléculaire) ou en fonction du groupe pronostique (GPG, MPG et PPG).

En ce qui concerne les sous-types moléculaires luminale-A et B-luminale, l'information sur l'expression de Ki67 n'était pas toujours disponible afin de réaliser une bonne distinction entre ces deux sous-types moléculaires, donc les deux ont été regroupés en un seul groupe celui du « sous-type luminal » connu pour avoir un meilleur pronostique. (350)

Le calcul du risque relatif a été accompagné d'un calcul des bornes de l'intervalle de confiance et qui a été fixé à 95%, les valeurs à signification statistiques ont été fixées à $p < 0,05$. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation) et Graph Pad Prism version 6 (GraphPad Software, San Diego, CA)

II. Résultats

II. Résultats

Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une publication intitulée "ADRA2A Germline Gene Polymorphism is Associated to the Severity, but not to the Risk, of Breast Cancer" Pathol Oncol Res 2016 13 avril; 22 (2): 357-65. Epub 2015 13 novembre (voire annexe 5)

1. Fréquences alléliques et génotypiques

Les fréquences alléliques et génotypiques des SNPs rs1800544 et rs553668 chez les cas et chez les témoins sont présentés dans le Tableau 12. Les locus étaient en équilibre de HW ($p > 0,05$) dans les deux groupes. Il n'y avait pas de différence significative dans la distribution des génotypes rs1800544 ou rs553668

Table 12. Fréquences alléliques des polymorphismes du gène ADRA2A chez les patientes et chez les contrôles ainsi que leur association avec le risque du cancer du sein

SNP	Allèle	Patients n (%)	contrôles n (%)	OR (IC 95%)	Valeur de P
rs1800544	C	116 (57)	121 (60)	1	0.53
	G	88 (43)	81 (40)	0.88 (0.59-1.3)	
rs553668	G	148 (76)	91 (77)	1	0.86
	A	46 (24)	27 (23)	0.95 (0.56-1.6)	

OR odds ratio, IC intervalle de confiance

Table 13. Fréquences génotypiques des polymorphismes du gène ADRA2A chez les cas et les contrôles et leur association avec le risque du cancer du sein

SNP	Génotype	Patient n (%)	contrôles n (%)	valeur de P pour un modèle d'héritage				
				Co dominant	Dominant	Récessif	Over-dominant	Log-additif
rs1800544	C/C	36 (35)	34 (34)	0.26	0.81	0.15	0.18	0.54
	C/G	44 (43)	53 (52)					
	G/G	22 (22)	14 (14)					
rs553668	A/A	08 (08)	01 (02)	0.09	0.55	0.06	0.15	0.87
	G/A	30 (31)	25 (42)					
	G/G	59 (61)	33 (56)					

OR odds ratio, IC intervalle de confiance

2. Analyse des haplotypes

Les fréquences des haplotypes chez les cas et les témoins ont été estimées en utilisant le logiciel **SNP stats**. L'haplotype le plus fréquent chez les cas et les témoins est l'haplotype **CG**

(56% et 59%, respectivement). Aucune différence n'a été observée entre les deux groupes en ce qui concerne la distribution de l'ensemble des haplotypes (table 14).

Table 14. Fréquences des haplotypes des polymorphismes du gène ADRA2A chez les cas et chez les témoins et leur association avec le risque du cancer du sein

Haplotypes		Fréquence		OR (IC 95%)	Valeur de P
rs1800544	rs553668	cas	témoins		
C	G	0.56	0.59	1	
G	A	0.23	0.25	1.01 (0.62-1.65)	0.98
G	G	0.19	0.14	0.74 (0.41-1.33)	0.31
C	A	0	0	-	-

OR odds ratio, IC intervalle de confiance

3. L'âge et le Statut ménopausique au moment du diagnostic du cancer du sein

Le jeune âge au moment du diagnostic est souvent associé à une évolution plus agressive de la maladie et à un mauvais pronostic (352, 353) donc nous avons étudié l'association entre les polymorphismes du gène ADRA2A et l'âge au moment du diagnostic du cancer du sein.

Nous avons tracé l'âge au moment du diagnostic suivant les génotypes de ADRA2A (Fig. 1a). Il y avait une différence significative dans la médiane de l'âge d'apparition de la maladie chez les patientes pour chaque génotype rs1800544 et rs553668 ($p = 0,01$ pour chaque locus), ce qui signifie que ces polymorphismes sont associés avec l'âge au moment du diagnostic (Fig.25a).

En outre, et comme il n'ya pas de consensus concernant l'âge limite pour définir « un jeune âge de cancer du sein », nous avons choisi de le fixer à 40 ans, comme d'autres auteurs (353, 354) et nous avons étudié la distribution des génotypes dans les deux groupes d'âge ($y \leq 40$ et $y > 40$ ans) (tableau 15). Il y avait une association significative entre le génotype GG rs1800544 et l'âge précoce d'apparition du cancer du sein suivant un modèle génétique codominant, récessif et log-additif ($p = 0,01$, $p = 0,02$ et $p = 0,01$, respectivement).

De même, le génotype AA rs553668 a eu une tendance à être associé à un âge précoce de diagnostic suivant un modèle codominant et récessif. Cependant cette association n'a pas atteint une signification statistique (Tableau 15). En accord avec ces résultats, l'analyse des haplotypes a montré une association significative de l'haplotype (GA), impliquant les allèles mineurs, avec l'âge précoce de diagnostic ($p = 0,03$, OR = 0,43, IC 95% (0,20-0,94)).

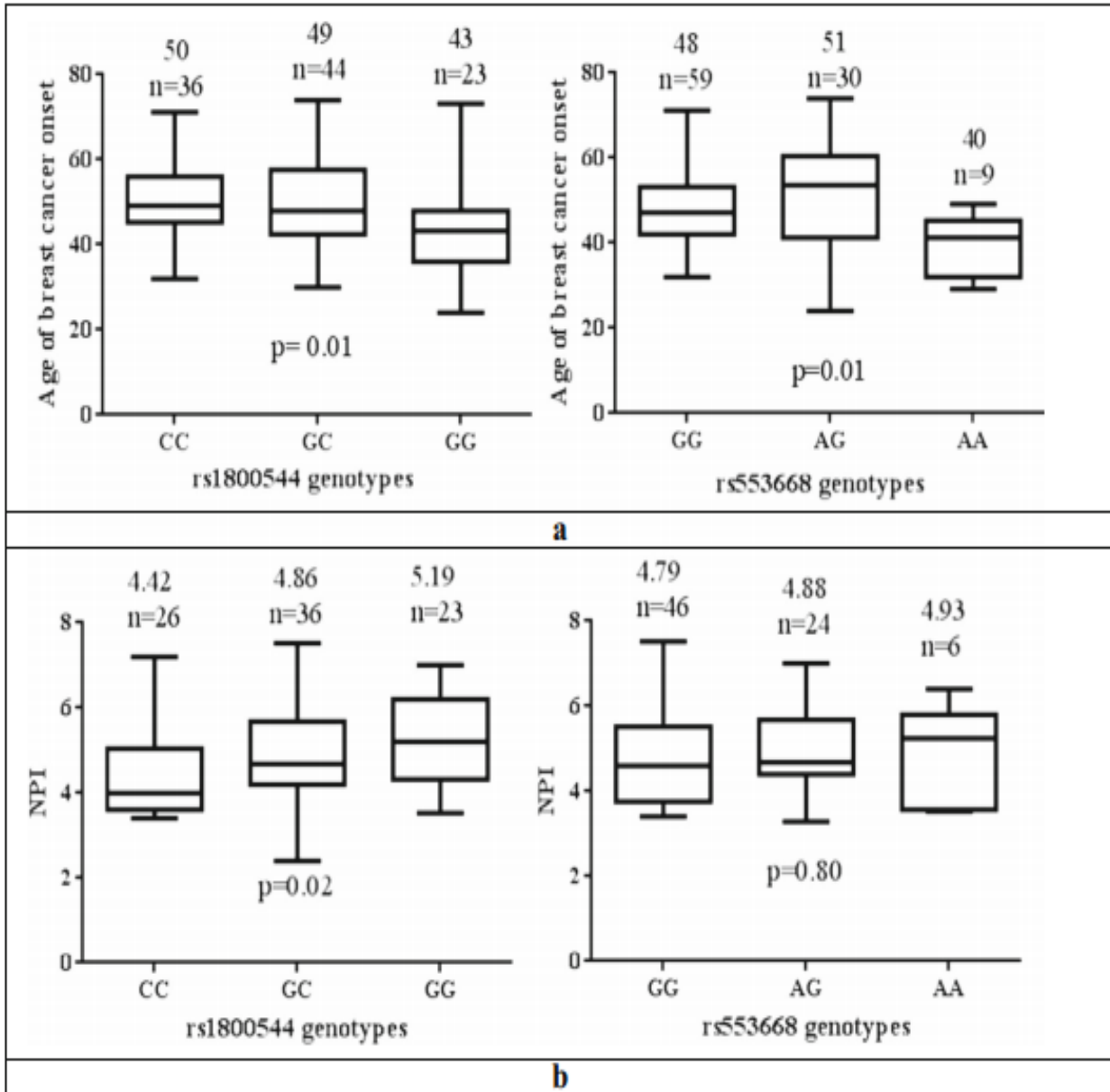


Figure 23. Répartition de l'âge de diagnostic du cancer du sein et le NPI par rapport au génotype. Répartition de l'âge d'apparition de la maladie (1a) et NPI (1b) par rapport aux polymorphismes ADRA2A (rs1800544) et 553668 (rs553668). L'intervalle interquartile est indiqué par les carrés, et les valeurs maximales et minimales sont représentées par les barres. La barre horizontale indique la valeur médiane. Le nombre de sujets et la valeur moyenne de l'âge (a) ou NPI (b) sont mentionnés au dessus de chaque groupe génotypique. la valeur P du test de Kruskal-Wallis est indiquée. NPI : Indice du Pronostique de Nottingham

Table 15. Association des génotypes avec un âge précoce de survenu du cancer du sein

SNP	rs1800544					rs553668				
	Génotype	≤40ans	>40ans	OR (IC 95%)	Valeur de P	Génotype	≤40 ans	>40 ans	OR (IC 95%)	Valeur de P
Codominant	C/C	5 (23.8%)	31 (38.3%)	1.00	-	G/G	10 (50%)	49 (63.6%)	1.00	-
	G/C	7 (33.3%)	37 (45.7%)	0.85 (0.25-2.95)	0.80	A/G	6 (30%)	24 (31.2%)	0.82 (0.27-2.51)	0.72
	G/G	9 (42.9%)	13 (16.1%)	0.23 (0.06-0.83)	0.01	A/A	4 (20%)	4 (5.2%)	0.20 (0.04-0.96)	0.05
Dominant	C/C	5 (23.8%)	31 (38.3%)	1.00	0.21	G/G	10 (50%)	49 (63.6%)	1.00	0.27
	G/C-G/G	16 (76.2%)	50 (61.7%)	0.50 (0.17-1.51)		A/G-A/A	10 (50%)	28 (36.4%)	0.57 (0.21-1.54)	
Recessif	C/C-G/C	12 (57.1%)	68 (84%)	1.00	0.01	G/G-A/G	16 (80%)	73 (94.8%)	1.00	0.05
	G/G	9 (42.9%)	13 (16.1%)	0.25 (0.09-0.73)		A/A	4 (20%)	4 (5.2%)	0.22 (0.05-0.97)	
Overdominant	C/C-G/G	14 (66.7%)	44 (54.3%)	1.00	0.3	G/G-A/A	14 (70%)	53 (68.8%)	1.00	0.92
	G/C	7 (33.3%)	37 (45.7%)	1.68 (0.61-4.60)		A/G	6 (30%)	24 (31.2%)	1.06 (0.36-3.08)	
Log-additif	---	---	---	0.47 (0.24-0.92)	0.02	---	---	---	0.53 (0.26-1.09)	0.08

OR odds ratio, IC intervalle de confiance, les résultats ayant une signification statistique sont présentés en gras

De plus, nous avons considéré l'association des génotypes avec le statut ménopausique (tableau16). Il y avait une association significative entre le génotype GG rs1800544 et un statut pré ménopausique suivant à la fois un modèle génétique codominant et un modèle récessif ($p = 0,02$, $p = 0,01$, respectivement). De même, le Génotype AA rs553668 a eu tendance à être associée avec un statut pré ménopausique bien que cette association n'a pas atteint une signification statistique (Tableau 16). Cette tendance a été observée aussi avec l'haplotype (GA) ($p = 0,05$, OR =0,51, IC à 95% (0,26-0,99)).

Table 16. Association du génotype avec le statut ménopausique

SNP	rs1800544					rs553668				
	Génotype	Pré M	M	OR (IC 95%)	Valeur de P	Génotype	Pré M	M	OR (IC95%)	Valeur de P
Codominant	C/C	18 (31%)	18 (40%)	1.00		G/G	31 (57.4%)	28 (63.6%)	1.00	
	G/C	22 (37.9%)	22 (48.9%)	1.00 (0.41-2.41)	1	A/G	14 (25.9%)	16 (36.4%)	1.27 (0.52-3.05)	0.60
	G/G	18 (31%)	5 (11.1%)	0.28 (0.08-0.91)	0.02	A/A	9 (16.7%)	0 (0%)	0.05 (0.003-1.0)	0.007
Dominant	C/C	18 (31%)	18 (40%)	1.00	0.34	G/G	31 (57.4%)	28 (63.6%)	1.00	0.53
	G/C-G/G	40 (69%)	27 (60%)	0.68 (0.30-1.53)		A/G-A/A	23 (42.6%)	16 (36.4%)	0.77 (0.34-1.74)	
Récessif	C/C-G/C	40 (69%)	40 (88.9%)	1.00	0.01	G/G-A/G	45 (83.3%)	44 (100%)	1.00	0.02
	G/G	18 (31%)	5 (11.1%)	0.28 (0.09-0.82)		A/A	9 (16.7%)	0 (0%)	0.08 (0.004-1.5)	
Overdominant	C/C-G/G	36 (62.1%)	23 (51.1%)	1.00	0.26	G/G-A/A	40 (74.1%)	28 (63.6%)	1.00	0.27
	G/C	22 (37.9%)	22 (48.9%)	1.57 (0.71-3.45)		A/G	14 (25.9%)	16 (36.4%)	1.63 (0.69-3.88)	
Log-additif	---	---	---	0.59 (0.34-1.01)	0.05	---	---	---	0.57 (0.30-1.09)	0.08

OR odds ratio, IC intervalle de confiance, pré M patientes pré ménopausées; M Patientes ménopausées. les résultats statistiquement significatifs sont présentés en gras

4. Les Caractéristiques Clinico-pathologiques

Nous avons étudié l'association des polymorphismes ADRA2A avec la panoplie des caractéristiques clinico-pathologiques qui sont des indicateurs pronostiques classiques des cancers du sein : taille de la tumeur, l'envahissement des ganglions lymphatiques, stades TNM, grades SBR (355), NPI (343) et le statut d'expression des récepteurs ER, PR, Her2 qui sont tous des facteurs de prédiction du pronostic de la maladie, individuellement (69, 330) ou en combinaison (120, 356, 357)

Le génotype rs1800544 GG était significativement plus fréquent dans les tumeurs de grande taille (>5cm), suivant un modèle génétique codominant et un modèle récessif (p =0,03 ; p =0,01, respectivement) (Table 17). Ce génotype était plus fréquent aussi dans les cas où existait un envahissement ganglionnaire lymphatique, suivant un modèle génétique codominant, bien que cela n'a pas atteint le niveau significatif (p =0,05, RC =3,21, IC à 95% (de 1,01 à 10,22)), mais l'allèle G de rs1800544 été significativement associé a une atteinte des ganglions lymphatiques dans un modèle log-additif (p = 0,03) (table 17).

Après stratification des stades TNM par le statut ménopausique, l'allèle G de rs1800544 présentait une forte association aux stades TNM avancés (III et IV) chez les patientes pré ménopausées (p =0,01). Le génotype rs1800544 GG était également significativement plus fréquent dans le PPG (dans un modèle codominant, p = 0,04) et l'allèle G de ce SNP était significativement associée à PPG (dans un modèle log-additif, p = 0,03) (table 17).

De plus, il y avait une différence significative dans la médiane de l'index NPI entre les groupes de génotypes rs1800544 ($p = 0,02$), ce qui signifie que ce SNP est associé à l'index NPI (Fig. 1b). Il n'y avait pas d'association entre rs1800544 et les autres caractéristiques clinico-pathologiques : stades SBR, expression des ER, PR et HER2, ainsi que la classification moléculaire qui est basée sur ces paramètres, même après stratification selon le statut ménopausique. Le rs553668 n'était pas associé à aucun des paramètres clinico-pathologiques étudiés cependant l'analyse des haplotypes a montré que l'haplotype GG était significativement associé à de mauvais indicateurs pronostiques : taille de la tumeur plus élevée ($p = 0,03$), ganglions lymphatiques envahis ($p = 0,006$), stades TNM avancés ($p = 0,03$) et expression tumorale de Her2 ($p = 0,007$) (table 18)

Table 17. Association du polymorphisme rs1800544 avec les paramètres clinico-pathologiques

Paramètre	modèle génétique	Génotype	Paramètre n (%)		OR (IC 95%)	valeur de P
			≤ 5 cm	> 5 cm		
Taille de la tumeur (n=103)	Co dominant	C/C	27 (37)	5 (26.3)	1.00	0.01
		G/C	35 (48)	6 (31.6)	0.93 (0.26-3.36)	
		G/G	11 (15.1)	8 (42.1)	3.93 (1.05-14.69)	
	Récessif	C/C-G/C	62 (84.9)	11 (57.9)	1.00	
		G/G	11 (15.1)	8 (42.1)	4.10 (1.35-12.49)	
			Négatif	Positif		
Nodule (n=103)	Co dominant	C/C	18 (42.9)	12 (23.5)	1.00	0.03
		G/C	17 (40.5)	24 (47.1)	2.12 (0.81-5.52)	
		G/G	7 (16.7)	15 (29.4)	3.21 (1.01-10.22)	
	Log-additive	---	---	---	1.82 (1.02-3.24)	
			Stade I-II	Stade III-IV		
Stade TNM (n=103)	Dominant	C/C	18 (45)	12 (25)	1.00	0.01
		G/C-G/G	22 (55)	36 (75)	2.45 (1.00-6.05)	
Stade TNM (statut préménopausique, n=58)	Dominant	C/C	9 (45)	4 (14.3)	1.00	0.01
		G/C-G/G	11 (55)	24 (85.7)	4.91 (1.24-19.46)	
			GPG/MPG	PPG		
NPI (n=103)	Co dominant	C/C	24 (39.3)	4 (17.4)	1.00	0.03
		G/C	26 (42.6)	11 (47.8)	2.54 (0.71-9.06)	
		G/G	11 (18)	8 (34.8)	4.36 (1.08-17.63)	
	Log-additive	---	---	---	2.06 (1.05-4.07)	

OR odds ratio, intervalle de confiance IC, GPG groupe de bon pronostic (NPI≤3,4), groupe de pronostic Modéré MPG (3,4 <NPI ≤5,4), PPG groupe de mauvais pronostic (NPI>5.4). Seules les caractéristiques clinico-pathologique et modèles génétiques montrant des différences significatives sont présentés. Les résultats significatifs sont présentés en gras

Table 18. Association des haplotypes avec les paramètres clinico-pathologiques

Paramètre	Haplotype rs1800544/rs553668		la fréquence des haplotypes dans les sous- groupes		fréquence totale des haplotypes	OR (IC 95%)	valeur de P
			≤ 5 cm	> 5 cm			
La taille des tumeurs (n=92)	C	G	0.60	0.42	0.57	1.00	---
	G	A	0.23	0.26	0.24	1.62 (0.68-3.84)	0.27
	G	G	0.15	0.31	0.18	2.58 (1.11-6.02)	0.03
			Négatif	Positif			
Nodule (n=93)	C	G	0.63	0.47	0.54	1.00	---
	G	A	0.27	0.24	0.26	1.25 (0.65-2.40)	0.51
	G	G	0.09	0.27	0.19	3.64 (1.46-9.10)	0.006
			Stade I-II	Stade III-IV			
stade TNM (n=88)	C	G	0.65	0.50	0.56	1.00	---
	G	A	0.23	0.26	0.25	1.45 (0.73-2.88)	0.29
	G	G	0.11	0.23	0.18	2.59 (1.08-6.24)	0.03
			Négatif	Positif			
statut Her2 (n=97)	C	G	0.59	0.45	0.55	1.00	---
	G	A	0.25	0.20	0.24	1.07 (0.51-2.25)	0.87
	G	G	0.14	0.34	0.20	2.92 (1.35-6.29)	0.007

OR odds ratio, intervalle de confiance IC . Seules les caractéristiques clinico-pathologique et modèles génétiques montrant des différences significatives sont présentés. Les résultats significatifs sont présentés en gras

III. Discussion

III. Discussion

Durant les dernières décennies, l'hétérogénéité du cancer du sein a conduit à une évolution des paramètres pronostiques partant des critères clinico-pathologiques et histologiques classiques vers d'autres classifications plus précises basées sur les progrès de la biologie moléculaire. Toute fois, ces classifications sont principalement basées sur les caractéristiques intrinsèques de la tumeur (3, 358) Pourtant, malgré ces progrès, des différences de pronostic existent encore entre les patients, même quand ils appartiennent à la même catégorie (359) Une des explications possibles à ces écarts pourraient être l'absence d'une implication suffisante de l'environnement de la croissance tumorale, tel que le background génétique des patients. Dans la présente étude, nous avons exploré l'association de deux SNP du gène ADRA2 A avec les indicateurs pronostiques du cancer du sein ainsi qu'avec la susceptibilité à ce cancer.

Nous avons constaté que le génotype GG rs1800544 est nettement associé à des indicateurs de mauvais pronostic: jeune âge au moment du diagnostic de la maladie, statut pré ménopausique, une taille importante des tumeurs, envahissement ganglionnaire lymphatique, stades TNM avancés et index NPI élevé.

Le génotype AA rs553668 a été significativement associé à un jeune âge de survenu de la maladie et à un statut pré ménopausique, mais à aucun des indicateurs pronostiques étudiés, bien que de nombreuses tendances à cette association ont été observées.

Par analyse des haplotypes, nous avons trouvé que l'haplotype GA est associée à l'apparition précoce de la maladie et l'haplotype GG est associée à des indicateurs de mauvais pronostic: une taille plus grande de la tumeur, envahissement ganglionnaire lymphatique, stade TNM avancé et un statut HER2 positif.

Le SNP rs1800544 est situé dans la région du promoteur du gène ADRA2A (11) ce qui peut conduire à son implication dans l'expression du gène. Il est intéressant de noter que, Small et al. ont constaté que des lignés cellulaires transfectées avec différents haplotypes ADRA2A ont une expression différente de l'ARNm ainsi que la protéine (221)

Une autre étude menée sur des sujets humains a montré que différents haplotypes ADRA2A sont associés à différentes réponses à un agoniste α 2-AR-, la dexmédétomidine (16). Ainsi, il est

possible que l'association des deux haplotypes GA et GG avec des indicateurs de mauvais pronostic du cancer du sein pourrait être expliquée par une expression différentielle de $\alpha 2A$ -AR. Il a été démontré que les récepteurs $\alpha 2A$ induisaient une suppression adrénérergique de la sécrétion d'insuline, et que les îlots pancréatiques humains ayant une plus faible expression de ce récepteur présentent une sécrétion d'insuline plus importante (17, 360). L'insuline est connue pour améliorer la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et la biodisponibilité de l'estradiol (118)

Par conséquent, nous pouvons poser l'hypothèse que l'association observée entre l'haplotype GA et GG du gène ADRA2A et les mauvais indicateurs pronostiques pourraient être expliquées par le taux élevé de la sécrétion d'insuline chez ces patients ces haplotypes.

Cependant, et comme nous n'avons pas pris en considération l'association d'autres SNPs du gène ADRA2A avec rs1800544 et rs553668, plusieurs autres enquêtes sont nécessaires pour confirmer ou infirmer telle hypothèse ; en particulier parce que l'étude Smal et al. (221) a été menée sur plusieurs haplotypes ADRA2A portant les mêmes allèles G (rs1800544) et G (rs553668), mais accompagnée d'allèles d'autres SNP, et qui a montré une expression renforcée de $\alpha 2A$ -AR.

D'autre part, il a été démontré en utilisant la technologie des puces à ADNc afin d'évaluer le profil d'expression génique de tumeurs mammaires, que l'expression du gène ADRA2A est plus faible dans les tumeurs de patients ayant un mauvais pronostic (361, 362). De plus, Du et al. ont montrés, en utilisant des analyses immuno histochimiques sur des échantillons paraffinés, que l'expression de $\alpha 2a$ est associée au statut Her2 ($p = 0,048$) (363). Par conséquent, nous pouvons spéculer que les différences d'expression de $\alpha 2a$ AR dans des tumeurs distinctes pourraient être expliquées soit par les différentes mutations dans les gènes de la tumeur soit par les différents antécédents génétiques du tissu mammaire avant le déclenchement de la malignité chez les patient.

En outre, des études *in vitro*, *in vivo* et des études cliniques ont montré que les effets à long terme du stress favorisent la croissance et la progression tumorale (364) L'adrénaline et la noradrénaline sont au centre de la réponse adrénérergique au stress et sont reconnus par les récepteurs adrénérergiques. L'activation du récepteur $\alpha 2a$ AR dans les tissus normaux diminue

l'AMP cyclique intracellulaire (AMPC) par la régulation négative de la synthèse de l'adénylate cyclase (365) et contribue à la régulation du flux sanguin dans les différents tissus y compris la glande mammaire (366), ils peuvent également inhiber la sécrétion du lait dans cette glande (367).

Des études *in vitro* et *in vivo* sur des lignées cellulaires de cancer du sein ont montré que l'activation des récepteurs alpha adrénergiques conduit à une chimio résistance et à une prolifération cellulaire (23, 368, 369) Par conséquent, les récepteurs adrénergiques peuvent être les leaders de l'effet du stress sur le devenir de la maladie.

Il est aussi intéressant de noter que, dans un modèle murin de cancer du sein, des antagonistes sélectifs des récepteurs alpha-adrénergiques (rauwoscine), réduisent le volume de la tumeur (25). De ce fait, la détection de polymorphismes ADRA2A associés à un mauvais pronostic de cancer du sein pourrait ouvrir la porte à des traitements basés sur le génotype du malade dans ce type de cancer.

Conclusion et perspectives

Notre étude nous a permis, en identifiant une association entre les polymorphismes étudiés avec le cancer du sein, d'apporter une contribution dans la meilleure connaissance des mécanismes biologiques de cette maladie chez l'Homme, le rôle du récepteur ADRA2A n'ayant été démontré que de manière indirecte *in vitro* sur des lignées cellulaires et *in vivo* chez la souris.

En effet, nous avons montré que le polymorphisme rs1800544 du gène ADRA2A seul ou en une combinaison haplotypique avec le polymorphisme rs553668, est associée à des indicateurs de mauvais pronostic du cancer du sein : jeune âge au moment du diagnostic de la maladie, statut pré ménopausique, taille plus grandes des tumeurs, statut positifs des ganglions lymphatiques, stades TNM avancés, NPI plus élevé et un statut HER2 positif.

Ces données suggèrent que les polymorphismes germinaux du gène ADRA2A pourraient représenter un facteur prédictif du pronostic du cancer du sein. Les deux SNP étudiés ne sont pas associés au risque du cancer du sein. Ceci nous permet de les considérer comme des marqueurs génétiques de pronostic du cancer du sein.

Cependant, nous proposons pour la continuité du travail de réaliser une enquête plus approfondie investiguant l'association d'autres polymorphismes ADRA2A, avec le risque ou le pronostic du cancer du sein. L'éventuelle découverte d'une différence génotypique significative particulière entre les patientes et les contrôles permettrait de considérer le ou les SNP ainsi identifiés comme des marqueurs génétiques de susceptibilité au cancer du sein, qui pourraient être utilisés dans le dépistage de ce cancer. L'exemple typique de tels marqueurs est, sans doute, celui des mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* qui constituent un facteur de prédiction du cancer du sein. Elles sont recherchées chez les femmes ayant une histoire familiale de cancer du sein afin de calculer leur risque d'avoir la même maladie. Leur découverte implique une meilleure prise en charge de ses femmes: surveillance radiologique plus rapprochée voire mammectomie prophylactique (exérèse des seins) afin de préserver leur vie.

D'un autre côté, il existe déjà plusieurs marqueurs génétiques pronostiques pour cette maladie. Mais les groupes constitués avec chacun d'eux restent toujours hétérogènes. De plus, pour

certaines d'entre eux, comme les mutations des gènes BRCA1 et BRCA2, des études prospectives manquent pour affirmer définitivement leur impact pronostic qui reste controversé (370) Un marqueur pronostique seul ou associé à d'autres marqueurs permet de mieux orienter la prise en charge thérapeutique des patientes en donnant autant d'informations telles que:

- * L'évaluation de la réponse à la chimiothérapie afin de mieux orienter l'administration de ce traitement qui est lourd à la fois économiquement et pour le corps du malade.

- * Le repérage des patientes susceptibles de développer des métastases afin de discuter une chimiothérapie néo-adjuvante (avant la chirurgie), une chimiothérapie adjuvante (ou une radiothérapie) lourde, ou bien une mastectomie totale.

- * Enfin, la détection de polymorphismes ADRA2A associés à un mauvais pronostic de cancer du sein pourrait ouvrir la porte à des traitements basés sur le génotype de la malade dans ce type de cancer.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D.M,** *Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC. CancerBas., 2004. 5(2)*
2. <http://www.lexpressiondz.com/actualite/165979-plus-de-4500-deces-par-an.html>
3. **Goldhirsch A., Winer EP., Coates AS., Gelber RD., Piccart-Gebhart M.,** *Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2013. Ann Oncol., 2013. 24(9): p. 2206–2223*
4. **Pusztai L.,** *Anatomy and biology: two complementary sides of breast cancer prognostication. J Clin Oncol ., 2011. 29(33): p. 4347–4348*
5. **Zhang B., Beeghly-Fadiel A., Long J., Zheng W.** *Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. Lancet Oncol., 2011 12(5): p. 477–488*
6. **Rafiq S., Khan S., Tapper W., Collins A., Upstill-Goddard R.,** *A genome wide meta-analysis study for identification of common variation associated with breast cancer prognosis. PLoS One, 2014. 9(12): p. 101-488*
7. **Ribelles N., Santonja A., Pajares B., Llacer C., Alba E.,** *The seed and soil hypothesis revisited: current state of knowledge of inherited genes on prognosis in breast cancer. Cancer Treat Rev.,2014 40(2): p. 293–299.*
8. **Anne E., Knaus, Verena Muthig , Stefanie Schickinger , Eduardo Moura, Nadine Beetz, Ralf Gilsbach , Lutz Hein,** *α 2-Adrenoceptor subtypes—Unexpected functions for receptors and ligands derived from gene-targeted mouse models. Neurochemistry International, 2007. 51: p.277–281*
9. **Kobilka BK., Matsui H., Kobilka TS., Yang-Feng TL.,vFrancke U., Caron MG.,** *Cloning, sequencing, andvexpression of the gene coding for the human plateletvalpha 2-adrenergic receptor. Science,1987. 238: p. 650-6*
10. **Hoffman BB., Taylor P.,** *Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous systems. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG (eds) Goodman & Gilman’s the pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill, New York,2001 : p. 115–153*
11. **Lario S., Calls J., Cases A., Oriola J., Torras A.,** *MspI identifies a biallelic polymorphism in the promoter region of the alpha 2A-adrenergic receptor gene. Clin Genet., 1997. 51(2): p. 129–130*
12. **Lima JJ., Feng H., Duckworth L., Wang J., Sylvester JE.,** *Association analyses of adrenergic receptor polymorphisms with obesity and metabolic alterations. Metabolism,2007. 56(6): p. 757–765*

13. **Garenc C., Perusse L., Chagnon YC., Rankinen T., Gagnon J.,** *The alpha 2-adrenergic receptor gene and body fat content and distribution: the HERITAGE family study.* *Mol Med.*,2002. 8(2): p. 88–94
14. **Oppert JM., Tourville J., Chagnon M., Mauriege P., Dionne FT.,** *DNA polymorphisms in the alpha 2- and beta 2-adrenoceptor genes and regional fat distribution in humans: association and linkage studies.* *Obes Res.*,1995. 3(3): p. 249–255
15. **Ukkola O., Rankinen T., Weisnagel SJ., Sun G., Perusse L.,** *Interactions among the alpha2-, beta2-, and beta3-adrenergic receptor genes and obesity-related phenotypes in the Quebec family study.* *Metabolism* , 2000. 49(8): p. 1063–1070
16. **Kurnik D., Muszkat., Li C., Sofowora GG., Friedman EA.,** *Genetic variations in the alpha(2A)-adrenoceptor are associated with blood pressure response to the agonist dexmedetomidine.* *Circ Cardiovasc Genet.*, 2011. 4(2): p. 179–187
17. **Rosengren AH., Jokubka R., Tojjar D., Granhall C., Hansson O., Li DQ,** *Overexpression of a2A-adrenergic receptors contributes to type 2 diabetes.* *Science*, 2010. 327: p. 217–220
18. **P. J. Talmud & J. A. Cooper & T. Gaunt & M. V. Holmes & S. Shah & J. Palmén & F. Drenos & T. Shah & M. Kumari & M. Kivimaki & J. Whittaker & D. A. Lawlor & I. N. Day & A. D. Hingorani & J. P. Casas & S. E. Humphries,** *Variants of ADRA2A are associated with fasting glucose, blood pressure, body mass index and type 2 diabetes risk:meta-analysis of four prospective studies.* *Diabetologia*, 2011. 54: p. 1710–1719
19. **Trentham-Dietz A., Newcomb PA., Storer BE., Longnecker MP., Baron J.,** *Body size and risk of breast cancer.* *Am J Epidemiol.*,1997.145(11): p. 1011–1019
20. **Key TJ., Appleby PN., Reeves GK., Roddam A., Dorgan JF.,** *Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women.* *J Natl Cancer Inst.*, 2003. 95(16): p. 1218– 1226
21. **DeCensi A, Gennari A.,** *Insulin breast cancer connection: confirmatory data set the stage for better care.* *J Clin Oncol.*,2011. 29(1): p. 7–10
22. **Perez Pinero C., Bruzzone A., Sarappa MG., Castillo LF., Luthy IA.,** *Involvement of alpha2- and beta2-adrenoceptors on breast cancer cell proliferation and tumour growth regulation.* *Br J Pharmacol* 2012. 166(2):p. 721–736
23. **Vazquez, S.M.,** *Human breast cell lines exhibit functional alpha2-adrenoceptors.* *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006. 58(1): p. 50-61
24. **Little, K.Y., Clark, T.B., Ranc, J. and Duncan, G.E.,** */3-Adrenergic receptor binding in frontal cortex from suicide victims,* *Biol. Psychiatry*, 1993. 34: p. 596-605

- 25. Bruzzone, A.,** *Alpha2-adrenoceptor action on cell proliferation and mammary tumour growth in mice. Br J Pharmacol, 2008. 155(4): p. 494-504*
- 26. Chiesa, I.J., L.F. Castillo, and I.A. Luthy,** *Contribution of alpha2-adrenoceptors to the mitogenic effect of catecholestrogen in human breast cancer MCF-7 cells. J Steroid Biochem Mol Biol, 2008. 110(1-2): p. 170-5*
- 27. Russo, J., and Russo, I.H.,** *Development of the human breast. Maturitas, 2004. 49: p.2-15*
- 28. Sternlicht,** *Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. Breast Cancer Res, 2006. 8 : p. 201*
- 29.** [http:// www.iuphar.org](http://www.iuphar.org)
- 30.** <http://globocan.iarc.fr/>
- 31. Lamote, I., Meyer, E., Massart-Leen, A.M., and Burvenich, C.,** *Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. Steroids, 2004. 69: p. 145-159*
- 32. Saglier J., Antoine EC.,** *Cancer du sein. Questions et réponses au quotidien. Masson New York Collection, 1996 : P. 125*
- 33. Tubiana, M.,** *Histoire naturelle des cancers humains et facteurs pronostiques. L'exemple du cancer du sein. Bull. Cancer (Paris), 1987. 74: p. 43-57*
- 34. Tubiana, M., Koscielny, S.,** *The Natural History of Breast Cancer. Implication for a Screening Strategy. . Oncol, 1990. 19: p. 1117-20 12.*
- 35. Tavassoli, FA., Devilee, P.,** *Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs, WHO Classification of Tumors. IARC Press, 2003.*
- 36.** <http://www.univadis.com/servicemed/atlas-anatomie-3D.html>.
- 37. GLOBOCAN** *2008 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008*
- 38. Steven, S., Coughlin, Donatus U., Ekwuemeb,** *Breast cancer as a global health concern. Cancer Epidemiology, 2009, 33: p.315–318*
- 39. Nagi S., El Saghir,** *Breast cancer management in low resource countries (LRCs): Consensus statement from the Breast Health Global Initiative. The Breast, 2011. 20: p. 3-11.*
- 40. Gabriel N., Hortobagyi,** *The Global Breast Cancer Burden: Variations in Epidemiology and Survival. Clinical Breast Cancer, 2005. 6: p. 391–401*
- 41. Smigal, C., Jemal, A., Ward, E., Cokkinides, V., Smith, R., Howe, H.L.,** *Trends in breast cancer by race and ethnicity: update. CA Cancer J Clin., 2006. 56: p. 168–183*
- 42. Tardivon A., Malhaire. C.,** *Cancer du sein (I). Épidémiologie, facteurs de risque, imagerie. emc radiologie et imagerie médicale : Génito-urinaire - Gynéco-obstétricale – Mammaire. Elsevier Masson SAS, 2009. 34-800-A-40.*

- 43. Marc Espié.,** *Épidémiologie des lésions malignes du sein.* EMC ElsevierMasson SAS, 2001, Gynécologie, 840-A-15
- 44. El Saghir, NS., Khalil, MK., Eid T.,** Trends in epidemiology and management of breast cancer in developing arab countries: a literature and registry analysis. *Int J Surg*, 2007, 5: p. 225-33.
- 45. Hance, KW., Anderson WF., Devessa SS., Young HA., Levine PH.,** Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program at the National Cancer Institute. *J Nat Cancer Inst.*, 2005.97: p. 966-75
- 46. Mahnane, A., Hamdi Cherif M.,** *Registre du Cancer de Sétif : Épidémiologie du cancer du sein en Algérie, actualités dans la prise en charge multidisciplinaire des cancers du sein en 2012, SAOM 18 février 2012*
- 47. Belkacémi, Y., Boussen, H., Hamdi-Cherif, M., A. Benider, Errihani H., Mrabti, H., Bouzid, K., Bensalem, A., Fettouki, S., Ben Abdalah, M., Abid, L., Gligorov, J.,** *Young women breast cancer epidemiology in North Africa, 32es Journées de la SFSPM, Strasbourg, novembre 2010*
- 48. Zineb Lounici Baba-Ahmed,** *Un système de dépistage du cancer du sein, propre à l'Algérie, est une nécessité absolue, Santé-MAG N°15 - Février 2013*
- 49. Hamdi M., et Cherif,** *Registre du cancer de Sétif (Algérie): incidence, tendance et survie, 1986–2005. J. Afr. Cancer*, 2010. 2: p. 245-258.
- 50. Fouatih Z.A., N. Midoun, F. Ammour, O. Lahouel, L. Mokhtari,** *Registry of Oran, Ten years of registration : 1996-2005. 2008*
- 51. Bouhidel Ml., A. Bouhidel, F. Bendali Amor,** *Registre du cancer de la wilaya de Batna de 2000 à 2006 : p. 525*
- 52. Weigelt, B., Bissell, M.J.,** *Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. Semin Cancer Biol*, 2008, 18: p. 311-321.
- 53. Vargo-Gogola, T., Rosen, J.M.,** *Modelling breast cancer: one size does not fit all. Nat Rev Cancer*, 2007, 7: p. 659-672
- 54. Hahn, W. C. and Weinberg, R. A.,** *Rules for making human tumor cells. N Engl J Med.*, 2002. 347: p. 1593-603
- 55. Hanahan, D. and Weinberg, R. A.,** *The hallmarks of cancer. Cell*, 2000. 100 : p. 57-70.
- 56. Kaneko, M., Kanno, T., Honda, K., Mashiko, H., Oosuga, N., Watanabe, A., Kumashiro, H.,** *Platelet alpha-2 adrenergic receptor binding and plasma free 3-methoxy-4-hydroxyphenyl-ethylene glycol in depressed patients before and after treatment with mianserin. Neuropsychobiology*, 1992. 25: p. 14-19
- 57. Thompson, D. and Easton, D.,** *The genetic epidemiology of breast cancer genes. J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2004. 9: p. 221-36.

- 58. Knudson, A. G.,** *Antioncogenes and human cancer. Proc Natl Acad Sci.,1993. 90(10) : p.914--21.*
- 59. Olivier, M., Langerod, A., Carrieri, P., Bergh, J., Klaar, S., Eyfjord, J., Theillet, C., Rodriguez, C., Lidereau, R., Bieche, I.,** *The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. Clin Cancer Res.,2006. 12 : p. 1157-67*
- 60. Bosco, E. E. and Knudsen, E. S.,** *RB in breast cancer: at the crossroads of tumorigenesis and treatment. Cell Cycle,2007. 6: p. 667-71*
- 61. Caldon, C. E., Daly, R. J., Sutherland, R. L. and Musgrove, E. A.,** *Cell cycle control in breast cancer cells. J Cell Biochem,2006. 97: p. 261-74.*
- 62. Futreal, P. A., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., Bennett, L. M., Haugen-Strano, A., Swensen, J., Miki, Y.,** *BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. Science, 1994. 266: p. 120-2*
- 63. Lancaster, J. M., Wooster, R., Mangion, J., Phelan, C. M., Cochran, C., Gumbs, C., Seal, S., Barfoot, R., Collins, N., Bignell, G.,** *BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. Nat Genet,1996. 13: p. 238-40*
- 64. Metcalfe, K. A., Foulkes, W. D., Kim-Sing, C., Ainsworth, P., Rosen, B., Armel, S., Poll, A., Eisen, A., Gilchrist, D., Chudley, A.,** *Family history as a predictor of uptake of cancer preventive procedures by women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. Clin Genet.,2008. 73: p. 474-9.*
- 65. Buck, M.,** *A novel domain of BRCA1 interacts with p53 in breast cancer cells. Cancer Lett .2008.*
- 66. Wiwanitkit, V.,** *Structure of human BRCA2-RAD51 by molecular docking study. Arch Gynecol Obstet.,2007. 276: p. 625-7*
- 67. Yoshida, K. and Miki, Y.,** *Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. Cancer Sci., 2004. 95: p. 866-71*
- 68. Bieche, I. and Lidereau, R. (1997).** *Somatic genetics of breast cancer. Bull Cancer 84, 83-96.*
- 69. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL.** *Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the her-2/neu oncogene. Science,1987.235: p.177-182.*
- 70. Moasser, M. M.,** *The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. Oncogen,2007. 26: p. 6469-87.*
- 71. Vogel, C. L., Cobleigh, M. A., Tripathy, D., Gutheil, J. C., Harris, L. N., Fehrenbacher, L., Slamon, D. J., Murphy, M., Novotny, W. F., Burchmore, M.,** *First-line Herceptin monotherapy in metastatic breast cancer. Oncology,2001. 61(2): p. 37-42.*
- 72. Faratian, D. and Bartlett, J.,** *Predictive markers in breast cancer--the future. Histopathology,2008. 52: p. 91-8.*

- 73. Jarvinen, T. A. and Liu, E. T.,** Simultaneous amplification of HER-2 (ERBB2) and topoisomerase IIalpha (TOP2A) genes--molecular basis for combination chemotherapy in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*,2006. **6**: p.579-602.
- 74. Blancato, J., Singh, B., Liu, A., Liao, D. J. and Dickson, R. B.,** Correlation of amplification and overexpression of the c-myc oncogene in high-grade breast cancer: FISH, in situ hybridisation and immunohistochemical analyses. *Br J Cancer*,2004. **90**: p. 1612-9
- 75. Arnold, A. and Papanikolaou, A.,** Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol*,2005. **23** : p. 4215-24.
- 76. Roy, P. G. and Thompson, A. M.,** Cyclin D1 and breast cancer. *Breast*, 2006. **15** : p. 718-27
- 77. Feinberg, A. P. and Tycko, B.,** The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*,2004. **4**: 143-53.
- 78. Szyf, M., Pakneshan, P. and Rabbani, S. A.,.** DNA methylation and breastcancer. *Biochem Pharmacol*,2004. **68**: p. 1187-97.
- 79. Tlsty, T. D., Crawford, Y. G., Holst, C. R., Fordyce, C. A., Zhang, J., McDermott, K., Kozakiewicz, K. and Gauthier, M. L.,** Genetic and epigenetic changes in mammary epithelial cells may mimic early events in carcinogenesis. *J Mammary Gland BiolNeoplasia* 2004. **9**: p. 263-74.
- 80. Lehmann, U., Hasemeier, B., Christgen, M., Muller, M., Romermann, D., Langer, F. and Kreipe, H.,** Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol.*,2008. **214**: p. 17-24.
- 81. Yang, N., Coukos, G. and Zhang, L.,** MicroRNA epigenetic alterations in human cancer: one step forward in diagnosis and treatment. *Int J Cancer*,2008. **122**: p. 963-8.
- 82. Mulero-Navarro, S. and Esteller, M.,** Epigenetic biomarkers for human cancer: The time is now. *Crit Rev Oncol Hematol*,2008
- 83. Hoque, M. O., Feng, Q., Toure, P., Dem, A., Critchlow, C. W., Hawes, S. E., Wood, T., Jeronimo, C., Rosenbaum, E., Stern, J.,** Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J Clin Oncol.*,2006. **24**: p. 4262-9

- 84. Colleoni M, Rotmensz N, Robertson C, Orlando L, Viale G, Renne G, Luini A, Veronesi P, Intra M, Orecchia R.,** Very young women (<35 years) with operable breast cancer: features of disease at presentation. *Ann Oncol*, 2002.**13**(2): p.273-279.
- 85. Kroman N., Jensen MB., Wohlfahrt J., Mouridsen HT., Andersen PK., Melbye M.,** Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: population based study. *Bmj*, 2000.**320**(7233): p. 474-478.
- 86. Canello G., Maisonneuve P., Rotmensz N., Viale G., Mastropasqua MG., Pruneri G., Veronesi P., Torrisi R., Montagna E., Luini A.,** Prognosis and adjuvant treatment effects in selected breast cancer subtypes of very young women (<35 years) with operable breast cancer. *Ann Oncol*
- 87. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S.,** Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Jama*, 2006, **295**(21): p. 2492-2502
- 88. Bauer KR., Brown M., Cress RD., Parise CA., Caggiano V.,** Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*, 2007. 109(9): p.1721-1728.
- 89. Sakorafas, G.H., Krespis, E., and Pavlakis, G.,** Risk estimation for breast cancer development; a clinical perspective. *Surg. Oncol.* 2002. 10:183-192.
- 90. Dumitrescu, R.G., and Cotarla, I.** Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J. Cell Mol. Med.*, 2005. 9:p.208-221.
- 91. Wu, W., Koike, A., Takeshita, T., and Ohta, T.,** The ubiquitin E3 ligase activity of BRCA1 and its biological functions. *Cell Div.*, 2008. 7:p. 3-1
- 92. Daly, P.A.,** Genetic counselling in breast and colorectal cancer. *Ann. Oncol. Suppl* , 2005, 2: p. 163-169
- 93. Dumitrescu, R.G., and Cotarla, I.** Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J. Cell Mol. Med.*, 2005, 9: p.208-221
- 94. Kvale G. HEUCH ,** Menstrual factors and breast cancer risk. *Cancer*, 1988b .**62**:p. 1625- 31
- 95. Feigelson, H.S., and Henderson, B.E.,** Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis*, 1996. 17: p.2279-2284.
- 96. Key, T., Appleby, P., Barnes, I., and Reeves, G.,** Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002. 94: p.606-616.
- 97. Jacobsen, BM., Richer, JK., Schittone, SA., and Horwitz, KB.,** New human breast cancer cells to study progesterone receptor isoform ratio effects and ligand-independent gene regulation. *J Biol Chem.*, 2002. 277: p. 27793- 800.

- 98. COLDITZ G, A. R. B.,** Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status : data from the Nurses Health Study. *Am. J. Epidemiol.*, 2000.152 : p.950-964.
- 99. Ross R, P.-H. A., Wan P, and Pike M.,** Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: oestrogen plus progestin. *J.Natl.Cancer Inst.*,2000.**92**: p. 328-332.
- 100. Chlebowski RT, H. S., Langer RD, Stefanick ML, GASS M, Lane D, Rodabough RJ, GILLIGAN MA, CYR MG, Thomson CA, Khandekar J, Petrovitch H. , Mctiernan A.,** influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women. *JAMA* 2003. 289 : p.3243 3254.
- 101. Anderson GL.,** Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy. *JAMA*,2004. 291 : p.1701-1712
- 102. Colditz, G. A., Rosner, B. A., Chen, W. Y., Holmes, M. D. & Hankinson, S. E.,** Risk factors for breast cancer according to estrogen and progesterone receptor status. *J Natl Cancer Inst*, 2004. 96 : p.218-28.
- 103. Claus, E. B., Stowe, M., Carter, D. & Holford, T.,** The risk of a contralateral breast cancer among women diagnosed with ductal and lobular breast carcinoma in situ: data from the Connecticut Tumor Registry. *Breast*,2003. 12 : p.451- 6
- 104. Russo, I. H. & Russo, J.,** Primary prevention of breast cancer by hormone induced differentiation. *Recent Results Cancer Res*, 2007. 174: p.111-30.
- 105. Russo, J., Balogh, G. A., Heulings, R., Mailo, D. A., Moral, R., Russo, P. A., Sheriff, F., Vanegas, J. & Russo, I. H.,** Molecular basis of pregnancy-induced breast cancer protection. *Eur J Cancer Prev*, 2006a.15 : p.306-42.
- 106. Russo, J., Fernandez, S. V., Russo, P. A., Fernbaugh, R., Sheriff, F. S., Lareef, H. M., Garber, J. & Russo, I. H.,** 17-Beta-estradiol induces transformation and tumorigenesis in human breast epithelial cells. *Faseb J*,2006b. 20 : p.1622-34
- 107. Thomas DB.,** Oral contraceptives and breast cancer: review of the epidemiologic literature. *Contraception*,1991.43: p.597-642
- 108. Malone KE., Daling JR., Weiss NS.,** Oral contraceptives in relation to breast cancer. *Epidemiol Rev*, 1993.15:p. 80-97
- 109. Romieu I., Berlin JA., Colditz GA.,** Oral contraceptives and breast cancer: review and meta analysis. *Cancer*,1990.66: p.2253-63
- 110. Narod, S.A., Dubé, M.P., Klijn, J.,** Oral contraceptives and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutations carriers, *J. Natl. Cancer. Inst.*, 2002, 94: p. 1173-1179
- 111. Mitrunen, K., Hirvonen, A.,** Molecular epidemiology of sporadic breast cancer : the role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism, *Mutation Research, Natl. Cancer. Inst.*, 2002. 94: p. 1173-1179.

- 112. Nkondjock, A., Ghadirian, P.,** *Epidemiology of breast cancer among BRCA mutation carriers : an overview, Cancer Letters, 2004.205 : p. 1-8*
- 113. Ohnson, Rebecca H., MD., Chien, Franklin L.BA., Bleyer, Archie, MD.,** *Incidence of Breast Cancer With Distant Involvement Among Women in the United States, 1976 to 2009. Journal of the American Medical Association, February 27, 2013. 309(8) : p 800-805*
- 114. E. F. Beaber, D. S. M. Buist, W. E. Barlow, K. E. Malone, S. D. Reed, C. I. Li,** *Recent Oral Contraceptive Use by Formulation and Breast Cancer Risk among Women 20 to 49 Years of Age. Cancer Research, 2014 . 74 (15)*
- 115. Gourinel, C., Buxeraud, J., Coulon, J.P., Lagarde, A., Comby, F., Bernard, M., Dossier,** *Le cancer du sein. Actualités Pharmaceutiques, 1996. 347: p. 37-47*
- 116. Longneker MP, B. J., Orza MJ, Chalmier TC.,** *A meta analysis of alcoholconsumption in relation to the risk of breast cancer. JAMA,1988. 260 : p. 652-6*
- 117. Plymate SR, H. R., Jones RE, Matei LA.,** *Régulation of sex hormone bindingglobulin production by growth factors. Metabolism, 1990. 39 : p.967-970*
- 118. Sinicrope FA., Dannenberg AJ .,** *Obesity and breast cancer prognosis: weight of the evidence. J Clin Oncol., 2011. 29(1): p. 4–7*
- 119. Jacques Saglier,** *Cancer du sein. ed Elsevier Masson, 2003.*
- 120. Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross,D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lonning,P.E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P.O., Botstein, D.,** *Molecular portraits of human breast tumours. Nature,2000. 406: p. 747-752*
- 121. Hergueta-Redondo, M., Palacios, J., Cano, A., Moreno-Bueno, G.,** *"New" molecular taxonomy in breast cancer. Clin Transl Oncol,2008, 10: p.777-785.*
- 122. Parker, J.S., Mullins, M., Cheang, M.C., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C.,He, X., Hu, Z., Quackenbush, J.F., Stijleman, I.J., Palazzo, J., Marron, J.S., Nobel, A.B., Mardis, E.,Nielsen, T.O., Ellis, M.J., Perou, C.M., Bernard, P.S.,** *Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. J Clin Oncol,2009, 27: p. 1160 1167*
- 123. Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H.,Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C.M., Lonning, P.E., Brown, P.O., Borresen-Dale, A.L.,Botstein, D.,** *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets,Proc Natl Acad Sci U S A,2003, 100:p. 8418-8423.*
- 124. Richard P.,** *Evidence that the gene YLR070c of Saccharomyces cerevisiae encodes a xylitol dehydrogenase. FEBS Lett.,1999. 457(1): p. 135-8.*

- 125. Carter D. H., Barnes J. M., Aaron J. E.,** *Histomorphometry of fresh frozen iliac crest bone biopsies. Calcif. Tissue Int., 1989.44: p. 387–392*
- 126. Amat S, Penault-Llorca F, Cure H, Le Bouedec G, Achard JL, Van Praagh I, Feillel V, Mouret-Reynier MA, Dauplat J, Chollet P.** *Scarff-Bloom- Richardson (SBR) grading: A pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy. Int J Oncol, 2002.20: p.791-796.*
- 127. Mauri FA, Maisonneuve P, Caffo O, Veronese S, Aldovini D, Ferrero S, Cozzaglio F, Dalla Palma P, Galligioni E, Barbareschi M.** *Prognostic value of estrogen receptor status can be improved by combined evaluation of p53, bcl2 and pgr expression: An immunohistochemical study on breast carcinoma with long-term follow-up. Int J Oncol 1999. 15:1137-1147*
- 128. Liu H.,** *Construction of a GAL1-regulated yeast cDNA expression library and its application to the identification of genes whose overexpression causes lethality in yeast. Genetics, 1992.132(3): p. 665-73*
- 129. Dittadi R, Donisi PM, Brazzale A, Cappellozza L, Brusca G, Gion M.** *Epidermal growth factor receptor in breast cancer. Comparison with non malignant breast tissue. Br J Cancer ,1993.67: p. 7- 9*
- 130. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D, Gray JW.** *ErbB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992.89: p. 5321-5325.*
- 131. Keshgegian AA, Cnaan A.** *Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, s-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, ki-67 and MIB-1. Am J Clin Pathol ,1995.104:p. 42-49*
- 132. Wenger CR, Clark GM.** *S-phase fraction and breast cancer—a decade of experience. Breast Cancer Res Treat 1998.51:255-265.*
- 133. Fitzgibbons PL, Connolly JL, Page DL.** *Updated protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the breast. Cancer committee. Arch Pathol Lab Med ,2000.124: p. 1026- 1033*
- 134. Houssami, N., Cuzick, J., and Dixon, J. M.,** *The prevention, detection, and management of breast cancer. Med. J. Aust., 2006. 184: p.230-234.*
- 135. Brennan, M., Wilcken, N., French, J., Ung, O., and Boyages, J.,** *Management of early breast cancer—the current approach. Aust. Fam. Physician, 2005. 34: p. 755-760.*
- 136. Wittliff, J. L.,** *Steroid-hormone receptors in breast cancer. Cancer, 1984. 53: p. 630-643.*
- 137. Lee, W. L., Cheng, M. H., Chao, H. T., and Wang, P. H.,** *The role of selective estrogen receptor modulators on breast cancer : from tamoxifen to raloxifene. Taiwan J Obstet Gynecol., 2008. 47: p.24-31*

- 138. Lucchi-Angellier, E.,** [Hormone therapy and breast cancer: a review. *Rev. Med. Interne*, 2001. 22: p.1213-1224
- 139. Howell, A.,** The future of fulvestrant ("Faslodex"). *Cancer Treat. Rev.* 2005. 31(2): p. 26-33
- 140. Kaufmann, M., Jonat, W., Kleeberg, U., Eiermann, W., Janicke, F., Hilfrich, J., Kreienberg, R., Albrecht, M., Weitzel, H.K., Schmid, H., and Goserelin,** a depot gonadotrophin-releasing hormone agonist in the treatment of premenopausal patients with metastatic breast cancer. German Zoladex Trial Group. *J. Clin. Oncol*, 1989. 7: p.1113-1119
- 141. Howell, A., and Dowsett, M.,** Endocrinology and hormone therapy in breast cancer: aromatase inhibitors versus antioestrogens. *Breast Cancer Res*, 2004. 6: p.269-274.
- 142. Yue, W., Wang, J.P., Li, Y., Bocchini, W.P., Korach, K.S., Devanesan, P.D., Rogan, E., Cavalieri, E., and Santen, R.J.,** Tamoxifen versus aromatase inhibitors for breast cancer prevention. *Clin. Cancer Res.*, 2005. 11: p.925-930.
- 143. Benghiat, A., Cassidy, S.A., Davidson, H.E., Mancero, F.S., Pickard, J.G., and Tyrrell, C.J.,** Megestrol acetate in the treatment of advanced post-menopausal breast cancer. *Eur. J. Surg. Oncol*, 1986. 12: p.43-45
- 144. Chow, L.W., Loo, W.T., and Toi, M.,** Current directions for COX-2 inhibition in breast cancer. *Biomed. Pharmacother*, 2005. 59 (2): p. 281-284.
- 145. Nicholson, R.I., Hutcheson, I.R., Britton, D., Knowlden, J.M., Jones, H.E., Harper, M.E., Hiscox, S.E., Barrow, D., and Gee, J.M.,** Growth factor signalling networks in breast cancer and resistance to endocrine agents: new therapeutic strategies. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2005. 93: p. 257-262
- 146. Anne Marjamaki, Marjo Pihlavisto, Victor Cockcroft, Petri Heinonen, Juha-matti Savola, and Mika Scheinin,** Chloroethylclonidine Binds Irreversibly to Exposed Cysteines in the Fifth Membrane-Spanning Domain of the Human α 2A-Adrenergic Receptor. *MOLECULAR PHARMACOLOGY*, 1998. 53: p. 370-376
- 147. Savarese TM. and Fraser CM.,** In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein coupled receptors. *Biochem J.*, 1992. 283: p.1- 19.
- 148. Scheer A., Fanelli F., Costa T., De Benedetti P., and Cotecchia S.,** Constitutively active mutants of the α 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *EMBO J.*, 1996. 15: p. 3566-3578
- 149. Hardman JG., Limbird LE., Molinoff P.,** Godman & Gilman-Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments. 9e edition. Mc Graw-Hill International (UK), 1998: p. 1677

- 150. Christina S. Pao and Jeffrey L. Benovic.** *Structure/Function Analysis of α_2 Adrenergic Receptor. Interaction with G Protein-coupled Receptor Kinase.* *the journal of biological chemistry*, 2005. 280(12): p. 11052–11058
- 151. C. Boudry B. Costes, G. Fournier, B. Dewals, A. Vanderplasschen,** *Les homologues viraux des récepteurs cellulaires couplés aux protéines G.* *revue Virologie* 2007, 11 (6) : 457-70
- 152. Christine Saunders, Lee E. Limbird,** *Localization and trafficking of α_2 -adrenergic receptor subtypes in cells and tissues.* *Pharmacology & Therapeutics*, 1999. 84: p. 193–205
- 153. Ahlquist, R. P.;** *A study of adrenotropic receptors.* *Am J Physiol.*, 1948. 153: p. 586–600
- 154. ADAMS HR.,** *Drugs acting on the central nervous system.* In: *Veterinary pharmacology and therapeutics.* 8th edition. Iowa State Press, 2001b : p. 1201.
- 155. Rosenbaum M., Malbon CC., Hirsch J., Laibel RL.,** *Lack of β_3 -adrenergic effect on lipolysis in human subcutaneous adipose tissue.* *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1993. 77: p. 352-355.
- 156. England et Clarke,** *Alpha(2) adrenoceptor agonists in the horse.* *British Veterinary Journal*, 1996; 152(6): p. 641-657.
- 157. Alberts P.,** *Subtype classification of presynaptic α_2 -adrenoceptors.* *Gen. Pharmatec*, 1993. 24: p. 1-8
- 158. Campbell, I.C., McKernan, R.M., Checkley, S.A., Glass, I.B., Thompson, C., Shur, E.,** *Characterization of platelet alpha adrenoceptors and measurement in control and 2 depressed subjects.* *Psychiatry Research*, 1985. 14: p. 17-31.
- 159. Umit Kazim O., Zdogan, Janne Lahdesma, Kristo Hakala, Mika Scheinin,** *The involvement of α_2A -adrenoceptors in morphine analgesia, tolerance and withdrawal in mice.* *European Journal of Pharmacology*, 2004. 497: p. 161–171
- 160. Regan, J. W., Kobilka, T. S., Yang-Feng, T. L., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., and Kobilka, B. K.,** *Cloning and expression of a human kidney cDNA for an alpha 2-adrenergic receptor subtype,* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1988. 85: p. 6301 6305
- 161. Gilsbach R., Brede M., Beetz N., Moura E., Muthig V., Gerstner C., Barreto F., Neubauer S., Vieira-Coelho MA., and Hein L.,** *Heterozygous α_2C -adrenoceptor-deficient mice develop heart failure after transverse aortic constriction.* *Cardiovasc Res.*, 2007. 75: p. 728–737

- 162. Bylund DB., Eikenberg DC., Hieble JP., Langer SZ., Lefkowitz RJ., Minneman KP., Molinoff PB., Ruffolo RR. Jr, and Trendelenburg U.,** International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev.*,1994. 46: p.121–136
- 163. Bylund, D. B., & Martinez, J. R.,** Alpha 2-adrenergic receptors appear in rat salivary glands after reserpine treatment. *Nature*, 1980. 285: p. 229– 230.
- 164. Starke K. , Endo T., and Taube HD.,**Pre- and postsynaptic components in effect of drugs with alpha adrenoceptor affinity. *Nature*,1975. 254: p.440–441
- 165. Ralf Gilsbach, Christoph Ro ser, Nadine Beetz, Marc Brede, Kerstin Hadamek, Miriam Haubold, Jost Leemhuis, Melanie Philipp, Johanna Schneider, Michal Urbanski, Bela Szabo, David Weinshenker, and Lutz Hein,** Genetic Dissection of 2-Adrenoceptor Functions in Adrenergic versus Nonadrenergic Cells. *MOLECULAR PHARMACOLOGY*,2009. 75(5): p.1160 1170
- 166. MacDonald, E., Kobilka, B. K., & Sheinin, M.,** Gene targeting homing in on α 2-adrenoceptor subtype function. *Trends Pharmacol Sci.*,1997. 18: p.211–219
- 167. Valet, P., Pages, C., Jeanneton, O., Daviaud, D., Barbe, P., Record, M., Saulnier-Blache, J. S., & Lafontan, M.,** Alpha2-adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes. A paracrine signal for preadipocyte growth. *J Clin Invest.*,1998. 101: p. 1431– 1438
- 168. Valet, P., Pages, C., Jeanneton, O., Daviaud, D., Barbe, P., Record, M., Saulnier-Blache, J. S., & Lafontan, M.,** Alpha2-adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes. A paracrine signal for preadipocyte growth. *J Clin Invest.*,1998. 101: p. 1431– 1438
- 169. Bockman, C. S., Jeffries, W. B., & Abel, P. W.,** Binding and functional characterization of alpha-2 adrenergic receptor subtypes on pig vascular endothelium. *J Pharmacol Exp Ther.*,1993. 267: p. 1126–1133.
- 170. Jones, C. J., DeFily, D. V., Patterson, J. L., & Chilian, W. M.,**Endothelium-dependent relaxation competes with alpha 1- and alpha2-adrenergic constriction in the canine Σ epicardial coronary microcirculation. *Circulation*, 1993. 87: p. 1264–1274
- 171. Lanier, S., Downing, S., Duzic, E., & Homcy, C. J.,**Isolation of rat genomic clones encoding subtypes of the alpha-2 adrenergic receptor. Identification of a unique receptor subtype. *J Biol Chem.*,1991. 266: p. 10470 -10478.
- 172. Huang, Y., Gil, D. W., Vanscheeuwijck, P., Stamer, W. D., & Regan, J. W.,** Localization of alpha 2-adrenergic receptor subtypes in the anterior segment of the human eye with selective antibodies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 1995. 36: p. 2729–2739
- 173. Stamer, W. D., Huang, Y., Seftor, R. E., Svensson, S. S., Snyder, R. W., &Regan, J. W.,** Cultured human trabecular meshwork cells express functional alpha 2A adrenergic receptors. *Invest Ophthalmol VisSci.*,1996. 34: p. 2803–2812

- 174. Wang, R. X., & Limbird, L. E.,** *Distribution of mRNA encoding three alpha 2-adrenergic receptor subtypes in the developing mouse embryo suggests a role for the alpha 2A subtype in apoptosis. Mol Pharmacol., 1997. 52: p. 1071–1080*
- 175. Wang, S. Y., & Pilkey, D. T.,** *Identification in islets of Langerhans of a new rat alpha 2-adrenergic receptor. Diabetes, 1994. 43: p. 127–136*
- 176. Lockette, W., Ghosch, S., Farrow, S., MacKenzie, S., Baker, S., Miles, P., Schock, A., & Cadaret, L.,** *Alpha 2-adrenergic receptor gene polymorphism and hypertension in blacks. Am J Hypertens., 1995. 8: p. 390–394*
- 177. Summers, R. J.,** *Renal alpha adrenoceptors. Fed Proc., 1984. 43: p. 2917–2922.*
- 178. Clarke, D., & Garg, L. C.,** *Alpha 2 adrenergic receptors in inner medullary collecting duct cells of the rabbit kidney. J Pharmacol Exp Ther., 1993. 264 : p. 879–888*
- 179. Cécile Cayla, Stéphane Schaak, Pierre-Antoine Crassous, Bénédicte Buffin-Meyer, Christine Delage, Hervé Paris, Jean-Michel Senard, Colette Denis,** *Transcriptional down-regulation of human α 2A-adrenoceptors by IFN γ and TNF α in intestinal cells European Journal of Pharmacology, 2008. 588 : p.33–40*
- 180. Unnerstall JR., Kopajtic TA., Kuhar MJ.,** *Distribution of α 2 agonist binding sites in the rat and human central nervous system: Analysis of some functional, anatomic correlates of the pharmacologic effects of clonidine and related adrenergic agents. Brain Res.Rev., 1984. 7: p. 69-101.*
- 181. Menani JV., Saad WA., Camargo LA., Antunes-Rodrigues J., Covian MR., Saad WA.,** *Effect of cholinergic and adrenergic stimulation of the subfornical organ on water intake. Pharmacol Biochem Behav., 1984. 20: p. 301–306*
- 182. Schmidt ME., Matochik JA., Risinger RC., Schouten JL., Zametkin AJ., Cohen RM., Potter WZ.** *Regional brain glucose metabolism after acute alpha 2-blockade by idazoxan. Clin Pharmacol Ther., 1995. 57(6): p. 684–695*
- 183. Murrin LC., Gerety ME., Happe HK., Bylund DB.,** *Inverse agonism at alpha(2)-adrenoceptors in native tissue. Eur J Pharmacol., 2000. 398: p. 185–191.*
- 184. Small KM., Brown KM., Forbes SL., Liggett SB.,** *Polymorphic deletion of three intracellular acidic residues of the alpha 2B adrenergic receptor decreases G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation and desensitization. J Biol Chem., 2001. 276: p. 4917–4922*
- 185. Daniel Kurnik, Mordechai Muszkat, Chun Li, Gbenga G. Sofowora, Joseph Solus, Hong-Guang Xie, Paul A. Harris, Lan Jiang, Chara McMunn, Patrick Ihrie,**

- vElliott P., Dawson, Scott M. Williams, Alastair J. J. Wood, and Michael Stein, MD*
Nashville and Murfreesboro, Tenn Variations in the 2A-adrenergic receptor gene
and their functional effects *CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS*, 2006.
79(3): p. 173-85
- 186.** <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ADRA2A>
- 187. Starke K.**, Presynaptic autoreceptors in the third decade: focus on alpha2-
adrenoceptors. *J Neurochem.*,2001. 78: p. 685 693
- 188. Eason, M. G., Moreira, S. P., and Liggett, S. B.**, Four consecutive serines in the
third intracellular loop are the sites for beta-adrenergic receptor kinase-mediated
phosphorylation and desensitization of the alpha 2A-adrenergic receptor.*J. Biol.*
Chem.,1995. 270: p. 4681–4688
- 189. Altman JD., Trendelenburg AU., MacMillan L., Bernstein D., Limbird L., Starke**
K., Kobilka BK., Hein L., Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in
alpha2A-adrenergic receptor knockout mice. *Mol Pharmacol.*, 1999. 56: p. 154–61.
- 190. Makaritsis KP., Johns C., Gavras I., Altman JD., Handy DE., Bresnahan MR.,**
Gavras H.,Sympathoinhibitory function of the alpha(2A)-adrenergic receptor
subtype. *Hypertension*,1999. 34: p. 403–7.
- 191. Gavras I., Manolis AJ., Gavras H.**, The alpha2 –adrenergic receptors in
hypertension and heart failure: experimental and clinical studies. *J Hypertens.*,
2001. 19: p. 2115–2124
- 192. Inna Belfer, Beata Buzas, Heather Hipp Gabriel Phillips, Julie Taubman, Ilona**
Lorincz Catherine Evans, Robert H., Lipsky, Mary-Anne Enoch Mitchell B., Max
David Goldman, Haplotype-based analysis of alpha 2A, 2B, and 2C adrenergic
receptor genes captures information on common functional loci at each gene .
line: The Japan Society of Human Genetics and Springer-Verlag .J Hum Genet., 2005. 50:
p. 12–202004
- 193. Lakhani, P.P., MacMillan, L.B., Guo, T.Z., McCool, B.A., Lovinger, D.M., Maze,**
M., Limbird, L.E., Substitution of a mutant alpha2adrenergic receptor via hit and
run gene targeting reveals the role of this subtype in sedative, analgesic, and
anesthetic-sparing responses in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*,1997. 94: p.
9950–9955.
- 194. Hunter, J.C., Fontana, D.J., Hedley, L.R., Jasper, J.R., Lewis, R., Link, R.E., Secchi,**
R., Sutton, J., Eglen, R.M., 1997. Assessment of the role of alpha2-adrenoceptor
subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of
dexmedetomidine in transgenic mice. *Br. J. Pharmacol.* 122, 1339 1344
- 195. Lahdesma J., Sallinen, J., MacDonald, E., Kobilka, B.K., Fagerholm, V., Scheinin,**
M., Behavioral and neurochemical characterization of alpha(2A)-adrenergic
receptor knockout mice. *Neuroscience*,2002. 113: p.289–299

- 196. Stone, L.S., MacMillan, L.B., Kitto, K.F., Limbird, L.E., Wilcox, G.L.,** *The alpha2a adrenergic receptor subtype mediates spinal analgesia evoked by alpha2 agonists and is necessary for spinal adrenergic-opioid synergy. J. Neurosci.,1997. 17: p.7157–7165*
- 197. Arbab Sikander, Satya Vati Rana, Sanjeev K. Sharma, Saroj Kant Sinha, Sunil K. Arora, Kaushal Kishor Prasad, Kartar Singh,** *Association of alpha 2A adrenergic receptor gene(ADRA2A) polymorphism with irritable bowel syndrome, microscopic and ulcerative colitis . Clinica Chimica Acta .,2010. 411: p. 59–63*
- 198. Hein L., Altman JD., Kobilka BK.,** *Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. Nature, 1999. 402:p. 181–4*
- 199. Liggett, S. B., Ostrowski, J., Chesnut, L. C., Kurose, H., Raymond, J. R., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J.,** *Sites in the third intracellular loop of the alpha 2A-adrenergic receptor confer short term agonist-promoted desensitization. Evidence for a receptor kinase-mediated mechanism. J. Biol. Chem.,1992. 267: p.4740–4746*
- 200. Wu, G., Krupnick, J. G., Benovic, J. L., and Lanier,** *Interaction of arrestins with intracellular domains of muscarinic and alpha2-adrenergic receptors. S. M. J. Biol. Chem., 1997. 272: p.17836–17842*
- 201. DeGraff, J. L., Gurevich, V. V., and Benovic, J. L.** *The third intracellular loop of alpha 2-adrenergic receptors determines subtype specificity of arrestin interaction.J. Biol. Chem.,2002. 277: p. 43247–43252*
- 202. Wade, S. M., Dalman, H. M., Yang, S. Z., and Neubig, R. R.** *Mol.Pharmacol.,1994. 45 : p.1191–1197*
- 203. Richman, J. G., Brady, A. E., Wang, Q., Hensel, J. L., Colbran, R. J., and Limbird, L. E.,** *Agonist-regulated Interaction between alpha2-adrenergic receptors and spinophilin. J. Biol. Chem.,2001 .276: p.15003–1500*
- 204. Prezeau, L., Richman, J. G., Edwards, S. W., and Limbird, L. E.** *The zeta isoform of 14-3-3 proteins interacts with the third intracellular loop of different alpha2-adrenergic receptor subtypes.J. Biol.Chem.,1999. 274; p. 13462–13469*
- 205. Wang, Q., Zhao, J., Brady, A. E., Feng, J., Allen, P. B., Lefkowitz, R. J., Greengard, P., and Limbird, L. E.** *Spinophilin blocks arrestin actions in vitro and in vivo at G protein-coupled receptors. Science, 2004.304: p. 1940–194*
- 206. MacMillan LB., Hein L., Smith MS., Piascik MT., and Limbird LE.,** *Central hypotensive effects of the 2A-adrenergic receptor subtype. Science,1996. 273: p.801–803.*
- 207. Maze M., Scarfini C., and Cavaliere F.,** *New agents for sedation in the intensive care unit. Crit Care Clin.,2001. 17: p.881–897*
- 208. Link RE., Desai K., Hein L., Stevens ME., Chruscinski A., Bernstein D., Barsh GS.,and Kobilka BK .,** *Cardiovascular regulation in mice lacking 2-adrenergic receptor subtypes b and c. Science, 1996. 273: p. 803–805*

- 209. Wang M., Ramos BP., Paspalas CD., Shu Y., Simen A., Duque A., Vijayraghavan S., Brennan A., Dudley A., Nou E.,** *2-Adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. Cell, 2007. 129: p. 397–410*
- 210. Lafontan M., Berlan M.,** *Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. Endocr Rev., 1995. 16: p. 716-38.*
- 211. Niddam R., Angel .I, Bidet S., Langer SZ.,** *Pharmacological characterization of alpha-2 adrenergic receptor subtype involved in the release of insulin from isolated rat pancreatic islets. J Pharmacol Exp Ther., 1990. 254: p. 883-7.*
- 212. Small KM., Forbes SL., Brown KM., Liggett SB.,** *An Asn to Lys polymorphism in the third intracellular loop of the human alpha 2A-adrenergic receptor imparts enhanced agonist-promoted Gi coupling. J Biol Chem. 2000. 275: p. 38518-23*
- 213. LIN Ying, ZHU Xi, YAO Wan-zhen, YANG Yan-lin, A La-ta and CHEN Li,** *Yohimbine protects against endotoxin-induced acute lung injury by blockade of alpha 2A adrenergic receptor in rats. Chinese Medical Journal, 2011.124(7): p. 1069-1074*
- 214. Philipp M., Brede ME., Hadamek K., Gessler M., Lohse MJ., and Hein L.,** *Placental α 2-adrenoceptors control vascular development at the interface between mother and embryo. Nat Genet., 2002. 31: p. 311–315.*
- 215. De Vos, H., A. Convents, J. De Keyser, J.-P. De Backer, I.J.B. VanMegen, G. Ebinger and G. Vauquelin,** *Autoradiographic distribution of α 2 adrenoceptors, NAIBS, and 5-HT_{2A} receptors in human brain using [³H]idazoxan and [³H]rauwolscine, Brain Res. 1991. 566: p. 13*
- 216. Sastre, M. and J.A. Garcia-Sevilla,** *α 2-Adrenoceptor subtypes identified by [³H]RX821002 binding in the human brain: the agonist guanoxabenz does not discriminate different forms of the predominant α 2A subtype, J. Neurochem., 1994. 63: p. 1077*
- 217. Sallinen, J., Link, R. E., Haapalinna, A., Viitamaa, T., Kulatunga, M., Sjöholm, B., Macdonald, E., Pelto-Huikko, M., Leino, T., Barsh, G. S., Kobilka, B. K., & Scheinin, M.,** *Genetic alteration of alpha 2C adrenoceptor expression in mice: influence on locomotor, hypothermic, and neurochemical effects of dexmedetomidine, a subtype-nonspecific alpha 2-adrenoceptor agonist. Mol Pharmacol., 1997. 51: p. 36–46*
- 218. Nicholas, A. P., Pieribone, V., & Hökfelt, T.,** *Distributions of mRNAs for alpha-2 adrenergic receptor subtypes in rat brain: an in situ hybridization study. J Comp Neurol., 1993. 328; p. 575–594*
- 219. Wang, R., MacMillan, L. B., Fremeau, R. T., Jr., Magnuson, M. A., Lindner, J., & Limbird, L. E.** *Expression of α 2-adrenergic receptor subtypes in the mouse brain:*

- evaluation of spatial and temporal information imparted by 3 kb of 59 regulatory sequence for the α 2A ARreceptor gene in transgenic animals. Neuroscience,1996. 74 : p. 199–218*
- 220. Scheinin, M., Lomasney, J. W., Hayden-Hixson, D. M., Schambra, U. B., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., & Fremeau, R. T., Jr.,** *Distribution of alpha 2-adrenergic receptor subtype gene expression in ratbrain. Brain Res Mol Brain Res.,1994. 21: p. 133–149*
- 221. Small KM., Brown KM., Seman CA., Theiss CT., Liggett SB.,** *Complex haplotypes derived from noncoding polymorphisms of the intronless alpha2A-adrenergic gene diversify receptor expression. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103: p. 5472–7.*
- 222. Bella, J. N., Devereux, R. B. & Basson, C. T.** *in Molecular Mechanisms of Cardiac Hypertrophy and Failure, ed. Walsh, R. A. (Taylor & Francis, London), 2005 : p. 477–499.*
- 223. Seidell, J. C.,** *Epidemiology of obesity. Semin. Vasc. Med.,2005. 5 :p. 3–14.*
- 224. Givertz, M. M.,** *Underlying causes and survival in patients with heart failure.N. Engl. J. Med., 2000. 342: p.1120–1122*
- 225. Kersten M., Small, Kari M. Brown, Carrie A. Seman, Cheryl T. Theiss, and Stephen B. Liggett,** *Complex haplotypes derived from noncoding polymorphisms of the intronless 2A-adrenergic gene diversify receptor expression.PNAS, 2006. 103(14): p. 5472–5477*
- 226. Hamann, C.Brieske, J. Tafel, P Buttron, B. Schwarzloh, H. Mu Ènzberg, A. Hinney, H. Mayer, W. Siegfrie,J. Hebebrand, H. Greten, P., Algenstaedt and R. Ziegler.** *European Journal of Endocrinology, 2001. 144: p. 0804-4643.*
- 227. Westfall TC. and Westfall DP.,** *Adrenergic agonists and antagonists, in Goodman & Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics (Brunton LL, Lazo JS and Parker KL eds),2006 : p. 237–295*
- 228. Walter SA., Ragnarsson G., Bodemar G.,** *New criteria for irritable bowel syndrome based on prospective symptom evaluation. Am J Gastroenterol 2005. 100: p. 2598–609*
- 229. Camilleri M., Choi MG.,** *irritable bowel syndrome. Aliment Pharmacol Ther., 1997. 11: p. 3–15.*

- 230. Mitchell CM., Drossman DA.,** *Survey of the AGA membership relating to patients with functional gastrointestinal disorders. Gastroenterol., 1987. 92: p. 1282–4*
- 231. Bharucha AE., Camilleri M., Zinsmeister AR., Hanson RB.,** *Adrenergic modulation of human colonic motor and sensory function. Am J Physiol., 1997. 36: p. 997–1006.*
- 232. Viramontes BE., Malcolm A., Camilleri M., Szarka LA., Mckinzie S., Burton DD.,** *Effects of alpha 2-adrenergic agonist on gastrointestinal transit, colonic motility and sensation in humans. Am J Physiol., 2001. 281: p. 1468–1476*
- 233. Kollef MH., Schuster DP.,** *The acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med., 1995. 332: p. 27-37*
- 234. Phua J., Badia JR., Adhikari NK., Friedrich JO., Fowler RA., Singh JM.,** *Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time? A systematic Respir Crit Care Med., 2009. 179: p. 220-227.)*
- 235. Flierl MA., Rittirsch D., Nadeau BA., Chen AJ., Sarma JV., Zetoune FS.,** *Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. Nature, 2007. 449: p. 721-725*
- 236. Miksa M., Wu R., Zhou M., Wang P.,** *Sympathetic excitotoxicity in sepsis: pro-inflammatory priming of macrophage norepinephrine. Front Biosci., 2005. 10: p. 2217-2229*
- 237. Stevens SE., Sonuga-Barke EJ., Kreppner JM., Beckett C., Castle J., Colvert E., Groothues C., Hawkins A., Rutter M.,** *Inattention/overactivity following early severe institutional deprivation: presentation and associations in early adolescence. Journal of Abnormal Child Psychology, 2008. 36(3): p.385-98*
- 238. Faraone S., Biederman J., Mick E.,** *The age dependent decline of attention deficit/hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. Psychological Medicine, 2006. 36(2): p. 159-165.*
- 239. Faraone SV., Perlis RH., Doyle AE., Smoller JW., Goralnick JJ., Holmgren MA., Sklar P.,** *Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. Biological Psychiatry, 2005. 57(11): p. 1313-1323*
- 240. Comings DE., Gade-Andavolu R., Gonzalez N., Blake H., Wu S., MacMurray JP.** *Additive effect of three noradrenergic genes (ADRA2a, ADRA2C, DBH) on attention-deficit hyperactivity disorder and learning disabilities in Tourette syndrome subjects. Clin Genet., 1999. 55: p. 160–172*
- 241. Park L., Nigg JT., Waldman ID., Nummy KA., Huang-Pollock C., Rappley M.,** *Association and linkage of alpha-2A adrenergic receptor gene polymorphisms with childhood ADHD. Mol Psychiatry, 2004. 10: p. 572–580.*

- 242. Roman T., Schmitz M., Polanczyk GV., Eizirik M., Rohde LA., Hutz MH.** *Is the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) associated with attention-deficit/hyperactivity disorder? Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.,2003. 120: p. 116–120*
- 243. Stevenson J., Langley K., Pay H., Payton A., Worthington J., Olliver W.,** *Attention deficit hyperactivity disorder with reading disabilities: Preliminary genetic findings on the involvement of the ADRA2A gene. J Child Psychol Psychiatry,2005. 46: p. 1081–1088*
- 244. Wang B. , Wang Y., Zhou R. Li J., Qian Q., Yang L.,***Possible association of the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) with symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.,2006. 141: p. 130–134*
- 245. Xu C., Schachar R., Tannock R., Roberts W., Malone M., Kennedy JL.,** *Linkage study of the alpha2A adrenergic receptor in attention-deficit hyperactivity disorder families. Am J Med Genet., 2001. 105: p. 159–162*
- 246. Jablensky, A., Sartorius, N., Ernberg, G., Anker, M., Korten, A., Cooper, J.E., Day, R., Bertelsen, A.,***Schizophrenia: t manifestations, incidence and course in different cultures: a. World Health Organization Ten Country Study. Psychol.. Med.1992. 22(20): p. 1–97*
- 247. Jarmo Hietala , Erkkä Syva lahti , Harry Vilkmán , Klaus Vuorio , Viljo ,Jo rgen Bergman, Merja Haaparanta, Olof Solin ,Mikko Kuoppama, Esa Eronen, Ulla Ruotsalainen , Raimo K.R. Salokangas,** *Depressive symptoms and presynaptic dopamine function in neuroleptic-naive schizophrenia. Schizophrenia Research.,1999. 35: p. 41–50*
- 248. Lochman J., Balcar VJ, Štátný F, Serý O.,** *Preliminary evidence for association between schizophrenia and polymorphisms in the regulatory Regions of the ADRA2A, DRD3 and SNAP-25 Genes. Psychiatry Res.,2013. 30: p. 7-12*
- 249. Clayton Finley J. Jr., Michael O'Leary, Derin Wester, Steven MacKenzie, Neil Shepard, Stephen Farrow, Warren Lockette,***A genetic polymorphism of the α_2 -adrenergic receptor increases autonomic responses to stress. Journal of Applied Physiology, 2004. 96(6): p. 2231-2239*

- 250. Calhoun DA. and Mutinga ML.,** Race, family history of hypertension, and sympathetic response to cold pressor testing. *Blood Press*, 1997. 6: p. 209-213,
- 251. Kasagi F., Akahoshi M., and Shimaoka K.,** Relation between cold pressor test and development of hypertension based on 28-year follow-up. *Hypertension*, 1995. 25: p. 71-76
- 252. Markovitz JH., Raczynski JM., Wallace D., Chettur V., and Chesney MA.,** Cardiovascular reactivity to video game predicts subsequent blood pressure increases in young men: The CARDIA study. *Psychosom Med.*, 1998.60: p. 186-189,
- 253. Toto-Moukous J., Um JP., Jon JP., and Hagbe P.,** Hemodynamic reactivity factors to cold pressor test in blacks with sustained essential hypertension. *Am J Hypertens.*,1993. 6: p. 824-829
- 254. Badoer E., Head GA., Korner PI.,** Effects of intracisternal and intravenous α -methyl dopa and clonidine of hemodynamics and baroreceptor-heart rate reflex properties in conscious rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol.*,1983. 5: p. 760-767,
- 255. Eisenhofer G., Cox HS., and Esler MD.,** Noradrenaline reuptake and plasma dihydroxyphenylglycol during sustained changes in sympathetic activation in rabbits. *J Auton Nerv Syst.*,1991. 32: p. 217-231
- 256. Kessler, R.C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Koretz, D., Merikangas, K.R., Rush, A.J., Walters, E.E., Wang, P.S.,** The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA*,2003. 289: p. 3095-3105
- 257. Elhwuegi, A.S.,** Central monoamines and their role in major depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2004. 28: p. 435-451
- 258. Bunney WE., Davis JM.,** Norepinephrine in depressive reactions. *Arch Gen Psychiatry*, 1965. 13: p. 483-494
- 259. Schildkraut JJ.,**The catecholamine hypothesis of affective disorders: A review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*,1965. 122: p. 509-522
- 260. Garcia-Sevilla, J.A., Zis, A.P., Hollingsworth, P.J., Greden, J.F., Smith, C.B.,** Platelet α -2-adrenergic receptors in major depressive disorder: binding of tritiated clonidine before and after tricyclic antidepressant drug treatment. *Archives of General Psychiatry*, 1981. 38: p. 1327-1333
- 261. Siever LJ., Davis KL.** Overview: Toward a dysregulation hypothesis of depression. *Am J Psychiatry*,1985. 142: p. 1017-1031.
- 262. Garcia a-Sevilla, Pedro Ventayol, Vctor Perez, Gregoire Rubovszky, Dolores Puigdemont2, Marcel Ferrer-Alco, Antonio Andreoli, Jose Guimo and Enric Alvarez,** Regulation of Platelet α 2A-Adrenoceptors, Gi Proteins and Receptor Kinases

- in Major Depression: Effects of Mirtazapine Treatment. Neuropsychopharmacology, 2004. 29: p. 580–588*
- 263. Michael Maes, An Van Gastel, Laure Delmeire, and Herbert Y. Meltzer.** *Decreased Platelet Alpha-2 Adrenoceptor Density in Major Depression: Effects of Tricyclic Antidepressants and Fluoxetine. Society of Biological Psychiatry, 1999. 45: p. 278–284*
- 264. Gonzalez, A.M., Pascual, J., Meana, J.J., Barturen, F., del Arco, C., Pazos, A. and Garcia-Sevilla, J.A.,** *Autoradiographic demonstration of increased α_2 -adrenoceptor agonist binding sites in the hippocampus and frontal cortex of depressed suicide victims, J. Neurochem., 1994. 63: p. 256-265*
- 265. Garcia-Sevilla, J.A.,** *Platelet α_2 -adrenoceptor function in depression and response to drug treatment. In: Leonard, B., Spencer, P. Eds. , Antidepressants: Thirty Years On. CNS Clinical Neuroscience Publishers, London, 1990. p. 163-168.*
- 266. Garcia-Sevilla, J.A., Udina, C., Fuster, M.J., Alvarez, E., Casas, M.,** *Enhanced binding of 3H adrenaline to platelets of depressed patients with melancholia: effect of long-term clomipramine treatment. Acta Psychiatrica Scandinavica, 1987. 75: p. 150-157.*
- 267. Garcia-Sevilla, J.A., Guimon, J., Garcia-Vallejo, P., Fuster, M.J.,** *Biochemical and functional evidence of supersensitive platelet α_2 -adrenoceptors in major affective disorder: effect of long-term lithium carbonate treatment. Archives General Psychiatry, 1986. 43: p. 51-57.*
- 268. Smith, C.B., Hollingsworth, P.J., Garcia-Sevilla, J.A., Zis, A.P.,** *Platelet alpha adrenoceptors are decreased in number after antidepressant therapy. Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry, 1983. 7: p. 241-247.*
- 269. Doyle, M.C., George, A.J., Ravindran, A.U., Philpott, R.,** *Platelet alpha-2-adrenergic receptor binding in elderly depressed patients. American Journal of Psychiatry, 1985. 142: p. 1489-1490.*
- 270. Carstens, M.E., Engelbrecht, A.H., Russell, V.A., Aalbers, C., Gagiano, C.A., Chalton, D.O., Taljaard, J.J.F.,** *Alpha -adrenoceptor levels on platelets of patients with 2 major depressive disorders. Psychiatry Research, 1986. 18: p. 321-331.*
- 271. Piletz, J.E., Halaris, A., Saran, A., Marler, M.,** *Elevated 3H para-aminoclonidine binding to platelet purified plasma membranes from depressed patients. Neuropsychopharmacology, 1990. 3: p. 201-210.*

- 272. Piletz, J.E., Halaris, A., Saran, A., Marler, M.R.,** *Desipramine lowers tritiated para-aminoclonidine binding in platelets of depressed patients. Archives of General Psychiatry, 1991. 48: p. 813-820.*
- 273. Piletz, J.E., Halaris, A.,** *Super high affinity H para- w 3 x aminoclonidine binding to platelet adrenoceptors in depression. Progress Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry, 1988. 12: p. 541-553.*
- 274. Piletz, J.E., Schubert, D.S.P., Halaris, A.,** *Evaluation of studies on platelet alpha adrenoreceptors in depressive 2 illness. Life Sciences, 1986. 39 : p. 1589-1616.*
- 275. Pandey, G.N., Pandey, S.C., Davies, J.M.,** *Peripheral adrenergic receptors in affective illness and schizophrenia. Pharmacology and Toxicology, 1990. 66: p. 13-36.*
- 276. Takeda, T., Harada, T., Otsuki, S.,** *Platelet H clonidine w 3 x and H imipramine binding and plasma cortisol level in w 3 x depression. Biological Psychiatry, 1989. 26: p. 52-60*
- 277. Carolina Muguruza, Fernando Rodríguez , Isabel Rozas , Javier Meana, Leyre Urigüen, Luis F., Callad,** *Antidepressant-like properties of three new α 2-adrenoceptor antagonists. Neuropharmacology, 2013. 65 : p. 13-19*
- 278. Bhatia, S.C., Hsieh, H.H., Theesen, K.A., Townley, R.G., Andersen, J.M., Weiss, S., Agrawal, D.K.,** *Platelet alpha-2 adrenoreceptor activity pre-treatment and posttreatment in major depressive disorder with melancholia. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, 1991. 74: p. 47-57*
- 279. Healy, D.T., Paykel, E.S., Whitehouse, A.M., White, W., Wilton-Cox, H., Johnson, A.L., Theodorou, A.E., Lawrence, K., Horton, R.W.,** *Platelet H imipramine and w 3 x α 2-adrenoceptor binding in normal subjects during desipramine administration and withdrawal. Neuropsychopharmacology, 1991. 4: p. 117-124.*
- 280. Braddock, L., Cowen, P.J., Elliott, J.M., Fraser, S., Stump, K.,** *Binding of yohimbine and imipramine to platelets in depressive illness. Psychological Medicine, 1986. 16: p. 765-773.*
- 281. Georgotas, A., Schweitzer, J., McCue, R.E., Armour, M., Friedhoff, A.J.,** *Clinical and treatment effects onw 3H clonidine and H imipramine binding in elderly de- x w 3 x pressed patients. Life Sciences, 1987. 40: p. 2137-2143.*

- 282. Tadokoro, C., Kiuchi, Y., Yamazaki, Y., Oguchi, K., Kamijima, K.,** *Effects of imipramine and sertraline on protein kinase activity in rat frontal cortex. European Journal of Pharmacology, 1998. 342: p. 51-54*
- 283. Wolfe, N., Cohen, B.C., Gelenberg, A.J.,** *Alpha -adren- 2 ergic receptors in platelet membranes of depressed patients: increased affinity for H yohimbine. Psychiatry Research 1987. 20: p. 107-116.*
- 284. Werstiuk, E.S., Auffarth, S.E., Coote, M., Gupta, R.N., Steiner, M.,** *Platelet a 2- adrenergic receptors in depressed patients and healthy volunteers: the effects of desipramine. Pharmacopsychiatry, 1992. 25: p. 199-206.*
- 285. Sevy, S., Papadimitriou, G.N., Surmont, D.W., Goldman, S., Mendlewicz, J.,** *Noradrenergic function in generalized anxiety disorder, major depressive disorder, and healthy subjects. Biological Psychiatry, 1989. 25: p. 141-152.*
- 286. Daiguji, M., Meltzer, H.Y., Tong, C., U'Prichard, D.C., Young, M., Kravitz, H.,** *a 2- Adrenergic receptors in platelet membranes of depressed patients: no change in number of w 3H yohimbine affinity. Life Sciences, 1981. 29: p. 2059 -2064*
- 287. Lenox, R.H., Ellis, J.E., Van Riper, D.A., Ehrlich, Y.H., Peyser, J.M., Shipley, J.E., Weaver, L.A.,** *Platelet a 2-adrenergic receptor activity in clinical studies of depression. In: Usdin, E., Goldstein, M., Friedhoff, A.J., Georgotas, A. Eds. ,Frontiers in Neuropsychiatric Research. MacMillan Press, London, 1983. p 331-356.*
- 288. Pimoule, C., Briley, M.S., Gay, C., Loo, H., Sechter, D., Zarifian, E., Raisman, R., Langer, S.Z.,** *w 3H Rauwolscine binding in platelets from depressed x patients and healthy volunteers. Psychopharmacology, 1983. 79: p. 308-312.*
- 289. Siever, L.J., Kafka, M.S., Targum, S., Lake, C.R.,** *Platelet alpha-adrenergic binding and biochemical responsiveness in depressed patients and controls. Psychiatry Research, 1984. 11: p. 287-302.*
- 290. Stahl, S.M., Lemoine, P.M., Ciaranello, R.D., Berger, P.A.,.** *Platelet alpha - adrenergic receptor sensitivity in ma- 2 jor depressive disorder. Psychiatry Research, 1983. 10: p. 157-164.*
- 291. Adolfo Sequeira , Firoza Mamdani , Aleksandra Lalovic , Milena Anguelova Alain Lesage , Monique Seguin , Nadia Chawky , Alex Desautels , Gustavo Turecki**

- . *Alpha 2A adrenergic receptor gene and suicide. Psychiatry Research, 2004. 125: p. 87–93*
- 292. Arango, V., Ernsberger, P., Marzuk, P.M., Chen, J.S., Tierney, H., Stanley, M., Reis, D.J. and Mann, J.J.,** *Autoradiographic demonstration of increased serotonin 5-HT₂ and β -adrenergic receptor binding sites in the brain of suicide victims, Arch. Gen. Psychiatry, 1990. 47: p. 1038-1047.*
- 293. Meana, J.J., Barturen, F. and Garcla-Sevilla, J.A.,** *α 2-Adrenoceptors in the brain of suicide victims: increased receptor density associated with major depression, Biol. Psychiatry, 1992. 31: p. 471-490.*
- 294. Stockmeier, C.A. and Meltzer, H.Y.,** *β -Adrenergic receptor binding in frontal cortex of suicide victims, Biol. Psychiatry, 1991. 29: p. 183-191.*
- 295. Gross-Isseroff, R., Dillon, K.A., Fieldust, S.J. and Biegon, A.,** *Autoradiographic analysis of α -noradrenergic receptors in the human brain postmortem. Effect of suicide, Arch. Gen. Psychiatry, 1990. 47: p. 1049-1053.*
- 296. Ordway, G.A., Widdowson, P.S., Smith, K.S. and Halaris, A.,** *Agonist binding to α 2-adrenoceptors is elevated in the locus coeruleus from victims of suicide, J. Neurochem., 1994. 63: p. 617- 624.*
- 297. Cheetham, S.C., Crompton, M.R., Katona, C.L.E. and Horton, R.W.,** *Brain 5-HT₁ binding sites in depressed suicides, Psychopharmacology, 1990. 102: p. 544-548.*
- 298. Escriba PV, Ozaita A, Garcia-Sevilla JA.,** *Increased mRNA expression of α 2Adrenoceptors, serotonin receptors and mu-opioid receptors in the brains of suicide victims. Neuropsychopharmacology, 2004. 29: p. 1512–21*
- 299. Sequeira A., Mamdani F., Lalovic A., Anguelova M., Lesage A., Seguin M.,** *Alpha 2A adrenergic receptor gene and suicide. Psychiatry Res., 2004. 125: p. 87–93*
- 300. McGuffin , P., N. Perroud, R. Uher, A. Butler, K.J. Aitchison, I. Craig, C. Lewis, A. Farmer.** *The genetics of affective disorder and suicide. European Psychiatry ,2010. 25 : p. 275–277*
- 301. Bray, G.A.,** *Obesity--a disease of nutrient or energy balance? Nutr Rev., 1987. 45: p. 33-43*
- 302. Ross, R., Berentzen, T., Bradshaw, A.J., Janssen, I., Kahn, H.S., Katzmarzyk, P.T., Kuk, J.L., Seidell, J.C., Snijder, M.B., Sorensen, T.I.,** *Does the relationship between*

- waist circumference, morbidity and mortality depend on measurement protocol for waist circumference? *Obes Rev.*,2008. 9: p. 312-325.
- 303. Ness-Abramof, R., and Apovian, C.M.,** Waist circumference measurement in clinical practice. *Nutr Clin Pract.*,2008. 23: p. 397-404
- 304. Haffner CA., Kendall MJ., Maxwell S.,** The lipolytic effect of beta 1- and beta 2- adrenoceptor activation in healthy human volunteers. *Br J Clin Pharmacol.*, 1993. 35: p. 35-9.
- 305. Gunter MJ., Leitzmann MF.,**Obesity and colorectal cancer: epidemiology, mechanisms and candidate genes. *J Nutr Biochem.*,2006. 17: p. 145-56
- 306. Loos RJ., Bouchard C.,** Obesity—is it a genetic disorder? *J Intern Med.*, 2003. 254: p. 401-25.
- 307. Loos RJ, Rankinen T.** Gene-diet interactions on body weight changes. *J Am Diet Assoc.*, 2005. 105:p. 29-30
- 308. Large V., Arner P.,** Regulation of lipolysis in humans. Pathophysiological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia. *Diabetes Metab.*, 1998. 24: p. 409-18.
- 309. Barbe P., Millet L., Galitzky J.,** In situ assessment of the role of the beta 1-, beta 2- and beta 3- adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue. *Br J Pharmacol.*, 1996. 117: p. 907-13
- 310. Stich V., de Gl., Crampes F.,** Activation of antilipolytic alpha(2)- adrenergic receptors by epinephrine during exercise in human adipose tissue. *Am J Physiol.*, 1999. 277: p. 1076-83
- 311. de Glisezinski.** Mobilisation des lipides du tissu adipeux au cours de l'exercice physique Adipose tissue lipid mobilisation during exercise. *Science & Sports*, 2007. 22: p. 280–285
- 312. Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P. & Shaw, J.,** The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*, 2005. 366: p. 1059-1062.
- 313. Grundy, S.M.,**Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*, 2005. 112: p. 2735-2752
- 314. John J. Limaa,4, Hua Fengb, Laurie Duckwortha, Jianwei Wanga, James E. Sylvestera, Niranjana Kissonc, Hardesh Garg,** Association analyses of adrenergic receptor polymorphisms with obesity and metabolic alterations. *Metabolism Clinical and Experimental*, 2007. 56: p. 757–765
- 315. Ukkola O., Pérusse L., Weisnagel SJ.,** Interactions among the glucocorticoid receptor, lipoprotein lipase, and adrenergic receptor genes and plasma insulin and lipid levels in the Quebec Family Study. *Metabolism*,2001. 50: p. 246-52
- 316. Balkau B., Eschwege E.,**The diagnosis and classification of diabetes and impaired glucose regulation. *Textbook of Diabetes 3rd edition*, 2003

- 317. Stumvoll M., Goldstein BJ., van Haeften TW.,** *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. Lancet, 2005. 365: p. 1333-1346,*
- 318. Katsilambros N., Tentolouris N.,** *Type 2 diabetes: an overview. Textbook of Diabetes 3rd edition, 2003*
- 319. Rorsman P., Bokvist K., Amma C., Arkhammar P., Berggren PO., Larsson O.,** *Activation by adrenaline of a low-conductance G protein-dependent K⁺ channel in mouse pancreatic B-cells. Nature, 1991; 349: 77–79.*
- 320. Devedjian JC., Pujol A., Cayla C., George M., Casellas A., Paris H.,** *Transgenic mice overexpressing $\alpha 2a$ adrenoceptors in pancreatic b-cells show altered regulation of glucose homeostasis. Diabetologia, 2000. 43: p. 899–906.*
- 321. Magnan C., Ktorza A..** *Production et sécrétion de l'insuline par la cellule b pancréatique. Endocrinologie-Nutrition, 2012. 10-362-E-10*
- 322. Fagerholm V., Gronroos T., Marjamaki P., Viljanen T., Scheinin M., Haaparanta M.,** *Altered glucose homeostasis in alpha2A-adrenoceptor knockout mice. Eur J Pharmacol., 2004 .505: p. 243–252*
- 323. S. Bo, M. Cassader, P. Cavallo-Perin, M. Durazzo, R. Rosato and R. Gambino.,** *The rs553668 polymorphism of the ADRA2A gene predicts the worsening of fasting glucose values in a cohort of subjects without diabetes. A population-based study. Diabetic Medicine. 2011 Diabetes UK. DOI:10.1111/j.1464-5491*
- 324. Ewa-Carin , Lngberg, Mohammed Seed Ahmed, Suad Efendic, Harvest F. Gu and Claes-Goran ,stenson,** *Genetic Association of AdrenergicReceptor Alpha 2a with Obesity and Type 2 Diabetes. Obesity,2013.21(8): p. 1720-1725*
- 325. Boesgaard TW., Grarup N., Jørgensen T., Borch-Johnsen K.,** *MetaAnalysis of Glucose and Insulin-Related Trait Consortium (MAGIC), Hansen T, Pedersen O. Variants at DGKB/TMEM195, ADRA2A , GLIS3 and C2CD4B loci are associated with reduced glucose-stimulated b-cell function in middle-aged Danish people. Diabetologia, 2010. 53: p. 1647–1655.*
- 326. Renstro F., Shungin D., Johansson I., Florez JC., Hallmans G., Hu FB., Franks PW.,** *Genetic predisposition to longterm non-diabetic deteriorations in glucose homeostasis: ten-year follow-up of the Glacier Study. Diabetes,2011. 60: p. 345–354*
- 327. Ingelsson E., Langenberg C., Hivert MF., Prokopenko I., Lyssenko V., Dupuis J.,** *Detailed physiologic characterization reveals diverse mechanisms for novel*

- genetic loci regulating glucose and insulin metabolism in humans. Diabetes, 2010. 59: p. 1266–1275*
- 328.** *INSP, Enquête nationale sur l'incidence et la prévalence des cancers. 2005*
- 329.** *Parkin, D.M., International variation. Oncogene, 2004. 23(38): p. 6329-40*
- 330.** *Osborne, C.K., The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. Cancer, 1980. 46(12 Suppl): p. 2884-8.*
- 331.** *Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A. Studies of the her-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer, Science, 1989. 244: p. 707-712.*
- 332.** *Goldgar, D.E., A 45-year follow-up of kindred 107 and the search for BRCA2. J Natl Cancer Inst Monogr, 1995(17): p. 15-9.*
- 333.** *Clark, G.M. and W.L. McGuire, Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. Semin Oncol, 1988. 15(2 Suppl 1): p. 20-5.*
- 334.** *Ross, J.S. and G.S. Gray, Targeted therapy for cancer: the HER-2/neu and Herceptin story. Clin Leadersh Manag Rev, 2003. 17(6): p. 333-40.*
- 335.** *Gonzalez-Angulo, A.M. and F. Meric-Bernstam, Metformin: a therapeutic opportunity in breast cancer. Clin Cancer Res, 2010. 16(6): p. 1695-700.*
- 336.** *Tsugane, S. and M. Inoue, Insulin resistance and cancer: epidemiological evidence. Cancer Sci, 2010. 101(5): p. 1073-9.*
- 337.** *Yang-Feng, T.L., Chromosomal organization of adrenergic receptor genes. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(4): p. 1516-20*
- 338.** *Rosmond, R., C. Bouchard, and P. Bjorntorp, A C-1291G polymorphism in the alpha2A-adrenergic receptor gene (ADRA2A) promoter is associated with cortisol escape from dexamethasone and elevated glucose levels. J Intern Med, 2002. 251(3): p. 252-7.*
- 339.** *Fukutake, M., Association of alpha2A-adrenergic receptor gene polymorphism with susceptibility to suicide in Japanese females. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2008. 32(6): p. 1428-33*
- 340.** *Finley, J.C., Jr., A genetic polymorphism of the alpha2-adrenergic receptor increases autonomic responses to stress. J Appl Physiol, 2004. 96(6): p. 2231-9*

- 341. Papathanasopoulos, A.,** A preliminary candidate genotype-intermediate phenotype study of satiation and gastric motor function in obesity. *Obesity (Silver Spring)*, 2010. 18(6): p. 1201-11.
- 342. de Cerqueira, C.C.,** ADRA2A polymorphisms and ADHD in adults: Possible mediating effect of personality. *Psychiatry Res*, 2010. doi:10.1016/j.psychres.2010.08.032.]
- 343. Todd JH., Dowle C., Williams MR., Elston CW., Ellis IO.,** Confirmation of a prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer*, 1987. 56(4): p. 489–492
- 344. Ameziane N., Bogard M., Lamoril J.** Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Elsevier. 2006. p. 705
- 345. Poitras E., Houde A.,** La PCR en temps réel : principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*,. 2002. 2(2): p. 2-11.
- 346. Bishop, D. T.,** Genetic predisposition to cancer: an introduction, London. 2004
- 347.** <http://biostats.usc.edu/software>
- 348. Sole X., Guino E., Valls J., Iniesta R., Moreno V.,** SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*,2006. 22(15): p. 1928–192.
- 349. EASTON, D. F.,** Genetic predisposition to cancer: from families to chromosomes: genetic linkage and association studies for finding cancer-predisposition genes, London. 2004
- 350. Wirapati P., Sotiriou C., Kunkel S. , Farmer P., Pradervand S.,** Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res.*,2008. 10(4): p.65.
- 351.** <http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Automated-Solutions/Sample-Prep/QIAcube#orderinginformation>)
- 352. El Saghier NS., Seoud M., Khalil MK., Charafeddine M., Salem ZK.,** Effects of young age at presentation on survival in breast cancer. *BMC Cancer* 2006. 6: p. 194
- 353. Anders CK., Johnson R., Litton J., Phillips M., Bleyer A.** Breast cancer before age 40 years. *Semin Oncol.*, 2009. 36(3): p. 237–249
- 354. Bharat A., Aft RL., Gao F, Margenthaler JA.,** Patient and tumor characteristics associated with increased mortality in young women (< or =40 years) with breast cancer. *J Surg Oncol.*,2009. 100(3): p. 248–251

- 355. Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacene K, Spyrtos F.,** Prognostic value of histologic grade nuclear components of scarff-bloom-Richardson (SBR). an improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer*, 1989. 64(9): p. 1914–1921
- 356. Sorlie T., Perou CM., Tibshirani R., Aas T., Geisler S.,** Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci.*, 2001. 98(19): p. 10869–108
- 357. Hugh J., Hanson J., Cheang MC., Nielsen TO., Perou CM.,** Breast cancer subtypes and response to docetaxel in nodepositive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol.*, 2009. 27(8): p. 1168–1176
- 358. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B,** Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann Oncol.*, 2011 22(8): p. 1736–1747
- 359. Boyle DP., McCourt CM., Matchett KB., Salto-Tellez M.,** Molecular and clinicopathological markers of prognosis in breast cancer. *Expert Rev Mol Diagn.*, 2013. 13(5): p. 481–498
- 360. Despres JP., Mareette A.,** Obesity and insulin resistance epidemiologic, metabolic, and molecular aspects. In: Reaven G, Laws A, editors. *Contemporary endocrinology: insulin resistance*. Totowa: Humana Press Inc., 1999: p. 51-81
- 361. Lim E, Vaillant F, Wu D, Forrest NC, Pal B.,** Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med.* 2009. 15(8): p. 907–913
- 362. Shkurnikov MY., Galatenko VV., Lebedev AE., Podol'skii VE., Tonevitskii EA.,** On statistical relationship between ADRA2A expression and the risk of breast cancer relapse. *Bull Exp Biol Med.*, 2014. 157(4): p. 454–458
- 363. Du Y., Zhou L., Wang Y., Yan T., Jiang Y.,** Association of alpha2a and beta2 adrenoceptor expression with clinical outcome in breast cancer. *Curr Med Res Opin.*, 2014. 30(7): p. 1337–1344
- 364. Lutgendorf SK., Sood AK., Antoni MH.,** Host factors and cancer progression: biobehavioral signaling pathways and interventions. *J Clin Oncol.*, 2010. 28(26): p. 4094–4099
- 365. Docherty JR.,** Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.*, 1998. 361(1): p. 1–15
- 366. Giessler C., Wangemann T., Silber RE., Dhein S., Brodde OE.,** Noradrenaline-induced contraction of human saphenous vein and human internal mammary artery: involvement of different alphaadrenoceptor subtypes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, 2002. 366(2): p. 104–109

- 367. Bruckmaier RM., Wellnitz O., Blum JW.,***Inhibition of milk ejection in cows by oxytocin receptor blockade, alpha-adrenergic receptor stimulation and in unfamiliar surroundings. J Dairy Res.,1997 64(3): p. 315–325*
- 368. Su F., Ouyang N., Zhu P., Jia W., Gong C.,***Psychological stress induces chemoresistance in breast cancer by upregulating mdr1. Biochem Biophys Res Commun.,2005. 329(3): p. 888–897*
- 369. Flint MS., Kim G., Hood BL., Bateman NW., Stewart NA.,.***Stress hormones mediate drug resistance to paclitaxel in human breast cancer cells through a CDK-1-dependent pathway. Psychoneuroendocrinology ,2009. 34(10): p. 1533–1541*
- 370. Bordeleau L., Panchal S., Goodwin P.** "Prognosis of BRCA-associated breast cancer: a summary of evidence." *Breast cancer research and treatment.* 2010. 119 (1): 13-24

ANNEXES

Annexe1 :QIAamp® DNA Blood Mini Accessory Sets

For use with multiple QIAamp DNA Blood Mini Kits on the QIAcube™

Set Contents

QIAamp DNA Blood Mini Accessory Set	A	B
Catalog no.	1043368	1043369
Buffer AL	33 ml	33 ml
Buffer AW1 (concentrate)	19 ml	–
Buffer AW2 (concentrate)	13 ml	–
Buffer AE	60 ml	60 ml
QIAGEN® Protease	1 vial	1 vial
Protease Solvent	1.2 ml	1.2 ml
Product Sheet	1	1

Storage

All buffers can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year without showing any reduction in performance. Lyophilized QIAGEN Protease can be stored at room temperature (15– 25°C) for up to 12 months without affecting performance. Reconstituted QIAGEN Protease is stable for up to 1 year when stored at 2–8°C. Keeping the QIAGEN Protease stock solution at room temperature for prolonged periods of time should be avoided.

Product Use Limitations

The QIAamp DNA Blood Mini Accessory Set A contains additional buffers and reagents typically for use with 10 x QIAamp DNA Blood Mini Kits (50), catalog number 51104, on the QIAcube. The QIAamp DNA Blood Mini Accessory Set B is typically for use with 2 x QIAamp DNA Blood MiniKits (250), catalog number 51106, on the QIAcube. Depending on run parameters, the set may be sufficient for use with more or, occasionally, fewer complete kits. For setting up the

ANNEXES

QIAcube for DNA purification using the QIAamp DNA Blood Mini Kit, follow the instructions in the Protocol Sheet, which can be downloaded from www.qiagen.com/myQIAcube. QIAamp DNA Blood Mini Accessory Sets are intended for molecular biology applications. These products are not intended for the diagnosis, prevention, or treatment of disease.

Buffers AL and AW1 contain guanidine hydrochloride, which can form highly reactive compounds when combined with bleach. If liquid containing these buffers is spilt, clean with suitable laboratory detergent and water. If the spilt liquid contains potentially infectious agents, clean the affected area first with laboratory detergent and water, and then with 1% (v/v) sodium hypochlorite. The following risk and safety phrases apply to components of QIAamp DNA Blood Mini Accessory Sets:

Buffer AL and Buffer AW1 Contains guanidine hydrochloride: harmful, irritant. Risk and safety phrases: * R22-36/38, S13-26-36-46

QIAGEN Protease

Contains subtilisin: sensitizer, irritant. Risk and safety phrases: * R37/38-41-42, S22-24-26-36/37/39-46

Annexe2 : Protocol sheet

General Information

Application	DNA
Kit	QIAamp® DNA Blood Mini Kit (50) plus QIAamp DNA Blood Mini Accessory Set A, cat. no. 1043368 or QIAamp DNA Blood Mini Kit (250) plus QIAamp DNA Blood Mini Accessory Set B, cat. no. 1043369.
Sample material	Blood or body fluid
Short protocol name	Elution volume: 100 µl
Version	3
Full protocol name	Blood and body fluid spin protocol V3
Editable parameters	–
Required QIAcube® software versions	Firmware version FIW-50-001-J_FW_MB.hex and PLC program version FIW-50-002-G-PLC_MB.prs or higher; available from the QIAcube Web Portal

ANNEXES

Shaker

Material	200 μ l blood or body fluid
Vessel	2 ml screw-cap tube without skirted base*
Adapter	Shaker adapter for 2 ml screw cap tubes (marked with "S2")

* Sample Tubes CB, 2 ml (cat. no. 990382); see www.qiagen.com/MyQIAcube .

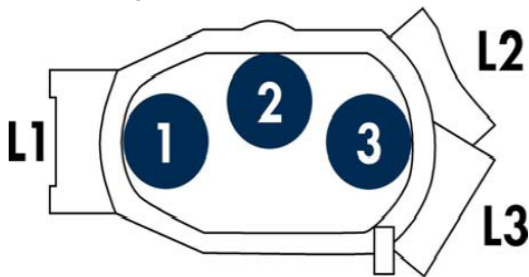
Disposable Tips

Disposable Filter-Tips, 1000 μ l
Disposable Filter-Tips, 200 μ l

Reagent Bottle Rack

Rack labeling strip	QIAamp DNA
----------------------------	------------

Rotor Adapter



Position	Reagent
1	–
2	Buffer AL
3	96–100% ethanol
4	Buffer AW1
5	Buffer AW2
6	Buffer AE

Position	Labware	Lid position
1	QIAamp spin column	L1
2	–	–
3	1.5 ml collection tube*	L3

* Sarstedt, Micro tube 1.5 ml, Safety Cap (see www.sarstedt.com).

ANNEXES

Annexe 3. Fiche de consentement pour malade et témoins

République Algérienne Démocratique et populaire

Centre Hospitalière Universitaire de BANTA

Centre Anti-Cancer de Batna

Fiche de consentement

Dans le cadre de l'étude : **Etude de l'association des polymorphismes génétiques fonctionnels du gène du récepteur adrénérgique $\alpha 2A$ (ADRA2A) avec le cancer du sein**

Je soussigné(e);

Nom :

Prénom :

Déclare avoir pris connaissance des explications concernant cette étude et j'accepte le prélèvement sous les conditions décrites, en gardant tous mes droits stipulés par la loi d'éthique et de déontologie.

J'accepte ce type de recherche

Je m'oppose à ce type de recherche.

Signature du patient:

Signature du chef de projet:

Annexe 4. TaqMan® SNP Genotyping Assays

1. Product Overview

a. Product description

TaqMan® SNP Genotyping Assays provide the largest collection of ready-to-use human single nucleotide polymorphisms (SNP) assays available. All assays were designed using our powerful bioinformatics pipeline and software, as well as genomic information from Celera Genomics and public databases:

- TaqMan® Validated SNP Genotyping Assays: ~ 160,000 genecentric assays. These highly tested, top performing assays were validated by genotype and subsequent minor allele frequency (MAF) analysis on 2 or 4 ethnic group populations (45 individual samples per ethnic group). Inventoried for fast availability.
- TaqMan® Coding SNP Genotyping Assays: ~ 30,000 assays for the detection of informative and putative functional, nonsynonymous SNPs in gene-coding regions. Inventoried assays, which are functionally tested to assure quality performance
- TaqMan® Pre-Designed SNP Genotyping Assays: > 3 million genome-wide assays including assays to > 2.5 million HapMan SNPs, as well as to ~ 30,000 high value nonsynonymous SNPs (including known disease mutations and SNPs in protein domains associated with drug binding regions). Made to order assays, available in multiple scales, are manufactured and functionally tested upon ordering. TaqMan SNP Genotyping Assays provide optimized assays for genotyping SNPs. The products use the 5' nuclease assay for amplifying and detecting specific SNP alleles in purified genomic DNA samples. Each assay allows researchers to genotype individuals for a specific SNP.

b. Product properties

All TaqMan SNP Genotyping Assays:

- Are designed and optimized to work with TaqMan® Universal PCR Master Mix (with or *without AmpErase® UNG) using the same thermal cycling conditions.
- Require only three components:
 - 1 to 20 ng of purified gDNA sample per well
 - 20X, 40X, or 80X SNP Genotyping Assay (depending on product and assay scale)
 - TaqMan® Universal PCR Master Mix (with or without AmpErase® UNG)
- Require only one PCR amplification step and an endpoint reading to obtain results.

c. SNP Genotyping Assay Contents

The 20X, 40X, or 80X SNP Genotyping Assay contains:

- Sequence-specific forward and reverse primers to amplify the polymorphic sequence of interest.
- Two TaqMan® MGB probes:
 - One probe labeled with VIC® dye detects the Allele 1 sequence
 - One probe labeled with FAM™ dye detects the Allele 2 sequence

2. Sample Preparation

a. Recommended Template

ANNEXES

The recommended template for TaqMan SNP Genotyping Assays is purified genomic DNA (1 to 20 ng). Quantify genomic DNA using the TaqMan® RNase P Detection Reagents Kit (PN4316831) and the TaqMan® DNA Template Reagents Kit (PN 401970).

To prepare a plate with wet DNA:

1.	Dilute each DNA sample with DNase-free water to deliver a final DNA mass in the range of 1 to 20 ng per well. IMPORTANT! All wells belonging to the same assay must contain the same amount of sample or control.						
	<table border="1"><thead><tr><th>If you prepare a...</th><th>The volume of DNA sample and DNase-free water per reaction should be...</th></tr></thead><tbody><tr><td>384-well reaction plate</td><td>2.25 µL</td></tr><tr><td>96-well reaction plate</td><td>11.25 µL</td></tr></tbody></table>	If you prepare a...	The volume of DNA sample and DNase-free water per reaction should be...	384-well reaction plate	2.25 µL	96-well reaction plate	11.25 µL
	If you prepare a...	The volume of DNA sample and DNase-free water per reaction should be...					
384-well reaction plate	2.25 µL						
96-well reaction plate	11.25 µL						
Note: Multiple assays can be run on one reaction plate, but they must be analyzed separately.							
2.	Into each well of the 96-well or 384-well optical reaction plate, pipette one control or sample aliquot of the volume appropriate for the plate type (indicated in step 1).						

b. Preparing the Reaction Mix

The reaction mix is made from 20×, 40×, or 80× SNP Genotyping Assay, TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG, and DNase-free water. The recommended final reaction volume per well is 5 µL for a 384-well plate and 25 µL for a 96-well plate. Note: For instructions on diluting the 40× or 80× SNP Genotyping Assay to a 20× working stock solution,

ANNEXES

To prepare the reaction mix :

1.	<p>Calculate the number of reactions to be performed for each assay.</p> <p>Applied Biosystems recommends including:</p> <ul style="list-style-type: none"> • At least two NTCs on each plate. • If available, at least one known DNA control on each plate.
----	--

To prepare the reaction mix (*continued*):

2.	<p>Calculate the total volume of each component needed for each assay, using the table below. Be sure to choose the appropriate DNA delivery method for your experiment.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th rowspan="3" style="text-align: center;">Component</th> <th colspan="2" style="text-align: center;">Wet DNA Method</th> <th colspan="2" style="text-align: center;">Dry-Down DNA Method</th> </tr> <tr> <th colspan="4" style="text-align: center;">$\mu\text{L}/\text{well}$</th> </tr> <tr> <th style="text-align: center;">384-well plate</th> <th style="text-align: center;">96-well plate</th> <th style="text-align: center;">384-well plate</th> <th style="text-align: center;">96-well plate</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TaqMan Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase UNG</td> <td style="text-align: center;">2.50</td> <td style="text-align: center;">12.50</td> <td style="text-align: center;">2.50</td> <td style="text-align: center;">12.50</td> </tr> <tr> <td>20X working stock of SNP Genotyping Assay</td> <td style="text-align: center;">0.25</td> <td style="text-align: center;">1.25</td> <td style="text-align: center;">0.25</td> <td style="text-align: center;">1.25</td> </tr> <tr> <td>DNase-free water</td> <td style="text-align: center;">(none)</td> <td style="text-align: center;">(none)</td> <td style="text-align: center;">2.25</td> <td style="text-align: center;">11.25</td> </tr> <tr> <td>Total Volume per Well</td> <td style="text-align: center;">2.75</td> <td style="text-align: center;">13.75</td> <td style="text-align: center;">5.00</td> <td style="text-align: center;">25.00</td> </tr> </tbody> </table> <p>Note: In your calculations, include some extra reactions to compensate for the volume loss that occurs during pipetting.</p>	Component	Wet DNA Method		Dry-Down DNA Method		$\mu\text{L}/\text{well}$				384-well plate	96-well plate	384-well plate	96-well plate	TaqMan Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase UNG	2.50	12.50	2.50	12.50	20X working stock of SNP Genotyping Assay	0.25	1.25	0.25	1.25	DNase-free water	(none)	(none)	2.25	11.25	Total Volume per Well	2.75	13.75	5.00	25.00
Component	Wet DNA Method		Dry-Down DNA Method																															
	$\mu\text{L}/\text{well}$																																	
	384-well plate	96-well plate	384-well plate	96-well plate																														
TaqMan Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase UNG	2.50	12.50	2.50	12.50																														
20X working stock of SNP Genotyping Assay	0.25	1.25	0.25	1.25																														
DNase-free water	(none)	(none)	2.25	11.25																														
Total Volume per Well	2.75	13.75	5.00	25.00																														
3.	Gently swirl the bottle of TaqMan Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase UNG (abbreviated as “UMM” in subsequent steps). Ensure the UMM is well mixed before use.																																	
4.	Vortex and centrifuge the 20X SNP Genotyping Assay briefly.																																	
5.	Pipette the required total volumes of UMM and 20X SNP Genotyping Assay into a sterile microcentrifuge tube.																																	
6.	Cap the tube and invert several times to mix.																																	

ANNEXES

7. Centrifuge the tube briefly to spin down the contents and to eliminate any air bubbles from the reaction mix.

Adding the Reaction Mix

To add the reaction mix to the prepared DNA reaction plate :

1.	Into each well of your DNA reaction plate (as prepared per the procedures on page 10), pipette the reaction mix as indicated below.		
	Plate Type	Volume of Reaction Mix ($\mu\text{L}/\text{Well}$)	
		Wet DNA Delivery Method	Dry-Down DNA Method
	384-well	2.75	5
96-well	13.75	25	
IMPORTANT! Be sure that no cross-contamination occurs from well to well during pipetting.			
2.	Inspect all the wells for uniformity of volume, and note which wells do not appear to contain the proper volume. (See page 21 in the “Troubleshooting” section.)		
3.	Seal the plate with the appropriate cover. (See page 36 for a list of covers compatible with your instrument.)		
4.	Vortex the plate to mix the wells.		
5.	Centrifuge the plate briefly to spin down the contents and eliminate any air bubbles.		

ANNEXES

Performing PCR To perform PCR:

1.	<p>Specify the thermal cycling conditions.</p> <p>IMPORTANT! These conditions are optimized for use only with TaqMan SNP Genotyping Assays on the instruments specified on page 35.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin: 10px 0;"> <thead> <tr> <th colspan="3" style="text-align: center; background-color: #f2f2f2;">Standard Protocol</th> </tr> <tr> <th style="width: 33%; text-align: center;">AmpliTaq Gold Enzyme Activation</th> <th colspan="2" style="text-align: center;">PCR (40 Cycles)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">HOLD</td> <td style="text-align: center;">Denature</td> <td style="text-align: center;">Anneal/Extend</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">10 min at 95 °C</td> <td style="text-align: center;">15 sec at 92 °C</td> <td style="text-align: center;">1 min at 60 °C</td> </tr> <tr> <th colspan="3" style="text-align: center; background-color: #f2f2f2;">Alternate Protocol[†]</th> </tr> <tr> <th style="width: 33%; text-align: center;">AmpliTaq Gold Enzyme Activation</th> <th colspan="2" style="text-align: center;">PCR (50 Cycles)</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">HOLD</td> <td style="text-align: center;">Denature</td> <td style="text-align: center;">Anneal/Extend</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">10 min at 95 °C</td> <td style="text-align: center;">15 sec at 92 °C</td> <td style="text-align: center;">90 sec at 60 °C</td> </tr> </tbody> </table> <p>Note: Refer to the appropriate instrument user guide for help with programming your thermal cycler.</p>	Standard Protocol			AmpliTaq Gold Enzyme Activation	PCR (40 Cycles)		HOLD	Denature	Anneal/Extend	10 min at 95 °C	15 sec at 92 °C	1 min at 60 °C	Alternate Protocol [†]			AmpliTaq Gold Enzyme Activation	PCR (50 Cycles)		HOLD	Denature	Anneal/Extend	10 min at 95 °C	15 sec at 92 °C	90 sec at 60 °C
Standard Protocol																									
AmpliTaq Gold Enzyme Activation	PCR (40 Cycles)																								
HOLD	Denature	Anneal/Extend																							
10 min at 95 °C	15 sec at 92 °C	1 min at 60 °C																							
Alternate Protocol [†]																									
AmpliTaq Gold Enzyme Activation	PCR (50 Cycles)																								
HOLD	Denature	Anneal/Extend																							
10 min at 95 °C	15 sec at 92 °C	90 sec at 60 °C																							
2.	<p>Specify the reaction volume according to the table below.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin: 10px 0;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%; text-align: center;">Plate Type</th> <th style="text-align: center;">Reaction Volume (µL/Well)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">384-well</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">96-well</td> <td style="text-align: center;">25</td> </tr> </tbody> </table>	Plate Type	Reaction Volume (µL/Well)	384-well	5	96-well	25																		
Plate Type	Reaction Volume (µL/Well)																								
384-well	5																								
96-well	25																								
3.	<p>Load the reaction plate into the thermal cycler, then start the run.</p>																								

Annexe 5. Publication

ADRA2A Germline Gene Polymorphism is Associated to the Severity, but not to the Risk, of Breast Cancer

Batoul Kaabi¹ · Ghania Belaaloui² · Wassila Benbrahim^{2,3} · Kamel Hamizi^{2,3} · Mourad Sadelaoud⁴ · Wided Toumi⁴ · Hocine Bounezer^{2,5}

Received: 19 July 2015 / Accepted: 4 November 2015
© Arányi Lajos Foundation 2015

Abstract Breast cancer (BC) prognosis and risk were associated to obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. Two Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the adrenergic receptor-2a gene (*ADRA2A*): rs1800544 and rs553668, have been associated to these metabolic disorders. We investigated these SNPs in BC risk and prognosis. A total of 102 BC patients and 102 healthy controls were included. The rs1800544 and rs553668 were determined by real-time PCR. Genotypes and haplotypes frequencies between patients and controls, and for different clinico-pathologic parameters were compared. We found a significant association of rs1800544 GG genotype with young age at diagnosis, premenopausal status, higher tumor size, metastasis in lymph nodes, advanced TNM stages and higher Nottingham Prognosis Indicator (NPI) ($p < 0.05$). There was no association between rs1800544 and SBR stages, Her2, ER and PR statuses and the molecular classification. The rs553668 AA genotype was associated to young age at diagnosis and premenopausal status ($p < 0.05$). The haplotype GA was associated to the early age of diagnosis ($p = 0.03$), and the haplotype GG to higher tumor size, lymph node involvement, advanced TNM stages and Her2 positive status ($p < 0.05$). There was no polymorphism or haplotype

association with BC risk ($p > 0.05$). *ADRA2A* polymorphism is associated with indicators BC poor prognosis but not with BC susceptibility. This is the first report suggesting that *ADRA2A* germline gene polymorphism could represent a predictor factor for BC outcome. Further investigation of other *ADRA2A* polymorphisms in BC risk or prognosis are needed and may lead to a genotype-based therapy.

Keywords *ADRA2A* · Single nucleotide polymorphism (SNP) · Breast cancer · Risk · Prognosis · Case-control study

Introduction

Breast cancer (BC) is the second cause of women cancer death in the developed regions after lung cancer, and the first one in less developed regions. With 522,000 deaths per year in the world [1], it represents a critical public health problem.

Genetics has been to the rescue of BC in the last decade, since BC prognostication is now based on both clinico-anatomical criteria and tumor gene expression or their surrogate immunohistochemical criteria [2–4]. But in addition to acquired somatic mutations of the tumor cell, different germline genetic variants have been associated to BC risk [5] and/or outcome [6–8]. However, it is estimated that these germline genetic variants explain only 28 % of the innate causes of BC [5], and much less is known about the role that patient's genetic background plays in BC prognosis [8]. Therefore, identifying genetic variants involved in BC risk and/or progression is of crucial importance.

Adrenoceptors (AR) are G protein-coupled receptors for adrenergic neurotransmitters: adrenalin and noradrenalin. AR can be divided into three types, each one having three subtypes: $\alpha 1$ AR ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1D$); $\alpha 2$ AR ($\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$); and β AR ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$). They are expressed by almost all organs

Batoul Kaabi and Ghania Belaaloui contributed equally to this work.

✉ Ghania Belaaloui
gbelaaloui@yahoo.fr

¹ Faculty of Sciences, Batna 1 University, Batna, Algeria

² Faculty of Medicine, Batna 2 University, 05000 Cité Ezzouhour, Batna, Algeria

³ Anti-Cancer Center, Batna, Algeria

⁴ LAM Laboratory, Batna, Algeria

⁵ Epidemiology Unit, University Hospital Center, Batna, Algeria

in the body and encoded by separate genes. The AR α 2A gene (*ADRA2A*) is an intronless gene located in chromosome 10q25.2, encoding a protein receptor of 450 amino acid residues [9]: α 2A-adrenergic receptor which is implicated in several functions in the central nervous system, cardiovascular system, neurotransmitter release, platelet aggregation, blood pressure, insulin secretion and lipolysis [10]. *ADRA2A* has several SNPs. The SNP rs1800544 is located in its promoter region [11] and was associated to obesity and body fat content and distribution [12, 13]. Another SNP named rs553668 that is located in the 3'-UTR region was associated to blood pressure response to adrenergic agonists [14], to body fat accumulation in the truncal-abdominal region [15, 16] and to obesity and type 2 diabetes (T2D) [17–19].

On the other hand, it is now well established that obesity is a risk [20–22] and a prognostic factor [23] for BC. This is also valid for T2D patients who are more likely to develop BC, and those among them who have already developed this cancer get a poorer prognosis [24].

This double association of obesity and T2D with *ADRA2A* polymorphisms, on the one hand, and with BC risk/prognosis at the other hand, prompted us to conduct this work aiming to investigate the possible association of *ADRA2A* polymorphisms with BC prognosis indicators and BC risk. Our approach was supplied by the fact that α 2-ARs are expressed on BC cell lines [25, 26] which proliferate after stimulation by α 2-adrenergic agonists [25, 27] or by catecholestrogens (estrogen metabolites) [28]. This proliferation can be reversed by α 2-adrenergic antagonists [26]. Moreover, the same α 2-adrenergic agonist/antagonist effects have been reproduced on mammary tumour growth in mice [29]. To our knowledge, the current study is the first investigation of *ADRA2A* germline gene polymorphism association with BC prognosis indicators and BC risk.

Patients, Materials and Methods

Patients and Controls

In this case-control study, unrelated subjects were included: a total of 102 prevalent cases of invasive BC female patients (age 48.51 ± 10.32) and 102 healthy controls (age 47.63 ± 10.31). Patients were diagnosed in the Anti-Cancer Center of Batna, between September 2012 and June 2014. Control subjects were matched to cases by age and geographical origin.

Registered data regarding: tumor size (maximum diameter), lymph node involvement, tumor-nodal-metastatic (TNM) stage, Scarff-Bloom and Richardson (SBR) histological grade at time of diagnosis, as well as tumor expression of progesterone receptors (PR), estrogen receptors (ER) and human epidermal growth factor receptor-2 (HER2), were obtained from medical records (Table 1). We used these

expressions to categorize patients into four molecular subtypes: luminal-A, luminal-B, Her-2, and basal-like according to Perou et al. [30]. The Nottingham Prognostic Index (NPI) was calculated according to Todd et al. [31] then patients were separated into three prognostic groups: Good prognostic group GPG ($NPI \leq 3.4$), Moderate prognostic group MPG ($3.4 < NPI \leq 5.4$) and Poor prognostic group PPG ($NPI > 5.4$) (Table 1). Necessary precautions to protect participant's information were taken according to the principles of the World Medical Association Declaration of Helsinki in 1964 and its later amendments. An informed written consent was obtained from all patients and controls.

DNA Extraction and Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral whole blood using QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's protocol. The SNPs rs1800544 and rs553668 were determined by allelic discrimination with validated TaqMan probes using the TaqMan[®] SNP Genotyping Assays C_7611979_10 and C_996424_20, respectively (Applied Biosystems, Foster City, CA). A quantity of 20 ng DNA was used in each reaction tube with the Type-it[®] Fast SNP Probe PCR master mix (QIAGEN, Basel, Switzerland) to reach a final volume of 25 μ L. The reactions were carried in the Rotor Gene 1.7.94 real-time cycler (QIAGEN, Basel, Switzerland). Amplification was performed according to the following cycling protocol: Initial PCR activation step at 95 °C for 5 min, followed by denaturation at 95 °C for 15 s by 45 cycles, then by annealing/extension at 60 °C for 30 s. Some samples were carried in triplicate in order to insure reproducibility of the assay.

Statistical Analysis

We used QUANTO program version 1.2.4, May 2009 (<http://biostats.usc.edu/software>) to estimate sample size, with a minor allele frequency data obtained from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) and a study power fixed at 80 %. To test Hardy–Weinberg (HW) equilibrium of alleles frequencies we used SNPstats software [32]. This software was used also to estimate haplotype frequencies in BC cases and controls. The chi-square test or Fisher exact test (when the number of subjects was less than 5) were used to assess the significance of any difference in genotype frequency between subjects or between patient's series. Kruskal–Wallis test was used to assess whether the distribution of a categorical variable is the same between genotype groups. Patient series were stratified according to separate prognostic factors (TNM stage, SBR grade, ER, PR or HER2 receptors status and molecular subtype) or prognostic group (GPG, MPG and PPG). For the molecular subtypes, and as Ki67 expression was not available to well distinguish between luminal-A and luminal-B, these

Table 1 Clinic-anatomic and molecular characteristics of BC patients

Parameter	Patients
Age, n (%)	
≤ 40 y	21 (19)
> 40 y	87 (81)
Menopausal status, n (%)	
premenopausal	59 (55)
postmenopausal	49 (45)
Tumor Size(cm), n (%)	
< 2	11 (10)
2 to 5	66 (62)
> 5	20 (19)
Unknown	10 (9)
Nodal status, n (%)	
Positive	55 (51)
Negative	43 (40)
Unknown	10 (9)
TNM stage, n (%)	
TNM _{I-II}	43 (40)
TNM _{III-IV}	50 (46)
Unknown	15 (14)
SBR grade, n (%)	
1	6 (6)
2	72 (67)
3	23 (21)
unknown	7 (6)
ER status, n (%)	
Positive	59 (55)
Negative	44 (41)
Unknown	5 (5)
PR status, n (%)	
Positive	54 (50)
Negative	47 (44)
Unknown	7 (6)
HER2 status, n (%)	
Positive	33 (31)
Negative	69 (64)
Unknown	6 (6)
Molecular subtype, n (%)	
Luminal-A	45 (42)
Luminal-B	18 (17)
HER2	15 (14)
Basal-like	23 (21)
Unknown	7 (6)
NPI, n (%)	
GPG	8 (7)
MPG	59 (53)
PPG	24 (22)
Unknown	19 (18)

subtypes were merged to form the ‘luminal subtype’ which is known to have better prognosis than the other subtypes [33]. Odds ratio (OR), used as a measure of association strength, and the corresponding 95 % confidence interval (CI) were calculated. Statistical significance was set at $p < 0.05$ based on a two-sided calculation. Statistical analyses were performed using Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation) and GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Results

Allele and Genotype Frequencies

Allele and genotype frequencies of the rs1800544 and rs553668 in BC cases and controls are shown in Table 2. The loci were in HW equilibrium ($p > 0.05$) in both groups. There was no significant difference in the distribution of the rs1800544 or the rs553668 genotypes between BC cases and controls in different genetic models ($P > 0.05$) (Table 3).

Haplotype Analysis

Haplotype frequencies in BC cases and controls were estimated using SNPstats software. The most frequent haplotype in cases and in controls was CG (56 % and 59 %, respectively). No difference was observed between both groups regarding the distribution of all the haplotypes (Table 4).

Age and Menopausal Status at BC Diagnosis

Young age at diagnosis is often associated to more aggressive disease course and to poorer outcome [34–36], therefore we investigated the association between *ADRA2A* polymorphisms and age at BC diagnosis. We plotted the age of BC diagnosis following the genotypes of *ADRA2A* polymorphisms (Fig. 1a). There was a significant difference in the median of the age of onset in each genotype group for both rs1800544 and rs553668 ($p = 0.01$ for each loci), which means that these polymorphisms are associated with age at diagnosis (Fig. 1a). Additionally, and as there is no consensus about age cut-off for defining “young age” BC, we chose to set it at 40 years like other authors [35, 36], than we studied the distribution of the genotypes in the two age groups (≤ 40 y and > 40 y) (Table 5). There was a significant association between the rs1800544 GG genotype and BC early age of onset in a codominant, a recessive and a log-additive genetic model ($p = 0.01$, $p = 0.01$ and $p = 0.02$, respectively). Similarly, the rs553668 AA genotype trended to be associated with BC early age of diagnosis in a codominant and a recessive model although this association did not reach statistical significance (Table 5). In agreement with these results, haplotype analysis

Table 2 Allele frequencies of *ADRA2A* polymorphisms in BC cases and controls and their association with BC risk

SNP	Allele	Cases n (%)	Controls n (%)	OR (95 % CI)	P value
rs1800544	C	116 (57)	121 (60)	1	0.53
	G	88 (43)	81 (40)	0.88 (0.59–1.3)	
rs553668	G	148 (76)	91 (77)	1	0.86
	A	46 (24)	27 (23)	0.95 (0.56–1.6)	

OR odds ratio, CI confidence interval

showed a significant association of the haplotype (GA), which involves the minor alleles, with early age of diagnosis of BC ($p = 0.03$, OR = 0.43, 95 % CI (0.20–0.94)).

At another hand, we considered genotypes association with menopausal status (Table 6). There was a significant association between the rs1800544 GG genotype and premenopausal status in both a codominant and a recessive genetic model ($p = 0.02$, $p = 0.01$, respectively). Similarly, the rs553668 AA genotype trended to be associated premenopausal status although this association did not reach statistical significance (Table 6). This trend was observed also with the haplotype (GA) ($p = 0.05$, OR = 0.51, 95 % CI (0.26–0.99)).

Clinico-Pathological Features

We studied the association of *ADRA2A* polymorphisms with panoply of clinico-pathological features which are classical indicators of BC prognosis: tumor size, lymph node involvement, TNM stages, SBR grades [37], NPI [31], and ER, PR, Her2 statuses which are predictor factors of BC prognosis, individually [38–41] or in combination [30, 42, 43].

The rs1800544 GG genotype was significantly more frequent in tumors with larger size (> 5 cm), in a codominant and in a recessive genetic model ($p = 0.03$; $p = 0.01$, respectively) (Table 7). This genotype was more frequent also in case of positive lymph node involvement, in a codominant model although this did not reach significant level ($p = 0.05$, OR = 3.21, 95 % IC (1.01–10.22)), but the allele G of rs1800544 was significantly associated to positive lymph node

involvement in a log-additive model ($p = 0.03$) (Table 7). After stratifying TNM stages by the menopausal status, the allele G of rs1800544 was found to be strongly associated to higher TNM stages (III and IV) in premenopausal patients ($p = 0.01$). The rs1800544 GG genotype was also significantly more frequent in the PPG (in a codominant model, $p = 0.04$) and the allele G of this SNP was significantly associated to PPG (in a log-additive model, $p = 0.03$) (Table 7). Moreover, there was a significant difference in the median of the NPI between rs1800544 genotype groups ($p = 0.02$), which means that this SNP is associated to the NPI (Fig. 1b). There was no association between rs1800544 and the other clinico-pathologic features: SBR stages, and ER, PR, Her2 statuses, as well as the molecular classification which is based on these statuses, even after stratification by the menopausal status. The rs553668 was not associated with all the studied clinico-pathologic features. However, haplotype analysis showed that the haplotype GG was significantly associated with poor prognosis indicators: higher tumor size ($p = 0.03$), lymph node involvement ($p = 0.006$), advanced TNM stages ($p = 0.03$) and Her2 expression by the tumor ($p = 0.007$), (Table 8).

Discussion

Through the last decades, BC heterogeneity induced prognostication evolving from the classical clinico-pathological and histological classifications to more accurate classifications based on advances in molecular biology. However, these

Table 3 Genotype frequencies of *ADRA2A* polymorphisms in BC cases and controls and their association with BC risk

SNP	Genotype	Cases n (%)	Controls n (%)	P value for model of inheritance				
				Codominant	Dominant	Recessive	Over-dominant	Log-additive
rs1800544	C/C	36 (35)	34 (34)	0.26	0.81	0.15	0.18	0.54
	C/G	44 (43)	53 (52)					
	G/G	22 (22)	14 (14)					
rs553668	A/A	08 (08)	01 (02)	0.09	0.55	0.06	0.15	0.87
	G/A	30 (31)	25 (42)					
	G/G	59 (61)	33 (56)					

OR odds ratio, CI confidence interval

Table 5 Genotype association with early age of breast cancer diagnosis

SNP	rs1800544				rs553668					
	Model	Genotype	≤40y	>40y	OR (95 % CI)	P-value	Genotype	≤40y	>40y	OR (95 % CI)
Codominant	C/C	5 (23.8 %)	31 (38.3 %)	1.00	-	G/G	10 (50 %)	49 (63.6 %)	1.00	-
	G/C	7 (33.3 %)	37 (45.7 %)	0.85 (0.25–2.95)	0.80	A/G	6 (30 %)	24 (31.2 %)	0.82 (0.27–2.51)	0.72
	G/G	9 (42.9 %)	13 (16.1 %)	0.23 (0.06–0.83)	0.01	A/A	4 (20 %)	4 (5.2 %)	0.20 (0.04–0.96)	0.05
Dominant	C/C	5 (23.8 %)	31 (38.3 %)	1.00	0.21	G/G	10 (50 %)	49 (63.6 %)	1.00	0.27
	G/C-G/G	16 (76.2 %)	50 (61.7 %)	0.50 (0.17–1.51)		A/G-A/A	10 (50 %)	28 (36.4 %)	0.57 (0.21–1.54)	
Recessive	C/C-G/C	12 (57.1 %)	68 (84 %)	1.00	0.01	G/G-A/G	16 (80 %)	73 (94.8 %)	1.00	0.05
	G/G	9 (42.9 %)	13 (16.1 %)	0.25 (0.09–0.73)		A/A	4 (20 %)	4 (5.2 %)	0.22 (0.05–0.97)	
Overdominant	C/C-G/G	14 (66.7 %)	44 (54.3 %)	1.00	0.3	G/G-A/A	14 (70 %)	53 (68.8 %)	1.00	0.92
	G/C	7 (33.3 %)	37 (45.7 %)	1.68 (0.61–4.60)		A/G	6 (30 %)	24 (31.2 %)	1.06 (0.36–3.08)	
Log-additive	—	—	—	0.47 (0.24–0.92)	0.02	—	—	—	0.53 (0.26–1.09)	0.08

OR odds ratio, CI confidence interval, statistically significant results are emphasized in bold

insulin secretion in patients who harbour these haplotypes. However, and as we did not investigate other *ADRA2A* SNPs concomitantly with rs1800544 and rs553668, further investigations are needed to confirm or infirm such hypothesis especially because in Small et al. study [45], other *ADRA2A* haplotypes with the same alleles G (rs1800544) and G (rs553668) but accompanied with alleles of other SNPs, showed an enhanced $\alpha 2A$ -AR expression. On the other hand, it has been shown by using cDNA microarray technology for assessing gene expression profile in BC tumors, that *ADRA2A* gene expression is lower in the tumors of patients with poor clinical outcome [46–49]. Additionally, Du et al. showed, by using immunohistochemistry on paraffin-embedded samples, that $\alpha 2a$ AR expression is associated with Her-2 status ($p = 0.048$) [50]. Hence, we can speculate that the different expression of $\alpha 2a$ AR between tumors with distinct outcome could be

explained by differential mutations in tumor genes or by differential genetic background of mammary tissue in the patient before malignancy occurrence.

Additionally, in vitro, in vivo and clinical studies have shown that the long-term effects of stress promote tumor growth and progression [51]. Adrenalin and noradrenalin are at the centre of the adrenergic stress response and are recognized by the adrenergic receptors. Activation of $\alpha 2A$ -AR in normal tissues decreases intracellular cyclic AMP (cAMP) by downregulating the synthesis of adenylyl cyclase [52] and contribute to the regulation of blood flow in different tissues including mammary gland [53], they also may inhibit milk secretion in this gland [54]. *In vitro* and in vivo studies on BC cell lines showed that activation of alpha adrenergic receptors induced chemoresistance and cell proliferation [25, 55, 56]. Hence, adrenergic receptors may be the leaders of stress effect on BC outcome. Interestingly, in a murine

Table 6 Genotype association with menopausal status

SNP	rs1800544				rs553668					
	Model	Genotype	Pre M	M	OR (95 % CI)	P-value	Genotype	Pre M	M	OR (95 % CI)
Codominant	C/C	18 (31 %)	18 (40 %)	1.00		G/G	31 (57.4 %)	28 (63.6 %)	1.00	
	G/C	22 (37.9 %)	22 (48.9 %)	1.00 (0.41–2.41)	1	A/G	14 (25.9 %)	16 (36.4 %)	1.27 (0.52–3.05)	0.60
	G/G	18 (31 %)	5 (11.1 %)	0.28 (0.08–0.91)	0.02	A/A	9 (16.7 %)	0 (0 %)	0.05 (0.003–1.0)	0.007
Dominant	C/C	18 (31 %)	18 (40 %)	1.00	0.34	G/G	31 (57.4 %)	28 (63.6 %)	1.00	0.53
	G/C-G/G	40 (69 %)	27 (60 %)	0.68 (0.30–1.53)		A/G-A/A	23 (42.6 %)	16 (36.4 %)	0.77 (0.34–1.74)	
Recessive	C/C-G/C	40 (69 %)	40 (88.9 %)	1.00	0.01	G/G-A/G	45 (83.3 %)	44 (100 %)	1.00	0.02
	G/G	18 (31 %)	5 (11.1 %)	0.28 (0.09–0.82)		A/A	9 (16.7 %)	0 (0 %)	0.08 (0.004–1.5)	
Overdominant	C/C-G/G	36 (62.1 %)	23 (51.1 %)	1.00	0.26	G/G-A/A	40 (74.1 %)	28 (63.6 %)	1.00	0.27
	G/C	22 (37.9 %)	22 (48.9 %)	1.57 (0.71–3.45)		A/G	14 (25.9 %)	16 (36.4 %)	1.63 (0.69–3.88)	
Log-additive	—	—	—	0.59 (0.34–1.01)	0.05	—	—	—	0.57 (0.30–1.09)	0.08

OR odds ratio, CI confidence interval, Pre-M premenopausal patients; M postmenopausal patients. Statistically significant results are emphasized in bold

ANNEXES

ADRA2A Germline Gene and Breast Cancer

Table 7 Association of rs1800544 genotypes with clinico-pathologic parameters

Parameter	Genetic Model	Genotype	Parameter category n (%)		OR (95 % CI)	P-value
			≤ 5 cm	> 5 cm		
Tumor size (n = 103)	Codominant	C/C	27 (37)	5 (26.3)	1.00	
		G/C	35 (48)	6 (31.6)	0.93 (0.26–3.36)	0.90
		G/G	11 (15.1)	8 (42.1)	3.93 (1.05–14.69)	0.03
	Recessive	C/C-G/C	62 (84.9)	11 (57.9)	1.00	0.01
		G/G	11 (15.1)	8 (42.1)	4.10 (1.35–12.49)	
Nodal involvement (n = 103)	Codominant	C/C	18 (42.9)	12 (23.5)	1.00	
		G/C	17 (40.5)	24 (47.1)	2.12 (0.81–5.52)	0.15
		G/G	7 (16.7)	15 (29.4)	3.21 (1.01–10.22)	0.05
	Log-additive	—	—	—	1.82 (1.02–3.24)	0.03
				Stage I-II	Stage III-IV	
TNM stage (n = 103)	Dominant	C/C	18 (45)	12 (25)	1.00	
		G/C-G/G	22 (55)	36 (75)	2.45 (1.00–6.05)	0.04
TNM stage (premenopausal status, n = 58)	Dominant	C/C	9 (45)	4 (14.3)	1.00	0.01
		G/C-G/G	11 (55)	24 (85.7)	4.91 (1.24–19.46)	
				GPG/MPG	PPG	
NPI (n = 103)	Codominant	C/C	24 (39.3)	4 (17.4)	1.00	
		G/C	26 (42.6)	11 (47.8)	2.54 (0.71–9.06)	0.23
		G/G	11 (18)	8 (34.8)	4.36 (1.08–17.63)	0.04
	Log-additive	—	—	—	2.06 (1.05–4.07)	0.03

OR odds ratio, CI confidence interval, GPG Good prognostic group (NPI ≤ 3.4), MPG Moderate prognostic group (3.4 < NPI ≤ 5.4), PPG Poor prognostic group (NPI > 5.4). Only clinico-pathologic features and genetic models showing significant differences are shown. Significant results are emphasized in bold

Table 8 Haplotype association with clinico-pathologic parameters

Parameter	Haplotype rs1800544/ rs553668		Haplotype frequency in parameter's sub-groups		Total haplotype frequency	OR (95 % CI)	P-value
	C	G	≤ 5 cm	> 5 cm			
Tumor size (n = 92)	C	G	0.60	0.42	0.57	1.00	—
	G	A	0.23	0.26	0.24	1.62 (0.68–3.84)	0.27
	G	G	0.15	0.31	0.18	2.58 (1.11–6.02)	0.03
Nodal involvement (n = 93)	C	G	0.63	0.47	0.54	1.00	—
		A	0.27	0.24	0.26	1.25 (0.65–2.40)	0.51
		G	0.09	0.27	0.19	3.64 (1.46–9.10)	0.006
TNM stage (n = 88)	C	G	0.65	0.50	0.56	1.00	—
		A	0.23	0.26	0.25	1.45 (0.73–2.88)	0.29
		G	0.11	0.23	0.18	2.59 (1.08–6.24)	0.03
Her2 status (n = 97)	C	G	0.59	0.45	0.55	1.00	—
		A	0.25	0.20	0.24	1.07 (0.51–2.25)	0.87
		G	0.14	0.34	0.20	2.92 (1.35–6.29)	0.007

OR odds ratio, CI confidence interval, GPG Only clinic-pathologic features and genetic models showing significant differences are shown. Significant results are emphasized in bold

model of BC, selective alpha adrenergic receptors antagonists (rauwoscine), reduced tumor volume [29]. Hence, further detection of *ADRA2A* polymorphisms that are associated to poor BC prognosis may open the door for genotype-based treatment testing in this disease.

Conclusion

Our study showed that *ADRA2A* polymorphism rs1800544, alone and in a haplotype combination with rs553668, is associated with indicators of BC poor prognosis: young age at the onset of the disease, premenopausal status, larger tumor size, positive lymph node involvement, advanced TNM stages, higher NPI and Her2 positive status. These data suggest that *ADRA2A* germline polymorphism could represent a predictor factor for BC prognosis. The two studied SNPs were not associated to BC risk. However, further investigation of other *ADRA2A* polymorphisms, either in BC risk or BC prognosis, are needed.

Acknowledgments The authors thank the patients and control subjects for their participation.

Authors' Contributions GB conceived of the study, obtained financial support for the project, carried out genotyping, carried out the statistical analyses, managed the project, coordinated data collection and wrote the manuscript. BK carried out genotyping, retrieved the clinical data and wrote the manuscript. WB and KH retrieved the clinical data. WT and MS carried out genotyping. HB co-ordinated data collection.

All authors read and approved the final manuscript.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval All procedures performed in this study are in accordance with the ethical standards of the Thematic Agency for Research in Health Sciences (ATRSS, ex-ANDRS) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed Consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Funding This work was funded by contract No. 71/ANDRS/2011, from the Ministry of Higher Education and Scientific Research in Algeria.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2013) GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide. IARC CancerBase 2012; No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://globocan.iarc.fr>. Accessed on 2019th Dec 2014
2. Puztai L (2011) Anatomy and biology: two complementary sides of breast cancer prognostication. *J Clin Oncol* 29(33):4347–4348
3. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, et al. (2011) Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann Oncol* 22(8):1736–1747
4. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, et al. (2013) Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2013. *Ann Oncol* 24(9):2206–2223
5. Zhang B, Beeghly-Fadiel A, Long J, Zheng W (2011) Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *Lancet Oncol* 12(5):477–488
6. Rafiq S, Khan S, Tapper W, Collins A, Upstill-Goddard R, et al. (2014) A genome wide meta-analysis study for identification of common variation associated with breast cancer prognosis. *PLoS One* 9(12):e101488
7. Sapkota Y (2014) Germline DNA variations in breast cancer predisposition and prognosis: a systematic review of the literature. *Cytogenet Genome Res* 144(2):77–91
8. Ribelles N, Santonja A, Pajares B, Llacer C, Alba E (2014) The seed and soil hypothesis revisited: current state of knowledge of inherited genes on prognosis in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 40(2):293–299
9. Kobilka BK, Matsui H, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Francke U, et al. (1987) Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science* 238(4827):650–656
10. Hoffman BB, Taylor P (2001) Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous systems. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG (eds) Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill, New York, pp. 115–153
11. Lario S, Calls J, Cases A, Oriola J, Torras A, et al. (1997) MspI identifies a biallelic polymorphism in the promoter region of the alpha 2A-adrenergic receptor gene. *Clin Genet* 51(2):129–130
12. Lima JJ, Feng H, Duckworth L, Wang J, Sylvester JE, et al. (2007) Association analyses of adrenergic receptor polymorphisms with obesity and metabolic alterations. *Metabolism* 56(6):757–765
13. Garenc C, Perusse L, Chagnon YC, Rankinen T, Gagnon J, et al. (2002) The alpha 2-adrenergic receptor gene and body fat content and distribution: the HERITAGE family study. *Mol Med* 8(2): 88–94
14. Kumik D, Muszkat M, Li C, Sofowora GG, Friedman EA, et al. (2011) Genetic variations in the alpha(2A)-adrenoreceptor are associated with blood pressure response to the agonist dexmedetomidine. *Circ Cardiovasc Genet* 4(2):179–187
15. Oppert JM, Tourville J, Chagnon M, Mauriege P, Dionne FT, et al. (1995) DNA polymorphisms in the alpha 2- and beta 2-adrenoceptor genes and regional fat distribution in humans: association and linkage studies. *Obes Res* 3(3):249–255
16. Ukkola O, Rankinen T, Weisnagel SJ, Sun G, Perusse L, et al. (2000) Interactions among the alpha2-, beta2-, and beta3-adrenergic receptor genes and obesity-related phenotypes in the Quebec family study. *Metabolism* 49(8):1063–1070
17. Rosengren AH, Jokubka R, Tojjar D, Granhall C, Hansson O, et al. (2010) Overexpression of alpha2A-adrenergic receptors contributes to type 2 diabetes. *Science* 327(5962):217–220
18. Bo S, Cassader M, Cavallo-Perin P, Durazzo M, Rosato R, et al. (2012) The rs553668 polymorphism of the *ADRA2A* gene predicts the worsening of fasting glucose values in a cohort of subjects without diabetes. A population-based study. *Diabet Med* 29(4): 549–552

19. Talmud PJ, Cooper JA, Gaunt T, Holmes MV, Shah S, et al. (2011) Variants of ADRA2A are associated with fasting glucose, blood pressure, body mass index and type 2 diabetes risk: meta-analysis of four prospective studies. *Diabetologia* 54(7):1710–1719
20. Trentham-Dietz A, Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, Baron J, et al. (1997) Body size and risk of breast cancer. *Am J Epidemiol* 145(11):1011–1019
21. van den Brandt PA, Spiegelman D, Yuan SS, Adami HO, Beeson L, et al. (2000) Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 152(6):514–527
22. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam A, Dorgan JF, et al. (2003) Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 95(16):1218–1226
23. Sinicropo FA, Dannenberg AJ (2011) Obesity and breast cancer prognosis: weight of the evidence. *J Clin Oncol* 29(1):4–7
24. DeCensi A, Gemari A (2011) Insulin breast cancer connection: confirmatory data set the stage for better care. *J Clin Oncol* 29(1):7–10
25. Vazquez SM, Mladovan AG, Perez C, Bruzzone A, Baldi A, et al. (2006) Human breast cell lines exhibit functional alpha2-adrenoceptors. *Cancer Chemother Pharmacol* 58(1):50–61
26. Perez Pinero C, Bruzzone A, Sarappa MG, Castillo LF, Luthy IA (2012) Involvement of alpha2- and beta2-adrenoceptors on breast cancer cell proliferation and tumour growth regulation. *Br J Pharmacol* 166(2):721–736
27. Vazquez SM, Pignataro O, Luthy IA (1999) Alpha2-adrenergic effect on human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 55(1):41–49
28. Chiesa IJ, Castillo LF, Luthy IA (2008) Contribution of alpha2-adrenoceptors to the mitogenic effect of catecholestrogen in human breast cancer MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 110(1–2):170–175
29. Bruzzone A, Pinero CP, Castillo LF, Sarappa MG, Rojas P, et al. (2008) Alpha2-adrenoceptor action on cell proliferation and mammary tumour growth in mice. *Br J Pharmacol* 155(4):494–504
30. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406(6797):747–752
31. Todd JH, Dowle C, Williams MR, Elston CW, Ellis IO, et al. (1987) Confirmation of a prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer* 56(4):489–492
32. Sole X, Guino E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22(15):1928–1929
33. Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, et al. (2008) Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res* 10(4):R65
34. El Saghir NS, Seoud M, Khalil MK, Charafeddine M, Salem ZK, et al. (2006) Effects of young age at presentation on survival in breast cancer. *BMC Cancer* 6:194
35. Bharat A, Afifi RL, Gao F, Margenthaler JA (2009) Patient and tumor characteristics associated with increased mortality in young women (< or =40 years) with breast cancer. *J Surg Oncol* 100(3):248–251
36. Anders CK, Johnson R, Litton J, Phillips M, Bleyer A (2009) Breast cancer before age 40 years. *Semin Oncol* 36(3):237–249
37. Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacene K, Spyrtos F, et al. (1989) Prognostic value of histologic grade nuclear components of scarff-bloom-Richardson (SBR). an improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer* 64(9):1914–1921
38. Osborne CK, Yochimowitz MG, Knight 3rd WA, McGuire WL (1980) The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer* 1980 46(12 Suppl):2884–2888
39. McGuire WL, Osborne CK, Clark GM, Knight 3rd WA (1982) Steroid hormone receptors and carcinoma of the breast. *Am J Phys* 243(2):E99–102
40. Clark GM, McGuire WL (1988) Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. *Semin Oncol* 15(2 Suppl 1):20–25
41. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, et al. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235(4785):177–182
42. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, et al. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subtypes with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19):10869–10874
43. Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, et al. (2009) Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol* 27(8):1168–1176
44. Boyle DP, McCourt CM, Matchett KB, Salto-Tellez M (2013) Molecular and clinicopathological markers of prognosis in breast cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 13(5):481–498
45. Small KM, Brown KM, Seman CA, Theiss CT, Liggett SB (2006) Complex haplotypes derived from noncoding polymorphisms of the intronless alpha2A-adrenergic gene diversify receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(14):5472–5477
46. Lim E, Vaillant F, Wu D, Forrest NC, Pal B, et al. (2009) Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med* 15(8):907–913
47. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, et al. (2008) Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 14(5):518–527
48. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, et al. (2003) Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(18):10393–10398
49. Shkumikov MY, Galatenko VV, Lebedev AE, Podol'skii VE, Tonevitskii EA, et al. (2014) On statistical relationship between ADRA2A expression and the risk of breast cancer relapse. *Bull Exp Biol Med* 157(4):454–458
50. Du Y, Zhou L, Wang Y, Yan T, Jiang Y, et al. (2014) Association of alpha2a and beta2 adrenoceptor expression with clinical outcome in breast cancer. *Curr Med Res Opin* 30(7):1337–1344
51. Lutgendorf SK, Sood AK, Antoni MH (2010) Host factors and cancer progression: biobehavioral signaling pathways and interventions. *J Clin Oncol* 28(26):4094–4099
52. Docherty JR (1998) Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 361(1):1–15
53. Giessler C, Wangemann T, Silber RE, Dhein S, Brodde OE (2002) Noradrenaline-induced contraction of human saphenous vein and human internal mammary artery: involvement of different alpha-adrenoceptor subtypes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 366(2):104–109
54. Bruckmaier RM, Welnitz O, Blum JW (1997) Inhibition of milk ejection in cows by oxytocin receptor blockade, alpha-adrenergic receptor stimulation and in unfamiliar surroundings. *J Dairy Res* 64(3):315–325
55. Su F, Ouyang N, Zhu P, Jia W, Gong C, et al. (2005) Psychological stress induces chemoresistance in breast cancer by upregulating mdrl. *Biochem Biophys Res Commun* 329(3):888–897
56. Flint MS, Kim G, Hood BL, Bateman NW, Stewart NA, et al. (2009) Stress hormones mediate drug resistance to paclitaxel in human breast cancer cells through a CDK-1-dependent pathway. *Psychoneuroendocrinology* 34(10):1533–1541

لقد ارتبط تشخيص سرطان الثدي و مخاطره (س ث) مع السمنة ومرض السكري من النوع 2 و تم التحقق من ارتباط هذه الاضطرابات الأيضية بطفرتين من نوع النوكليوتيدات المفردة: rs1800544 و rs553668 و المتواجدة على مستوى الجين ADRA2A المشفر لمستقبلات الأدرينالين $\alpha 2A$ AR .

في دراستنا هذه اهتمنا بهذه النوكليوتيدات حيث قمنا بدراسة مجموع 102 امرأة بصحة جيدة اتخذت كشاهد و 102 امرأة مصابة بسرطان الثدي. تمت دراست rs1800544 و rs553668 عن طريق تقنية real time PCR بعد ما تم استخراج الحمض النووي من الكريات البيضاء لكل امرأة. بالإضافة إلى مقارنة ترددات الأنماط الوراثية عند كل مريضة و شاهدة بالنسبة لعدة عوامل إكلينيكية و جزيئية. نتائجا تظهر علاقة وثيقة بين النمط الجيني rs 1800544 GG و : السن المبكرة عند التشخيص (>40 عاما)، إصابة العقد اللمفاوية ، حالة الإصابة قبل انقطاع الطمث، زيادة حجم الورم (كبير من 5 سم) ، مراحل TNM متقدمة، و ارتفاع مؤشر نوتنغهام ($p < 0,05$) . من جهة أخرى لم يوجد هناك أي علاقة بين rs 1800544 و كل من : حالة SBR ، حالة مستقبلات HER2، ومستقبلات هرمون الاستروجين أو البروجسترون. النمط الجيني AA rs 553668 تم ربطه مع السن المبكرة عند التشخيص و حالة الإصابة قبل انقطاع الطمث ($p < 0,05$). كما وجد أن النمط GA مرتبط بالسن المبكرة عند التشخيص ($p = 0,03$) ، و من جهة أخرى وجدنا أن النمط GG مرتبط بما يلي: إصابة العقد اللمفاوية ، مراحل TNM متقدمة، وجود مستقبلات HER2 ، زيادة حجم الورم ($p < 0,05$). علاقة على ذلك لم يوجد أي علاقة بين هذه الأنماط الجينية و خطر الإصابة بسرطان الثدي ($p > 0,05$).

في الختام، أظهرت هذه الدراسة أن هذه الأنماط الجينية مرتبطة بمؤشرات التشخيص السلبية لسرطان الثدي لا بقابلية الإصابة به. هناك حاجة إلى إجراء المزيد من التحقيقات على طفرات أخرى على مستوى الجين ADRA2A لتعزيز هذه الملاحظات ويمكن أن يؤدي ذلك في نهاية المطاف إلى اكتشاف طرق علاج جديدة مبنية على التركيب الوراثي للأفراد.

كلمات البحث: SNP. ADRA2A. سرطان الثدي. خطر. تشخيص. دراسة من نوع حالة شاهد.

Résumé

Le risque ainsi que le pronostic du cancer du sein (BC) ont été associés à l'obésité, au syndrome métabolique et au diabète de type 2. Deux polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) du gène ADRA2A codant le récepteur adrénergique $\alpha 2A$ AR : rs1800544 et rs553668, étaient associés à ces troubles métaboliques. Nous avons étudié l'association de ces SNP avec le risque et le pronostic du BC. Au total, 102 patientes atteintes de CS et 102 femmes témoins saines ont été incluses dans l'étude. Les SNP rs1800544 et rs553668 ont été étudiés par PCR en temps réel sur l'ADN extrait des leucocytes du sang périphérique. Les fréquences des génotypes ou des haplotypes chez les patientes et leurs témoins ont été comparés pour différents paramètres clinico-pathologiques et moléculaires.

Nos résultats montrent une association significative entre le génotype GG rs1800544 et le jeune âge au moment du diagnostic (≤ 40 ans), le statut pré-ménopausique, une plus grande taille tumorale (> 5 cm), l'envahissement ganglionnaire, les stades TNM avancés (III/IV) et un index pronostic de Nottingham élevé (NPI) ($p < 0,05$). Il n'existait aucune association entre le rs1800544 et le grade histopronostique SBR, les statuts d'expression du récepteur Her2 et des récepteurs d'œstrogènes ou de progestérone, isolés ou en association dans la classification moléculaire. Le génotype AA rs553668 a été associé au jeune âge au moment du diagnostic et au statut préménopausique ($p < 0,05$). L'haplotype GA a été associé à l'âge jeune au diagnostic ($p = 0,03$), et l'haplotype GG a été associé à l'envahissement ganglionnaire, aux stades TNM avancés, au statut Her2 positif et à une taille tumorale importante ($p < 0,05$). Par ailleurs, il n'existait aucune association entre ces polymorphismes ou ces haplotypes et le risque de CS ($p > 0,05$).

En conclusion, cette étude a montré que les polymorphismes du gène ADRA2A dans la lignée germinale sont associés aux indicateurs de mauvais pronostic du CS mais pas avec la susceptibilité d'avoir ce cancer. Une enquête plus approfondie sur d'autres polymorphismes du gène ADRA2A et leur association avec le risque ou le pronostic du CS sont nécessaires afin de renforcer ces observations et elle pourrait éventuellement conduire à une thérapie personnalisée basée le génotype.

Mots clés: ADRA2A. SNP. Cancer du sein. Risque. Pronostic. Étude cas-témoins.

Abstract

Breast cancer (BC) prognosis and risk were associated to obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. Two Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the adrenergic receptor-2a gene (ADRA2A): rs1800544 and rs553668, have been associated to these metabolic disorders. We investigated these SNPs in BC risk and prognosis. A total of 102 BC patients and 102 healthy controls were included. The rs1800544 and rs553668 were determined by real-time PCR. Genotypes and haplotypes frequencies between patients and controls, and for different clinico-pathologic parameters were compared. We found a significant association of rs1800544 GG genotype with young age at diagnosis, premenopausal status, higher tumor size, metastasis in lymph nodes, advanced TNM stages and higher Nottingham Prognosis Indicator (NPI) ($p < 0.05$). There was no association between rs1800544 and SBR stages, Her2, ER and PR statuses and the molecular classification. The rs553668 AA genotype was associated to young age at diagnosis and premenopausal status ($p < 0.05$). The haplotype GA was associated to the early age of diagnosis ($p = 0.03$), and the haplotype GG to higher tumor size, lymph node involvement, advanced TNM stages and Her2 positive status ($p < 0.05$). There was no polymorphism or haplotype association with BC risk ($p > 0.05$). ADRA2A polymorphism is associated with indicators BC poor prognosis but not with BC susceptibility. This is the first report suggesting that ADRA2A germline gene polymorphism could represent a predictor factor for BC outcome. Further investigation of other ADRA2A polymorphisms in BC risk or prognosis are needed and may lead to a genotype-based therapy.

Keywords : ADRA2A. Single nucleotide polymorphism (SNP). Breast cancer .Risk .Prognosis .Case control study