

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**

N° d'ordre :

N° de série :

**THESE**

**Présentée pour l'obtention du diplôme de docteur en sciences**

**Option :**

**Génétique-biologie moléculaire**

**Par**

**KELLIL – BENDJEMANA KATIA**

**THEME**

**ETUDE DU POLYMORPHISME DES ENZYMES  
DE DETOXIFICATION DES XENOBIOTIQUES DANS LE CANCER  
DU NASOPHARYNX**

Soutenu le : 01 -07-2008

Devant le jury :

Président :	ABADI. N	Prof. Université de Constantine
Rapporteur :	SATTA. D	Prof. Université de Constantine
Examineur :	BENOUARETH. D	Prof. Université de Guelma
	BENDJEDDOU. D	M.C. Université de Guelma
	BOURAS. M	M.C. Université de Batna

## *DEDICACE*

*Je dédie ce travail :*

*A mon mari en témoignage de ma gratitude pour ses encouragements, sa patience, son aide et son incitation à poursuivre mon rêve*

*A mon fils Rachid anis a qui je souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de bonheur.*

*A mes parents en témoignage de ma reconnaissance pour tout ce que je leur dois. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon amour.*

*A ma belle famille pour leurs encouragements et leurs soutiens*

*A mon frère Mehdi et sa petite famille, ainsi qu'à la famille Hanachi, Mme Djeddar, la famille Goudgil pour leurs soutiens.*

*Ainsi qu'à tous mes amis en particuliers tous ceux qui m'ont procuré aide et réconfort durant la réalisation de ce travail. Avec toute mon affection.*

## **REMERCIEMENTS**

*Au terme de ce travail, il m'est agréable d'adresser mes plus vifs remerciements à tous ce qui ont contribué à sa réalisation.*

*Je remercie mon professeur Mme SATTA Dalila de l'université de Constantine pour sa précieuse aide et de n'avoir négligé aucun effort pour m'apporter soutien et recommandation. Ces précieux conseils et ces qualités de rigueurs scientifiques ont largement contribué à ma formation.*

*Je remercie le professeur Mme YEKHLEF de l'université de Constantine pour son aide*

*J'adresse mes remerciements à Monsieur le professeur agrégé Fethi Guemira chef de service de biologie clinique ainsi que le professeur agrégé Mme Monia Abdennebi de l'institut Salah Azaiez de Tunis, pour m'avoir fait l'honneur de me confier ce travail et permis de suivre mon stage pratique au sein de leur laboratoire.*

*Je remercie également le président ainsi que tous les membres du jury d'avoir bien voulu me faire l'honneur d'examiner ce travail.*

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	01
<b>RAPPEL THEORIQUE</b>	
<b>I-LES VOIES DE BIOTRANSFORMATIONS DES XENOBIOTIQUES</b>	04
<i>A-LES REACTIONS DE LA PHASE I</i>	04
<i>B- LES REACTIONS DE LA PHASE II</i>	07
<b>II-LES GLUTHATION -S-TRANSFERASES</b>	08
A- GSTM1, gène et enzyme	10
1- <i>Structure du gène GSTM1</i>	10
2- <i>polymorphisme</i>	11
3- <i>Variation de la fréquence du génotype GSTM1*0/0</i>	12
4- <i>Structure, substrats et expression de l'enzyme GSTM1</i>	12
B-GSTT, gène et enzyme	13
1- <i>Structure du gène GSTT2</i>	13
2- <i>Structure du gène GSTT1</i>	14
3- <i>Découverte du polymorphisme du GSTT1</i>	15
4- <i>polymorphisme GSTT1</i>	15
5- <i>Variation de la fréquence du génotype GSTT1*0/0</i>	16
6- <i>structure, substrats et expression de l'enzyme GSTT1</i>	16
<b>III-LES N-ACETYL-TRANSFERASES</b>	17
A- HISTORIQUE	17
B-PRINCIPALE FONCTION DES NAT	18
C- DETERMINISME GENETIQUE	21
D- STRUCTURE DES ENZYMES N-Acétyltransferases	22
E- POLYMORPHISME GENETIQUE	23
1- <i>méthode de détermination phénotypique</i>	24
2- <i>polymorphisme du gène NAT1</i>	25
3- <i>polymorphisme du gène NAT2</i>	27
<b>IV- LES ENZYMES DU CYTOCHROMES P450</b>	29
A- HISTORIQUE	30
B- CLASSIFICATION ET NOMENCLATURE	30

C- STRUCTURE	33
D-CYCLE REACTIONNEL	34
E- FONCTION BIOLOGIQUES DES CYTOCHROMES P 450	37
1- Métabolisme des substances endogènes	37
2- Métabolisme des xénobiotiques	37
V- REGULATION DE L'EXPRESSION DES ENZYMES DE DETOXIFICATION	40
1 – origine non génétique	40
a1- facteurs endogènes	40
a2- facteurs exogènes	41
2- Origine génétique	44
VI- ASSOCIATION DES POLYMORPHISMES DE DETOXIFICATION AU CANCER.	45
A- ROLE DES ENZYMES DE DETOXICATION DANS L'ACTIVATION DES CARCINOGENES CHIMIQUES.	45
B- ASSOCIATION DU POLYMORPHISME GST AVEC LES CANCERS	46
1- Association de la délétion du gène <i>GSTM1</i> et le cancer	47
2- Association du gène <i>GSTT1</i> et le cancer	48
C- ASSOCIATION DU POLYMORPHISME NAT2 AVEC QUELQUES PATHOLOGIES	48
D-ASSOCIATION DU POLYMORPHISME CYP 450 AVEC LES CANCERS	50
VII- LE CARCINOME DU NASOPHARYNX	51
A-RAPPEL ANATOMIQUE ET HISTOLOGIQUE DU NASOPHARYNX	51
B-ASPECTS ANATOMOPATHOLOGIQUES DES CARCINOMES DU NASOPHARYNX	53
C-EPIDEMIOLOGIE DU CARCINOME DU NASOPHARYNX	54
D-FACTEURS ETIOLOGIQUES DU CARCINOME DU NASOPHARYNX	55
1-Facteurs environnementaux	56
2- Facteurs génétiques	57
3-Facteur viral : le virus d'Epstein Barr ( <i>EBV</i> )	57
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	
I-PATIENTS ET TEMOINS	59
II-METHODES	59
A- EXTRACTION DE L'ADN	59
B-PRINCIPE DE LA PCR	60
1-ETUDE DES DELETIONS DANS LES GENES GST PAR PCR MULTIPLEX	61

2-ETUDE DU POLYMORPHISME NAT PAR RFLP	63
3-NESTED PCR	64
4-DIGESTION PAR LES ENZYMES DE RESTRICTION	64
<b>III-ANALYSE STATISTIQUE</b>	66
A- CALCUL DES FRÉQUENCES ALLÉLIQUES	67
B- TEST $\chi^2$	67
C- ODDS RATIO	67
D- INTERVALLE DE CONFIANCE POUR LE OR	68
<b>RESULTATS</b>	
I- CARACTERISTIQUES DES POPULATIONS ETUDIEES	69
II- ANALYSE DU POLYMORPHISME DES GENES GSTM1 ET GSTT1	70
III- ANALYSE DU POLYMORPHISME NAT2	74
a-l'alléle NAT2*5	74
b-l'alléle NAT2*6	75
c-l'alléle NAT2*7	80
d-l'alléle NAT2*14	81
IV -ANALYSE DES OR POUR LES ALLELES, LES GENOTYPES NAT*2 ET LE PHENOTYPE ACETYLEUR LENT AJUSTES SELON LE STATUT FUMEURS/NON FUMEURS	83
V-ANALYSE DES ASSOCIATIONS ENTRE LES DIFFERENTS GENOTYPES	85
<b>DISCUSSION</b>	86
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	92
<b>ANNEXES</b>	93
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	96
<b>RESUME EN LANGUE ANGLAISE (ABSTRACT)</b>	104
<b>RESUME EN LANGUE FRANCAISE</b>	105
<b>RESUME EN LANGUE ARABE</b>	106

# ***INTRODUCTION***

De part notre environnement, l'homme est quotidiennement exposé à une grande variété de substances exogènes d'origines diverses, rassemblées sous le terme de xénobiotiques (du grec *xenos*, étranger). Il peut s'agir de produits naturels, des médicaments, des polluants de l'environnement: toxines végétales et animales, additifs alimentaires, herbicides, pesticides, dérivés des combustibles domestiques et industriels, solvant et colorant.

Ces xénobiotiques sont généralement des substances hydrophobes, peu volatiles et peu précipitables. Ces propriétés rendent difficiles leur élimination urinaire. Ils ont une tendance naturelle à s'accumuler dans les phases lipidiques des membranes cellulaires engendrant ainsi une toxicité, voire une mort cellulaire inéluctable. Pour éviter cette accumulation, tous les organismes vivants ont développé, au cours de l'évolution, des systèmes enzymatiques de biotransformation et de détoxification. Le processus de détoxification représente l'ensemble des réactions biochimiques que subissent les substances endogènes et exogènes (xénobiotiques) dans le but de faciliter leur biotransformation et leur excrétion hors de l'organisme.

La conception classique de ce métabolisme voit un caractère biphasique comportant une phase I de "fonctionnalisation" qui a pour but d'augmenter la polarité de ces substances et les préparer à subir d'autres transformations au cours des réactions de la phase II dites de "conjugaison". En effet, cette dernière permet l'ajout d'un radical chimique hydrophile tel que le glutathion ou le groupement acétyl, soit directement sur le xénobiotique inchangé, soit sur les métabolites "fonctionnalisés" générés par la phase I. L'élimination de ces conjugués hydrophiles s'effectue par des glycoprotéines membranaires permettant le transport actif des produits de la phase II hors de la cellule.

Néanmoins, le métabolisme des xénobiotiques ne conduit pas toujours à la détoxification de ces composés. Dans certains cas, le produit oxydé ou métabolites intermédiaires présentent l'inconvénient d'être fortement réactifs et peuvent manifester des attaques électrophiles ou nucléophiles des macromolécules environnantes tel que l'ADN. Ainsi la formation d'adduits sur

l'ADN peut entraîner l'apparition d'éventuelles mutations ponctuelles et initier des processus de cancérogenèse.

La tolérance de l'organisme aux xénobiotiques présente une importante hétérogénéité interindividuelle. Celle-ci résulte en grande partie d'une variabilité dans l'activité des enzymes de biotransformation et ce, en raison de 2 types de facteurs : \*Des facteurs externes environnementaux

\*Des facteurs intrinsèques en particulier les polymorphismes génétiques, qui traduisent les variations de la structure primaire d'un gène au sein d'une même espèce. Ces variations stables et transmises de manière mendélienne, constituent l'origine moléculaire de la diversité phénotypique intra-spécifique des individus.

Les polymorphismes génétiques sont accompagnés d'effets fonctionnels et concernent de nombreuses enzymes de phase I comme de phase II. Les enzymes polymorphes majeurs en pharmacogénétiques sont les enzymes du cytochrome P450 pour la phase I, et les NAT et GST pour la phase II. Les variants enzymatiques connus sont présents à des fréquences variables au sein des différentes populations humaines. Les différences phénotypiques peuvent cependant être discrètes et dépourvues d'impact clinique important.

Le cancer constitue l'un des problèmes de santé à l'échelle mondiale et l'une des préoccupations majeures en matière de recherches scientifiques et médicales dans toutes les régions du globe. L'ampleur de cette morbidité n'a fait que croître ces dernières années. L'Afrique du Nord n'a pas échappé à cette tendance.

Le carcinome du nasopharynx (CNP) représente en Tunisie, le premier cancer des voies aérodigestives supérieures chez la femme (42.3%) et le deuxième, après le cancer du larynx chez l'homme (31.29%) [1].

En Algérie, les données épidémiologiques donnent un chiffre de 26347 nouveaux cas de cancer chaque année. Le cancer du nasopharynx représente la première tumeur ORL avec 8% des cancers. [2]

La répartition géographique particulière du CNP, laisse penser que des facteurs génétiques associés ou non à des facteurs environnementaux sont à l'origine de cette observation. Parmi les facteurs environnementaux suspectés, les substances chimiques carcinogènes du tabac, les nitrosamines provenant de la fumée du charbon et les expositions professionnelles au caoutchouc et aux matières plastiques semblent de plus en plus incriminées.

Les études faites en Afrique et en Afrique du nord dont le sujet est l'établissement d'une relation entre les enzymes du métabolisme des xénobiotiques et le cancer, sont peu nombreuses et parfois même quasiment absente en ce qui concerne le cancer du nasopharynx [3].

### **Objectif du travail**

Notre travail vise à établir une étude sur 66 patients ayant un cancer du nasopharynx et 100 témoins. Dans cette étude nous nous sommes intéressé aux polymorphismes génétiques des enzymes de la phase II de détoxification, à travers l'étude des gènes de la glutathion -S- transférases de classe thêta et mu (GSTM1, GSTT1) ainsi que le gène de la N-acétyltransférase de type II (NAT2), et cela afin d'explorer les facteurs génétiques potentiellement liés au cancer du nasopharynx et définir ainsi l'implication de ces gènes de détoxification dans ce cancer, qui semble de plus en plus fortement associé à des facteurs environnementaux.

# ***RAPPEL THEORIQUE***

## **I- LES VOIES DE BIOTRANSFORMATIONS DES XENOBIOTIQUES.**

Un xénobiotique subit donc plusieurs étapes de biotransformations simultanées ou successives dont les principaux sites sont les tissus situés à l'interface entre l'organisme et le milieu extérieur, à savoir : le tube digestif, l'appareil respiratoire, le rein et le foie. Ce dernier étant fonctionnellement le plus important.

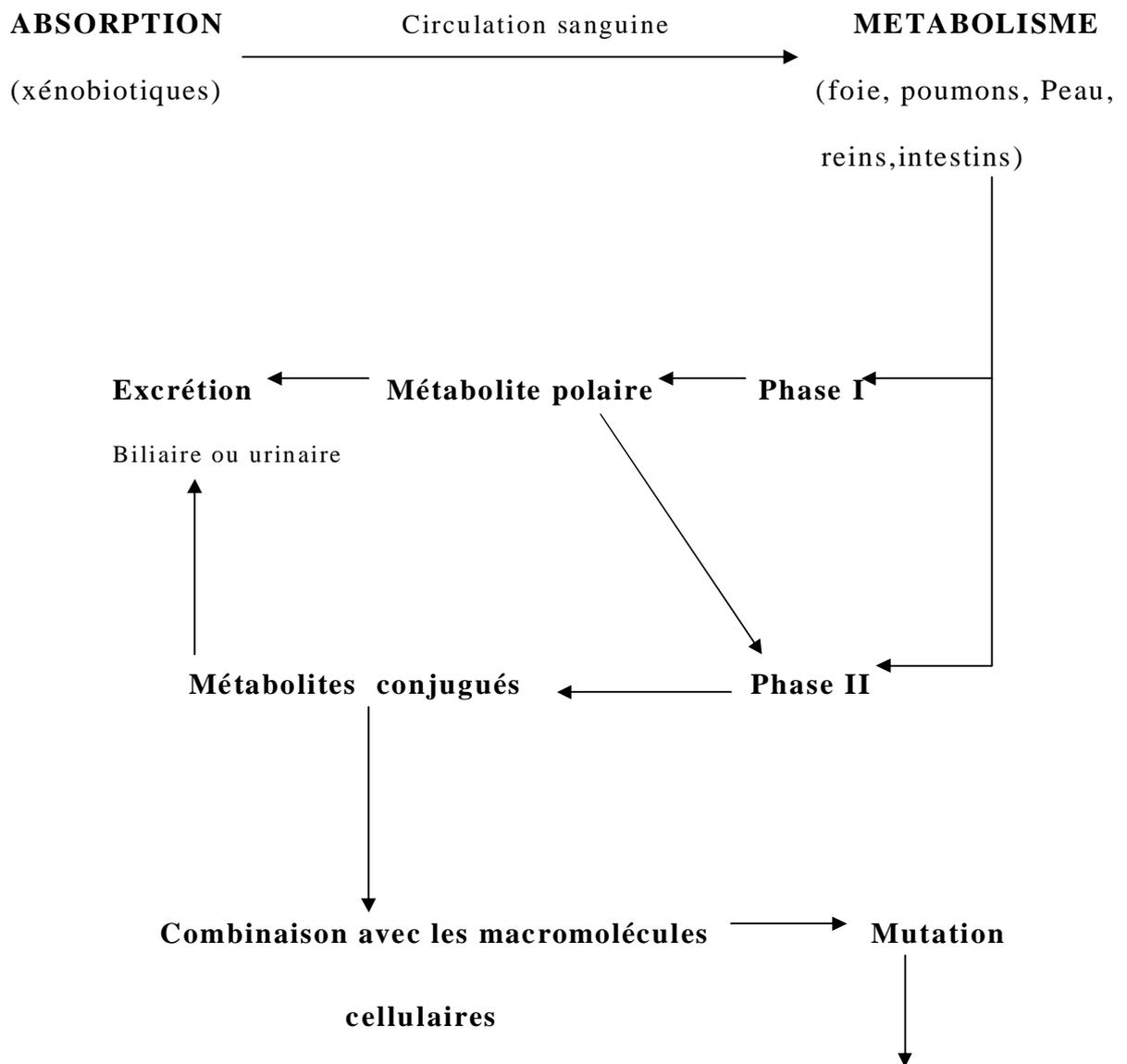
Les deux phases réactionnelles principales constituant les étapes de détoxification, phase I et phase II ne sont possibles que par l'intervention de systèmes enzymatiques spécifiques. Etant donné la grande diversité des xénobiotiques au quel l'organisme est exposé, il existe une multitude d'enzymes présentant des spécificités variées.

Il doit être rappelé que les réactions de biotransformation des xénobiotiques s'enchaînent rarement de façon linéaire, car deux voies ou plus prennent souvent naissance à partir d'un métabolite donné. On comprend dès lors que l'existence d'un variant enzymatique défectif pour l'une de ces voies réactionnelles pourra orienter le métabolisme d'une substance cancérigène vers une autre voie. Cette dernière, généralement mineure, prendra dès lors une grande importance et les polymorphismes qui la concernent pourront orienter le devenir des métabolites ainsi formés.

### **A- LES REACTIONS DE LA PHASE I**

Les réactions de cette phase ou métabolisme du premier passage, sont des réactions de dégradation et de fonctionnalisation représentées essentiellement, par des oxydations microsomaux hépatiques.

D'une façon générale, les réactions de la phase I aboutissent à un substrat plus hydrophile qu'au départ en ajoutant au substrat hydrophobe une fonction



## Cancérisation

**Figure 1: schéma récapitulatif du métabolisme des xénobiotiques**

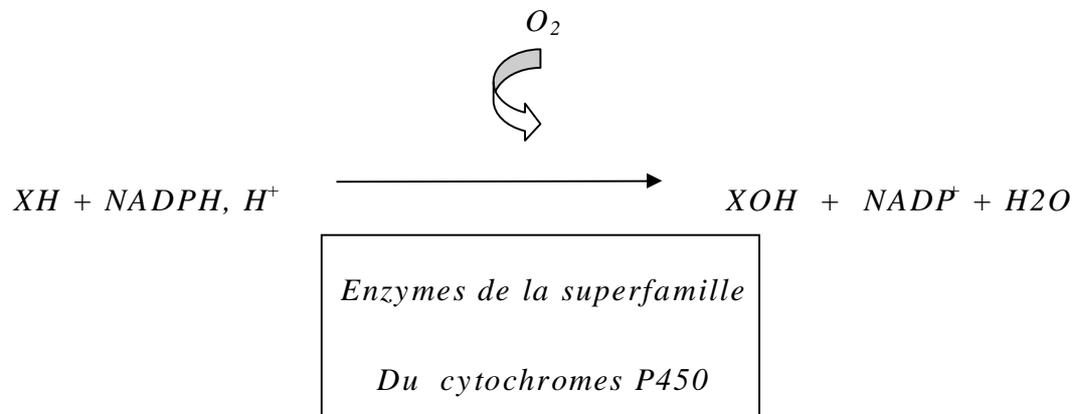
**Tableau 1: principales réactions de biotransformations**

Réactions	Enzymes	Localisation	Substrats
<i>Réaction de la phase I</i>			
<b>Oxydations</b>	Alcool déshydrogénases	Cytosol	Alcools
	Aldéhyde déshydrogénases	Cytosol	Aldéhydes
	Monoamine oxidases	Mitochondrie	Amines
	Flavine monooxygénases	Microsomes	Amines tertiaires
	Cytochromes P450	Microsomes	nombreux
<b>Réductions</b>	Cytochrome P450	Microsomes	nombreux
	Carbonyl réductases		Aldéhydes, Cétones
	Alcool déshydrogénases	Cytosol	Aldéhydes, Cétones
	Hydrolyses estérases	Cytosol	Esters
		Microsomes, mitochondrie	
	Peptidases	microsomes	
<i>Réactions phase II</i>			
	Epoxide hydrolase	Microsomes, Cytosol	Epoxide
	UDP Glucuronyl-transférases	Microsomes	Phénols, thiols, amine, Acides carboxyliques

<b>Gluthation-S-transférases</b>	microsomes	électrophiles
Sulfotransférases	cytosol	phénols, thiols, amines
O-, N-, S-méthyl-transférases	cytosol, microsomes	phénol, amines
<b>N-acétyl transférases</b>	cytosol	amines
Aminoacyl-transférases	microsomes	acides carboxyliques

chimique d'ancrage permettant, lors de la phase II, la fixation d'un groupe le plus souvent polaire (R).

Il s'agit de mono-oxygénation essentiellement catalysée pour plus de 95% des oxydations par les enzymes de la superfamille des cytochromes P450 et aboutissant à un substrat plus hydrophile en induisant un groupement polaire grâce à l'oxygène atmosphérique.

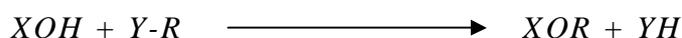


XH: xénobiotique hydrophobe  
XOH: composé intermédiaire hydrophile

**Figure 2: la réaction de monoxygénation de la phase I**

***B- LES REACTIONS DE LA PHASE II***

A la suite du processus métabolique de la phase I certains substrats seront excrétés car ils ont atteint leur stade final de biotransformation. D'autres substrats peuvent être conjugués avec des composés endogènes et subir ainsi une réaction de la phase II. Les réactions de la phase II se définissent par la conjugaison du xénobiotique ou de son métabolite avec des constituants endogènes, succédant aux oxydations si celles-ci n'ont pas suffi à éliminer le xénobiotique. Elles sont catalysées par des transférases microsomales ou cytosoliques selon la réaction suivante :



(*NAT, GST,..*)

Les transférases augmentent le plus souvent l'hydro solubilité du substrat et aboutissent en général à des composés biologiquement inactifs.

Il existe différents types de transférases, classées selon le type de composé endogène utilisé et le type de substrat conjugué. Par exemple, la glutathion S-transférase utilise le glutathion comme composé endogène pour conjuguer principalement les époxydes et les dérivés nitrés. Alors que la N-acétyl transférase utilise l'Acétyle CoA pour conjuguer des arylamines.

## **II- LES GLUTHATION -S-TRANSFERASES**

Les glutathion-S-transférases (GST) constituent une famille d'enzymes jouant un rôle clé dans la détoxification d'un grand nombre de composés hydrophobes et électrophiles endogènes et exogènes tels que les époxydes et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (composants cancérigènes de la fumée de tabac, benzo[a]pyrène).

*Attaque nucléophile*



(xénobiotiques et produits  
De stress oxydant)

Tous les eucaryotes expriment plusieurs isoenzymes cytosoliques et membranaires. Elles constituent des enzymes métaboliques de phase II, puisqu'elles catalysent la conjugaison de leurs substrats, et particulièrement les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), à un groupement glutathion réduit menant à la formation de métabolites hydrophiles excrétables.

Chez l'homme les GST sont préférentiellement synthétisés dans le foie, mais on les trouve également dans les reins, l'estomac et faiblement dans les muscles squelettiques et cardiaques. Elles sont caractérisées par leur présence aussi bien dans la fraction cytosolique que microsomale.

Les GST assurent leur fonction de conjugaison grâce à l'existence de deux sites enzymatiques de liaison [4] : un site de liaison pour le glutathion appelé G-site et un site de liaison pour le substrat appelé H-site.

Actuellement, les GST humaines sont réparties en 6 groupes selon leurs propriétés structurales (similarité des séquences nucléotidiques, localisations et nature du substrat) biochimiques (point isoélectrique) et immunologiques. On distinguera ainsi les classes : alpha ( $\alpha$ ), mu ( $\mu$ ), kappa ( $\kappa$ ), theta ( $\tau$ ), pi ( $\pi$ ), sigma ( $\sigma$ ) [5]

Chaque classe est représentée par un nombre précis de gènes.

La classe alpha (*GSTA*) est représentée par 5 gènes (*GSTA1*, *A2*, *A3*, *A4* et *A5*). La classe thêta par 2 gènes *GSTT1* et *GSTT2*.

La classe mu comprend 5 gènes: *GSTM1*, *M2*, *M3*, *M4* et *M5*.

Enfin, un seul gène a été décrit dans chacune des classes kappa (*GSTK*) et pi (*GSTP*) nommés respectivement, *GSTK1* et *GSTP1*. La classe sigma reste mal connue. [5]

Les gènes *GSTM1* et *GSTT1* qui font l'objet de ce travail, sont deux gènes appartenant respectivement aux classes mu et thêta. Il s'agit des gènes de la famille des glutathion S-transférases les plus étudiés. *GSTM1* est localisé sur le chromosome 1 et *GSTT1*, sur le chromosome 22.

## A-GSTM1, gène et enzyme

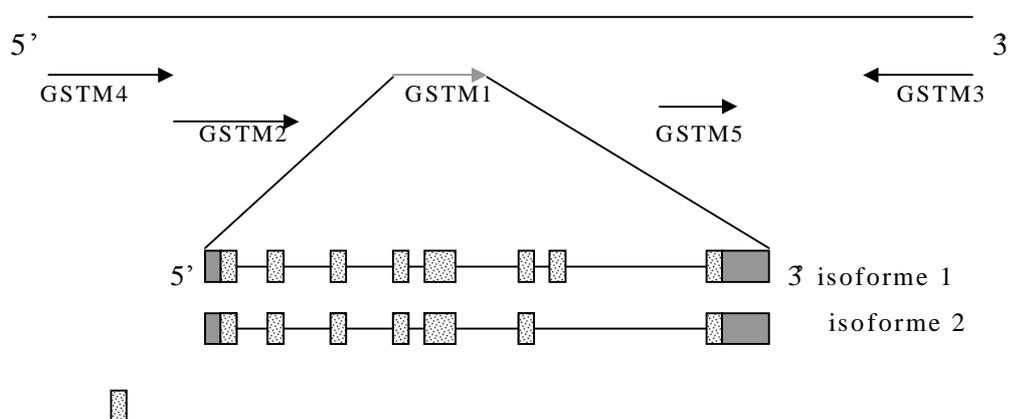
### 1-Structure du gène *GSTM1*

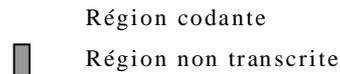
Le gène *GSTM1* appartient à la classe  $\mu$  qui renferme 4 autres gènes nommé *GSTM2*, *GSTM3*, *GSTM4* et *GSTM5* localisé sur le chromosome 1 au niveau de la région 1p13.3 [6]. La carte physique détaillée montre que le gène *GSTM1* est situé en aval des gènes *GSTM4* et *GSTM2* et en amont des gènes *GSTM5* et *GSTM3*.

Le gène *GSTM1* est constitué de 8 exons et 7 introns. Sa taille est de 5.92kb.

Des études ont montré que ce gène peut être dupliqué [7]. En effet, il peut présenter une autre copie sur le même chromosome, expliquant ainsi l'activité ultrarapide de l'enzyme GSTM1 observée dans certains cas. Cette duplication du gène est due à un crossing over inégal entre les deux brins des deux chromosomes 1, ce qui permet l'introduction d'un deuxième gène GSTM1 au voisinage du premier.

Chromosome : 1. position: 1p13.3





L'isoforme 1 est constitué de 8 exons.

L'isoforme 2 est constitué de 7 exons et donne naissance à une protéine plus courte de 37 acides aminés

### Figure3: Position et structure du gène GSTM1

Selon certains auteurs [7-8], il existe une autre classe mu, constituée de gènes ou de pseudo gènes, localisée au niveau du chromosome 3, probablement dans la région 3p24-3pter. Cette observation n'a pas été confirmée par d'autres auteurs.

#### 2- polymorphisme

Deux polymorphismes ont été décrits au niveau de GSTM1 :

- une délétion homozygote complète du gène, représentée par l'allèle GSTM1\*0/0. Cette forme allélique résulte d'un crossing over inégal entre deux régions répétées de 4.2kb, qui flanquent le gène GSTM1 et qui provoque une délétion de 15kb incluant le gène entier [9], conduisant au niveau phénotypique à un déficit enzymatique total. L'enzyme GSTμ est donc inactive chez plus de 50% des individus allant de 45 à 58% selon diverses études menées sur des populations européennes.

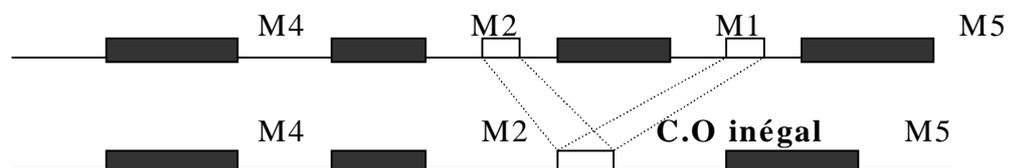


Figure4: Mécanisme d'apparition de la délétion GSTM1

- Transversion C-G (en position 534 de l'exon 7 du gène) définissant

ainsi les allèles GSTM1\*A et GSTM1\*B [10] qui diffèrent seulement par 1 seul acide aminé K172N. les deux versions restent parfaitement fonctionnels, et sans expression phénotypique particulière. Ces deux allèles sont considérés comme les représentants du phénotype de conjugateur positif.

Il existe une relation de codominance entre ces deux allèles (GSTM1\*A et GSTM1\*B). Par contre, il existe une relation de dominance entre ces allèles et l'allèle nul.

L'activité catalytique de l'enzyme est normale chez les individus ayant l'un des génotypes suivant GSTM1\*0/\*A, GSTM1\*0/\*B, GSTM1\*A/\*A, GSTM1\*A/\*B et GSTM1\*B/\*B. Cependant, l'activité est complètement nulle chez les individus ayant le génotype GSTM1\*0/\*0.

**Tableau2 : Différentes formes alléliques du gène GSTM1 humain**

<b>Polymorphisme</b>	<b>Position nucleotidiques polymorphes</b>	<b>Acides aminés changés</b>	<b>Activité Enzymatique</b>
GSTM1 *A	allèle sauvage		Normale
GSTM1*B	C534 G -exon 7-	K172N	Normale
GSTM1*0	Délétion de 15 kb du gène		Nulle

### ***3- Variation de la fréquence du génotype GSTM1\*0/0***

La fréquence du génotype nul présente une variation à plusieurs niveau: interethnique, intra-ethnique et selon le sexe.

Une différence significative du génotype nul a été observée entre les 3 grands groupes ethniques caucasien, asiatique et africain. Les résultats de différentes études montrent que la population asiatique présente la fréquence la plus élevé du génotype GSTM1\*0/0 ([11-12], alors que la fréquence la plus faible a été enregistré chez la population africaine.

D'autre part il existe une variation au sein d'un même groupe ethnique, cette variation résulte de différents facteurs tels que la taille de l'échantillon étudié, la tranche d'âge et la source de leur sélection.

La différence selon le sexe est significative seulement dans le groupe africain [11]

#### ***4- Structure, substrats et expression de l'enzyme GSTM1***

L'enzyme GSTM1 native est un dimère de 217 acides aminés. Chaque monomère présente deux domaines [4]:

\*le premier domaine est appelé G-site. Il a pour rôle principale d'établir la liaison et l'activation du glutathion.

\*le deuxième domaine est appelé H-site. Ce site est indispensable pour la liaison et l'orientation du substrat électrophile.

Cette enzyme catalyse la conjugaison du glutathion avec plusieurs substances électrophiles et carcinogènes tel que: les époxydes, les dérivés nitrés, les hydroxylamines, le styrène, l'oxyde de styrène, le benzène et le benzo (a) pyrène, composé carcinogène de la fumé du tabac. Cette enzyme intervient aussi dans la détoxification de quelques médicaments et des produits du stress oxydative

Le spectre d'expression de l'enzyme GSTM1 est relativement large puisqu'elle s'exprime dans différents tissus principalement dans le foie, mais aussi dans le poumon, le rein, la peau et dans les lymphocytes.

#### **B-GSTT, gène et enzyme**

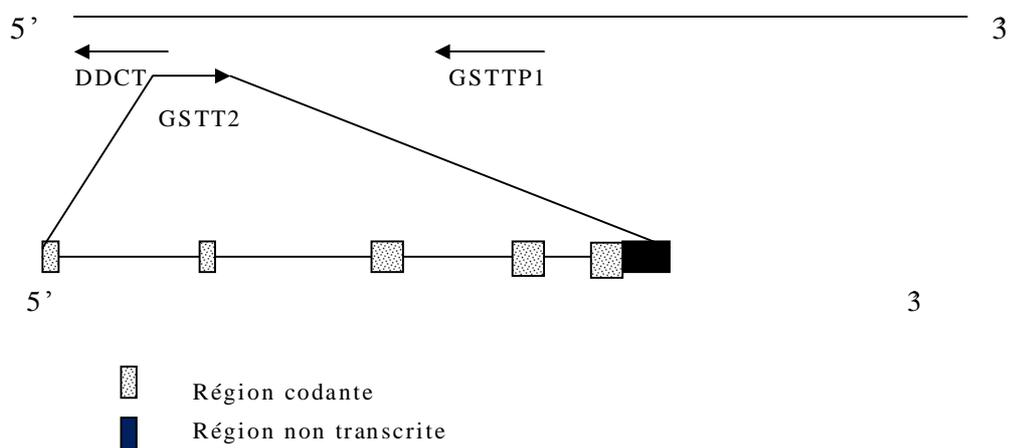
Chez l'homme, la classe thêta renferme deux gènes GSTT1 et GSTT2. Ces deux gènes sont situés sur le chromosome 22 et sont séparés par approximativement 50kb. Ils ont une structure similaire avec 5 exons et 4 introns. Les protéines issues de ces gènes sont identiques pour 55% de leurs séquences en acides aminés [13]

### 1-structure du gène *GSTT2*

Le gène *GSTT2* a une taille de 3.7kb. Il est situé tête à tête avec un gène codant pour la dopachrome tautomerase (*DDCT*). La séquence qui se situe entre les deux gènes contient un promoteur bidirectionnel.

Le gène *GSTT2* peut être dupliqué. Les études montrent que ces duplications peuvent porter soit une mutation au niveau du site de la jonction entre l'exon2 et l'intron2 ou alors un codon stop prématuré au niveau du codon 196. Ces changements font de ces dupliquas des pseudogènes appelés: *GSTTP1* et *GSTTP2* [13].

Chromosome:22; position: 22q11.2

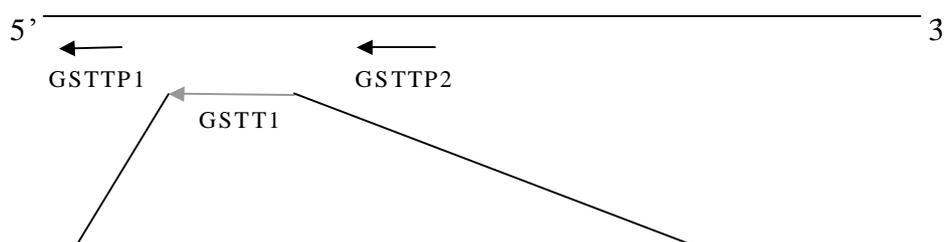


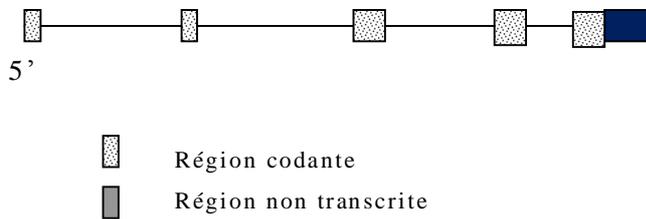
**Figure5: Position et structure du gène *GSTT1***

### 2-structure du gène *GSTT1*

Le gène *GSTT1* est précisément localisé à la position 22q11.23. Il a une taille 8.1kb.

Chromosome:22; position: 22q11.23





3

**Figure6: Position et structure du gène GSTT1**

### ***3- Découverte du polymorphisme GSTT1***

En 1989, une différence inter individuelle dans le métabolisme du méthyle chloride a été observée, montrant l'existence de trois groupes d'individus différents par le degré d'élimination métabolique du produit. Cette élimination peut être absente pour les individus n'ayant pas une activité enzymatique correspondante, moyenne pour les individus ayant une faible activité enzymatique ou une élimination normale pour les individus ayant une activité enzymatique normale [14]

### ***4-polymorphisme GSTT1***

On a pu établir une variabilité dans le métabolisme du chlorure de méthylène dans le sang humain. Cette différence était attribuable à un polymorphisme génétique au sein de *GSTT1* correspondant à une délétion partielle de 54 251 paires de bases du gène *GSTT1* et confère trois phénotypes distincts (" *nonconjugators*, *low conjugators* et *high conjugators* ") selon que deux, un seul ou aucun des deux allèles soit délété.

Le phénotype de non conjuguant est donc dû à une délétion homozygote de l'allèle fonctionnel de *GSTT1* et correspond par conséquent, au génotype *GSTT1\*0/0* [15]. Le phénotype de moyen conjuguant est dû à une délétion

hétérozygote de l'allèle fonctionnel de GSTT1 et le phénotype très conjuguant est dû à la présence homozygote de l'allèle fonctionnel de GSTT1.

En ce qui concerne la fréquence de ce polymorphisme, on rapporte qu'entre 15 à 20 % des Caucasiens de descendance européenne sont *GSTT1\*0* (donc homozygotes délétés sans activité de l'enzyme). [15]

Une étude récente a permis l'identification de deux autres allèles, l'allèle *GSTT1\*A* et l'allèle *GSTT1\*B*, qui sont le résultat d'une substitution d'une adénine (A) par une guanine (G) au niveau du nucléotide 310 (A310G) [16].

L'apparition de l'allèle *GSTT1\*B* sous la forme homozygote cause l'inactivation de l'enzyme GSTT1.

Le phénotype non conjuguant peut donc être due aux génotypes *GSTT1 0\*/0\**, *GSTT1 B\*/B\** ou *GSTT1 B\*/0\**. Alors que le phénotype conjuguant moyen est du à la présence du génotype hétérozygote *GSTT1\*A/\*0* ou le génotype *GSTT1\*A/\*B*.

Le phénotype de fort conjuguant est du à la présence homozygote de l'allèle *GSTT1\*A/\*A*.

**Tableau 3: différentes formes alléliques du gène GSTT1**

<b>Polymorphisme</b>	<b>Position nucleotidiques polymorphes</b>	<b>Acides aminés changés</b>	<b>Activité Enzymatique</b>
<i>GSTT1 *A</i>	Allele sauvage		Normale
<i>GSTT1*B</i>	A 310 G		Nulle
<i>GSTT1*0</i>	Délétion de 54251pb du gène		Nulle

### ***5- Variation de la fréquence du génotype GSTT1\*0/0***

La fréquence de ce génotype présente des variations interethnique, intraethnique et selon les sexes.

Une différence significative du génotype nul a été observé entre la

population caucasienne, asiatique et la population africaine. La fréquence la plus élevée du génotype GSTT1\*0/\*0 a été enregistré dans la population asiatique (52%) ([11-17]. Peu d'études ont concerné la population africaine [3-18].

Les études montrent aussi que la variation au sein d'un même groupe ethnique est statistiquement non significative, sauf dans quelques groupes de la population caucasienne et d'autres dans la population asiatique [11- 17]

### ***6-Structure, substrats et expression de l'enzyme GSTT1***

Glutathione S-transferase thêta 1 (GSTT1) est un membre de la superfamille des protéines catalysant la conjugaison du glutathion réduit à différents composés électrophiles.

Selon les études fonctionnelles, GSTT1 catalyserait la conjugaison de substances toxiques environnementales et de composés électrophiles mutagènes comme l'oxyde d'éthylène, le bromure de méthylène, différents alcanes halogénés et époxydes. Par ailleurs, on a initialement observé dans la population caucasienne que 60% des individus seulement conjuguait les halométhanes (un des substrats spécifique à GSTT1) alors que 40% ne le faisaient pas ([19- 11].

De point de vue structural, l'enzyme GSTT1 est aussi de structure dimérique, avec la présence des mêmes domaines (G-site et H-site) que l'enzyme GSTM1.

Chez l'homme, son spectre d'expression est presque identique à celui de l'enzyme GSTM1 sauf pour les lymphocytes, puisque l'enzyme glutathion S-transférase thêta se trouve en majeure partie dans les globules rouges, et pas dans les lymphocytes. Cependant, elle pourrait aussi être induite dans les autres tissus.

## **III- LES N-ACETYL-TRANSFERASES**

La famille des N-acétyl Transférases fait partie des enzymes assurant principalement la réaction de conjugaison de la phase II de détoxification.

## **A- HISTORIQUE**

Le polymorphisme des N-acétyl transférases représente l'un des exemples de variation pharmacogénétique décrit, et de l'un des plus documentés, depuis sa découverte au début des années 50 [20], en même temps que la découverte de la grande efficacité de l'isoniazide (INH) dans le traitement de la tuberculose.

L'administration de l'isoniazide a permis d'observer initialement que, si de nombreux patients excrétaient rapidement une dose d'INH sous forme de dérivés conjugués inactifs, d'autres conservaient plus longtemps une concentration plasmatique plus élevée d'INH non transformé, en relation avec l'élimination moins efficace du médicament. Des études quantitatives, par le calcul du rapport entre métabolites conjugués et métabolites non conjugués, ont vite montré que les populations étudiées se divisaient en 2 groupes d'individus en ce qui concerne la vitesse d'élimination de l'INH: les uns dits métaboliseurs rapides, les autres métaboliseurs lents de l'INH.

Ce n'est que 30 ans plus tard, qu'on a pu attribuer ces différences, à des variations de niveau d'activité d'une enzyme qui intervient dans le métabolisme de l'INH : la N- Acétyl transférase [21].

En effet, les métaboliseurs rapides ont une activité enzymatique normale et les métaboliseurs lents présentent une activité enzymatique diminuée, en rapport avec une quantité réduite d'enzyme au niveau du foie. Plus tard, on a montré que les acétyleurs lents présentent au niveau de la région codante du gène NAT, des variations alléliques dues à une substitution

## **B-PRINCIPALE FONCTION DES NAT**

Les N-acétyl transférases (NAT) constituent une famille d'enzymes, qui comme leur nom l'indique, catalysent le transfert d'un groupement acétyl issu de l'acétyl coenzyme A, sur l'azote du groupement amine primaire (-NH<sub>2</sub>) ou

hydrazine (-NH-NH<sub>2</sub>) d'une molécule aromatique ou arylamine receveuse. Le produit formé est une arylamide. [22]

En plus des réactions de N-acétylation, les NAT peuvent catalyser la O-acétylation de substrats aromatiques N-hydroxylés, ainsi que la N,O transacétylation intramoléculaire de composés N-hydroxylés et N-acétylés.

La N-acétylation des arylamines est considérée de façon générale comme exerçant une détoxification relative puisque cette réaction les rend en effet moins actives, alors que la O-acétylation serait plutôt activatrice.

Cependant, les N-Acétyl transférases agissent aussi sur d'autres substrats représentés par des médicaments de type isoniazide, dapsoné, sulfamides..., mais aussi des polluants présents dans l'environnement et dans l'alimentation. Les substrats endogènes des NAT sont encore mal connus.

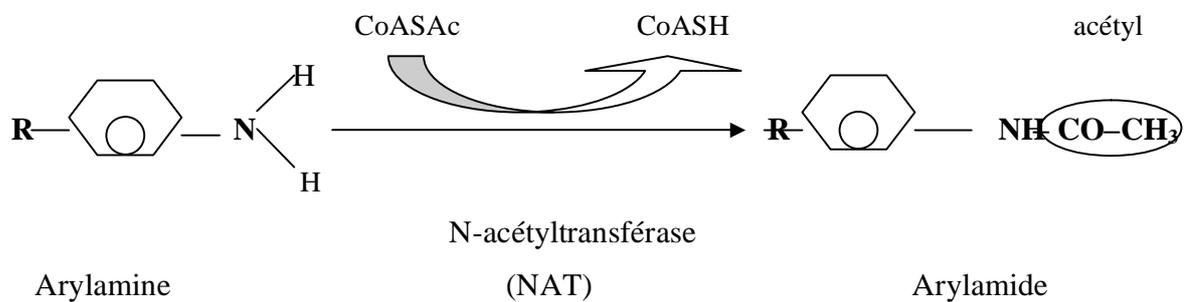
Chez l'homme, ces molécules peuvent être transformées plus ou moins sélectivement par l'une ou l'autre des deux formes distinctes d'arylamine N-acétyltransférases, en l'occurrence la N-acétyl transférases de type I (NAT1) et la N-acétyl-transférases de type II (NAT2).

Les deux arylamines NAT humaines connues sont des enzymes cytosolique. L'expression de NAT2 est essentiellement hépatique et substantiellement gastro-intestinal (colon, pancréas et l'œsophage). Alors que l'enzyme NAT1 est bien plus exprimée et a été détectée dans de nombreux tissus extra hépatiques [23- 24].

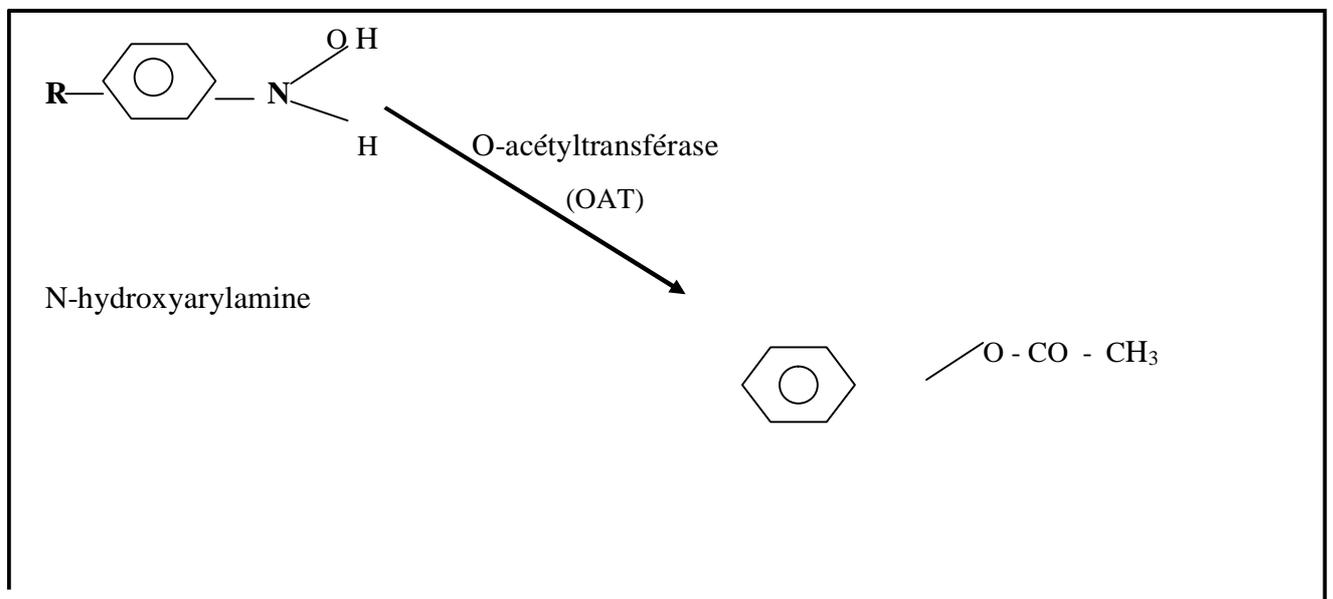
Chez les individus de type acétyleur rapide, NAT2 est exprimée dans le foie en quantité supérieure à NAT1 (12 fois environ), alors que le rapport des deux activités serait en faveur de NAT1 dans le cytosol colo-rectal et l'uroépithélium. Chez les acétyleurs lents, les contenus hépatiques en enzymes NAT1et NAT2 seraient par contre comparable (activité NAT2 jusqu'à deux fois plus forte seulement) [25]

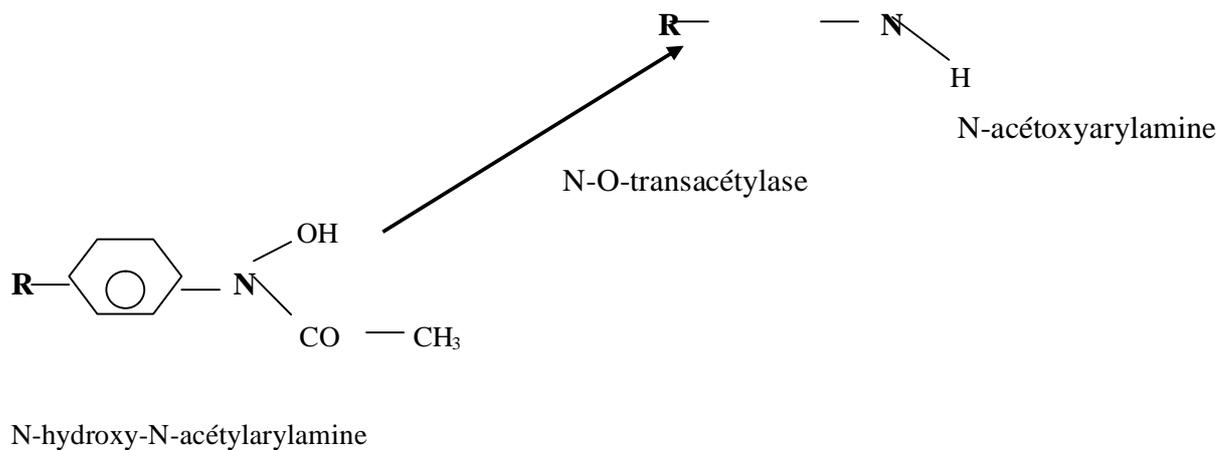
Le phénotype acétyleur lent est dû à un contenu hépatique diminué en enzyme NAT2 fonctionnellement active, atteignant un niveau résiduel.

Les études ont montré que le tissu hépatique montré toujours les mêmes taux d'ARNm que pour l'allèle de référence. Le phénotype acétyleur lent a dès lors été attribué à des défauts d'ordre traductionnel (efficacité de traduction diminuée) ou post traductionnel (dégradation accélérée de la protéine) [26-21]



**Figure 07a : La Réaction de N-acétylation**





**Figure 07b: Autres réactions de transfert d'acétyl catalysées par les NAT.**

### C-DETERMINISME GENETIQUE

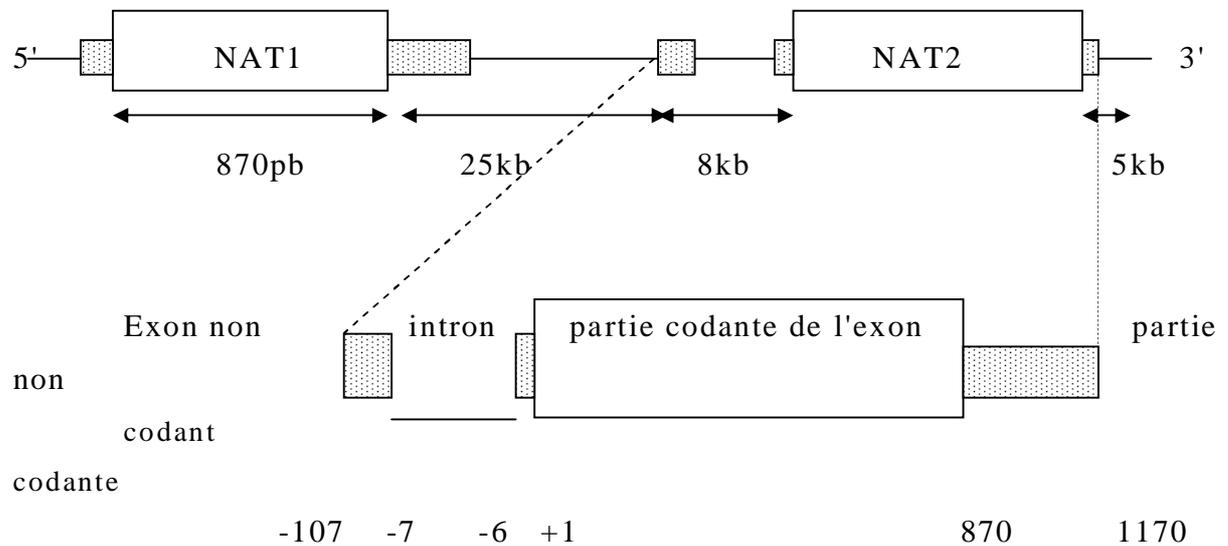
Les récentes avancées acquises dans la connaissance de la génétique des NAT ont permis d'élucider certaines des bases moléculaires du polymorphisme phénotypique de la N-acétylation observé chez l'homme.

Les deux formes enzymatiques des N-acétyl transférases sont codées par deux gènes différents : *NAT1* et *NAT2* isolé pour la première fois par Grant et collaborateurs en 1981[27].

Ces deux gènes sont séparés par 25kb et localisés sur le bras court du chromosome 8, plus précisément dans la région 8p22 [28].

Un troisième gène, *NATP1*, a été identifié sur le même chromosome et constitue très probablement un pseudogène. Il présente 79 et 80% d'identité nucléotidique avec *NAT1* et *NAT2*, respectivement. Il renferme plusieurs mutations expliquant le défaut d'expression. [28]

Les deux séquences codantes des gènes *NAT1* et *NAT2* constituées de 870pb sont dépourvues de d'interruption intronique (intron less proteine coding exon), et partagent 87 % d'homologie nucléotidique dans la région codante qui se traduit par 81% d'homologie au niveau de la séquence des acides aminés.



**Figure08: Représentation schématique du locus NAT humain**

Le gène *NAT1* produit son transcrit à partir d'une seule séquence nucléotidique, alors que le gène *NAT2* produit son ARNm grâce à la transcription du gène constitutif et d'une deuxième séquence exonique de 100pb sans aucune partie traduite et situés à environs 8kb en 5' du site du début de la transcription [28- 29]

Les gènes *NAT1* et *NAT2* semblent s'exprimer de façon indépendante et aucune donnée n'existe encore quant à leur contrôle par des facteurs de régulation en trans. L'expression de ses gènes donne naissance à deux protéines fonctionnelles de 290 acides aminés qui ne diffèrent que par 55 acides aminés au niveau de la région C-terminale [21-30] 33KD pour *NAT1* et 31KD pour *NAT2*.

Malgré le haut degré de ressemblance entre les deux protéines, leurs propriétés cinétique et électrophorétiques sont quelque peu différentes, leur permettant d'avoir des affinités et des fonctionnalités distinctes. [30]

## **D- STRUCTURE DES ENZYMES N-ACETYL TRANSFERASES**

La première structure spatiale d'une N-acétyl transférase a été publiée en 2000 par Sinclair et collaborateurs. En dépit du fait que la NAT était, dans cette recherche, d'origine bactérienne, elle a fourni des nouvelles informations structurales et fonctionnelles sur l'enzyme humaine. Cette étude a, en effet, montré que cette protéine présente dans l'espèce humaine une triade catalytique située au niveau de la partie N-Terminale. Elle est composée de la cystéine 68, de l'histidine et de l'aspartate (Cys-His-Asp)

Des analyses structurales ont permis de distinguer trois domaines au niveau de la protéine NAT [31].

\* Le premier domaine s'étend du premier acide aminé jusqu'à l'acide aminé 90. Il forme une partie de la crevasse ou de la fente composé par la triade catalytique et constitue le lieu où la cystéine 68 va se combiner aux substrats. Ce domaine est le plus conservé entre les espèces.

\* Le deuxième domaine s'étend de l'acide aminé 90 jusqu'à l'acide aminé 210. Il forme l'autre partie de la crevasse et se présente essentiellement sous forme de bâtonnets bêtas. Cette zone présente des particularités selon qu'il s'agisse de l'enzyme NAT1 ou NAT2, puisque au niveau de la position 93 et 125 les acides aminés sont différents permettant à l'enzyme NAT2 d'établir plusieurs liaisons interactives (F93 et S125 pour NAT2 et V93 et F125 pour NAT1).

\*le dernier domaine intéresse particulièrement le groupement carboxyle. Il est formé d'une combinaison entre des hélices alfa et des bâtonnets bêtas. C'est le domaine le plus diversifié entre les espèces.

La réaction d'acétylation se produit en deux étapes séparées [32] :

\*d'abord l'acétyl coenzyme A se lie à l'enzyme. Sa moitié est transférée sur la cystéine 68 de la protéine, le reste est libéré dans le cytoplasme.

\*Durant la seconde étape, il s'établit une liaison entre le substrat et l'enzyme acétylée, la moitié du coenzyme A va donc être transférée au substrat. Après se transfert, le produit acétylé se détache de l'enzyme.

## **E- POLYMORPHISME GENETIQUE**

Il est maintenant bien connu que les gènes codant aux formes NAT1 et NAT2 sont polymorphes. Le séquençage de la région du bras court du chromosome 8, montre plusieurs niveaux de mutations ponctuelles pour chacun des gènes, donnant naissance aux différentes formes alléliques constituant le polymorphisme génétique [30-33] (tableau 4 et 4').

L'allèle de référence ou allèle sauvage est représenté par l'allèle NAT1\*4 et NAT2\*4. Toutes les autres formes diffèrent de l'allèle de référence par une, deux ou même trois substitutions nucléotidiques.

Les conséquences sur la séquence en acides aminés sont différentes, puisque certaines de ces mutations sont silencieuses, alors que d'autres altèrent la séquence. Ceci peut changer le niveau d'activité de l'enzyme, par une variation quantitative ou qualitative (variation d'affinité au substrat).

### **1-méthode de détermination phénotypique :**

La détermination phénotypique *in vivo* consiste à quantifier les métabolites plasmatiques ou urinaires produits après l'administration d'une sonde métabolique. Ces composés-test ont initialement été exclusivement des médicaments, avant que la caféine ne s'avère utilisable.

Actuellement, la caféine est le substrat le plus communément utilisé comme sonde métabolique pour la détermination du statut d'acétylation. Elle est exempte de toxicité sur une large gamme de doses et permet de déterminer facilement, avec précision, et en toute sécurité le phénotype d'individus sains et malades.

Le test consiste à faire ingérer par le sujet 200 à 300mg de caféine sous forme purifiée ou alimentaire (café, thé ou boisson à base de cola). Les urines

sont collectées pendant les 24 heures (test classique) ou les 2 à 6 heures (test simplifié) suivant l'ingestion. Les métabolites de la caféine sont quantifiés à partir de petits échantillons d'urine (200µl) par HPLC.

Le phénotype d'acétylation (lent ou rapide) est mis en évidence par la détermination de la vitesse de formation des métabolites conjugués éliminés dans les urines.

Ce test est préférentiellement utilisé pour la détermination phénotypique de NAT2, alors que l'acide amino-salicylique est le plus utilisé pour la détermination du phénotype de NAT1, en utilisant le même principe.

Les études cinétiques montrent que les acétyleurs lents sont caractérisés par une vitesse maximale inférieure à 50% de la vitesse maximale enregistré pour les acétyleurs rapides et cela sans aucune altération de la constante de Michaelis ( $K_m$ ) pratiquement similaire pour les deux phénotypes.

Les différentes combinaisons d'allèles NAT pourraient réaliser dans leur ensemble un spectre de réactivités chevauchantes envers certains substrats. Ainsi des génotypes considérés comme lents pourraient s'avérer rapides vis-à-vis d'autres substrats. Au total, cette variabilité métabolique pourrait moduler de manière très complexe les réponses à des thérapies concomitantes multiples.

## **2-polymorphisme du gène *NAT1***

Longtemps considéré comme monomorphe, le gène *NAT1* présente en réalité une vingtaine de variations nucléotidiques. Les données fonctionnelles obtenues *in vitro* et *in vivo* indiquent que certains allèles sont associés à des enzymes à activité diminuée par rapport au type de référence (cas des enzymes associées aux allèles *NAT1\*11*, *NAT1\*14* comparées à l'enzyme de type *NAT1\*4*), et que d'autres allèles sont associés à des activités nulles (*NAT1\*15*, *NAT1\*17*).

Cependant d'autres formes alléliques auraient une activité augmentées (*NAT1\*10*) pour les substrats testés (acide *para*-amino benzoïque en particulier) [23].

Les sites polymorphes NAT1 ayant été identifiés sont situés dans la région codante ainsi que dans les régions 5' et 3' flanquantes.

La plus remarquable de ces variations est la transversion T1088 en A située au niveau d'une séquence consensus d'un signal de polyadénylation.

On retrouve également une délétion portant sur un nonanucléotide à proximité du signal de polyadénylation.

Cependant, La caractérisation des phénotypes associés aux différents génotypes NAT1 n'est pas achevée.

**Tableau 4 : Différentes formes alléliques du gène NAT1 humain**

<b>Polymorphisme</b>	<b>Position nucléotidiques polymorphes</b>	<b>Acides aminés changés</b>	<b>Activité Enzymatique</b>
----------------------	--	------------------------------	-----------------------------

	-344	-40	445	459	559	560	640	1075	1088	1091	1095			
NAT1*4	C	A	G	G	C	G	T	*	T		C		Normale	
NAT1*3											A	Aucun	Inconnue	
NAT1*5			Plusieurs substitutions										Plusieurs	Inconnue
NAT1*10									A		A	Aucun	Rapide	
NAT1*11	T	T	A	A			G	Δ9			A	Val149Ile	diminué	
NAT1*14						A			A		A	Arg187gln	Diminuée	
NAT1*15					T							Arg187stop	nulle	
NAT1*16										{AAA}	A	Aucun	Inconnue	
NAT1*17			plusieurs substitutions										plusieurs	Nulle

### 3-polymorphisme du gène *NAT2*

Neuf substitutions nucléotidiques ponctuelles ont été identifiées dans la séquence codante *NAT2*. Sept d'entre elles sont des transitions entraînant chacune une substitution d'acide aminé et huit altèrent au moins un site de restriction.

Quinze allèles sont actuellement connus (tableau 4'), parmi lesquels treize allèles majeurs, c'est-à-dire rencontrés à des fréquences significatives dans plusieurs populations [33]. Chacun de ces treize allèles a été corrélé à une activité de N-acétylation, deux variant rares restent à activité inconnues.

Les variant majeurs NAT2 se divisent en quatre catégories, chacune étant caractérisée par la présence d'une seule substitution nucléotidique qui se traduit au niveau protéique par un changement non conservatif d'acide aminé.

Ces changements donnent naissance aux quatre allèles suivants: NAT2\*5, NAT\*6, NAT2\*7 et l'allèle NAT2\*14. L'activité enzymatique du produit NAT dans chacun de ces allèles est diminuée. Il s'agit des acétyleurs lents dont les fréquences varient considérablement entre les groupes ethniques [34- 31]

Dans les populations africaines et caucasiennes, la fréquence des acétyleurs lents varie de 40 à 70% [34]. En Europe, presque la moitié de la population sont des acétyleurs lents, alors que dans les pays asiatiques tels que le japon et la chine, la fréquence des acétyleurs lent se situe entre 10 et 30% [35].

Ces fréquences alléliques présentent même des variations au sein même du groupe. En Afrique, par exemple pour l'allèle NAT2\*14, on suggère l'hypothèse de l'existence d'un gradient Est-Ouest avec 19% en Guinée-Bissau, 3 % au soudan et l'absence totale de cet allèle en somalie [36].

**Tableau 4' : Différentes formes alléliques du gène NAT2 humain.**

<b>Polymorphisme</b>	<b>Positions nucléotidiques polymorphes</b>										<b>Acides aminés changés</b>	<b>Activité enzymatique</b>
	191	282	341	434	481	590	803	845	857			
NAT2*4	G	C	T	A	C	G	A	A	G			Rapide
NAT2*5A			C		T						Ile114 Thr	Diminuée
NAT2*5B			C		T		G				Lys268Arg	Diminuée
NAT2*5C			C				G					Diminuée
NAT2*6A		T				A					Arg197Gln	Diminuée
NAT2*6B						A						Diminuée
NAT2*6C		T				A	G					Diminuée
NAT2*7A									A		Gly283Glu	Diminuée
NAT2*7B		T							A			Diminuée
NAT2*12A							G				Lys268Arg	Rapide
NAT2*12B		T					G					RAPIDE
NAT2*13		T										rapide
NAT2*14A	A										Arg84Gln	Diminuée
NAT2*14B	A	T										Diminuée
NAT2*17			C								Gln145Pro	Inconnue
NAT2*18								C			Lys 282Thr	Inconnue

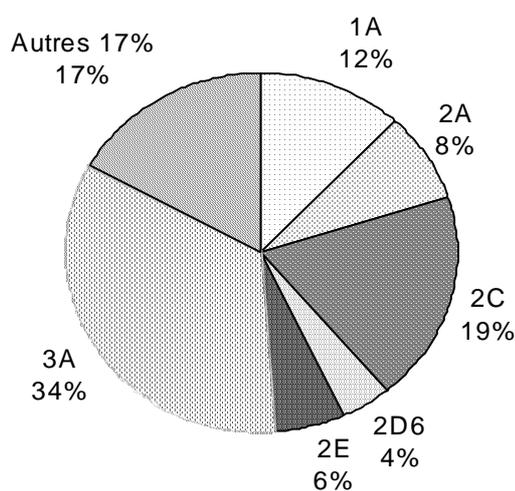
#### IV- LES ENZYMES DU CYTOCHROMES P450

Les cytochromes P450 (CYP) forment une superfamille multigénique d'enzymes hépatiques clé de la fonction de détoxification. Ils sont impliqués dans le métabolisme oxydatif de molécules très diverses, comprenant aussi bien des xénobiotiques (médicaments, pesticides polluants, toxiques, cancérigènes..) que des substances endogènes (hormones stéroïdiennes, acides gras, vitamines...).

Il s'agit de monooxygénases localisées sur le réticulum endoplasmique, et ayant acquis au cours de l'évolution des espèces un degré de diversité leur permettant de métaboliser un grand nombre de corps chimiques.

Une des caractéristiques de ces enzymes est leur inductibilité, en particulier par certaines hormones, médicaments ou polluants chimiques. Paradoxalement, ces enzymes ont également un grand potentiel d'activation chimique de certains composés pouvant produire des métabolites toxiques, mutagènes voire cancérigènes. Cette ambivalence et les conséquences majeures qui en découlent ont conduit à s'intéresser aux cytochromes P450.

Chez l'homme, les familles les plus prépondérantes de CYP450 sont représentées par les familles CYP1A1, CYP2C et CYP3A.[37]



**Figure 09: Répartition des P450s dans le foie humain**

## **A- HISTORIQUE**

La présence d'un pigment capable de lier le monoxyde de carbone a été observé pour la première fois par GR Williams en 1955, mais ce n'est que plus tard que l'existence de ce pigment dans des microsomes hépatiques de rat et de porc a été confirmé.

Ce pigment présentant une absorption à 450nm fut caractérisé comme une hémoprotéine. Ces protéines furent rapidement impliquées dans le métabolisme oxydatif des stéroïdes au niveau des glandes corticosurrénales et des xénobiotiques dans le foie.

Il fut ensuite établi que l'oxydation des xénobiotiques par les microsomes hépatiques et l'élévation de l'activité métabolique après traitement des animaux par différents médicaments et autres xénobiotiques, pouvaient être attribuées au cytochrome P450 et à son inductibilité

Au milieu des années 70, les premières formes protéiques furent isolées, puis au début des années 80, les premières séquences primaires furent établies, ainsi que la séquence en acides nucléiques correspondant, ce qui permit de démontrer clairement que ces différentes formes de cytochromes P450 étaient des produits de gènes différents.

## **B- CLASSIFICATION ET NOMENCLATURE**

Nelson et al recensaient en 1995, 481 gènes codant pour les CYPs et 22 pseudogènes. Ces gènes été décrits chez 85 eucaryotes, incluant vertébrés, invertébrés, plantes et algues et 20 procaryotes. De nombreux autres cytochromes P450 ont été isolés depuis et plus de 1000 sont aujourd'hui clairement identifiés.

Depuis 1987, ces protéines sont répertoriées et désignées selon une nomenclature basée uniquement et strictement sur le pourcentage d'homologies entre les séquences en acides aminés, les similitudes en terme d'activité enzymatique et de régulation ne sont pas prises en compte.

Ainsi, si deux cytochromes P450 présentent plus de 40% d'homologie dans la séquence d'acides aminés, ils seront considérés comme appartenant à la même famille. Si l'homologie est supérieure à 55% les protéines font parties de la même sous famille. Les protéines ayant moins de 3% de divergence sont classées comme variants alléliques.

On dénombre actuellement chez l'homme, aux moins 17 familles différentes de cytochromes P450 incluant 26 sous familles organisées en 49 gènes hautement similaires et à localisation chromosomique différentes, et 15 pseudogènes (tableau 5). Pour désigner un gène chez l'homme on utilisera la forme italique CYP pour cytochrome P450, suivi du nombre arabe désignant la famille, puis une lettre désignant le sous famille et enfin d'un chiffre arabe désignant le gène. La lettre P après un gène désigne un pseudogène. Les ADNc, ARNm et protéines de toutes les espèces doivent être désigné en lettre capitale.

En se basant sur cette similitude entre les séquences en acides aminés, et dans certains cas en tenant compte des activités catalytiques, il a été possible de déterminer si deux gènes étaient issus ou non d'une duplication de gènes et d'établir des arbres phylogénétiques (figure 10). En 1999, le nombre de famille est de 150 et la classification requiert un niveau supplémentaire de regroupement.

Les clans font alors leur apparition et rassemblent les familles qui appartiennent à un même groupe (issu d'un même gène ancestral) d'après les nombreux arbres phylogénétiques établis auparavant. Ces clans sont désignés par le chiffre le plus petit des familles qu'ils regroupent ou de celui comportant la famille majoritaire. Ainsi, le clan 2 regroupe la famille CYP2 de même que les familles CYP1, 17, 18 et 21

Un certain nombre de cytochromes P450 sont maintenant connus pour leur polymorphisme d'expression ou de fonction, et pour certains d'entre eux les bases moléculaires de ces variations sont décrites.

La famille CYP1 comporte deux sous famille 1A et 1B. La sous famille 1A est composée de deux membres 1A1 et 1A2 dont les séquences nucléiques sont très proches (92% de similitude).

### **Figure 10:Arbre phylogénétique incluant des familles de CYPs**

La forme 1A1 est présente à un taux très bas dans le foie: cette enzyme est essentiellement extra hépatique. La forme 1A2 est impliquée dans le métabolisme de procarcinogènes (amines aromatiques), ainsi que dans la survenue d'hépatites auto-immunes. Cette famille est inductible par les hydrocarbures aromatiques.

La famille CYP2 est divisée en un très grand nombre de sous-famille: 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F et 2J.

La sous-famille 2C comporte plusieurs membres (2C8, 2C9 et 2C19) qui sont impliqués dans le polymorphisme oxydatif de la méphénytoïne et du tolbutamide. La sous-famille 2D est responsable du polymorphisme de la débrisoquine hydroxylase. La sous-famille 2E a un seul membre 2E1 inductible par l'alcool, l'isoniazide, l'acétone et les dérivés du pyrazole. Cette sous-famille est inductible, à des degrés variables, par le phénobarbital.

La famille CYP3 comporte une seule sous-famille 3A. Trois membres de cette sous-famille (3A4, 3A5 et 3A7) ont des séquences extrêmement proches (<5% de divergence). Ils sont inductibles par les glucocorticoïdes de synthèse, le phénobarbital et par deux types d'antibiotiques, les macrolides et la rifampicine.

Le tableau 5 résume les familles et sous-familles du CYP 450 et montre que presque toutes les isoformes des familles 1 à 3 présentent un polymorphisme d'expression ou d'activité. Toutefois, la fréquence et le nombre des mutations décrites varient beaucoup d'une enzyme à l'autre.

Des efforts ont été faits afin de trouver un polymorphisme important des CYP3A4 et 1A2, sans succès. Des sites polymorphes ont été identifiés dans la région régulatrice de ces gènes mais leur impact reste mal défini.

La notion de polymorphisme génétique s'est étendue aux monooxygénases de la phase I avec la mise en évidence du polymorphisme de l'hydroxylation de la débrisoquine et de la spartéine et d'environ soixante autres agents thérapeutiques.

D'autres parts de nombreuses études actuelles mettent en cause les cytochromes P450 dans la susceptibilité individuelle au cancer induit par les xénobiotiques tel que la fumée du tabac. Ces études montrent une prédisposition génétique dans la capacité à métaboliser les substances cancérigènes présentes. Les familles les plus impliquées dans ce genre d'études sont les CYP1A1, CYP2E1 et CYP2D6.[38]

## **C- STRUCTURE**

Les cytochromes P450 constituent un système enzymatique complexe de structure globulaire, fortement ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique ou les microsomes. Cette configuration leur permet d'avoir accès autant au substrat lipophiles qu'aux composés hydrophiles [37].

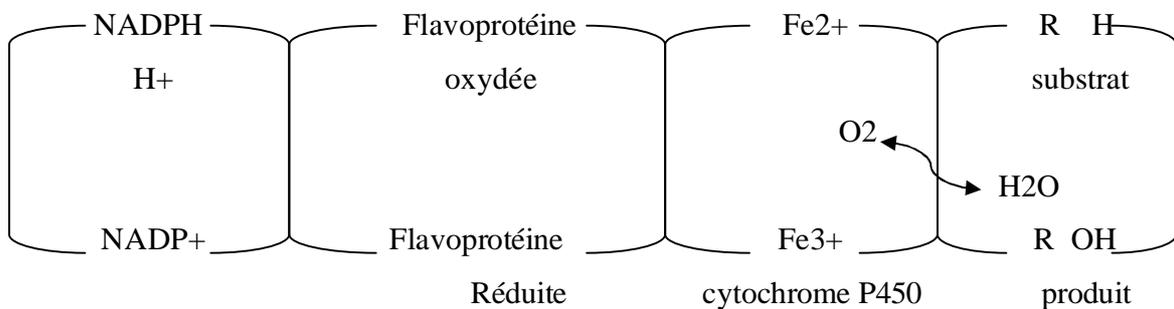
Ce système est formé au minimum de trois composants: une partie protéique, l'apoprotéine et d'un groupement prosthétique liée à un atome de fer par quatre liaison covalentes. La cinquième liaison de coordination du fer est réalisée avec le groupement thiolate d'une cystéine conservée et positionnée dans le site catalytique. Enfin la sixième liaison permet la fixation de diverses molécules comme l'eau et l'oxygène moléculaire. Les cytochromes P450 sont donc des protéines à hème-thiolates.

#### D-CYCLE REACTIONNEL :

L'insertion d'un atome d'oxygène dans un substrat est l'aboutissement de la réaction d'hydroxylation catalysée par le cytochrome P450. La séquence d'événements qui conduit à cette réaction peut s'écrire suivant le bilan global:



Les P450 sont associés à des chaînes de transfert d'électrons distinctes suivant leurs localisations microsomales ou mitochondriales mais qui utilisent toutes les deux la NADPH comme source d'électrons.



**Figure 11: Chaîne de transfert d'électrons utilisant un cytochrome P450 dans les microsomes.**

Les CYPs du réticulum endoplasmique sont réduits par une protéine membranaire, la NADPH cytochrome P450 réductase. Cette protéine comporte deux domaines contenant chacun une flavine.

Deux électrons sont ainsi transmis du FAD au FMN puis à l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) de l'hème du cytochrome. Pour les cytochromes mitochondriaux, la chaîne de transfert des électrons comporte, outre une réductase à flavine, une composante supplémentaire (protéine Fer-Soufre), la ferrédoxine (adénodoxine dans les glandes surrénales) qui joue le rôle de donneur d'électrons.

Les événements du cycle catalytique des cytochromes P450 peuvent être schématisés comme suit (Figure 12):

1- Fixation du substrat sur le site actif de l'enzyme dont le fer hémique est sous la forme ferrique avec expulsion des molécules d'eau présentes dans le site actif et rupture de la liaison fer- $\text{H}_2\text{O}$ .

2- Réduction du fer ferrique ( $3+$ ) en fer ferreux ( $2+$ ) par transfert d'un électron de la NADPH-P450 réductase sur le fer ferrique.

3- fixation de l'oxygène moléculaire sur la sixième liaison du fer hémique.

4- incorporation d'un électron supplémentaire provenant soit du cytochrome b5 soit directement de la NADPH-P450 réductase, et réduction du dioxygène ferreux en complexe activé capable de réagir avec le substrat. A ce stade, on peut avoir production de peroxyde d'hydrogène suivant la réaction:  $(\text{Fe}^{2+} - \text{O}_2^-) (\text{RH}) + 2\text{H}^+ \rightarrow (\text{Fe}^{3+}) (\text{RH}) + \text{H}_2\text{O}_2$  in vivo, la signification de cette étape non productive n'est pas claire.

5- première protonation nécessaire à la libération d'H<sub>2</sub>O de l'étape suivante.

6- libération d'une molécule d'eau après une deuxième protonisation et clivage hétérolytique de la liaison dioxygène.

7- transfert de proton du substrat vers l'oxygène et formation d'intermédiaires radicalaires OH et R.

8- addition du radical hydroxyle (OH) sur le radical R. A ce stade, il peut y avoir libération de radicaux libres dans la cellule, pouvant générer un stress oxydant.

9- libération du produit

L'ensemble du processus catalytique se déroule selon une cascade d'événements conduisant simultanément à la libération du produit et à la régénération complète de l'enzyme.

## **Figure 12: Cycle catalytique du P450**

### **E- FONCTION BIOLOGIQUES DES CYTOCHROMES P 450**

Les fonctions biologiques des CYPs peuvent se diviser en deux domaines d'importance égale: d'une part le métabolisme des substances endogènes, d'autre part le métabolisme des xénobiotiques. Il arrive que certains CYPs présentent des potentialités dans chacun des deux domaines.

#### ***1- Métabolisme des substances endogènes:***

Les principales réactions catalysées par les P 450 ont trait à l'hydroxylation des stéroïdes, des vitamines A et D et des acides biliaires. L'importance de ces voies métaboliques est soulignée par la gravité des symptômes relevés chez des patients déficients en certains des CYPs impliqués dans ces activités. Ces cytochromes sont localisés dans de très nombreux tissus tels que corticosurrénale, testicule, ovaire, placenta et tissus adipeux.

La spécificité d'expression tissulaire des CYP contrôle la production de différents stéroïdes dans différents tissus: aldosterone, cortisol dans les glandes surrénales, testostérone dans le testicule. En plus de cette distribution tissulaire, une distribution subcellulaire de ces enzymes a aussi été retrouvée.

#### ***2- Métabolisme des xénobiotiques***

Les CYPs impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques montrent des spécificités larges et croisées pour de nombreux substrats. En effet, la spécificité de substrats des cytochromes P450 est relative et chevauchante (puisque'un CYP peut métaboliser plusieurs substrats et un substrat peut être métabolisé par plusieurs CYP).

Malgré la proximité de leurs séquences protéiques, les isoenzymes d'une sous-famille montrent des activités catalytiques divergentes. Le tableau 3 présente quelques substrats des P 450 des familles 1 à 3 chez l'homme.

**Tableau 05: liste de quelques substrats des P450s**

<b>CYP</b>	<b>Substrats</b>
CYP1A1	Chlorzoxazone, théophylline, étoxyresorufine
CYP1A2	Acetaminophène, acétanilide, caféine, phénacétine, propranolol, tachine
CYP2A6	Coumarine
CYP2B6	cyclophosphamide, S-Méphénitoine (nirvanol)
CYP2C8	diclofenac, mephenitoine, toglitazone
CYP2C9	acide acethyl salicylique, diclofenac, ibuprofene, phenytoine, acide tielinique, tolbutamine, warfarine
CYP2C19	citalopram, cycloguanil, cyclophosphamide, diazepam, hexobarbital, omeprazol, proguanil, propranolol
CYP2D6	clozapine, codéine, débrisoquine, propranolol, spartéine.
CYP2E1	alcools, acetaminophen, chloroforme, hqlothane, acide launique
CYP3A4	acetaminophen, amiodarone, cocaine, codeine, diazepam, digitoxine, citalopram, chlorzoxazone, erythromicine, methadone, taxol, xarfarine, omeprazole.

En présence de substrat exogène, les CYPs catalysent un très grand nombre de biotransformations, qui se distinguent principalement par l'activité biologique éventuelle du produit obtenu. Dans la plupart des cas, ce dernier a une formation qui lui permet de faciliter l'élimination du composé initial par l'ajout de groupements polaires. Une étape de conjugaison vient éventuellement parachever ce mécanisme de détoxification, initié par CYP.

Dans d'autres cas, il arrive que le produit obtenu à la suite de la première phase de détoxification, présente une activité biologique due à une modification des propriétés pharmacologiques de la molécule de départ, ou à l'acquisition d'une nouvelle activité au cours du processus de biotransformation.

A l'opposé, il arrive que la biotransformation subit par la molécule conduise à la formation d'un métabolite toxique. Il s'agit d'une activation métabolique.

Cependant le métabolisme des xénobiotiques durant la phase I peut faire intervenir une grande variété de réactions tel que :

- L'Oxydation d'une molécule aliphatique ou aromatique formant un composé hydroxylé
- Désalkylation des atomes d'azote, de soufre ou d'oxygène, ou le groupe éliminé est remplacé par un hydrogène
- Déshalogénéation oxydative de solvants organiques chlorés comme le chloroforme
- N ou S-oxydation: les amines primaires ou secondaires sont transformées en hydroxylamines, les sulfures divalents en sulfoxydes et sulfones
- Epoxydation sur doubles liaisons aliphatiques ou aromatiques

- Réductions des N-oxydes d'amines tertiaires.

La variété des substrats métabolisés par les cytochromes P450 va de pair avec l'existence de multiples enzymes P450. Sur le plan cinétique, la flexibilité du site actif permet à P450 de métaboliser un grand nombre de molécules de structures chimiques très différentes.

Il est ainsi difficile de citer un substrat spécifique pour une forme enzymatique puisqu'un même substrat peut être reconnu par plusieurs enzymes, d'où la notion de spécificité imparfaite et chevauchante.

## **V- REGULATION DE L'EXPRESSION DES ENZYMES DE DETOXIFICATION**

La variabilité d'expression intra et inter espèces des enzymes de détoxification est modulé à deux niveaux:

1/ par des facteurs non génétiques incluant les facteurs environnementaux (inducteurs ou inhibiteurs), le sexe, l'âge, la physiologie, les pathologies..

2/par des facteurs génétiques représentés par le polymorphisme

### ***1 – origine non génétique***

#### ***a1- facteurs endogènes***

L'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques varie chez les individus en fonctions de l'âge, du sexe ou de conditions physiologiques particulières.

Tous ces facteurs sont le reflet, pour une grande part, des modulations des sécrétions hormonales qui surviennent au cours du développement et de l'activité sexuelle. Chez l'homme aucun dimorphisme sexuel n'a été décrit à ce jour, et les différences interindividuelles observées sont plutôt le résultat de variations génétiques, ou d'expositions diverses à des xénobiotiques.

D'autres part, de nombreuses études ont montré que les processus pathologiques et inflammatoires, aussi bien chez l'homme que chez l'animal, qui était accompagné par une diminution du métabolisme hépatique entraîné ainsi un ralentissement de toutes les réactions de détoxication.

### *a2- facteurs exogènes*

Les principaux facteurs exogènes régulant l'expression des enzymes de détoxification sont les xénobiotiques et l'alimentation.

L'inductibilité est une des propriétés originale qui caractérise les enzymes de détoxification impliquées dans la biotransformation des xénobiotiques.

Différents composés de structures chimiques variées sont des inducteurs d'enzymes. L'exposition à l'inducteur se traduit par la synthèse de novo d'une ou plusieurs enzymes cibles.

L'induction est souvent un procédé de régulation lent, faisant intervenir un mécanisme transcriptionnel. Ces inducteurs transcriptionnels activent spécifiquement l'expression d'un ou de plusieurs gènes en activant des voies de signalisation spécifiques souvent transduites par un récepteur nucléaire.

Cependant, si l'activation transcriptionnelle est souvent à l'origine de l'induction, une stabilisation de la protéine ou de l'ARNm peut également être impliquée.

Les inducteurs peuvent être classés en cinq groupes agissant chacun sur le niveau d'expression d'un groupe limité d'enzymes:

\* Inducteurs de type les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) regroupent la dioxine et certaines benzo-flavones. Ces composés se lient à un récepteur cytosolique appelé récepteur Ah et le complexe récepteur-ligand, comparable à celui formé par les hormones stéroïdes et leur récepteur, est responsable de l'activation des gènes du cytochrome p450 (CYP1A) ainsi que les gènes de glutathion S transférase.

\* Inducteurs de type le phénobarbital (PB), un médicament anticonvulsivant, son mécanisme d'action est mal connu, les gènes concernés par ces inducteurs sont les CYP2B et 2C ainsi que des gènes codant pour des enzymes de la phase II de détoxification.

\* Inducteurs de types corticoïdes de synthèse tel le dexaméthasone qui semble agir indépendamment du récepteur glucocorticoïde classique.

\* Inducteurs de type clofibrate qui est agent hypolipémiant et proliférateur des peroxyosomes, induit l'hydroxylation de l'acide arachidonique et l'acide gras comme l'acide laurique (C12), par un mécanisme transcriptionnel médié par un récepteur des CYP4.

\* Inducteurs de type éthanol, acétone, isoniazide et pyrazole qui peuvent être des substrats et des inducteurs des CYP2E selon un double mécanisme transcriptionnel et post transcriptionnel.

Les phénomènes d'induction (et aussi d'inhibition) des enzymes de détoxification induisent donc un nouveau facteur modulant le métabolisme des médicaments. En effet, les associations de plusieurs médicaments peuvent entraîner des risques d'interactions médicamenteuses qui doivent être connues pour adapter les posologies.

L'effet inducteur du phénobarbital risque ainsi d'accélérer le métabolisme de médicaments également métabolisés par un cytochrome P450, avec pour conséquence selon la nature du médicament une accélération de l'inactivation du produit ou, à l'inverse, une activation renforçant l'action thérapeutique ou l'effet toxique éventuel. Le phénomène inverse sera observé dans le cas de l'administration d'un composé inhibiteur (cas de la cimétidine, médicament anti-ulcéreux).

***Exemple: le métabolisme des médicaments***

En tant qu'enzymes de détoxication, les cytochromes P450 pour la phase I ainsi que différents enzymes de la phase II, sont largement impliqués dans l'effet thérapeutique des médicaments. En effet, un médicament métabolisé peut avoir ses propriétés pharmacologiques modifiées à plusieurs niveaux:

- **Inactivation:** les enzymes de la phase I et de la phase II forment un composé facilement éliminé de l'organisme mais ayant perdu son activité pharmacologique.

C'est le cas de composés comme amphétamine, neuroleptique, anti-arythmique pour les enzymes de la phase I, antalgique pour les enzymes de la phase II.

- **Activation:** certains médicaments administrés doivent subir une étape d'activation métabolique par les enzymes essentiellement de la phase I afin de pouvoir exercer leur effet pharmacologique thérapeutique désiré. Telle est le cas par exemple pour la cyclophosphamide qui doit subir une activation pour pouvoir agir comme un agent antinéoplasique.

- **Modification de la réponse pharmacologique:** certains médicaments peuvent avoir une activité pharmacologique propre différente de celle du métabolite formé suite à l'action des enzymes de détoxication durant le métabolisme.

D'autres parts, le métabolisme d'un médicament peut influencer sur sa toxicité. Les cytochromes P450 avec les N-Acétyl transférases sont responsables de la toxicité hépatique de l'isoniazide (antituberculeux) ou de l'halothane (anesthésique). Il peut s'agir également de l'activation de procarcinogènes.

Toutefois, une protection existe contre les phénomènes d'activation toxique et un certain équilibre s'établit entre les phénomènes de détoxication et d'activation toxique, avec notamment le rôle protecteur cellulaire d'autres enzymes comme le glutathion S transférase (GST) et l'époxyde hydrolase (EH).

Les enzymes de détoxification jouent ainsi un rôle de premier plan dans le métabolisme des médicaments, mais l'évaluation de ce rôle en clinique est difficile à établir car de nombreux facteurs sont intriqués, facteurs génétiques et environnementaux notamment.[39]

Concernant l'alimentation, le statut nutritionnel reste un facteur de variation de l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Il faut néanmoins distinguer l'aspect qualitatif de l'aspect quantitatif. L'alimentation ne constitue pas une agression chimique pour l'organisme.

Des carences en oligo-éléments (calcium, cuivre, magnésium, zinc, fer), ou en vitamines (B, C et E) entraînent une diminution du niveau de CYP total, suite à une déficience des voies de synthèse de l'apoprotéine ou de l'hème.

Il en est de même pour les régimes pauvres en protéines. Les régimes pauvres en lipides peuvent entraîner une dégradation de la membrane cellulaire avec perte concomitante de certaines enzymes pouvant se situer au niveau des membranes cellulaires.

Par ailleurs, la composition du régime alimentaire est également susceptible d'influencer l'expression des enzymes de détoxification.

Ainsi des hydrocarbures aromatiques potentiellement cancérigènes sont générés au cours de la cuisson de la viande au feu de bois et augmentent l'expression du CYP1A1 et induit celle des N-acétyltransférases.

## ***2- Origine génétique***

Les variations interindividuelles d'expression des enzymes de détoxification ont fait l'objet de nombreuses recherches ces dernières années. Des observations cliniques de réponses variables à des médicaments en ont souvent été à l'origine.

Un sujet peut présenter un phénotype de métaboliseur lent ou rapide pour une molécule donnée, ce qui permet de former des sous groupes dans la population qui diffèrent dans leur façon de métaboliser certaines molécules.

Ce polymorphisme est dû à des mutations sur les gènes codant pour les enzymes de détoxification qui sont à l'origine d'une diminution, d'une augmentation ou de l'absence de l'expression ou d'activité d'une protéine [39]

## **VI- ASSOCIATION DU POLYMORPHISME DE DETOXIFICATION AU CANCER.**

### **A- RÔLE DES ENZYMES DE DETOXICATION DANS L'ACTIVATION DES CARCINOGENES CHIMIQUES.**

Il apparaît actuellement clair que le polymorphisme des enzymes du métabolisme des xénobiotiques influence la susceptibilité individuelle aux carcinogènes chimiques.

En effet, les voies de bio transformation aboutissent normalement, après une exposition à un carcinogène chimique, à la formation de métabolites faciles à éliminer.

Cependant, il arrive qu'à l'issue de la première phase du métabolisme et à la suite de l'action des enzymes spécifiques de cette phase, il se forme des métabolites appelés métabolites fonctionnalisés dotés d'une forte réactivité chimique. Ces métabolites réactifs, sont en particulier capables de se fixer de façon covalente et stable sur des macromolécules cellulaires dont les acides nucléiques, en formant des adduits (adduits pour **addition** de **produits**).

Au niveau de l'ADN, les sites réactifs sont les nucléotides, les liaisons phosphates ou la base elle-même.

Ces adduits, s'ils sont produits en grande quantité et insuffisamment éliminés peuvent s'avérer mutagène en un premier temps, puis cancérigène. Puisque les mutations somatiques et l'instabilité génomique ainsi produites peuvent potentiellement initier l'induction de tumeurs cancéreuses. Ainsi certains procarcinogènes chimiques pourront être à l'origine de tumeurs dans les tissus cible excrétoires (foie, vessie, intestin) éloignés du site d'administration.

De même, les métabolites issus de la deuxième phase de détoxification peuvent, s'ils sont insuffisamment éliminés, être transformés en métabolites fonctionnalisés ayant les mêmes conséquences.

Il a pu être montré que beaucoup de cancers (plus de 70%) sont attribuables à ces facteurs environnementaux xénobiotiques qui après pénétration dans l'organisme sont généralement activés en composés génotoxiques nucléophiles.

Plusieurs types d'adduits ont été décrits, et malgré leur diversité, il semble exister une homogénéité pour les adduits provoqués par le même type de structure chimique, permettant une reconnaissance du carcinogène.

On décrit par exemple une atteinte fréquente du résidu oxygène 6 de la guanine aboutissant à une substitution de la guanine en thymine suite à l'action d'agents alkylants. On retrouve par ailleurs la mutation de base purique vers T induite par les hydrocarbures polycycliques et par les rayons ultra violets (UV) ou les radicaux oxydants, il se produit une double mutation du type CC vers TT.

## **B- ASSOCIATION DU POLYMORPHISME GST AVEC LES CANCERS**

La description des polymorphismes de délétion des gènes codant pour les enzymes du groupe glutathion S transférase (GST) a permis de les associer à l'augmentation du risque des maladies chimiquement induites tel que le cancer.

Normalement, l'action des GST aboutit à un composé soluble et peu toxique pouvant facilement être excrété. Cependant, le pouvoir cancérigène qu'ont certains substrats tels que les haloalkanes peut être accentué par la conjugaison du glutathion.

Ce processus d'activation permet l'addition d'un radical méthyle ou éthyle sur un radical azote ou oxygène de l'une des 4 bases de l'ADN. On parle alors de formation d'ions épisulfonium nucléophiles, tel est le cas pour le dibromomthane

### **Figure 13: Activation du dibromomethane par l'enzyme GSTT1**

Cet adduit se lie de façon covalente avec l'azote N7 de la guanine et cela pour 95% des réactions de conjugaison médié par les enzymes de la famille thêta. L'adduit peut aussi se lié en position O6 de la guanine [40].

#### **1- Association de la délétion du gène GSTM1 et le cancer**

Une association entre la délétion homozygote du gène GSTM1 (GSTM1\*0/\*0) et le risque du cancer de la vessie [41], le cancer du sang (un individu fumeurs dépourvu d'activité enzymatique GSTM1 a un risque deux fois plus important de développer une leucémie qu'un individu non fumeur) [42], le cancer du sein [43] et avec le cancer de l'estomac. [44]

En ce qui concerne le cancer du nasopharynx, une forte corrélation avec la double délétion du gène GSTM1 (GSTM1\*0/0) a été mise en évidence. Cependant, cette corrélation n'est pas nette dans le cas d'autres ethnies. Cette constatation a également été retrouvée dans le cancer du poumon. [45-46-47-48]

D'autres maladies ont été décrites en association avec des polymorphismes du gène GSTM1. Un rôle significatif dans l'augmentation de risque des maladies neuro-dégénératives telles que la maladie de parkinson est montré [49].

## **2- Association du gène GSTT1 et le cancer**

Plusieurs études ont montré une association entre le génotype GSTT1 nul et la susceptibilité à certains cancers. En effet, on a montré l'association de ce génotype avec la leucémie myéloïde chronique [50], le cancer du sein [51] et le cancer du poumon [48].

Une étude a rapporté que l'absence de l'activité enzymatique GSTT1 à l'état homozygote ou son expression à l'état hétérozygote augmente fortement le risque de développer le cancer de la prostate [52].

Une augmentation remarquable des aberrations chromosomiques telles que l'échange de chromatides sœurs dans les lymphocytes ou des lésions de l'ADN des mononucléaires serait corrélée au génotype GSTT1 nul. L'absence de l'activité GSTT1 empêche la métabolisation de l'oxyde d'éthylène ce qui entraîne la formation d'adduit de haut poids moléculaire qui provoque une cassure dans un des brins d'ADN [53]

## **C- ASSOCIATION DU POLYMORPHISME NAT2 AVEC QUELQUES PATHOLOGIES**

L'influence du polymorphisme NAT a été étudiée dans divers types de cancers puisque, le métabolisme de certains substrats communs au N-acétyltransférase et au cytochrome P450 peut aboutir à la formation d'ions dit aryl-nitrenium réactifs par perte spontanée d'un ion acétate. Ces ions se lient de façon préférentielle au niveau du résidu carbone 8 de la guanine. L'adduit par sa masse, ne peut se glisser dans l'hélice d'ADN, et entraîne une distorsion dans la structure hélicoïdale, perturbant gravement la transcription.

Selon la voie métabolique suivie, le 4-aminobiphenyl est une amine

aromatique meilleure substrat pour les N-acétyltransférases 2 (NAT2) que pour le cytochrome P4501A2.

Cependant, lors du métabolisme et quelque soit l'enzyme intervenant en premier pour la détoxification de se substrat, sa biotransformation aboutit toujours à la formation d'ion nucléophile.

Par ailleurs, cet ion nucléophile peut aussi se former à la suite d'une activation métabolique par O-acétylation et N-O transacétylation d'un grand nombre de carcinogènes [25]. Ces réactions sont aussi catalysées par les enzymes NAT et leur polymorphisme pourrait donc influencer le risque d'apparition de cancer selon le degré d'exposition à ces substances carcinogènes.

## **Figure 14 / activation métabolique d'un amine aromatique**

L'influence du polymorphisme enzymatique sur la susceptibilité au cancer varie selon les organes, reflétant probablement les différences d'expression des enzymes dans ces tissus.

Le phénotype acétyleur rapide est associé avec l'augmentation de risque de développement du cancer du colon [54], du sein [55] et celui du poumon [56].

Alors que le phénotype d'acétyleur lent serait associé au cancer du sang [57], de la tête et du cou [58], et le cancer de la prostate [59].

Pour le cancer du nasopharynx les résultats sont différents d'une population à une autre. Dans la population chinoise les acétyleurs lents sont fortement associés à l'apparition de ce type de cancer. Ces résultats n'ont pas pu être vérifié dans la majorité des populations caucasiennes.

Cependant l'ensemble des résultats s'accordent pour classer l'allèle NAT2\*7 comme un allèle protecteur vis-à-vis du cancer du nasopharynx. [60]

L'association entre le type d'acétylation et le risque d'autres maladies a été extensivement étudiée. Les deux modes d'acétylation (lent et rapide) paraissent jouer un rôle majeur dans l'augmentation du risque de développement de plusieurs maladies en plus du cancer.

En effet, le phénotype acétyleur rapide serait en association avec le diabète de type I [61]. A l'inverse, de nombreuses maladies sont liées au phénotype d'acétyleur lent tel que l'épilepsie [62] et la maladie de parkinson [63].

## **D-ASSOCIATION DU POLYMORPHISME CYP 450 AVEC LES CANCERS**

Ces dernières années, de nombreuses études ont porté sur l'association des différentes familles du CYP450 et leurs polymorphismes à la susceptibilité à certains cancers donnant naissance à une nouvelle discipline de la génétique : la pharmacogénétique.

De grandes différences ethniques dans la distribution de ces polymorphismes en association à la susceptibilité aux cancers ont été enregistrées à travers les études entreprises. D'autre part les études ont aussi montrées que la susceptibilité au cancer était différente selon les organes reflétant probablement l'expression différentielle des enzymes dans les tissus.

L'influence du polymorphisme de la famille CYP2E1 a été étudiée dans le cas de plusieurs cancers. Pour le cancer du nasopharynx une forte association a été retrouvé dans la population chinoise et taiwanaise.[64]

## **VII- LE CARCINOME DU NASOPHARYNX**

Le cancer du nasopharynx (cavum ou rhinopharynx) est un cancer qui pose un problème carcinologique important dans le bassin méditerranéen et un problème majeur de santé publique dans le Sud-Est asiatique.

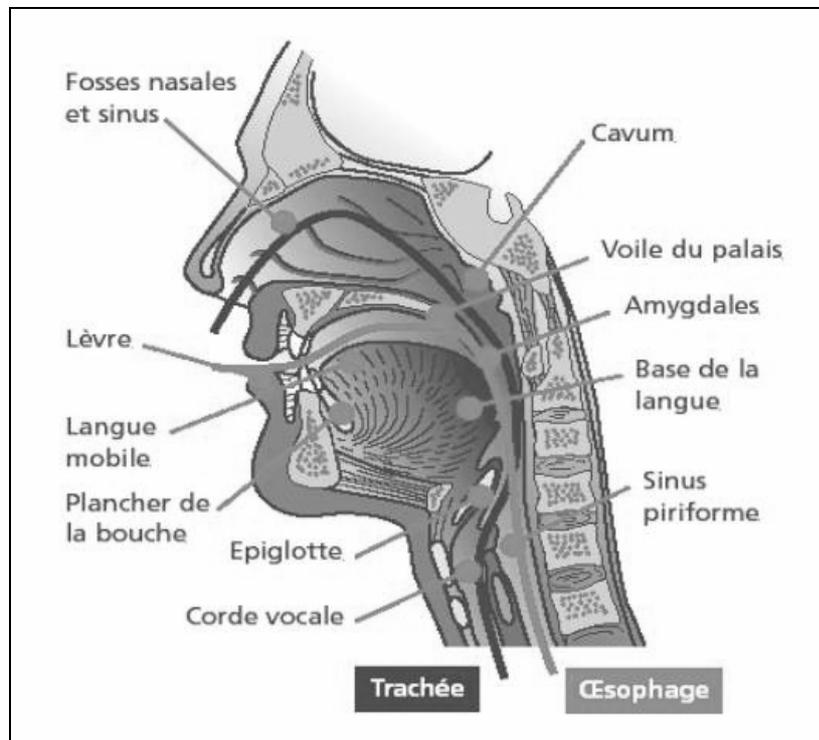
Les tumeurs malignes d'origine épithéliale du nasopharynx (nasopharyngeal carcinoma : NPC) constituent une entité clinique, biologique et histologique différente des autres cancers cervico-faciaux par sa relation avec le virus d'Epstein-Barr, sa répartition géographique et sa radiosensibilité.

Il touche préférentiellement l'adulte jeune et présente un taux élevé de métastases ganglionnaires et viscérales qui explique une partie des échecs thérapeutiques.

### **A-RAPPEL ANATOMIQUE ET HISTOLOGIQUE DU NASOPHARYNX**

Le cavum ou nasopharynx constitue la partie supérieure aérienne du pharynx qui intervient dans la respiration, la phonation et la ventilation de l'oreille moyenne. Situé derrière le squelette de la face, au-dessous de la base du crâne et en avant de la colonne cervicale, il communique en avant avec les fosses nasales par les choanes et latéralement avec les oreilles moyennes par les

trompes d'Eustache. La vascularisation du nasopharynx est sous la dépendance des artères du système carotidien externe.



**Figure 14: localisation du nasopharynx dans le carrefour aéro-digestives**

Le drainage lymphatique se fait par trois groupes de collecteurs : les supérieurs qui vont vers les ganglions jugulaires, les moyens et inférieurs qui se dirigent vers les ganglions jugulaires internes, sus et sous gastriques.

L'innervation est assurée par le plexus pharyngien, constitué par les nerfs mixtes IX et X et le contigu sympathique provenant du ganglion cervical supérieur (5- Cahier d'anatomie O).

La muqueuse nasopharyngée, est essentiellement formée par :

\*Un épithélium de surface reposant sur une lame basale. Il existe 3 types d'épithéliums : malpighien stratifié non kératinisé, cilié pseudo stratifié de type

respiratoire et intermédiaire ou transitionnel ressemblant à celui qui revêt les organes excréto-urinaires.

\*Un chorion : constitué de glandes salivaires, plus au moins riche en follicules lymphoïdes avec un infiltrat inflammatoire diffus composé de lymphocytes et de plasmocytes.

## **B-ASPECTS ANATOMOPATHOLOGIQUES DES CARCINOMES DU NASOPHARYNX**

Les tumeurs épithéliales en provenance du nasopharynx ont fait l'objet de plusieurs classifications. Actuellement, la plupart des auteurs utilisent la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) basée sur le degré de différenciation. Trois types de tumeurs ont été décrits :

1- Les carcinomes spinocellulaires kératinisant bien différenciés ou OMS type I. Il s'agit d'un carcinome épidermoïde kératinisant, tout à fait comparable à celui retrouvé dans les autres localisations des voies aérodigestives supérieures.

2- Les carcinomes non kératinisant peu ou moyennement différenciés ou OMS type II.

3- Les carcinomes indifférenciés de type nasopharyngé ou OMS type III. Celui-ci est fréquent dans les zones endémiques où il représente plus de 90% des cas observés et moins de 5% des cas présente un carcinome de type I. Ce dernier, rend compte de 30 à 50 % des carcinomes du nasopharynx (CNP) survenant dans les zones à bas risque.

Plusieurs systèmes de classification par stade ont été utilisés. Les plus importantes sont ceux de Ho (en 1970) et la classification TNM (où la lettre T

désigne la tumeur primaire, la lettre N les ganglions et la lettre M les métastases) proposée par l'Union Internationale de Lutte Contre le Cancer (UICC) et l'American Joint Committee (AJC).

Cette classification permet la distinction entre 4 stades d'évolution :

Stade I : T1N0M0

Stade II : IIA : T2aN0M0

IIB : T1N1M0, T2aN1M0, T2bN0-1M0

Stade III : T3N0, T1-3N1

Stade IV : T4N0-1, N2-3, M1

En pratique, les deux types de classification sont appliqués mais la classification histologique reste la plus communément retrouvés dans les dossiers des malades.

## **C-EPIDEMIOLOGIE DU CARCINOME DU NASOPHARYNX**

Le CNP est une maladie qui sévit dans le monde avec une incidence qui varie entre 0,1 et 30 cas pour 100000 habitants par an [65].

Sa répartition géographique particulière en rapport avec l'interaction complexe des facteurs étiologiques, génétiques, environnementaux, diététiques et viraux représente une des plus importantes caractéristiques de la maladie [66]. Trois grandes zones se distinguent à travers le monde:

\* Les zones de haute incidence (30 à 80 cas/100000 habitants par an) comportant la Chine du Sud-est et en particulier la population d'origine cantonaise et Hongkong [67].

\* Les zones d'incidence intermédiaire (8 à 12 cas / 100000 habitants par an) représentées par le pourtour méditerranéen (Maghreb et Moyen orient), le Soudan, l'Afrique de l'Est, Taiwan, le Vietnam, la Thaïlande, la Malaisie, les Philippines, les Caraïbes, les Esquimaux du Groenland et de l'Alaska [67].

\* Les zones de faible incidence (0,5 à 2 cas / 100000 habitants par an) intéressent l'Europe, l'Amérique du Nord, le Japon et l'Australie mais aussi l'Egypte et le Nigéria [68].

Il se rencontre à tous les âges, mais survient à un âge plus jeune que les autres carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures avec un pic d'incidence entre 40 et 50 ans. Une distribution bimodale, avec un pic supplémentaire pendant la deuxième décennie, est observée dans certaines régions telles que : L'Afrique du Nord, l'Ouganda, le Soudan, l'Inde, la Malaisie Orientale ainsi que chez les noirs Américains.

Il touche aussi bien les hommes que les femmes mais il est cependant plus fréquent chez les hommes avec un sex-ratio variant de 2 à 3.5.

Le carcinome du nasopharynx a la particularité d'être retrouvée pour l'ensemble du Maghreb, avec une distribution bimodale avec deux pics de fréquence. Un premier pic entre 18 et 20 ans et un deuxième entre 50 et 60 ans. Il est vraisemblable que la composante génétique soit plus incriminée dans le cancer précoce. En revanche, dans les formes tardives, le poids des facteurs environnementaux serait plus important. [69]

Il représente en Tunisie et en Algérie le premier cancer de la sphère ORL et des voies aérodigestives chez la femme et la deuxième après le cancer du larynx chez l'homme. En Tunisie son incidence est estimée à 1.78 à 2.05 cas/an/100000 habitants [70].

Alors qu'en Algérie, il est retrouvé à une incidence de 5.5 cas de sexe masculin/100000 habitants / an et de 3cas de sexe féminin /100000 habitants / an.[2]

#### **D- FACTEURS ETIOLOGIQUES DU CARCINOME DU NASOPHARYNX**

L'étiologie du CNP est multifactorielle et non encore totalement élucidée. Les données actuellement disponibles suggèrent l'interaction complexe de facteurs viraux, environnementaux et génétiques dans l'apparition de la maladie.

### **1-facteurs environnementaux**

L'intervention de ces facteurs a été suspectée devant la répartition géographique particulière du CNP et ses variations au sein même des différentes zones à risque.

Parmi les facteurs suspectés :

\* Les nitrosamines, forment un large groupe de carcinogènes chimiques gènotoxiques. Ils se trouvent dans l'alimentation humaine et dans d'autres milieux environnementaux.

Ces composés chimiques sont incriminés dans la genèse de plusieurs cancers incluant celui du nasopharynx, de l'œsophage et de l'estomac[71].

\* Les facteurs alimentaires tels que le poisson et la viande séchés semblent associés à un risque élevé de CNP [72- 73]

\* Les esters de phorbols contenus dans certaines préparations de la pharmacopée traditionnelle chinoise ou maghrébine sont de puissants agents promoteurs de la carcinogènèse.[69]

\* L'exposition professionnelle aux vapeurs et fumées chimiques et à la poussière de bois pourrait augmenter le risque de survenue d'un CNP [71]

\* La fumée de cigarette contient environ 4000 substances différentes, dont de nombreux carcinogènes, soit dans la phase volatile gazeuse et non stoppée par le filtre tel que les nitrosamines, nitrosodiméthylamine, nitrosopyrrolidine, soit dans la phase solide des particules telles que les

hydrocarbones aromatiques polycycliques, benzopyrène et nitrosamines dérivés de la nicotine et des alcaloïdes proches.

Plusieurs adduits spécifiques du tabac ont été retrouvés non seulement dans le poumon mais également dans les voies aéro-digestives supérieures, la paroi des artères et le myocarde, expliquant ses implications directes dans les pathologies cardiovasculaires mais aussi dans le cancer du poumon.

Le rôle du tabac dans la survenue du CNP est par ailleurs controversé [74].

## **2- facteurs génétiques**

L'incrimination de facteurs génétiques a été évoquée dans la genèse des carcinomes du nasopharynx devant les caractéristiques épidémiologiques suivantes :

- l'observation de cas familiaux et des vrais jumeaux de carcinome indifférencié du nasopharynx.
- \* la persistance d'une incidence élevée de CNP chez les chinois émigrants du sud de la Chine dans d'autres continents du globe, par rapport à la population native [75].

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle des gènes HLA situés sur le bras court du chromosome 6. En effet, l'existence d'un risque élevé pour le cancer du nasopharynx est associée à un profil particulier pour les antigènes d'histocompatibilité (HLA) [75].

Cependant, il est à noter l'importance accordée au polymorphisme des gènes des enzymes de détoxification intervenant lors des deux phases de biotransformation

Des études cytogénétiques sur des biopsies de CNP ont par ailleurs identifié des anomalies au niveau des chromosomes 1, 3, 11, 12, 17 [75-66].

Par ailleurs, des délétions sur le bras court des chromosomes 3 et 9 suggèrent la présence dans cette région, d'un gène suppresseur tumoral qui contribue au phénotype malin quand la copie normale du gène est délétée.

Enfin, des études ont établi un lien entre le gène de la protéine p53, gène suppresseur tumoral et le CNP [76].

### **3-Facteur viral : le virus d'Epstein Barr (EBV)**

La relation du carcinome (spécialement du type indifférencié) avec le virus d'Epstein Barr (EBV) (herpes virus) a été rapportée par plusieurs auteurs ([77-78]).

On a pu mettre en évidence la présence de l'ADN viral de l'EBV au niveau des cellules tumorales du CNP. Cet ADN viral est le même dans chaque cellule épithéliale maligne, témoignant de la monoclonalité de cette prolifération tumorale. Cette observation indique que l'EBV est présent dans la cellule au moment de la transformation carcinogène et suggère le rôle important du virus dans la contribution à l'épreuve de transformation.

***MATERIEL***  
***ET***  
***METHODES***

## **I-PATIENTS ET TEMOINS**

Une population de 35malades ayant un carcinome du nasopharynx confirmé histologiquement, recrutés au centre hospitalier universitaire de Batna et une population de 66 témoins sains, non apparentées et appariées aux malades, selon l'âge et le sexe et la région.

L'étude du polymorphisme génétique à concerné 66 malades atteints du CNP confirmé histologiquement, recrutés à l'institut Salah Azaiez de Tunis et une population témoin constituée de 100 personnes saines, recrutées parmi l'entourage familial et professionnel non apparentées et appariées aux malades, selon l'âge et le sexe.

Notre étude moléculaire a porté sur la cohorte de malades tunisiens.

## **II-METHODES**

### **A- EXTRACTION DE L'ADN**

La source majeure pour extraire de l'ADN est les globules blancs. A partir de 5 à 10ml de sang total prélevé sur EDTA, après lyse préférentielle des cellules anucléées, on peut obtenir quelques centaines de microgrammes d 'ADN.

#### **1-Préparation d'un culot de cellules nucléées**

Le sang fraîchement recueilli est centrifugé à 3000tr/min 15min à 4°C afin de sédimenter les globules et de les séparer du plasma. Le plasma est éliminé alors que le culot cellulaire est suspendu dans 5 volumes de solution

lysante (NH<sub>4</sub>Cl 140mM/ NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> 1mM), incubé 10 minutes dans la glace et centrifugé à 3000tr/min 15min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot de cellules est recueilli. Sur ce culot la même opération est effectuée une deuxième fois. Au dernier lavage le culot doit être bien blanc et débarrassé de toute trace d'hémoglobine. Les globules blancs obtenus, peuvent être utilisés immédiatement ou conservés à -70°C pendant plusieurs mois.

## **2- Purification de l'ADN**

Le culot de globules blancs est suspendu dans 1ml d'une solution de détergents (Non Idet P40 à 0.45%, Tween20 à 0.45%). Après l'addition de 10µl de protéinase K (10mg/ml), les cellules sont incubées pendant 3 heures à 60°C. l'ADN est extrait par 1 ml de phénol (déprotéinisant majeur), puis 1 ml de chloroforme / octanol (24/1) qui permet d'éliminer les traces de phénol restant.

L'ADN présent dans la phase aqueuse, est précipité par 2.5 volumes d'éthanol absolu à -20°C et récupéré par enroulement autour d'une pipette pasteur scellée, puis dissous dans 1ml de T.E pH 8 (tris 10mM/EDTA 1mM) pendant toute la nuit.

## **3-Estimation de la concentration de l'ADN et contrôle de sa qualité**

Les acides nucléiques ont un spectre d'absorption maximum en UV à 260nm. Cette absorption est proportionnelle à la concentration de l'ADN.

Les protéines absorbent aussi bien à 260nm qu'à 280nm. La mesure de la densité optique de chaque échantillon à 260nm et 280nm est établie.

Le rapport DO<sub>260</sub> /DO<sub>280nm</sub> doit être compris entre 1.8 et 2, afin de pouvoir considéré l'ADN débarrassé des protéines cellulaires.

D'autres part la mesure de la DO à 270nm et le calcul du rapport DO<sub>260nm</sub>/ DO<sub>270nm</sub> est effectué pour s'assurer que la solution contient peu ou pas de phénol résiduel. Se rapport d'absorption doit être inférieur à 1.

## **4- test de digestibilité**

Par une simple migration sur gel d'agarose à 0.8% dans du TBE à 0.5X (Annexes), on peut contrôler la digestibilité de l'ADN. Si l'on observe l'apparition d'une seule bande, l'ADN est donc intact.

## **B-PRINCIPE DE LA PCR (polymerase chaine reaction):**

La réaction de polymérisation en chaîne est une cyclisation in vitro d'une réplification d'ADN effectuée à l'aide de l'enzyme thermorésistante, la Taq polymérase. La séquence cible à amplifier doit être connue ou du moins celle des deux régions flanquantes.

La méthode consiste à utiliser des amorces d'oligonucléotides synthétiques de 20 à 25 nucléotides complémentaires d'une séquence et situées de part et d'autre de la séquence à amplifier. En mélangeant les deux amorces avec de l'ADN génomique dans des conditions d'hybridation, et en faisant agir une ADN polymérase, chaque amorce est allongée dans le sens 5'-3'. Il en résulte un doublement du fragment considéré à chaque cycle. L'amplification est donc exponentielle.

Chaque cycle comprend trois phases: une phase de dénaturation de l'ADN à haute température, une phase d'hybridation des amorces à la matrice, et une phase d'extension ou d'élongation des amorces par polymérisation. Cette étape s'effectue à la température optimale de la Taq polymérase.

Nous avons appliqué différentes méthodes d'exploration de nos différents gènes selon leur spécificité

## **1-ETUDE DES DELETIONS DANS LES GENES GLUTHATION-S-TRANSFERASES PAR PCR MULTIPLEX:**

La recherche des délétions GSTM1 et GSTT1 utilise la PCR multiplex. Cette technique est une variante de la PCR classique. Elle permet d'amplifier plusieurs gènes au cours d'une même réaction PCR, par l'introduction dans le milieu d'amplification de couples d'amorces spécifiques différentes. Les gènes GSTM1, GSTT1 et le gène de l'albumine qui sert de contrôle interne sont alors amplifiés simultanément.

### **a-Amorces utilisées**

<b>Gènes</b>	<b>Appellation de l'amorce</b>	<b>Séquences</b>	<b>Direction</b>
--------------	--------------------------------	------------------	------------------

GSTM1	GSTM1F	5'GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC 3'	Sens
	GSTM1R	5'GTT GGGCTCAAATATACGGTGG 3'	Antisens
GSTT1	GSTT1F	5'TTCCTCACTGGTCCTCACATCTC 3'	Sens
	GSTT1R	5'TCACCGGATCATGGCCAGCA 3'	Antisens
ALB	ALB F	5'GCCCTCTGCTAACAAGTCCTAC 3'	Sens
	ALB R	5'GCCCTAAAAAGAAAATCGCCAATC3'	Antisens

### **b- protocole d'amplification**

L'adaptation de la technique de PCR dans un laboratoire nécessite la réalisation d'un certain nombre de tests afin d'améliorer le rendement de l'amplification. Pour notre travail, un test de la concentration de Mgcl2 a été effectué pour améliorer la qualité de l'amplification.

250 ng d'ADN sont amplifiés dans un volume réactionnel de 50 µl composé des amorces GSTM1F, GSTM1R, GSTT1F et GSTT1R à 0.45pM/µl alors que les amorces responsables de l'amplification du gène de contrôle de l'albumine sont à 0.1pM/µl, des dNTP à 200µM, 2U de Taq polymérase, un tampon de Taq polymérase (1x) et 5mM de Mgcl2. On complète à 50µl avec de l'eau distillé.

### **c-Conditions d'amplification sur thermocycler (Biométra)**

L'amplification est assurée par un thermocycler (biometra UNO-thermoblok). Le progmmame PCR utilisé est:

Etape 1 : Dénaturation à 94°C pendant 5'

Etape 2 : Hybridation à 64°C pendant 2'

Etape 3 : Elongation à 72°C pendant 30''

Dénaturation à 94°C pendant 20''

Hybridation à 64°C pendant 20''

} 30 cycles

Etape 4 : Elongation finale à 72°C pendant 7'

Etape 5 : fin de l'amplification à 25°C

### **d- contrôle et analyse de la réaction**

Le produit d'amplification, au quel est ajouté un mélange de bleu de xylène cyanol, bleu de bromophenol et du ficoll 400 à 15%, sont analysés sur un gel d'agarose à 1%. L'électrophorèse est réalisée en un tampon TAE 1X en parallèle avec un marqueur de poids moléculaire.

Après migration, le gel est visualisé sous lumière ultraviolette en présence de bromure d'éthidium (BEt). Le BEt est un produit intercalant qui se glisse entre les bases des acides nucléiques et présente une fluorescence orange sous illumination par UV.

## **2-ETUDE DU POLYMORPHISME N-ACETYL TRANSFERASE PAR RFLP**

L'étude des polymorphismes NAT2 utilise l'approche des RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Cette approche est basée sur le fait que les polymorphismes d'ADN sont révélés par des modifications de coupure par les endonucléases de restriction (polymorphisme de restriction).

### **a-Amplification du gène NAT2 (835pb)**

Après l'amplification du gène NAT2 par PCR, les produits sont soumis à une digestion enzymatique pour la détermination des allèles NAT2\*5 et NAT2\*6

#### ***a1-Amorces utilisées***

Gènes	Appellation de l'amorce	séquences	direction
NAT2	G5	5'GATCACATTGTAAGAAGAAACCG 3'	Sens
	G3	5'GGATGAAAGTATTTGATGTTTAGG3'	Antisens

#### ***a2- Protocole d'amplification***

Cette amplification utilise le couple d'amorces G3/G5 à une concentration de 0.4pM, la concentration du mgcl2 est ajusté à 3.5mM et tous les constituants du mélange réactionnel reste les mêmes.

**a3- Conditions d'amplification sur thermocycler (Biométra)**

Dans le programme d'amplification, le temps d'hybridation est de 60°C et le nombre de cycles est de 35. Les autres paramètres restent les mêmes.

**b-Amplification du gène NAT2 (633pb)**

Cette amplification sera utilisée pour la détermination de l'allèle NAT2\*14

**b1-Amorces utilisées :**

Gène	Appellation des amorces	Séquences	Direction
NAT2	NG5	5-GTCACACGAGGAAATCAAATGCTT-3	Sens
	VNAT2	5-TTTTTGGTGTTCCTTCTTTGGC-3	Antisens

**b2- Protocole d'amplification**

Cette amplification utilise les amorces NG5 et VNAT2 à une concentration de 0.4µM et 1U de Taq polymérase. La concentration de Mgcl2 est ajustée à 4mM.

**b3- Conditions d'amplification sur thermocycler (Biométra)**

Les mêmes conditions d'amplification du fragment de 835pb sont utilisées pendant 30cycles.

**3-NESTED PCR (243pb)**

Le principe de la technique permet d'affiner notre méthode d'exploration en ciblant une séquence spécifique. Cette ré amplification utilise une amorce sens plus interne et permet d'amplifier un fragment qui sera utilisé pour la détermination de l'allèle NAT2\*5

Tous les constituants réactionnels sont gardés aux mêmes concentrations et les conditions d'amplifications sont maintenues.

*a. amorces utilisées :*

Gène	Appellation des amorces	Séquences	Direction
NAT2	VT341C	5-CTTCTCCTGCAGGTGTCTA-3	Sens
	VNAT2	5-TTTTGGTGTTCCTCTTTGGC-3	Antisens

#### **4- DIGESTION PAR LES ENZYMES DE RESTRICTION**

Pour la mise en évidence d'un éventuel polymorphisme, différentes enzymes de restriction sont utilisées.

l'allèle NAT2\*5 est mis en évidence par l'enzyme Acc I qui permet l'identification du site de restriction T341C, l'allèle NAT2\*6 est mis en évidence par l'enzyme de restriction Taq I qui permet l'identification du site G590A. L'allèle NAT2\*7 est identifié par l'enzyme BamH1, qui met en évidence le site G857A alors que l'allèle NAT2\*14 est mis en évidence par l'enzyme de restriction MspI qui permet l'identification du site G191A.

##### **a- Digestion par l'enzyme Taq I**

Le produit d'amplification du fragment de 835pb est sont digérés dans un milieu réactionnel contenant 5U de l'enzyme de restriction.

La réaction est incubée dans un bain marie pendant 4 heures à 65 °C.

##### **b- Digestion par l'enzyme BamH1**

Le même produit d'amplification que précédemment est digéré dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 2.5U de l'enzyme. La réaction est incubée à 37°C, pendant une nuit.

#### **c- Digestion par l'enzyme Msp I**

Le produit d'amplification de 633pb est digéré dans un volume de 25 µl avec 10U de l'enzyme de restriction.

La réaction est incubée à 37°C, pendant une nuit.

#### **d- Digestion par l'enzyme AccI**

2µl du produit de la nested PCR sont digérés dans un volume de 30 µl.

La réaction est incubée à 37°C, pendant une nuit.

#### **e- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.**

Le produit de digestion est déposé sur un gel d'acrylamide-bisacrylamide 29 :1 à 8% en parallèle avec un marqueur de poids moléculaire.

Le gel d'acrylamide est préparé selon le protocole décrit dans l'annexe.

350 µl de persulfate d'ammonium à 10% et 50µl de TEMED sont ajouté au mélange en dernier lieu. Le gel est ensuite immédiatement coulé entre des plaques de verre au moyen d'une seringue. L'électrophorèse est conduite en tampon TBE 1X sous un courant de 150 Volts.

### **III-ANALYSE STATISTIQUE**

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à l'utilisation du logiciel Epi.Info.

Dans ce travail nous avons effectué une étude statistique d'association entre les délétions GSTM1, GSTT1, les allèles NAT2\*6 et NAT2\*7 et le cancer du cavum. L'étude statistique est basée sur le test  $\chi^2$  et l'odds ratio (OR) dans le but de :

- Déterminer s'il existe une association significative entre le polymorphisme étudié et le cancer : ceci se fait par la comparaison du nombre de fois ou

l'allèle est observé chez les patients par rapport au nombre de fois où il est présent chez les contrôles.

- Estimer l'intensité de cette association par le calcul de l'odds ratio : le risque de développer la maladie est d'autant plus élevé pour le sujet porteur de l'allèle que l'odds ratio est supérieur à 1.

Sur une table de contingence, on notera la répartition en malades –témoins et porteurs -non porteurs de l'allèle testé.

Echantillon \ Allèle	PRESENT	ABSENT
	MALADES	a
TEMOINS	c	d

### A- CALCUL DES FREQUENCES ALLELIQUES

Fréquence allélique chez les malades  $F_m = a / (a+b)$

Fréquence allélique chez les témoins  $F_t = c / (c+d)$

### B- TEST $\chi^2$

A partir de la table de contingence, on calcule le  $\chi^2$  afin de savoir si la différence observée dans la répartition des fréquences alléliques entre la population de patients et la population de témoins est significative ou non

$$\chi^2 = \frac{N (ad-bc)^2}{(a+b)(a+c)(c+d)(d+b)}$$

$$N = a+b+c+d$$

A toute valeur de  $\chi^2$  correspond une valeur de p indiquant la probabilité que la distribution observée soit due au hasard. Une valeur seuil de signification est

fixée à 0.05. Au-delà de ce seuil, la différence observée est considérée comme étant due au hasard.

### **C- ODDS RATIO**

L'intensité de l'association entre le polymorphisme et la maladie est calculée comme suit :

$$OR = \frac{ad}{cb}$$

- Si l'odds ratio (OR) est inférieur à 1 : l'association est négative et l'allèle confère une protection contre la maladie.
- Si OR est égal à 1 : l'allèle est neutre.
- Si OR est supérieur à 1 : l'association est positive et l'allèle confère une prédisposition à la maladie. Le risque de développer la maladie est d'autant plus élevé que le OR est élevé.

### **D- INTERVALLE DE CONFIANCE POUR LE OR**

L'intervalle de confiance (IC) à 95%, donne une précision de l'estimation du OR. L'intervalle de confiance est d'autant plus étroit que l'estimation du OR est précise. Il est estimé à partir de l'intervalle de confiance à 95% du logarithme népérien du OR :

Ecart type de  $\log OR = \frac{1}{\sqrt{\chi^2}}$ .

D'où l'intervalle de confiance à 95% du  $\log OR$  est :

$\log OR \pm 1,96 \times \text{écart type } \log OR$

Enfin, l'intervalle de confiance pour le OR est obtenu par transformation exponentielle des bornes ainsi calculées.

# ***RESULTATS***

## **I- CARACTERISTIQUES DES POPULATIONS ETUDIEES**

L'échantillon recueillis à Batna est constitué de 35malades dont l'âge moyen est de 45ans, avec 24 hommes (68%) et 11femmes (32%). Le sexe ratio est égal à 2.18. La majorité des malades présentés un cancer de type indifférencié(79%). 40% des patients étai fumeurs. La population de 66 témoins était appariée aux malades selon l'âge, le sexe et la consommation de tabac.

Cette population est recueillie dans le but de comparer la prévalence entre notre population d'étude de Tunisie et la population Algérienne. Cependant ce travail préliminaire ne donne que des résultats exhaustifs qui restent à compléter.

L'analyse des polymorphismes des gènes GSTM1, GSTT1 et NAT2 a été réalisée sur 66 malades ayant un CNP, et une population de 100 témoins sains tunisiens. Les témoins se répartissaient en 59 hommes (59%) et 41 femmes (41%), sexe ratio est égal à 1.4, avec une moyenne d'âge de 49ans. 22% des

témoins sont fumeurs. L'âge moyen des malades était de 47 ans, le sexe ratio égal à 1.6 avec 41 hommes (62%) et 25 femmes (38%). 37% des patients sont fumeurs. Le tableau 1a résume les caractéristiques des populations étudiées en fonction de l'âge

**Tableau 1a : Caractéristiques de la population de témoins et de malades en fonction de l'âge**

	Malades	Témoins
Moyenne d'âge	47ans	49ans
20-40ans	22%	17%
40-60ans	53%	52%
+60ans	25%	31%

La majorité de nos malades et de nos témoins ont un âge compris entre 40 et 60ans.

Le tableau 1b montre les caractéristiques anatomopathologiques de nos malades en prenant en considération le type histologique qui est la classification la plus communément utilisé.

**Tableau 1b: classification histologique et TNM de nos malades**

Classifications	Malades
	Fréquences (%)
<b>Type histologique</b>	
* Indifférencié	84.84
* Peu différencié	13.6
* Bien différencié	1.5

Le type indifférencié est le type le plus rencontré dans notre population. 9 cas sont de type peu différencié et un seul cas de carcinome bien différencié.

## **II- ANALYSE DU POLYMORPHISME DES GENES GSTM1 ET GSTT1**

La figure 1 montre un profil de PCR multiplex. Au cours de cette réaction, sont amplifiés simultanément les gènes GSTT1 dont la taille est de 480 paires de base (pb) et le gène GSTM1, dont la taille est de 215 pb. Le gène de l'albumine (380 pb) est amplifié au cours de la même réaction et sert comme contrôle interne de la PCR. La bande représentative de l'albumine sera présente dans tous les profils de migration.

Les délétions homozygotes GSTM1 et GSTT1 sont caractérisées par une absence totale de bandes correspondantes à l'amplification. Les délétions hétérozygotes ne sont pas mises en évidence.

Dans notre travail, Le génotype GSTM1 0/0 était retrouvé avec une fréquence de 33 % chez les témoins et de 50 % chez les malades (Tableau 2). Cette différence était statistiquement significative ( $p < 0,05$ ).

La fréquence de la délétion GSTT1 0/0 ne présentait pas de différence significative entre les deux groupes, puisqu'elle était retrouvée dans 20% des cas chez les témoins et 24.24 % des cas chez les malades.

**Tableau 2 : Fréquence des génotypes GSTM1 0/0 et GSTT1 0/0 et calcul du OR correspondant.**

Génotypes	Malades	Témoins	p	OR (IC à95%)
	%	%		
GSTM1 0/0	50	33	<0.05	2.03 (1.03-4.37)
GSTT1 0/0	24.24	20	NS	1.08 (0.6-2.32)

Le calcul du OR pour ces génotypes de délétions de GST montre que seul Les malades porteurs du génotype GSTM1 0/0 présentaient un risque élevé de carcinome du nasopharynx (OR= 2.03 ;IC95% [1.03-4.37]). Le polymorphisme GSTT1 0/0 ne montre pas d'association avec le CNP.

Les ORs associé au génotype GSTM1 0/0 sont donc ajustés pour l'âge, le sexe et la consommation de tabac.

Les hommes homozygotes pour l'allèle GSTM1 0/0 présentaient un risque légèrement plus élevé que pour les femmes vis-à-vis de la susceptibilité au cancer du nasopharynx.

D'autre part la répartition selon l'âge montre deux pics de risque. Un premier pic de valeur très importante OR= 12 ; IC95% [7.71-14.6], pour les patients dont l'âge se situe entre 20 et 40 ans signalant ainsi une forte association entre ces patients et le CNP. Le deuxième pic est enregistré chez les patients de 60 ans et plus OR= 5.35 ; IC95% [3.35- 6.44].

En ce qui concerne le statut fumeurs / non fumeurs, les résultats montrent que les patients fumeurs portant le génotype GSTM1 présentent un risque de susceptibilité plus important que les patients non fumeurs. Tous ces résultats sont consignés dans le tableau 3.

**Tableau 3: OR pour le CNP associé au génotype GSTM1.**

	malades		Témoins		OR (Ic à 95%)
	GSTM1nul	GSTM1+/-	GSTM1nul	GSTM1+/-	
<b>Tous les sujets</b>	33	33	34	66	2.03(1.03-4.37)
<b>1-selon le sexe</b>					
<b>Masculin</b>	24	20	24	34	2.50(1.60-3.17)
<b>Féminin</b>	09	13	9	33	2.35(1.51-2.98)

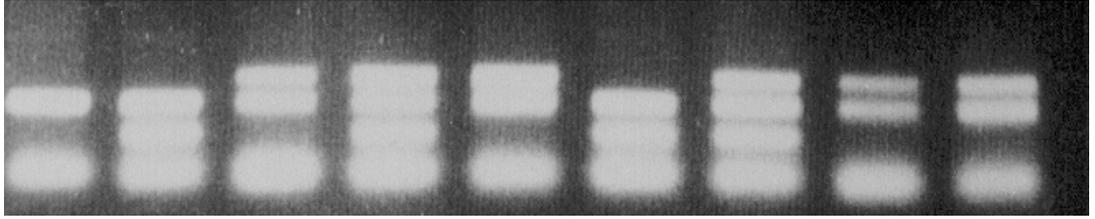
<b>2-selon l'âge</b>					
<b>20-40ans</b>	7	8	1	16	<b>12(7.71-14.6)</b>
<b>40-60ans</b>	17	18	26	26	0.87(0.62-1.22)
<b>+60ans</b>	9	7	6	25	<b>5.35(3.35-6.44)</b>
<b>3-statut F/NF</b>					
<b>Fumeurs</b>	15	10	07	15	3.21(2.01-3.86)
<b>Non fumeurs</b>	17	24	26	52	1.41(0.90-1.88)

F: fumeurs

NF: non fumeurs

-            1            2            3            4            5            6            7            8            9





+

**Figure 1: Profil de PCR Multiplex de GSTM1 et GSTT1**

**1** : GSTM1 0/0, GSTT1 0/0

**2 et 6** : GSTM1+, GSTT1 0/0

**3, 5, 8 et 9** : GSTM1 0/0, GSTT1+

**4 et 7** : GSTM1+ / GSTT1+

#### **IV- ANALYSE DU POLYMORPHISME NAT2**

Le gène NAT2 présente plusieurs mutations ponctuelles donnant naissance aux différentes formes alléliques constituant le polymorphisme génétique. L'allèle de référence ou allèle sauvage est l'allèle NAT2\*4.

Les variant majeurs NAT2 se divisent en quatre allèles suivants: NAT2\*5, NAT\*6, NAT2\*7 et l'allèle NAT2\*14. Ils sont responsables du phénotype acétyleur lent soit à l'état homozygote ou double hétérozygote.

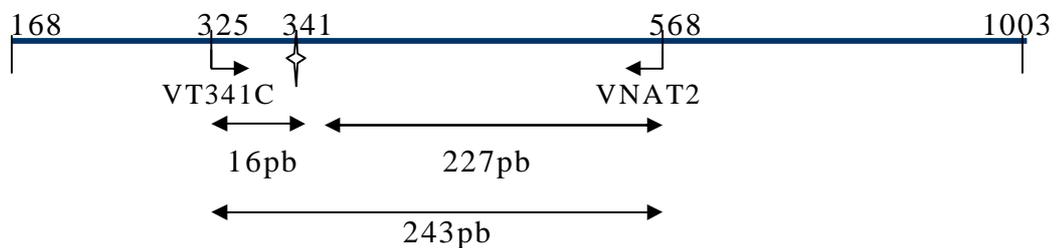
Pour identifier ces différents allèles nous avons utilisés quatre enzymes chacune spécifiant un allèle et un seul offrant ainsi un pouvoir discriminatoire élevé.

### a- l'allèle NAT2\*5

La ré-amplification du gène NAT2 génère un fragment de 243pb qui contient un site de restriction polymorphe pour l'enzyme Acc I en position 341 pb, en fonction de la présence ou de l'absence à ce niveau, de la mutation T→C.(fig.2)

Les individus porteurs de l'allèle sauvage (+) s'accompagnent de l'absence du site de restriction, le génotype ++ est objectivé par un fragment unique de 243pb. Les individus porteurs de l'allèle NAT2\*5 sont caractérisés par une mutation qui fait apparaître un site de digestion enzymatique. Le génotype NAT2\*5/5 est objectivé par la présence de 2 fragments : 227pb et 16pb.

Les hétérozygotes NAT2\*5/+ présentent 3 fragments : 243pb, 227pb et 16pb.



**Figure 2 : Sites de restriction pour l'enzyme Acc I**

Le tableau 04 montre les fréquences génotypiques pour le polymorphisme NAT2\*5. La fréquence de l'allèle NAT2\*5 était de 31.81% et 31,5 % respectivement chez les témoins et les malades. Cette différence était non significative. La valeur du OR ne montrait pas la présence d'une association entre cet allèle et l'augmentation du risque de développement du CNP (OR=1.01, IC 95% [0.97-5.6]).

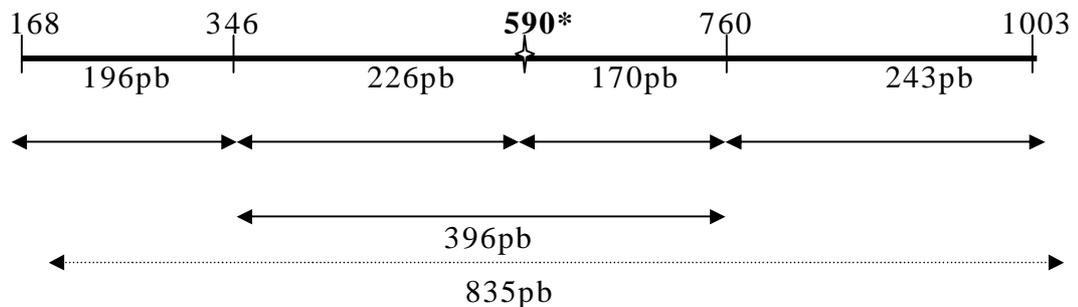
**Tableau 04 : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme  
NAT2\*5**

	MALADES		TEMOINS		P	OR (IC 95%)
	Nombre	Fréquence (%)	nombre	Fréquence (%)		
NAT2*5/5	7	10.6	17	18	NS	1.01(0.97-5.6)
NAT2*5/+	28	42.42	29	27		
NAT2*+/+	31	46.9	54	55		
Allèle NAT2*5	31.81%		31.5%			

**b- L'allèle NAT2\*6**

L'amplification du gène NAT2 génère un fragment de 835pb. Celui-ci contient 3 sites de restriction générés par l'enzyme Taq I, deux sites constants et un site en position 590 pb est polymorphe en fonction de la présence ou de l'absence à ce niveau, de la mutation G→A.

En effet, l'absence de la mutation observée chez les individus porteurs de l'allèle sauvage (+) s'accompagne de l'apparition du site de restriction, alors que sa présence, observée chez les individus porteurs de l'allèle NAT2\*6, s'accompagne d'une perte du site de restriction (fig3).



**figure 3 : Sites de restriction pour l'enzyme Taq I**

La figure 4 montre un profil de digestion par l'enzyme Taq I. La présence du génotype sauvage (+/+) est objectivée par la présence des 4 fragments de 243pb, 226pb, 196pb et 170pb. Le génotype NAT2\*6/6 est caractérisé par 3 fragments de 396pb, 243pb et 196pb. Les hétérozygotes NAT2\*6/+ présentent les 5 fragments : 396pb, 243pb, 226pb, 196pb et 170pb.

**Tableau 05 : Fréquences génotypiques et allélique du polymorphisme NAT2\*6.**

	MALADES		TEMOINS		P	OR (IC à 95%)
	Nombre	Fréquence (%)	Nombre	Fréquence (%)		
<b>NAT2*6/6</b>	14	21.21	5	5	<0.05	<b>2.8 (1.02-4.4)</b>
<b>NAT2*6/+</b>	16	24.24	21	25		
<b>NAT2*+/+</b>	36	54.54	74	74		
<b>Allèle NAT2*6</b>	33.33 %		15.5%			

Le tableau 05 montre les fréquences génotypiques pour le polymorphisme NAT2\*6. Les homozygotes NAT2\*6/6 étaient plus fréquents chez les malades (21.21%) que chez les témoins (5%). Les fréquences de l'allèle NAT2\*6 chez les témoins et chez les malades, montrent une différence statistiquement significative.

La valeur du OR montrait la présence d'une association entre cet allèle et l'augmentation du risque de développement du CNP (OR= 2.8 , IC 95% [1.02-4.4]).

Les ORs associés à l'allèle NAT2\*6 ont été ajustés pour l'âge et le sexe. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 6.

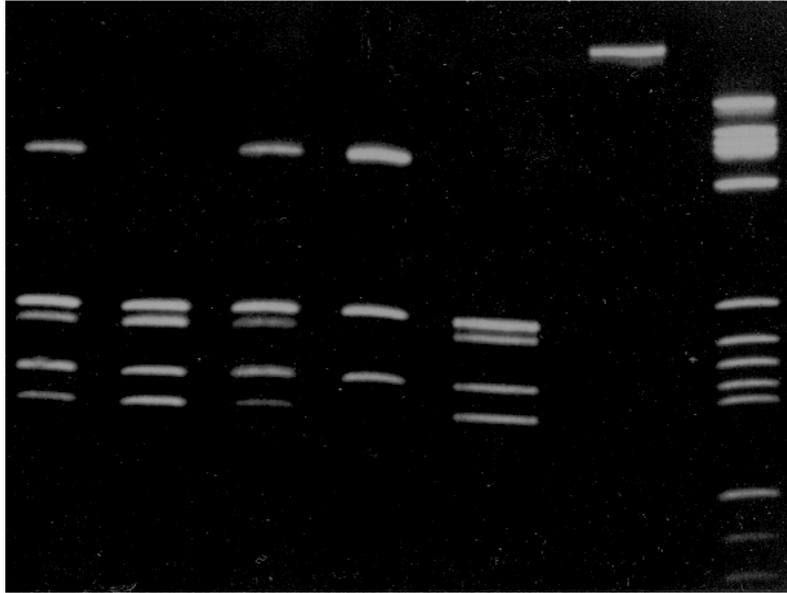
**Tableau 6: OR pour le CNP associé à l'allèle NAT2\*6.**

	MALADES		TEMOINS		OR (Icà 95%)
	NAT2*6	+	NAT2*6	+	
Tous les sujets	44	88	31	169	2.8(1.02-4.4)
<b>1-selon le sexe</b>					
<b>Masculin</b>	26	56	15	103	<b>3.18(2.43-4.03)</b>
<b>Féminin</b>	18	32	16	66	2.32(1.49-2.85)
<b>2-selon l'âge</b>					
<b>20-40</b>	9	21	4	30	3.21(2.06-4.07)
<b>40-60</b>	23	47	19	85	2.18(1.42-3.31)
<b>60ans</b>	12	20	8	54	<b>4.05(2.63-5.13)</b>

Les malades porteurs de l'allèle NAT2\*6 présentait un risque élevé pour le carcinome du nasopharynx (OR= 2.8 ;IC95% [1.02-4.4]). Ce risque est plus important pour les hommes OR= 3.18 ; IC95% [2.43-4.03]) que pour les femmes OR= OR= 2.32 ;IC95% [1.49-2.85]).

La répartition selon l'age montre encore une fois, deux pics de risque. Un premier pic pour les jeunes patients (entre 20 et 40 ans) et un deuxième pic de valeur légèrement plus élevé chez les patients de 60 ans et plus.

1      2      3              4      5      6      7



+

**Figure 4 : Profil de digestion par l'enzyme Taq I**

**1 et 3** : NAT2\*6 / +

**2 et 5** : NAT2\*+ / +

**4** : NAT2\*6 / NAT2\*6

**6** : ADN non digéré

**7** : Marqueur de PM

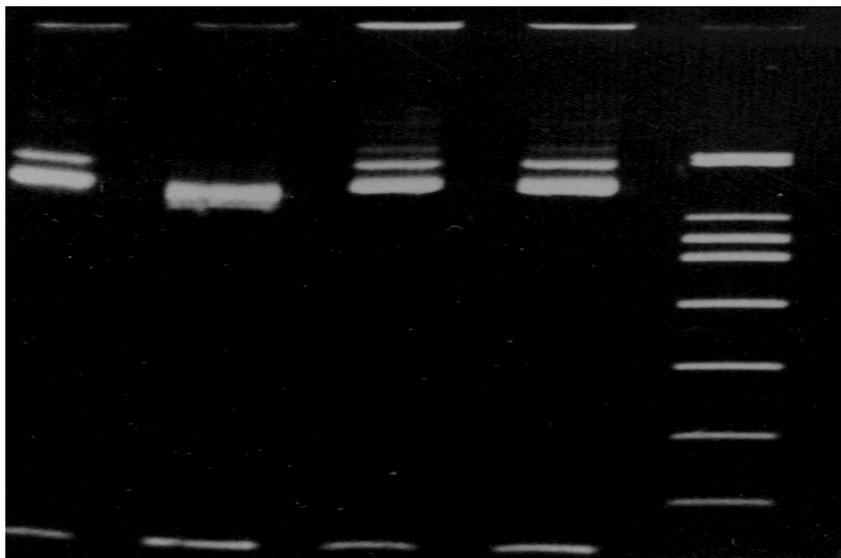
**1**

**2**

**3**

**4**

**5**



**Figure 5 : Profil de digestion par l'enzyme BamH I**

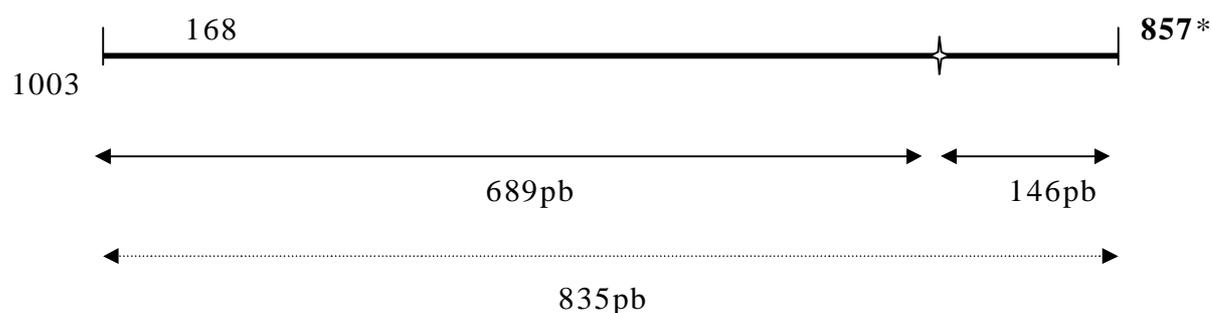
**1, 3 et 4 : NAT2\*7/+**

**2 : +/+**

**5 : Marqueur de PM**

**c- L'allèle NAT2\*7**

Le même fragment de 835pb est digéré par l'enzyme BamH1 pour la caractérisation de l'allèle NAT2\*7 qui correspond à une mutation G→A en position 857 du gène (figure 6).



**figure 6 : Sites de restriction pour l'enzyme BamH1.**

La figure 5 montre un profil de digestion par l'enzyme BamH1. Les individus ayant le génotype sauvage présentent les fragments 689pb et 146pb. Ceux ayant le génotype NAT2\*7, ne présentent que le fragment 835pb puisque le site pour l'enzyme est aboli par la présence à ce niveau de la mutation, alors que les hétérozygotes présentent les 3 fragments 835pb, 689 pb et 146pb.

**Tableau 7: Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme NAT2\*7**

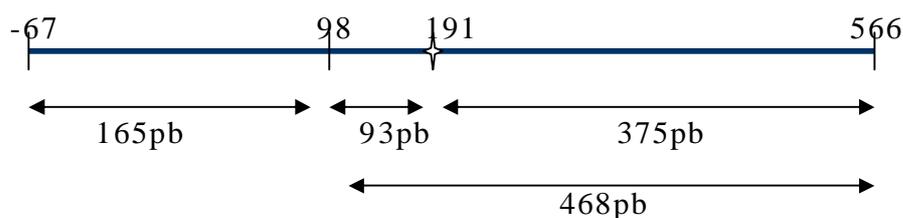
	MALADES		TEMOINS		P	OR (IC 95%)
	Nombre	Fréquence (%)	nombre	Fréquence (%)		
NAT2*7/7	0	0	0	0	NS	<b>0.5(0.2-1.19)</b>
NAT2*7/+	8	17.78	30	30		
NAT2*+ /+	37	82.22	70	70		
Allèle NAT2*7	8.88%		15%			

La fréquence de l'allèle NAT2\*7 était faible, de 15% chez les témoins et 8,88 % chez les malades. Aucune association entre cet allèle et l'augmentation du risque de développement du cancer du nasopharynx ne peut être établie. La valeur du OR=0,5 ;IC95% [0.2-1.19], indique par contre, qu'il serait protecteur contre ce type de cancer. Il est à noter qu'aucun malade ni témoin ne présente d'homozygotie pour cet allèle.

#### **d- L'allèle NAT2\*14**

L'amplification du gène NAT2 génère un fragment de 633pb, dans le quel 2 sites de restriction se dégagent sous l'action de l'enzyme Msp I, un site constant et un, en position 191 pb polymorphe en fonction de la présence ou de l'absence à ce niveau, de la mutation G→A (figure 9).

En effet, les individus porteurs de l'allèle sauvage (+) s'accompagnent de la présence du site de restriction, le génotype +/+ donne 3 fragments de 375pb, 165pb et 93pb. Les individus porteurs de la mutation NAT2\*14 sont caractérisés par l'abolition du site de restriction. Le génotype NAT2\*14/14 est objectivé par la présence de 2 fragments : 468pb et 165pb. Les hétérozygotes NAT2\*14/+ présentent les 4 fragments : 468pb, 375pb, 165pb et 93pb.



**figure 8: Sites de restriction pour l'enzyme MspI**

Le tableau 8 montre les fréquences génotypiques pour le polymorphisme NAT2\*14. La fréquence du génotype NAT2\*14/14 est de 13.3% dans la population de malades par rapport à 1% dans la population de témoins.

**Tableau 8 : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme**

	MALADES		TEMOINS		P	OR (IC 95%)
	Nombre	Fréquence (%)	nombre	Fréquence (%)		
<b>NAT2*14/14</b>	7	13.3	1	1	<0.05	<b>5.11(2.26-8.03)</b>
<b>NAT2*14/+</b>	14	22.22	8	8		
<b>NAT2*+ /+</b>	45	64.44	91	91		
<b>Allèle NAT2*14</b>	42.42%		5%			

La fréquence de l'allèle NAT2\*14 était par conséquent de 42.42% et 5 % respectivement chez les témoins et les malades. Cette différence était statistiquement significative. La valeur du OR montrait la présence d'une forte association entre cet allèle et l'augmentation du risque de développement du cancer du nasopharynx (OR=5.11, IC 95% [2.26-8.03]).

Dans le tableau 9, les ORs pour l'allèle NAT2\*14 ont été ajustés pour l'âge et le sexe. Les patients de sexe masculin porteurs de cet allèle présentaient un risque au CNP nettement plus élevé que pour les femmes.

La répartition en fonction de l'âge montre que le risque de développer un cancer du nasopharynx augmente avec l'âge pour les patients porteur de l'allèle NAT2\*14, celui-ci peut être considéré comme un allèle prédictif de la survenue du CNP et pourrait devenir un marqueur moléculaire.

**Tableau 9: OR pour le CNP associé à l'allèle NAT2\*14.**

	MALADES		TEMOINS		OR (Icà 95%)
	NAT2*14	+	NAT2*14	+	
<b>Tous les sujets</b>	28	104	10	190	5.11(2.26-8.03)
<b>1-selon le sexe</b>					
<b>Masculin</b>	15	67	04	114	<b>6.38(4.09-8.19)</b>
<b>Féminin</b>	13	37	06	76	4.45(2.85-5.64)
<b>2-selon l'âge</b>					
<b>20-40</b>	08	22	03	31	3.75(2.4-4.75)
<b>40-60</b>	14	56	05	99	<b>4.95(3.18-6.27)</b>
<b>60ANS</b>	06	26	02	60	<b>6.92(4.35-8.77)</b>

**VI- ANALYSE DES OR POUR LES ALLELES, LES GENOTYPES NAT2 ET LE PHENOTYPE D'ACETYLEUR LENT AJUSTES SELON LE STATUT FUMEURS / NON FUMEURS**

Le polymorphisme NAT2 est responsable de l'apparition du phénotype d'acétyleur lent due aux allèles NAT2\*5, NAT2\*6, NAT2\*7 et NAT2\*14 à l'état homozygote ou double hétérozygote. Ce phénotype est accompagné à l'échelle enzymatique par une réduction de l'activité enzymatique. Dans ce cas, l'exposition aux xénobiotiques notamment le tabac, qui représente par ces constituants toxiques un des substrats de l'enzyme NAT2, favorise l'accumulation de ces métabolites dans la cellule, pouvant entraîner ainsi la formation de liaison avec les macromolécules tel que l'ADN et générer des mutations cancérigènes

L'analyse conjointes des effets du tabac et de la présence des allèles NAT2\*6, NAT2\*14 et le phénotype d'acétyleur lent sur le risque de développement du CNP sont représentés dans le tableau 10a.

**Tableau 10a : Prévalence des allèles NAT2\*6 et NAT2\*14 associé au statut fumeurs / non fumeurs dans le CNP.**

	Malade	Témoin	OR (IC95%)
<b>NAT2*6</b>			
<b>Fumeurs</b>	16	03	<b>6.43 (2.92-14.3)</b>
<b>Non fumeurs</b>	28	27	2.47 (1.66-5.13)
<b>NAT2*14</b>			
<b>Fumeurs</b>	10	01	<b>11 (7.06-13.94)</b>
<b>Non-fumeur</b>	18	09	0.21 (0.13-0.36)
<b>AL</b>			
<b>Fumeurs</b>	22	08	<b>2.75 (1.76-3.48)</b>
<b>Non fumeurs</b>	34	34	0.34 (0.25-0.93)

Le tableau montre que les allèles NAT2\*6 et NAT2\*14 sont plus fréquent chez les malades fumeurs que chez les témoins non fumeurs. L'association au CNP est donc moins importante pour les non fumeurs.

Le phénotype acétyleur lent (AL) montre la même prévalence et témoigne d'un risque de susceptibilité plus élevé au cancer du nasopharynx pour les fumeurs.

Cependant cette augmentation de risque n'est pas aussi clair en considérant les individus ayant le génotype NAT2\*6/6. Dans ce cas les fumeurs comme les non fumeurs présentaient un risque élevé au CNP, sans aucune différence significative dans les valeurs du ORs pour les deux groupes. (voir tableau 10b)

**Tableau 10b : Prévalence des génotypes NAT2\*6/6 et NAT2\*14/14 associé au statut fumeurs / non fumeurs dans le CNP.**

	Malade	Témoin	OR (IC95%)
--	--------	--------	------------

<b>NAT2*6/6</b>			
<b>Fumeurs</b>	05 (7.5%)	01 (1%)	5.25 (2.41-11.43)
<b>Non fumeurs</b>	09 (13.6%)	04 (4%)	5.20 (2.38-11.23)
<b>NAT2*14/14</b>			
<b>Fumeurs</b>	03 (4.5%)	00	forte association
<b>Non-fumeur</b>	04 (6%)	01 (1%)	8.32 (6.73-17.36)

Nous avons constaté que le génotype homozygote NAT2\*14/14 n'est pas présent dans la catégorie des témoins fumeurs. Ce génotype est retrouvé chez un seul témoin non fumeur. Il est présent chez les malades avec une fréquence très faible confirmant son extrême rareté et son association au carcinome du nasopharynx aussi bien pour les fumeurs que pour les non fumeurs.

## V-ANALYSE DES ASSOCIATIONS ENTRE LES DIFFERENTS GENOTYPES

**Tableau 11 : Combinaison entre les différents génotypes et calcul des OR associés**

<b>Associations Génotypiques</b>	<b>Fréquence Témoins (%)</b>	<b>Fréquence Malades (%)</b>	<b>p</b>	<b>OR(Ic à 95%)</b>
GSTM1nul / NAT2*5	5	6,66	NS	1,32(0,64-2,7)
GSTM1nul / NAT2*6	2	11.11	<0.05	4,66(2,23-8,5)
GSTM1nul / NAT2*14	0	4.44	<0.05	<b>11.55(3,78-16,6)</b>
GSTM1nul / Acétyleur lent	13	44.44	<0.05	5,35(1,8-11,11)

A travers nos résultats il apparaît que seul la combinaison GSTM1nul/ NAT2\*5 ne présente pas de différence significative entre les deux groupes.

Toutes les autres combinaisons sont fortement associées au carcinome du nasopharynx surtout celles présentant l'allèle NAT2\*14. Le risque le plus élevé était observé pour la combinaison GSTM1 nul/l'allèle NAT2\*14.

# ***DISCUSSION***

Le cancer du nasopharynx représente un des cancers du carrefour aéro-digestive les plus répandu dans le monde. Il est caractérisé par une répartition géographique particulière avec trois zones d'incidences différentes. L'Algérie, la Tunisie et le Maroc sont inclus dans la zone à moyenne incidence.

Il représente en Algérie comme en Tunisie le premier cancer de la sphère ORL et des voies aérodigestives chez la femme et le deuxième après le cancer du larynx chez l'homme. En Algérie, il est retrouvé à une incidence de 5.5 cas de sexe masculin/100000 habitants / an et de 3cas de sexe féminin /100000 habitants / an.[70-2]

En Tunisie, l'Institut Saleh Azaiz (ISA) est resté longtemps le seul centre de soin des cancéreux et des traitements contre le cancer. Ce qui lui a permis d'accueillir la majeure partie des cancers dont le cancer du cavum qui représente 2,9% de l'ensemble des cancers avec une incidence de 1.78 cas annuels / 100000 habitants. [79]

Notre échantillon est caractérisé par une prédominance d'hommes malades et de patients dont l'âge se situe entre 40 et 60ans. Une étude menée par Gharbi en 1994 sur 2010 cas de cancer montre que ce cancer présente un premier pic entre 10 et 24 ans alors que le second se situe en moyenne à 50 ans.[70]

En Tunisie, les cas dépistés avant 25 ans constituent près de 20 % des cancers nasopharyngés. Dans les pays du Maghreb où la moitié de la population est âgée de moins de 20 ans, une telle fréquence chez des jeunes individus constitue un problème majeur de santé publique. Les hommes sont plus fréquemment atteints que les femmes, mais avec un sexe ratio de 2 à 3 hommes malades pour une femme atteinte de carcinome du nasopharynx. [70]

Nos malades présentent en majorité un carcinome du nasopharynx de type indifférencié. Ce carcinome constitue la tumeur nasopharyngée la plus fréquente, quelle que soit la région considérée.

Au cours des dix dernières années, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle du polymorphisme des gènes codant pour les enzymes de détoxification des substances exogènes dans la susceptibilité individuelle au risque de cancer. Parmi celles ci, certaines ont démontré la contribution de ces polymorphismes dans la susceptibilité au cancer du nasopharynx

Dans notre travail, nous avons étudié la répartition des polymorphismes des gènes GSTM1, GSTT1 et NAT2 codant pour les enzymes de Glutathion S transférase et les N acétyl transférase intervenant dans la phase II de détoxification, dans une population Tunisienne de malades ayant un cancer du nasopharynx, comparée à une population témoin, saine. Afin de tester l'existence d'une association entre ces polymorphismes, la consommation de tabac et le risque de développement du cancer du nasopharynx.

Ces enzymes sont responsables du métabolisme des xénobiotiques, et des substances carcinogènes dont celles présentes dans le tabac. Leur déficit total ou partiel conduit à un défaut de détoxification à effet génotoxique, favorisant ainsi l'apparition de cancer.

La délétion homozygote GSTM1 a été trouvée dans la population Tunisienne saine, avec une fréquence de 33%. Celle ci présente de larges différences ethniques, puisqu'elle est estimée à 50 % dans la population Caucasienne (12), 22 % dans la population Indienne (12) et 62 % dans la population Japonaise (80). La fréquence dans notre échantillon se rapproche de celle trouvée dans la population Africaine, estimée à 35% (3), mais aucune comparaison avec la population Maghrébine n'a pu être réalisée.

Le polymorphisme de délétion GSTT1 présente également de larges différences entre les populations. Il est retrouvé dans notre travail, avec une fréquence de 20 %. Celle ci se rapproche de la fréquence observée au niveau

de la population Caucasienne (19 %) (**12**), mais s'éloigne de la fréquence décrite dans la population Africaine (30 %) (**3**).

En ce qui concerne l'association de ces génotypes au risque de carcinome du nasopharynx, nos résultats suggèrent que le génotype de délétion GSTM1 nul est associé à un risque élevé de CNP de type indifférencié. Nazar et al en 2001 (**81**), trouvent une relation entre le CNP de type différencié (squamous cell carcinoma) et le génotype GSTM1 nul. Des différences ethniques sont également décrites dans l'association du polymorphisme GSTM1 nul à la susceptibilité aux cancers de la sphère ORL et des poumons [**82-83-47-48**]. En effet, cette association est retrouvée dans la population Japonaise (**47**) et chez les Américains d'origine Africaine [**84**], mais pas dans la population Caucasienne [**45**] et brésilienne [**85**]. Les larges différences dans la prévalence de certains polymorphismes de détoxification décrites dans plusieurs groupes ethniques, influenceraient la susceptibilité au cancer, par des modifications de l'activité de l'enzyme sur les carcinogènes environnementaux.

En effet, la glutathion-S-transférase, détoxifie les benzo(a)pyrènes et d'autres carcinogènes contenus dans la fumée de tabac. Cependant, dans la littérature, les conclusions concernant la liaison de la consommation de cigarettes au CNP ne sont pas clairement établies, bien que certaines études associent l'augmentation du risque de développer un carcinome du nasopharynx à la délétion GSTM1 et au statut fumeurs [**86-87**]. De nombreuses études portant sur le polymorphisme GSTM1 nul, ont montré son implication direct dans le CNP chez les populations fumeurs et non fumeurs [**81-87-88**]. Nos résultats, confirme l'association de l'augmentation du risque au CNP avec le génotype GSTM1 nul et le statut fumeurs.

Nous montrons que le risque d'apparition du CNP en association avec la délétion GSTM1, varie en fonction du sexe. Puisque, nous avons trouvé un risque plus élevé chez les hommes que chez les femmes. Ce résultat n'est pas concordant avec celui observé dans la population Américaine où on note un risque plus élevé chez les femmes que chez les hommes [**81-88**]. Il a été suggéré

qu'une différence de régulation de l'expression de GSTM1 en fonction du sexe, pourrait conduire à un métabolisme de détoxification différent chez l'homme et chez la femme [89-90].

L'augmentation du risque chez les hommes, observée dans notre travail, contrairement à ce qui a été décrit dans la population Américaine, pourrait s'expliquer par une différence de contexte socioculturel et par une prédominance dans notre population de fumeurs de sexe masculin.

On signale (tableau 3) une fluctuation de la survenue du CNP suivant les tranches d'âges 20-40ans, 40-60ans et plus de 60ans, en notant une très forte association pour les 20-40ans et les plus de 60ans alors que chez les individus de 40-60ans, le polymorphisme GSTM1 nul devient protecteur. Ce résultat original soulève beaucoup d'hypothèses :

- Les patients de 20-40ans fumeurs représentent 26.26% de la population fumeur. Ils sont caractérisés par une forte association au CNP en présence du génotype GSTM1 nul (OR=8 ; IC 95% [6.03-10.08]). Ceci montre qu'une exposition précoce au tabac engendrerait l'expression d'un nombre plus important de mutations cancérigènes. Ces patients présenteraient un facteur génétique de régulation de l'expression d'oncogène, qui reste à identifier, ce facteur influencerait probablement l'augmentation du risque au CNP.

- La nette différence avec les 40-60ans portant le même polymorphisme GSTM1 nul pourrait être dû à une influence d'ordre hormonale. Cette hypothèse est accentuée par la légère différence du risque au CNP entre les hommes et les femmes

- Pour les plus de 60ans, cette augmentation de risque indique qu'une plus grande exposition à des facteurs environnementaux, favoriserait l'apparition du CNP.

Le gène NAT2 présente plusieurs formes alléliques caractérisées par une ou plusieurs substitutions nucléotidiques.

Ces allèles sont représentés par : NAT2\*5, NAT2\*6, NAT2\*7 et NAT2\*14 [30-33]. Leur proportion connaît d'importantes variations selon l'origine ethnique [11].

Les allèles NAT2\*5, NAT2\*6, NAT2\*7 qui ont fait l'objet de notre travail, ont été trouvés dans notre population Tunisienne saine témoin, avec des fréquences respectives de 31,5%, 17,5% et 15% par rapport à 46%, 28,5% et 2,9% dans la population Caucasienne [11], confirmant ainsi les différences des distributions alléliques observées au sein de populations différentes.

En ce qui concerne l'allèle NAT2\*14, qualifié d'allèle rare, car non détecté dans les populations Caucasiennes, Japonaises, Chinoises et Indiennes [35], celui-ci est rencontré avec une fréquence de 5% dans notre population témoin. Cette fréquence se rapproche de celle trouvée chez les Américains d'origine Africaine (8.3%) et chez les Gabonais (9%)[91-92]

Chez nos malades, la fréquence des allèles est différente d'un allèle à un autre, avec 31.8% pour l'allèle NAT2\*5, 33.33% pour l'allèle NAT2\*6 et 8.88% pour l'allèle NAT2\*7. Ces résultats se rapprochent des résultats obtenus lors d'une étude similaire sur la population caucasienne sauf pour l'allèle NAT2\*14 qui est plus fréquent dans la population malade tunisienne.

Si l'on considère les différents génotypes du gène NAT2, nous notons que les génotypes NAT2\*6 / NAT2\*6 et NAT2\*14 / NAT2\*14 sont plus fréquents chez les malades (24,4% pour NAT2\*6 / NAT2\*6 et 13.3% pour NAT2\*14 / NAT2\*14) que chez les témoins (5% pour le génotype NAT2\*6 / NAT2\*6 et 1% pour le génotype NAT2\*14 / NAT2\*14 ) et sont associés à l'augmentation de la susceptibilité d'apparition de carcinome du nasopharynx.

Parmi les différents allèles du gène NAT2, certains sont associés à une activité normale de l'enzyme définissant sur le plan phénotypique, les individus acétyleurs rapides et d'autres, sont associés à une activité diminuée, définissant ainsi les acétyleurs lents, qui sont alors soit homozygotes soit double hétérozygote pour un des allèles acétyleur lent [30-33].Leurs fréquences

présentent d'importantes variations ethniques. C'est ainsi que les populations Caucasiennes comptent des proportions en moyenne équivalentes d'acétyleurs rapides et d'acétyleurs lents [11-35]. La population d'Afrique du Nord compte parmi la plus riche en acétyleurs lents, avec 80% dans la population Egyptienne [93] et 90% dans la population Maghrébine [35]. Chinois et Japonais sont essentiellement acétyleurs rapides, avec seulement 10 à 20% d'acétyleurs lents (30). Nos résultats montrent une fréquence de 42% dans la population témoins

Tous ces résultats génotypiques et phénotypiques confirment les études [58-59] qui témoignent comme il est indiqué par ces auteurs, que la capacité réduite des acétyleurs lents à détoxifier les carcinogènes, notamment ceux contenus dans le tabac, les expose à un risque plus élevé de développer un cancer du nasopharynx par augmentation des risques de mutations au niveau des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. Ces mêmes observations ont été faites en ce qui concerne le cancer de la vessie et celui du larynx (94-95), mais ne semble pas s'appliquer au cancer du poumon où les auteurs trouvent une association avec le phénotype acétyleur rapide (96). Cette association s'explique par le fait qu'en plus de la N-acétylation, la N-acétyl transférase catalyse des réactions de O-acétylation et de N-O transacétylation, pouvant ainsi activer certains procarcinogènes.

D'autre part le risque d'apparition du cancer du nasopharynx est plus accentué pour les patients fumeurs porteurs de l'allèle NAT2\*14. La substitution G191A responsable de l'allèle NAT2\*14 donne naissance à une N-acétyltransférase douée d'une plus forte capacité d'activation des carcinogènes chimiques [58-59].

Nous trouvons par ailleurs, que le génotype NAT2\*7 / NAT2\*7 est totalement absent chez les malades et les témoins. Ceci indique un phénomène de sélection de l'hétérozygosis. Le calcul du OR correspondant à cet allèle montre qu'il serait protecteur contre le cancer du nasopharynx.

Nos résultats n'ont par contre pas trouvé d'association entre le génotype GSTT1 nul et le carcinome du nasopharynx. Ceci n'est pas en accord avec les travaux de **Olshan et al en 2000**, qui décrivent une association entre la délétion homozygote GSTT1 et les cancers de la tête et du cou, incluant les cancers de la cavité orale, du larynx et du pharynx [86].

Notre travail a montré que l'absence de la glutathion-S-transférase, par délétion homozygote du gène GSTM1 et une faible activité de la N-acétyl transférase, engendrée par la présence de l'allèle NAT2\*6 et NAT2\*14 sont associées à un risque élevé de carcinome du nasopharynx. Leur déficit total ou partiel conduit à un défaut de détoxification des substances carcinogènes, dont l'accumulation est responsable d'un effet génotoxique, favorisant l'apparition de cancer. L'association de ces polymorphismes avec les substances du tabac, augmentent nettement le risque de susceptibilité à ce carcinome.

Il serait par conséquent intéressant de prévoir dans nos perspectives :

1- d'établir les polymorphismes GSTM1 et GSTT1 ainsi que tous les polymorphismes NAT2 responsables du phénotype acétyleur lent chez un échantillon plus important de population saine Algérienne.

2- de choisir une population de malades présentant un cancer connu pour être fortement lié à la consommation de tabac, notamment le cancer du poumon et les cancers de la sphère ORL de manière générale, dont le cancer du nasopharynx qui est aussi très présent dans notre pays,

3- d'établir les polymorphismes GSTM1 et GSTT1 ainsi que tous les polymorphismes NAT2 responsables du phénotype acétyleur lent chez ces malades,

4- de les comparer par rapport au témoin, par rapport au degré de consommation de cigarettes et les uns par rapport aux autres, afin de mieux cerner l'implication des défauts de détoxification du tabac dans la genèse de ces cancers,

5- Finalement, de comparer les résultats obtenus avec ceux d'une autre population, notamment la population caucasienne qui semble présenter des fréquences différentes, afin de mieux cerner l'intervention des polymorphismes des enzymes de la phase II dans la susceptibilité aux cancers dépendants du TABAC

## ***ANNEXES***

**\* La solution lysante de globules rouge:**

-72 mg de  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  1Mm

-7g de  $\text{NH}_4\text{cl}$  140mM

QSP 1000ml d' eau et agiter 20minutes.

**\*Solution tris Hcl pH8.8 1M:**

121.14g de trisma basique

Dissoudre cette quantité dans 800ml d'eau. Ajuster le pH à 8.8 en ajoutant du Hcl concentré goutte à goutte

Ajuster le volume de la solution à 1000ml avec de l'eau.

Aliquoter puis autoclaver.

**\*Solution lysante des globules blancs:**

5ml de Kcl 1M

1ml de tris pH8.8

250 $\mu$ l de  $\text{Mgcl}_2$  1M

450 $\mu$ l NP 40 (Non Idet P40)

450 $\mu$ l tween 20

QSP 100ml d'eau

**\* Solution de Tris-EDTA 10-1 pH 8**

10 ml tris Hcl pH8 1M

2ml EDTA 0.5M

Compléter à 1000ml d'eau

**\*Solution EDTA 0.5M pH8**

18.6g EDTA

70ml d'eau

Dissoudre l'EDTA. Ajuster le pH à 8 à l'aide de NaOH 10N

Compléter à 100ml avec de l'eau

**\*Solution de migration Tris-Borique-EDTA (TBE) 5x**

27g de trisma basique

13.75g acide borique

10ml EDTA 0.5M pH8

Compléter avec de l'eau à 500ml

-pour TBE 0.5x

On mesure 1ml de TBE 5x pour 10ml d'eau

-pour TBE1x

On mesure 1ml de TBE 5x pour 5ml d'eau

**\*Solution de migration Tris-Acide acétique-EDTA (TAE) 50x**

28.5ml acide acétique

121g Tris 1M

50ml EDTA 0.5M pH 8

Adjuster à 500ml avec de l'eau

- Pour le TAE 1x on mesure 1ml pour 50ml d'eau

**\*Bleu de depot**

Xylene cyanol 0.25%

Bleu de bromophenol 0.25%

3.7g de ficole 400 (15%)

**\* Gel de polyacrylamide.**

Le produit de digestion est déposé sur un gel d'acrylamide-bisacrylamide 29 :1 à 8%. Dans un Erlen-Meyer, on mélange :

\* Solution mère à 40% d'acrylamide/bis-acrylamide : 8 ml

\* Tampon 10X TBE : 4 ml

\* H<sub>2</sub>O : 28 ml

On ajoute alors 350 µl de persulfate d'ammonium à 10% et 50µl de TEMED. Le gel est ensuite immédiatement coulé entre des plaques de verre au moyen d'une seringue.

**\*Digestion enzymatique avec Taq I**

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale
Taq I	20 U	5 U/ réaction
Tampon Taq I	10 X	1 X
BSA	100X	1 X
H <sub>2</sub> O		Qsp 40µl
Quantité d'amplificat		15µl

La réaction est incubée dans un bain marie pendant 4 heures à 65 °C.

**\*Digestion enzymatique avec Bam HI**

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale
BamH I	10 U	2,5 U/ réaction
Tampon BamH I	10 X	1 X
BSA	100X	1 X
H2O Quantité d'amplificat		Qsp 25 µl 10µl

La réaction est incubée à 37°C, pendant une nuit.

**\*Digestion enzymatique avec MspI**

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale
Msp I	20 U	10U/ réaction
Tampon MspI	10 X	1 X
H2O Quantité d'amplificat		Qsp 25µl 5µl

La réaction est incubée à 37°C, pendant une nuit.

# ***BIBLIOGRAPHIE***

**1-Ben Abdallah M** : Epidémiologie des cancers en Tunisie. Registre de l'Institut Salah Azaiez 1997 ; 61-66.

**2- Pr.hamdi cherif**. Séminaire sur les maladies non transmissibles, Alger du 01 au 03/4/2003

**3-Adams C**, Werely CJ, Victor T, Hoal E, Rossouw G, Van Helden P. Allele frequencies for GST and NAT2 differ in african population groups and may be associated with oesophageal cancer. Clin Chem Lab Med 2003; **41**(4): 600-605

**4- Mannervik B**. The isozymes of GST. Advances in Enzymology. Areas mol biol 1985 ; **57** :357-417.

**5-Board P**, Coggan M, Johnston P, Suzuki T. Genetic heterogeneity of the human Glutathione S-Transferase: Pharmacological Therapy 1990 ; **48** :357-369.

**6- Pearson W**. identification of class  $\mu$  GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1p13. Am J Hum Genet 1993; **53**: 220-233.

**7-Roman A**, Oscarson M, Alexendrie A, Seidegard J, David A, Evans P., Characterization of a human GST m cluster containing a duplicated GSTM1 gene. Pharmacology 1997; **52**: 958-965

**8-Islam M**, Plaz A, Szpirer J, Levan G, Mannervik B. Chromosomal localisation of human GST genes of classes alpha, mu and pi. Hum Genet 1989; **82**: 338-342

**9- Shi-jie Xu**. Ying-Ping Wang, Bruce R, William R. Characterisation of human class mu GST gene cluster and the GSTM1 deletion. J. bio. Chem 1998; **273**(6) :3517-3527.

- 10-Board P.G.** Biochemical genetics of glutathione S-transferase in man. *Am. J.Hum.Genet* 1981 ; 33 :36-43.
- 11- Garte S,** Gspari L, Anna-Karin A et al. Metabolic gene polymorphism frequency in control population. *Cancer Epidem Biomarkers and Prevention* 2001; 10; 1239-48
- 12-Pedro A.,** Gaspar I., Mara H., Salsano S., Hill K., Polymorphism of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1 and P53 genes in Amerindians and caucasiens. *American Journal of Physical Anthropology* 2002 ; 119: 249-256
- 13-Coggan M,** Whitbread L, Whittington A, Board P. Structure and organisation of the human theta class GST and D-dopachrome tautomerase gene complex. *Biochem J* 1998 ; 334 :617-632.
- 14- Peter H,** Deutschmann S, Seichel C, Hallier E. Metabolism of methyl chloride by human erythrocytes. *Arch Toxicol* 1989 ; **63** :351-355.
- 15- Pemble S,** Schroeder K, Meyer J, Hallier E, Bolt H, Taylor J. Human GSTT1:cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem.J* 1994 ; **300** :271-276.
- 16- Alexandrie A,** Rannug A, Juronen E, TasaG. Detection and characterization of novel functional polymorphism in GSTT1 gene. *Pharmacogenetics* 2002; **12**(8): 613-9.
- 17-lee E,** Wong J, Yeoh P, GSTT1 genetic polymorphism among Chinese, Malays and Indians in Singapore. *Pharmacogenetics* 1995; **5**: 332-334.
- 18-hamdy S.,** Hiratsuka M., Narahara K., Endo N., El-Enany M., Moursi N., Ahmed M. Genotype and allele frequencies of TPMT, NAT2, GST and MDR-1 in the Egyptian population. *Br J Clin Pharmacol* 2003; **55**(6): 560-569.
- 19- Seidgard J,** Pero R. The hereditary transmission of high GST activity towards halomethanes in human mononuclear leukocytes. *Human Genet* 1985; **69** :66-68.
- 20- Hughes H.B,** Biehl J, Schmidt L. Metabolism of isoniazid in man. *Am. Rev. Dis* 1954 ; **70**: 266 -273.

- 21-Blum M**, Grant D, Heim M, Meyer U. Human N-acetyltransferase genes : isolation, localization and functional expression. *Cell Biol* 1990 ; **9** :193-203.
- 22- Rustan T**, Hein D, Feng Y, Doll M, Ferguson R. Metabolic activation aromatic and deactivation of carcinogens by NAT1 and NAT2 . *carcinogenesis* 1993 ; **14** :1633-1638.
- 23- Deguchi T**. Sequences and expression of alleles of polymorphic NAT of human liver. *J.Biol.Chem* 1992 ; **267** :18140-18147
- 24- Evans D.A**. N-acetyltransferase. *Pharmacogenetics of drug metabolism*. pergamon press 1993 ; 95-178.
- 25- Hein D.W**, Doll M, Gray K, Feng Y, Ferguson R. Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2. *Carcinogenesis* 1993 ; **14** :1633-1638.
- 26-Blum M**, Demierre A, Grant D, Heim M, Meyer U. Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1991 ; **88** :5237-5241
- 27-Grant DM**, Blum M, Beer M, Meyer U. Monomorphic and polymorphic human arylamine NAT: a comparison of liver isozyme and expressed product of two cloned genes. *Mol. Pharmacol* 1981; **39**: 184-191
- 28-Hichman D.**, Rish A., Buckle V., Spurr N., Jeremiah S., Chromosomal localization of human gene arylamine NAT. *Biochem* 1994; **297**: 441-445.
- 29- Matas N**, Thygesen P, Stacy M, Rish A, Sim E. Mapping AAC1, AAC2, AACP, the NAT genes, carcinogen metabolising enzymes on human chromosome 8p22. *Cytogenet Cell Genet* 1997; **77**: 290-295.
- 30- Grant D.M**, Hughes N, Janezic S, Goodfellow G, Chen H. Human acetyltransferase polymorphisms. *Mutat. Res* 1997 ; **376** :61-70.
- 31-Butcher N**, Boukouvala E, Sim R, Minchin. Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases. *The Pharmacogenomics Journal* 2002; **2**:30-42
- 32- Ambrosone C.**, fred K. NAT polymorphisms, reactions and susceptibility to cancer. In *biomarkers: medical and workplace applications* 1998; 190-210.

- 33- Vatsis K.**, Martell K, Weber W. Diverse point mutations in the human gene for polymorphic NAT. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; **88** : 6333- 6337.
- 34- Vatsis K.**, Weber W. Structural heterogeneity of caucasian NAT at the gene locus. Arch. Biochem. Biophys 1991 ; **301** : 71 -76.
- 35-Lin H**, Han CY, Lin B, Hardy S. Ethnic distribution of slow acetylator mutations in the polymorphic NAT2 gene. Pharmacogenetics., **4**: 125-134, 1994.
- 36-Covaco I** et al. CYP3A\*1B and NAT2\*14 alleles in a native African population. Clin chem. Lab med 2003; **41**(4) :606-609.
- 37- Guengerich F.P.** CytochromeP-450.Comp.Bioch.physiol 1988 ; **80** :1-4.
- 38- Stern j** . Cytochrome P 450 polymorphism and susceptibility to cancer . Medical and workplace applications 1998 ; 211-226.
- 39-Meyer U**, Zangen U. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1997. **37**: 269-296.
- 40- Dipple A.** DNA adducts of chemical carcinogens. Carcinogenesis 1995;437-441.
- 41- Kempkes M**, Golka K, Reich S, Bolt H, Reckwitz. GSTM1 and GSTT1null genotypes as potential risk factors for urothelial cancer of the bladder. Arch Toxicol 1996 ; **71** :123-126.
- 42-Karagas MR**, Park S, Warren A, et al. Gender, smoking, GST variants, and bladder cancer incidence. Cancer Lett 2005; 219-263
- 43-Park S**, Yoo K, Lee S. Alcohol consumption, GSTM1 and T1 genetic polymorphisms and breast cancer risk. Pharmacogenetics 1995; **10**: 301-309
- 44-Hong S**, Kim J, Park I, Ryoo J, Lee C. GSTM1, GSTT1, GSTP1 polymorphisms and the risk of gastric cancer. J Prev Med Pub Health 2006; **39** (2): 135-140
- 45- Jong Y**, Joshua E, Stimson P, Jordan C, John P. Comparaison of GSTM polymorphisms and risk for oral cancer between African-Americans and caucasians.pharmacogenetics 2000 ; **10** :123-131.

- 46-Stacy A.**, Geisler G., Olshan A. GSTM1, GSTT1 and risk of Squamous Cell Carcinoma of the head and neck: A Mini Huge Review American Journal of Epidemiology 2001; 154 : 2
- 47- Kihara M**, Noda K. Distribution of GSTM1 null genotype in relation to gender, age and smoking status in japanese lung cancer patients. Pharmacogenetics 1995 ; **5** :S74-S75.
- 48-Stucker I.**, Hirvonen A., Isabelle W., Arnauld C., Katja M., Sylvie C. Genetic polymorphisms of GST as a modulateurs of lung cancer susceptibility. Carcinogenesis 2002; **23**: 1475-1481.
- 49-Dick F**, De palma G, Ahmadi A, Osborne A, Scott N, Haites N. Gene environment interactions in parkinson's disease. Occpational and Environmental Medicine 2007; **64**:673-680.
- 50- Arruda V**, Lima S, Rignoli C, Demelo M. Increased risk for acute myeloid leukaemia in individuals with GSTM1 and T1 gene defects. Eur J Haematol 2001; **66**(6): 383-8
- 51- Renee L**, Carmel S, Roodi N, Yee J. Breast cancer and CYP1A1, GSTM1, GSTT1 polymorphisms : lack of association in caucasians and african americans. Cancer Res 1998 ; **58** :65-70.
- 52- Rebbeck T**, Walker A, Jaffe J et al. GSTM1 and T1 genotypes in etiology of prostate cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1999; **82**: 83-7.
- 53- Hallier E**, Schroder K, Goergens H, Muller A. Polymorphism of GST conjugation of methyl bromide in blood :influence on the induction of sister chromatid exchanges(SCE). Arch Toxi 1993 ; **67** :173-178.
- 54- Katoh T**, Nagata N, Kitagawa K, Kuroda Y, Itoh H, Kawamoto T. Inherited polymorphism in the NAT1 and NAT2 genes and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. Int. J. cancer 2000 ; **85** :46-49.
- 55- Pervers F**, Firzori, Bondy, Aysegul A, Shahin. Aromatic DNA adduits and polymorphisms of CYP1A1, NAT2 and GSTM1 in breast cancer. Carcinogenesis2002; **23**(2): 301-306.
- 56- Martinez C**, Agundez J, Olivera M, Martin R, Benitez J. lung cancer and mutations at N-acetyltransferase2 gene locus. Pharmacogenetics 2001; **5** :207-214.

- 57- Risch A**, Wallace D.M.A, Bathers S, Sim E. Slow NAT genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. *Human Molecular Genetics* 1999 ; 4 :231-236.
- 58- Gonzalez MV**, Alvarez V, Pello M, Menendez M, Suarez C. Genetic polymorphism of NAT2, GSTM1, P450IIE1 and P450IID6 in the susceptibility to head and neck cancer. *J .Clin. Pathol* 1998 ; **51** :294-298.
- 59-Wadeluis C**, Wolf C, Rane A. Polymorphisms in NAT2, CYP2D6, CYP2C19 and GSTP1 and their association with prostate cancer. *Pharmacogenetics* 1999; **9**. 330- 340.
- 60- Gajecka M**, Rydzancz M, Jaskula R, Kujawski M, Szyfter W, Szyfter K. CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, NAT2, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms or their combinations are associated with risk of the laryngeal cancer. *Mutat Res* 2005 ;**574** :112-23.
- 61- Yalin S**, Hatungil R, Tamer L, Ates N, Dogruer N, Karakas S. NAT2 polymorphism in diabetes. *Cell Biochem Funct* 2007; **25** (4): 407-411.
- 62- Borlak J**, Harsamy V, Schneble H, Haegele K. PNAT and CYP2D6 gene polymorphism in epileptic patients. *Biochem Pharmacol* 1994; **48**: 1717-1720.
- 63-Bandmann O**, Vaughan J, Holmans P, Wood N. Detailed genotyping demonstrates association between the slow acetylator genotype for NAT2 and familial parkinson's disease. *Mov Disord* 2000; **15**: 30-35
- 64- Bartsch H**, Nair U, Risch A, Rojas M, Wilkman H, Alexandrov K. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Can Epid Bio prev* 2000; **9**, 3-28
- 65-Altun M**, Fandi A, Dupuis O, Cvitkovic E. UNPC current diagnostic and therapeutic aspects. *Int .J .Rad Oncol Biol Phys* 1995 ; **32** :859-877.
- 66-Bourhis J**, Schwaab G :Cancer du nasopharynx. *Encycl. Med. Chir. (Paris) ORL* 1999 ; **20** : 590.
- 67- Le Febvre J.L**, Adenis L. Epidemiologie des cancers des voies aero digestives superieures. *La revue du praticien (Paris)* 1999 ; **45** :818-824.
- 68- Fandi A**, Altun M, Azli N. NPC :Epidemiology, staging and treatment. *Seminars in oncology* 2002 ; **21**:382-397.
- 69- Bouras N**, Tahri A, Ammor S, Baali A. Nutritional and environmental risk factors of nasophayngeal carcinoma in Morocco. *J Clin Oncology, ASCO* 2006; **24**: 18S

**70- Gharbi M.K.** these med ;univesité de medicine de sousse,.

**71- Tricker A.R,** Preussmann R. Carcinogenic N-nitrosamines in the diet : occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potentiel. Mutat Res 1997 ; **259** :277-289.

**72- Jeannel D,** Hubert A, DevathaireF. Diet living conditions and Nasopharyngeal carcinoma in Tunisia : a case control study. Int. J. Cancer 1999 ; **46** :421-425.

**73-Armstrong R.W,** Armstrong M, Yu M. Salted fish and inhalants as risk factors for NPC in Malisian Chinese. Cancer Res.1993 ; **43** :2967-2970.

**74- Chow.W.H,** Mclaughtin J, Hrubec Z. Tobacco use and Nasopharyngeal Carcinoma in cohort of us veterans. Int. J. Cancer 1998 ; **55** :538-540.

**75- Vokes E,** Liebowitz D, Weichselbaum R. NPC etiology. The lancet 1999 ; **350** :1087-1091.

**76- Golovleva I,** Birgander R, Sjalander A. Interferon  $\alpha$  and P53 alleles involved in Nasopharyngeal carcinoma. Carcinogenesis 1997 ; **18**, 4 :654- 657.

**77- Choi .P,** Sven M, Path M. NPC :genetic changes, EBV infection : a clinical and molecular study .Cancer 1998 ; **72** :2873- 2878.

**78- Leibowitz D.** NPC :the EBV association. Seminars in oncology 2001; **2**:376- 381.

**79- Jmal A,** Abdennebi M, Boussem H, Abaza H, Gara S, Bendjemana K, Harzallah L, Guemira F, Ghanem A. Serum lactate dehydrogenase and its isoenzymes in nasopharyngeal carcinoma in Tunisia. Tunis Med 2005; **83**(4):218-220.

**80- Rebbeck T.** Molecular epidemiology of the human GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1997; **67**: 33-743.

**81- Nazar-Stewart,** Thomas L, Vaughan C, Chen C. GSTM1 and susceptibility to NPC. Cancer epid biomarkers and prevention 2001 ; **8** :547-551.

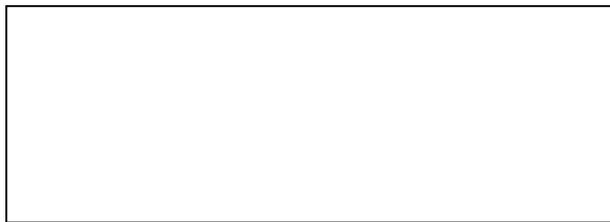
**82. Chandra B,** Tripathy P, Nilanjan D, Roy D. Meta analysis of GSTM1 genotype and risk toward head and neck cancer. Inc Head Neck 2005 ; **27**.

**83. Suzen HS,** Guvenc G, Turenli M, Comert E, Duydu Y, Ethan A. The role of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in head and neck cancer risk. Oncol Res 2007 ; **16**: 432-9.

- 84-Yongliang I**, Ford J, Margaret M, Taioli E, Seymour G. GSTM1 polymorphism and lung cancer risk in african- americans. *Carcinogenesis* 2002 ; 20:1971-1775.
- 85. Rossini A**, Rapozo D, Ferreira M, Teixeira R, Kruel C, Barros S. Polymorphisms of GSTP1 and T1, but not of CYP2A6, CYP2E1, GSTM1, modify the risk for esophageal cancer in western population. *Carcinogenesis* 2005 ; **26**.
- 86. Olshan F**, Mark C, Mary A, Watson A. GSTT1, GSTM1, GSTP1, CYP1A1 and NAT1 polymorphism, tobacco use, and the risk of head and neck cancer. *Cancer epid biomarkers and prevention* 2000 ; **9** :185-191.
- 87. Peters E**, Mc Clean M, Carmen J, Luckett B, Kelsey KT. GST polymorphisms and synergy of alcohol and tobacco in Oral, Pharyngeal and Laryngeal Carcinoma. *Cancer Epid Biomarkers and Prevention* 2006 ; **15**: 2196-202.
- 88. Ye Z**, Song H, Guo Y. Glutathion S Transferase M1, T1 statuts and the risk of head and neck cancer: meta analysis.2005
- 89. Gleiter C.H**, Gundert-Remy U. Gender differences in pharmacokinetics. *Eur. J. Drug. Metab. Phermacokinet* 1996; **21** : 132-128
- 90. Harris R.Z**, Benet L, Schwartz J. Gender effectors in pharmacokinatics and pharmaco- dynamics. *Drugs* 1995; **50** : 222-239.
- 91. Bell DA**, Taylor J, Butler M, Stephens E, Wiest J, Brubaker L et al. Genotype/phenotype discordance for human NAT2 Reveals a new slow acetylator allele common in african-americans. *Carcinogenesis* 1993; **14**: 1689-1692.
- 92. Deloménie C**, Sica L, Grant DM, Krishnamoorthy R, Dupret JM. Genotyping of the polymorphic NAT2 gene in two native africain populations. *Pharmacogenetics* 1996; **6**:177-185.
- 93. Hashem H**, Khalifa S, Nour A. the frequency of isoniazid acetylase enzyme defiency among egyptiens. *Am J Phy Anthrop* 1999; **31**:97-101.
- 94- Drozd M**, Gierek T, Jendryczko A. N-acetyltransferase phenotype of patients with cancer of the larynx. *Neoplasia* 1997 ; **34** :481-4.
- 95- Ilett K.F**, David B, Detchon P, Castleden W, Kwa R. Acetylator phenotype in colorectal carcinoma. *Cancer Research* 1999 ; **47** :1466-69

**96-** Chiou H, Wu M, Chien W, Cheng Y, Wong R, Chen C, Lin T. NAT2 fast acetylator genotype is associated with an increased risk of lung cancer in Taiwan. *Cancer Lett* 2005; **223**(1): 93-101

**ABSTRACT**



Interindividual differences observed in the metabolism of tobacco carcinogens substances have been attributed to the genetic polymorphism of genes, which code for enzymes involved in detoxification. This genetic variability associated with the individual's susceptibility to certain cancers, including nasopharyngeal carcinoma (NPC).

We have investigated the genotypic frequencies of DNA polymorphisms of genes which codes for detoxification enzyme's: glutathion-S-transferase (GST) and N-acetyltransférases 2 (NAT2) and evaluate the impact of the consumption of tobacco on the risk of development of NPC. The study concerned 66 patients presenting an NPC, compared to 100 healthy Tunisian controls. The presence of the GSTM1 null and GSTT1 null polymorphism was screened by a multiplex PCR procedure. A PCR-RFLP method was used to detect the most common alleles of the NAT2 gene. Allelic frequencies were compared using a  $\chi^2$  test and odds ratio (OR) with 95% confidence intervals. The results indicate that the frequency of GSTM1 0/0 between controls and patients was significantly different. This genotype confers an increased risk of NPC (OR=2.03; IC 95% [1.03-4.37]). This risk is accentuated for men and smokers. No significant association was observed between GSTT1 0/0 and the NPC, however, genotypic frequencies of NAT2\*6/6 and NAT2\*14/14 were significantly higher in NPC patients. The OR (OR = 2.8; IC 95% (1.02-4.4) for NAT2\*6. OR = 5.11; IC 95% (2.26-8.03) for NAT2\*14) (OR = 6.14; IC 95% [2.4-14] for NAT2\*6. OR = 15.2; IC 95% [5-30] for NAT2\*14) suggested that these alleles may significantly increase the risk of NPC with an additive interaction between this alleles and smoking. NAT2\*7 allele may play a protective role in nasopharyngeal carcinogenesis.

## **RESUME**

Les différences interindividuelles observées dans le métabolisme des xénobiotiques sont dues aux polymorphismes des gènes codant pour les enzymes de détoxification. Cette variabilité génétique semble être associée à des

différences de susceptibilité à certains types de cancers, dont le carcinome du nasopharynx (CNP).

Notre travail vise à établir les fréquences génotypiques des polymorphismes de DNA dans ces gènes de détoxication, chez 66 malades présentant un CNP, comparée à 100 témoins sains. La présence de la délétion homozygote des gènes GSTM1 et GSTT1 est déterminée par PCR multiplex. L'étude du polymorphisme allélique du gène NAT2 utilise l'approche PCR-RFLP. La comparaison des fréquences entre les deux groupes est établie par un test  $\chi^2$  et le calcul des odds ratio (OR) avec un intervalle de confiance à 95%.

Nos résultats montrent une différence significative entre les deux groupes concernant le génotype GSTM1 nul. Celui ci est associé à une augmentation du risque de CNP (OR = 2.03 ; IC 95% [1.03-4.37]). Cette association est plus importante chez les homes fumeurs. Pas d'association significative est à noter entre le génotype GSTT10/0 et le carcinome du nasopharynx.

Par ailleurs, la fréquence des génotypes NAT2\*6/6 et NAT2\*14/14 est plus élevée chez les patients. Le calcul du OR montre une association entre ces allèles et le CNP (OR = **2.8**; IC 95% (**1.02-4.4**) pour NAT2\*6. OR = 5.11; IC 95% (2.26-8.03) pour NAT2\*14), avec un risque plus accentué pour les fumeurs. L'allèle NAT2\*7 aurait un rôle protecteur contre le cancer du nasopharynx.

#### تلخيص

الفروق الذاتية الملاحظة في استقلاب المواد المسرطنة للتدخين ناتجة عن تعدد اشكال جينات الانزيمات لازالة السمية هذا التنوع الجيني يظهر انه مرتبط مع مختلف الظواهر السرطانية للحنجرة

يهدف هذا العمل الى وضع تواتر جيني لتعدد الاشكال لجينات الانزيمات السمية من بينها الفلوتسيون-س-ترانسفيراس (ج س ت) و ن-استيل-ترانسفيراز 2 (ن ا ت 2). وتقييم تاثير التبغ و التدخين وخطورته في ظهور السرطان.

اهتمت هذه الدراسة ب66 مريض ميليين بسرطان الحنجرة. قورنت هذه المجموعة ب 100 شاهد سالمين من أي مظهر من المرضيات المسرطنة.

الخبن المتمائل للجينات (ج س ت م 1) و (ج س ت ت 1) و دراسة الاشكال الاليلية للجين (ن ا ت 2) عين بتقنيات البيولوجيا الجزيئية و اقيمت مقارنة التواتر بين المجموعتين باختبار  $2\chi$  و حساب odds ratio (OR) مع جعل فاصل للثقة ب95%.

اضهرت نتائجنا فرقا واضحا بين فيما يخص النمط الجيني (ج س ت م 1) بين مجموعة المرضى و السالمين. هذا الاخير حاضرا مع ازدياد خطورة سرطان الحنجرة

(OR=2.03; IC 95% [1.03-4.37]). هذه الخطورة متزايدة عند الرجال و المستهلكين للتبغ. لا

يوجد ترابط بين (ج س ت ت 1) و هذا السرطان.

في حين وجدنا النمط الجيني (ن ا ت\*2- 6/6) و (ن ا ت\*2- 14/14) اكثر وجودا عند فئة المرضى.

قيمة OR تبين ترابط بين هذا النمط و سرطان الحنجرة (OR = 2.8; IC 95% (1.02-4.4)

(OR=5.11; IC 95% (2.26-8.03) NAT2\*14) مع تزايد الخطورة لدى المدخنين بالنسبة

لعدم المدخنين

بينما وجدنا ان النمط الاليلي ن ا ت\*2- 7 يلعب دورا في الحماية من سرطان الحنجرة.

Nom: Kellil né BENDJEMANA  
Prénom: KATIA

Date de soutenance:  
06/2008

Titre: Etude du polymorphisme des enzymes de détoxification des  
xénobiotiques dans le cancer du nasopharynx

Nature du diplôme: Docteur en sciences. Option : Génétique-biologie moléculaire

**RESUME**

Les différences interindividuelles observées dans le métabolisme des xénobiotiques sont dues aux polymorphismes des gènes codant pour les enzymes de détoxification. Cette variabilité génétique semble être associée à des différences de susceptibilité à certains types de cancers, dont le carcinome du nasopharynx (CNP).

Notre travail vise à établir les fréquences génotypiques des polymorphismes de DNA dans ces gènes de détoxification, chez 66 malades présentant un CNP, comparée à 100 témoins sains. La présence de la délétion homozygote des gènes GSTM1 et GSTT1 est déterminée par PCR multiplex. L'étude du polymorphisme allélique du gène NAT2 utilise l'approche PCR-RFLP. La comparaison des fréquences entre les deux groupes est établie par un test  $\chi^2$  et le calcul des odds ratio (OR) avec un intervalle de confiance à 95%.

Nos résultats montrent une différence significative entre les deux groupes concernant le génotype GSTM1 nul. Celui-ci est associé à une augmentation du risque de CNP (OR = 2.03 ; IC 95% [1.03-4.37]). Cette association est plus importante chez les hommes fumeurs. Pas d'association significative est à noter entre le génotype GSTT1/0 et le carcinome du nasopharynx. Par ailleurs, la fréquence des génotypes NAT2\*6/6 et NAT2\*14/14 est plus élevée chez les patients. Le calcul du OR montre une association entre ces allèles et le CNP (OR = **2.8**; IC 95% (**1.02-4.4**) pour NAT2\*6. OR = 5.11; IC 95% (2.26-8.03) pour NAT2\*14), avec un risque plus accentué pour les fumeurs. L'allèle NAT2\*7 aurait un rôle protecteur contre le cancer du nasopharynx.

---

Mots clés: xénobiotiques, cancer du nasopharynx, enzymes de détoxification, GSTM1, GSTT1, NAT2

---

Laboratoire de recherche: Laboratoire de biologie et génétique moléculaire  
CHU constantine