



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abbes Laghrour -Khenchela
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire



N°:

Thèse de Doctorat
présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat 3ème cycle (LMD)

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière: Biotechnologie Appliquée
Spécialité : Génétique

Intitulé

*Implication du polymorphisme génétique
des enzymes de détoxification dans le
carcinome hépatocellulaire*

Présentée et soutenue par : CHORFI Lamia

Le14/07/2022

Membres du jury :

-Docteur BOUAZZA Lyas	Président	Université Abbes Laghrour-Khenchela
-Professeur BENDJEMANA Katia	Directeur	Université Abbes Laghrour-Khenchela
-Docteur GHARZOULI Razika	Examineur	Université Des Frères Mentouri-Constantine 1
-Docteur LEULMI Nassima	Examineur	Université Abbes Laghrour-Khenchela
-Docteur SEBIHI Fatima Zohra	Invité	Université Abbes Laghrour-Khenchela

2021/2022



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



وَلَسَوْفَ يَعْطِيكَ بِرِكَاتِي وَرِزْقِي



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ ١٤٢٧

Remerciements

الله

AU TOUT PUISSANT ALLAH :

Merci de m'avoir donnée la force et le courage pour accomplir ce travail que gloire et louanges vous soient consacrées pour l'éternité.

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

*Je remercie tout d'abord très chaleureusement le Professeur **BENDJEMANA Katia**, ma directrice de thèse. Pour la qualité de son encadrement, pour sa disponibilité, sa gentillesse, son soutien constant, son professionnalisme, ses conseils qui sont si précieux, qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Ainsi son pragmatisme qui suscite mon profond respect. Veuillez trouver ici, madame, l'expression de ma profonde gratitude et de l'estime que je porte pour vous.*

*Je suis profondément reconnaissante au professeur **KADI Kenza**, qui m'a ouvert les portes du laboratoire de Biotechnologies, Eau, Environnement et Santé et mis à ma disposition tous les moyens disponibles pour la bonne réalisation de ce travail. Ainsi que ces encouragements furent très précieux... Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect et le témoignage de ma reconnaissance.*

Je remercie tout le personnel du centre anti-cancer de Constantine et du centre anti-cancer de Batna pour leurs aides précieuses

Je remercie tout le personnel de l'hôpital Ahmed ben Bella de Khenchela pour leur implication très positive

Je tiens à remercier les membres du jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait de bien vouloir juger cette thèse, j'exprime toute ma reconnaissance aux :

Docteur BOUAZZA Lyas

Docteur GHARZOULI Razika

Docteur LEULMI Nassima

Docteur SEBIHI Fatima Zohra

Je remercie le Docteur Mohamed El-Cherif pour toute l'aide qu'il m'a apportée pour résoudre les problèmes statistiques.

Enfin, à tous les patients et témoins qui ont accepté de participer à notre étude et toutes les personnes qui nous ont aidées et encouragées de près ou de loin, qu'elles trouvent ici l'expression de mes remerciements les plus chaleureux.

Dédicaces

Ce modeste travail aura été un ascenseur émotionnel pour moi, c'est pour cela que je le dédie aux personnes qui ont su me comprendre, me rassurer, et m'aider tout au long de cette période:

*Bien sûr, tout cela n'aurait pas pu être réalisé sans le soutien de ma famille. Merci à **mes parents, mes frères**. Merci de m'avoir apportée, aidée et encouragée durant toutes ces années d'études. Recevez cette thèse en guise de remerciements et témoignage de mon amour*

*A **mes très chers neveux et nièces**: Aymen, Aridje, Ayoub, Amina, Wassim, Anis, Imene, Djawed, Baraa, et en particulier Adel et Miral*

*A **mon mari**, qui a toujours fait bien plus que me soutenir et m'encourager*

*A **ma cousine Zahwa***

*A **mes très chère amies** Bisma, Sabeh, Nassira, Amel, Rathya, Nawel,, Rachida et en particulier ma sœur Fayza. Tous les mots ne sauraient exprimer ma gratitude, mon amour et ma reconnaissance pour l'aide que vous m'avez apportée. Vous m'avez soutenue, réconfortée et encouragée.*

*A **la mémoire de mon oncle Abd-El-Hamid et mon frère Adel**. Mon dieu, ils me manquent tellement. Vous encouragée toujours dans mon cœur. Que Dieu vous accorde sa miséricorde et vous garde en son paradis.*

*A **tout ceux qui m'aiment et ceux que j'aime***

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements et dédicaces	
Liste des abréviations	V et VI
Liste des figures	VII
Liste des tableaux	VIII
Introduction	1
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Le foie	3
1.1 L'anatomie du foie.....	3
1.2 L'histologie du foie.....	4
1.3 Physiologie du foie.....	5
1.4 Pathologie du foie.....	5
2. Le carcinome hépatocellulaire	7
2.1 Définition.....	7
2.2 Epidémiologie.....	7
2.3 Facteurs de risque.....	9
2.3.1 Virus de l'hépatite B.....	9
2.3.2 Virus de l'hépatite C.....	10
2.3.3 Virus de l'hépatite D.....	10
2.3.4 L'exposition à l'aflatoxine B1.....	11
2.3.5 L'alcool.....	11
2.3.6 Stéatose hépatique dysmétabolique non alcoolique.....	11
2.3.7 Diabète de type 2.....	12
2.3.8 L'obésité.....	12
2.3.9 Hémochromatose.....	12
2.3.10 Tabac.....	13
2.3.11 Pathologie auto-immune.....	13
2.3.12 Prise médicamenteuse et autres substances.....	13
2.4 Mécanisme moléculaire de l'hépatocarcinogénèse.....	14
2.4.1 Altérations génétiques.....	14
2.4.1.1 Instabilité chromosomique.....	15
2.4.1.2 Mutations génétiques.....	15
a. La voie de réactivation de la télomérase.....	16

b. La voie WNT / β -caténine.....	16
c. La voie TP53.....	17
d. La voie PI3K/AKT/mTOR.....	17
e. La voie Ras/ MAPK.....	18
f. La voie du stress oxydatif.....	18
2.4.2 Altérations épigénétiques.....	18
2.5 Classification.....	19
2.5.1 Classification moléculaire des CHCs.....	19
2.5.2 Classifications pronostiques.....	20
2.6 Le diagnostic.....	22
2.6.1 Bilans biologiques.....	22
2.6.2 Les moyens d'imagerie.....	23
2.6.3 La ponction biopsie du foie.....	24
2.7 Stratégies thérapeutiques.....	24
2.7.1 Traitement curatif.....	25
2.7.1.1 Transplantation hépatique.....	25
2.7.1.2 La résection chirurgicale.....	25
2.7.1.3 Radiofréquence percutanée.....	25
2.7.2 Traitement palliatif.....	26
2.7.2.1 La chimio-embolisation.....	26
2.7.2.2 La radio-embolisation.....	26
2.7.2.3 Le sorafénib.....	27
3. Les voies de biotransformation des xénobiotiques et les enzymes de détoxication...	28
3.1 Les voies de biotransformation des xénobiotiques.....	28
3.2 Les enzymes de détoxication.....	31
3.2.1 Le cytochrome P450.....	31
3.2.1.1 Historique.....	31
3.2.1.2 Définition, dénomination et classification.....	32
3.2.1.3 Cycle réactionnel du cytochrome P450.....	33
3.2.1.4 Rôle des cytochromes P450.....	35
3.2.1.4.1 Rôle des Cytochromes P450 dans le métabolisme des xénobiotiques...	35
3.2.1.4.2 Rôle des Cytochrome P450 dans le métabolisme des endogènes.....	37
3.2.1.5 Les différents polymorphismes des cytochromes P450.....	38
3.2.1.5.1 Polymorphisme génétique.....	38

3.2.1.5.2 Polymorphisme de régulation.....	39
3.2.1.6 Conséquence du polymorphisme du cytochrome 450.....	39
3.2.1.6.1 Conséquence du polymorphisme sur le métabolisme des médicaments	39
3.2.1.6.2 Conséquence du polymorphisme sur les pathologies et les cancers...	40
3.2.2 Les glutathion-S-transférases.....	40
3.2.2.1 Définition.....	40
3.2.2.2 GSTM1.....	42
a. Structure du gène GSTM1.....	42
b. Polymorphisme du gène GSTM1.....	42
c. Fréquence du génotype GSTM1*0/*0.....	44
d. Structure de l'enzyme GSTM1.....	44
3.2.2.3 GSTT1.....	44
a. Structure du gène GSTT1.....	44
b. Polymorphisme du gène GSTT1.....	45
c. Fréquence du génotype GSTT1*0/*0.....	46
d. Structure de l'enzyme GSTT1 et son rôle.....	47
3.2.2.4 Association du polymorphisme de GST et le cancer.....	47
3.2.3 Les N-acétyltransférases.....	48
3.2.3.1 Historique.....	48
3.2.3.2 Fonction des N-Acétyltransférases.....	48
3.2.3.3 Gène et protéine des N-acétyltransférases.....	50
3.2.3.4 Polymorphismes génétiques des N-acétyltransférases.....	52
3.2.3.5 Relation entre le polymorphisme du gène NAT2 et le cancer.....	55

MATERIELS ET METHODES

1. Population d'étude : Patients et Témoins.....	56
2. Méthodes.....	56
2.1 Extraction de l'ADN génomique.....	56
2.1.1 Préparation du culot de leucocytes (globules blancs).....	56
2.1.2 Elimination des protéines et purification de l'ADN.....	57
2.1.3 Contrôle de la pureté de l'ADN et estimation de sa concentration.....	57
2.1.4 Test de digestibilité.....	58
2.2 Etude du polymorphisme des gènes GSTM1, GSTT1 et NAT2.....	58
2.2.1 Etude des délétions des gènes glutathion-S-transférase par PCR multiplex.....	59
a. Amorces utilisées.....	59

b. protocole d'amplification.....	59
c. Conditions d'amplification sur thermocycler (Biométra).....	59
d. Contrôle et analyse de la réaction.....	60
2.2.2 Etude du Polymorphisme N-acétyltransférase par RFLP.....	60
a. Mise en évidence de l'allèle NAT2*5 et l'allèle NAT2*14.....	61
b. Mise en évidence de l'allèle NAT2*6 et l'allèle NAT2*7.....	62
c. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	63
3 Analyse statistique.....	64

RESULTATS

1 Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée.....	66
2 Analyse du polymorphisme des gènes GSTM1 et GSTT1.....	67
3 Analyse du polymorphisme de gène NAT2.....	70
a. L'allèle NAT2*5.....	70
b. L'allèle NAT2*6.....	71
c. L'allèle NAT2*7.....	73
d. L'allèle NAT2*14.....	74
e. Analyse des associations génotypiques entre les allèles NAT2, ainsi que le phénotype acétyleur lent.....	75
4 Analyse des interactions entre les gènes GSTM1, GSTT1 et le phénotype Acétyleur lent...	77

DISCUSSION.....	79
------------------------	-----------

CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	85
--	-----------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	87
---	-----------

ANNEXES

PUBLICATION SCIENTIFIQUE

RESUMES

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA:	Acide aminé
AAc :	Autoanticorps
AASLD :	American Association for the Study of Liver Diseases
ABP:	arylamine 4-aminobiphényle
AcétylCoA:	Acétylcoenzyme A
ADN:	Acide désoxyribonucléique
αFP:	l'alpha-foeto-protéine
AI:	Acétyleurs intermédiaires
AL:	Acétyleurs lents
ALB:	Albumine
APC:	Adenomatous Polyposis Coli
AR:	Acétyleurs rapides
ARN :	Acide RiboNucléique
ATP7B :	ATPase copper transporting beta
BCLC :	Barcelona ClinicLiver Cancer
BET :	Bromure d'éthidium
BSA :	bovin serum albumin
CHC :	Carcinome hépatocellulaire
CLIP :	Cancer of the Liver Italian Program
CO :	Contraception orale
CTNNB1 :	Catenin (Cadherin-Associated Protein) beta 1
CYP :	Cytochrome P450
DHEA-S :	Déhydroépiandrostérone
dNTPs :	désoxy-nucléotide tri-phosphates
DO :	Densité optique
EASL :	European Association for the Study of the Liver
EDTA:	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EMX:	Enzymes du métabolisme des xénobiotiques
GGT:	Gamma-glutamyl transférase
GST:	Glutathion S-transférases
GSTM:	Glutathion S-transférases Sigma
GSTT:	Glutathion S-transférases Theta
HAP:	hydrocarbures aromatiques polycycliques
HFE :	high Fe
HH:	Hémochromatose héréditaire
IC :	Intervalle de confiance
IGF2 :	Insulin-like Growth Factor 2
IL-6:	Interleukine 6
IMC:	Indice de masse corporelle
IRM:	Imagerie par Résonnance Magnétique
KEAP1:	Kelch-like ECH-associated protein 1
LEF :	Lymphoid Enhancer Factor

MAPK :	Mitogen-activated protein Kinase
mTOR :	Mammalian Target of Rapamycin
NADPH :	nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
NASH:	Stéatose hépatique dysmétabolique non alcoolique
NAT1:	N-Acétyltransférase de type 1
NAT2:	N-Acétyltransférase de type 2
Nrf2 :	Nuclear Factor Erythroid derived-2-Like 2
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
OR :	Odds ratios
PCR :	Polymerase chain reaction
PI3K :	Phosphoinositide-3-Kinase
PTEN :	Phosphatase and Tensin Homolog
RAS:	Rat sarcoma
RFLP:	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
SNP :	Single nucleotide polymorphism
TACE :	Tumor necrosis factor- α -converting enzyme
TAE:	Tris, Acétate, EDTA
TBE:	Tris, acide borique, EDTA
TCF :	T-Cell Factor
TDM :	Tomodensitométrie
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TERT :	Téломérase reverse-transcriptase
TH :	Transplantation hépatique
TNM :	Tumor Nodes Metastasis
TP53 :	Tumor Protein 53
TP:	Prothrombine
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
VHB :	Virus de l'hépatite B
VHC:	Virus de l'hépatite C
VHD :	Virus de l'hépatite D
WNT:	Wingless Integration

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :Segmentation et vascularisation du foie.....	3
Figure 2 :Structure des lobules hépatiques et circulation lobulaire.....	4
Figure 3 :Epidémiologie du cancer primitif du foie à l'échelle mondiale pour les deux sexes confondus selon l'OMS.....	8
Figure 4 :Hépatocarcinogenèse : un processus multi-étapes.....	14
Figure 5 :Principales voies de signalisation altérées par des mutations somatiques ou des délétions de gènes dans le CHC.....	15
Figure 6 :Classification transcriptomique des CHCs.....	20
Figure 7 :Classification Barcelona ClinicLiver Cancer :stades et traitements.....	24
Figure 8 :Biotransformation des xénobiotiques.....	28
Figure 9 :La réaction de monooxygénation de la phase I.....	30
Figure 10 :Répartition des CYP dans le foie humain.....	32
Figure 11 :Représentation simplifiée de l'oxydation d'un substrat par le cytochrome P450...	34
Figure 12 :Cycle catalytique du cytochrome P450.....	35
Figure 13 :Structure et localisation des gènes de la famille du GSTM.....	42
Figure 14 :Mécanisme d'apparition du génotype GSTM1 nul.....	43
Figure 15 :Position et structure du gène GSTT1.....	45
Figure 16 :Structure et localisation des gènes de la famille GST thêta (Chr.22q11.2).....	46
Figure 17 :Réaction de N-acétylation des xénobiotiques par les NATs.....	49
Figure 18 :Activation et inactivation des arylamines par N-acétylation, O-acétylation, et N-,O-acétylation catalysées par la NAT2.....	50
Figure 19 :Représentation schématique du locus NAT humain sur le chromosome 8.....	51
Figure 20 :Structure tridimensionnelle de la NAT2 humaine : diagramme en ruban.....	52
Figure 21 :Profil de PCR multiplex des gènes GSTT1 (480 pb), GSTM1 (215 pb) et l'Alb (380 pb).....	68
Figure 22 :Profil de digestion de l'enzyme TaqI.....	72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :Score de child pugh.....	21
Tableau 2 :Classification Barcelona ClinicLiver Cancer BCLC.....	21
Tableau 3 :Réactions de biotransformation de phase I.....	29
Tableau 4 :Exemples de substrats des principales sous-familles des CYPs chez l’homme..	36
Tableau 5 :Formes alléliques du gène NAT2 humain.....	54
Tableau 6 :Les amorces d’amplification utilisées pour la PCR multiplex.....	59
Tableau 7 :Composants du milieu réactionnel pour l’allèle NAT2*5.....	62
Tableau 8 :Composants du milieu réactionnel pour l’allèle NAT2*14.....	62
Tableau 9 :Composants du milieu réactionnel pour l’allèle NAT2*6.....	63
Tableau 10 :Composants du milieu réactionnel pour l’allèle NAT2*7.....	63
Tableau 11 :Tableau de contingence.....	64
Tableau 12 :Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée.....	66
Tableau 13 :Distribution des génotypes GSTM1 et GSTT1 chez les témoins et les patients.....	69
Tableau 14 :Risque de CHC associé aux GSTM1 et le statut tabagique.....	69
Tableau 15 :Taille des produits d’amplification et de digestion de chaque allèle NAT2	70
Tableau 16 :Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme NAT2*5.....	71
Tableau 17 :Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme NAT2*6.....	73
Tableau 18 :Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme NAT2*7.....	74
Tableau 19 :Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme NAT2*14.....	75
Tableau 20 :Les fréquences des associations génotypiques avec les allèles NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7, NAT2*14.....	76
Tableau 21 :Distribution du phénotype NAT2 acétyleur lent dans notre population et calcul du OR.....	76
Tableau 22 :Calcul du OR pour les acétyleurs lent associé au statut tabagique.....	77
Tableau 23 :Effet de l'interaction entre GSTM1, GSTT1 nul et les acétyleurs lent sur le développement du CHC.....	78

Introduction

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le plus fréquent des cancers primitifs du foie. Au niveau mondial, c'est le cinquième cancer le plus répandu et la troisième cause de décès lié au cancer (El-serag et Rudolph 2007). Son incidence annuelle continue d'augmenter dans de nombreux pays dont l'Algérie avec, une incidence de 0.62 /100000 habitants chez l'homme et 0.37 /100000 habitants chez la femme (Hammouda et Maaraf 2012).

Il survient presque toujours dans le contexte d'une maladie hépatique sous-jacente, généralement une cirrhose. Bien que son étiologie ne soit pas encore complètement élucidé, cette pathologie est le résultat d'interactions conjointes entre différents facteurs tels que le facteur viral par l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC), des facteurs environnementaux comme le tabac et l'alcool et des facteurs génétique puisque de nombreuses études épidémiologiques indiquent que des polymorphismes génétiques jouent un rôle dans le processus cancérogène du CHC (Li et al. 2012; Ladero et al. 2006)

En effet, à la suite d'une exposition à des carcinogènes et des xénobiotiques, des voies de biotransformations en deux phases (phase I et phase II) vont être activées dans le but de former des métabolites faciles à éliminer.

Cependant une hétérogénéité interindividuelle dans le métabolisme de détoxification a été observée. Celle-ci résulterait d'une variabilité dans l'activité des enzymes de biotransformations à la suite de polymorphismes des gènes codant pour ces enzymes de détoxification. Cette variabilité génétique semble être associée à des différences de susceptibilité à certains types de cancers, dont le carcinome hépatocellulaire (CHC).

Les glutathion-S-transférases (GST) et la N-acétyltransférase (NAT) sont les principales enzymes de la phase II de détoxification responsables de la biotransformation des composés cancérogènes tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les amines aromatiques, largement présents dans la fumée de cigarette et dont le polymorphisme est impliqué dans la susceptibilité au cancer.

GSTM1 et GSTT1 sont des gènes de la superfamille des gènes des glutathion-S-transférases (GST) caractérisés par un polymorphisme de délétion. Ce polymorphisme altère leur expression et leur fonction pouvant entraîner une activation des composés cancérogènes. La délétion homozygote de ces gènes (GSTM1-nul et GSTT1-nul) entraîne la perte totale de l'activité enzymatique correspondante, augmentant ainsi la susceptibilité au CHC.

NAT2 intervient dans la détoxification ou l'activation de plusieurs composés carcinogènes tels que les arylamines et les amines hétérocycliques N-hydroxylées du tabac en catalysant la N- ou O-acétylation. NAT2 est très polymorphe. Plusieurs formes alléliques conduisent à des acétylations variables qui peuvent être soit des acétylations lentes ou des acétylations rapides des substances potentiellement toxiques.

Dans ce contexte, notre travail, par le biais d'une étude cas-témoin élargie, vise à étudier le polymorphisme des enzymes de détoxification afin d'évaluer l'influence du facteur étiologique environnementale sur la susceptibilité d'apparition de ce cancer.

Pour cela nous nous sommes assignés les objectifs suivants :

- effectuer une étude épidémiologique à partir d'une enquête réalisée sur notre échantillon pour déterminer les principales caractéristiques et les facteurs de risque spécifiques à notre échantillon.
- Établir le profil des polymorphismes du GSTM1, GSTT1 et NAT2 dans une population de patients et de témoins afin d'évaluer la susceptibilité de cette population au CHC.
- Chercher une association potentielle entre ces polymorphismes génomiques, le carcinome hépatocellulaire et l'influence du tabac.

*Etude
bibliographique*

Le foie

1. Le foie

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme. Il remplit une large gamme de fonctions biochimiques et métaboliques essentielles et vitales, notamment la fonction de régulation, synthèse, stockage et d'épuration (Ganong et al. 2012).

1.1 L'anatomie du foie

Avec une masse qui représente 2% de la masse corporelle totale chez l'adulte (1.5 kg environ, auquel il faut ajouter 800 grammes de sang) le foie est la plus grande annexe du tube digestif. Il se situe sous le diaphragme, dans la partie supérieure droite de la cavité abdominale. De couleur rouge brun, ovoïde et asymétrique, il mesure 28 cm de large sur 16 cm de hauteur et 8cm d'épaisseur (Figure 1).

Entièrement recouvert d'une capsule fibreuse : la capsule de Glisson, il se divise en deux lobes, gauche et droit. Le lobe hépatique droit est le plus volumineux. Ces lobes sont divisés en huit segments composés de lobules fonctionnels (Zeitoun et al. 2017).

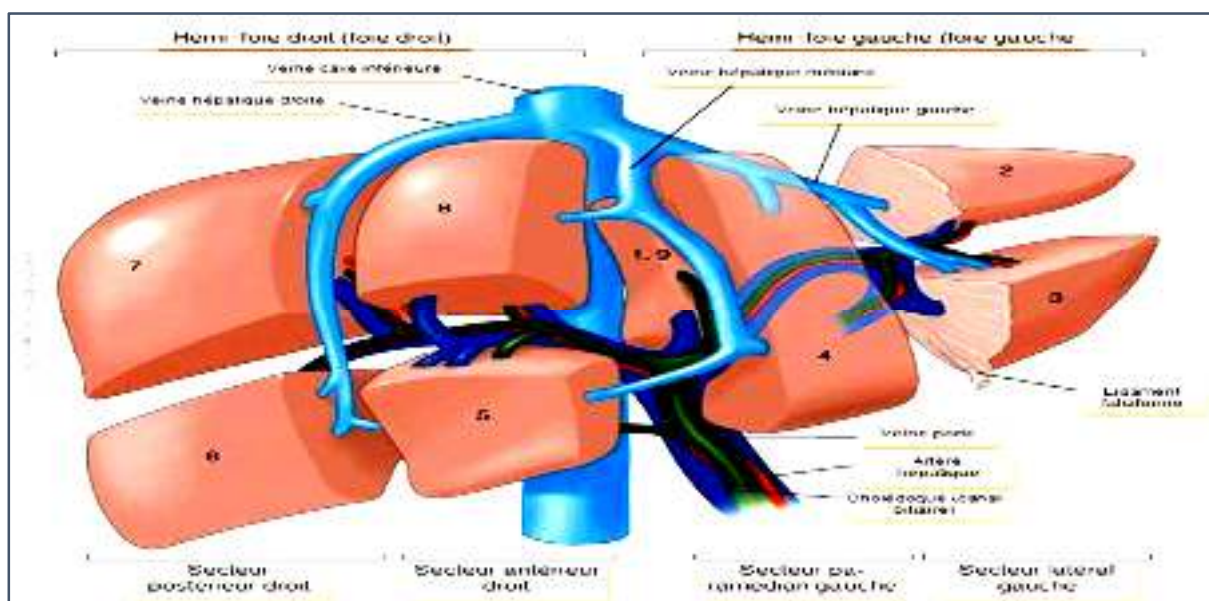


Figure 1: Segmentation et vascularisation du foie (Couinand 1957).

La vascularisation du foie dépend de deux pédicules :

- *Le pédicule sus-hépatique qui comprend trois veines courtes (gauche, moyenne et droite). Elles se jettent dans la veine cave inférieure.
- *Le pédicule hépatique qui contient la veine porte qui fournit 70-80% du débit sanguin total du foie, l'artère hépatique propre apportant les 20-30% de l'apport vasculaire du foie

et 50 % de son oxygène. Elle va se diviser comme la veine porte pour vasculariser les différents segments du foie. Le conduit cholédoque fait aussi partie du pédicule hépatique, il naît de la réunion des deux conduits biliaires droit et gauche (Zeitoun et al. 2017).

1.2 L'histologie du foie

Au plan microscopique, le foie est constitué d'une multitude d'unités structurelles et fonctionnelles individuelles de forme hexagonale appelées «lobules». Ces lobules sont organisés autour d'une veine centrale dite veine centro-lobulaire, et séparés entre eux par des travées de tissu conjonctif, auxquelles on donne le nom d'espace porte ou espace de Kierann, où cheminent des vaisseaux et des canaux biliaires intra hépatiques (Heath et al. 2008).

Chaque lobule est constitué de 20 à 25 hépatocytes, 80% des cellules du foie sont donc des hépatocytes mais il existe d'autres types cellulaires tel que les cellules des canaux biliaires, les cellules endothéliales, les cellules de Kuppfer, les cellules de Ito ou cellules étoilées stellaires pour le stockage de la vitamine A et des lipides, et la synthèse de la matrice extracellulaire autour des cellules endothéliales, des cellules ovales pluripotentes pour la régénération des hépatocytes et des cellules endothéliales et les lymphocytes hépatocytaires (Heath et al. 2008).

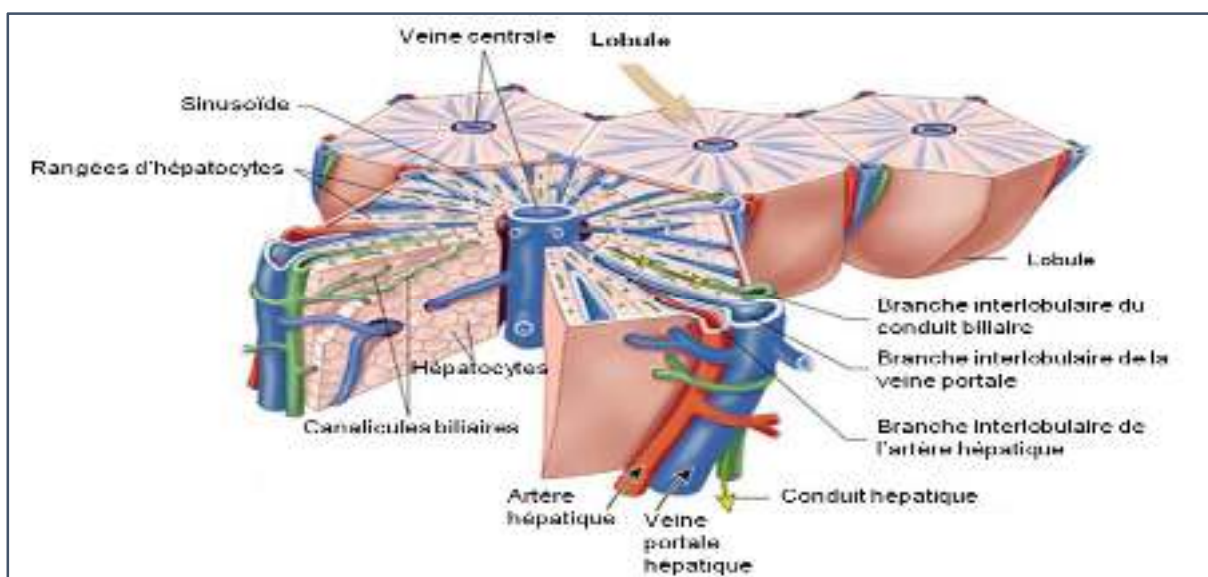


Figure 2: Structure des lobules hépatiques et circulation lobulaire. Coupe d'un lobule hépatique avec la circulation du sang de l'artère et de la veine portale hépatique vers la veine centrale. Les cellules hépatiques produisent de la bile dirigée par l'intermédiaire des canalicules biliaires vers les conduits biliaires (Patton et Thibodeau 2013).

1.3 Physiologie du foie

Le foie est un organe complexe impliqué dans de nombreuses fonctions vitales. Il assure la fonction métabolique glycogénique, régulant la glycémie (glycogénogénèse, glycogénolyse et la néoglucogénèse à partir des lipides). Il synthétise la majeure partie des protéines plasmatiques (albumine, protéines de l'inflammation, facteurs de la coagulation et les protéines du métabolisme de fer (ferritine, transferrine) ou encore les lipoprotéines et les lipides (2/3 du cholestérol de l'organisme est d'origine endogène par néo synthèse hépatique).

D'autres propriétés impliquent le foie dans la production de la bile qui permet l'élimination des produits lipophiles ne pouvant pas être éliminé par le rein.

Le foie est aussi en charge de la dégradation de substances toxiques pour l'organisme qui, rendues non-toxiques, seront éliminées via les selles ou les urines. Les cellules hépatiques éliminent l'alcool et interviennent également dans la dégradation de l'ammoniac.

De la même manière, le foie élimine une partie des substances actives des médicaments pris par voie orale. C'est la fonction de détoxification (Baudin 2017).

1.4 Pathologie du foie

Les atteintes du foie sont multiples et perturbent parfois gravement la santé du corps humain (Baudin 2017). Les pathologies les plus fréquentes sont :

Hémochromatose: maladie héréditaire assez fréquente se traduisant par une surcharge en fer dans plusieurs tissus de l'organisme dont le foie, mais aussi le cœur ou le pancréas.

La maladie de Wilson: une pathologie génétique due à l'accumulation excessive du cuivre dans le foie et dans le système nerveux central. Un dysfonctionnement de la protéine ATP7B, qui permet l'élimination du cuivre dans la bile, en est la cause.

La stéatose: maladie caractérisée par la présence excessive de graisses dans le foie. Elle est la conséquence d'une consommation chronique et abusive d'alcool. Réversible mais favorise l'apparition de cancers hépatiques. La taille du foie augmente et on parle d'hépatomégalie.

La cirrhose: maladie grave du foie résultant d'agressions biochimiques répétées par la consommation chronique d'alcool ou par des virus hépatotropes ou par des maladies auto-immunes. Elle est caractérisée par un remplacement progressif des tissus sains du foie par des nodules structurellement anormaux et du tissu fibreux (fibrose) qui altèrent peu à peu la

fonction hépatique. Le carcinome hépatocellulaire (cancer primitif) se développe habituellement suite à une cirrhose.

L'hépatite: C'est l'inflammation du foie, généralement causée par l'infection d'un virus. D'autres facteurs (alcoolisme, intoxication médicamenteuse, produit chimique) peuvent aussi déclencher une hépatite.

Cancer du foie: Le cancer primitif ou hépatocarcinome prend naissance dans les hépatocytes. Le cancer secondaire, ou métastatique, se propage dans le foie après s'être formé ailleurs dans l'organisme. Cette pathologie va faire l'objet de notre travail.

*Le carcinome
hépatocellulaire*

2. Le carcinome hépatocellulaire

2.1 Définition

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) ou hépatocarcinome est le cancer primitif le plus fréquent du foie (Papoulas et Theocharis 2009). Il survient dans le cadre d'une inflammation chronique du foie étroitement liée à une hépatite virale chronique (hépatite B ou C) (Chayanupatkul et al. 2017), mais aussi à la suite d'une cirrhose et rarement sur un foie sain (Bosch et al. 2004).

Le CHC est un cancer dont l'incidence ne cesse d'augmenter en raison donc de l'augmentation des cas d'infection virale et de cirrhoses autres que virale notamment d'origine métabolique (Bailly Matthieu 2014).

Malheureusement, Le pronostic de ce cancer reste sombre puisqu'il est responsable de 500 000 à 1 million de décès par an dans le monde (Borie et al. 2009). Ceci est principalement dû au fait qu'il est rarement découvert à temps pour entreprendre un traitement curatif. Le taux de survie pourrait positivement évoluer avec l'amélioration de la précocité du diagnostic et de l'efficacité thérapeutique (Whittaker et al. 2010).

L'étiologie multifactorielle de ce cancer incrimine une combinaison de facteurs viraux et d'altération génétiques associée à un profil épigénétique (Zucman-Rossi et al. 2015). Le traitement varie donc en fonction des particularités de l'histologie tumorale, de la taille, de la propagation du cancer et de l'état de santé général (Pons et al. 2005).

2.2 Epidémiologie

L'étude GLOBOCAN 2018 a estimé l'incidence et la mortalité de 36 cancers dans 185 pays, et a montré que le carcinome hépatocellulaire est le cinquième cancer en termes d'incidence chez l'homme et le neuvième chez la femme, avec un nombre de nouveaux cas annuels estimé à 841 080 dans le monde (596 574 chez l'homme et 203 426 chez la femme) (Bray et al. 2018). Ces chiffres sont en augmentation par rapport à l'étude GLOBOCAN 2008 qui avait estimé l'incidence du CHC à 748 000 nouveaux cas annuels (Ferlay et al. 2010). Il s'agit de la première cause de mortalité chez les patients cirrhotiques et le 4ème cancer le plus meurtrier (Park et al. 2015), avec 782 000 décès en 2018 (Bray et al. 2018).

La répartition en fonction du sexe montre que ce cancer affecte plus les hommes que les femmes, avec un taux de 3.2% chez les hommes et de 2.0% chez les femmes (Canada 2013). Les raisons de cette dominance masculine ne sont pas clairement connues, mais elle serait due à une différence d'exposition aux facteurs de risque ainsi que l'implication de facteurs hormonaux.

En effet, tandis que les androgènes favorisent le développement du CHC et le cancer de la prostate, les études montrent, que les œstrogènes joueraient un rôle protecteur (Shi et al. 2014). D'autre part, la production élevée de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 favorise la carcinogenèse chez l'homme (Naugler et al. 2007).

Concernant la répartition géographique, elle est très hétérogène avec trois zones d'incidence. Une zone de haute incidence et des patients relativement jeunes en Asie du Sud-Est et l'Afrique sub-saharienne (Zhu et al. 2016), une zone d'incidence intermédiaire qui regroupe l'Europe du Sud et en Amérique du Nord, et une zone de faible incidence avec des patients ayant une moyenne d'âge de 55 ans en Europe du Nord, l'Amérique du sud et le Canada (Boyle et Ferlay 2005) (Figure 3).

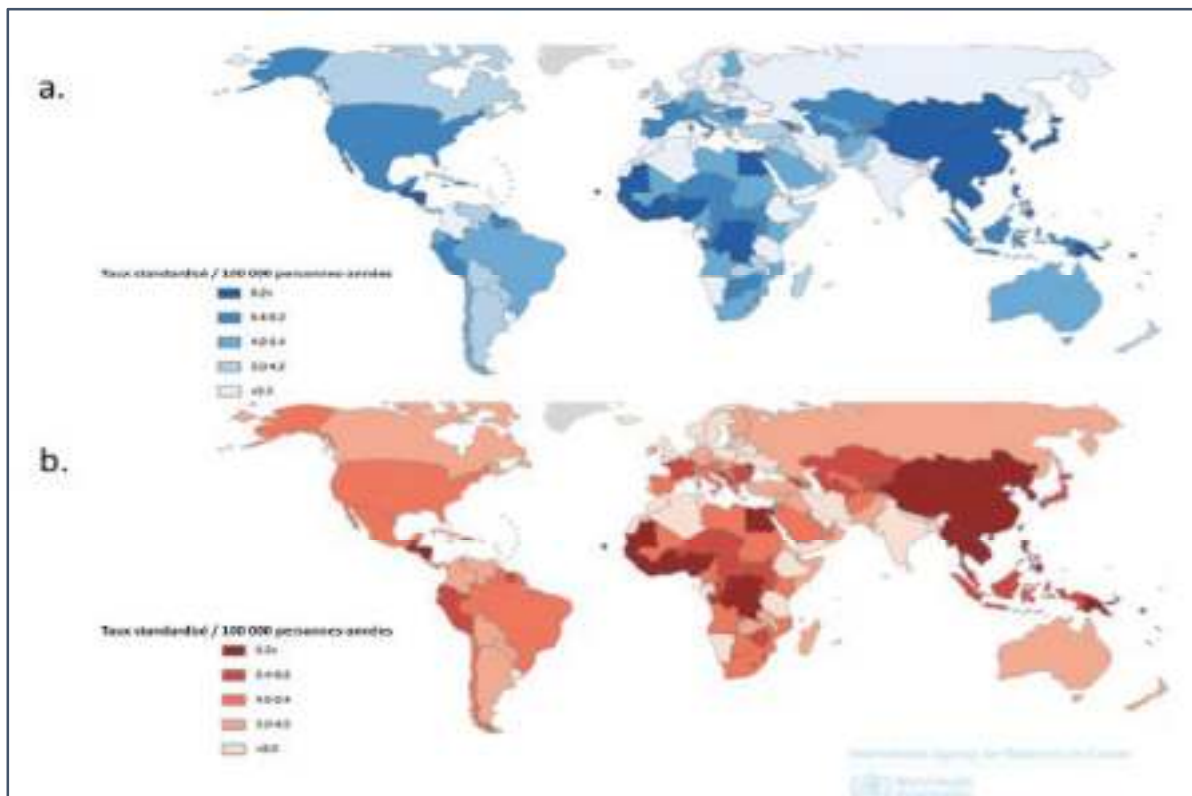


Figure 3: Epidémiologie du cancer primitif du foie à l'échelle mondiale pour les deux sexes confondus selon l'OMS (<http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx>) :

a – incidence ; b – mortalité.

Cette hétérogénéité géographique est étroitement liée à la différence de répartition des facteurs de risque. Ainsi, en zone de forte incidence, le CHC est associé aux infections virales principalement le virus de l'hépatite B, ainsi que l'exposition aux carcinogènes chimiques tel que l'aflatoxine B1. Alors que dans les autres zones à incidence intermédiaire ou faible, le cancer est associé aux maladies chroniques du foie généralement plus évoluées, parvenues au stade de cirrhose, principalement dues au virus de l'hépatite C ou à l'alcool (Ganne-Carrié 2017).

En Algérie, il n'existe pas de chiffre précis sur le CHC. Son incidence est couplée à celle des cancers des voies biliaires. Selon les données du registre des tumeurs d'Alger (Hammouda et Maaraf 2012), l'incidence annuelle standardisée est en nette augmentation avec une incidence pour les hommes de 1.19 et de la femme de 1.14/100.000 habitants entre 1993 et 1995 et 2.4 pour les hommes et 1.3 pour 100 000 habitants pour les femmes en 2007.

En 2012, le cancer du foie et des voies biliaires intra hépatiques est classé au 16eme rang des cancers chez l'homme avec une incidence de 2.1 pour 100000 habitants et au 18eme rang avec une incidence de 1.3/100000 habitants pour la femme. L'incidence brut du CHC seul a pu être calculée durant l'année 2012, avec une incidence de 0.62 /100000 habitants chez l'homme et 0.37 /100000 habitants chez la femme.

Une étude rétrospective publiée en 2016 incluant 196 cas de CHC a également rapporté une prédominance masculine avec un sexe ratio de 1.6 (Chikhi 2016). Parmi les cancers digestifs, il a été classé au 4eme rang chez l'homme après les cancers colorectaux, gastriques et pancréatiques, alors que chez la femme, il est au 5eme rang après les cancers colorectaux, gastriques, vésicules biliaires et pancréatiques (Chikhi 2016).

2.3 Facteurs de risque

Le CHC est un cancer multifactoriel, son étiologie implique essentiellement le facteur viral mais aussi les diverses expositions. Cette hétéro-étiopathologie complique le diagnostic, le pronostic et le traitement.

2.3.1 Virus de l'hépatite B

L'infection chronique au virus de l'hépatite B (VHB) est de loin le plus important facteur de risque de l'hépatocarcinome. Cette association a aussi été suggérée par l'augmentation de l'incidence de ce cancer dans les zones endémique de ce virus (Llovet et al. 2008a). Les patients porteurs chroniques de l'antigène HBs ont environ 100 fois plus de

risque de développer un CHC que les patients non porteurs chroniques de l'Ag HBs (Bruix et Sherman 2005).

Le VHB participe à la carcinogenèse hépatique indirectement en provoquant une cirrhose donnant un cancer ou de façon directe en amorçant des processus mutationnelles (insertion, réarrangement chromosomique, transactivation) (Zucman-Rossi et al. 2015). Ces mutations vont aboutir à l'apparition d'un CHC lié au VHB sur un foie non cirrhotique (Chen et al. 2006).

Le risque de développement du CHC augmente avec l'augmentation de la charge virale B et la durée de l'infection (Forner et al. 2018).

Ainsi, le programme de vaccination des nouveau-nés contre le VHB a Taiwan a permis de réduire spectaculairement l'incidence du CHC chez les enfants taiwanais (Bruix et Sherman 2005). La nécessité de vacciner systématiquement tous les nouveau-nés est actuellement obligatoire en Algérie depuis 2001, il est intégré dans le programme national vaccinal (Chikhi 2016).

2.3.2 Virus de l'hépatite C

Le VHC est maintenant clairement considéré comme un facteur étiologique majeur de la carcinogenèse hépatique. Cette infection est le principal facteur de risque de développement d'un CHC en Europe occidentale, en Amérique du Nord, et au Japon.

De nombreux arguments suggèrent que le VHC pourrait favoriser l'émergence du CHC par des mécanismes différents du VHB puisqu'il ne s'intègre pas dans le génome de l'hôte. Les données expérimentales soulignent qu'en dehors du contexte d'inflammation lié à l'hépatite chronique, il est probable que certaines protéines virales du VHC soient directement incriminées dans l'activation de voies de signalisation (Levrero 2006).

Le risque de développer un CHC chez des patients souffrant de cette infection virale augmente en combinaison avec un abus d'alcool concomitant, une obésité, une résistance à l'insuline et une infection VHB ancienne ou actuelle (Sakamuro et al. 1995).

2.3.3 Virus de l'hépatite D

L'implication du virus de l'hépatite D (VHD) comme facteur de risque du CHC est controversée. Des études suggèrent cependant qu'une co-infection VHB/VHD provoque une évolution plus rapide vers la cirrhose et un risque accru au cancer en comparaison à la mono infection par le virus de l'hépatite B (13% versus 2– 4 %) (Abbas et al. 2015).

2.3.4 L'exposition à l'aflatoxine B1

Divers carcinogènes chimiques, dont l'aflatoxine, favorisent la survenue du CHC. Les aflatoxines B1 sont des mycotoxines hépatocarcinogènes puissantes d'origine naturelle produites par certaines espèces d'*Aspergillus* (*Aspergillus parasiticus* ou *Aspergillus flavus*) qui contamine communément le maïs, le soja et les arachides, particulièrement dans des conditions de climat chaud et d'humidité élevée dans certaines régions d'Afrique subsaharienne et d'Asie orientale. Dans ces régions où la consommation d'aliments contaminés par cette toxine est fréquente, les taux d'incidence du CHC ont tendance à être élevés (El-serag et Rudolph 2007).

D'autre part, les zones géographiques de forte exposition de l'aflatoxine B1 étant celles d'une forte prévalence d'infection par le VHB, leur association majeure très significative avec le risque de développement de ce cancer (Guerrero et Roberts 2005). En effet, l'aflatoxine B1 induirait des mutations du gène suppresseur de tumeur p53, ce qui rendrait les hépatocytes hautement sensibles à l'intégration du VHB, activant ainsi de nombreuses voies oncogéniques prédisposant au développement du CHC (Guerrero et Roberts 2005).

2.3.5 L'alcool

La consommation abusive d'alcool constitue aussi un facteur de risque bien établi du CHC. En effet, L'alcool pourrait être impliqué dans le développement de ce cancer via des mécanismes directs de toxicité sur le génome des hépatocytes par création d'instabilité génétique et des mutations au niveau de certains gènes cibles, mais surtout et bien plus largement par la cirrhose hépatique éthylique (Emerit et al. 2001).

Il n'est pas clair si le risque du CHC est significativement modifié avec la quantité et la durée de consommation d'alcool. Par ailleurs, il a été démontré que chez les patients infectés par le VHC, la consommation d'alcool augmente le risque de développer ce cancer (El-Serag 2012).

Le rôle des polymorphismes génétiques des enzymes impliquées dans la métabolisation de l'éthanol a été avancé pour expliquer le mécanisme par lequel se développe le CHC chez ces consommateurs (Covolo et al. 2005).

2.3.6 Stéatose hépatique dysmétabolique non alcoolique

La Stéatose hépatique dysmétabolique non alcoolique (NASH) est une pathologie dont la définition est histologique associant une accumulation de graisse dans le foie provoquant une inflammation et une dégénérescence des cellules hépatiques (Maeda et al. 2005). Elle survient chez un patient qui n'a pas d'autre maladie hépatique d'origine virale ,

auto-immune, génétique ou toxique et qui n'a pas une maladie alcoolique du foie (Maeda et al. 2005).

La NASH est maintenant clairement associée à l'obésité, à l'insulinorésistance et à l'hyperlipidémie, c'est à dire à un syndrome dysmétabolique. Cette pathologie a longtemps été considérée comme bénigne. Pourtant, certains patients peuvent présenter une véritable inflammation hépatique, exposant à un risque de cirrhose et de CHC (Maeda et al. 2005).

2.3.7 Diabète de type 2

Des études épidémiologiques suggèrent une forte association entre le diabète de type 2 et le CHC. Toutefois, cette association doit être interprétée avec prudence, car le diabète peut être le syndrome métabolique, facteur de risque du CHC, mais peut aussi être un résultat de ce dernier (El-Serag et al. 2004). Cette association augmente avec une durée plus longue de diabète (Hassan et al. 2010). Le mécanisme incriminé est probablement lié à l'hyperinsulinémie présente chez les diabétiques de type 2 qui stimule la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et favorise l'inflammation chronique hépatique et la stéatose. L'hyperglycémie en elle-même, par relargage des acides gras, va engendrer un stress oxydatif et ainsi une inflammation chronique, la prolifération cellulaire et l'apparition de certaines mutations comme celle du gène suppresseur de tumeur p53 (Blanc 2017).

2.3.8 L'obésité

L'effet de l'obésité sur le risque au cancer hépatocellulaire a été examiné dans plusieurs études de cohorte. Ces études ont montrées un risque au CHC de 2 à 3 fois plus élevé chez les malades obèses ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$) que chez les individus à indice de masse corporelle normale (Lauby-Secretan et al. 2016). L'obésité comme le diabète induit une inflammation des cellules du foie par la génération de la peroxydation des lipides (Caldwell et al. 2004).

2.3.9 Hémochromatose

L'hémochromatose héréditaire (HH) est une pathologie caractérisée par une augmentation de l'absorption du fer suite à des mutations par substitution au niveau du gène HFE (high Fe (fer)) (Elmberg et al. 2003), entraînant ainsi une surcharge hépatique en fer par accumulation progressive. Cette accumulation devenant toxique est responsable de la survenue de lésions tissulaires hépatiques, irréversible pour le foie. L'HH non traitée entraînera une fibrose qui évoluera vers la cirrhose pouvant évoluer en un cancer hépatocellulaire (Kowdley 2004).

Cependant ce lien n'est pas seulement dû à l'apparition d'une cirrhose, certains cas de CHC chez des patients souffrant d'HH en absence de cirrhose ont aussi été recensés (Von Delius et al. 2006).

2.3.10 Tabac

Le rôle du tabac n'est plus controversé. Dans des études de cohorte et des études cas-témoins, une consommation tabagique active a été associée à un risque accru de CHC chez les patients cirrhotiques et non cirrhotiques (Ha et al. 2012). La survenue d'un CHC lié au tabac serait associée à une signature moléculaire particulière (Zucman-Rossi et al. 2015).

2.3.11 Pathologie auto-immune

Ces pathologies sont représentées essentiellement par la cirrhose biliaire primitive et les hépatites auto-immunes, caractérisées par une atteinte inflammatoire chronique du foie marquée par la présence d'autoanticorps (AAc) sériques, d'une hypergammaglobulinémie polyclonale et d'une infiltration lymphocytaire périportale pour l'hépatite auto-immune et d'une atteinte lente et progressive des canaux biliaires pour la cirrhose biliaire primitive. Cependant, le risque de développer un carcinome hépatocellulaire existe mais très faible (Addou 2015).

2.3.12 Prise médicamenteuse et autres substances

Plusieurs traitements ont été impliqués dans l'apparition de l'hépatocarcinome. La prise d'oestroprogestatifs pourrait favoriser la survenue d'adénomes qui peuvent secondairement se transformer en CHC. Les récepteurs à l'œstrogène existent dans les cellules hépatiques, et leur expression augmente lors de la survenue de CHC, faisant suggérer une sensibilité hormonale accrue du tissu hépatique néoplasique. Mais les études faites jusqu'à nos jours sont encore non concluantes pour établir une relation entre l'usage de la Contraception orale (CO) et le risque de survenue de CHC. En plus, il n'existe pas d'informations nouvelles sur l'utilisation de doses basses de CO (El-serag et Rudolph 2007; Zhai et al. 2006).

Quelques études ont incriminé certains médicaments comme l'azathioprine, le méthotrexate, le denazol et l'acétate de cyprotérone dans la carcinogénèse hépatique (Leong et Leong 2005).

2.4 Mécanisme moléculaire de l'hépatocarcinogénèse

La carcinogénèse hépatique est un processus multi-étapes complexes prenant naissance, généralement, à la suite d'une hépatopathie chronique. L'hépatite chronique et la cirrhose sont de véritables étapes prénéoplasiques. Ces états pathologiques sont susceptibles d'induire des anomalies moléculaires. En effet, ces lésions traduisent un mécanisme inflammatoire chronique associée à une régénération hépatocytaire excessive et à un stress oxydatif, événements qui précipitent la sénescence répllicative et l'accumulation d'altérations génétiques dans les hépatocytes (Thorgerirsson et Grisham 2002) (Figure 4).

La caractérisation moléculaire associée à l'apparition du CHC permettrait d'envisager des approches diagnostiques et thérapeutiques plus adaptés (Laurent-Puig et Zucman-Rossi 2006).

Il existe donc des altérations génétiques spécifiques de certains facteurs de risque et d'autres qui en sont indépendantes.

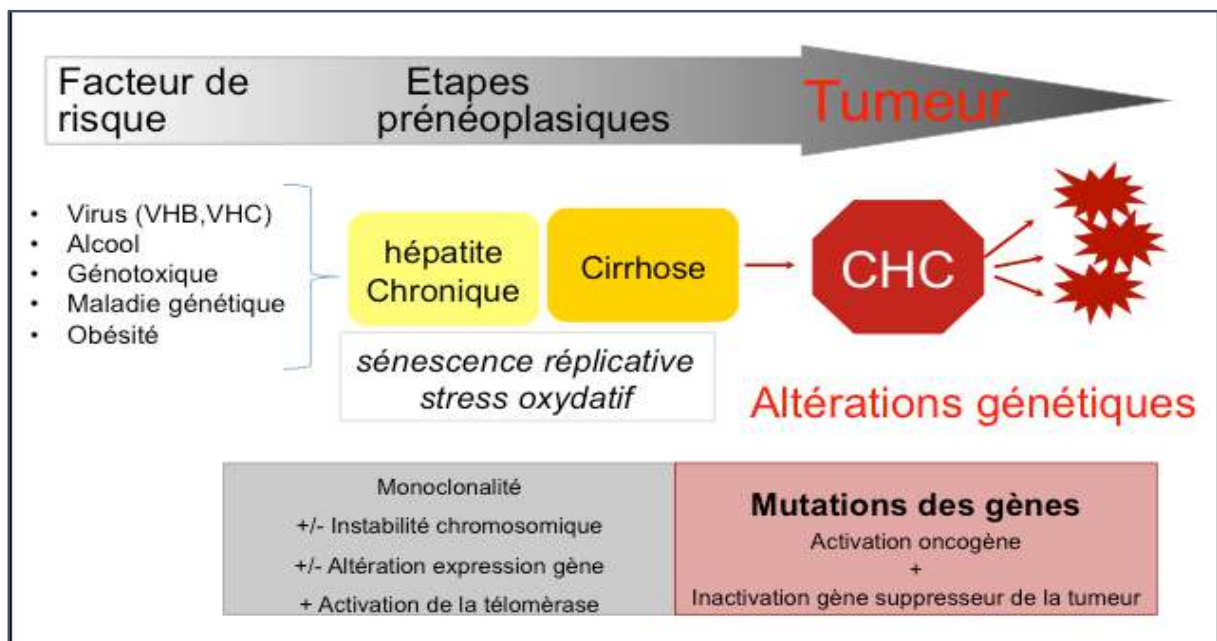


Figure 4: Hépatocarcinogénèse: un processus multi-étapes (Nakagawa et Maeda 2012).

2.4.1 Altérations génétiques

Plusieurs altérations génétiques sont à la base du déclenchement du processus tumorigène de l'hépatocarcinome. Ces altérations irréversibles peuvent être soit des instabilités chromosomiques ou alors des mutations géniques.

a. La voie de réactivation de la télomérase

Les télomères sont des séquences répétées d'ADN situées aux extrémités chromosomiques et essentiels pour protéger de la dégradation induite lors de la division cellulaire. Après chaque division cellulaire, les télomères des cellules somatiques humaines normales se raccourcissent de 50 à 150 paires de base. Un raccourcissement trop important des télomères fait sortir de manière permanente la cellule du cycle cellulaire par un processus de sénescence répllicative, qui évite la tumorigénèse. Dans 85% des tumeurs humaines, cette sénescence est rompue par l'expression de la télomérase, qui est une enzyme qui assure le remplacement des séquences perdues des télomères au cours des divisions cellulaires et peut provoquer une prolifération cellulaire et une cancérisation (Nault et al. 2013). Cette réactivation de la télomérase observée dans plus de 90 % des CHC chez l'homme peut être secondaire à des mutations somatiques du promoteur de TERT (Télomérase reverse-transcriptase) (Nault et al. 2013).

Par ailleurs, ces mutations peuvent coopérer avec les mutations activatrices du gène CTNNB1 de la β -caténine pour promouvoir la transformation maligne (Pinyol et al. 2014).

b. La voie WNT / β -caténine

Les études ont confirmé que la dérégulation de la voie intracellulaire WNT/ β -caténine était la principale voie oncogénique impliquée dans l'hépatocarcinogénèse. Cette voie joue un rôle clé dans la physiologie hépatique, en termes de différenciation, de renouvellement des cellules souches, de transition épithélio-mésenchymateuse, de prolifération, d'adhésion cellulaire et de régénération du foie (Pez et al. 2013). Normalement, la β -caténine est localisée majoritairement au niveau des jonctions cellulaires et l'excès de β -caténine produite est constamment dégradé. L'activation de la cascade de signalisation Wnt/ β -caténine se produit lorsqu'un ligand de la famille Wnt, une glycoprotéine sécrétée, se lie à son récepteur. L'association ligand récepteur stimule une cascade d'événements moléculaires qui conduira à la stabilisation et l'accumulation de β -caténine, lui permettant de se lier aux facteurs de transcription de la famille LEF/TCF et de stimuler la transcription de leurs gènes cibles. L'excès de β -caténine sera dégradé.

Des mutations somatiques activatrices du gène CTNNB1 codant la β -caténine ont été identifiées dans 10 à 32% des CHC (de La Coste et al. 1998). Ces mutations surviennent majoritairement à l'extrémité 5' du gène (exon 3) et induisent l'accumulation de la β -

caténine dans le noyau des hépatocytes. Cette accumulation conduit à une transcription excessive des gènes cible d'où cancérisation (Li et al. 2011).

Cette voie peut également être altérée sans que la β -caténine soit directement mutée. En effet, 10% environ des CHC présentent des mutations inactivatrices des gènes cibles de la β -caténine comme le gène suppresseur de tumeur AXIN 1 et APC (Taniguchi et al. 2002).

c. La voie TP53

Le gène TP53 est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les cancers humains (Olivier et al. 2010). C'est un facteur de transcription qui intervient à l'état normal dans le contrôle négatif du cycle cellulaire, la réparation et la division cellulaire, le contrôle de la stabilité génétique et l'apoptose. Il s'agit d'un véritable gardien du génome par blocage du cycle cellulaire en cas de mutation, donnant ainsi le temps nécessaire à une réparation; ou, lorsque celle-ci est impossible, initier l'apoptose.

L'inactivation du gène p53 est majoritairement due à des mutations faux-sens, et sont localisées dans le domaine de liaison à l'ADN.

Dans le cas du CHC, dans plus de 50% des cas, les mutations de p53 se développent chez les sujets exposés à l'aflatoxine B1, alors que ce chiffre n'est que de 20% chez les sujets non exposés. En effet, l'aflatoxine B1 induit une mutation ponctuelle G747T, qui a pour conséquence l'expression d'une protéine p53 mutée R249S (Hussain et al. 2007). Par ailleurs p53 peut être inactivée par la surexpression de son inhibiteur MDM2 ou par l'inactivation de p19^{ARF}, qui l'active (Jablkowski et al. 2005).

d. La voie PI3K/AKT/mTOR

La voie PI3K / AKT / mTOR est une voie de signalisation intracellulaire jouant un rôle-clé dans l'homéostasie cellulaire par sa fonction de régulation de l'apoptose, de la croissance et du cycle cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse. Elle est fréquemment dérégulée dans les cellules cancéreuses. Dans les CHC cette voie est activée dans 30% à 50% des cas (Zhou et al. 2011).

Dans le tissu normal, cette voie est régulée négativement par le gène suppresseur de tumeur Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) qui est déphosphorylé par les intermédiaires lipidiques de PI3K. Une perte de fonction de PTEN ou des mutations

activatrices de PIK3CA sont à l'origine d'une activation non contrôlée de la voie PI3K / AKT / mTOR (Zucman-Rossi et al. 2015).

e. La voie Ras/ MAPK

La famille des proto-oncogènes RAS comprend trois gènes bien caractérisés HRAS, NRAS et KRAS. Les protéines RAS font partie de la famille des GTPases, et jouent un rôle important dans la transmission de signaux extracellulaires provenant des récepteurs membranaires vers le noyau, aboutissant à la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse (Astrid et Laurent-puig 2010).

Cette voie est activée dans la moitié des CHC précoces et dans presque tous les cas avancés. Les mutations des 3 principaux gènes Ras ont été observées dans moins de 10 % des cas. Ces altérations ont été décrites comme des indicateurs de mauvais pronostic (Villanueva et al. 2007; Qin et Tang 2002).

f. La voie du stress oxydatif

Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid derived-2-Like 2) est le principal facteur de transcription intervenant dans la réponse antioxydante. Une activation de la voie NRF2/KEAP1 est observée dans 5 à 15 % des CHC (Schulze et al. 2015). Lorsqu'il est activé, NRF2 se dissocie de KEAP1, migre vers le noyau et active la transcription de gènes antioxydants ; permettant aux cellules tumorales d'échapper à l'apoptose (Schulze et al. 2015).

2.4.2 Altérations épigénétiques

L'épigénétique, par définition, représente tous les changements héréditaires de l'expression des gènes indépendamment des changements dans la séquence primaire de l'ADN. Ces mécanismes comprennent la méthylation de l'ADN, les modifications des histones, le positionnement nucléosomique et les ARN non codants, surtout l'expression des microARNs, essentiels pour le maintien d'expression des gènes, le développement normal et la survenue d'états pathologiques comme le cancer chez les mammifères (Sharma et al. 2010).

2.5 Classification

2.5.1 Classification moléculaire des CHCs

Les CHCs constituent un groupe de tumeurs hétérogènes, qui diffèrent par les facteurs de risque et les altérations génétiques. Le regroupement de paramètres transcriptomiques, cliniques et étiologiques a donné naissance à une classification moléculaire mettant en corrélation génotype/phénotype, identifiant 6 sous-groupes (notés G1 à G6) de CHC (Boyault et al. 2007). Les principaux déterminants de cette classification des CHC sont l'instabilité chromosomique, l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) et les altérations génétiques (Figure 6).

Ainsi, Les CHCs du sous-groupe G1 présente une infection par le VHB avec un faible nombre de copie d'ADN viral, une surexpression de gènes de l'embryogenèse et le gène IGF2 et sont associés aux mutations AXIN1.

Le sous-groupe G2 inclut des tumeurs infectées par le VHB avec un nombre de copie élevée d'ADN viral, TP53 et PIK3CA mutées, et sont associés aux mutations AXIN1. Les mutations AXIN1 sont commune aux deux sous-groupes G1 et G2.

Les tumeurs du sous-groupe G3 sont mutés pour TP53, non-infectées par le VHB et surexpriment des gènes contrôlant le cycle cellulaire et ayant un mauvais pronostic.

Ces deux groupes G1-G3 présentent une instabilité chromosomique.

Le sous-groupe G4 constitue un groupe de tumeurs hétérogènes avec les adénomes et les carcinomes présentant des mutations du gène TCF1.

Les tumeurs des sous-groupes G5 et G6 sont fortement corrélées aux mutations CTNNB1 et une activation importante de la voie Wnt ainsi que la présence de nodules satellites et une sous-expression de la E-cadhérine dans les tumeurs du sous-groupe G6 (Boyault et al. 2007).

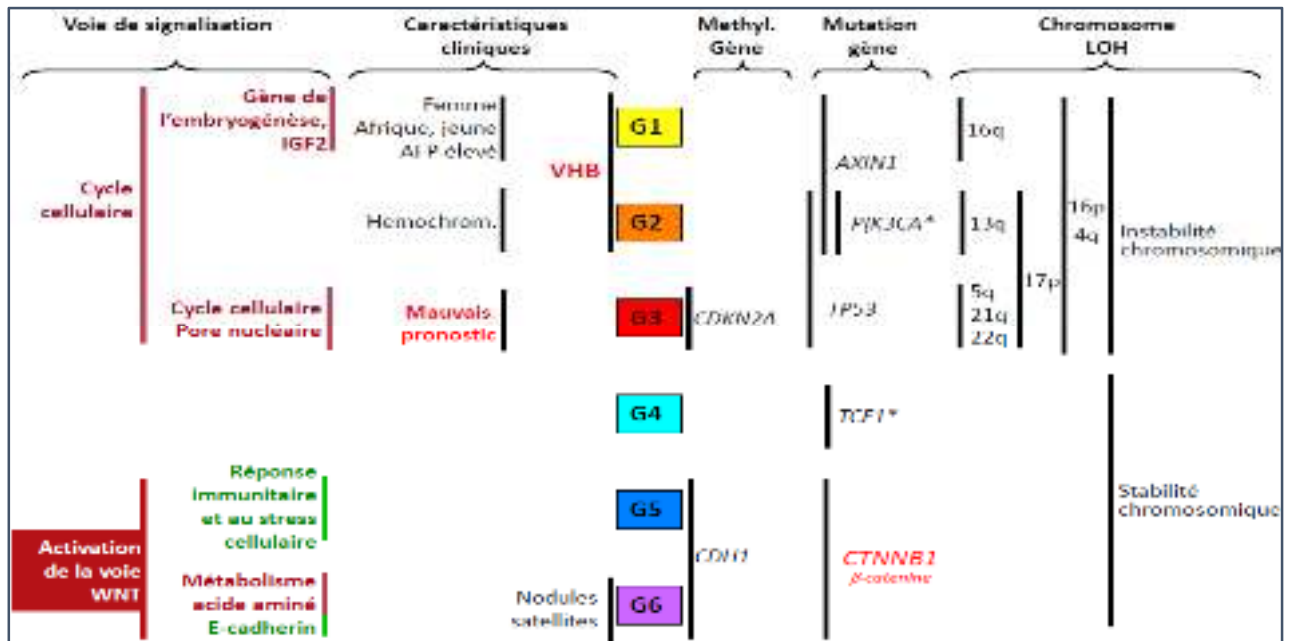


Figure 6: Classification transcriptomique des CHCs (Boyault et al. 2007).

2.5.2 Classifications pronostiques

Le pronostic du carcinome hépatocellulaire est très variable, il dépend non seulement du stade tumoral, mais aussi du degré d'insuffisance hépatique et de la maladie hépatique sous-jacente. Il est donc nécessaire d'utiliser une classification qui combine des critères évaluant la fonction hépatique, l'évolution de la tumeur et l'état général (Dilou et al. 2004).

La classification Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) (Llovet et al. 1999) est actuellement la classification pronostique recommandée par l'EASL et l'AASLD. Cette classification prend en compte les principaux facteurs pronostiques cliniques et biologiques dans le CHC, que sont le statut tumoral (nombre et taille des nodules, présence d'une invasion vasculaire et de lésions extra-hépatiques), la fonction hépatique évaluée par le score de Child Pugh, et l'état général de l'individu défini selon l'échelle OMS. Elle est la seule à relier le stade de la maladie à une indication thérapeutique optimale (Tableau 1 et 2).

Le score de Child adapté par Pugh en 1973 est considéré comme le score pronostique de référence pour prédire la survie des patients cirrhotiques. Le calcul de ce score, est présenté dans le tableau 1 (Pugh et al. 1973).

Tableau 1 : Score de child pugh (Pugh et al. 1973).

Points par critère	1point	2points	3points	Grade
Encéphalopathie	absente	confusion	coma	Grade A : 5-6 points Grade B : 7-9 points Grade C : 10-15 points
Ascite	absente	discrète	abondante	
Albuminémie (g/L)	>35	28-35	<28	
Bilirubinémie (mg/L)	<20	20-30	>30	
Taux de prothrombine (%)	>50	40-50	<40	

Tableau 2 : Classification Barcelona ClinicLiver Cancer BCLC (Llovet et al. 1999).

STADES		OMS	Morphologie tumorale	Fonction hépatique
Stade très précoce	0	0	Unique, <2 cm	Pas d'HTP, bilirubinémie N
Stades précoces	A1	0	Unique, <5 cm	Pas d'HTP, bilirubinémie N
	A2	0	Unique, <5 cm	HTP, bilirubinémie N
	A3	0	Unique, <5 cm	HTP, hyperbilirubinémie
	A4	0	3 lésions, <3 cm	Child-Pugh A-B
Stade intermédiaire	B	0	Multinodulaire	Child-Pugh A-B
Stade évolué	C	1-2	Invasion vasculaire, métastases	Child-Pugh A-B
Stade terminal	D	3-4	Indifférente	Child-Pugh C

HTP = hypertension portale

Stades 0, A et B : tous les critères peuvent être remplis

Stades C et D : la présence d'un seul critère suffit

La classification BCLC permet la distinction entre cinq stades différents, comme le montre le tableau 2.

La classification TNM a été révisée en 1997, elle ne tient compte que des caractéristiques tumorales. L'évaluation de la taille tumorale (T1 à T4) est basée sur le nombre et la localisation des nodules, la taille du plus grand nodule et la présence d'une invasion soit vasculaire, soit d'un organe de voisinage. Les critères pour le statut ganglionnaire et métastatique (N et M) sont identiques à ceux des autres tumeurs solides (annexe1). Cette classification paraît peu appropriée pour guider l'indication thérapeutique dans les CHC avancés car elle ne tient pas compte de la fonction hépatique du malade (Vauthey et al. 2002).

D'autres classifications pronostiques existent mais sont utilisées à moindre échelle. Par exemple, le score de CLIP (Cancer of the Liver Italian Program) qui est un score qui prend en compte le statut tumoral y compris l'invasion vasculaire, la fonction hépatique, mais aussi le taux d' α FP. En revanche, l'état général de l'individu n'est pas pris en compte (Cancer of the Liver Italian Program Investigators 1998).

2.6 Le diagnostic

Le CHC est généralement asymptomatique, de découverte fortuite ou diagnostiqué lors d'un dépistage chez les patients cirrhotiques ou porteurs du VHB non cirrhotiques qui subissent une surveillance régulière.

Ce dépistage se fait principalement à la suite d'un bilan biologique par dosage sérique de l'alpha-foeto-protéine (α FP) (Lok et al. 2010), mais aussi par imagerie qui est non invasifs, bien toléré et suffisamment sensible (échographie, scanner et IRM).

Un diagnostic établi à un stade précoce permet de proposer un traitement à visée curative et d'augmenter la survie (Costentin et al. 2018).

2.6.1 Bilans biologiques

Le signe biologique essentiel du CHC est l'élévation de l' α FP, même si elle est souvent normale en cas de CHC de petite taille. L' α FP est une glycoprotéine fœtale codée par un gène situé sur le chromosome 4. Chez les sujets sains, l' α FP est élevée chez les nouveau-nés et se normalise à 1 an. Cependant l'augmentation de son taux peut ne pas être

spécifique du CHC, puisqu'elle ne s'élève que dans 60 à 80% des cas. Son élévation ne devient significative (supérieure à 200 ng/ml) que dans les tumeurs volumineuses et symptomatiques, et peut-être non spécifique au CHC mais à d'autres tumeurs digestives (Zhang et al. 2004).

Cet examen doit donc être complété par un bilan hépatique complet avec dosage de la bilirubine totale et conjuguée, phosphatases alcalines, GGT, transaminases, prothrombine (TP) et le facteur V, dont l'élévation apparait comme témoin d'un processus néoplasique (Audrey et al. 2015).

2.6.2 Les moyens d'imagerie

L'imagerie joue donc un rôle primordial dans la prise en charge des carcinomes hépatocellulaires, elle permet de faire un dépistage de lésion hépatique, notamment de CHC afin de poser un diagnostic et proposer un moyen thérapeutique.

L'échographie abdominale est la meilleure méthode d'imagerie pour le dépistage du CHC ayant prouvé son efficacité. Elle est caractérisée par une très grande acceptabilité, absence d'effets secondaires, coût peu élevé et une très faible sensibilité et spécificité. Cependant cette technique reste moyennement performante pour la détection de lésion de petite taille mais demeure toutefois utile lors de la surveillance de cirrhose pour différencier un nodule de régénération d'un petit carcinome hépatocellulaire (Maaroufi 2015).

La TDM abdominale est à l'heure actuelle un examen courant d'évaluation en vue de l'appréciation de la taille tumorale, la forme, le volume tumoral et la structure du foie. L'examen doit toujours être réalisé après une échographie abdominale, qui oriente la technique tomodynamométrique. Elle permet de réaliser une bonne caractérisation tumorale avec une meilleure précision diagnostique (Maaroufi 2015).

Une imagerie plus performante peut alors être recommandée à partir d'un scanner ou d'une IRM. Ce dernier permet de lever le doute dans de nombreuses situations non résolues par l'échographie et le scanner (Maaroufi 2015).

2.6.3 La ponction biopsie du foie

Le diagnostic de CHC ne peut être réellement confirmé qu'à la suite d'une biopsie. En pratique, une biopsie « négative » n'élimine pas le diagnostic de CHC, car il est parfois difficile de différencier un nodule dysplasique d'un CHC, et cela peut nécessiter l'utilisation de marquages complémentaires immuno-histochimique spécifiques (Tremosini et al. 2012). Cependant, la biopsie peut être contre indiquée dans certains cas (ascite, troubles de la coagulation, certaines localisations tumorales) ou le diagnostic radiologique sera alors privilégié.

2.7 Stratégies thérapeutiques

La stratégie thérapeutique est guidée par la classification de BCLC (Barcelona ClinicLiver Cancer) qui prend en compte les trois paramètres décisionnels à savoir l'état général du patient, la fonction hépatique et le stade tumoral. Un traitement curatif ou alors palliatif sera proposé (Figure 7).

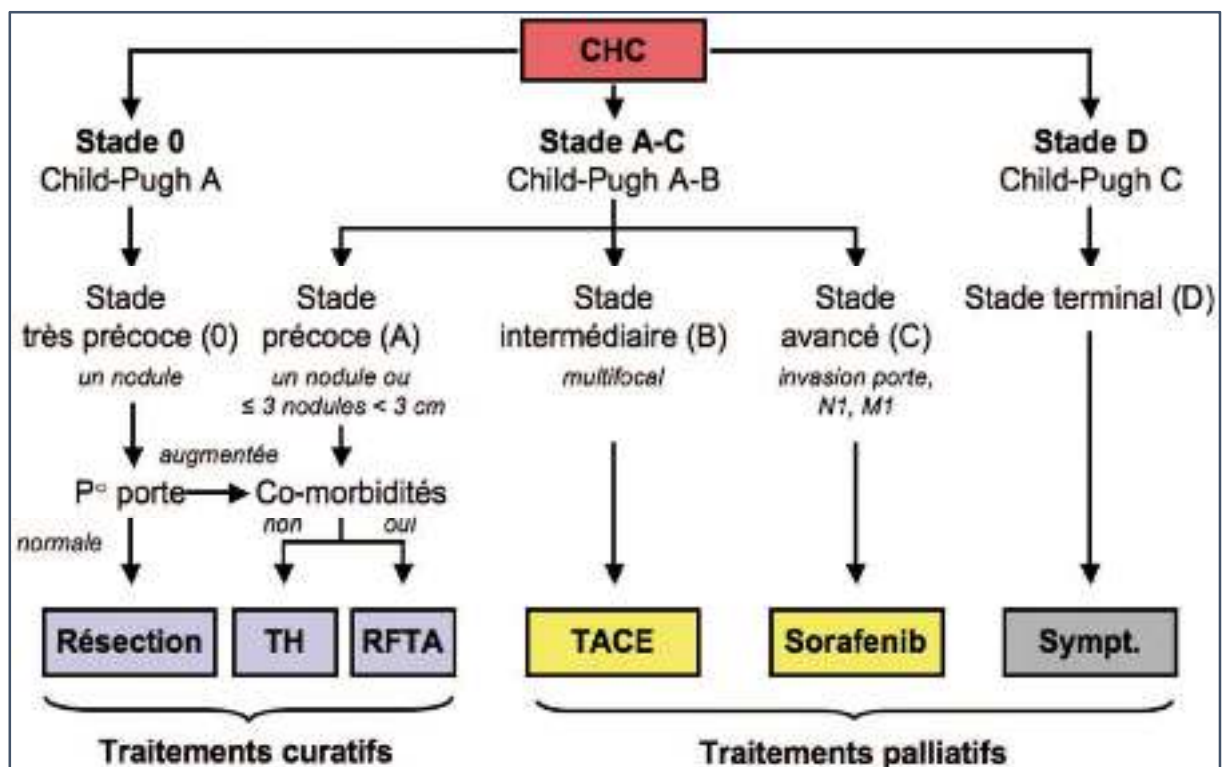


Figure 7: Classification Barcelona ClinicLiver Cancer: stades et traitements (Llovet et al. 2008a).

2.7.1 Traitement curatif

2.7.1.1 Transplantation hépatique

C'est le traitement de choix à visée curative du CHC sur foie cirrhotique qui a pour avantage de traiter également la maladie hépatique chronique sous-jacente lorsqu'elle est présente. Cependant, en raison de la disponibilité restreinte des organes, la sélection des patients doit être stricte pour obtenir la meilleure espérance de vie. Il convient d'utiliser au mieux les greffons disponibles en proposant une transplantation chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire à faible risque de récurrence tumorale (Mazzaferro et al. 1996).

2.7.1.2 La résection chirurgicale

La résection chirurgicale ou hépatectomie partielle est un traitement de choix, surtout pour les CHC qui se développent sur foie sain non cirrhotique car elle autorise un volume de foie restant plus important que sur foie cirrhotique. Seuls les patients ayant un seul nodule, une fonction hépatique «excellente» et pas d'hypertension portale semblent pouvoir bénéficier de la résection. Chez les patients cirrhotiques, le risque de mortalité lié à l'opération est plus élevé. C'est pourquoi la chirurgie ne peut être proposée qu'à une minorité de patients (Pache et al. 2010).

2.7.1.3 Radiofréquence percutanée

Elle fait partie des techniques d'ablation thermique percutanée du CHC consistant à l'application, directement en intra-tumorale, d'un courant sinusoïdal (420-500kHz). Cette technique s'effectue sous anesthésie générale et échoguidé ou scannoguidé.

La radiofréquence est considérée aujourd'hui comme la technique de choix, car elle permet d'obtenir dans presque 100% des cas une nécrose complète des lésions de petites tailles. Elle nécessite également une sélection des patients du fait de ses nombreuses contre-indications : ascite, trouble de l'hémostase, proximité colique et risque de perforation et de la convergence biliaire (risque d'abcès hépatique) (Peng et al. 2013).

2.7.2 Traitement palliatif

Lorsqu'un traitement curatif n'est pas réalisable, du fait d'un volume tumoral très important ou d'une diffusion métastatique du CHC, plusieurs thérapies visant au moins à la stabilisation ou le ralentissement de la croissance tumorale peuvent être réalisées.

Ces traitements s'adressent donc aux patients stade B et C de BCLC.

2.7.2.1 La chimio-embolisation

La chimio-embolisation intra-artérielle est le traitement recommandé chez les patients atteints d'un CHC de stade intermédiaire de la classification BCLC, à savoir une tumeur de grande taille ou multifocale avec une fonction hépatique correcte, sans thrombose portale, ni métastase. Elle associe, l'injection dans l'artère hépatique vascularisant la tumeur d'un agent de chimiothérapie couplé à un vecteur, suivie d'une embolisation artérielle afin de piéger le produit de chimiothérapie au sein de la tumeur. C'est le traitement palliatif le plus utilisé (Bruix et al. 2004).

2.7.2.2 La radio-embolisation

La radio-embolisation à l'Yttrium90 est une injection intra-artérielle hépatique de microsphères chargées d'Yttrium 90 radioactif, permettant de réaliser une irradiation interne sélective au CHC tout en préservant le parenchyme non tumoral (Salem et al. 2011).

Cette radio-embolisation s'adresse tout particulièrement à:

- des patients stade B de BCLC mauvais candidats pour une chimio- embolisation;
- des patients stade C de BCLC contre-indiqués à une chimio-embolisation en raison d'une thrombose portale (Salem et al. 2010);
- des patients progressant après chimio-embolisation ou Sorafénib.

2.7.2.3 Le sorafénib

Le sorafénib est le traitement palliatif de première ligne du CHC avancé (BCLC stade C). Cette thérapie ciblée à action anti-angiogénique (anti-VEGF et anti tyrosine kinase) est administré par voie orale, chez des patients ayant une fonction hépatique préservée, et en bon état général (European Association For The Study Of The Liver 2018; Llovet et al. 2008b).

*Les voies de
biotransformation et les
enzymes de détoxification*

3. Les voies de biotransformation des xénobiotiques et les enzymes de détoxication

3.1 Les voies de biotransformation des xénobiotiques

L'homme est de plus en plus agressé dans son environnement par des substances exogènes de nature diverses tel que les additifs alimentaires, les herbicides, les pesticides, dérivés des combustibles domestiques et industriels, solvant et colorant, les médicaments, les diverses polluants, très souvent rassemblé sous le terme de xénobiotiques.

La plupart de ces xénobiotiques sont hydrophobes et difficiles à éliminer par l'organisme. Afin d'éviter leur accumulation pouvant être toxique pour les cellules, et de faciliter leur excrétion, les organismes vivants ont développé, au cours de l'évolution, des systèmes de biotransformations ou de détoxication (Beaune 1986). Cette biotransformation se déroule dans plusieurs sites de l'organisme comme les poumons, les reins et les intestins, mais le foie étant fonctionnellement le plus important, constitue le principal site de la biotransformation des xénobiotiques et essentiellement au niveau des hépatocytes (Meeks et al. 1991).

Le processus de détoxication est un ensemble de réactions biochimiques répartie en deux phases principales, phase I et phase II, grâce à l'intervention d'enzymes spécifiques permettant d'éliminer les groupements hydrophobes et de neutraliser les groupements réactifs des xénobiotiques (Figure 8).

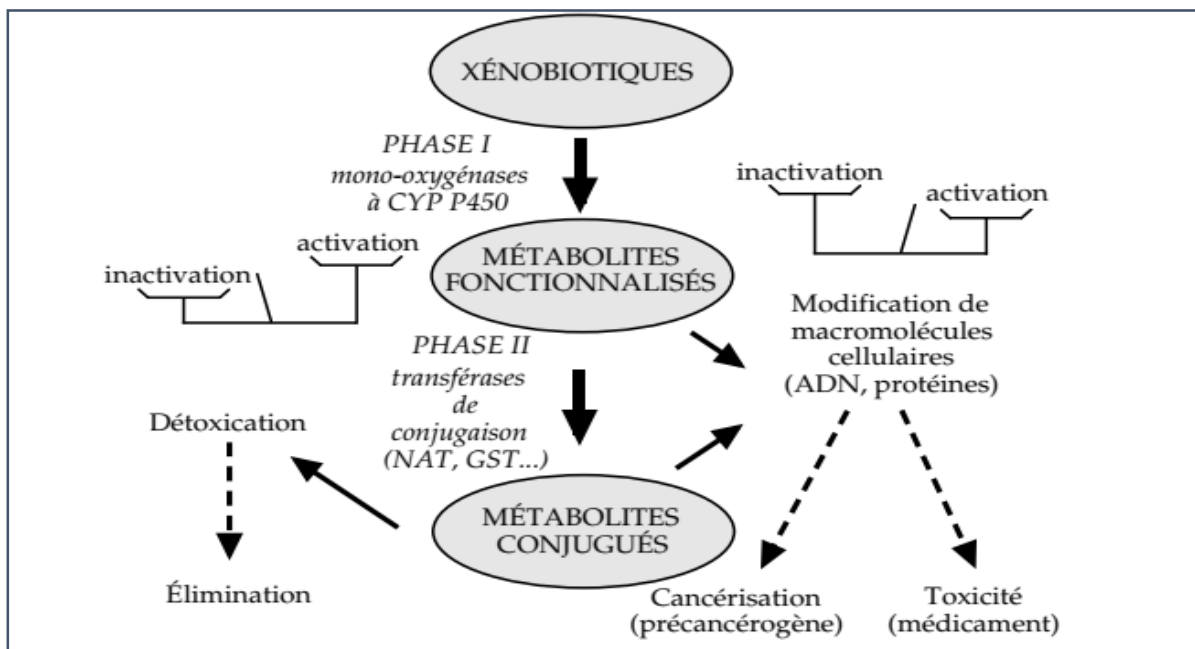


Figure 8: Biotransformation des xénobiotiques.

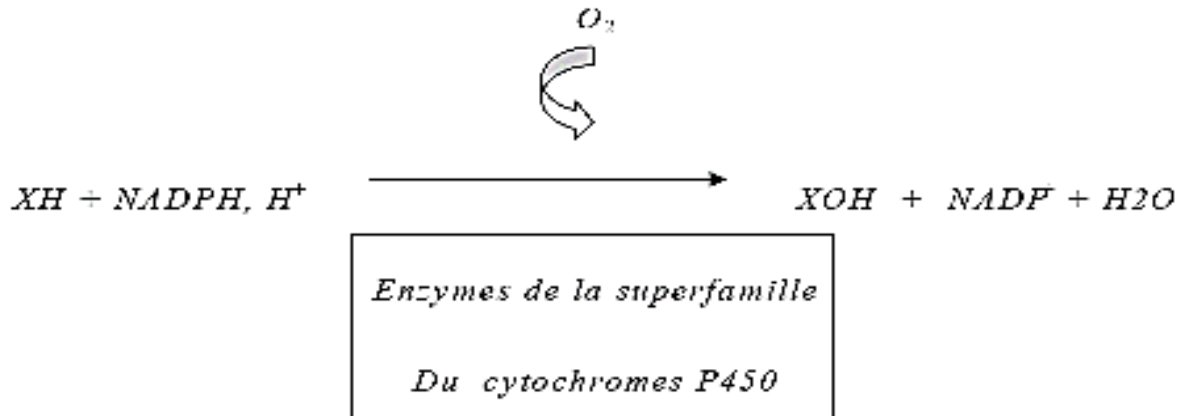
CYP : mono-oxygénase à cytochrome P450 ; NAT : N-acétyltransférase ; GST : glutathion-S-transférase.

Les réactions de la phase I sont des réactions de dégradation et de fonctionnalisation représentées essentiellement, par des oxydations microsomales hépatiques (Tableau 3). Cette phase permet l'introduction de groupement fonctionnel qui a pour rôle de rendre la molécule plus polaire et plus hydrophile qu'au départ.

Tableau 3: Réactions de biotransformation de phase I.

TYPE DE REACTION	ENZYMES	SUBSTRATS
Oxydation	Cytochrome P450	Xénobiotiques Composés endogènes
	Alcool déshydrogénases	Alcools
	Aldéhyde déshydrogénases	Aldéhydes
	Flavine Monooxygénases	Amines tertiaires
	Monoamine oxydase	Amines
Réduction	Cytochrome P450	Xénobiotiques Composés endogènes
	Alcool déshydrogénases	Aldéhydes, cétones
	Carbonyl réductases	Aldéhydes, cétones
Hydrolyse	Estérases	Esters
	Peptidases	Peptides
	Epoxyde hydrolases	Hydrocarbure aliphatiques polycycliques (HAP)

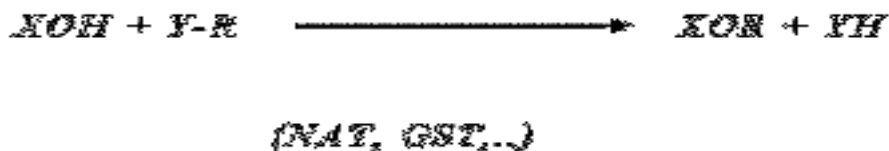
Il s'agit donc de mono-oxygénation essentiellement catalysée pour plus de 95% des oxydations par les enzymes de la superfamille des cytochromes P450 et aboutissant à un substrat plus hydrophile en induisant un groupement polaire grâce à l'oxygène atmosphérique (Destreicher et al. 1999) (Figure 9).



XH: xénobiotique hydrophobe
 XOH: composé intermédiaire hydrophile

Figure 9: La réaction de monoxygénation de la phase I.

Les enzymes de phase II, catalysent la conjugaison du xénobiotique ou de son métabolite préalablement produit par le processus de la phase I, à une molécule endogène. Cette phase succède donc aux premières oxydations insuffisantes à éliminer le xénobiotique. La phase II nécessite l'intervention de transférases microsomales ou cytosoliques qui augmentent le plus souvent l'hydro solubilité du substrat et aboutissent en général à des composés biologiquement inactifs selon la réaction suivante :



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-acétyltransférase utilise l'Acétyle CoA pour conjuguer des arylamines.

Les produits issus du métabolisme de la phase II sont généralement moins toxiques que le produit initial, mais dans certains cas peu courants, ces réactions n'aboutissent pas à la détoxification du composé qui devient toxique. Ce sont les bavures d'un système très efficace pour transformer les xénobiotiques en métabolites non réactifs faciles à éliminer (Beaune 2001).

Ainsi un xénobiotique peut être transformé en métabolites non toxiques ou en métabolites toxiques, fortement réactifs pouvant former des adduits sur l'ADN ayant pour conséquences l'apparition de mutation cancérogènes. L'équilibre entre ces voies dépend de la nature et de l'expression de ces enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) (Beaune 2001).

3.2 Les enzymes de détoxification

3.2.1 Le cytochrome P450

3.2.1.1 Historique

Il y a quelques milliards d'années les enzymes P450 ont vraisemblablement eu une origine génétique commune chez la plante et l'animal. Initialement les systèmes P450 devaient aider au maintien de l'intégrité de la membrane cellulaire, ceci par leurs contributions au métabolisme des stéroïdes. Lors de l'apparition des premiers herbivores, les plantes produisirent des toxines pour survivre. Les animaux, pour éliminer ces substances chimiques élaborèrent un système de détoxification : ainsi le système P450 se développa (Jefferson et Greist 1996).

La présence d'un pigment capable de lier le monoxyde de carbone a été observée pour la première fois dans les années 1960. Les études du métabolisme ont permis de caractériser leur rôle principale dans la métabolisation des composés endogènes tels que les stéroïdes, les acides gras et les vitamines, ainsi que leur fonction dans la détoxification des substances exogènes ou des xénobiotiques dans le foie tels que les médicaments (Omura et Sato 1962; Klingenberg 1958).

L'abréviation P450 provient de la spectrophotométrie. Ces enzymes sous forme de pigments dans des fractions microsomales hépatiques et à l'état réduit et complexées avec le monoxyde de carbone, ont un maximum d'absorbance à une longueur d'onde de 450 nm. Cette découverte a été faite par deux japonais en 1963, SATO et OMURA (Lamotte 2002).

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 cytochrome P450 étaient d'un même gène ancestral s'étant différencié au cours de l'évolution phylogénétique en de très nombreux isoenzymes. Cependant, seule une

dizaine d'entre elles sont majoritairement impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques (Gueguen et al. 2006).

3.2.1.2 Définition, dénomination et classification

Les cytochromes P450 (*CYP450*) sont localisés principalement dans le réticulum endoplasmique lisse des hépatocytes et dans les entérocytes de l'intestin grêle, et en plus faible quantité dans d'autres tissus comme le rein, le poumon, le cerveau et la peau.

Plus de 200 enzymes *CYP450* existent dans la nature dont au moins 40 ont été répertoriées chez l'homme et exprimés de façon largement prédominante dans le foie (Pessayre 1993; Meeks et al. 1991) (figure 10).

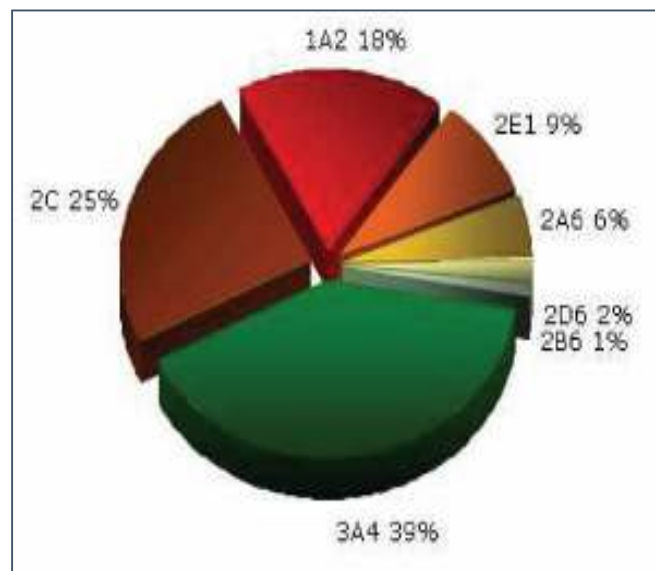


Figure 10: Répartition des CYP dans le foie humain (Guengerich F.Peter 2005).

Cette enzyme est constituée d'une chaîne polypeptidique simple ou apoprotéine et d'un groupement prosthétique, associé à un atome de fer. C'est donc une hémoprotéine contenant une molécule d'hème par molécule d'apoprotéine. La molécule d'hème se trouve attachée à l'apoprotéine par une liaison de coordination établie entre le fer de l'hème et un résidu cystéine de l'apoprotéine.

La nomenclature actuelle des cytochromes P450 tient compte de leur appartenance à des familles et des sous familles grâce au pourcentage d'analogie dans la séquence d'acides

aminés, les similitudes en termes d'activité enzymatique et de régulation ne sont pas prises en compte :

-S'il y a moins de 40% d'analogie dans la séquence d'acides aminés de deux cytochromes P450, ils seront classés dans des familles différentes.

-Si le pourcentage d'analogie dépasse 55% alors les deux cytochromes appartiendront à la même famille.

On dénombre actuellement chez l'homme, aux moins 17 familles différentes de cytochromes P450s incluant 42 sous familles organisées en 49 gènes hautement similaires et à localisation chromosomique différentes, et 15 pseudogènes (Lamotte 2002).

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 la sous famille et enfin un chiffre arabe désignant le gène. La lettre P après un gène désigne un pseudogène. Par exemple pour le *CYP3A4* : *CYP* désigne le cytochrome P450, 3 la famille, A correspond à la sous famille, 4 précise l'isoforme (Mathis 2012).

3.2.1.3 Cycle réactionnel du cytochrome P450

Le cytochrome P450 est un système multi enzymatique à fer qui est capable d'oxyder une substance en lui transférant directement un atome d'oxygène à partir de l'oxygène moléculaire. Le fonctionnement du cytochrome P450 nécessite la présence d'enzymes associées, tel que la réductase, qui prélève deux électrons à une flavoprotéine réduite pour les transférer au substrat qui sera oxydé. La flavoprotéine elle-même reçoit ses électrons du NADPH, H⁺.

Les changements du degré d'oxydoréduction du fer sont à l'origine des biotransformations catalysées par l'enzyme. Le fer se présente sous forme d'ion ferreux (Fe²⁺) à l'état réduit, et d'ion ferrique (Fe³⁺) à l'état oxydé (Meeks et al. 1991). La liaison du substrat à la forme ferrique de l'enzyme dans la poche hydrophobe de l'apoprotéine mène à la réduction à l'état ferreux suite au transfert d'un électron via la réductase; le Fe²⁺ servira à la fixation de l'oxygène (O₂) (Beaune 1993) selon le schéma de la figure 11.

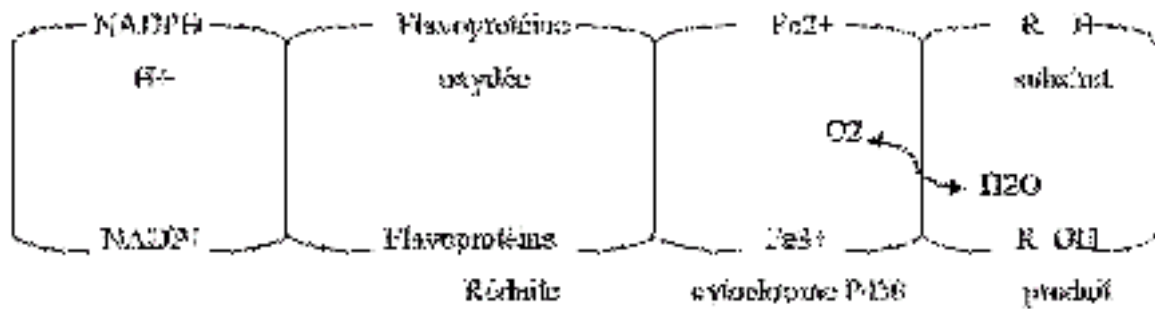


Figure 11: Représentation simplifié de l'oxydation d'un substrat par le CYP450.

L'insertion de l'atome d'oxygène dans le substrat est donc l'aboutissement de la réaction d'hydroxylation catalysée par le cytochrome P450 comme le résume la réaction suivante:



Le cycle d'oxydation du cytochrome P450 comprend plusieurs événements en cascade conduisant simultanément à la libération du produit et à la régénération complète de l'enzyme comme le montre la figure 11 :

- Tout d'abord, il se forme un complexe entre une molécule (substrat endogène ou exogène) et le fer à l'état ferrique de l'hémoprotéine.
- Ce complexe est ensuite réduit par un électron fourni par le NADPH grâce à l'intervention d'un coenzyme NADPH-P450 réductase. Le fer passe donc à l'état ferreux.
- L'oxygène moléculaire se fixe sur le fer ferreux sur la sixième liaison du fer hémique.
- Incorporation d'un deuxième électron apporté par le NADPH par l'intervention soit du coenzyme NADPH CYP réductase, soit par NADPH-cytochrome b5 et réduction de ce nouveau complexe. Il y a alors formation d'un hydroperoxyde.
- La molécule d'oxygène est ensuite transférée sur la molécule à métaboliser (Lin et Lu 1998).

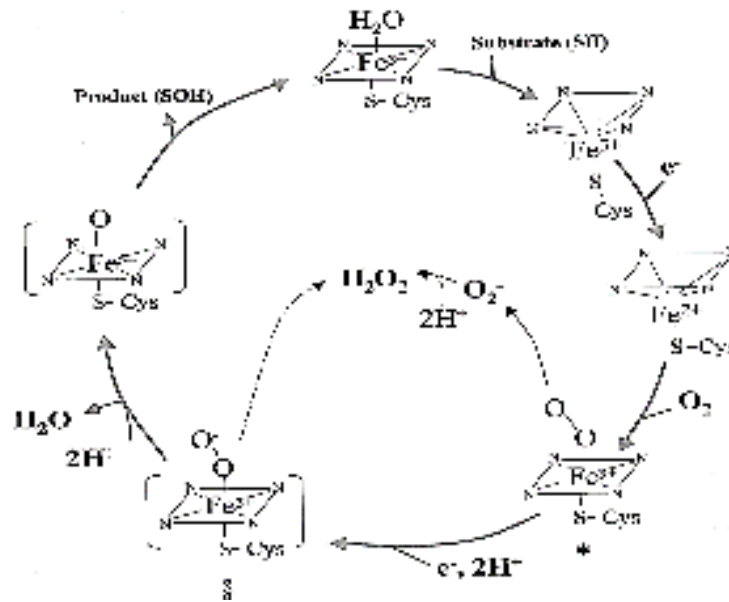


Figure 12: Cycle catalytique du cytochrome P450 (Fleming 2001).

3.2.1.4 Rôle des cytochromes P450

Les cytochromes P450 ont deux domaines d'action essentiels dans les biotransformations de substances endogènes et exogènes. D'une part, ils détoxifient l'organisme des molécules étrangères (xénobiotiques) à celui-ci en les oxydant. Et d'autre part, Ils interviennent dans la conversion de molécules endogènes. La variété des propriétés catalytiques provient de la variété de la partie protéique du cytochrome P450 (Lamotte 2002).

3.2.1.4.1 Rôle des cytochromes P450 dans le métabolisme des xénobiotiques

Les cytochromes les plus souvent impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques sont les *CYP1A2*, *CYP2A6*, *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP3A4* (Gueguen et al. 2006). Ces enzymes représentent plus de 90% de toutes les enzymes P450. Les deux cytochromes les plus abondants sont le *CYP2C* et le *CYP3A*. Les cytochromes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques montrent des spécificités larges et croisées pour de nombreux substrats. En effet, un *CYP* peut métaboliser plusieurs substrats et un substrat peut être métabolisé par plusieurs *CYP*. Le tableau 4 (Gueguen et al. 2006) présente quelques substrats des P 450 chez l'homme.

Tableau 4: Exemples de substrats des principales sous-familles des CYPs chez l'homme.

<i>CYPs</i>	SUBSTRATS
<i>CYP1A1</i>	Benzo(a)pyrène, autres hydrocarbures polycycliques aromatiques
<i>CYP1A2</i>	Phénacétine, aflatoxine B1, caféine, arylamines hétérocycliques, théophylline, acétaminophène, imidazole, imidazoquinoline, aminofluorène, chlorzoxazone
<i>CYP2A6</i>	Coumarine
<i>CYP2B6</i>	Coumarine
<i>CYP2C9</i>	Méphénytoïne
<i>CYP2D6</i>	Débrisoquine
<i>CYP2E1</i>	Alcool, acétones, nitrosodiméthylamines, chloroforme, styrène, tétrachlorure de carbone, vinyles, acétaminophène, acétonitrile, chlorzoxazone
<i>CYP3A4/5</i>	Nifédipine, aflatoxine B1, cyclosporine, testostérone, éthinyloestradiol, rifampicine, érythromycine, lovastatine, midazolam

La famille *CYP1* est composée de deux sous familles (*CYP1A*, *CYP1B*). La sous famille 1A comporte deux membres avec 92% de similitude (*CYP1A1* et *CYP1A2*). Elle est impliquée dans le métabolisme de nombreux procarcinogènes environnementaux, des toxines et quelques médicaments (Nebert et Russell 2002). *CYP1A1* intervient dans les réactions d'hydroxylation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), tels que ceux retrouvés dans les produits d'incinération de composés industriels, la fumée de cigarette et les aliments grillés, mais n'est pas impliqué dans le métabolisme des médicaments. Le *CYP 1A2* intervient le plus souvent dans le métabolisme des médicaments. Les substrats exogènes du *CYP1B* ne sont pas encore bien définis. L'expression du *CYP1A1* et du *CYP1B1* est principalement extrahépatique, alors que le *CYP1A2* s'exprime essentiellement au niveau du foie (Nebert et Russell 2002).

La famille *CYP2* est la plus grande famille de cytochrome chez l'homme, elle se divise en un grand nombre de sous famille : 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F et 2J. À la différence des membres de la famille *CYP1*, les membres de cette famille ne partagent pas le même

système de régulation. Les spécificités de substrats et de tissus sont également très différentes (Gueguen et al. 2006).

La sous famille *CYP2A* par son membre *CYP2A6* semble jouer un rôle important dans le métabolisme de la nicotine et dans l'activation d'une nitrosamine spécifique du tabac (Gueguen et al. 2006).

La sous famille *CYP2C* est composé de quatre membres: *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C18* et *CYP2C19*. Cette sous famille métabolise environ 25% des médicaments utilisés en clinique (Lewis 2004).

Dans la sous famille *CYP2D*, le *CYP2D6* polymorphe est le plus actif. Certains de ces polymorphismes entraînant une altération de son expression et une baisse de son activité enzymatique ont été associés à une déficience du métabolisme de certains médicaments (Gonzalez et al. 1988). À l'inverse, d'autres formes polymorphiques, identifiées chez certains individus, aboutissent à un métabolisme très rapide des médicaments (Ingelman-Sundberg 2005).

La sous famille *CYP2E* a un seul membre *CYP2E1*. Il métabolise un grand nombre de composés caractérisés par leur faible poids moléculaires et par leur hydrophobie. Parmi ces composés se trouvent potentiellement des agents cytotoxiques et carcinogènes. L'activité du *CYP2E1* est induite par l'alcool, l'isoniazide, l'acétone et les dérivés du pyrazole, mais aussi par certaines conditions physiopathologiques comme le diabète, l'obésité et le jeûne (Lamotte 2002).

La famille *CYP3* comprend seulement une sous-famille, le *CYP3A*, qui est composé de trois membres ou isoformes: *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* (Nelson et al. 1996) dont l'expression tissulaire diffère. Le *CYP3A4* est le plus abondant, avec 30 à 40% de la totalité des cytochromes contenus dans le foie humain adulte et dans l'intestin grêle. Il intervient dans le métabolisme de plus de 50 % des médicaments (antibiotiques, anesthésiques, antihistaminiques, corticostéroïdes, statines, inhibiteurs de la protéase du VIH, certaines benzodiazépines, immunosuppresseurs...) (<http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>).

3.2.1.4.2 Rôle des cytochromes P450 dans le métabolisme des endogènes

Les cytochromes P450 interviennent dans plusieurs hydroxylation de composés endogènes aboutissant à la conversion du cholestérol en acides biliaires, ainsi que la conversion des vitamines A et D en leur forme active ou dans le métabolisme des stéroïdes.

Ils participent aussi à la synthèse ou la dégradation des prostaglandines et d'autres acides gras. Un défaut de leur activité entraîne des symptômes et des pathologies pouvant être très grave.

Ces cytochromes sont localisés dans de très nombreux tissus tels que les corticosurrénales, les testicules, les ovaires, placenta et tissus adipeux. La spécificité d'expression tissulaire des *CYP* contrôle la production de différents stéroïdes dans différents tissus: aldostérone, 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.

Tous les membres de la famille *CYP1A* métabolisent les prostaglandines, les œstrogènes et la mélatonine. *CYP2C* participe à la transformation de l'acide arachidonique. Le *CYP2D6* intervient notamment dans le métabolisme de certains neurotransmetteurs. Alors que les *CYP3A* jouent un rôle dans la biotransformation et la catalyse de la réaction d'hydroxylation de la DHEA-S (une réaction importante pour la formation de l'estriol pendant la grossesse), ainsi que dans la réaction d'hydroxylation de la testostérone (Funae et al. 2003).

3.2.1.5 Les différents polymorphismes des cytochromes P450

3.2.1.5.1 Polymorphisme génétique

Le polymorphisme génétique a été découvert en 1950 quand les chercheurs ont constaté que des effets indésirables apparaissant aux doses médicamenteuses usuelles, ne pouvaient être induits que par des variations dans l'activité de l'enzyme. En effet, on décrit une grande variabilité du phénotype qui était, en réalité, prédite par le polymorphisme génétique, donnant ainsi naissance à une modification et une variabilité du niveau d'activité enzymatique.

On parle de polymorphisme génétique si la mutation de l'allèle se produit avec une fréquence d'au moins 1% dans la population normale et entraîne une différence dans la réponse thérapeutique. Les mutations des gènes codant pour une enzyme peuvent donner lieu à des variations d'activité: l'activité de l'enzyme peut être plus élevée, plus basse ou nulle. Les mutations peuvent aussi n'entraîner aucune modification à l'activité enzymatique et passer inaperçues (Gueguen et al. 2006).

3.2.1.5.2 Polymorphisme de régulation

L'action des facteurs de transcription sur la régulation transcriptionnelle des gènes étant dépendante de la séquence d'ADN dans les promoteurs, on peut concevoir que des mutations et/ou polymorphismes génétiques de ces régions puissent entraîner des modifications de leur régulation. En retour, le niveau de protéines (dans ce cas précis ; les *CYP P450*) peut être affecté (Gueguen et al. 2006).

En effet, ces enzymes peuvent être inductibles ou répressibles. Elles sont souvent inhibées, de façon compétitive ; comme le cytochrome P450 3A4 (*CYP3A4*), qui est inhibé par des médicaments comme le kétoconazole ou par des aliments comme le jus de pamplemousse (Schmiedlin-Ren et al. 1997; Bourrie et al. 1996). De plus, de nombreux enzymes *CYP P450* sont inductibles; ainsi par exemple, la rifampicine ou le phénobarbital induisent le *CYP3A4*, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) de la fumée de tabac induisent les *CYP1A*, l'*UGT1A6*, la quinone oxydo- réductase (Ronis et Ingelman-Sundberg 1999).

Il est aussi important de signaler que chez l'homme le contrôle génétique est aussi polymorphe puisqu'il est polygénique pour les *CYP1A2*, *2E1* et *3A4*. A l'inverse le contrôle génétique des *CYP2C9*, *2C19* et *2D6* est monogénique.

3.2.1.6 Conséquence du polymorphisme du cytochrome P450

3.2.1.6.1 Conséquence du polymorphisme sur le métabolisme des médicaments

Le polymorphisme génétique produit des modifications de l'activité enzymatique et divise la population en plusieurs catégories de métaboliseurs : les métaboliseurs normaux, lents, intermédiaire et les métaboliseurs rapides ou extensifs.

Ce polymorphisme génétique peut avoir donc des conséquences importantes sur l'efficacité thérapeutique d'un médicament mais aussi sur ses effets indésirables.

Pour les métaboliseurs lents, il se produit généralement une accumulation de la molécule xénobiotique, avec risque de surdosage et apparition d'effets indésirables, pouvant aller jusqu'à la toxicité cellulaire et la mort cellulaire.

Pour les métaboliseurs rapides et ultra-rapides, l'élimination du produit peut annuler la réponse thérapeutique.

3.2.1.6.2 Conséquence du polymorphisme sur les pathologies et les cancers

Le polymorphisme des cytochromes peut influencer la sensibilité individuelle à développer des cancers ou des maladies. Il existe une relation entre la présence d'allèles mutants, l'exposition à des substances toxiques et la susceptibilité à des cancers et à des maladies. Plusieurs pathologies sont associées à des modifications de séquences de *CYP*. Si le lien entre certaines mutations de *CYP2D6* et la maladie de Parkinson est encore discuté à l'heure actuelle (Foltynie et al. 2002), la relation entre certains polymorphisme de *CYP2D6* et la dépendance à la nicotine est clairement établi (Malaiyandi et al. 2005).

Dans le contexte du carcinome hépatocellulaire, les cytochromes P450 ont d'avantage été étudiés selon leurs polymorphismes et leurs effets sur le métabolisme des drogues (Preissner et al. 2013). De plus, une étude a démontré que les individus ayant un phénotype de fort métaboliseur selon les polymorphismes de *CYP2D6* avaient un risque 6 fois plus élevé de développer un CHC, alors que ceux avec un polymorphisme de faible métaboliseur ont un risque diminué de 90% (Agundez et al. 1995; Silvestri et al. 2003).

3.2.2 Les glutathion-S-transférases

3.2.2.1 Définition

Les glutathion S-transférases (GST) ont été découvertes en 1961 suite à la mise en évidence, dans des extraits de foie de rat, de la conjugaison enzymatique du glutathion avec des composés aromatiques halogénés, le sulfobromophthaléine et les chloro-nitrobenzènes (Booth et al. 1961). Ces enzymes, ont été identifiées comme étant responsables de la détoxification cellulaire de composés au travers de la formation de conjugués covalents glutathionylés. Au cours des 30 dernières années, de nombreuses protéines partageant de fortes identités de séquence et des activités similaires de transfert de glutathion sur des molécules variées ont été regroupées dans une même famille (Habig et al. 1974a; Habig et al. 1974b).

Il s'agit d'une super famille d'enzymes multifonctionnelles ubiquitaires (GST ; EC 2.5.1.18) impliquées dans la détoxification de nombreux composés hydrophobes et électrophiles tel que les époxydes et les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Elles catalysent l'addition nucléophile du composé endogène tri-peptidique, le glutathion (GSH ; g-Glu-Cys-Gly), pour conjuguer le xénobiotiques ou son métabolite issu de la phase I d'oxydation (Senhaji et al. 2015; Hayes et Strange 2000). Elles neutralisent ainsi leurs sites

électrophiles rendant le conjugué plus hydrosolubles qui sera facilement éliminé (Coleman et al. 1997).

Elles sont largement répandues dans la nature et sont présentes à la fois chez les procaryotes et les eucaryotes en tant que principales enzymes de la phase II de détoxification (Hayes 2005). 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. Cette répartition n'est pas homogène, on les trouve principalement dans le foie; un peu moins dans les ovaires, la peau et le tissu surrénal et en faible quantité dans la vessie. 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: un site de liaison pour le glutathion appelé G-site et un site de liaison pour le substrat appelé H-site (Mannervik 1985).

Actuellement, les GST humaines sont classés selon leurs propriétés structurales (similarité des séquences nucléotidiques, localisations et nature du substrat), biochimiques (point isoélectrique) et immunologiques en huit classes distinctes (π), (α), (σ), (μ), (θ), (κ), (ω) et (ζ) qui sont codés par les gènes *GSTA*, *GSTM*, *GSTK*, *GSTO*, *GSTP*, *GSTS*, *GSTT* et *GSTZ*. Chaque classe est représentée par un nombre précis de gènes:

- la classe alpha (α) est représenté par 5 gènes (*GSTA1*, *A2*, *A3*, *A4* et *A5*)
- la classe thêta (θ) comprend 2 gènes *GSTT1* et *GSTT2*
- la classe mu (μ) comprend 5 gènes: *GSTM1*, *M2*, *M3*, *M4* et *M5*
- la classe kappa (κ) comprend un seul gène *GSTK1*
- la classe pi (π) comprend aussi un seul gène *GSTP1*
- les autres classes restes mal connues (Strange et al. 2001).

Plusieurs polymorphismes qui influencent les fonctions des gènes GST ont été découverts. Au cours de notre étude, nous allons nous intéresser à deux gènes appartenant respectivement aux classes mu et thêta à savoir aux gènes *GSTM1* et *GSTT1*. *GSTM1* et *GSTT1* sont localisés sur des chromosomes différents 1 et 22 respectivement et présentent un polymorphisme de délétion.

3.2.2.2 GSTM1

a. Structure du gène GSTM1

Le gène GSTM1 fait partie de la classe μ qui regroupe quatre autres gènes situés sur le chromosome 1 au niveau de la région 1p13.3 (Xu et al. 1998), comme le montre la figure 13.

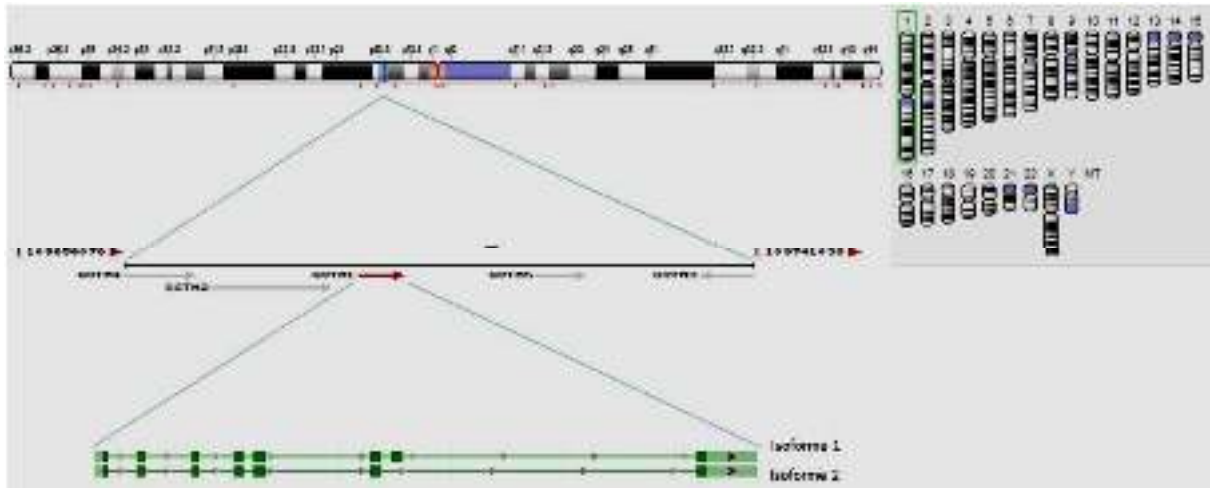


Figure 13: Structure et localisation des gènes de la famille du GSTM.

Le gène GSTM1 présente deux isoformes. L'isoforme 1 de 5.92kb est constituée de 8 exons et 7 introns, avec une protéine de 218 acides aminés, alors que l'isoforme 2, présente 7 exons, avec une protéine de 181 acides aminés.

Des études ont montré que ce gène peut être dupliqué (Roman et al. 1997). 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 homologues 1, ce qui permet l'introduction d'un deuxième gène GSTM1 au voisinage du premier.

b. Polymorphisme du gène GSTM1

GSTM1 est le gène cytosolique le plus abondant et le plus polymorphe par rapport aux autres gènes GST, ce qui en fait de lui le gène d'intérêt dans de nombreuses études physiologiques et pharmacologiques (Hoensch et al. 2002).

Deux polymorphismes ont été décrits au niveau de GSTM1:

- une délétion homozygote complète du gène, représentée par l'allèle GSTM1*0/*0 ou bien GSTM1 nul. Cette délétion implique la perte de la protéine qui conduit à un déficit enzymatique total. 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 (Figure 14) (Xu et al. 1998).

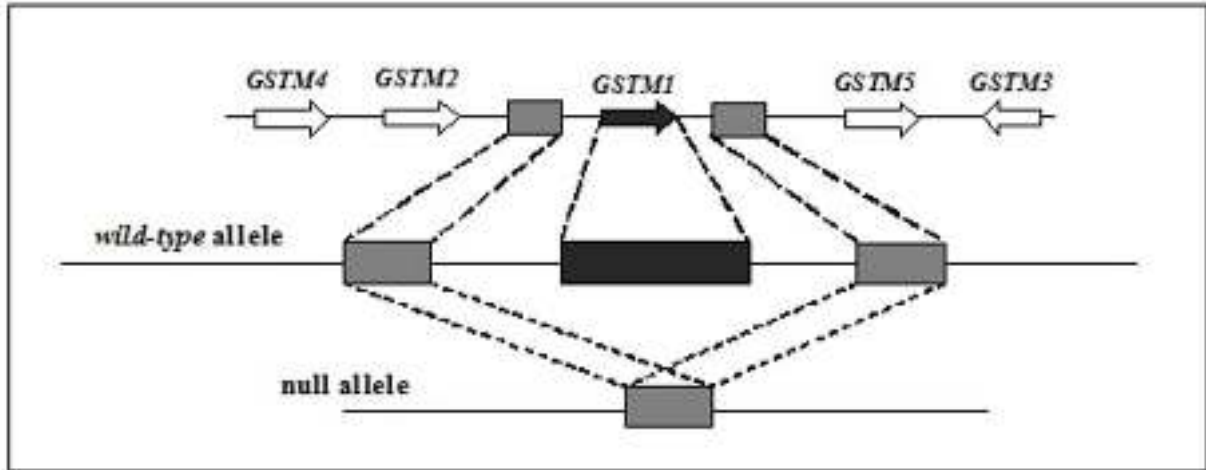


Figure 14: Mécanisme d'apparition du génotype GSTM1 nul (Parl 2005).

-Une substitution nucléotidique (transversion) en position 534 de l'exon 7 du gène, caractérisé par une transversion du nucléotide C en G et donnant naissance à deux allèles : GSTM1*A et GSTM1*B. ces deux allèles ne diffèrent que par un seul acide aminé du codon 172 (K172N) (Widersten et al. 1991). Cependant, les produits enzymatiques de ces deux allèles sont parfaitement fonctionnels, et sans différence phénotypique particulières. Ce sont des représentants du phénotype normal ou conjugateur positif.

Les deux allèles sont liés par une relation de codominance. En revanche, il existe une relation de dominance entre ces allèles et l'allèle nul. Les individus porteur de l'un des génotypes à savoir GSTM1*0/*A, GSTM1*0/*B, GSTM1*A/*A, GSTM1*A/*B et GSTM1*B/*B possèdent une activité catalytique normale de l'enzyme. Par contre, l'activité est complètement nulle chez les individus ayant le génotype GSTM1*0/*0 (Lo et Ali-Osman 2007).

c. Fréquence du génotype GSTM1*0/*0

Le génotype GSTM1 nul présente d'importante variation entre les différents groupes ethnique (caucasiens, asiatiques et africains). Les fréquences les plus élevées sont observées

dans les populations asiatiques avec un taux de délétion allant de 47% à 56%. Alors que cette délétion est moins fréquent chez la population d'origine Africaine. Il est cependant à noter qu'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 des sujets et la source de leur sélection (Yim et al. 2002; Garte et al. 2001; Watson et al. 1998).

d. Structure de l'enzyme GSTM1

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

L'enzyme GSTM1 est un dimère de 217 acides aminés pour l'isoforme 1 et de 181 acides aminés pour l'isoforme 2. Chaque monomère est composé de deux domaines (Board et al. 1990):

- le premier domaine ou G-site assure l'établissement de la liaison et l'activation du glutathion.
- le deuxième domaine ou H-site est indispensable pour la liaison et l'orientation du substrat électrophile.

3.2.2.3 GSTT1

a. Structure du gène GSTT1

La classe thêta est considéré comme la plus ancienne classe des GST. Les enzymes de cette classe sont retrouvées dans presque tous les organismes étudiés (Pemble et Taylor 1992). Elle est caractérisée par deux gènes GSTT1 et GSTT2 localisés sur le chromosome 22, et séparés par environs 50kb (Landi 2000), avec cinq exons et quatre introns chacun. Les deux isoenzymes issus de ces gènes ont une homologie d'environ 55 %, ce qui est moins que les autres classes de GST ou l'homologie de séquence est entre 75 à 95 % pour les membres de la même classe (Tang et al. 2012; Pearson et al. 1993).

Le gène GSTT2 a une taille de 3.7kb. Le gène GSTT1 est composé de 8179pb et précisément localisé à la position 22q11.23 (Figure 15). L'épissage alternatif de GSTT1 donne plusieurs variants de transcription, actuellement 9 variants sont répertoriés dans la banque des données NCBI (NCBI 2017a).



Figure 15: Position et structure du gène GSTT1.

b. Polymorphisme du gène GSTT1

La délétion partielle de 54251 paires de bases du gène GSTT1 a été découverte à la suite d'études portées sur le métabolisme des halométhanés (chlorure de méthylène) dans le sang humain. Ce métabolisme présente des degrés d'élimination métabolique différents donnant naissance à trois phénotypes distincts, selon que deux, un seul ou aucun des deux allèles soit délété. On retrouve le phénotype « no conjugators » pour les individus ne pouvant pas éliminer le produit par absence totale de l'activité enzymatique suite à la délétion homozygote de l'allèle fonctionnel (GSTT1*0/*0 ou GSTT1 nul). Le phénotype « low conjugators » pour les individus ayant une élimination modérée suite à une activité moyenne de l'enzyme correspondante résultante d'une délétion hétérozygote de l'allèle fonctionnel, et le phénotype « high conjugators » pour les individus, sans délétion, avec une activité enzymatique normale (Bruhn et al. 1998).

Le polymorphisme de délétion de GSTT1 (GSTT1*0/*0) se produit en raison de la recombinaison homologe entre les séquences identiques, de 403pb, situées au centre des deux régions (HA3 et HA5) flanquantes le gène GSTT1 (Sprenger et al. 2000) comme l'illustre la figure 16. Par conséquent, le gène sera délété et l'activité enzymatique sera perdue.

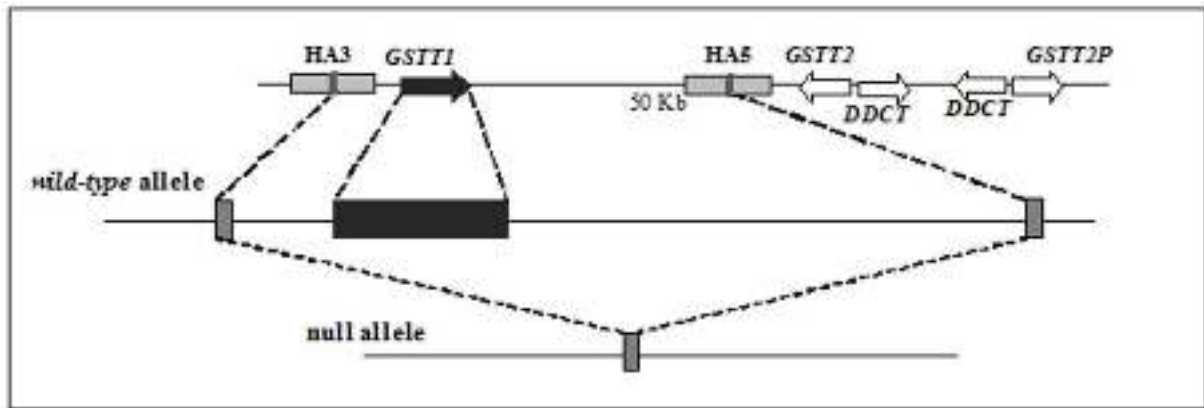


Figure 16: Structure et localisation des gènes de la famille GST thêta (Chr.e 22q11.2)
(Parl 2005).

En plus de se polymorphisme de délétion, GSTT1 est caractérisé par un autre polymorphisme nucléotidique simple (SNP) de substitution donnant naissance à deux variants alléliques fonctionnelles qui sont GSTT1 * A et GSTT1 * B (Bolt et Thier 2006). Il y a une substitution d'une adénine (A) par une guanine (G) au niveau du nucléotide 310 (A310G), d'où la modification de l'acide aminé en position 104 de la thréonine pour l'allèle GSTT1*A à la proline pour l'allèle GSTT1*B, altérant ainsi la structure et l'activité enzymatique. L'apparition de l'allèle GSTT1*B sous la forme homozygote cause donc l'inactivation de l'enzyme GSTT1 (Bolt et Thier 2006).

c. Fréquence du génotype GSTT1*0/*0

Comme pour le gène GSTM1 la fréquence du génotype nul de gène GSTT1 présente des variations de fréquences selon les groupes ethniques. Il est faible chez les Caucasiens (entre 15 à 20%) et augmente significativement dans les populations asiatiques (plus de 64%) (Nelson et al. 1995). Cependant, peu d'études ont concerné les populations africaines, à quelques exceptions près, comme chez les Tunisiens, où la délétion GSTT1 est de l'ordre de 30%, alors qu'elle ne dépasse pas les 15% chez les Egyptiens (Abd El Hameed et al. 2010).

d. Structure de l'enzyme GSTT1 et son rôle

Le GSTT1 catalyse la conjugaison de nombreuses substances cancérigènes présentes dans l'environnement, l'alimentation et les médicaments (Meyer et al. 1991). Du point de

vue structural, l'enzyme GSTT1 est aussi un dimère, avec la présence des mêmes domaines (G-site et H-site) que l'enzyme GSTM1.

Chez l'homme, son spectre d'expression est proche de celui du gène GSTM1 en général. Il est hautement exprimé dans les lymphocytes, la thyroïde et la glande surrénal (Gtex 2017). L'enzyme est par ailleurs composée de 240 acides aminés avec un poids moléculaire de 27335Daltons (NCBI 2017b).

3.2.2.4 Association du polymorphisme de GST et le cancer

En tant qu'enzyme principal dans la détoxification d'une large gamme de carcinogènes et de substances toxiques provenant des médicaments ou de l'environnement, le polymorphisme de délétion de GSTM1 et de GSTT1 sensibiliserait les individus à certaines maladies dont les cancers, en raison de l'abolition de l'activité enzymatique.

L'association des génotypes nuls GSTM1 et/ou GSTT1 avec plusieurs types de cancer a été rapportés (Moy et al. 2009; Gsur et al. 2001; Strange et Fryer 1999). Ils sont associés à un risque accru au cancer de la prostate chez les Asiatiques ou ils sont considérés comme un des facteurs de risque pour le développement de ce cancer (Liu et al. 2013).

Le polymorphisme de délétion de GSTM1 et de GSTT1 est aussi souvent associé à une augmentation du risque au cancer du poumon (CP). On suppose que les individus porteurs de ces génotypes sont incapables de détoxifier les carcinogènes présents dans la fumée de tabac tels que le benzo[α]pyrène, la nitrosamine, et les amines aromatiques (Sharma et al. 2015; Zhang et al. 2014; Rotunno et al. 2012).

Concernant le carcinome hépatocellulaire (CHC), les résultats sont controversés. L'étude de Donna L. White a montré que les génotypes GSTM1 nul et GSTT1 nul n'avaient pratiquement aucune influence sur la susceptibilité d'apparition de CHC (White et al. 2008), alors que les recherches de Kang Song ont montré que ces mêmes génotypes pouvaient entraîner une légère augmentation du risque au CHC (Song et al. 2012), ou alors une forte association avec le risque de CHC d'après les recherches de Ying-Hao Shen (Shen et al. 2014). Ceci montre l'importante variation de susceptibilité d'une population à une autre.

Par ailleurs, il a été observé que le polymorphisme de délétion de GSTT1 pourrait jouer un rôle dans l'augmentation de la susceptibilité au carcinome hépatocellulaire chez les fumeurs (Boccia et al. 2015).

3.2.3 Les N-acétyltransférases

3.2.3.1 Historique

Le polymorphisme d'acétylation (NAT) a été découvert il y a plus de 60 ans suite aux différences de réponse observées chez les patients tuberculeux traité à l'isoniazide (Hughes et al. 1954). En effet, à la suite de l'administration de l'isoniazide, des variations du temps d'élimination du traitement sous forme de dérivés conjugués inactifs a été observés chez les patients et ont ainsi permis de classer les patients en fonction de leur profil d'acétylation en acétyleurs lents (AL), acétyleurs rapides (AR) et les acétyleurs intermédiaires (AI) en fonction de l'activité de l'enzyme N-acétyltransférase. Les acétyleurs rapides ont une activité enzymatique normale et les acétyleurs lents présentent une activité enzymatique diminuée, en rapport avec une quantité réduite d'enzyme au niveau du foie.

Cette différence a été attribuée, bien plus tard, au polymorphisme de l'enzyme N-acétyltransférase (EC 2.3.1.5) qui est l'enzyme principale de conjugaison cytosolique de phase II de la désactivation de l'isoniazide (Weber et Hein 1979; Evans et White 1964).

Ce polymorphisme a été appelé le "polymorphisme d'acétylation de l'isoniazide" pendant de nombreuses années, jusqu'à ce que l'on découvre que l'effet de ce polymorphisme ne se limite pas à l'isoniazide mais il intervient aussi dans le métabolisme et l'élimination d'autres médicaments et de substances chimiques cancérigènes (Weber 1987; Weber et Hein 1985).

3.2.3.2 Fonction des N-Acétyltransférases

Les arylamine-N-acétyltransférases (NAT) sont une famille d'enzymes de la phase II de biotransformation des xénobiotiques, qui acétylent les composés arylamines, aryl-hydrazines et aryl-hydroxylamines, en utilisant l'acétylcoenzyme A (acétylCoA) comme cofacteur (Weber et Hein 1985). Effectivement, ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement acétyle issu de l'acétylcoenzyme A, sur l'azote du groupement amine primaire (-NH₂) ou hydrazine (-NH-NH₂) d'une molécule aromatique ou arylamine receveuse (Figure 17). Le produit formé est une arylamide (Rychlik-Sych et al. 2006; Grant 1993).

Ce transfert se produit en deux étapes séparées: d'abord l'acétyl coenzyme A se lie à l'enzyme. Sa moitié est transférée sur la cystéine 68 de la protéine, et 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 et se détache de l'enzyme (Ambrosone et fred 1998).

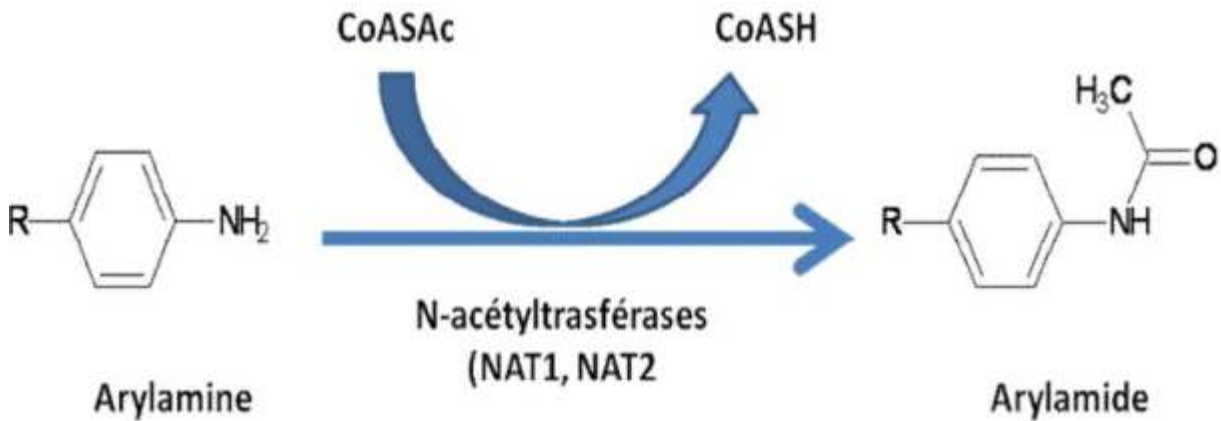


Figure 17: Réaction de N-acétylation des xénobiotiques par les NATs.

En plus des réactions de N-acétylation, les NATs 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 est considérée de façon générale comme exerçant une détoxification relative des arylamines puisque cette réaction les rend en effet moins actives, alors que l'*O*-acétylation serait plutôt activatrice. En effet, la figure 18 représente les réactions du métabolisme du cancérigène arylamine 4-aminobiphényle (ABP), conduisant finalement à la formation d'électrophiles hautement réactifs qui se lient à l'ADN et pouvant conduire à des phénomènes de mutagénèse et de cancérogénèse par l'intermédiaire de la *O*-acétylation (Hein et al. 1992).

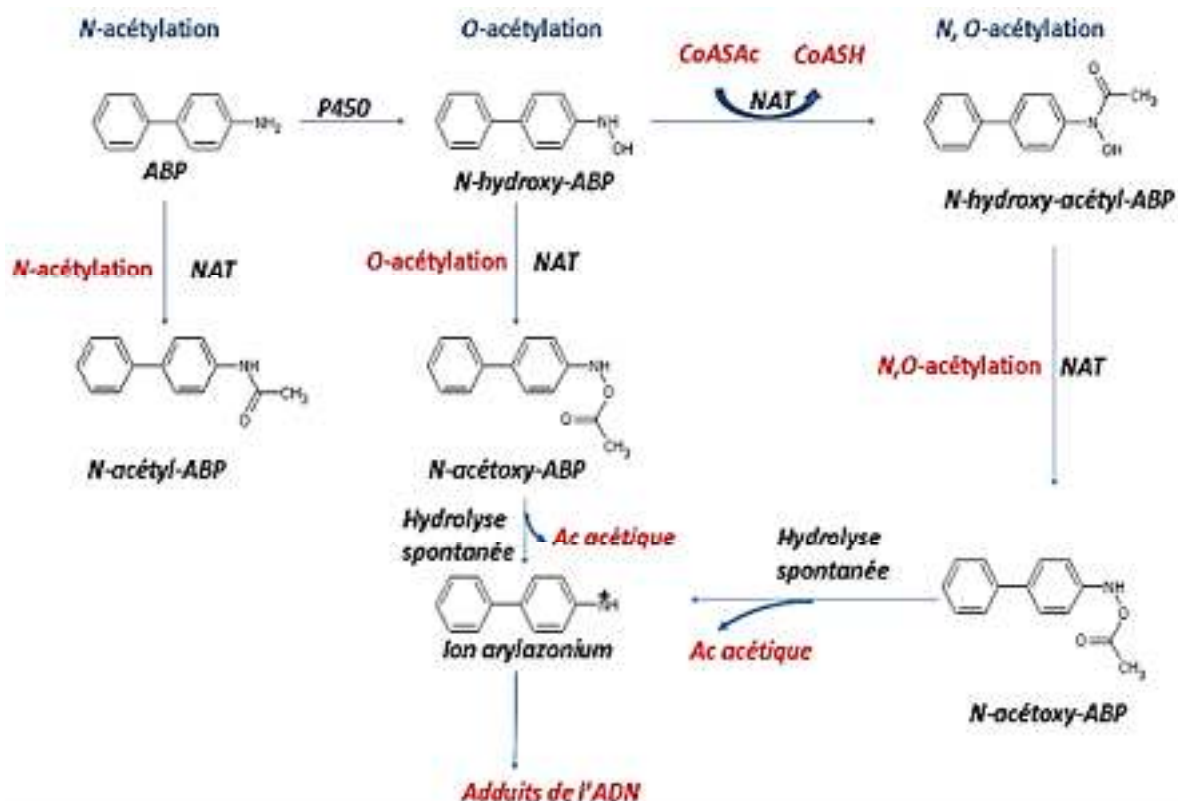


Figure 18: Activation et inactivation des arylamines par N-acétylation, O-acétylation, et N-,O-acétylation catalysées par la NAT2.

Cependant, les N-acétyltransférases agissent principalement dans les voies métabolique des amines primaires, des hydrazides et des hydrazines, mais aussi sur d'autres substrats représentés par des médicaments de type isoniazide, dapsonne, sulfamides, l'acide para-aminosalicylique (PAS). Les NATs interviennent également dans le métabolisme des polluants présents dans l'environnement et des additifs présents dans l'alimentation contenant des amines aromatiques. Les substrats endogènes des NATs sont encore mal connus (Lang et al. 1994).

Chez l'homme, ces molécules seront pris en charge et métabolisées par l'une ou l'autre des deux formes distinctes d'arylamine N-acétyltransférases, en l'occurrence la N-acétyltransférases de type I (*NAT1*) et la N-acétyltransférases de type II (*NAT2*).

3.2.3.3 Gène et protéine des N-acétyltransférases

Les N-acétyltransférases comprennent deux gènes codant pour des enzymes actives et un pseudogène *NATp*, qui n'est pas transcrit en protéine. Les deux gènes, *NAT1* et *NAT2*, ont été décrits chez l'homme pour la première fois par Grant et collaborateurs en 1981 (Grant 1983). Ils sont séparés par 25kb et localisés sur le bras court du chromosome 8, et

plus précisément dans la région 8p22 (Grant 2008). Le pseudogène *NATp*, a aussi été identifié sur le même chromosome. Il présente 79 et 80% d'identité nucléotidique avec les *NAT1* et *NAT2* respectivement. Il renferme plusieurs mutations expliquant le défaut d'expression (Grant 2008).

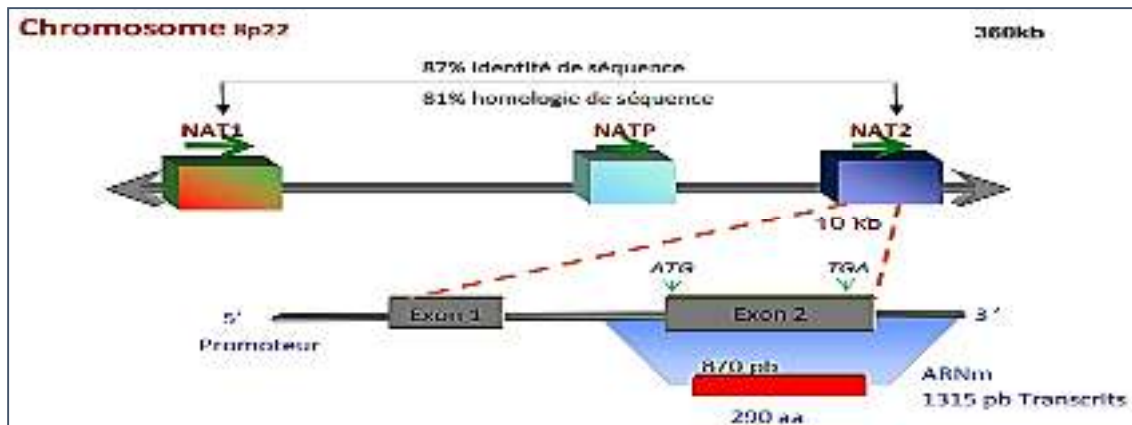


Figure 19: Représentation schématique du locus NAT humain sur le chromosome 8

(Blum et al. 1990; Grant et al. 1983).

Le gène *NAT1* a une taille de 33kDa et le gène *NAT2*, à une taille de 31kDa, avec deux exons dont seul l'exon 2 réparti sur 870pb est codant. Ces deux gènes partagent 87% d'homologie nucléotidique dans la région codante qui se traduit par 81% d'homologie au niveau de la séquence des acides aminés (Figure 19) (Blum et al. 1990; Grant 1983).

L'expression des gènes *NAT1* et *NAT2* donne naissance à deux protéines fonctionnelles de 290 acides aminés (aa) qui ne diffèrent entre elles, que par 55 acides aminés au niveau de la région C terminale. 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 (Grant et al. 1997).

L'étude de la structure de l'enzyme chez l'homme montre qu'elle présente 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 supplémentaires ont permis de distinguer trois domaines au niveau de la protéine NAT2 (Walraven et al. 2008; Butcher et al. 2002) (Figure 20).

mutations ponctuelles pour chacun des gènes, donnant naissance aux différentes formes alléliques constituant le polymorphisme génétique.

Nous allons particulièrement nous intéresser au polymorphisme du gène NAT2 qui a fait l'objet de notre travail de recherche.

Le gène NAT2 est hautement polymorphe, avec divers polymorphismes mononucléotidiques (SNP) identifiés, et qui sont responsables des phénotypes observés. En effet, plus de 25 polymorphismes dans la séquence codante du gène humains NAT2 ont été mise en évidence à travers les différentes populations, dont treize substitutions nucléotidiques sont dites majeurs car elles sont rencontrées à des fréquences importantes dans plusieurs populations (G191A, T341C, G590A, G857A, A803G, C282T, C481T, C345T, C403G, A434C, C481T, G638A et G838A) (Di Pietro et al. 2012; Hein 2002). Les autres mutations ponctuelles sont retrouvés avec de faible fréquence chez certains groupes ethniques seulement (Tableau 5).

L'allèle NAT2*4 est considéré comme l'allèle de référence en l'absence de toute mutation ponctuelle ou SNP connus. Il est désigné comme un allèle sauvage (Touré et al. 2012; Walker et al. 2009; Hein et al. 2000). Toutes les autres formes diffèrent de l'allèle de référence par une, deux ou même trois substitutions nucléotidiques.

Tableau 5 : formes alléliques du gène NAT2 humain (Vatsis et al. 1991).

Polymorphisme	Position nucléotidiques polymorphes										AA changés	Activité enzymatique
	191	282	341	434	481	590	803	845	857			
NAT2*4	G	C	T	A	C	G	A	A	G			Normale
NAT2*5A			C		T						Ile114Thr	Diminuée
NAT2*5B			C		T		G				Lys268Arg	Diminuée
NAT2*5C			C				G					Diminuée
NAT2*6A		T				A					Arg197Gln	Diminuée
NAT2*6B						A						Diminuée
NAT2*7A								A			Gly283Glu	Diminuée
NAT2*7B		T						A				Diminuée
NAT2*12A							G				Lys268Arg	Normale
NAT2*12B		T					G					Normale
NAT2*13		T										Normale
NAT2*14A	A										Arg84Gln	Diminuée
NAT2*14B	A	T										Diminuée
NAT2*17				C							Gln145Pro	Inconnue
NAT2*18								C			Lys282Thr	Inconnue

Ces mutations peuvent avoir des conséquences différentes, puisqu'elles peuvent être silencieuses ou peuvent altérer la séquence en acide aminé entraînant une modification du niveau d'activité enzymatique. Il y a alors apparition de trois phénotypes différents : les acétyleurs rapides (RAs), acétyleurs intermédiaires (IA) et les acétyleurs lents (SA) (Walker et al. 2009). Les individus homozygotes pour l'allèle lent ou double hétérozygotes pour les allèles lents, sont considérés comme acétyleurs lent avec une activité enzymatique diminuée. Les individus homozygotes pour l'allèle rapide sont considérés comme acétyleurs rapide, alors que les individus hétérozygotes possédant un allèle lent et un allèle rapide sont considérés comme acétyleurs intermédiaire (Hein 2006).

Leurs proportions connaissent d'importantes variations selon l'origine ethnique. La fréquence des acétyleurs rapides est la plus élevée en Asie de l'Est, tandis que les populations nord-africaines comptent parmi les plus riches en acétyleurs lents, avec environ 90% dans la population générale maghrébine. Les populations caucasiennes comptent en moyenne des proportions équivalentes d'acétyleurs rapides, intermédiaire et lents (McDonagh et al. 2014; Dandara et al. 2003; Hamdy et al. 2003; Furet et al. 2002). Ces fréquences alléliques présentent même des variations au sein du même groupe.

3.2.3.5 Relation entre le polymorphisme du gène NAT2 et le cancer

Le rôle des NATs dans la carcinogenèse chimique a été discuté depuis des années par Hein et ces collaborateurs (Hein 2002; Hein et al. 2000). Ensuite, plusieurs études ont exploré l'impact des polymorphismes génétiques des NATs sur les risques d'apparition de divers cancers, tels que le cancer de la vessie (Avirmed et al. 2021; Zhu et al. 2015), le cancer colorectal (Da Silva et al. 2011), et le cancer du sein (Kocabas et al. 2004; Chang-Claude et al. 2002; Ambrosone et al. 1996).

En revanche, il y a eu très peu d'études qui ont exploré le rôle du profil d'acétylation de la N-acétyltransférase 2 dans le processus de survenue du cancer du foie, en particulier dans celui du carcinome hépatocellulaire.

Obada et al. 2016, ont démontré, dans la population égyptienne, que les acétyleurs lents étaient associés à un risque accru de CHC par rapport aux individus acétyleurs rapides. Ces résultats étaient cohérents avec ceux de Farker et al. 2003 et de Zhang et al. 2012 qui ont indiqué que ce phénotype lent du gène NAT2 n'était pas associé à un risque accru de CHC dans la population globale mais à un risque accru de CHC chez les fumeurs.

Cependant, Khalaf et al. 2013, et Agundez et al. 1995, ont montré que l'acétylation lente du NAT2 n'avait pas d'effet sur la susceptibilité au CHC, et suggèrent que cette forme enzymatique se comporte comme une enzyme inactivatrice des agents cancérigènes et joue un rôle protecteur en évitant le développement du CHC.

D'autres études ont montré que ce sont les acétyleurs rapides qui seraient plus associés au risque de développement du carcinome hépatocellulaire (Huang et al. 2003), en se basant sur l'hypothèse que le risque de cancer pour les acétyleurs rapides est dû à l'activation de procarcinogènes tels que les amines hétérocycliques. Cette divergence sur le rôle du polymorphisme de NAT2 dans le CHC peut s'expliquer par le fait que le polymorphisme de NAT2 est impliqué dans différentes voies métaboliques de diverses amines aromatiques (Gelatti et al. 2005).

*Matériel et
méthodes*

1. Population d'étude: Patients et Témoins

Il s'agit d'une étude cas-témoin réalisée sur une population de 132 patients, non apparentés et ayant un carcinome hépatocellulaire confirmé histologiquement. Ces patients sont originaires de l'Est algérien et ont été admis au niveau d'hôpitaux et centre anti cancer essentiellement de Constantine et de Batna, durant la période allant de 2019 à 2021.

La population témoins est constituée de 141 volontaires sains, recrutés aléatoirement, sans aucun diagnostic préalable de cancer, ni des antécédents familiaux de cancer, ni de signe pathologique de maladie hépatique. Les personnes ayant des antécédents familiaux de cancer hépatique ont été exclues de cette étude.

Ces témoins sont non apparentés et appariés aux patients selon l'âge, le sexe, la région géographique et la consommation d'alcool et de tabac. Un consentement éclairé nous autorisant à utiliser leur matériel génétique a été obtenu auprès des patients et des témoins ayant participé à notre étude (annexe 2). Un questionnaire détaillé a été établi pour tous les patients suite à la consultation des dossiers médicaux complété par les informations obtenus directement des patients (annexe 3). Un questionnaire a aussi été fait pour les témoins (Annexe 4).

2. Méthodes

2.1 Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique a été extrait à partir des leucocytes de 5 ml de sang total prélevé en conditions stériles et recueilli en présence d'anticoagulant EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétracétique). La méthode d'extraction d'ADN utilisée est la méthode au phénol-chloroforme. Cette méthode commence par une lyse préférentielle des cellules anucléées, ensuite vient l'élimination des protéines et enfin la précipitation de l'ADN, dont la pureté sera vérifiée et la concentration sera mesurée.

2.1.1 Préparation du culot de leucocytes (globules blancs)

Cette étape permet l'obtention d'un culot de leucocytes (globules blancs) par une lyse hypotonique. Pour sédimenter les cellules sanguines et les séparer du plasma, le sang fraîchement prélevé est centrifugé à 3 000 tr pendant 15 minutes à 4 °C. Le plasma est retiré alors que le culot cellulaire est incubé dans la glace pendant 10 min en présence de 5 volumes de solution de lyse (140mM NH₄cl / 1mM NH₄CO₃). Le mélange est ensuite centrifugé à 3000 tr pendant 15 min à 4°C afin d'éliminer le surnageant et recueillir le culot cellulaire.

Cette opération pourra être répétée jusqu'à l'obtention d'un culot bien blanc sans aucune trace d'hémoglobine. Les globules blancs obtenus peuvent être utilisés immédiatement ou conservés à -80°C pendant plusieurs mois.

2.1.2 Elimination des protéines et purification de l'ADN

Le culot de globules blancs est ensuite traité par 1ml de solution de détergents (Non Idet P40 à 0.45%, Tween20 à 0.45%) et de 10µl de protéinase K (10mg/ml) permettant la lyse des membranes cellulaires et la dénaturation et la dégradation des protéines. Cette réaction dure trois heures à 60°C. On ajoute ensuite 1ml de phénol qui débarrasse efficacement l'ADN de toutes les protéines. 1ml de chloroforme / octanol (24/1) est additionné pour éliminer les traces de phénol restant.

L'ADN nucléaire est alors libéré dans le lysat et les protéines qui lui sont associées sont digérées, il est donc précipité par 2.5 volumes d'éthanol absolu à -20°C et récupéré sous forme de filament blanchâtre par enroulement autour d'une pipette pasteur scellée. La méduse d'ADN après séchage à température ambiante est solubilisée en phase aqueuse (tris 10mM/EDTA 1mM) et conservée à 4°C ou -20°C.

2.1.3 Contrôle de la pureté de l'ADN et estimation de sa concentration

Afin d'obtenir une bonne amplification génique et assuré l'efficacité d'action des enzymes de restriction, un contrôle de la qualité de l'ADN et une estimation de sa pureté et sa concentration doit être effectué.

Les acides nucléiques ont un spectre d'absorption maximum en UV à 260nm, alors que les protéines absorbent essentiellement à 280nm. La mesure de la densité optique de chaque échantillon à 260nm et 280nm est établie par spectrophotométrie.

Le rapport DO₂₆₀ /DO_{280nm} doit être compris entre 1.6 et 2, afin de pouvoir considéré l'ADN comme pur et débarrassé des protéines cellulaires. Une valeur supérieure à 2 témoigne d'une contamination par les ARN et une valeur inférieure à 1,6 indique une contamination protéique.

La densité optique à 260 nm permet aussi de déterminer la concentration de l'ADN des solutions sachant qu'une unité de densité optique (1U DO) est équivalente à 50µg/ml d'ADN, la concentration sera calculée comme suite :

$$\text{La concentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{facteur de dilution} \times \text{DO à 260 nm} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

D'autre part la mesure de la DO à 270nm et le calcul du rapport DO260nm/ DO270nm est effectué pour s'assurer que la solution contient peu ou pas d'alcool résiduel. Ce rapport d'absorption doit être inférieur à 1.

Les ADN purs sont conservés à + 4°C ou congelés à - 20°C si l'utilisation n'est pas immédiate et si les ADN doivent être conservés pour une plus longue durée.

2.1.4 Test de digestibilité

Afin de vérifier la qualité de l'ADN, on effectue un test de digestibilité qui se fait par une simple migration sur gel d'agarose à 0.8% dans du TBE à 0.5X (Annexe 5). Si l'on observe l'apparition d'une seule bande, l'ADN est donc intact.

2.2 Etude du polymorphisme des gènes GSTM1, GSTT1 et NAT2

L'identification des différents polymorphismes des gènes GSTM1, GSTT1 et NAT2 au sein des deux populations de patients et de témoins a été réalisée par la technique de PCR multiplex pour les gènes GSTM1, GSTT1, et par PCR-RFLP pour les polymorphismes du gène NAT2.

-Principe de la PCR (polymerase chaine reaction)

Cette technique de Biologie Moléculaire a été inventée en 1983 par K. Mullis et brevetée en 1985. Il s'agit d'une méthode d'amplification génique et cyclique d'une séquence d'acide nucléique, à partir d'une faible quantité d'acide nucléique (l'Amplicon) à l'aide d'un appareil programmable, le thermocycleur, qui assure les variations de température nécessaires durant l'amplification.

Cette réaction nécessite la présence d'une enzyme polymérase thermorésistante, la Taq polymérase, deux amorces d'oligonucléotides de synthèse de 20 à 25 nucléotides située de part et d'autre de la séquence à amplifier et les quatre désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN. En mélangeant les deux amorces avec de l'ADN génomique dans des conditions d'hybridation, et en faisant agir l'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 à température différentes: une phase de dénaturation de l'ADN à haute température à 95°C, une phase d'hybridation des amorces à la matrice nécessitant une température de 50 à 65°C, et une phase d'extension ou d'élongation des amorces par polymérisation qui se fait à 72°C, température optimale de la Taq polymérase.

2.2.1 Etude des délétions des gènes glutathion-S-transférase par PCR multiplex

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

a. Amorces utilisées

Trois couples d'amorces sont utilisés lors de la PCR multiplex et sont représentés dans le tableau suivant :

Le couple (GSTM1F, GSTM1R) sert à amplifier le gène GSTM1

Le couple (GSTT1F, GSTT1R) sert à amplifier le gène GSTT1

Le couple (ALB F, ALB R) sert à amplifier le gène ALB

Tableau 6 : Les amorces d'amplification utilisées pour la PCR multiplex (Arand et al.1996).

Gènes	Appellation de l'amorce	Séquences	Direction
GSTM1	GSTM1F	5'GAACTCCCTGAAAGCTAAAGC 3'	Sens
	GSTM1R	3'GTT GGGGCTCAAATATACGGTGG 5'	Antisens
GSTT1	GSTT1F	5' TCCTTACTGGTCCTCACATCTC 3'	Sens
	GSTT1R	3'CACCGGATCATGGCCAGCA 5'	Antisens
ALB	ALB F	5'GCCCTCTGCTAACAAAGTCCTAC 3'	Sens
	ALB R	3'GCCCTAAAAAGAAAATCGCCAATC 5'	Antisens

b. Protocole d'amplification

250ng d'ADN sont amplifiés dans un volume réactionnel de 50µl composé des amorces GSTM1F, GSTM1R, GSTT1F et GSTT1R à 0.45pmol/µl alors que les amorces responsables de l'amplification du gène de contrôle de l'albumine (ALB F, ALB R) sont à 0.1pmol/µl, des dNTPs à 200µmol, 2U de Taq polymérase, 1X de tampon de Taq polymérase (50mmol Kcl, 20mmol tris Hcl pH8.4) et 5mmol de Mgcl2. On complète à 50µl avec de l'eau distillé.

c. Conditions d'amplification sur thermocycler (Biométra)

Toutes nos amplifications ont été assurées par un thermocycler (biometra UNO-thermoblok). 30 cycles de PCR sont réalisés en suivant le programme suivant:

- Etape 1 : Dénaturation initiale à 94°C pendant 5min
- Etape 2 : Dénaturation à 94° pendant 1min
- Etape3 : Hybridation à 64°C pendant 1min
- Etape 4 : Elongation à 72°C pendant 1min
- Etape 5 : Elongation finale à 72°C pendant 7min
- } 30 cycles

d. Contrôle et analyse de la réaction

Le contrôle de la taille des produits d'amplification s'effectue par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

Dans chaque puits du gel, on dépose 5µl de produit d'amplification au quel est ajouté un mélange de bleu de xylène cyanol, bleu de bromophenol et du ficoll 400 à 15%. L'électrophorèse est réalisée en un tampon 1X TAE (Tris 40mmol, Acide acétique 25mmol, EDTA 1mmol pH8.4) en parallèle avec un marqueur de poids moléculaire. La migration se fait grâce à un champ électrique de 120 volts pendant 30 min.

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.

2.2.2 Etude du Polymorphisme N-acétyltransférase 2 par RFLP

L'analyse des allèles NAT2 a été effectuée selon la méthode développée par Bell et al (1993). Une combinaison de réaction en chaîne par polymérase (PCR) et de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) a été appliquée pour étudier les allèles de NAT2.

La technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 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). Ces variations se traduisent par des différences de taille des fragments de digestion.

Pour la mise en évidence du polymorphisme NAT2, différentes enzymes de restriction sont donc utilisées. L'allèle NAT2*5 est mis en évidence par l'enzyme KpnI qui permet l'identification du site de restriction C481T, l'allèle NAT2*6 est mis en évidence par l'enzyme de restriction TaqI qui permet l'identification du site G590A. L'allèle NAT2*7 est identifié par l'enzyme BamHI, 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. Mise en évidence de l'allèle NAT2*5 et l'allèle NAT2*14

***amplification du gène NAT2 (1109pb)**

L'amplification d'un fragment de 1109pb par l'utilisation des amorces suivantes (5'-CCATTGTGTTTTTACGTATT-3' et 5'-GTATTTGATGTTTAGGATTTT-3') a été utilisé pour la mise en évidence des allèles NAT2*5 et NAT2*14.

La PCR a été réalisée dans 50µl de mélange réactionnel contenant 250ng d'ADN, 0.4µmol/µl de chaque amorces, 200mmol/l de dNTPs, 2.5mmol/l MgCl₂, 1X de tampon PCR (20mmol/L Tris-HCl, pH8.4, 50mmol/L KCl) et 5 U de Taq polymérase d'ADN thermostable.

La réaction de 30 cycles se fait à l'aide d'un thermocycleur programmable (biométra) en respectant les étapes suivantes:

- Etape 1 : dénaturation initiale à 94°C pendant 4 min
 - Etape 2 : dénaturation à 94°C pendant 30 s
 - Etape 3 : hybridation à 53°C pendant 30 s
 - Etape 4 : élongation à 72°C pendant 90 s
 - Etape 5 : élongation final à 72°C pendant 4 min.
- } 30cycles

L'amplification est contrôlée par une électrophorèse de 10µl de produit d'amplification sur un gel d'agarose à 1%. Après la migration électrophorétique, le gel est soumis aux rayons UV permettant la visualisation des fragments amplifiés.

***Digestion par l'enzyme KpnI pour la mise en évidence de l'allèle NAT2*5**

10µl de produit d'amplification de 1109pb est digéré dans un milieu réactionnel de 15µl. La réaction est incubée dans un bain marie pendant 3 heures à 65 °C.

Tableau 7 : Composants du milieu réactionnel pour l'allèle NAT2*5.

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale
Enzyme <i>KpnI</i>	20U/μl	5U /réaction
Tampon de l'enzyme <i>KpnI</i>	10X	1X
H2O		Qsp 15μl

***Digestion par l'enzyme Msp I pour la mise en évidence de l'allèle NAT2*14**

Cette mise en évidence utilise le même produit d'amplification précédent de 1109pb mais qui est digéré par l'enzyme Msp I.

La réaction se fait dans un volume de 25μl avec 10μl du produit d'amplification et 5U d'enzyme de restriction. La réaction est incubée à 37°C, pendant une nuit.

Tableau 8 : Composants du milieu réactionnel pour l'allèle NAT2*14.

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale
Enzyme Msp I	10U/μl	5U /réaction
Tampon de l'enzyme Msp I	10X	1X
BSA	100X	1X
H2O		Qsp 25μl

b. Mise en évidence de l'allèle NAT2*6 et l'allèle NAT2*7

***Amplification du gène NAT2 (835pb)**

L'amplification d'un fragment de 835pb en utilisant le couple d'amorces (5'GATCACATTGTAAGAAGAAACCG 3'et 5'GGATGAAAGTATTTGATGTTTAGG3'), a été utilisé pour la détermination des allèles NAT2*6 et NAT2*7 à la suite de digestions enzymatiques.

250ng d'ADN sont amplifiés dans un volume réactionnel de 50μl avec 0.4pmol/μl de chaque amorce, 200μmol de dNTPs, 2U de taq polymérase, 1X de tampon taq polymérase (50mmol Kcl, 20mmol Tris Hcl pH8.4) et 3.5mmol de Mgcl2.

35 cycles ont été réalisés dans un thermocycleur (Biométra) dont la première étape est une dénaturation initiale à 94°C pendant 7min. Chaque cycle est constitué d'une dénaturation à 94°C pendant 1min, une hybridation à 60°C pendant 30 sec et une élongation à 72°C pendant 1min. une élongation finale à 72°C pendant 5min clôture l'amplification.

L'amplification est contrôlée par une électrophorèse de 10µl de produit d'amplification sur un gel d'agarose à 1%. Après la migration électrophorétique, le gel est soumis aux rayons UV permettant la visualisation des fragments amplifiés.

***Digestion par l'enzyme TaqI pour la mise en évidence de l'allèle NAT2*6**

L'allèle NAT2*6 est mis en évidence par l'enzyme de restriction TaqI qui permet l'identification du site G590A. 15µl du produit d'amplification ont été digérés dans un volume réactionnel de 40 µl.

Tableau 9 : Composants du milieu réactionnel pour l'allèle NAT2*6.

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale
Enzyme TaqI	20U/µl	5U /réaction
Tampon de l'enzyme TaqI	10X	1X
BSA	100X	1X
H2O		Qsp 40µl

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

***Digestion par l'enzyme BamHI pour la mise en évidence de l'allèle NAT2*7**

L'allèle NAT2*7 est mis en évidence par l'enzyme de restriction BamHI qui identifie le site polymorphe G857A. 10µl de produit d'amplification ont été digérés dans un volume réactionnel de 25 µl.

Tableau 10 : Composants du milieu réactionnel pour l'allèle NAT2*7.

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale
Enzyme BamHI	10U/µl	2.5U /réaction
Tampon de l'enzyme BamHI	10X	1X
BSA	100X	1X
H2O		Qsp 25µl

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

c. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les produits de digestion sont déposés sur un gel d'acrylamide-bisacrylamide 29 :1 à 8% en parallèle avec un marqueur de poids moléculaire. Une fois le gel d'acrylamide préparé, 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 1X TBE (Tris 90mmol, acide

borique 88mmol pH8.3, EDTA 2mmol) sous un courant de 150Volts. Après migration, le gel est visualisé sous lumière ultraviolette en présence de bromure d'éthidium (BET).

2. Analyse statistique

L'étude de l'association entre le polymorphisme de délétion des gènes GSTM1 et GSTT1 et le polymorphisme allélique du gène NAT2 et le carcinome hépatocellulaire a été réalisé par une étude statistique grâce à l'utilisation du logiciel IBM SPSS Statistics version 28.

L'analyse statistique commence par l'établissement d'un tableau de contingence comportant la répartition des patients et des témoins, porteurs et non porteurs de l'allèle testé.

Tableau 11 : Tableau de contingence.

	Patients	Témoins
Critères présent	a	b
Critères absent	c	d

Le Khi-deux χ^2 a été établi afin de savoir si les différences de la répartition des fréquences alléliques et génotypiques entre la population de patients et la population de témoins sont significative ou non, sachant que ces différences sont considérées comme significatives quand la valeur P est inférieure à 0.05.

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

$$N = a+b+c+d \quad \text{ddl}=1$$

Le calcul de l'odds ratio (OR) avec intervalle de confiance à 95% (IC à 95%) a aussi été effectué et cela afin d'estimer l'existence d'association entre les polymorphismes étudiées et le carcinome hépatocellulaire. L'odds ratio se calcul par la formule suivante:

$$OR = \frac{a/c}{b/d} = \frac{a * d}{b * c}$$

- Si l'odds ratio (OR) est inférieur à 1 : l'association est négative et l'allèle confère une protection contre la maladie.

- Si l'odds ratio (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.

- Si OR est égal à 1 : l'allèle est neutre. L'allèle aurait le même rôle pour les cas et les témoins.

L'intervalle de confiance permet de donner un degré de certitude et de précision de l'estimation de l'odds ratio auquel il est associé. Il est d'autant plus étroit que l'estimation du OR est précise.

$$\ln OR \pm 1.96 \left(\frac{1}{\sqrt{a^2}} \right) \ln OR \Rightarrow \text{borne 1 et borne 2}$$

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

Résultats

1. Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée

L'analyse des polymorphismes des gènes GSTM1, GSTT1 et NAT2 a été effectuée sur 132 patients présentant un carcinome hépatocellulaire (CHC), dont 110 hommes et 22 femmes et 141 témoins avec 111 hommes et 30 femmes. Le tableau 12 résume les caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée.

Tableau 12 : Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée.

Variables	Patients n= 132(%)	Contrôles n= 141(%)	OR(IC à 95%) ^a	P value
Le sexe				
homme	110(83.33)	111(78.72)	1.0	0.333
Femme	22(16.67)	30(21.28)	0.74(0.40-1.36)	
Age (années)				
moyenne ± ET	63.1 ± 9.53	61.6 ± 10.88		
<40	03(2.27)	07(4.96)	1.0	0.167
40-60	52(39.39)	46(32.62)	2.64(0.64-10.80)	
>60	77(58.33)	88(62.41)	2.04(0.51-8.17)	
Tabac				
Non-fumeurs	45(34.09)	69(48.94)	1.0	0.013*
Fumeurs	87(65.91)	72(51.06)	1.85(1.14-3.02)	
Consommation d'alcool				
Negative	103(78.03)	113(80.14)	1.0	0.669
Positive	29(21.97)	28(19.86)	1.14(0.63-2.04)	

^aOR ajusté en fonction de l'âge, du sexe, du tabagisme et de la consommation d'alcool;

ET:écart type ; *P<0.05

La répartition des patients en fonction du sexe montre une prédominance du sexe masculin avec 83.33% d'homme patients par rapport à seulement 16.67% de patients de sexe féminin. Le sexe ratio est égal à 5.

La répartition en fonction de l'âge montre que le nombre de patient augmente avec l'âge avec une majorité de patients ayant plus de 60 ans (58.33%) et très peu avec un âge inférieur à 40 ans (2.27%). L'âge moyen des patients et des témoins était respectivement de 63.10 ± 9.532 ans et 61.60 ± 10.879 ans.

La répartition des sujets selon les facteurs étiologiques étudiés à savoir le tabac et l'alcool montre que la population de patients présente plus de fumeurs que la population de témoins avec 51.06% de fumeurs chez les témoins et 65.91% chez les patients. Le calcul du OR avec son IC à 95% en considérant les non-fumeurs comme référence montre une association entre ce facteur et le risque d'apparition du cancer hépatocellulaire (OR = 1.85, IC à 95% 1.14-3.02, $p=0.013$).

Concernant, la répartition en fonction de la consommation d'alcool, 19.86% des témoins étaient consommateur d'alcool par rapport à 21.97% chez les patients. La valeur du OR correspondante ne montre pas d'association significative de ce facteur avec le risque d'apparition de ce cancer ($p>0.05$) (Tableau 12).

2. Analyse du polymorphisme des gènes GSTM1 et GSTT1

La figure 21 montre un profil sur gel d'agarose des résultats d'une PCR multiplex où sont amplifiés, simultanément le gène GSTM1 dont la taille est de 215 paires de base (pb), le gène GSTT1, dont la taille est de 480pb et le gène de l'albumine dont la taille est de 380 pb et qui sert de contrôle interne de la PCR. La bande représentative du gène 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.

Le Tableau 13 présente la distribution des fréquences génotypiques de GSTM1 (non nul et nul), GSTT1 (non nul et nul) avec les OR correspondants et les IC à 95 %.

Nos résultats montrent que le génotype GSTM1 nul est plus fréquent chez les patients que chez les témoins puisqu'il est retrouvé avec une fréquence de 63.6 % chez les patients ayant un carcinome hépatocellulaire (CHC) contre 48.23% chez les témoins. Cette différence était significative ($p=0.011$).

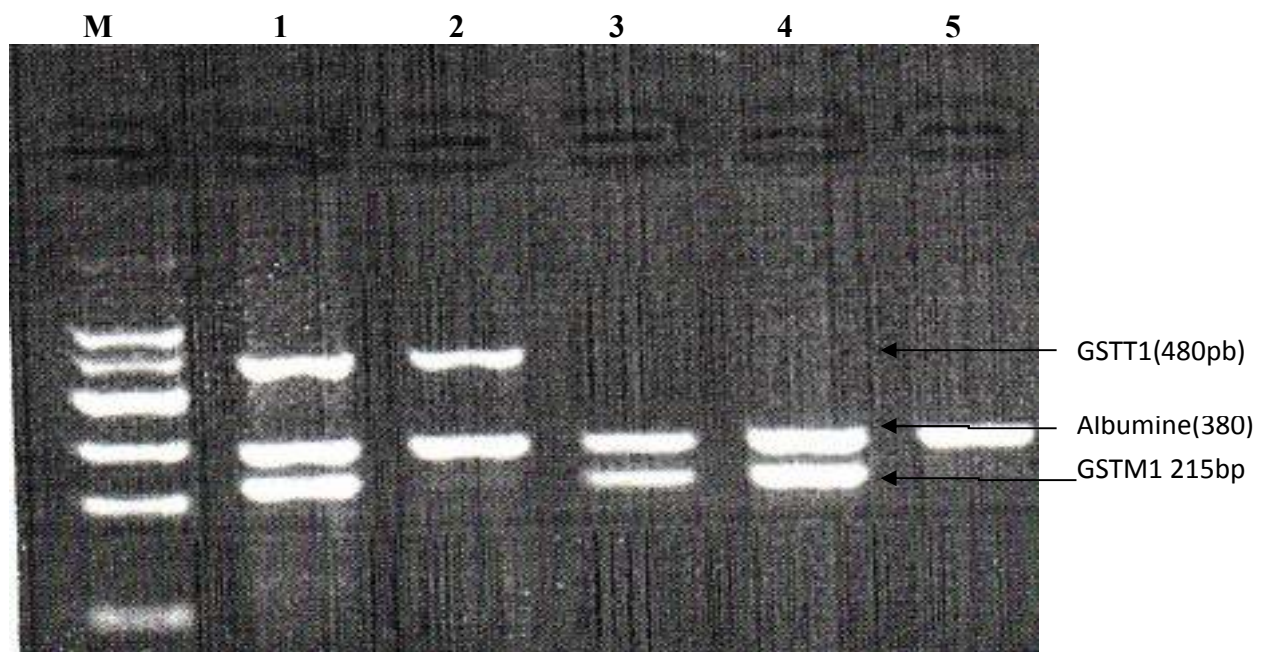


Figure 21: Profil de PCR multiplex des gènes GSTT1 (480 pb), GSTM1 (215 pb) et l'Alb (380 pb).

1 : GSTM1+ /GSTT1+.

2: GSTM1nul, GSTT1+.

3, 4 : GSTM1+, GSTT1nul.

5:GSTM1 nul, GSTT1nul.

M : marqueur de poids moléculaire de l'ADN.

Le calcul du OR montre une association entre le GSTM1 nul et le risque de développer un CHC (OR =1.88, IC à 95% 1.16–3.05, p<0.05).

Concernant le génotype GSTT1 nul, il a été trouvé à une fréquence de 29.5% des patients ayant un CHC par rapport à 35.5% chez les témoins. Cette différence était non significative. Le calcul du OR montre que ce génotype ne présente aucune association avec le risque d'apparition du CHC (OR=0.76, IC à 95% 0.46-1.27, p>0.05).

Tableau 13 : Distribution des génotypes GSTM1 et GSTT1 chez les témoins et les patients.

Génotypes	Patients n=132(%)	Contrôles n=141(%)	OR (IC à 95%)	P value
GSTM1				
Present	48(36.4)	73(51.77)	1.0	
Nul	84(63.6)	68(48.23)	1.88(1.16-3.05)	0.011*
GSTT1				
Present	93(70.5)	91(64.50)	1.0	
Nul	39(29.5)	50(35.50)	0.76(0.46-1.27)	0.298

*P<0.05.

Les ORs associés aux génotypes GSTM1 et GSTT1 ont été ajustés pour la consommation de tabac et sont représentés dans le Tableau 14.

Une augmentation du risque a été observée chez les fumeurs porteurs du génotype GSTM1 nul par rapport aux non-fumeurs, puisque le OR est plus important chez les fumeurs GSTM1 nul (OR=2, IC à 95% 1.05-3.8, p=0.034).

Tableau 14 : Risque de CHC associé aux GSTM1 et le statut tabagique.

	Génotypes	Patients/Contrôles	OR (IC à 95%) ^a	P value
Non-fumeurs	GSTM1			
	Present	19/37	1.0	
	Nul	26/32	1.58 (0.74-3.38)	0.236
fumeurs	GSTM1			
	Present	29/36	1.0	
	Nul	58/36	2.00 (1.05-3.8)	0.034*

^aOR ajusté pour la consommation de tabac. *P<0.05.

3. Analyse du polymorphisme de gène NAT2

Le gène NAT2 présente plusieurs formes alléliques caractérisées par une ou plusieurs substitutions nucléotidiques. Parmi ces différents allèles, certains sont associés à une activité diminuée, définissant les acétyleurs lents, qui sont alors soit homozygotes, soit double hétérozygotes pour un des allèles lents. Les allèles lents sont NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7 et NAT2*14. L'allèle de référence ou allèle sauvage est l'allèle NAT2*4. (Grant et al. 1997).

Après l'amplification du gène NAT2 en utilisant des couples d'amorces spécifiques selon l'allèle étudié, ces produits d'amplification sont digérés par des enzymes de restriction spécifique révélant les allèles de NAT2.

Le Tableau 15 présente, pour chaque allèle, la taille du produit d'amplification, l'enzyme de restriction utilisée et la taille des produits de digestion.

Tableau 15 : Taille des produits d'amplification et de digestion de chaque allèle NAT2.

Allèles	mutation	Enzymes de restrictions	Taille de l'amplicon (pb)	Produits générés (pb)	
				Sauvage	muté
NAT2					
NAT2*5	481(C →T)	KpnI	1109	593pb +516pb	1109pb
NAT2*6	590(G →A)	TaqI	835	243+226+196+170	396+243+196
NAT2*7	857(G →A)	BamHI	835	689+146	835pb
NAT2*14	191(G →A)	Msp I	1109	618+209+189+93	618+282+209

a. L'allèle NAT2*5

L'amplification du gène NAT2 donne un fragment de 1109pb qui contient un site de restriction polymorphe pour l'enzyme KpnI.

Le profil de digestion des individus porteurs de l'allèle sauvage est caractérisé par la présence du site de digestion, donnant naissance à deux fragments dont la taille est de 593pb et 516pb. Les individus porteurs de l'allèle NAT2*5 sont caractérisés par l'abolition du site de restriction. Le génotype NAT2*5/5 est objectivé par un seul fragment de 1109pb alors que l'hétérozygote a trois fragments : 1109pb, 593pb et 516pb.

Le Tableau 16 montre les fréquences génotypiques pour le polymorphisme NAT2*5. La fréquence de l'allèle NAT2*5 est de 36.74% chez les patients et 32.27 % chez les témoins. Cette différence est non significative. La valeur du OR ne montre pas la présence d'une association significative entre cet allèle et l'augmentation du risque de développement du carcinome hépatocellulaire (OR=1.22, IC à 95% 0.74-2.00).

Tableau 16 : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme NAT2*5.

	PATIENTS		TEMOINS		P	OR (IC 95%)
	Nombre n	Fréquence %	Nombre N	Fréquence %		
NAT2*5/5	29	21.97	24	17.02		
NAT2*5/+	39	29.55	43	30.50		
NAT2*+/+	64	48.48	74	52.48		
Allèle NAT2*5	36.74%		32.27%		0.517	1.22 (0.74-2.00)

b. L'allèle NAT2*6

L'amplification du gène NAT2 en utilisant le couple d'amorces (G5, G3) génère un fragment de 835pb. Ce produit d'amplification contient 3 sites de restriction de l'enzyme TaqI, deux sites constants et un site polymorphe en position 590 pb selon la présence ou de l'absence de la substitution de la base G en A.

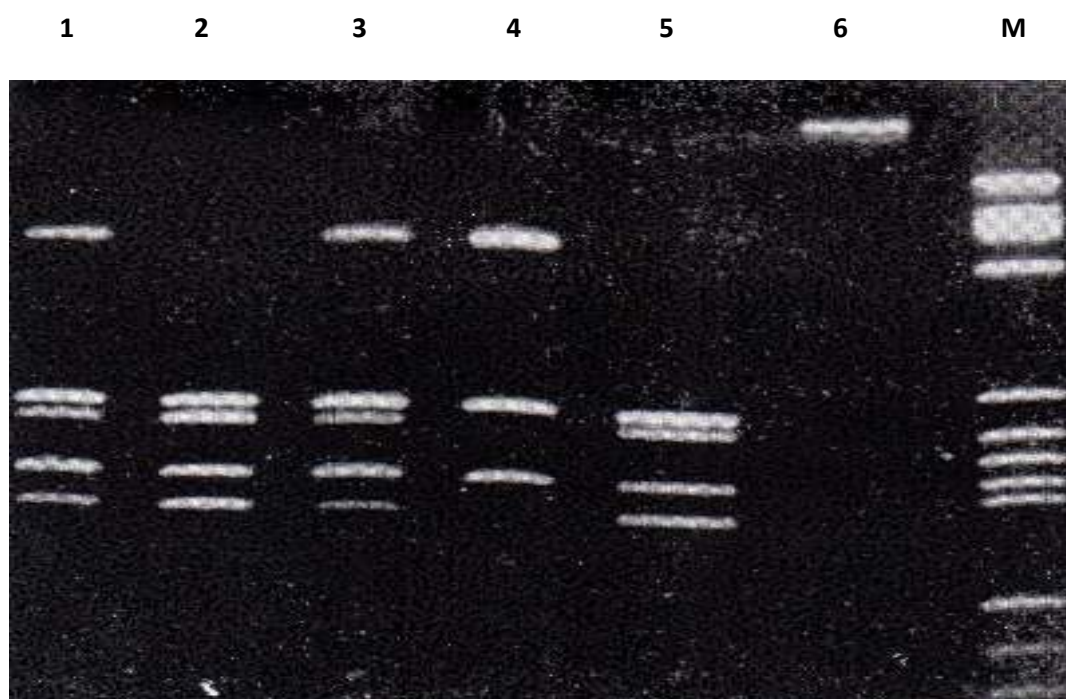


Figure 22: Profil de digestion de l'enzyme TaqI.

1 et 3 : NAT2*6/+
2 et 5 : NAT2*+/
4 : NAT2*6/*6
6 : ADN non digéré
M : marqueur PM.

Les individus porteurs de l'allèle sauvage s'accompagne de l'apparition du site de restriction, alors que les individus porteur de l'allèle NAT2*6 s'accompagne d'une perte du site de restriction tel que le montre la Figure 22 représentative du profil de digestion de l'enzyme TaqI. Le nombre et la taille des fragments de digestion nous renseignent sur le génotype homozygote ou hétérozygote de l'individu.

La présence du génotype sauvage (NAT2*+/+) 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, alors que les hétérozygotes NAT2*6/+ présentent les 5 fragments : 396pb, 243pb, 226pb, 196pb et 170pb.

Tableau 17 : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme NAT2*6.

	PATIENTS		TEMOINS		P	OR (IC 95%)
	Nombre n	Fréquence %	Nombre N	Fréquence %		
NAT2*6/6	38	28.79	31	21.99		
NAT2*6/+	28	21.21	33	23.40		
NAT2*+/+	66	50	77	54.61		
Allèle NAT2*6	39.39 %		33.69 %		0.404	1.27(0.78-2.08)

Le génotype homozygote NAT2*6/6 étaient plus fréquents chez les patients (28.79%) que chez les témoins (21.99%). Les fréquences de l'allèle NAT2*6 chez les témoins et chez les patients, ne montrent pas une différence statistiquement significative (Tableau 17).

La valeur du OR ne montre pas une grande association entre cet allèle et l'augmentation du risque de développement du CHC (OR= 1.27, IC à 95% 0.78-2.08).

c. L'allèle NAT2*7

Le même fragment de 835pb est utilisé pour la mise en évidence de l'allèle NAT2*7 par une digestion enzymatique par l'utilisation de l'enzyme BamHI.

Les individus ayant le génotype sauvage sont caractérisés par la présence du site de digestion générant deux fragments de 689pb et 146pb. Les individus porteurs de l'allèle NAT2*7 à l'état homozygote ne présenterons qu'un fragment de 835pb puisqu'ils présentent

une abolition du site de restriction. Les individus hétérozygotes auront les trois fragments de 835pb, 689pb et 146pb.

D'après les résultats portés dans le Tableau 18 le génotype NAT2*7/7 était absent aussi bien chez les patients que chez les témoins. La fréquence de cet allèle était par ailleurs faible avec seulement 3.03% chez les patients et 3.55% chez les témoins. Cette différence était non significative. Aucune association entre cet allèle et l'augmentation de la susceptibilité d'apparition du carcinome hépatocellulaire.

La valeur du OR (OR=0.855 IC à 95% 0.22-3.24) suggère que cet allèle aurait plutôt un effet protecteur.

Tableau 18 : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme NAT2*7.

	PATIENTS		TEMOINS		P	OR (IC 95%)
	Nombre n	Fréquence %	Nombre N	Fréquence %		
NAT2*7/7	00	00	00	00		
NAT2*7/+	08	6.06	10	7.09		
NAT2*+/+	124	93.94	131	92.91		
Allèle NAT2*7	3.03 %		3.55 %		1	0.85(0.22-3.24)

d. L'allèle NAT2*14

Le produit d'amplification de 1109pb du gène NAT2 est aussi utilisé pour la mise en évidence de l'allèle NAT2*14 par l'utilisation de l'enzyme Msp I. Ce fragment présente un site constant et un site polymorphe en position 191pb par la substitution de la base G en la base A.

Les individus porteurs de l'allèle sauvage (+) présentent le site de restriction, en comparaison aux individus porteurs de l'allèle NAT2*14 chez qui le site est absent.

Les individus avec le génotype +/+ présentent un profil avec quatre fragments de digestion de 618pb, 209pb, 189pb et 93pb. Les individus porteurs du génotype NAT2*14/14 présentent trois fragments de 618pb, 282pb et 209pb, alors que les hétérozygotes NAT2*14/+ auront donc les cinq fragments de 618pb, 282pb, 209pb, 189pb et 93pb.

La fréquence du génotype NAT2*14/14 étaient pratiquement similaire chez les témoins et les patients avec 8.33% chez les patients et 8.51% chez les témoins.

La fréquence de l'allèle NAT2*14 chez les patients ayant un carcinome hépatocellulaire étaient de 12.50%, alors qu'elles étaient de 12.77% chez les témoins. Cette légère différence était statistiquement non significative ($p>0.05$) (Tableau19).

Tableau 19 : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme NAT2*14.

	PATIENTS		TEMOINS		P	OR (IC 95%)
	Nombre n	Fréquence %	Nombre n	Fréquence %		
NAT2*14/14	11	8.33	12	8.51		
NAT2*14/+	11	8.33	12	8.51		
NAT2*+ /+	110	83.33	117	82.98		
Allèle NAT2*14	12.50%		12.77%		1	1.00(0.49-2.04)

e. Analyse des associations génotypiques entre les allèles NAT2, ainsi que le phénotype acétyleur lent

Les fréquences des génotypes associées aux différents allèles étudiés du gène NAT2 chez les patients et les témoins sont représentées dans le Tableau 20.

La fréquence des associations génotypiques NAT2*5/6, NAT2*5/7, NAT2*5/14, NAT2*6/7, NAT2*6/14 et NAT2*7/14 associées à un phénotype d'acétyleurs lents n'était pas significativement différente entre nos patients et nos témoins.

Tableau 20 : Les fréquences des associations génotypiques avec les allèles NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7, NAT2*14.

Génotype	Patients 132	Contrôles 141	P value
	n (%)	n (%)	
NAT2*5/6	15 (11.36)	19 (13.47)	NS
NAT2*5/7	6 (4.55)	4 (2.84)	NS
NAT2*5/14	10 (7.58)	3 (2.13)	NS
NAT2*6/7	2 (1.52)	3 (2.13)	NS
NAT2*6/14	1 (0.76)	3 (2.13)	NS
NAT2*7/14	0 (0.00)	1 (0.71)	NS

NS : non significative.

Cependant, la prise en considération de tous les individus ayant un phénotype acétyleur lent représenté par les allèles NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7 et NAT2*14 à l'état homozygote et à l'état double hétérozygote montre une différence statistiquement significative ($P < 0.05$) entre les patients et les témoins, puisque les acétyleurs lents sont présent à une fréquence de 84.85% chez les patients, par rapport à 70.92% chez les témoins (Tableau 20).

Le calcul du OR témoigne d'une augmentation du risque de développer un CHC chez les sujets porteurs du phénotype acétyleur lent (OR = 2.30, IC à 95% 1.26-4.18, $p < 0.01$).

Tableau 21 : Distribution du phénotype NAT2 acétyleur lent dans notre population et calcul du OR

NAT2 phénotype	Patients (%) (N=132)	Contrôles (%) (N=141)	OR (IC à 95%)	P value
Acétyleur rapide	20(15.15)	41(29.08)	1.0	
Acétyleur lent	112(84.85)	100(70.92)	2.30(1.26-4.18)	0.006**

* $P < 0,05$. ** $P < 0,01$.

Le phénotype d'acétyleur lent est accompagné à l'échelle enzymatique par une réduction de l'activité enzymatique. L'exposition aux xénobiotiques notamment le tabac, favorise l'accumulation des métabolites dans la cellule, pouvant entraîner ainsi la formation de liaison avec les macromolécules tel que l'ADN et générer des mutations cancérigènes.

Nous avons donc effectué l'analyse conjointe des effets du tabac et de la présence du phénotype d'acétyleur lent sur le risque de développement du carcinome hépatocellulaire (CHC) et sont représentés dans le Tableau 22.

Une augmentation du risque a été observée chez les fumeurs porteurs du phénotype d'acétyleur lent NAT2 par rapport aux non-fumeurs, puisque le OR est plus important chez les fumeurs (OR=2.55 IC à 95%1.22-5.34) que chez les non-fumeurs (OR=2.42, IC à 95% 0.82-7.15).

Tableau 22 : Calcul du OR pour les acétyleurs lent associé au statut tabagique.

	Génotypes	Patients/Contrôles	OR (IC à 95%) ^a	P value
Non fumeurs	<i>NAT2</i> Acétyleur rapide	05/16	1.0	0.105
	Acétyleur lent	40/53	2.42 (0.82-7.15)	
Fumeurs	<i>NAT2</i> Acétyleur rapide	15/25	1.0	0.012*
	Acétyleur lent	72/47	2.55 (1.22-5.34)	

^aOR ajusté pour la consommation de tabac. ; *P<0,05. **P<0,01.

4. Analyse des interactions entre les gènes GSTM1, GSTT1 et le phénotype acétyleur lent

Les résultats de l'analyse de l'interaction gène-gène sont répertoriés dans le Tableau 23. A travers nos résultats, il apparaît que seul la combinaison GSTM1 nul/acétyleur lent présente une différence significative entre les patients et les témoins avec 55.30% chez les patients et seulement 35.46% chez les témoins. Les autres associations ne présentaient pas de différences significatives entre les deux populations.

La valeur du OR calculé montre que la combinaison GSTM1 nul/acétyleur lent est fortement associée au risque de CHC (OR=2.27, IC à 95% 1.29-4.01, p=0.005).

Tableau 23 : Effet de l'interaction entre GSTM1, GSTT1 nul et les acétyleurs lent sur le développement du CHC.

Combinaison génotypique	Fréquence Patients (%)	Fréquence Témoins (%)	OR(IC à 95%)	P value
GSTM1nul/ acétyleur lent	55.30	35.46	2.27(1.29-4.01)	0.005**
GSTM1nul/GSTT1nul	15.91	15.60	1.00(0.47-2.13)	1.000
GSTT1nul/acétyleur lent	23.48	25.53	0.85(0.45-1.62)	0.623

** $P < 0.01$.

Discussion

De plus en plus d'études indiquent une combinaison de facteurs environnementaux et une susceptibilité génétique comme paramètres majeurs déterminants pour le développement de plusieurs formes de cancer dont le cancer de la vessie, sein et hépatocellulaire.

Dans ce contexte, le polymorphisme génétique affectant les enzymes du métabolisme des xénobiotiques semble être un des facteurs génétiques des plus pertinents dans la sensibilité individuelle au risque d'apparition du cancer par défaut de détoxification enzymatique.

Nous rapportons par cette étude et pour la première fois, la répartition des polymorphismes génétiques de trois gènes d'enzymes de la phase II de détoxification des xénobiotiques (NAT2, GSTM1, GSTT1) et leur impact sur la susceptibilité à développer un carcinome hépatocellulaire (CHC) dans la population algérienne, en recherchant l'effet de la consommation du tabac sur le risque d'apparition de ce cancer.

Le carcinome hépatocellulaire faisant l'objectif de notre étude représente le type le plus fréquent de tumeur primitive du foie (Papoulas et Theocharis 2009). Les caractéristiques épidémiologiques de notre population d'étude montrent que notre échantillon est caractérisé par une prédominance de patients de sexe masculin (83.33%) dont l'âge est supérieur à 60 ans. Ce résultat est en accord avec ce qui a été rapporté dans la littérature (De Sanctis et al. 2020; Llovet et al. 2003).

La différence de la répartition en fonction du sexe est concordant avec d'autres données d'enquête et elle peut être liée au mode de vie, car les hommes sont, de par leurs professions, plus exposés aux toxines que les femmes. L'exposition au tabac est aussi plus importante, sachant que le tabac multiplie le risque par deux ou trois le risque au cancer hépatocellulaire (Fattovich et al. 2004). Nos patients étaient par ailleurs majoritairement fumeurs.

D'autres études (De Sanctis et al. 2020) ont expliqué cette prédominance masculine par une association au statut hormonal pouvant avoir un effet protecteur chez la femme.

Selon nos résultats, l'âge ne peut être considéré comme un facteur de risque pour le développement du CHC dans notre population d'étude ($p > 0.05$). Cependant la tranche d'âge la plus représentée est celle de 60 ans et plus. Ceci peut s'expliquer par un diagnostic tardif et une évolution sur un mode silencieux pendant une longue période. Les symptômes apparaissent tardivement et à un stade avancé de la tumeur et souvent peu spécifique du cancer lui-même.

Concernant le tabac, nos résultats montrent qu'il s'agit d'un facteur de risque pour le carcinome hépatocellulaire (OR=1.85, IC à 95% 1.14-3.02, p=0.013). Ceci est cohérent avec les résultats de Trichopoulos et al (2011) d'Asim et al (2010), et de Franceschi et al (2006), et constituant ainsi l'un des principaux facteurs étiologique du CHC, avec le VHB et le VHC.

Ceci peut s'expliquer par le fait que la cigarette contient plusieurs produits chimiques cancérigènes pouvant être métabolisés et activés, formant ainsi des adduits à l'ADN (Wang et al. 1998; Staretz et al. 1997). Une forte corrélation entre le CHC et les adduits d'ADN formés à la suite des hydrocarbures aromatiques polycycliques a été démontré (Chen et al. 2002).

En revanche, une absence d'association entre le tabac et le CHC a été signalé dans plusieurs travaux de recherches (Gelatti et al. 2005; Hadziyannis et al. 1995; Tanaka et al. 1992).

Par ailleurs, dans notre étude, la consommation d'alcool n'était pas significativement corrélée au risque d'apparition du CHC (p=0.669). Ce résultat est en contradiction avec les résultats d'Asim et al (2010) et de Sakamoto et al (2006) qui considèrent que l'alcool est un facteur de risque important dans l'étiologie du cancer hépatique.

Les enzymes de la phase II de détoxification et particulièrement les GST et NAT2 ont un rôle très important dans la biotransformation des substances xénobiotiques et cancérigènes. De nombreuses recherches suggèrent que leurs polymorphismes seraient liés à un déficit total ou partiel conduisant à un défaut de détoxification à effet génotoxique, favorisant ainsi l'apparition de cancer (Autrup 2000).

Les délétions homozygotes de GSTM1 et GSTT1 ont été associées à une réduction de la fonction de détoxification et à une susceptibilité accrue au cancer (Li et al. 2012).

Les résultats de l'analyse génotypique montrent que la délétion homozygote de GSTM1 était plus fréquente chez les patients (63.6%) que chez les témoins (48.23%) avec une association entre ce génotype et un risque d'apparition du CHC (OR = 1.88, IC à 95% 1.16-3.05, p=0.011). Des associations similaires ont également été décrites dans les populations asiatiques (Li et al. 2019; Asim et al. 2010; Wang et al. 2010; Dai Long et al. 2006), mais peu ou pas d'associations ont été signalées pour les populations brésiliennes, caucasiennes et africaines (Ferreira et al. 2021; Li et al. 2019; Wang et al. 2010; Ladero et al. 2006).

Des études sur d'autres types de cancer ont également rapporté des associations positives entre le polymorphisme de délétion de GSTM1 et un risque accru de cancer

colorectal dans la population brésilienne (Rodrigues-Fleming et al. 2018), du cancer de la vessie dans la population mongole (Avirmed et al. 2021), et le cancer du sein dans la population de Mizoram (Kimi et al. 2016).

Par contre, le polymorphisme de délétion de GSTT1 ne montre pas de différence significative entre les patients et les contrôles, sans association avec le risque de CHC. Ceci corrobore les résultats trouvés dans les populations asiatiques (Li et al. 2012; Asim et al. 2010), contrairement aux résultats trouvés dans les populations brésiennes et italiennes qui montre que le génotype GSTT1 nul augmenterait le risque d'apparition du CHC (Araujo et al. 2021; Boccia et al. 2015).

Une méta-analyse combinant les résultats de 46 études, incluant 6124 cas et 9781 témoins, établie par Li et ses collaborateurs en 2019 a rapporté que les génotypes GSTM1 nul GSTT1 nul étaient corrélés à une augmentation du risque d'apparition du carcinome hépatocellulaire (OR = 1.37, IC à 95% 1.18-1.59 pour le génotype GSTM1 nul et OR = 1.43, IC à 95% 1.23-1.66 pour le génotype GSTT1 nul).

L'analyse des sous-groupes a montré que cette association serait plus évidente dans les groupes ethniques asiatiques que dans les groupes caucasiens ou africains. Ceci est en accord avec nos résultats ou on ne retrouve pas l'association entre GSTT1 nul et le risque de CHC. Ces données différents d'une population à une autre confirme que les fréquences du polymorphisme de délétion des gènes GSTM1 et GSTT1 varient remarquablement selon l'origine ethnique (Wang et al. 2010).

Ces larges différences dans la prévalence de ces polymorphismes de détoxication 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 des carcinogènes, y compris ceux de la fumée de tabac, un rôle étiologique du tabagisme dans le CHC a donc été suggéré dans plusieurs travaux de recherches (Wang et al. 1998; Staretz et al. 1997), démontrant une association entre l'augmentation du risque de développer le CHC, le génotype GSTM1 nul et le statut fumeurs. Nos résultats sont en accord avec ces recherches et confirment cette relation vu l'existence d'un lien direct entre le génotype de GSTM1 nul et l'augmentation du risque de CHC chez les fumeurs (OR = 2.0, IC à 95% 1.05-3.8, p=0.034).

Cependant, l'association du tabagisme avec le CHC n'est pas toujours clairement établie puisque plusieurs études menées sur le cancer du CHC n'ont trouvé aucune association entre la délétion de GSTM1 et le statut tabagique (Gelatti et al. 2005; Munaka et al. 2003; Yu et al. 1999).

Cette incohérence dans les résultats est probablement due à des différences dans les populations étudiées, des antécédents génétiques, l'ethnicité et la variation géographique, ainsi que dans les environnements sociaux et de santé (Wang et al. 2010; Wild et Hall 2000).

La N-acétyltransférase intervenant dans la phase II de détoxification, est responsable du métabolisme des xénobiotiques, et des substances carcinogènes dont celles présentes dans le tabac. Certains polymorphismes sont associés sur le plan enzymatique à un défaut de détoxification a pouvoir génotoxique, pouvant conduire à l'apparition du cancer.

Le gène NAT2 présente plusieurs formes alléliques caractérisées par une ou plusieurs substitutions nucléotidiques. Parmi ces différents allèles, certains sont associés à une activité normale de l'enzyme, alors que d'autres sont associés à une activité réduite. Selon la combinaison allélique, les humains présentent trois phénotypes différents caractérisant l'activité enzymatique de NAT2. On parle des acétyleurs rapides, intermédiaires et acétyleurs lents selon qu'ils possédaient ou non, à l'état homozygote ou à l'état hétérozygote d'un des allèles NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7 et NAT2*14 (Agundez et Garcia-Martin 2018; Agundez et al. 1996). Les acétyleurs lents sont alors soit homozygotes soit double hétérozygotes pour un des allèles précédents.

Ces dernières années, ces polymorphismes ont fait l'objet d'importantes recherches. Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à la répartition des allèles NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7 et NAT2*14 qui ont été retrouvés respectivement avec des fréquences de 32.27%, 33.69%, 3.55% et 12.77% dans la population témoin. Ces allèles étaient présents avec les fréquences de 45.8%, 26.6%, 1.93% et 0% dans la population caucasiennes (Sabbagh et al. 2008) démontrant ainsi les différences des distributions alléliques selon l'origine ethnique.

Selon les fréquences enregistrés dans la littérature, les allèles NAT2*5 et NAT2*6 comptent parmi les plus fréquents dans le monde. L'allèle NAT2*7 semble être spécifique de la population asiatique et l'allèle NAT2*14 de la population africaine avec un gradient allant de l'Est vers l'Ouest (avec 19% en Guinée-Bissau, 3 % au Soudan et l'absence totale de cet allèle en Somalie) (Cavaco et al. 2003; Garte et al. 2001; Lin et al. 1994). D'après nos résultats les allèles NAT2*5 et NAT2*6 sont aussi les plus fréquents. Par ailleurs, l'allèle NAT2*7 était très peu représenté dans notre population témoin et l'allèle NAT2*14 qualifié d'allèle rare, puisqu'il est non détecté dans les populations Caucasiennes, américaines et Indiennes (Umamaheswaran et al. 2014; Sabbagh et al. 2008), il est rencontré avec une fréquence de 12.77% dans notre population témoin.

Le calcul de l'odds ratio n'a montré aucune association entre les allèles NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7 et NAT2*14 et le carcinome hépatocellulaire. Ce même résultat a aussi été obtenu sur la population égyptienne pour le cancer de la vessie ou aucun allèle NAT2 n'a présenté une association avec le risque d'apparition du cancer de la vessie, même en prenant en considération le statut fumeur (Saleh et al. 2019). Une association statistiquement significative est par ailleurs retrouvée entre les allèles NAT2*5 et NAT2*6 et le cancer de la vessie dans la population algérienne, que ce soit chez les patients hétérozygotes (OR = 2.36, IC à 95% 1.44-3.86 et OR = 2.58, IC à 95% 1.52- 4.37 respectivement) ou chez les patients mutants homozygotes (OR = 2.54, IC à 95% 1.47- 4.38 et OR = 2.67, IC à 95% 1.62- 4.40 respectivement) (Ribouh-Arras et al. 2019). Une autre étude a montré que l'allèle NAT2*5 était fortement incriminée dans la survenue du cancer du sein en particuliers chez les sujets fumeurs. Ceci confirme qu'une réduction de l'activité enzymatique et une exposition au tabac augmentent les risques au cancer (van der Hel et al. 2003).

En revanche, des études menées sur un groupe de patients atteints de cancer du cerveau à Taïwan ont montré que certains types de cancers cérébraux (les astrocytomes et les glioblastomes) sont plus fréquents chez les porteurs de l'allèle NAT2*7 (Liu et al. 2008).

En ce qui concerne les génotypes, nos résultats ne montrent pas d'associations particulières avec le risque d'apparition du carcinome hépatocellulaire. Par ailleurs, nous avons trouvés que le génotype NAT2*7/NAT2*7 était complètement absent chez les patients et chez les témoins. Ceci indique un phénomène de sélection de l'hétérozygosis.

Concernant le phénotype d'acétyleur lent, elle présente aussi d'importante variation selon les groupes ethniques. Nos résultats montrent que ce phénotype est présent à une fréquence de 70.92% dans la population témoin, Cette fréquence ce rapproche de celle retrouvés dans la population marocaine (72.39%) et éthiopienne (73.6%). Au contraire ce phénotype est moins fréquents (moins de 10%) dans la plupart des populations asiatiques (Aklillu et al. 2018; Guaoua et al. 2014).

Dans notre population, la distribution entre la population de témoins et de patients montre que les acétyleurs lents sont plus fréquent chez les patients (84.8%) que chez les témoins (70.9%) et sont associés à une augmentation du risque d'apparition du CHC (OR= 2.30, IC à 95% 1.26-4.18, P=0.006). Ce résultat confirme les résultats de plusieurs études similaires (Obada et al. 2016; Zhang et al. 2012; Farker et al. 2003).

Une méta-analyse de 54 études cas-témoins a montré que les génotypes associés à une acétylation lente étaient corrélés au risque de développer un cancer de la vessie, en particulier chez les Caucasiens et les asiatiques fumeurs ou non-fumeurs (Song et al. 2020). Cela témoigne que la capacité réduite des acétylateurs lents à détoxifier les carcinogènes, notamment ceux présents dans le tabac, les expose à un risque plus élevé de développer ce cancer par la formation d'adduits à l'ADN (Farker et al. 2003; Agundez et al. 1996).

La prise en considération du statut tabagique (Tableau 22) montre une augmentation du risque chez les fumeurs porteurs du phénotype d'acétylateur lent par rapport aux non-fumeurs étant donné que la valeur du OR est plus importante chez les fumeurs (OR=2.55 IC à 95% 1.22-5.34, p=0.012) que chez les non-fumeurs (OR= 2.42, IC à 95% 0.82-7.15, p=0.105). Ces mêmes observations ont aussi été faites avec le cancer de la vessie (Avirmed et al. 2021), mais ne semble pas s'appliquer au cancer du sein (Kocabas et al. 2004). Cette différence de résultats pourrait être liée à la variation ethnique.

Au contraire, d'autres études ont montré que ce sont les acétylateurs rapides qui augmenteraient le risque de développer le cancer, notamment le carcinome hépatocellulaire (Huang et al. 2003), et le cancer de la prostate chez les fumeurs dans la population indienne (Srivastava et Mittal 2005), vu leur rôle dans l'activation des procarcinogènes tels que les amines hétérocycliques.

Cette divergence sur le rôle du polymorphisme de NAT2 dans le CHC pourrait s'expliquer par le fait que le polymorphisme de NAT2 est engagé dans différentes voies métaboliques de diverses amines aromatiques (Gelatti et al. 2005). D'autre part l'origine ethnique différentes et la variabilité de la nature des carcinogènes auxquels les populations sont exposées sont aussi fortement impliqués (Zhang et al. 2005).

*Conclusion et
perspectives*

Le carcinome hépatocellulaire est un cancer dont l'incidence ne cesse d'augmenter ces dernières années. Son étiologie multifactorielle résulte d'effets combinés entre facteurs viraux, génétiques et environnementaux.

Notre étude avait pour but l'étude des polymorphismes génétiques des enzymes de détoxification des xénobiotiques de la phase II à savoir la glutathion-S-transférase et le N-acétyltransférase, afin de déterminer l'existence d'éventuelle relation entre ces enzymes et le risque d'apparition du carcinome hépatocellulaire dans notre population algérienne. Certains polymorphismes sont associés à un déficit fonctionnel et à un défaut de détoxification des substances carcinogènes dont l'accumulation est responsable de l'effet génotoxique favorisant l'apparition du cancer.

Notre travail montre que le polymorphisme de délétion du gène GSTM1 provoquant l'absence totale de la glutathion-S-transférase est associé au risque d'apparition du CHC. De même que la présence du phénotype d'acétyleur lent associé à une faible activité de la N-acétyltransférase et représentatif du profil d'acétylation le plus présent dans notre population (70.9%) est aussi associé à une augmentation de la susceptibilité au carcinome hépatocellulaire.

L'association de ces polymorphismes avec les substances du tabac, augmentent nettement le risque de susceptibilité à ce carcinome. L'élimination des produits carcinogènes tel que les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les amines aromatiques, largement présents dans la fumée de cigarette devient difficile en raison du déficit fonctionnel des enzymes du métabolisme des xénobiotiques

La connaissance des profils génotypiques des enzymes de biotransformation caractéristique de notre population algérienne nous a permis d'établir des associations avec le carcinome hépatocellulaire et les substances carcinogènes du tabac, fortement suspectée par plusieurs chercheurs.

Il serait par conséquent intéressant de prévoir dans nos perspectives :

- Agrandir la taille de l'échantillon pour confirmer les résultats de la présente étude et parvenir à de meilleures conclusions qui seront représentatif de la population algérienne.
- Identifier avec plus de précision les facteurs de risque impliqués dans l'étiologie de ce cancer notamment les facteurs environnementaux afin d'affiner le profil épidémiologique caractéristique de ce cancer dans la population algérienne

- Etudier d'autres polymorphismes génétiques en rapport avec la carcinogenèse hépatique, notamment les polymorphismes des enzymes de détoxification de la phase I comme le cytochrome P450 pour mieux déterminer les polymorphismes génétiques de susceptibilité.
- Rechercher un lien éventuel entre la distribution des polymorphismes génétiques et l'hépatite B, hépatite C reconnu comme étant des facteurs de risque au carcinome hépatocellulaire.
- Prospector l'implication d'autres polymorphismes génétiques impliqués dans les systèmes de réparation d'ADN fortement associé dans la genèse des cancers.
- Effectuer une étude méta-Analyse entre plusieurs études publiées pour clarifier certaines incohérence, confirmer la variabilité en association à l'origine ethnique et établir de manière plus clair l'implication des GSTM1, GSTT1 et NAT2 avec le carcinome hépatocellulaire.
- mettre en place des campagnes de sensibilisation et de dépistage et créer des unités de biologie moléculaire visant à accentuer les études génétiques.

*Références
bibliographiques*

A

- Abbas, Z., Abbas, M., Abbas, S., & Shazi, L. (2015). Hepatitis D and hepatocellular carcinoma. *World journal of hepatology*, 7(5), 777-786.
- Abd El Hameed, A. H., Negm, O. E., El-Gamal, O. M., Hamouda, H. E., El Nouby, K. A., & Ismail, G. M. (2010, May). Genetic polymorphism of glutathione S-transferases M1 and T1 in Egyptian patients with bilharzial bladder cancer. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 2(83), 296-301.
- Addou, O. (2015). Traitement de carcinome hépatocellulaire par chimioembolisation: expérience du service de Radiologie, CHU Hassan II, de FES. Thèse en médecine, Université Sidi Mohamed Ben AbdEllah, FES. 97p.
- Agundez, J. A., Ledesma, M. C., Benitez, J., Ladero, J. M., Rodriguez-Lescure, A., Diaz-Rubio, E., & Diaz-Rubio, M. (1995). *CYP2D6* genes and risk of liver cancer. *Lancet* (London, England), 830-831.
- Agundez, J. A., Olivera, M., Ladero, J. M., Rodriguez-Lescure, A., Ledesma, M. C., Diaz-Rubio, M., ...& Benitez, J. (1996). Increased risk for hepatocellular carcinoma in NAT2-slow acetylators and *CYP2D6*-rapid metabolizers. *Pharmacogenetics*, 6(6), 501-512.
- Agundez, J. A., & García-Martín, E. (2018). Human Arylamine N-Acetyltransferase Type 2: Phenotypic Correlation with Genotype-A Clinical Perspective. In *Arylamine N-acetyltransferases in health and disease: from pharmacogenetics to drug discovery and diagnostics*, 69-89.
- Aklillu, E., Carrillo, J. A., Makonnen, E., Bertilsson, L., & Djordjevic, N. (2018). N-Acetyltransferase-2 (NAT2) phenotype is influenced by genotype-environment interaction in Ethiopians. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 74(7), 903-911.
- Ambrosone, C. B., Freudenheim, J. L., Graham, S., Marshall, J. R., Vena, J. E., Brasure, J. R., Michalek, A. M., Laughlin, R., Nemoto, T., Gillenwater, K.A., & Shields, P. G. (1996). Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 genetic polymorphisms, and breast cancer risk. *Jama*, 276(18), 1494-1501.
- Ambrosone, C., Fred, K. (1998). NAT polymorphisms, reactions and susceptibility to cancer. In *biomarkers: medical and work place applications*, 190-210.
- Arand, M., Mühlbauer, R., Hengstler, J., Jäger, E., Fuchs, J., Winkler, L., & Oesch, F. (1996). A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Analytical biochemistry*, 236(1), 184-186.

- Araujo, O. C., de Paula, V. S., do Ó, K. M., Villela-Nogueira, C. A., & Araujo, N. M. (2021). Association of Polymorphisms in the Glutathione S-Transferase Theta-1 Gene with Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma in Brazilian Patients with Chronic Hepatitis C. *Vaccines*, 9(8), 831.
- Asim, M., Khan, L. A., Husain, S. A., Husain, S., Sarma, M. P., Ahmad, I., Sharma, J. K., Sharma, A., Sharma, S., Thayumanavan, L., & Kar, P. (2010). Genetic polymorphism of glutathione S transferases M1 and T1 in Indian patients with hepatocellular carcinoma. *Disease markers*, 28(6), 369-376.
- Astrid, L., & Laurent-Puig, P. (2010). La voie de signalisation RAS/MAPK. *Cancérologie Dig*, 2, 38-42.
- Audrey, B., Cabel, L., Hutt, E., & Moustarhfir, M. (2015). *Cancerologie. Medecine KB*, 396.
- Autrup, H. (2000). Genetic polymorphisms in human xenobiotic a metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 464(1), 65-76.
- Avirmed, S., Khuanbai, Y., Sanjaajamts, A., Selenge, B., Dagvadorj, B. U., & Ohashi, M. (2021). Modifying Effect of Smoking on GSTM1 and NAT2 in Relation to the Risk of Bladder Cancer in Mongolian Population: A Case-Control Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 22(8), 2479.

B

- Bailly, Matthieu. (2014). Interet et valeur pronostique de la TEP/TDM au 18F-FDG dans le bilan pré-transplantation hépatique du carcinome hépatocellulaire: Revue de la littérature et etude locale au CHRU de tours. Thèse en medecine. Université François-Rabelais. Académie d'Orléans –Tours, 65.
- Balsara, B. R., Pei, J., De Rienzo, A., Simon, D., Tosolini, A., Lu, Y. Y., Shen, F. M., Fan, X., Lin, W. Y., Buetow, K. H., London, W. T., & Testa, J. R. (2001). Human hepatocellular carcinoma is characterized by a highly consistent pattern of genomic imbalances, including frequent loss of 16q23. 1–24.1. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 30(3), 245-253.
- Baudin, B. (2017). Exploration biochimique du foie en 2017. *Revue Francophone des Laboratoires*, 490, 25-33.
- Beaune, P. (1986). Les cytochromes P-450 hépatiques humains, 2, 358-63.
- Beaune, P. H. (1993). Human cytochromes P450. Applications in pharmacology. *Thérapie*, 48(6), 521-526.

- Beaune, P. (2001). Alimentation et cancer: interactions entre génétique et xénobiotiques. *Gastro enterol Clin Biol*, 25, 20-25.
- Bell, D. A., Taylor, J. A., Butler, M. A., Stephens, E. A., Wiest, J., Brubaker, L. H., Kadlubar, F.F., & Lucier, G. W. (1993). Genotype/phenotype discordance for human arylamine N-acetyltransferase (NAT2) reveals a new slow-acetylator allele common in African-Americans. *Carcinogenesis*, 14(8), 1689-1692.
- Blanc, J. F. (2017). Carcinome hépatocellulaire: nouveautés épidémiologiques et démarche diagnostique. *Oncologie*, 19(5), 135-143.
- Blum, M., Grant, D. M., McBride, W., Heim, M., & Meyer, U. A. (1990). Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosom allocalization, and functional expression. *DNA and cell biology*, 9(3), 193-203.
- Boar, P., Coggan, M., Johnston, P., Ross, V., Suzuki, T., & Webb, G. (1990). Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: A complex of gene families. *Pharmacology & therapeutics*, 48(3), 357-369.
- Boccia, S., Miele, L., Panic, N., Turati, F., Arzani, D., Cefalo, C., Amore, R., Bulajic, M., Pompili, M., Rapaccini, G., Gasbarrini, A., Vecchia, C. L., & Grieco, A. (2015). The effect of CYP, GST, and SULT polymorphisms and their interaction with smoking on the risk of hepatocellular carcinoma. *Biomed research international*.
- Bolt, H. M., & Thier, R. (2006). Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Current drug metabolism*, 7(6), 613-628.
- Booth, J., Boyland, E., & Sims, A. P. (1961). An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochemical Journal*, 79(3), 516.
- Borie, F., Trétarre, B., Bouvier, A. M., Faivre, J., Binder, F., Launoy, G., Delafosse, P., Tissot, J., Peng, J., Grosclaude, P., Guizard, A.V., & Gras-Aygon, C. (2009). Primitive liver cancers: epidemiology and geographical study in France. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 21(9), 984-989.
- Bosch, F. X., Ribes, J., Díaz, M., & Cléries, R. (2004). Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*, 127(5), 5-16.
- Bourrie, M., Meunier, V., Berger, Y., & Fabre, G. (1996). Cytochrome P450 isoform inhibitors as a tool for the investigation of metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 277(1), 321-332.
- Boyault, S., Rickman, D. S., De Reyniès, A., Balabaud, C., Rebouissou, S., Jeannot, E., Hérault, A., Saric, J., Belghiti, J., Franco, D., Bioulacsage, P., Laurent-Puig, P., &

- Zucman-Rossi, J. (2007). Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*, 45(1), 42-52.
- Boyle, P., & Ferlay, J. (2005). Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Annals of oncology*, 16(3), 481-488.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- Bruhn, C., Brockmöller, J., Kerb, R., Roots, I., & Borchert, H. H. (1998). Concordance between enzyme activity and genotype of glutathione S-transferase theta (GSTT1). *Biochemical pharmacology*, 56(9), 1189-1193.
- Bruix, J., Sala, M., & Llovet, J. M. (2004). Chemo embolization for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 127(5), 179-188.
- Bruix, J., & Sherman, M. (2005). Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 42(5), 1208-1236.
- Butcher, N. J., Boukouvala, S., Sim, E., & Minchin, R. F. (2002). Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases. *The pharmacogenomics journal*, 2(1), 30-42.
- C**
- Caldwell, S. H., Crespo, D. M., Kang, H. S., & Al-Osaimi, A. M. (2004). Obesity and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 127(5), 97-103.
- Canada, S. (2013). Canadian Cancer Statistics Special topic: Liver cancer: 1–114.
- Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators. (1998). A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients. *Hepatology*, 28(3), 751-755.
- Cavaco, I., Reis, R., Gil, J. P., & Ribeiro, V. (2003). CYP3A4* 1B and NAT2* 14 alleles in a native African population. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 41, 606-609.
- Chang-Claude, J., Kropp, S., Jäger, B., Bartsch, H., & Risch, A. (2002). Differential effect of NAT2 on the association between active and passive smoke exposure and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 11(8), 698-704.
- Chayanupatkul, M., Omino, R., Mittal, S., Kramer, J. R., Richardson, P., Thrift, A. P., El-Serag, H. B., & Kanwal, F. (2017). Hepatocellular carcinoma in the absence of cirrhosis in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology*, 66(2), 355-362.

- Chen, X., Cheung, S. T., So, S., Fan, S. T., Barry, C., Higgins, J., Lai, K. M., Ji, Jiafi., Dudoit, S., Ng, I. O. L.,...& Brown, P. O. (2002). Gene expression patterns in human liver cancers. *Molecular biology of the cell*, 13(6), 1929-1939.
- Chen, C. J., Yang, H. I., Su, J. U. N., Jen, C. L., You, S. L., Lu, S. N., Phd, MD. , Tarn-Huang, G., & Reveal-HBV Study Group. (2006). Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *Jama*, 295(1), 65-73.
- Chikhi, Y. (2016). *Carcinomes Hépatocellulaires Caractéristiques Anato-mo-Cliniques et Evolutives* (Doctoral dissertation, Université D'Alger 1).
- Coleman, J., Blake-Kalff, M., & Davies, E. (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in plant science*, 2(4), 144-151.
- Costentin, C. E., Layese, R., Bourcier, V., Cagnot, C., Marcellin, P., Guyader, D., Pol, S., Larrey, D., De Ledinghen, V., Ouzen, D., Zoulim, F.,...& Hillaire, S. (2018). Compliance with hepatocellular carcinoma surveillance guidelines associated with increased lead-time adjusted survival of patients with compensated viral cirrhosis: a multi-center cohort study. *Gastroenterology*, 155(2), 431-442.
- Couinand, C. (1957). *Le Foie Etudes anatomiques et chirurgicales*. Paris: Masson, 284-9.
- Covolo, L., Gelatti, U., Talamini, R., Garte, S., Trevisi, P., Franceschi, S., Franceschini, M., Barbone, F., Tagger, A., Ribero, M. L., Parrinello, G., Donadon, V., Nardi, G.,& Donato, F. (2005). Alcohol dehydrogenase 3, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, alcohol consumption and hepatocellular carcinoma (Italy). *Cancer Causes & Control*, 16(7), 831-838.

D

- da Silva, T. D., Felipe, A. V., de Lima, J. M., Oshima, C. T. F., & Forones, N. M. (2011). N-Acetyltransferase 2 genetic polymorphisms and risk of colorectal cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 17(6), 760-765.
- Dai Long, X., Ma, Y., Wei, Y. P., & Deng, Z. L. (2006). The polymorphisms of GSTM1, GSTT1, HYL1* 2, and XRCC1, and aflatoxin B1-related hepatocellular carcinoma in Guangxi population, China. *Hepatology Research*, 36(1), 48-55.
- Dandara, C., Masimirembwa, C. M., Magimba, A., Kaaya, S., Sayi, J., Sommers, D. K., Snyman, J. R.,& Hasler, J. A. (2003). Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotypes in Africans: the identification of a new allele with nucleotide changes 481C> T and 590G> A. *Pharmacogenetics and Genomics*, 13(1), 55-58.

- de La Coste, A., Romagnolo, B., Billuart, P., Renard, C. A., Buendia, M. A., Soubrane, O., Fabre, M., Chelly, J., Beldjord, C., Kahn, A., & Perret, C. (1998). Somatic mutations of the β -catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15), 8847-8851.
- De Sanctis, V., Soliman, A. T., Daar, S., Alansary, N., Kattamis, A., Skafida, M., Galati, M. C., Christou, S., Campisi, S., Messina, G.,... & Kattamis, C. (2020). A concise review on the frequency, major risk factors and surveillance of hepatocellular carcinoma (HCC) in β -thalassemias: past, present and future perspectives and the ICET-A experience. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 12(1).
- Deguchi, T. (1992). Sequences and expression of alleles of polymorphic arylamine N-acetyltransferase of human liver. *Journal of Biological Chemistry*, 267(25), 18140-18147.
- Destreicher, M., Desmeules, J., Piguët, V., & Dayer, P. (1999). Interactions médicamenteuses: le rôle des cytochromes P450 (CYP). *Médecine et hygiène*, 57(2251), 793-800.
- Di Pietro, G., Gadelha, S. R., Sousa, S. M. B., de Melo, P. R. S., & Santos, F. R. (2012). N-acetyltransferase 2: Slow, intermediate or fast? A booming question of the molecular epidemiology in cancer research.
- Dilou, N., Patouillard, B., Audigier, J-C. (2004). Les classifications de prédiction de survie du carcinome hépatocellulaire. *Gastroentérologie Clinique Biologique*, 28, 359-366.
- E**
- Elmberg, M., Hulcrantz, R., Ekblom, A., Brandt, L., Olsson, S., Olsson, R., Lindgren, S., Loof, L., Stal, P., Wallersted, S., Almer, S., Gertzen, H. S., & Askling, J. (2003). Cancer risk in patients with hereditary hemochromatosis and in their first-degree relatives. *Gastroenterology*, 125(6), 1733-1741.
- El-Serag, H. B., Tran, T., & Everhart, J. E. (2004). Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 126(2), 460-468.
- El-Serag, H. B., & Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7), 2557-2576.
- El-Serag, H. B. (2012). Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 142(6), 1264-1273.
- Emerit, J., Beaumont, C., & Trivin, F. (2001). Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 55(6), 333-339.
- European Association For The Study Of The Liver. (2018). EASL clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*, 69(1), 182-236.

Evans, D. A. P., & White, T. A. (1964). Human acetylation polymorphism. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 63(3), 394-403.

F

Farker, K., Schotte, U., Scheele, J., & Hoffmann, A. (2003). Impact of N-acetyltransferase polymorphism (NAT2) in hepatocellular carcinoma (HCC)—an investigation in a department of surgical medicine. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 54(5-6), 387-391.

Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I., & Donato, F. (2004). Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*, 127(5), 35-50.

Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer*, 127(12), 2893-2917.

Ferreira, G. D., Fernandes, G. M. D. M., Penteado, C., Cória, V. R., Galbiatti-Dias, A. L. D. S., Russo, A., ... & Goloni-Bertollo, E. M. (2021). Polymorphisms in xenobiotic metabolism-related genes in patients with hepatocellular carcinoma: a case-control study. *Xenobiotica*, 51(6), 737-744.

Fleming, I. (2001). Cytochrome p450 and vascular homeostasis. *Circulation research*, 89(9), 753-762.

Foltynie, T., Sawcer, S., Brayne, C., & Barker, R. A. (2002). The genetic basis of Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 73(4), 363-370.

Forner, A., Reig, M., Bruix, J. (2018). Hepatocellular carcinoma.

Franceschi, S., Montella, M., Polesel, J., La Vecchia, C., Crispo, A., Dal Maso, L., Casarin, P., Izzo, F., Tommasi, L. G., Chemin, I., Trépo, C., Crovatto, M., & Talamini, R. (2006). Hepatitis viruses, alcohol, and tobacco in the etiology of hepatocellular carcinoma in Italy. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 15(4), 683-689.

Funae, Y., Kishimoto, W., Cho, T., Niwa, T., & Hiroi, T. (2003). CYP2D in the brain. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 18(6), 337-349.

Furet, Y., Bechtel, Y., Le Guellec, C., Bechtel, P. R., Autret-Leca, E., & Paintaud, G. (2002). Clinical relevance of N-acetyltransferase type 2 (NAT2) genetic polymorphism. *Thérapie*, 57(5), 427-431.

G

Ganne-Carrié, N. Comment améliorer le dépistage de l'hépatocarcinome? POST'U FMC-HGE 2017.

- Ganong, Barrett, Barman, Boitano, & Brooks. (2012). *Physiologie médicale. nouveaux horizons-ARS*, Paris.
- Garte, S., Gaspari, L., Alexandrie, A. K., Ambrosone, C., Autrup, H., Autrup, J. L., Baranova, H., Bathum, L., Benhamou, S., Boffetta, P., Bouchardy, C.,...& Taioli, E. (2001). Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 10(12), 1239-1248.
- Gelatti, U., Covolo, L., Talamini, R., Tagger, A., Barbone, F., Martelli, C., Cremaschini, F., Franceschi, S., Ribero, M. L., Garte, S. F. (2005). N-Acetyltransferase-2, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms, cigarette smoking and hepatocellular carcinoma: A case-control study. *International journal of cancer*, 115(2), 301-306.
- Gonzalez, F. J., Skodak, R. C., Kimura, S., Umeno, M., Zanger, U. M., Nebert, D. W., Gelboin, H. V., Hardwick, J. P., & Meyer, U. A. (1988). Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature*, 331(6155), 442-446.
- Grant, D. M. (1983). TANG, BK AND KALOW, W.: Variability in caffeine metabolism. *Clin.Pharmacol. Ther*, 33, 591-602.
- Grant, D. M. (1993). Molecular genetics of the N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics and Genomics*, 3(1), 45-50.
- Grant, D. M., Hughes, N. C., Janezic, S. A., Goodfellow, G. H., Chen, H. J., Gaedigk, A., Yu, V. L., & Grewal, R. (1997). Human acetyltransferase polymorphisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 376(1-2), 61-70.
- Grant, D. M. (2008). Structures of human arylamine N-acetyltransferases. *Current drug metabolism*, 9(6), 465-470.
- Gsur, A., Haidinger, G., Hinteregger, S., Bernhofer, G., Schatzl, G., Madersbacher, S., Marberger, M., Vutuc, C., & Micksche, M. (2001). Polymorphisms of glutathione-S-transferase genes (GSTP1, GSTM1 and GSTT1) and prostate-cancer risk. *International journal of cancer*, 95(3), 152-155.
- Gtex. (2017). Gene expression for GSTT1 (ENSG00000184674.8).
- Guaoua, S., Ratbi, I., Laarabi, F. Z., Elalaoui, S. C., Jaouad, I. C., Barkat, A., & Sefiani, A. (2014). Distribution of allelic and genotypic frequencies of NAT2 and CYP2E1 variants in Moroccan population. *BMC genetics*, 15(1), 156-61.
- Gueguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J. M. A., Batt, A. M., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., & Souidi, M. (2006, November).

Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance. In *Annales de biologie clinique*, 64(6), 535-548.

Guengerich, F. P. (2005). Human cytochrome P450 enzymes. In *Cytochrome P450*, 377-530.

Guerrero, R. B., & Roberts, L. R. (2005). The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*, 42(5), 760-777.

Guichard, C., Amaddeo, G., Imbeaud, S., Ladeiro, Y., Pelletier, L., Maad, I. B., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Letexier, M., Degos, F., Clement, B., Balabaud, C., Chevet, E., Laurent, A., Couchy, G., Letouzé, E., Calvo, F., & Zucman-Rossi, J. (2012). Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nature genetics*, 44(6), 694-698.

H

Ha, N. B., Ha, N. B., Ahmed, A., Ayoub, W., Daugherty, T. J., Chang, E. T., Lutchman, G. A., Garcia, G., Cooper, A.D., Keeffe, E. B., & Nguyen, M. H. (2012). Risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: a case-control study. *Cancer Causes & Control*, 23(3), 455-462.

Habig, W. H., Pabst, M. J., Fleischner, G., Gatmaitan, Z., Arias, I. M., & Jakoby, W. B. (1974a). The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(10), 3879-3882.

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974b). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.

Hadziyannis, S., Tabor, E., Kaklamani, E., Tzonou, A., Stuver, S., Tassopoulos, N., Mueller, N., & Trichopoulos, D. (1995). A case-control study of hepatitis B and C virus infections in the etiology of hepatocellular carcinoma. *International journal of cancer*, 60(5), 627-631.

Hamdy, S. I., Hiratsuka, M., Narahara, K., Endo, N., El-Enany, M., Moursi, N., Ahmed, M. S. E., & Mizugaki, M. (2003). Genotype and allele frequencies of TPMT, NAT2, GST, SULT1A1 and MDR-1 in the Egyptian population. *British journal of clinical pharmacology*, 55(6), 560-569.

Hammouda, D., Maaraf, S. (2012). *Registre des tumeurs d'Alger source INSP 1999-2012*.

Hassan, M. M., Curley, S. A., Li, D., Kaseb, A., Davila, M., Abdalla, E. K., Javle, M., Moghazy, D. M., Lozano, R. D., Abbruzzese, J. L., & Vauthey, J. N. (2010). Association of diabetes duration and diabetes treatment with the risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 116(8), 1938-1946.

- Hayes, J. D., & Strange, R. C. (2000). Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*, 61(3), 154-166.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 51-88.
- Heath, J. W., Stevens, A., & Young, B. (2008). Foie, Atlas d'histologie fonctionnelle de Weather (Ed DeBoeck). 12, 427-442.
- Hein, D. W., Rustan, T. D., Doll, M. A., Bucher, K. D., Ferguson, R. J., Feng, Y., ...& Gray, K. (1992). Acetyltransferases and susceptibility to chemicals. *Toxicology letters*, 64, 123-130.
- Hein, D. W., Grant, D. M., & Sim, E. (2000). Update on consensus arylamine N-acetyltransferase gene nomenclature. *Pharmacogenetics and Genomics*, 10(4), 291-292.
- Hein, D. W. (2002). Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 506, 65-77.
- Hein, D. W. (2006). N-acetyltransferase 2 genetic polymorphism: effects of carcinogen and haplotype on urinary bladder cancer risk. *Oncogene*, 25(11), 1649-1658.
- Hoensch, H., Morgenstern, I., Petereit, G., Siepmann, M., Peters, W. H. M., Roelofs, H. M. J., & Kirch, W. (2002). Influence of clinical factors, diet, and drugs on the human upper gastrointestinal glutathione system. *Gut*, 50(2), 235-240.
- Huang, Y. S., Chern, H. D., Wu, J. C., Chao, Y., Huang, Y. H., Chang, F. Y., & Lee, S. D. (2003). Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene, red meat intake, and the susceptibility of hepatocellular carcinoma. *The American journal of gastroenterology*, 98(6), 1417-1422.
- Hughes, H. B., Biehl, J. P., Jones, A. P., & Schmidt, L. H. (1954). Metabolism of isoniazid in man as related to the occurrence of peripheral neuritis. *American review of tuberculosis*, 70(2), 266-273.
- Hussain, S. P., Schwank, J., Staib, F., Wang, X. W., & Harris, C. C. (2007). TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*, 26(15), 2166-2176.
- I**
- Ingelman-Sundberg, M. (2005). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *The pharmacogenomics journal*, 5(1), 6-13.

J

Jablkowski, M., Bocian, A., Bialkowska, J., & Bartkowiak, J. (2005). A comparative study of P53/MDM2 genes alterations and P53/MDM2 proteins immunoreactivity in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 24(1), 117-125.

Jefferson, J. W., & Greist, J. H. (1996). Brussels sprouts and psychopharmacology: understanding the cytochrome P450 enzyme system. *Psychiatr Clin North Am*, 3, 205-222.

K

Khalaf, F. A., Basuni, A. A., El Daly, M., El-Said, H., Kilany, A., El-Sebai, H., ...& Raouf, A. A. (2013). Genetic polymorphism of N acetyltransferase 2 and its association with tumor markers and cigarette smoking in hepatocellular carcinoma. *Egyptian Journal of Biochemistry & Molecular Biology*, 31(2).

Kimi, L., Ghatak, S., Yadav, R. P., Chhuani, L., Lallawmzuali, D., Pautu, J. L., & Senthil Kumar, N. (2016). Relevance of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 gene polymorphism to breast cancer susceptibility in Mizoram population, Northeast India. *Biochemical genetics*, 54(1), 41-49.

Klingenberg, M. (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 75(2), 376-386.

Kocabaş, N. A., Şardaş, S., Cholerton, S., Daly, A. K., & Karakaya, A. E. (2004). N-acetyltransferase (NAT2) polymorphism and breast cancer susceptibility: a lack of association in a case-control study of Turkish population. *International journal of toxicology*, 23(1): 25-31.

Kowdley, K. V. (2004). Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 127(5), 79-86.

L

Ladero, J. M., Martínez, C., García-Martín, E., Ropero, P., Briceño, O., Villegas, A., Diaz-Rubio, M., & Agúndez, J. A. (2006). Glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms are not related to the risk of hepatocellular carcinoma: a study in the Spanish population. *European journal of cancer*, 42(1), 73-77.

Lamotte, G. (2002). Interactions médicamenteuses: le rôle des cytochromes P450 (CYP) (Doctoral dissertation).

Landi, S. (2000). Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 463(3), 247-283.

- Lang, N. P., Butler, M. A., Massengill, J., Lawson, M., Stotts, R. C., Hauer-Jensen, M., & Kadlubar, F. F. (1994). Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 3(8), 675-682.
- Lauby-Secretan, B., Scoccianti, C., Loomis, D., Grosse, Y., Bianchini, F., & Straif, K. (2016). Body fatness and cancer—view point of the IARC Working Group. *New England journal of medicine*, 375(8), 794-798.
- Laurent-Puig, P., Legoux, P., Bluteau, O., Belghiti, J., Franco, D., Binot, F., Monges, G., Thomas, G., Bioulac-Sage, P., & Zucman-Rossi, J. (2001). Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, 120(7), 1763-1773.
- Laurent-Puig, P., & Zucman-Rossi, J. (2006). Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene*, 25(27), 3778-3786.
- Leong, T. Y. M., & Leong, A. S. Y. (2005). Epidemiology and carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. *Hpb*, 7(1), 5-15.
- Levrero, M. (2006). Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene*, 25(27), 3834-3847.
- Lewis, D. F. (2004). 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics*, 5(3), 305-318.
- Li, M., Zhao, H., Zhang, X., Wood, L. D., Anders, R. A., Choti, M. A., Pawlik, T. M., Daniel, H. D., Kannangai, R., Offerhaus, G. J. A., Velculescu, V. E., Wang, L., Zhou, S., Vogelstein, B., Hruban, R. H., Papadopoulos, N., Cai, J., Torbenson, M. S., & Kinzler, K. W. (2011). Inactivating mutations of the chromatin remodeling gene ARID2 in hepatocellular carcinoma. *Nature genetics*, 43(9), 828-829.
- Li, C. G., Zhao, Z. M., Hu, M. G., & Liu, R. (2012). Predictive role of glutathione-S-transferase gene polymorphisms in risk and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(7), 3247-3252.
- Li, S., Xue, F., Zheng, Y., Yang, P., Lin, S., Deng, Y., Xu, P., Zhou, L., Hao, Q., Zhai, Z., Wu, Y., Dai, Z., & Chen, S. (2019). GSTM1 and GSTT1 null genotype increase the risk of hepatocellular carcinoma: evidence based on 46 studies. *Cancer cell international*, 19(1), 1-12.

- Lin, H. J., Han, C. Y., Lin, B. K., & Hardy, S. (1994). Ethnic distribution of slow acetylator mutations in the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) gene. *Pharmacogenetics*, 4(3), 125-134.
- Lin, J. H., & Lu, A. Y. (1998). Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clinical pharmacokinetics*, 35(5), 361-390.
- Liu, H. E., Hsiao, P. Y., Lee, C. C., Lee, J. A., & Chen, H. Y. (2008). NAT2* 7 allele is a potential risk factor for adult brain tumors in Taiwanese population. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 17(3), 661-665.
- Liu, D., Liu, Y., Ran, L., Shang, H., & Li, D. (2013). GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and prostate cancer risk in Asians: a systematic review and meta-analysis. *Tumor Biology*, 34(5), 2539-2544.
- Llovet, J. M., Brú, C., & Bruix, J. (1999). Prognosis of hepatocellular Carcinoma : the BCLC staging classification. In *Seminars in liver disease*, 19(3), 329-338.
- Llovet, J. M., Burroughs, A., Bruix, J. (2003). Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 362 (9399), 1907–1917.
- Llovet, J. M., Di Bisceglie, A. M., Bruix, J., Kramer, B. S., Lencioni, R., Zhu, A. X., Sherman, M., Schwartz, M., Lotze, M., Talwalkar, J., Gores, G. J., & Panel of Experts in HCC-Design Clinical Trials. (2008a). Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(10), 698-711.
- Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J. F., Oliveira, A. C., Santoro, A., Raoul, J. L., Forner, A.,... & Bruix, J. (2008b). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England journal of medicine*, 359(4), 378-390.
- Lo, H. W., & Ali-Osman, F. (2007). Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance. *Current opinion in pharmacology*, 7(4), 367-374.
- Lok, A. S., Sterling, R. K., Everhart, J. E., Wright, E. C., Hoefs, J. C., Di Bisceglie, A. M., Morgan, T. R., Kim, H. Y., Lee, W. M., Bonkovsky, H. L., Dienstag, J., & Halt-C Trial Group. (2010). Des- γ -carboxy prothrombin and α -fetoprotein as biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 138(2), 493-502.

M

- Maaroufi, M. (2015). Traitement de carcinome hépatocellulaire par chimioembolisation : expérience du service de Radiologie, CHU HASSAN II, de FES. Thèse de spécialiste en médecine . Royaume du Maroc université sidi mohammed ben abdellah-Maroc.

- Maeda, S., Kamata, H., Luo, J. L., Leffert, H., & Karin, M. (2005). IKK β couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell*, 121(7), 977-990.
- Malaiyandi, V., Sellers, E. M., & Tyndale, R. F. (2005). Implications of CYP2A6 genetic variation for smoking behaviors and nicotine dependence. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 77(3), 145-158.
- Mannervik, B. (1985). The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 57, 357-417.
- Mathis, A. (2012). Le rôle des cytochromes P450 dans les interactions médicamenteuses et environnementales rencontrées à l'officine (Doctoral dissertation, Université de lorraine).
- Mazzaferro, V., Regalia, E., Doci, R., Andreola, S., Pulvirenti, A., Bozzetti, F., Montalto, F., Ammatuna, M., Morabito, A., & Gennari, L. (1996). Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *New England Journal of Medicine*, 334(11), 693-700.
- McDonagh, E. M., Boukouvala, S., Aklillu, E., Hein, D. W., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2014). PharmGKB summary: very important pharmacogene information for N-acetyltransferase 2. *Pharmacogenetics and genomics*, 24(8), 409.
- Meeks, R. G., Harrison, S. D., Bull, R. J. (1991). *Hepatotoxicology*. Boca Raton (Florida): CRC Press, 700.
- Meyer, D. J., Coles, B., Pemble, S. E., Gilmore, K. S., Fraser, G. M., & Ketterer, B. (1991). Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochemical Journal*, 274(2), 409-414.
- Moy, K. A., Yuan, J. M., Chung, F. L., Wang, X. L., Van Den Berg, D., Wang, R., Gao, Y. T., & Yu, M. C. (2009). Isothiocyanates, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and gastric cancer risk: A prospective study of men in Shanghai, China. *International journal of cancer*, 125(11), 2652-2659.
- Munaka, M., Kohshi, K., Kawamoto, T., Takasawa, S., Nagata, N., Itoh, H., Oda, Susumu, & Katoh, T. (2003). Genetic polymorphisms of tobacco- and alcohol-related metabolizing enzymes and the risk of hepatocellular carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 129(6), 355-360.

N

- Nakagawa, H., & Maeda, S. (2012). Molecular mechanisms of liver injury and hepatocarcinogenesis: focusing on the role of stress-activated MAPK. *Pathology research international*.

- Naugler, W. E., Sakurai, T., Kim, S., Maeda, S., Kim, K., Elsharkawy, A. M., & Karin, M. (2007). Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science*, 317(5834), 121-124.
- Nault, J. C., Mallet, M., Pilati, C., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Laurent, C., Laurent, A., Cherqui, D., Balabaud, C., & Zucman-Rossi, J. (2013). High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nature communications*, 4(1), 1-7.
- NCBI. (2017a). Homo sapiens glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1), transcript variant 2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>.
- NCBI. (2017b). glutathione S-transferase theta-1 isoforma [Homo sapiens]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000844.2.
- Nebert, D. W., & Russell, D. W. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet*, 360(9340), 1155-1162.
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gusalus, I. C., & Nebert, D. W. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, genemapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6(1), 1-42.
- Nelson, H. H., Wiencke, J. K., Christiani, D. C., Cheng, T. J., Zuo, Z. F., Schwartz, B. S., Lee, B. K., Spitz, M. R., Wang, M., Xu, X., & Kelsey, K. T. (1995). Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis*, 16(5), 1243-1246.
- O**
- Obada, M., El-Fert, A., Gomaa, A., Hashim, M., Kohla, M., Abdelrazek, W., & El-Said, H. (2016). Xenobiotics Metabolizing Enzymes Gene Polymorphism and susceptibility of Hepatocellular Carcinoma in Egyptian Patients with Hepatitis C Virus-induced Cirrhosis. *Bulletin of Egyptian Society for Physiological Sciences*, 36(2), 53-67.
- Olivier, M., Hollstein, M., & Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(1), a001008.
- Omura, T., & Sato, R. (1962). A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem*, 237(4), 1375-1376.
- Ortiz de Montellano, P. R. (1995). *Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry*. (2e édition). New York: Plenum Press, 652.

P

- Pache, I., Bize, P., Halkic, N., Montemurro, M., Giostra, E., Majno, P., & Moradpour, D. (2010). Management of hepatocellular carcinoma. *Revue Medicale Suisse*, 6(233), 198-202.
- Papoulas, M., & Theocharis, S. (2009). Primary liver tumors: origin and target therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 13(8), 957-965.
- Park, J. W., Chen, M., Colombo, M., Roberts, L. R., Schwartz, M., Chen, P. J., Kudo, M., Johnson, P., Wanger, S., Orsini, L. S., & Sherman, M. (2015). Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the BRIDGE Study. *Liver International*, 35(9), 2155-2166.
- Parl, F. F. (2005). Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer letters*, 221(2), 123-129.
- Patton, K. T., & Thibodeau, G. A. (2013). *Mosby's handbook of anatomy & physiology*. Elsevier Health Sciences.
- Pearson, W. R., Vorachek, W. R., Xu, S. J., Berger, R., Hart, I., Vannais, D., & Patterson, D. (1993). Identification of class-mu glutathione transferase genes GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1p13. *American journal of human genetics*, 53(1), 220.
- Pemble, S. E., & Taylor, J. B. (1992). An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-theta glutathione transferase cDNA sequences. *Biochemical journal*, 287(3), 957-963.
- Peng, Z. W., Zhang, Y. J., Chen, M. S., Xu, L., Liang, H. H., Lin, X. J., Guo, R. P., Zhang, Y. Q., & Lau, W. Y. (2013). Radiofrequency ablation with or without transcatheter arterial chemoembolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: a prospective randomized trial. *Journal of clinical oncology*, 31(4), 426-432.
- Pessayre, D. (1993). Cytochromes P450 and formation of reactive metabolites. Role in hepatotoxicity of drugs. *Thérapie*, 48(6), 537-548.
- Pez, F., Lopez, A., Kim, M., Wands, J. R., de Fromental, C. C., & Merle, P. (2013). Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: molecular targets for the development of innovative anticancer drugs. *Journal of hepatology*, 59(5), 1107-1117.
- Pinyol, R., Tovar, V., & Llovet, J. M. (2014). TERT promoter mutations: gatekeeper and driver of hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*, 61(3), 685-687.
- Pons, F., Varela, M. & Llovet, J.M., 2005. Staging systems in hepatocellular carcinoma. *HPB: the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, 7(1), 35-41.

Preissner, S. C., Hoffmann, M. F., Preissner, R., Dunkel, M., Gewiess, A., & Preissner, S. (2013). Polymorphic cytochrome P450 enzymes (CYPs) and their role in personalized therapy. *PloS one*, 8(12), e82562.

Pugh, R. N. H., Murray-Lyon, I. M., Dawson, J. L., Pietroni, M. C., & Williams, R. (1973). Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *British journal of surgery*, 60(8), 646-649.

Q

Qin, L. X., & Tang, Z. Y. (2002). The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology*, 8(3), 385.

R

Ribouh-Arras, A., Chaoui-Kherouatou, N., Hireche, A., Abadi, N., & Satta, D. (2019). Joint effect of N-acetyltransferase 2 gene and smoking status on bladder carcinogenesis in Algerian population. *Bio Technologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 100(2), 155-168.

Rodrigues-Fleming, G. H., de Mendonça Fernandes, G. M., Russo, A., Biselli-Chicote, P. M., Netinho, J. G., Pavarino, É. C., & Goloni-Bertollo, E. M. (2018). Molecular evaluation of glutathione S transferase family genes in patients with sporadic colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*, 24(39), 4462-4471.

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

Ronis, M. J., & Ingelman-Sundberg, M. (1999). Induction of human drug-metabolizing enzymes: mechanisms and implications. *Handbook of drug metabolism*. New York: Marcel Dekker, 239-62.

Rotunno, M., Lam, T. K., Vogt, A., Bertazzi, P. A., Lubin, J. H., Caporaso, N. E., & Landi, M. T. (2012). GSTM1 and GSTT1 copy numbers and mRNA expression in lung cancer. *Molecular carcinogenesis*, 51(S1), 142-150.

Rychlik-Sych, M., Skrêtkowicz, J., Gawrońska-Szklarz, B., Górnik, W., Sysa-Jêdrzejowska, A., & Skrêtkowicz-Szarmach, K. (2006). Acetylation genotype and phenotype in patients with systemic lupus erythematosus. *Pharmacological Reports*, 58(1), 22.

S

Sabbagh, A., Langaney, A., Darlu, P., Gérard, N., Krishnamoorthy, R., & Poloni, E. S. (2008). Worldwide distribution of NAT2 diversity: implications for NAT2 evolutionary history. *BMC genetics*, 9(1), 1-14.

- Sakamoto, T., Hara, M., Higaki, Y., Ichiba, M., Horita, M., Mizuta, T., Eguchi, Y., Yasutake, T., Ozaki, I.,...& Tanaka, K. (2006). Influence of alcohol consumption and gene polymorphisms of ADH2 and ALDH2 on hepatocellular carcinoma in a Japanese population. *International journal of cancer*, 118(6), 1501-1507.
- Sakamuro, D., Furukawa, T., & Takegami, T. (1995). Hepatitis C virus non structural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *Journal of virology*, 69(6), 3893-3896.
- Saleh, S. A. E. R., Zaghla, H. M. A., Bawady, S. A. H., Kotb, M., & Hammad, W. I. (2019). Assessment of N-acetyltransferase 2 (NAT2) gene polymorphisms in bladder cancer patients. *Journal of Nephroarmacology*, 8(2), 30-30.
- Salem, R., Lewandowski, R. J., Mulcahy, M. F., Riaz, A., Ryu, R. K., Ibrahim, S., Atassi, B., Baker, T., Gates, V., Miller, F. H.,...& Kulik, L. (2010). Radioembolization for hepatocellular carcinoma using Yttrium-90 microspheres: a comprehensive report of long-term outcomes. *Gastroenterology*, 138(1), 52-64.
- Salem, R., Lewandowski, R. J., Kulik, L., Wang, E., Riaz, A., Ryu, R. K., Sato, K. T., Gupta, R., Nikolaidis, P., Miller, F. H., Yaghmai, V.,...& Mulcahy, M. F. (2011). Radioembolization results in longer time-to-progression and reduced toxicity compared with chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 140(2), 497-507.
- Schmiedlin-Ren, P., Edwards, D. J., Fitzsimmons, M. E., He, K., Lown, K. S., Woster, P. M., Rahman, A., Thummel, K. E., Fisher, J. M., Hollenberg, P. F., & Watkins, P. B. (1997). Mechanisms of enhanced oral availability of CYP3A4 substrates by grapefruit constituents: decreased enterocyte CYP3A4 concentration and mechanism-based inactivation by furanocoumarins. *Drug Metabolism and Disposition*, 25(11), 1228-1233.
- Schulze, K., Imbeaud, S., Letouzé, E., Alexandrov, L. B., Calderaro, J., Rebouissou, S., Couchy, G., Meiller, C., Shinde, J., Soysouvanh, F., Calatayud, A. L.,...& Zucman-Rossi, J. (2015). Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nature genetics*, 47(5), 505-511.
- Senhaji, N., Kassogue, Y., Fahimi, M., Serbati, N., Badre, W., & Nadifi, S. (2015). Genetic polymorphisms of multi drug resistance gene-1 (MDR1/ABCB1) and glutathione S-transferase gene and the risk of inflammatory bowel disease among Moroccan patients. *Mediators of inflammation*.
- Sharma, N., Singh, A., Singh, N., Behera, D., & Sharma, S. (2015). Genetic polymorphisms in GSTM1, GSTT1 and GSTP1 genes and risk of lung cancer in a North Indian population. *Cancer Epidemiology*, 39(6), 947-955.

- Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 27-36.
- Shen, Y. H., Chen, S., Peng, Y. F., Shi, Y. H., Huang, X. W., Yang, G. H., Ding, Z. B., Yi, Y., Zhou, J., Qiu, S. J., Fan, J., & Ren, N. (2014). Quantitative assessment of the effect of glutathione S-transferase genes GSTM1 and GSTT1 on hepatocellular carcinoma risk. *Tumorbiology*, 35(5), 4007-4015.
- Shi, L., Feng, Y., Lin, H., Ma, R., & Cai, X. (2014). Role of estrogen in hepatocellular carcinoma: is inflammation the key?. *Journal of translational medicine*, 12(1), 1-9.
- Silvestri, L., Sonzogni, L., De Silvestri, A., Gritti, C., Foti, L., Zavaglia, C., Leverì, M., Cividini, A., Mondelli, M. U., Civardi, E., & Silini, E. M. (2003). Cyp Enzyme Polymorphisms And Susceptibility To Hcv-Related Chronic Liver Disease And Liver Cancer. *International Journal of Cancer*, 104, 310–317.
- Song, K., Yi, J., Shen, X., & Cai, Y. (2012). Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes GSTM1, GSTT1 and risk of hepatocellular carcinoma. *PloS one*, 7(11), e48924.
- Song, Y., Qi, X., & Liu, X. (2020). N-acetyltransferase 2 polymorphism is associated with bladder cancer risk: An updated meta-analysis based on 54 case-control studies. *Gene*, 757, 144924.
- Sprenger, R., Schlagenhafer, R., Kerb, R., Bruhn, C., Brockmüller, J., Roots, I., & Brinkmann, U. (2000). Characterization of the glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype–phenotype correlation. *Pharmacogenetics and Genomics*, 10(6), 557-565.
- Srivastava, D. S., & Mittal, R. D. (2005). Genetic polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene, and susceptibility to prostate cancer: a pilot study in north Indian population. *BMC urology*, 5(1), 1-6.
- Staretz, M. E., Murphy, S. E., Patten, C. J., Nunes, M. G., Koehl, W., Amin, S., Koenig, L. A., Guengerich, F. P., & Hecht, S. S. (1997). Comparative Metabolism of the Tobacco-Related Carcinogens Benzo [a] pyrene, 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol, and N'-Nitrosornicotine in Human Hepatic Microsomes. *Drug metabolism and disposition*, 25(2), 154-162.
- Strange, R. C., & Fryer, A. A. (1999). The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC scientific publications*, (148), 231-249.

Strange, R. C., Spiteri, M. A., Ramachandran, S., & Fryer, A. A. (2001). Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 482(1-2), 21-26.

T

Tanaka, K., Hirohata, T., Takeshita, S., Hirohata, I., Koga, S., Sugimachi, K., Kanematsu, T., Ohryohji, F., & Ishlbash, H. (1992). Hepatitis B virus, cigarette smoking and alcohol consumption in the development of hepatocellular carcinoma: a case-control study in Fukuoka, Japan. *International journal of cancer*, 51(4), 509-514.

Tang, K., Xue, W., Xing, Y., Xu, S., Wu, Q., Liu, R., Wang, X., & Xing, J. (2012). Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1, T1, and P1, and the assessment of oxidative damage in infertile men with varicoceles from north western China. *Journal of andrology*, 33(2), 257-263.

Taniguchi, K., Roberts, L. R., Aderca, I. N., Dong, X., Qian, C., Murphy, L. M., Nagorney, D.M., Lawrence, J. B., Roche, P. C., Smith, D. I., Ross, J. A., & Liu, W. (2002). Mutational spectrum of β -catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene*, 21(31), 4863-4871.

Thorgeirsson, S. S., & Grisham, J. W. (2002). Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature genetics*, 31(4), 339-346.

Touré, A., Diop, C., Cabral, M., Fall, M., Lhermitte, M., Diouf, A., ...& Allorge, D. (2012). Study of NAT2 genetic polymorphism in West African subjects: example of a healthy non-smoker Senegalese population. *Molecular biology reports*, 39(12), 10489-10496.

Tremosini, S., Forner, A., Boix, L., Vilana, R., Bianchi, L., Reig, M., Rimola, J., Rodriguez-Lope, C., Ayuso, C., Solé, M., & Bruix, J. (2012). Prospective validation of an immunohistochemical panel (glypican 3, heatshockprotein 70 and glutamine synthetase) in liver biopsies for diagnosis of very early hepatocellular carcinoma. *Gut*, 61(10), 1481-1487.

Trichopoulos, D., Bamia, C., Lagiou, P., Fedirko, V., Trepo, E., Jenab, M., ...& Riboli, E. (2011). Hepatocellular carcinoma risk factors and disease burden in a European cohort: a nested case-control study. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(22), 1686-1695.

U

Umamaheswaran, G., Kumar, D. K., & Adithan, C. (2014). Distribution of genetic polymorphisms of genes encoding drug metabolizing enzymes & drug transporters-a review with Indian perspective. *The Indian Journal of Medical Research*, 139, 27-65.

V

- van der Hel, O. L., Peeters, P. H., Hein, D. W., Doll, M. A., Grobbee, D. E., Kromhout, D., & de Mesquita, H. B. B. (2003). NAT2 slow acetylation and GSTM1 null genotypes may increase postmenopausal breast cancer risk in long-term smoking women. *Pharmacogenetics and Genomics*, 13(7), 399-407.
- Vatsis, K. P., Martell, K. J., & Weber, W. W. (1991). Diverse point mutations in the human gene for polymorphic N-acetyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(14), 6333-6337.
- Vauthey, J. N., Lauwers, G. Y., Esnaola, N. F., Do, K. A., Belghiti, J., Mirza, N., ... & Nagorney, D. M. (2002). Simplified staging for hepatocellular carcinoma. *Journal of clinical oncology*, 20(6), 1527-1536.
- Villanueva, A., Newell, P., Chiang, D., Friedman, S., & Llovet, J. (2007). Genomics and Signaling Pathways in Hepatocellular Carcinoma. *Seminars In Liver Disease*, 27(1), 055-076.
- Von Delius, S., Lersch, C., Schulte-Frohlinde, E., Fend, F., Dobritz, M., Schmid, R. M., & Eckel, F. (2006). Hepatocellular carcinoma associated with hereditary hemochromatosis occurring in non-cirrhotic liver. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 44(01), 39-42.

W

- Walker, K., Ginsberg, G., Hattis, D., Johns, D. O., Guyton, K. Z., & Sonawane, B. (2009). Genetic polymorphism in N-acetyltransferase (NAT): population distribution of NAT1 and NAT2 activity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 12(5-6), 440-472.
- Walraven, J. M., Zang, Y., Trent, J. O., & Hein, D. W. (2008). Structure/function evaluations of single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltransferase 2. *Current drug metabolism*, 9(6), 471-486.
- Wang, L. Y., Chen, C. J., Zhang, Y. J., Tsai, W. Y., Lee, P. H., Feitelson, M. A., Lee, C. S., & Santella, R. M. (1998). 4-Aminobiphenyl DNA damage in liver tissue of hepatocellular carcinoma patients and controls. *American journal of epidemiology*, 147(3), 315-323.
- Wang, B., Huang, G., Wang, D., Li, A., Xu, Z., Dong, R., ...& Zhou, W. (2010). Null genotypes of GSTM1 and GSTT1 contribute to hepatocellular carcinoma risk: evidence from an updated meta-analysis. *Journal of hepatology*, 53(3), 508-518.
- Watson, M. A., Stewart, R. K., Smith, G. B., Massey, T. E., & Bell, D. A. (1998). Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*, 19(2), 275-280.

- Weber, W. W., & Hein, D. W. (1979). Clinical pharmacokinetics of isoniazid. *Clinical pharmacokinetics*, 4(6), 401-422.
- Weber, W. W. & Hein, D. W., (1985). N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol Rev*, 37, 25-79.
- Weber, W. W. (1987). *The acetylator genes and drug response*. Oxford University Press, USA.
- White, D. L., Li, D., Nurgalieva, Z., & El-Serag, H. B. (2008). Genetic variants of glutathione S-transferase as possible risk factors for hepatocellular carcinoma: a HuGESystematic review and meta-analysis. *American journal of epidemiology*, 167(4), 377-389.
- Whittaker, S., Marais, R., & Zhu, A. X. (2010). The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 29(36), 4989-5005.
- Widersten, M., Pearson, W. R., Engström, A., & Mannervik, B. (1991). Heterologous expression of the allelic variant Mu-class glutathione transferases μ and ψ . *Biochemical Journal*, 276(2), 519-524.
- Wild, C. P., & Hall, A. J. (2000). Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 462(2-3), 381-393.
- X**
- Xu, S. J., Wang, Y. P., Roe, B., & Pearson, W. R. (1998). Characterization of the Human Class Mu Glutathione S-Transferase Gene Cluster and the GSTM1 Deletion. *Journal of Biological Chemistry*, 273(6), 3517-3527.
- Y**
- Yim, J. J., Yoo, C. G., Lee, C. T., Kim, Y. W., Han, S. K., & Shim, Y. S. (2002). Lack of association between glutathione S-transferase P1 polymorphism and COPD in Koreans. *Lung*, 180(2), 119-125.
- Yu, M. W., Chiu, Y. H., Chiang, Y. C., Chen, C. H., Lee, T. H., Santella, R. M., Chern, H. D., Liaw, Y. F., & Chen, C. J. (1999). Plasma carotenoids, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms, and risk of hepatocellular carcinoma: Independent and interactive effects. *American journal of epidemiology*, 149(7), 621-629.
- Z**
- Zeitoun, J. D., Chrysostalis, A., & Lefèvre, J. (2017). *HEG-Hépatologie, Gastrologie, Enterologie ,chirurgie viscérale (6ème Edition)*. Paris: KB, 606.

- Zhai, Y., Zhou, G., Deng, G., Xie, W., Dong, X., Zhang, X., Yu, L., Yang, H., Yuan, X., Zhang, H., Zhi, L., Yao, Z., Shen, Y., Qiang, B., & He, F. (2006). Estrogen receptor α polymorphisms associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus carriers. *Gastroenterology*, 130(7), 2001-2009.
- Zhang, B. H., Yang, B. H., & Tang, Z. Y. (2004). Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 130(7), 417-422.
- Zhang, X. F., Bian, J. C., Zhang, X. Y., Zhang, Z. M., Jiang, F., Wang, Q. M., Wang, Q. J., Cao, Y. Y., & Tang, B. M. (2005). Are polymorphisms of N-acetyltransferase genes susceptible to primary liver cancer in Luoyang, China?. *World journal of gastroenterology: WJG*, 11(10), 1457-1462.
- Zhang, J., Xu, F., & Ouyang, C. (2012). RETRACTED ARTICLE: Joint effect of polymorphism in the N-acetyltransferase 2 gene and smoking on hepatocellular carcinoma. *Tumor Biology*, 33(4), 1059-1063.
- Zhang, H., Wu, X., Xiao, Y., Chen, M., Li, Z., Wei, X., & Tang, K. (2014). Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and T1, and evaluation of oxidative stress in patients with non-small cell lung cancer. *European Journal of Medical Research*, 19(1), 1-6.
- Zhou, Q., Lui, V. W., & Yeo, W. (2011). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma. *Future oncology*, 7(10), 1149-1167.
- Zhu, Z., Zhang, J., Jiang, W., Zhang, X., Li, Y., & Xu, X. (2015). Risks on N-acetyltransferase 2 and bladder cancer: a meta-analysis. *OncoTargets and therapy*, 8, 3715.
- Zhu, R. X., Seto, W. K., Lai, C. L., & Yuen, M. F. (2016). Epidemiology of hepatocellular carcinoma in the Asia-Pacific region. *Gut and liver*, 10(3), 332.
- Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J. C., & Llovet, J. M. (2015). Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 149(5), 1226-1239.

Sites web:

<http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx>

<http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>

Les annexes

Annexe 1:
Classification TNM

Classification TNM

(American Liver Tumor Study Group)

T1	Nodule unique < 2 cm
T2	Nodule unique 2-5 cm ou 2-3 nodules < 3 cm
T3	Nodule unique > 5 cm ou 2-3 nodules, dont au moins un > 3 cm
T4a	≥ 4 nodules, quelle que soit la taille
T4b	T2, T3, T4a plus envahissement vasculaire : veine porte ou veine hépatique intra-hépatiques
N1	Atteinte ganglionnaire régionale (<i>portal hepatis</i>)
M1	Atteinte métastatique ou veine porte ou veine hépatique extra-hépatiques

Annexe 2

Consentement pour la participation à une étude scientifique

Intitulé de l'étude : Implication du polymorphisme génétique des enzymes de détoxification dans le carcinome hépatocellulaire

Je, soussigné(e), (Nom et prénom) :né(e)le.....
demeurant à

déclare avoir été informé(e), de la nature, des objectifs et du déroulement de l'étude scientifique concernant le carcinome hépatocellulaire.

A cet effet, je donne mon accord pour la participation à cette étude et je permets, l'utilisation de mon ADN extrait à partir du sang prélevé.

Ma participation est totalement volontaire. Je peux refuser de participer ou me retirer de l'étude à tout moment.

J'accepte que mes échantillons biologiques soient conservés et utilisés à des fins de recherche médicale et /ou biologique, seulement dans le cadre de la maladie désignée ci-dessus. J'ai compris que les résultats de l'analyse génétique me seront transmis si je désire et resteront confidentiels. Je peux à tout moment demander la destruction de mon ADN.

Lieu, date

Signature du patient (e)

Signature du médecin traitant

Signature du chercheur

Annexe 3:
Questionnaire

Date de prélèvement : .../.../....

N° du patient :.....

Nom :

Prénom :

Age :.....

Sexe :.....

Date et lieu de naissance :

Adresse :

Etat civil :Marié(e) Célibataire

Profession

Lieu de travail :.....

Age du diagnostic :.....

HABITUDES

TABAC : **CIGARETTES** blonde brune

Quantité/jours:

Depuis combien d'année:

Tabac à priser (NEFFA) harcha rotba

Quantité/jours:

Depuis combien d'année:

AUTRES.

Exposition à la fumée de cigarettes oui non

Très exposé moyennement exposé

ALCOOL quantités / jours

Depuis combien d'année

ASPECT CLINIQUE

Symptômes :

Antécédents personnels :

.....
Age de la découverte de la maladie/.....

Motifs de la première consultation :

Type histologique :

Classification TNM.....

Evolution (métastases).....

.....
Traitements.....

.....
Marqueurs tumoraux mesurés

ANTECEDANTS FAMILIAUX :

L'un de vos proches parents est-il malade : antécédents familiaux notamment cancéreux

Père Mère Fratrie Descendants

Si Oui, préciser : - la maladie : depuis

.....
- Autres renseignements :

.....

Annexe 4 :
Questionnaire témoin

Date de prélèvement : .../.../....

N° du Témoin:.....

Nom :

Prénom :

Age :.....

Sexe :.....

Adresse :

Profession :

Fumeur : Oui Non ancien fumeur

Tabac à priser : Oui Non ancien consommateur

Antécédent familial : cancer du foie Oui Non

Autres cancers Oui Non

Annexe 5

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

-72 mg de NH_4CO_3 1M

-7g de NH_4Cl 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 μl de MgCl_2 1M

450 μl NP 40 (Non Idet P40)

450 μl 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 TBE 1x

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**

Xylenecyanol 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'acrylamidebis-acrylamide

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

* H₂O : 28 ml

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

*Publication
scientifique*

Résumés

تأثير تعدد الأشكال الجيني لإنزيمات إزالة السموم في سرطان الخلايا الكبدية

سرطان الخلايا الكبدية هو الأكثر شيوعاً لأنواع سرطان الكبد الأولية ، مسبباته تتضمن عدة عوامل منها العامل الفيروسي الناتج عن فيروس التهاب الكبد (VHC) والعوامل الوراثية والبيئية. يبدو أن القابلية الفردية للإصابة بهذا السرطان مرتبطة بالتعدد الجيني للجينات المشفرة لإنزيمات إزالة السموم والتي تظهر اختلافات في استقلاب المواد المسرطنة.

NAT2 و GSTs هم الإنزيمات الرئيسية في المرحلة الثانية لإزالة السموم المسؤولة عن التحول الحيوي للمركبات المسببة للسرطان و المتورطة في إحداث العديد من السرطانات بما في ذلك سرطان الكبد.

الهدف من عملنا هو دراسة ارتباط محتمل بين تعدد الشكل الجيني لجينات إزالة السموم وسرطان خلايا الكبد في مجموعة سكانية مكونة من مرضى وشواهد من شرق الجزائر وتقييم تأثير التبغ. الطريقة: أجريت دراستنا على 132 مريضاً و 141 شاهد. استخراج الحمض النووي الجيني. يتم تحديد وجود حذف متماثل الزيغوت لجينات GSTM1 و GSTT1 بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد. نستخدم لدراسة تعدد الشكل الأليلي لجين NAT2 تقنية PCR-RFLP ، حيث يتم إجراء مقارنة الترددات بين المجموعتين باختبار χ^2 وحساب نسبة الأرجحية (OR) بفاصل ثقة 95%. النتائج: تظهر نتائجنا أن الأنماط الجينية الخالية لـ GSTM1 و الاستيل البطني لـ NAT2 مرتبطة بزيادة خطر الإصابة بسرطان الكبد (OR = 1.88، فاصل الثقة 95%، مدى الثقة 1.16-3.05 ؛ OR = 2.30، فاصل الثقة 95%، مدى الثقة 1.26-4.18 على التوالي). يكون هذا الارتباط أقوى لدى المدخنين (OR = 2.00، فاصل الثقة 95%، مدى الثقة 1.05-3.8 و OR = 2.55، فاصل الثقة 95%، مدى الثقة من 1.22 إلى 5.34 على التوالي). لم يلاحظ أي ارتباط ذات دلالة احصائية بين النمط الجيني الخالي لـ GSTT1 وسرطان خلايا الكبد.

الخلاصة: دراستنا أظهرت أن العجز الكلي للإنزيم بسبب الحذف المتماثل للجين GSTM1 أو العجز الجزئي لـ NAT2 عن طريق الأسئلة البيئية يؤدي إلى نقص إزالة سموم المواد المسرطنة والتي تساعد على الإصابة بسرطان الخلايا الكبدية و خاصة عند المدخنين.

الكلمات المفتاحية: سرطان الخلايا الكبدية، GSTM1، GSTT1، NAT2، الأشكال الجينية المتعددة، إنزيمات التحول الحيوي للمواد المسرطنة.

Abstract

Implication of genetic polymorphism of detoxification enzymes in hepatocellular carcinoma

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary liver cancer. Its multifactorial etiology involves several factors such as the viral factor by the hepatitis C virus (HCV), genetic and environmental factors. Individual susceptibility to this cancer seems to be associated with genetic polymorphism of genes coding for detoxification enzymes which then show differences in the metabolism of carcinogens.

Glutathione-S-transferases (GST) and N-acetyltransferase (NAT) are the main detoxification phase II enzymes responsible for the biotransformation of carcinogenic compounds implicated in the genesis of several cancers including HCC.

The objective of our work is to study a possible association between the genetic polymorphism of these detoxification genes and hepatocellular carcinoma in a population composed of patients and controls from Eastern Algeria and to evaluate the impact of tobacco.

Materials and methods: Our study was conducted on 132 patients and 141 controls. Genomic DNA was extracted. The presence of homozygous deletion of GSTM1 and GSTT1 genes was determined by multiplex PCR. The study of allelic polymorphism of the NAT2 gene uses the PCR-RFLP approach. The comparison of frequencies between the two groups is established by a χ^2 test and the calculation of odds ratios (OR) with a 95% confidence interval.

Results: Our results show that the GSTM1 null and slow acetylator genotypes of the NAT2 gene are associated with an increased risk of HCC (OR =1.88, 95% CI 1.16-3.05; OR= 2.30, 95% CI 1.26-4.18, respectively). This association was stronger in smokers (OR=2.00, 95% CI 1.05-3.8 and OR=2.55, 95% CI 1.22-5.34, respectively). No significant association was observed for the GSTT1 null genotype and HCC.

Conclusion: Our study shows that a total enzymatic deficiency by a homozygous deletion of the GSTM1 gene or a partial deficiency of NAT2 by slow acetylation leads to a detoxification defect of carcinogenic substances favoring the appearance of hepatocellular carcinoma in particular in smokers.

Keywords: hepatocellular carcinoma, GSTM1, GSTT1, NAT2, genetic polymorphisms, xenobiotic metabolism enzymes.

Résumé

Implication du polymorphisme génétique des enzymes de détoxification dans le carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le plus fréquent des cancers primitifs du foie. Son étiologie multifactorielle implique plusieurs facteurs tels que le facteur viral par le virus de l'hépatite C (VHC), les facteurs génétiques et environnementaux. La susceptibilité individuelle à ce cancer semble être associée au polymorphisme génétique des gènes codant pour les enzymes de détoxification qui présentent alors des différences dans le métabolisme des carcinogènes.

Les glutathion S-transférases (GST) et la N-acétyltransférase (NAT) sont les principales enzymes de la phase II de détoxification responsables de la biotransformation des composés cancérigènes incriminés dans la genèse de plusieurs cancers dont le CHC.

L'objectif de notre travail est d'étudier une éventuelle association entre le polymorphisme génétique de ces gènes de détoxification et le carcinome hépatocellulaire chez une population composée de patients et de témoins originaires de l'Est algérien et d'évaluer l'impact du tabac.

Matériels et méthodes : Notre étude a été menée sur 132 patients et 141 témoins. L'ADN génomique a été extrait. 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 χ^2 et le calcul des odds ratio (OR) avec un intervalle de confiance à 95%.

Résultats : Nos résultats montrent que le génotype GSTM1 nul et acétyleur lent du gène NAT2 sont associés à une augmentation du risque de CHC (OR =1.88, IC 95% 1.16–3.05; OR= 2.30, IC 95% 1.26–4.18, respectivement). Cette association est plus importante chez les fumeurs (OR=2.00, IC 95% 1.05–3.8 et OR=2.55, IC 95% 1.22–5.34, respectivement). Aucune association significative n'a été observée pour le génotype GSTT1 nul et le CHC.

Conclusion : Notre étude montre qu'un déficit enzymatique total par une délétion homozygote du gène GSTM1 ou un déficit partiel de NAT2 par acétylation lente conduit à un défaut de détoxification des substances carcinogènes favorisant l'apparition du carcinome hépatocellulaire en particuliers chez les fumeurs.

Mots clés : carcinome hépatocellulaire, GSTM1, GSTT1, NAT2, polymorphismes génétiques, enzymes du métabolisme des xénobiotiques.

Année universitaire 2021-2022

Présenté par : CHORFI Lamia

INTITULE :
**Implication du polymorphisme génétique des enzymes de détoxification dans le
carcinome hépatocellulaire**

thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat 3^{ème} cycle LMD en génétique

Résumé

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le plus fréquent des cancers primitifs du foie. Son étiologie multifactorielle implique plusieurs facteurs tels que le facteur viral par le virus de l'hépatite C (VHC), les facteurs génétiques et environnementaux. La susceptibilité individuelle à ce cancer semble être associée au polymorphisme génétique des gènes codant pour les enzymes de détoxification qui présentent alors des différences dans le métabolisme des carcinogènes.

Les glutathion S-transférases (GST) et la N-acétyltransférase (NAT) sont les principales enzymes de la phase II de détoxification responsables de la biotransformation des composés cancérigènes incriminés dans la genèse de plusieurs cancers dont le CHC.

L'objectif de notre travail est d'étudier une éventuelle association entre le polymorphisme génétique de ces gènes de détoxification et le carcinome hépatocellulaire chez une population composée de patients et de témoins originaires de l'Est algérien et d'évaluer l'impact du tabac.

Matériels et méthodes: Notre étude a été menée sur 132 patients et 141 témoins. L'ADN génomique a été extrait. 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 χ^2 et le calcul des odds ratio (OR) avec un intervalle de confiance à 95%.

Résultats: Nos résultats montrent que le génotype GSTM1 nul et acétyleur lent du gène NAT2 sont associés à une augmentation du risque de CHC (OR =1.88, IC 95% 1.16–3.05; OR= 2.30, IC 95% 1.26–4.18, respectivement). Cette association est plus importante chez les fumeurs (OR=2.00, IC 95% 1.05–3.8 et OR=2.55, IC 95% 1.22–5.34, respectivement). Aucune association significative n'a été observée pour le génotype GSTT1 nul et le CHC.

Conclusion: Notre étude montre qu'un déficit enzymatique total par une délétion homozygote du gène GSTM1 ou un déficit partiel de NAT2 par acétylation lente conduit à un défaut de détoxification des substances carcinogènes favorisant l'apparition du carcinome hépatocellulaire en particuliers chez les fumeurs.

Mots clés : carcinome hépatocellulaire, GSTM1, GSTT1, NAT2, polymorphismes génétiques, enzymes du métabolisme des xénobiotiques.

Laboratoire de recherche : Biotechnologie , eau et environnement et santé

De l'Université Abbes Laghrour –Khenchela

