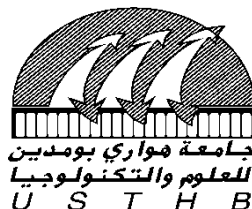


N° d'ordre : 12/2018-C/S.B.

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediène

Faculté des Sciences Biologiques



THESE

Présentée pour l'obtention du **diplôme de DOCTORAT 3^{ème} Cycle (LMD)**

En : SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Pharmacologie Expérimentale et Science du Médicament dans les Pathologies Inflammatoires et Infectieuses

Par : CHELOUTI Hiba

Sujet

NATs, MTHFR : polymorphisme génétique et cibles thérapeutiques dans un cancer épithélial. Implication des folates, vitamine B12 et homocystéine.

Soutenue publiquement, le 11 / 01 / 2018 , devant le jury composé de :

| | | |
|-----------------------|-----------------------------------|---------------------|
| Mme LARABA-DJEBARI F. | Professeur à l'USTHB | Présidente |
| Mme KHELIL M. | Professeur à l'USTHB | Directrice de thèse |
| M BOUZID K. | Professeur à CPMC.Mustapha | Examineur |
| Mme CHAIB-MAMOUCI S. | Professeur à HCA-Alger | Examineur |
| Mme DJERDJOURI B. | Professeur à l'USTHB | Examineur |
| Mme RAACHE R. | Maitre de Conférences A à l'USTHB | Examineur |

Remerciements

A Madame le Professeur Laraba-Djebari qui m'a fait l'honneur de présider ce jury. Pour ces encouragements durant ces années de Doctorat.

A Madame le Professeur Khelil pour m'avoir fait l'honneur de me confier et de diriger cette thèse. Pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, vos conseils et votre aide qui ont permis son aboutissement. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et son respect. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.

A Madame le Professeur Djerdjouri pour avoir accepté, avec un grand intérêt, de juger ce travail. Permettez-moi de vous adresser ma reconnaissance la plus sincère. Pour votre aide, vos conseils ainsi que votre chaleureux accueil au sein de l'équipe Pharmacologie Cellulaire et Signalisation.

A Monsieur le Professeur Bouzid de m'avoir facilité le travail au sein de son service d'oncologie au CPMC de l'hôpital Mustapaha Bacha. Je vous remercie également de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

A Madame le Professeur Chaib-Mamouzi pour votre gentillesse. Je vous remercie également de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

A Madame le Docteur Raache pour sa présence aujourd'hui, pour avoir accepté d'examiner ce travail et pour ces précieux conseils ainsi que son aide. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect et de ma gratitude.

Je tiens particulièrement à remercier tous les membres de l'équipe Pharmacologie Cellulaire et Signalisation.

A mon mari **Khaled**, qui a toujours fait bien plus que me soutenir et m'encourager. Pour son aide sur paillasse, sa contribution dans l'échantillonnage, et beaucoup d'autres choses liées à cette thèse. **Cette thèse est aussi la tienne.** Merci

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 supporté, soutenu, aidé et encouragé durant toutes ces années d'études. Recevez cette thèse en guise de remerciements et témoignage de mon amour.

Je remercie mes grands-mères qui ont toujours été là pour moi, mes tantes en particulier Djamila, mes oncles et tous mes cousins et cousines pour leurs encouragements.

Je remercie aussi mes beaux-parents, mon beau-frère, Khaltou Hassiba et son mari pour leurs soutiens.

Je remercie également ma meilleure amie Aziza.

Je suis enfin extrêmement reconnaissant aux personnes malades d'avoir participé à l'élaboration de ce travail.

Résumé

Introduction : Le cancer du sein est un problème de santé majeur. Avec 11000 nouveaux cas par an en Algérie, il reste le plus fréquent chez la femme. La majorité des cancers du sein sont de forme sporadique. L'objectif de notre travail est d'étudier une éventuelle association entre le polymorphisme génétique des enzymes NAT1 et MTHFR et de composés métabolisés par ces enzymes, et le risque du cancer du sein dans une population Algérienne. Ceci afin d'explorer les gènes candidats liés au cancer du sein et l'impact de certains produits tels que la fumée de tabac, la viande rouge, les folates, la vitamine B12 et l'homocystéine sur ce cancer. D'une autre part d'étudier le polymorphisme génétique de l'enzyme NAT2 dans une population Algérienne, afin d'évaluer la susceptibilité de la population algérienne aux composées hydrazines et arylamines.

Matériels et méthodes : L'étude des différents polymorphismes de la NAT1, NAT2 et MTHFR a été réalisée par PCR-RLFP. Par ailleurs, le dosage sérique de l'Homocystéine totale, de la vitamine B12 et des folates a été réalisé par la méthode ECLIA.

Résultats : Aucune différence significative n'a été trouvée entre les polymorphismes 190C>T, 1095G>A, 1088T>A, 560G>A et 559C>T du gène *NAT1* et le polymorphisme C677T du gène *MTHFR* et le risque du cancer du sein. En outre, nos résultats montrent une différence significative entre patients et témoins vis-à-vis de la consommation de la viande rouge ($p=0,017$, OR= 5,337). Par ailleurs, nos résultats montrent que les folates seraient un facteur de risque du cancer mammaire ($p =0,0014$, OR=1,160). En ce qui concerne le gène NAT2, nos résultats montrent que le génotype prédominant (53%) est le génotype acétyleur lent, génotype qui a été associé dans la littérature à une susceptibilité d'hépatotoxicité par l'INH.

Conclusion: Nos résultats montrent que le folate pourrait être un facteur de risque pour le cancer du sein dans la population Algérienne. Par ailleurs, notre étude suggère aussi l'implication de la viande rouge comme facteur de risque pour ce cancer dans notre population. Concernant le polymorphisme du gène *NAT1* et *MTHFR*, d'autres études sur d'autres SNPs sont nécessaires afin de déterminer leur rôle dans cette maladie. D'autre part, nos résultats démontrent une prédominance du phénotype acétyleur lent de l'enzyme NAT2 dans la population Algérienne.

Mots clés: Cancer du sein, Folates, Homocysteine, MTHFR, NAT1, NAT2, Viande rouge, Vitamine B12.

Abréviation :

Ac-CoA : Acétyl-CoA

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messagers

BRCA: BRest Cancer genes

CBS: Cystathionine Béta Synthase

CYP: Cytochrome P

DHF : Dihydrofolate

ER: Estrogène Receptor

dTMP: thymidine monophosphate

dUMP : déoxyuridine monophosphate

EDTA : Éthylène Diamine Tétra Acétique

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FBP: Folate Binding Protein

GSH: Glutathion réduit

Hcy : Homocystéine

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

IGF: insulin-like growth factor

IRM: Imagerie par Résonance Magnétique

MS: Méthionine Synthase

5-MTHF: 5-Méthyl Tétra Hydro Folate

5,10-MTHF : 5,10-Méthylène Tétra Hydro Folate

MTHFR : Méthylène Tétra Hydro Folate Réductase

NADPH : Nicotinamide Adénine Di nucléotide Phosphate

NAT : N-AcetylTransférases

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OR: Odds Ratio

PABA: Para-Amino Benzoic acid

p-ABG : *para*-Amino Benzoyl Glutamate

PAS : Para-Amino Salicylique

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCR-RFLP : Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism

PR : Progesterone Receptor

ROS: Reactive Oxygen Species

Ru : Ruthénium

SAH: S-Adénosyl-L-Homocystéine

SAM: S-Adénosyl-L-Méthionine

SBR: Scarff-Bloom et Richardson

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

THF: Tetrahydrofolate

TNM: Tumor, Nodes, Metastasis

UTDL: Unité Terminale Ducto-Lobulaire

Abréviations standardisées des acides aminés

A : Alanine

F : Phénylalanine

K : Lysine

P : Proline

T : Thréonine

C : Cystéine

G : Glycine

L : leucine

Q : Glutamine

V : Valine

D : Aspartate

H : Histidine

M : Méthionine

R : Arginine

W : Tryptophane

E : Glutamate

I : Isoleucine

N : Asparagine

S : Serine

Y : Tyrosine

Abréviations standardisées des bases nucléotidiques

A : Adénine

G : Guanine

C : Cytosine

T : Thymine

Sommaire

| | |
|--|----|
| I-INTRODUCTION | 1 |
| II-SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE | |
| II-1-Les N-AcetylTransférases..... | 2 |
| II-1-1- Nature..... | 2 |
| II-1-2-Réactions catalysées par les NATs..... | 3 |
| II-1-3-Pharmacogénétique des NATs | 5 |
| II-1-3-1-Caractéristiques structurales du locus <i>NAT</i> humain | 5 |
| II-1-3-2-Polymorphisme du gène <i>NAT1</i> | 6 |
| II-1-3-3-Polymorphisme du gène <i>NAT2</i> | 6 |
| II-1-4-Relation structure–fonction des NATs..... | 7 |
| II-1-4-1-NAT1..... | 7 |
| II-1-4-2-NAT2..... | 10 |
| II-2-Méthylène Tétra Hydro Folate Réductase (MTHFR), Homocystéine et vitamines B | 15 |
| II-2-1-MTHFR | 15 |
| II-2-1-1-Le gène <i>MTHFR</i> | 15 |
| II-2-1-2-Les polymorphismes du gène <i>MTHFR</i> | 16 |
| II-2-1-3-La protéine MTHFR..... | 17 |
| II-2-1-3-1-Réaction catalysée par la protéine MTHFR..... | 17 |
| II-2-1-3-2-Structure de la protéine MTHFR..... | 17 |
| II-2-3-3-Relation structure – fonction du MTHFR | 18 |
| II-2-2-Vitamine B12 | 18 |
| II-2-3-Vitamines B9 ou Folates | 19 |
| II-2-4-Homocystéine | 21 |
| II-2-5-Association de la vitamine B9, B12 et de l’Hcy avec le cancer du sein..... | 24 |
| II-3- Cancer du sein..... | 24 |
| II-3-1-La glande mammaire..... | 25 |
| II-3-1-1-Rappel anatomique et histologique du sein..... | 25 |
| II-3-1-2-Anatomopathologie de la glande mammaire | 26 |
| II-3-2-Classification | 27 |
| II-3-3- Epidémiologie | 29 |
| II-3-4- Facteurs de risque | 30 |
| II-3-4-1-L’âge | 30 |
| II-3-4-2-Les facteurs hormonaux | 30 |

| | |
|---|----|
| II-3-4-3-Facteurs de risques familiaux et génétiques | 31 |
| II-3-4-4-Les maladies bénignes du sein | 32 |
| II-3-4-5-Facteurs liés aux habitudes de vie et nutrition..... | 32 |
| II-3-4-6-Les facteurs environnementaux..... | 34 |
| II-3-5-Les altérations moléculaires à l'origine de la transformation cancéreuse mammaire | 35 |
| II-3-5-1-Les altérations génétiques | 35 |
| II-3-5-2-Les causes hormonales..... | 39 |
| II-3-6-Le diagnostic du cancer mammaire..... | 40 |
| II-3-7-Le traitement du cancer du sein | 41 |
| III-MATERIEL ET METHODES | |
| III-1-1-Sujets étudiés..... | 43 |
| III-1-2-Prélèvements sanguins..... | 43 |
| III-2-1-Etude génétique..... | 44 |
| III-2-1-1-Extraction d'ADN par la méthode des sels..... | 44 |
| III-2-1-2-Dosage et contrôle de qualité de l'ADN..... | 44 |
| III-2-1-2-1-Dosage de l'ADN..... | 44 |
| III-2-1-2-2-Contrôle de qualité d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose..... | 45 |
| III-2-1-3-Etude des polymorphismes par PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism)..... | 45 |
| III-2-1-3-1-Etude du polymorphisme génétique de <i>NAT1</i> | 45 |
| III-3-1-1-Amplification de l'ADN génomique..... | 45 |
| III-2-1-3-1-2-Nested PCR | 46 |
| III-2-1-3-1-3- Digestion par les enzymes de restriction..... | 48 |
| III-2-1-3-2-Etude du polymorphisme génétique de <i>-NAT2</i> | 49 |
| III-2-1-3-2-1-Amplification de l'ADN génomique..... | 49 |
| III-2-1-3-2-2-Nested PCR | 50 |
| III-2-1-3-2-3- Digestion par les enzymes de restriction..... | 51 |
| III-2-1-3-3-Etude du polymorphisme génétique du gène <i>MTHFR</i> | 53 |
| III-2-1-3-3-1-Amplification de l'ADN génomique..... | 53 |
| III-2-1-3-3-2- Digestion par les enzymes de restriction..... | 54 |
| III-2-2-Dosage biochimiques..... | 54 |
| III-2-2-1-Dosage des folates et de la vitamine B12..... | 54 |
| III-2-2-2-Dosage de l'homocystéine | 55 |
| III-2-3-Analyse statistique..... | 56 |

IV-RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|--|----|
| IV-1-Etude de la relation entre le polymorphisme génétique de <i>NAT1</i> et le cancer du sein..... | 57 |
| IV-1-1-Caractéristiques de la population étudiée..... | 57 |
| IV-1-2-L'allèle <i>NAT1*17</i> | 59 |
| IV-1-3-L'allèle <i>NAT1*14B</i> | 61 |
| IV-1-4-L'allèle <i>NAT1*3</i> | 62 |
| IV-1-5-Le polymorphisme 1088T>A..... | 64 |
| IV-1-6-L'allèle <i>NAT1*15</i> | 65 |
| IV-1-6-1-Profils <i>NAT1*15</i> obtenus | 65 |
| IV-1-6-2-Analyse univariée | 66 |
| IV-1-6-3-Analyse multivariée | 68 |
| IV-2-Etude de la relation du polymorphisme génétique du gène <i>MTHFR</i> , des folates, vitamines B12, homocystéine et le cancer du sein..... | 69 |
| IV-2-1-Caractéristiques de la population étudiée..... | 69 |
| IV-2-2-Profil <i>MTHFR</i> obtenus | 70 |
| IV-2-3-Analyse univariée | 71 |
| IV-2-3-1-Les vitamines B9 et B12..... | 72 |
| IV-2-3-2-L'Homocystéine..... | 72 |
| IV-2-3-3-Le polymorphisme du gène <i>MTHFR</i> | 73 |
| IV-2-4-Analyse multivariée | 73 |
| IV-2-5-Etude de la corrélation entre les folates, B12, Hcy les stades de la tumeur..... | |
| IV-3-Etude du polymorphisme génétique de <i>NAT2</i> | 76 |
| V-DISCUSSION GENERALE | 79 |
| VI-CONCLUSION | 87 |
| VII-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 89 |
| VIII-ANNEXES | |

I-INTRODUCTION

Le cancer du sein est un problème de santé majeur. Il représente 1,7 million de nouveaux cas dans le monde en 2012 et 11000 nouveaux cas par an en Algérie en 2010. Avec environ 3000 décès chaque année, ce cancer représente la première cause de mortalité chez la femme en Algérie. La majorité de ce cancer sont des formes sporadiques dont l'étiologie incrimine des facteurs de risque. En effet, il est caractérisé par l'accumulation et la combinaison de multiples facteurs génétiques, hormonaux, et environnementaux. Parmi les puissants précarcinogènes impliqués dans la cancérogenèse mammaire figurent les amines aromatiques et hétérocycliques présents dans la viande rouge trop cuite et la fumée de cigarette. Ces précarcinogènes sont soit directement détoxiqués par les enzymes N-acétyltransférases 1 (NAT1) et 2 (NAT2) ou bien transformés en carcinogènes par ces mêmes enzymes. Ces deux iso-enzymes hautement polymorphes sont impliquées dans la susceptibilité accrue au cancer du sein.

De même, certains facteurs nutritionnels tels que les folates et la vitamine B12 ainsi que l'homocystéine, dont le métabolisme est sous la dépendance de l'enzyme Méthylène Tétra Hydro Folate Réductase (MTHFR), sont essentiels au maintien de la stabilité et de l'intégrité de l'ADN.

De ce fait, la compréhension du phénomène de cancérogenèse mammaire passe par la détermination de gènes candidats et de facteurs environnementaux et nutritionnels en interaction avec ces gènes. S'inscrivant dans cette démarche, la réalisation de notre étude a eu pour objectif de :

- Rechercher une éventuelle association entre le polymorphisme génétique des enzymes NAT1, MTHFR et le risque du cancer du sein dans une population Algérienne, afin d'explorer les facteurs génétiques potentiellement liés au cancer du sein (gènes candidats).
- Etudier l'impact de la fumée de cigarettes, ainsi que la viande rouge et le polymorphisme génétique de *NAT1* sur le cancer du sein.
- Etudier l'impact de certains facteurs nutritionnels soit, les folates et la vitamine B12 ainsi que l'homocystéine et le polymorphisme du gène *MTHFR* sur le cancer du sein.
- Etudier le polymorphisme du gène *NAT2* dans une population Algérienne afin d'évaluer la susceptibilité de cette population aux composées arylamines et hydrazines.

II-SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

II-1-Les arylamines N-acétyltransférases (NAT) :

II-1-1-Nature :

Les arylamines N-acétyltransférases (NAT: EC 2.3.1.5) sont des enzymes de biotransformation des xénobiotiques de type arylamines et hydrazines (Grant et *al.*, 1997). Ces enzymes catalysent les réactions de la phase II de biotransformation dite de conjugaison (Hein, 2002). Chez l'homme, deux isoformes fonctionnels NAT1 et NAT2 sont exprimés. NAT2 se traduit principalement dans le foie et l'intestin alors que NAT1 a une vaste distribution dans les tissus adultes (Blum et *al.*, 1990; Ohsako et *al.*, 1990).

Les deux iso-enzymes NAT1 et NAT2 présentent 81% d'homologie en acides aminés. Ils ont des masses molaires de 33 et 31 kDa, respectivement et sont formés chacun de 290 acides aminés (Blum et *al.*, 1990 ; Ohsako et *al.*, 1990). Cependant, ces enzymes présentent une différence dans l'affinité et la spécificité aux substrats (Hein, 2002) (tableau 1).

Tableau 1: Principaux substrats exogènes métabolisés par les N-acétyltransférases (NAT1 et NAT2) (d'après Minchin et *al.*, 1992; Kawamura et *al.*, 2005; Sim et *al.*, 2014)

| NAT1 | NAT2 |
|---|--------------------------|
| acide p-aminosalicylique | Isoniazide |
| acide p-aminobenzoïque | Sulfaméthazine |
| 2-amino-3-méthylimidazo [4,5-f] quinoline | Dapsone |
| 2-amino- α -carboline | Benzidine |
| 2-amino-méthyl-6-phénylimidazo[4,5- b] pyridine (PhIP) | β -naphthylamine |
| 4-aminobiphényl | 4-aminobiphényl |
| 2-aminofluorene | 2-aminofluorene |
| acide 5-aminosalicylique | acide 5-aminosalicylique |

La spécificité est donnée à titre indicatif car chacune des deux isoformes NAT possède en général une activité catalytique détectable quel que soit le substrat considéré.

II-1-2-Réactions catalysées par les NAT :

La première structure cristalline de l'enzyme NAT a révélé que le résidu Cystéine 68 (C68) du site actif fait partie d'une triade catalytique, Cystéine-Histidine-Aspartate (C-H-D) (Sinclair et *al.*, 2000). La C68 est acétylée par l'acétyl coenzyme A (AcCoA), cofacteur physiologique donneur du groupement acétyl qui se fixe alors sur l'azote du groupement amine primaire (-NH₂) ou hydrazine (-NH-NH₂) d'une molécule aromatique ou arylamine receveuse (figure 1) (Butcher et *al.*, 2002; Hein et *al.*, 2000). Les résidus cystéine des protéines sont très sensibles à l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) générés au sein de la cellule (Atmane et *al.*, 2003). Le produit acétylé se détache alors de l'enzyme et le produit formé est une arylamide ou hydrazide (Butcher et *al.*, 2002).

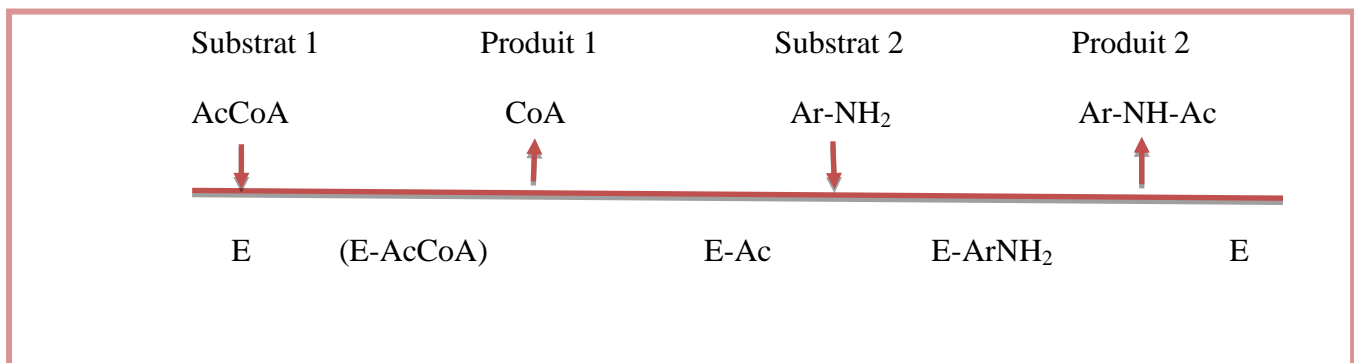


Figure 1 : Réaction bi-biping-pong de NAT (d'après Weber et King, 1981).

E : Enzyme, **AcCoA** : Acétyl Coenzyme A, **Ar** : Arylamine.

En plus des réactions de N-acétylation (inactivation), les NAT1 tout comme les NAT2, peuvent catalyser la O-acétylation des substrats aromatiques N-hydroxylés ainsi que la N, O-transacétylation intramoléculaire des composés N-hydroxylés et N-acétylés (activation) (figure 2).

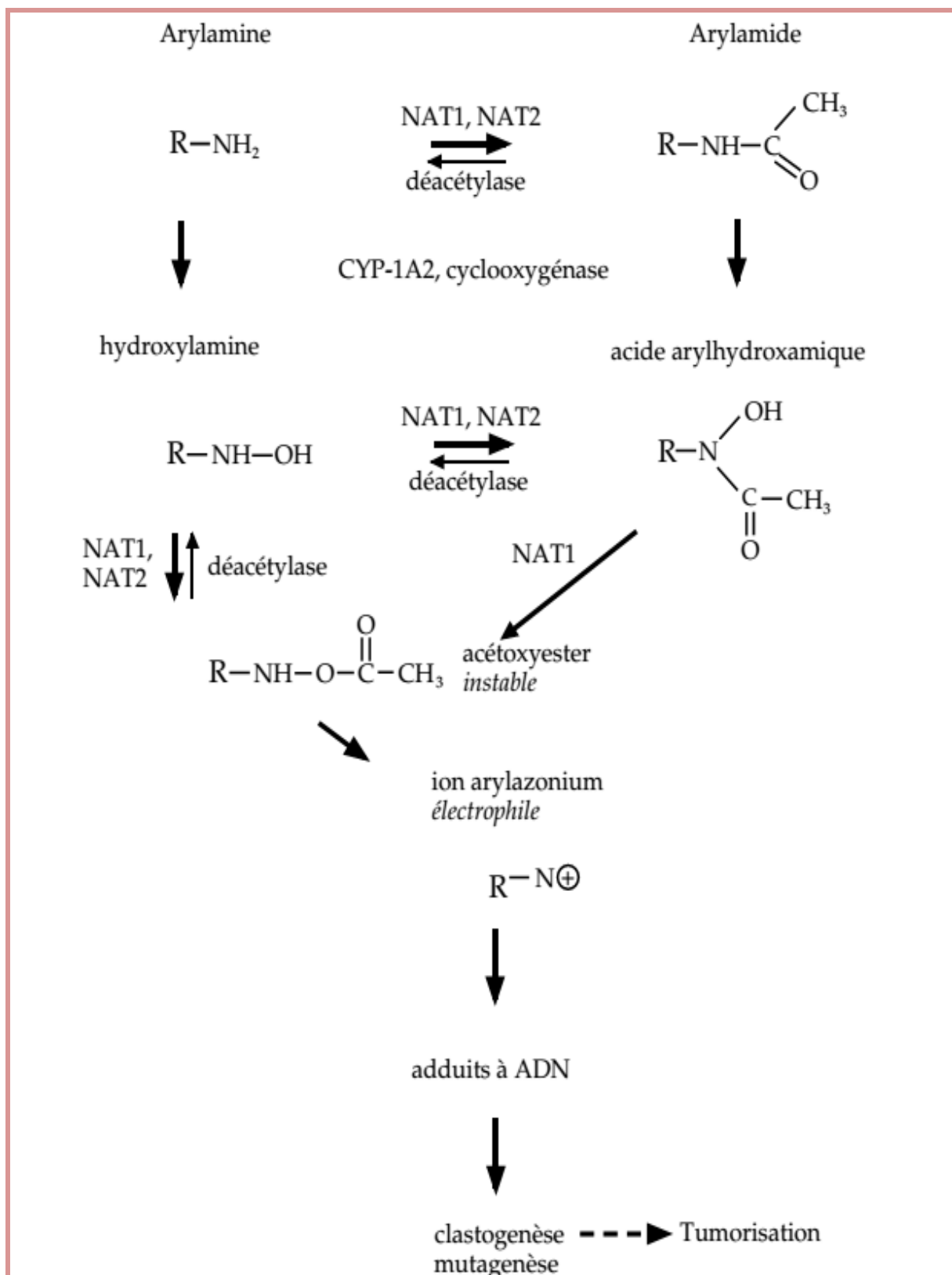


Figure 2: Voies de la biotransformation des précarcinogènes chimiques (Grant *et al.*, 1997).

II-1-3-Pharmacogénétique des NATs :

II-1-3-1-Caractéristiques structurales du locus NAT humain :

Les deux gènes *NAT1* et *NAT2* sont localisés sur le bras court du chromosome 8 dans la région 8p21 (Hickman et *al.*, 1994). La région codante du gène *NAT1* est localisée dans l'exon 9. Cependant, celle du gène *NAT2* est localisée dans l'exon 2, elles sont constituées chacune de 870pb (figure 3).

Les transcrits *NAT2* dérivent de l'exon codant (exon 2) et d'un deuxième exon non codant formé de 100pb, localisé à environ 8kb en amont du site du début de transcription de l'exon 2 (Boukouvala et Sim, 2005). Le gène *NAT1* produit son transcrit à partir d'une seule séquence nucléotidique.

Il a été rapporté une régulation positive excessive par *NAT1* du promoteur dans une lignée cellulaire de cancer du sein positive pour le récepteur d'œstrogène (ER⁺) (Wakefield et *al.*, 2008). Ceci suggère que *NAT1* peut agir comme un biomarqueur de susceptibilité à la maladie via un mécanisme moléculaire distinct du polymorphisme classique de la N-acétylation.

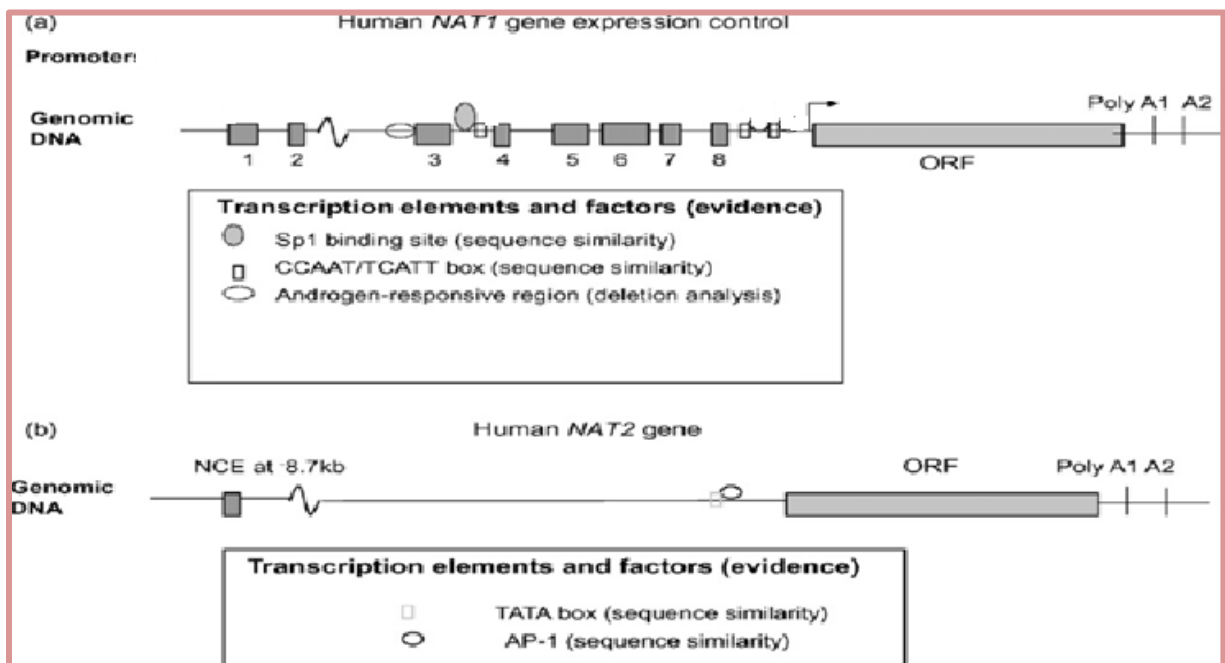


Figure 3 : Structure du gène *NAT* humain (d'après Sim et *al.*, 2008).

a : *NAT1* ; b : *NAT2*

Sp1 et AP1 : facteurs de transcription

II-1-3-2-Polymorphisme du gène *NAT1* :

Longtemps considéré comme monomorphe, le gène *NAT1* présente en réalité 27 variants alléliques (annexe 1). Les données fonctionnelles obtenues *in vitro* et *in vivo* indiquent que certains allèles sont associés à des enzymes à activité nulle (*NAT1*15*, *NAT1*19*), moindre (*NAT1*14*, *NAT1*17*, *NAT1*22*), identique (*NAT1*3*, *NAT1*11*, *NAT1*20*, *NAT1*21*, *NAT1*23*, *NAT1*24*, *NAT1*27*), ou supérieure (*NAT1*10*) au type sauvage ou type de référence (*NAT1*4*) (http://nat.mbg.duth.gr/Human%20NAT1%20alleles_2013.htm).

Les sites polymorphes *NAT1* ayant été identifiés sont situés dans la région codante ainsi que dans les régions 5' et 3' flanquantes (Hein et *al.*, 2008).

II-1-3-3-Polymorphisme du gène *NAT2* :

Le gène *NAT2* humain est hautement polymorphe et représente l'un des exemples les mieux étudiés (Hein et *al.*, 2008 ; Sim et *al.*, 2007) et les individus peuvent être subdivisés en acétyleurs rapides, intermédiaires et lents (Hein et *al.*, 2000). Ceci selon les taux auxquels les médicaments substrats de *NAT2* sont acétylés (Hein, 2002). De ce fait, les individus homozygotes pour les allèles *NAT2* acétyleurs rapides sont déduits comme acétyleurs rapides, les individus homozygotes pour les allèles *NAT2* acétyleurs lents sont déduits comme acétyleurs lents, et les individus possédant un allèle *NAT2* rapide et un lent sont déduits comme acétyleurs intermédiaires (Hein et *al.*, 2006).

Plusieurs single nucleotide polymorphisms (SNPs) ont été identifiés dans la région codante du gène *NAT2* humain. Ces SNPs sont responsables des phénotypes observés (Hein et *al.*, 2006). L'allèle ou l'haplotype *NAT2*4*, le plus fréquent dans les populations étudiées est considéré comme le " type sauvage " en raison de l'absence de tout SNP (Hein et *al.*, 2006; Walraven et *al.*, 2008a). Cet allèle a été associé à une haute activité enzymatique (Hein, 2002). 64 allèles *NAT2* ou haplotypes ont été identifiés dans les populations humaines étudiées (Hein et *al.*, 2010) (annexe 2).

Le type acétyleur lent a été plus associé à une diminution de la quantité protéique (Grant et *al.*, 1997). En effet, certains SNP des *NAT* humains entraînent des réductions dans la quantité de la protéine recombinée dans des systèmes d'expression eucaryote (Zang et *al.*, 2007a).

II-1-4-Relation structure –fonction des NATs:

II-1-4-1-N-Acétyl Transférase (NAT1) :

La résolution de la structure de NAT1 augmente les connaissances de la relation structure-fonction (figure 4). La connaissance de cette relation étant importante pour la compréhension de l'association des mutations ponctuelles polymorphes ou SNP de *NAT1* avec l'activité de l'enzyme et ainsi avec la prédisposition génétique au cancer, et autres maladies. Les évaluations des SNP entraînant les substitutions R64W, R187Q, V149I, M205V, S214A, D251V, E261K, et I263V dans la protéine ont été étudiées (Walraven et *al.*, 2008b).

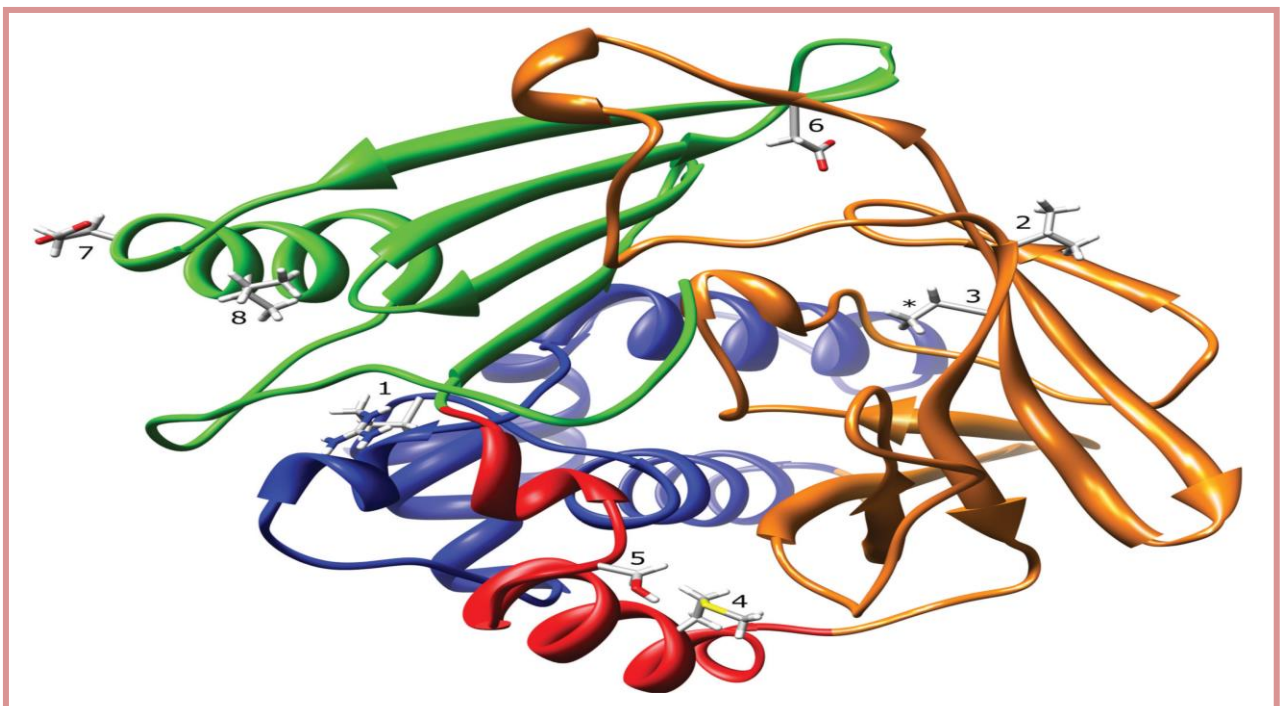


Figure 4 : Structure cristalline de NAT1 humaine (Walraven et *al.*, 2008b).

Le domaine I est représenté en bleu, l'inter domaine en rouge, le domaine II en orange et le domaine III en vert. Pour la NAT1, la localisation des résidus **R64** (1), **V149** (2), **R187** (3), **M205** (4), **S214** (5), **D251** (6), **E261** (7), et **I263** (8) est représentée.

-R64W (190C>T) :

L'haplotype *NAT1*17* (C190T) code pour une protéine avec une substitution de l'arginine (R), en position 64, par le tryptophane (W). Le R64 est partiellement exposé à la surface dans le domaine I. L'arginine réalise plusieurs liaisons hydrogène avec le glutamate 38 (E38) et l'asparagine 41 (N41) localisés dans le domaine I. Ces interactions disparaissent quand R64 est substituée par le W. La protéine NAT1 qui en résulte présente une thermo-stabilité réduite. La perte de l'intégrité structurale pourrait se manifester comme une agrégation ou une dégradation protéique (Walraven et *al.*, 2008b).

-V149I (445G>A) et S214A (640G>T) :

La substitution de la valine (V) par l'isoleucine (I) en position 149 (V149I) et de la sérine (S) par l'alanine (A) en position 14 (S214A) existent ensemble suite aux SNPs retrouvés dans l'allèle *NAT1*11*. L'expression de la région codante *NAT1*11* dans des bactéries recombinantes n'a montré aucun changement de l'activité catalytique, du taux de protéine, ou la stabilité de cette dernière (Hughes et *al.*, 1998).

Le résidu V149 est partiellement exposé à la surface dans le domaine II. La V ne présente pas d'interactions apparentes avec d'autres résidus. La mutation de cet acide aminé par l'I ne semble pas influencer la stabilité enzymatique (Doll et *al.*, 1997). En revanche, cette substitution donne une protéine qui catalyse l'activation métabolique des amines N-hydroxy-aromatiques à une valeur deux fois plus élevée que celle de la protéine normale (Doll et *al.*, 1997).

La S214 est localisée dans la région de l'inter-domaine. La S ne présente pas d'interactions apparentes avec d'autres résidus. Sa substitution par l'A n'influencerait pas la stabilité enzymatique, vu sa position à la surface protéique et l'absence d'interactions avec les autres résidus.

-R187Q (560G>A) :

L'haplotype *NAT1*14B* (G560A) code pour une protéine avec une substitution de R, en position 187, par la glutamine (Q). Le R187 est localisé dans le domaine II et il est partiellement exposé à la surface protéique et au site actif. Un hydrogène de R se lie aux E182 et à la lysine 188 (K188) dans le domaine II. La substitution de ce résidu par Q résulterait d'une perte de ces interactions. Cette perte d'interactions permettrait un changement dans la conformation du domaine II entraînant la déstabilisation de la structure de NAT1. Les études fonctionnelles de la variante R187Q exprimée dans la levure ont démontré une réduction de l'activité catalytique de l'enzyme, des taux de protéine, ainsi qu'une perte de la thermostabilité (Fretland et *al.*, 2001).

-M205V (613A>G) :

Le résidu méthionine 205 (M205) est partiellement exposé à la surface dans l'hélice de la région de l'inter-domaine. La M ne présente pas d'interactions avec d'autres résidus. La substitution de M205 par V n'influence pas la thermo-stabilité ou l'activité catalytique de la protéine (Fretland et *al.*, 2002).

-D251V (752A>T) :

L'aspartate 251 (D251) est localisée dans le domaine III. L'hydrogène du D251 se lie au résidu R166 du domaine II, aux résidus R242 et N245 du domaine III. La liaison hydrogène entre D251 et R166 influence directement la conformation du domaine II. Ces interactions et d'autres entre le domaine II et le domaine III contribuent à la stabilité de la protéine. La substitution de D par V hydrophobe pourrait entraîner une perte de toutes les interactions de la D251, affectant ensuite la conformation du domaine II et altérant ainsi la stabilité protéique (Butcher et *al.*, 2004).

-E261K (781G>A) :

Le résidu E261 est exposé à la surface du domaine III. Un hydrogène du glutamate se lie au S259. La substitution d'E261 par un résidu lysine n'influence pas la stabilité ou la fonction protéique.

En effet, le résidu 261 est localisé à la surface de la protéine, avec une interaction unique qui ne présente pas une contribution apparente à la dynamique ou aux conformations structurales dans cette région (Butcher et *al.*, 2004).

II-1-4-2- N-acétyltransférase 2 (NAT2) :

Les analyses structurales ont permis de distinguer également trois domaines au niveau de la protéine NAT2 : un domaine N-terminal très conservé en hélice- α (domaine I) qui constitue le lieu où la C68 se combine aux substrats, un second domaine en bâtonnet- β (domaine II) et un troisième domaine α/β (domaine III), qui entoure le site actif, c'est le domaine le plus diversifié entre les espèces (Fullame et *al.*, 2006) (figure 5).

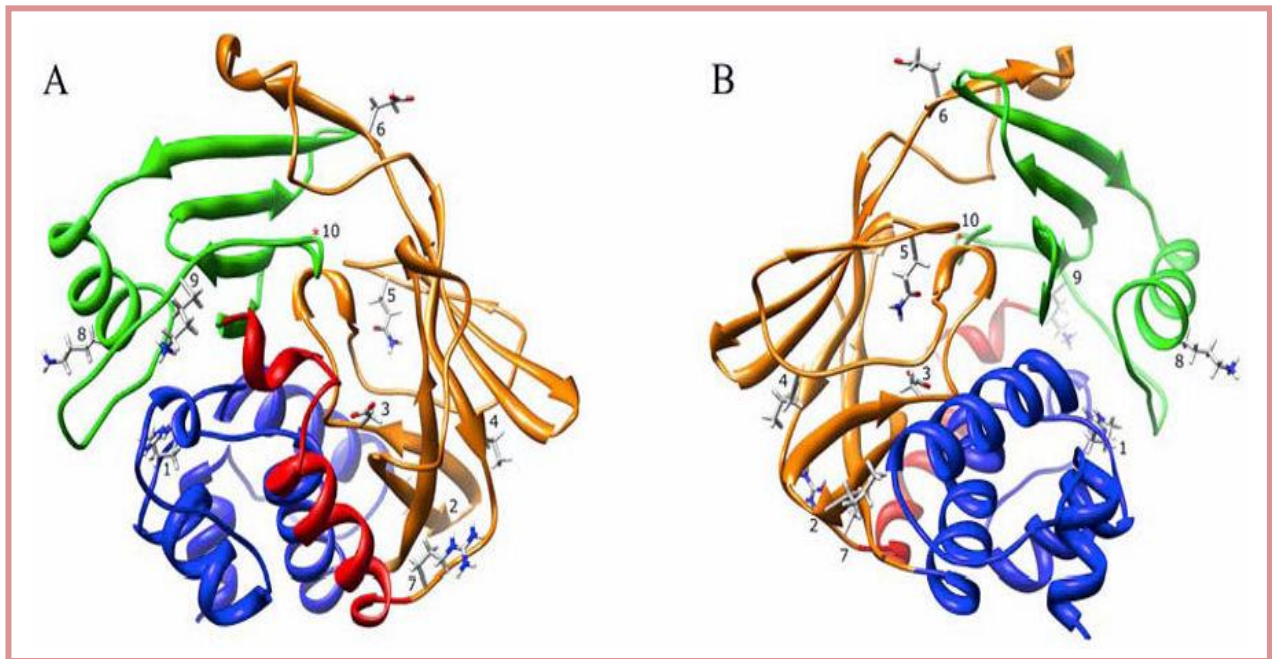


Figure 5 : Structure cristalline de NAT2 humaine (Walraven et *al.*, 2008a).

Le domaine I est en bleu, l'interdomaine en rouge, domaine II en orange et le domaine III en vert. Deux orientations sont représentées, l'une au site d'entrée du substrat dans le site actif (A) et l'autre au verso (B) de la structure. L'emplacement des résidus **R64** (1), **I114** (2), **D122**(3), **L137** (4), **Q145** (5), **E167** (6), **R197** (7), **K268** (8), **K282** (9), et **G286** (10) est représenté.

-R64Q(G191A) :

La chaîne latérale du résidu R64 situé dans le domaine I et ses liaisons hydrogène aux acides aminés E38 et N41. Le remplacement de R par Q au résidu 64 entraînera la perte de ces interactions, ce qui contribue à la perturbation de la conformation et de la dynamique de la structure tertiaire du premier domaine. Le fait que les résidus R64 et E38 soient complètement conservés dans toutes les NAT des mammifères connus suggère que ces interactions sont importantes pour la fonction et/ou la stabilité de l'enzyme (Walraven et *al.*, 2008a).

Le résidu N41 est également très conservé parmi les NAT. Des changements de structure significatifs dans cette région pourraient influencer la position du résidu de la triade catalytique, la C68, altérant ainsi ses interactions avec H107 catalytique, et/ou affectant son acétylation (Walraven et *al.*, 2008a).

Il est peu probable cependant que les interactions résiduelles des liaisons hydrogène R64 soient critiques pour le positionnement en C68, car de nombreuses autres interactions de liaison hydrogène supportent la structure tertiaire près de l'hélice du domaine I contenant C68 (Walraven et *al.*, 2008a).

-R197Q (590G>A) :

Le résidu R197 se trouve à la surface de la protéine dans le domaine II. Il présente des liaisons électrostatiques avec d'autres résidus chargés négativement. La substitution de R positivement chargé par un résidu Q neutre entraînerait une perte de cette interaction électrostatique, il en résulte une réduction de la stabilité protéique (Walraven et *al.*, 2008a).

-I114T (341T>C) :

Le résidu I114 est exposé à la périphérie de NAT2 dans le domaine II. Il partage des interactions hydrophobes avec les résidus leucine 21 et 24 (L21 et L24) dans le domaine I et la phénylalanine 84 (F84) et V112 dans le domaine II. La modification de ce résidu hydrophobe (I114) en un résidu de thréonine (T) hydrophile polaire peut réduire les interactions hydrophobes à l'interface entre le domaine II β et l'hélice du domaine I, altérant le repliement de la protéine dans cette région (Walraven et *al.*, 2008a).

Toutefois, étant donné que le résidu est périphérique et que la structure protéique environnante est fortement organisée en structures secondaires et tertiaires, il est peu probable qu'une réduction des forces hydrophobes dans cette région entraîne des changements structurels majeurs.

L'expression recombinante du variant I114T dans les cellules de mammifères n'a pas entraîné de changements dans la stabilité de la protéine ou des paramètres cinétiques apparents, mais a conduit à une réduction de l'enzyme active peut-être due à une dégradation accrue des protéines (Zang *et al.*, 2004). Ces données fonctionnelles sont cohérentes avec un changement structurel dans le variant I114T, qui pourrait augmenter l'agrégation protéique et/ou le ciblage pour la dégradation sans altérer la stabilité de la protéine.

-D122N (364G>A) :

La chaîne latérale du résidu de la triade catalytique D122 est complètement enfouie dans la protéine avec des liaisons hydrogène aux acides aminés N72, H107, S125, tyrosine 190 (Y190) et le squelette de la glycine (G124). Ces interactions de liaison hydrogène multiples contribuent probablement à la stabilité de la conformation de la boucle du site actif et à l'interaction entre les domaines I et II. L'emplacement et les interactions des résidus D122, N72, H107 et Y190 sont tous hautement conservés dans les NAT des mammifères et des bactéries (les résidus bactériens sont numérotés différemment). D122 est un résidu de la triade catalytique, tout changement du résidu 122 affectera négativement la fonction de la triade catalytique (Sandy *et al.*, 2005). Des études fonctionnelles du variant D122N ont démontré que le variant est catalytiquement inactif.

-L137F (411A>T):

Le résidu L137 est orienté vers l'intérieur du domaine II. Il partage des interactions hydrophobes avec les résidus I120, L152, W159, F192 et L194. La substitution du L137F est susceptible d'affecter la structure du domaine II. Des études fonctionnelles du variant L137F dans des cellules de mammifères ont montré une réduction des taux de la protéine sans modification de sa stabilité, probablement le résultat de la dégradation protéasomique (Zang *et al.*, 2007b).

-Q145P (434A>C):

Le résidu Q145 est exposé dans le domaine II et effectue des liaisons hydrogène avec les résidus W132 et Q133 sur un brin adjacent dans le domaine II. La substitution de ce résidu par une proline (P) est susceptible de provoquer une perturbation de la structure secondaire due à la perte d'interactions de liaison hydrogène stabilisantes (Li et *al.*, 1996). Comme les résidus W132 et Q133 font partie de la bobine qui devient la boucle du site actif, la modification des interactions du squelette avec le résidu 145 peut affecter la conformation de la boucle du site actif et altérer ainsi l'activité enzymatique et/ou la sélectivité du substrat.

-E167K (449G>A):

La chaîne latérale du résidu E167 est exposée dans la boucle du domaine II (165-185) et possède des liaisons hydrogène faibles avec le K185, qui se trouve dans un brin adjacent de la boucle du même domaine. Cette boucle joue un rôle dans la stabilisation des protéines NAT des mammifères (Walraven et *al.*, 2007). Les études fonctionnelles du variant E167K dans les cellules de mammifères ont démontré une réduction de l'activité due à la réduction des niveaux de protéines, sans réduction des niveaux d'ARNm ou de la thermostabilité des protéines (Zang et *al.*, 2007a). Il est possible que la variante E167K ait de petits changements structuraux qui causent l'agrégation des protéines et/ou une dégradation accrue.

-K268R (803A>G):

La chaîne latérale du résidu 268 est exposée à la surface de la protéine dans l'hélice α du domaine III et n'a aucune interaction avec les résidus environnants. Les études fonctionnelles du variant K268R exprimé de manière recombinante dans des cellules bactériennes, de levure et de mammifères n'ont montré aucun changement dans l'expression des protéines, la stabilité des protéines ou l'activité catalytique (Zang et *al.*, 2007a). L'évaluation de la structure NAT2 suggère que l'activité conservée dans le variant K268R serait due à l'emplacement de surface et au manque de contacts avec les résidus environnants.

-K282T (845A>C):

La chaîne latérale du résidu K (282) est exposée par son extrémité C-terminale dans le domaine III. Elle partage des interactions de liaison hydrogène avec le résidu H43 dans le domaine I et le résidu V280 dans le domaine III. L'interaction avec le résidu H43 du domaine I contribue probablement à la stabilité de la conformation. De ce fait, la substitution du K282 par un résidu T peut entraîner une perte de ces interactions et une déstabilisation structurelle. Les études fonctionnelles du variant K282T dans la levure ont démontré une absence de modification de l'activité catalytique de l'enzyme ou de son expression (Fretland et *al.*, 2001).

-G286E (857G>A):

Le résidu G286 est situé dans le domaine III, sa partie C-terminale est directement adjacente au site actif. Le résidu G286 n'interagit directement avec aucun autre résidu. Le remplacement de la G par un résidu de glutamate beaucoup plus grand à la position 286 pourrait altérer de manière significative la conformation de la partie C-terminale adjacente à l'ouverture du site actif. De ce fait, la protéine variante G286E est susceptible d'avoir un accès au site actif altéré et une sélectivité du substrat altérée. Une telle modification significative d'un résidu C-terminal adjacent au site actif est également susceptible d'affecter la liaison à l'AcCoA et l'acétylation C68.

Les différences entre NAT1 et NAT2 dans les sélectivités du substrat et/ou les activités catalytiques sont probablement influencées par la différence du volume du résidu NAT2 G286 plus petit par rapport au résidu NAT1 R286 plus grand, résidus orientés vers l'ouverture du site actif. En plus des différences dans la sélectivité du substrat, NAT1 est catalytiquement plus efficace que NAT2 (Grant et *al.*, 1997).

II-2-Méthylène Tétra Hydro Folate Réductase (MTHFR), Homocystéine et vitamines B :

II-2-1-MTHFR :

II-2-1-1-Le gène *MTHFR* :

Le gène *MTHFR* est localisé sur le bras court du chromosome 1 en position 1p36.3. Le gène *MTHFR* humain est d'une longueur de 2.2 Kb. Il a été rapporté que ce gène est formé de 11 exons de taille comprise entre 102pb à 432pb, chevauchés par 10 introns de taille comprise entre 25pb à 1.5kb (Goyette et *al.*, 1998). L'exon 1 code pour une majeure partie de la région 5' non traduite (5'-UTR) de l'ARNm de MTHFR et l'exon 11 contient le codon de terminaison (Goyette et *al.*, 1998) (figure 6).

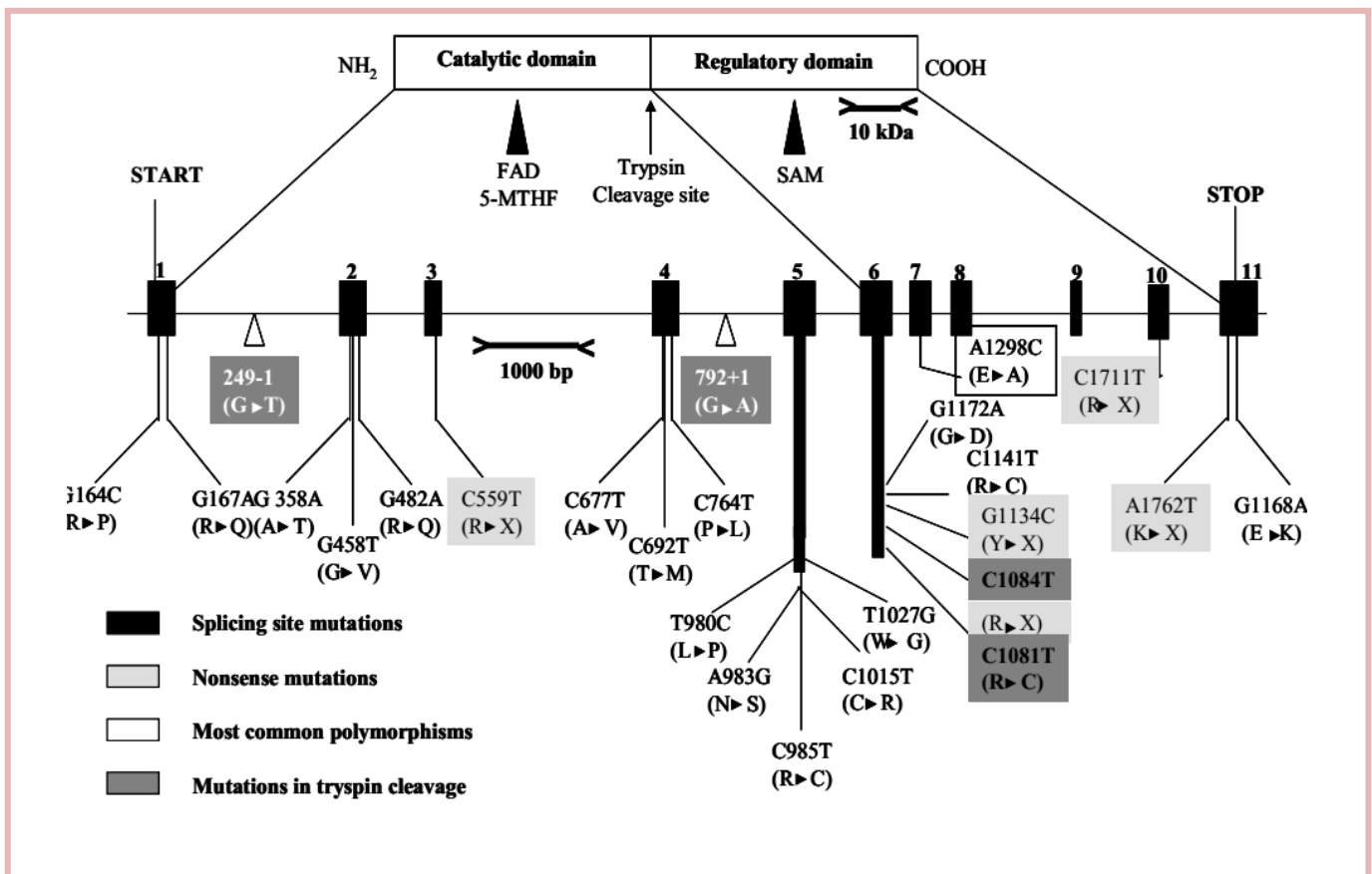


Figure 6 : Structure du gène, de la protéine et des polymorphismes de la MTHFR (Gos et Szepecht-Potocka, 2002).

II-2-1-2-Les polymorphismes du gène *MTHFR* :

On dénombre 41 polymorphismes de *MTHFR* (figure 6), cependant seuls deux polymorphismes sont responsables d'une activité enzymatique réduite, le C677T et le A1298C (Leclerc et *al.*, 2005).

Le polymorphisme C677T, au niveau de l'exon 4 est impliqué dans différents cancers, dont le cancer du sein, ce polymorphisme a notamment été associé à une augmentation du risque aux maladies cardiovasculaires et à des malformations du tube neural. La prédominance du polymorphisme C677T est relativement élevée dans la population générale, on note une fréquence de 5 à 15% des homozygotes 677TT et de 50% d'hétérozygotes dans les populations Caucasiennes et Asiatiques. Cependant, il existe une faible incidence dans les populations Africaines et Américaines (Weisberg et *al.*, 1998; Amouzou et *al.*, 2004).

Le polymorphisme A1298C a été identifié au niveau de l'exon 7. Plusieurs études considèrent que le polymorphisme A1298C serait un facteur de risque accru d'athérosclérose et de maladies cardiovasculaire chez les patients atteints de Polyarthrite Rhumatoïde (Palomino-Morales et *al.*, 2010). Cependant, une méta-analyse rapporte qu'il n'existe aucune association entre le polymorphisme de *MTHFR* A1298C et le risque du cancer du sein (Rai, 2014).

La présence simultanée des deux variantes génétiques, le C677T et A1298C, est associée à des maladies cardiovasculaires, à divers types de cancers, à des anomalies de la coagulation et à des malformations congénitales (Bennouar et *al.*, 2007).

Il existe d'autres polymorphismes plus rares tels que le T1317C qui a été identifié également dans l'exon 7 du gène *MTHFR*. Ce SNP semble extrêmement fréquent chez les individus d'origine Africaine (Weisberg et *al.*, 1998).

II-2-1-3-La protéine MTHFR :

II-2-1-3-1-Réaction catalysée par la protéine MTHFR :

Flavoprotéine cytosolique, MTHFR représente l'enzyme clé du métabolisme des folates. Cette protéine catalyse la conversion du 5,10-méthylène tétrahydrofolate (5,10-MTHF) en 5-méthyl tétrahydrofolate (5-MTHF). Elle utilise le dinucléotide adénine flavine (FAD) comme cofacteur pour lequel elle possède un site de liaison (Miner et Evrovski, 1997) (figure 6). Le 5,10-MTHF est le principal donneur de carbone dans la biosynthèse nucléotidique, notamment la synthèse de la thymidine, il peut également être convertie en d'autres dérivés foliques qui participent à la synthèse des purines. Le 5-MTHF est la forme prédominante des folates et le donneur du radical méthyl dans la réaction de la reméthylation de l'homocystéine (Hcy) en méthionine. Ces réactions vont faire intervenir la vitamine B12 et B6 comme cofacteurs. Le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) constitue le donneur d'électrons utilisé par la MTHFR durant cette réaction.

Cette enzyme catalyse la réaction suivante :



II-2-1-3-2-Structure de la protéine MTHFR :

L'enzyme MTHFR est subdivisée en deux domaines, le N-terminal, domaine catalytique de 40 KDa et le C-terminal, domaine régulateur de 37 KDa. A l'union de ces deux domaines se trouve une région hydrophobe (figure 6).

En l'absence d'une structure cristalline pour le MTHFR humain, l'enzyme *E. coli* a précédemment servi de modèle pour la caractérisation structurale et biochimique de cette famille d'enzymes.

II-2-1-3-3-Relation structure – fonction du MTHFR :

- A222V :

Frost et al. (1995) ont identifié la mutation C677T à l'origine de la substitution de l'acide aminé Alanine par une Valine en position 222 sur le site de liaison du cofacteur de MTHFR, le cofacteur FAD. Ceci rend l'enzyme thermosensible et diminue son activité (Sazci et *al.*, 2005).

-E429A :

La substitution de l'acide aminé Glutamate par une Alanine en position 429 est associée à une diminution plus modérée de l'activité enzymatique de la MTHFR. Cette substitution est codée par le polymorphisme A1298C. La diminution de l'activité enzymatique attribuée à ce polymorphisme n'est cependant pas responsable d'une action sur la thermolabilité de l'enzyme (Weisberg et *al.*, 1998).

II-2-2-Vitamine B12 :

La vitamine B12 ou cobalamine est présente dans les aliments d'origine animale et est exclusivement synthétisée par des microorganismes. Elle appartient à une classe de composés appelés corrinoïdes constitués d'un noyau corrine et d'un ribonucléotide reliés entre eux par un pont amino 2-propanol (figure 7).

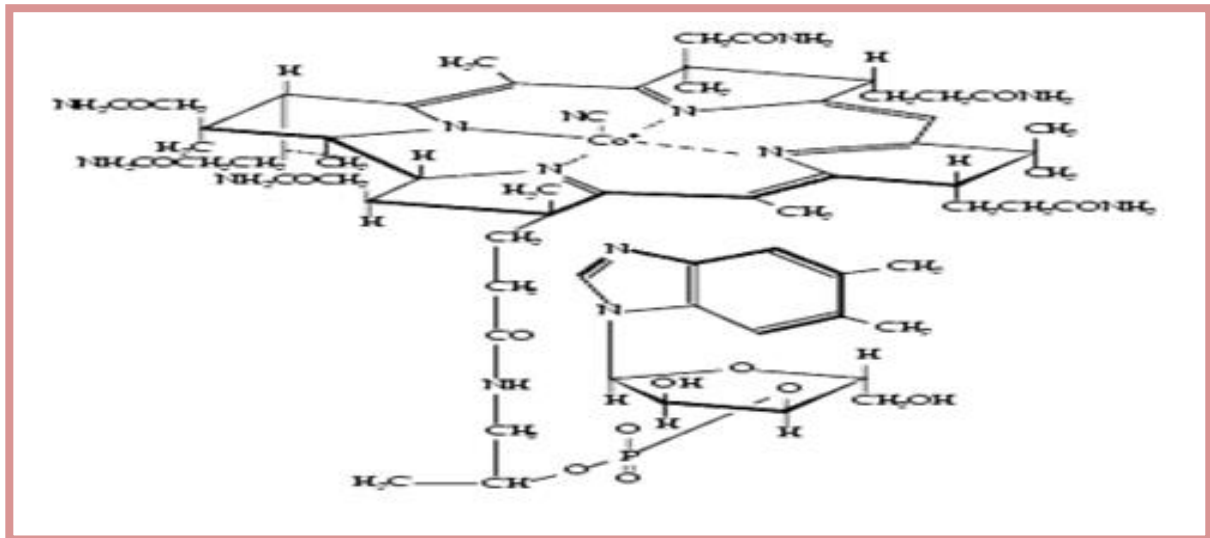


Figure 7 : Structure chimique de la cyanocobalamine (Vitamine B12).

L'absorption digestive (iléon) de cette vitamine fait intervenir des récepteurs spécifiques. Son transport dans le sang et sa captation tissulaire et hépatique nécessitent la présence de protéines de transport, les transcobalamines I, II, III. Fixant plus de 80% de la vitamine B12 absorbée, la transcobalamine II est la plus importante et permet de ce fait de distribuer cette dernière aux cellules par un mécanisme d'endocytose récepteur dépendant (Fräter-Schröder et *al.*, 1978). Dans le cytoplasme, elle est convertie en coenzymes actifs la méthylcobalamine et la 5' déoxy-adenosylcobalamine qui jouent un rôle dans le transfert de groupements méthyl. La méthylcobalamine permet les deux réactions combinées ; la conversion de l'Hcy en méthionine et la conversion du 5-MTHF en tétraHydroFolate (THF). La 5' déoxy-adenosylcobalamine est nécessaire à la conversion du méthyl-malonyl-coenzyme A en succinyl-coenzyme A. De ce fait, la carence en B12 entraîne l'accumulation du 5-MTHF et une carence relative en THF.

II-2-3-Vitamines B9 ou Folates :

La vitamine B9 est désignée par les termes d'acide folique et de folates. On distingue cependant les folates d'origine exclusivement alimentaires (légumes verts, agrumes ...) et l'acide folique qui lui est synthétisé par l'organisme. Elles constituent l'ensemble des composés dans lesquels l'acide ptéroïque est lié à une ou plusieurs molécules de glutamates (figure 8).

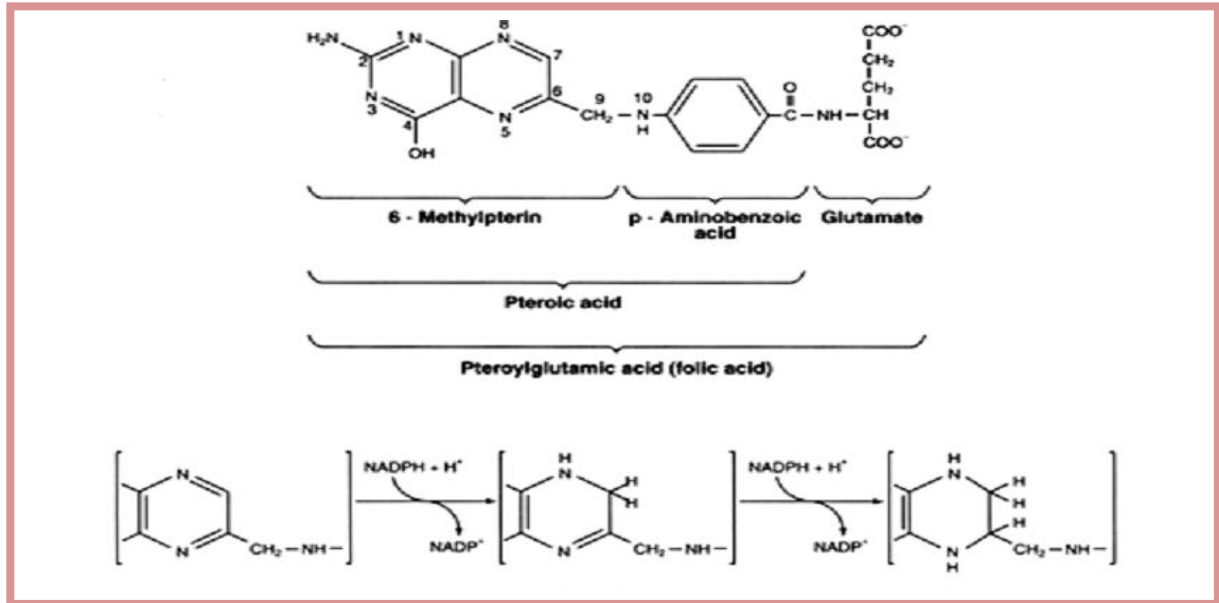


Figure 8 : Structure chimique de l'acide folique.

Les folates sont des vitamines hydrosolubles qui représentent un cofacteur indispensable à :

- La synthèse du déoxy-thymidine monophosphate (dTMP) à partir du déoxy-uridine monophosphate (dUMP) : étape essentielle de la synthèse d'ADN (Hannu *et al.*, 2013) ;

La synthèse du dTMP à partir du dUMP est catalysée par la thymidylate synthase. Cette réaction enzymatique nécessite la présence de 5,10-MTHF qui joue le rôle de donneur de groupe méthyl et celui de réducteur par sa transformation en 7-8-dihydrofolate. Ce dernier, grâce à la tétrahydrofolate réductase, est réduit en THF, lequel est transformé en 5,10-MTHF sous l'influence de la sérine hydroxy-méthyl-transférase.

- La biosynthèse des bases puriques, adénine et guanine, grâce au formyl-tétrahydrofolate et au méthylène-tétrahydrofolate ; qui sont des donneurs de carbone. Ils forment le noyau des purines avec un radical carboné qui provient du 5,10-MTHF (C8) suivi de la réaction de formylation assuré par le formyl-THF donnant un autre radical carboné (C2).

- Le catabolisme de l'histidine ;

La transformation de l'histidine en acide glutamique s'effectue en plusieurs étapes. La dernière consiste en la transformation de l'acide formimino-glutamique en acide glutamique par perte du groupe formimino CH-NH₂ capté par le THF.

- La synthèse de la méthionine par reméthylation de l'homocystéine.

Un apport adéquat en folates est donc essentiel pour la stabilité et l'intégrité de l'ADN mais également à l'homéostasie cellulaire (Scott et *al.*, 1998). Dans le plasma, les folates sont en partie libres et en partie liés à des protéines. Ils circulent sous forme de monoglutamates et sont amenés aux cellules utilisatrices, à l'intérieur desquelles ils sont transformés en polyglutamates (Cho et *al.*, 2007). Cette réaction est catalysée par la folylpolyglutamate synthétase. Dans la cellule, leur métabolisme est compartimentalisé dans le cytoplasme et la mitochondrie où les unités monocarbonées permettent la synthèse du formate, de la G et du méthionyl-ARNt (Tibbetts et *al.*, 2010).

Le catabolisme des folates et en particulier l'élimination urinaire du *p*-ABG, sous forme de N-acétyl-*p*-ABG, métabolite majeur des folates (McPartlin et *al.*, 1993) est principalement assurée par l'enzyme NAT1 (Minchin et *al.*, 2007).

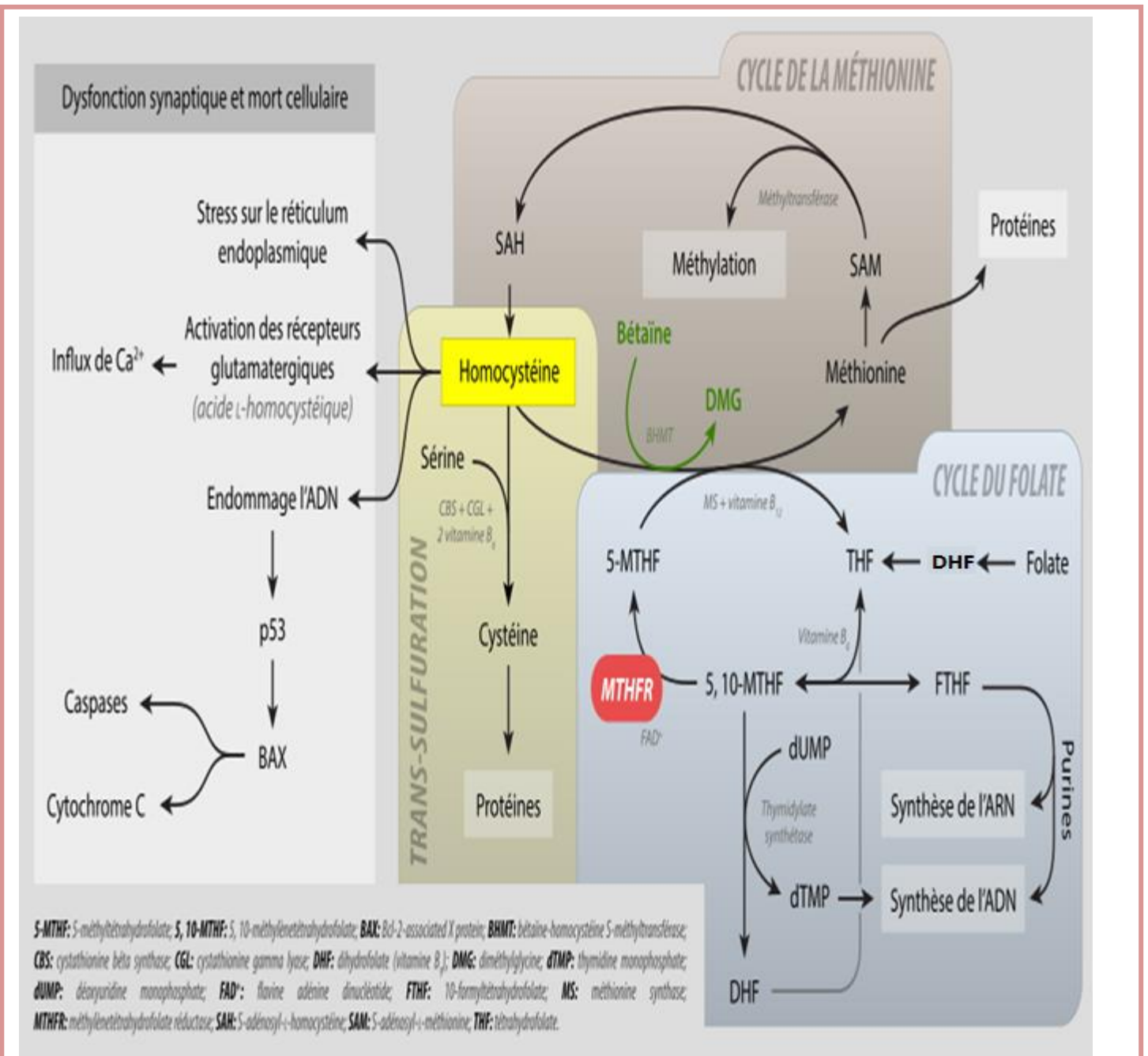
II-2-4-Homocystéine :

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré qui n'intervient pas dans la synthèse protéique. L'Hcy est formée dans le compartiment intracellulaire à partir de la méthionine apportée par l'alimentation. Elle sera synthétisée par toutes les cellules de l'organisme et existe soit sous forme libre (30%) soit sous forme liée aux protéines (albumine et hémoglobine) (70%) (Sikora et *al.*, 2006). L'Hcy, contrairement aux autres thiols intracellulaires (glutathion et cystéine) peut être considérée comme un thiol toxique pour la cellule. Le catabolisme de l'Hcy se produit principalement dans le foie et dans les reins par deux voies :

Le premier cycle métabolique nécessaire à son élimination est la voie de reméthylation aboutissant à la synthèse de la SAM, la SAH, et enfin la méthionine. Cette réaction est assurée en condition de déficit en méthionine, elle est catalysée par la méthionine synthétase (MS), utilisant comme cofacteur la vitamine B12 (Ruiz-Mercado et *al.*, 2015). L'Hcy peut aussi être reméthylée en méthionine par addition d'un groupe méthyle à partir de la 5-MTHF, qui est synthétisé par la 5,10-MTHFR (figure 9).

Le second est la voie de transsulfuration formant la cystéine : il s'agit d'une voie vitamine B6 dépendante (Finkelstein, 2000). La cystéine ainsi formée peut alors entrer dans la synthèse du Glutathion réduit (GSH) (Smulders et *al.*, 2006). L'enzyme cystathionine-béta-synthase (CBS) représente la première étape dans la formation de la cystéine. Cette dernière catalyse l'association de l'Hcy avec la sérine afin de former la cystathionine (figure 9).

Des études *in vitro* ont montré le rôle athérogène de l'Hcy, qui favorise la dysfonction endothéliale, le stress oxydatif, l'inflammation, la prolifération cellulaire et la thrombose (Gurda et *al.*, 2015).



5-MTHF: 5-Méthyl Tétra Hydro Folate; **5, 10-MTHF :** 5,10-Méthylène Tétra Hydro Folate ; **CBS :** Cystathionine Béta Synthase ; **DHF :** Dihydrofolate ; **dTMP :** thymidine monophosphate ; **dUMP :** déoxyuridinemonophosphate ; **FAD :** Flavine Adénine Dinucléotide ; **MS :** Méthionine Synthase ; **MTHFR :** Méthylène Tétra Hydro Folate Réductase; **SAH:** S-Adénosyl-L-Homocystéine; **SAM:** S-Adénosyl-L-Méthionine; **THF:** Tetrahydrofolate.

Figure 9: Synthèse et voies métaboliques de l'homocystéine (Parnetti et al., 1997).

Une carence en folates pourrait induire diverses lésions d'ADN en touchant les mécanismes de réparation et en fragilisant les chromosomes entraînant leurs cassures (Kim, 1999).

Il a été suggéré que le maintien de niveaux adéquats en folates sériques ou une augmentation modérée d'apports nutritionnels riches en vitamine B9 pourraient réduire considérablement le risque du cancer du pancréas et du sein (De batlle et *al.*, 2014).

Aucune étude n'a, à ce jour, permis d'établir un lien entre la vitamine B12 seule et le cancer. Cependant, l'interaction démontrée de la vitamine B12 avec les folates lors des divers processus métaboliques contribue à extrapoler quant au caractère protecteur de cette vitamine vis-à-vis du cancer (Chen et *al.*, 2014).

Les études évaluant l'association entre l'homocystéine circulante et le cancer du sein sont très limitées et les résultats ne reflètent pas la même conclusion. En effet, une étude récente a démontré que l'homocystéine n'était pas associée au risque de cancer du sein (Lin et *al.*, 2010).

II-3- Cancer du sein :

Le cancer du sein est une tumeur maligne qui se développe au niveau des cellules épithéliales de la glande mammaire. Une cellule normale devient cancéreuse à la suite d'importantes modifications, progressives. Habituellement, ces modifications sont réparées par l'organisme. Cependant, lorsque la cellule devient cancéreuse, elle perd ses capacités de réparation. Elle se met alors à se multiplier et finit par former une masse appelée tumeur maligne. La tumeur se développe dans la glande de façon anarchique. En l'absence d'un diagnostic précoce, les cellules cancéreuses mammaires peuvent envahir les tissus adjacents et métastaser via le sang et le système lymphatique. Les métastases concernent en générale d'abord les ganglions lymphatiques, puis les os, les poumons, le foie, le cerveau et la peau. Ce type de cancer touche le plus souvent les femmes, mais aussi les hommes dans de rares cas. Le cancer du sein chez l'homme est semblable au cancer du sein chez la femme, mais il y a quelques différences. Presque tous les cancers du sein détectés chez les hommes sont des carcinomes canaux.

II-3-1-La glande mammaire :

II-3-1-1-Rappel anatomique et histologique du sein :

Le sein est une glande alvéolaire exocrine responsable de l'allaitement qui se situe sur le muscle pectoral. Sa structure varie selon l'âge, les grossesses et l'activité physique de chaque femme.

La glande mammaire correspond à un système ramifié de canaux galactophores se divisant en canaux de plus en plus étroits, jusqu'à l'Unité Terminale Ducto-Lobulaire (UTDL) (Wellings et Alpers, 1994). L'UTDL comporte des canaux extra et intra lobulaires qui se terminent par des acini principalement fonctionnels pendant la grossesse et la lactation. Il est à noter que c'est au niveau de l'UTDL que la majorité des lésions se développent (Kryvenko et *al.*, 2013). Les canaux galactophores convergent tous vers le mamelon, ils s'élargissent pour former les sinus lactifères, puis se rétrécissent et débouchent au niveau des pores du mamelon.

Le sein est constitué également de 15 à 25 lobes disposés en rayons autour de l'aréole. Les lobes sont séparés les uns des autres par du tissu conjonctif dense et du tissu adipeux. Ces derniers ont un rôle de protection en plus de donner sa forme et son volume à la glande mammaire. Chaque lobe se compose de 20 à 40 lobules qui renferment à leurs tours 10 à 100 alvéoles. Les glandes alvéolaires de chaque lobule sécrètent le lait dans les conduits lactifères qui s'ouvrent par un ostium à la surface du mamelon (figure 10).

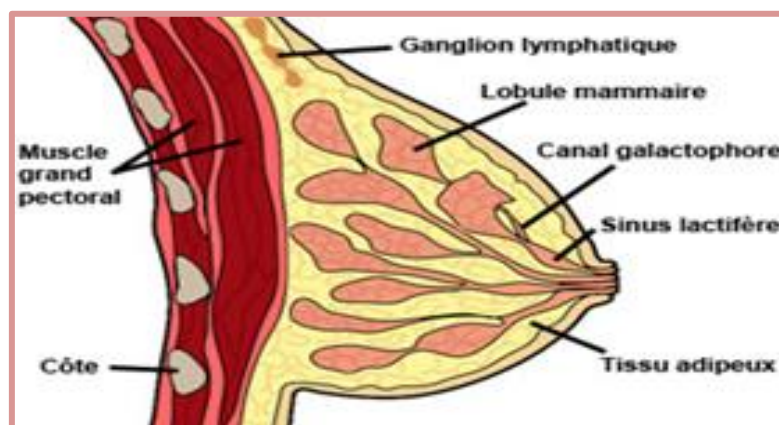


Figure 10 : Coupe schématique d'une glande mammaire à l'état adulte (Ali et Coombes, 2002).

Commencé dès les premières semaines de la vie fœtale, le développement anatomique de la glande mammaire suit les étapes hormonales de la vie de la femme : puberté, grossesse, allaitement, sevrage et ménopause. La structure anatomique fonctionnelle permettant la lactation n'est atteinte qu'au moment de la lactation. Ainsi, sous l'influence des hormones sexuelles (œstrogènes et progestérone) et de certains facteurs de croissance, la glande mammaire est en évolution permanente et représente une cible privilégiée pour les transformations malignes (Olsson, 2000).

II-3-1-2-Anatomopathologie de la glande mammaire :

Le terme « Cancer du sein » ne désigne que les tumeurs de la glande mammaire. La plupart de ces tumeurs (98%) sont des adénocarcinomes développés, à partir des cellules épithéliales soit des lobules glandulaires (carcinomes lobulaires) ou des canaux galactophores (carcinomes canaux) (Henderson, 1993).

Les tumeurs mammaires sont dites *in situ* lorsque les cellules cancéreuses sont confinées aux canaux et lobules, elles sont dites infiltrantes lorsque ces cellules sont présentes dans les tissus qui les entourent. Il a été rapporté que le cancer canalaire infiltrant est le plus fréquent. En effet, huit cancers sur dix sont des cancers canaux infiltrants. En revanche, le cancer lobulaire infiltrant est plus rare.

Dans les cancers infiltrants, les cellules malignes se propagent éventuellement dans les ganglions axillaires, on parle dans ce cas d'envahissement ganglionnaire. Les cellules cancéreuses ont tendance à migrer dans d'autres organes, et à y développer de nouvelles tumeurs dans tout l'organisme. La dissémination des cellules néoplasiques dans le corps se fait via les vaisseaux lymphatiques ou sanguins et elle est à l'origine des métastases (Kopans, 1998).

Cependant, tous les cancers du sein ne se comportent pas de la même façon. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire de déterminer les facteurs pronostics permettant d'identifier des sous-groupes de patientes afin d'envisager un traitement adapté à chaque cancer. En l'absence de traitement adapté, le cancer risque d'évoluer plus vite.

II-3-2-Classification :

Le cancer du sein a fait l'objet de plusieurs classifications. Actuellement, la plupart des auteurs utilisent la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) basée sur le degré de différenciation. Selon l'OMS, 90 à 95% des cancers du sein sont des adénocarcinomes. On distingue principalement l'adénocarcinome canalaire infiltrant et l'adénocarcinome lobulaire infiltrant. D'autres types tels que l'adénocarcinome tubuleux, le carcinome mucineux ou colloïde muqueux, le carcinome adénoïde kystique, le carcinome apocrine ou le carcinome médullaire sont retrouvés également (annexe 3).

Selon l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) et l'American Joint Committee on Cancer (AJCC), en plus de la classification histologique, il existerait d'autres classifications de la tumeur mammaire dite TNM « *Tumor, Nodes, Metastasis* » reposant sur la taille et l'infiltration de la tumeur, l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques et la présence ou non de métastases (annexe 4).

Il existe une classification qui permet d'évaluer le type exact de cancer et de définir son grade. Elle est dite SBR pour « *Scarff-Bloom et Richardson* » reposant sur le grade histopronostic. En effet, des paramètres anatomopathologiques permettent d'apprécier les potentialités cellulaires invasives, prolifératives et métastatiques (tableau 2).

Tableau 2 : Grading SBR (Scarff-Bloom-Richardson) modifié par Elston et Ellis.

| 1. Différenciation tubulo-glandulaire : proportion de tubes ou glandes dans la tumeur (en % de surface tumorale) | Score |
|--|---------|
| >75 % : tumeur bien différenciée | 1 |
| 10 à 75 % : tumeur moyennement différenciée | 2 |
| <10 % : tumeur peu différenciée | 3 |
| 2. Pléomorphisme nucléaire : degré d'atypie apprécié sur la population tumorale prédominante | |
| Noyaux petits, réguliers, uniformes | 1 |
| Pléomorphisme modéré | 2 |
| Variations marquées de taille, de forme, avec nucléoles proéminents | 3 |
| Nombre de mitoses (à compter sur 10 champs au grossissement x400 ; valeurs définies pour un champ de 0,48 mm de diamètre ; calibrage du microscope nécessaire pour des champs différents) | |
| 0 à 6 mitoses | 1 |
| 7 à 12 mitoses | 2 |
| >12 mitoses | 3 |
| AU TOTAL | |
| Grade I | 3, 4, 5 |
| Grade II | 6, 7 |
| Grade III | 8, 9 |

De manière générale :

- Le grade I correspond aux tumeurs les moins agressives ;
- Le grade III correspond aux tumeurs les plus agressives ;
- Le grade II est un grade intermédiaire entre les grades 1 et 3.

II-3-3- Epidémiologie :

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent dans le monde. D'après la fondation internationale de recherche sur le cancer, près de 1,7 million de nouveaux cas ont été diagnostiqués en 2012. Il représente environ 25% de tous les cancers chez les femmes (Ferlay et al., 2015). Les taux d'incidence varient dans les régions du monde, avec des taux allant de 27 pour 100 000 en Afrique centrale et en Asie de l'Est à 96 en Europe occidentale. Le cancer du sein se classe comme la cinquième cause de décès par cancer global (522 000 décès) et, bien qu'il soit la cause la plus fréquente de décès par cancer chez les femmes dans les régions moins développées (324 000 décès, 14,3% du total), c'est maintenant la deuxième cause de décès par cancer dans les régions plus développées (198 000 décès, 15,4%) après le cancer du poumon (Ferlay et al., 2015). En effet, le cancer mammaire représente 249 260 nouveaux cas par an, avec 40 890 décès en 2016, aux Etats Unis (American Cancer Society, 2016).

L'incidence brute des cancers est en perpétuelle augmentation en Algérie. Une attention particulière doit être portée au cancer du sein notamment qui à ce jour représente le cancer le plus fréquent chez la femme. Il représente ainsi 40,45% des cancers de la femme en Algérie (figure 11) (Zitouni, 2014).

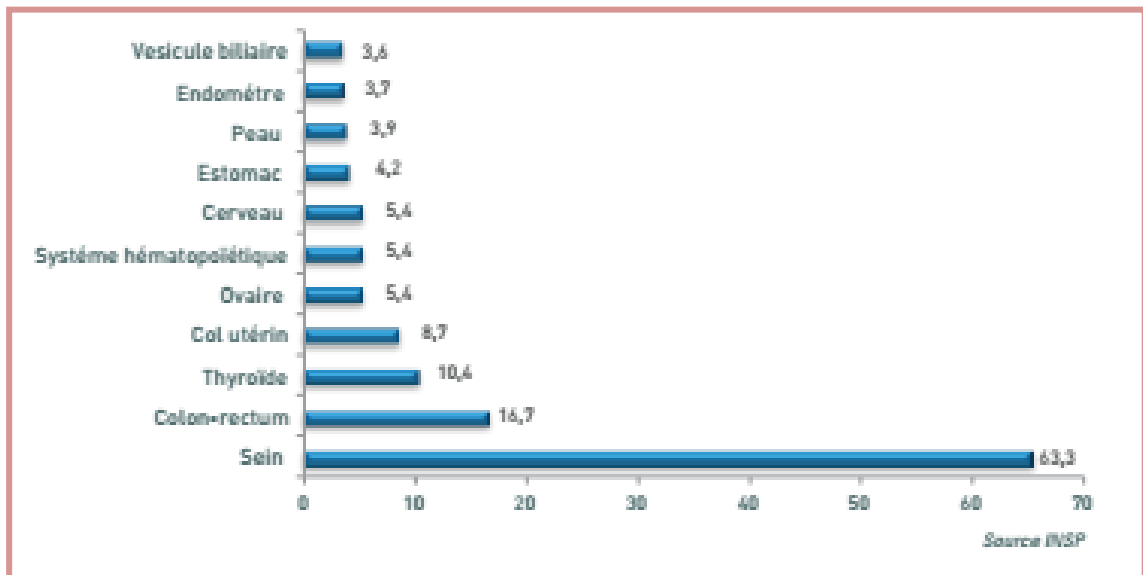


Figure 11 : Les formes de cancer les plus fréquentes chez la femme en Algérie 2010 (Zitouni, 2014).

La forte progression du cancer du sein prend ainsi des proportions épidémiques inquiétantes. En effet, en Algérie alors qu'en 2009, on recensait 9000 nouveaux cas par an ; soit 54 nouveaux cas pour 100 000 femmes, ce chiffre a été estimé à 11000 nouveaux cas par an en 2010; soit une augmentation de 500 nouveaux par an.

La particularité du cancer du sein en Algérie se situe au niveau de la moyenne d'âge qui est d'environ dix ans plus inférieure par rapport aux pays occidentaux. Il touche ainsi aussi bien la femme jeune que la femme ménopausée. Aussi, ce constat alarmant fait état d'environ 3000 décès chaque année (Zitouni, 2014).

Les raisons de la progression rapide de ce cancer peuvent être dus à:

- Une amélioration de l'enregistrement
- Les modifications démographiques
- Les expositions aux facteurs de risque
- Les modifications des modes de vie et d'alimentation

II-3-4-Facteurs de risque :

L'étiologie du cancer du sein n'est pas connue à ce jour, néanmoins, plusieurs facteurs de risque ont été incriminés dans le développement de cette pathologie.

II-3-4-1-L'âge :

Le risque de développer un cancer du sein augmente avec l'âge comme pour la plupart des maladies multifactorielles. Le vieillissement favorise l'apparition des cancers (Nkondjock et Ghadirian, 2005). Pour ces raisons, des programmes de dépistage du cancer du sein ont été mis en place pour les femmes à partir de 50 ans.

II-3-4-2-Les Facteurs hormonaux :

L'hypothèse de base est que le risque de développer un cancer du sein augmente avec une exposition plus longue aux hormones ovariennes, ce qui explique pourquoi l'âge de la ménarche (règles), la première grossesse, la ménopause, l'allaitement et l'accouchement sont tous considérés comme des facteurs de risque pour la maladie.

La plupart des recherches se focalisent sur la façon dont les hormones modifient le taux de progression ou de rémission du cancer en stimulant la division des cellules du sein et en soutenant la croissance de tumeurs œstrogène-dépendantes, plutôt que sur la façon dont les hormones peuvent effectivement causer le cancer.

La surexposition aux œstrogènes endogènes est associée à un risque élevé du cancer du sein (Keen et Davidson, 2003). Ceci par leurs implication dans la prolifération tissulaire mammaire (Platet, 2004) en induisent la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose tels que, le gène codant la cycline D nécessaire à la progression du cycle cellulaire et celui de la protéine anti apoptotique Bcl-2, (Mintz *et al.*, 2008). Cependant, la surexposition à la progestérone, elle, aurait plutôt un rôle protecteur contre ce cancer.

Selon une étude menée par le groupe (Collaborative group on hormonal factors in breast cancer, 1996), le risque de cancer du sein augmenterait de 24 % chez les femmes qui utilisent une contraception orale ou un traitement hormonal prescrit au moment de la ménopause.

II-3-4-3-Facteurs de risques familiaux et génétiques :

Les études d'épidémiologie génétique ont permis d'estimer que 5% des cas de cancer du sein sont liés à la présence d'un facteur génétique transmis selon le mode autosomique dominant et associé à un risque cumulé de cancer du sein de 67% à l'âge de 70 ans, soit un risque multiplié par 10 par rapport à celui de la population générale (Claus *et al.*, 1991).

Deux gènes, BReast Cancer genes (BRCA), *BRCA1* et *BCRA2*, semblent être les plus impliqués. En effet, le risque de survenue d'un cancer familial précoce du sein est associé à ces deux mutations (Hall *et al.*, 1992). Il est également, estimé que le risque associé aux mutations de ces gènes dépasse 80 % pour les femmes et 6 % pour les hommes, lorsque le sujet porteur de ces gènes atteint l'âge de 70 ans (Ford *et al.*, 1998 ; Wolpert *et al.*, 2000). Le fait d'avoir le même environnement, le même style de vie et un patrimoine génétique commun, ajouté à l'instabilité génomique en rapport avec les mutations, expliquerait en partie le risque accru de cancer du sein associé à l'agrégation familiale et aux mutations génétiques (Tria Tirona, 2013).

II-3-4-4-Les maladies bénignes du sein :

Les maladies bénignes du sein constituent un facteur de risque de cancer du sein (Nkondjock et *al.*, 2005). Elles sont histologiquement divisées en deux groupes : les lésions prolifératives et les lésions non prolifératives avec ou sans atypie. Les lésions non prolifératives ne sont généralement pas associées à un risque accru de cancer du sein ou, si elles le sont, le risque est très faible. Les lésions prolifératives sans atypie multiplient le risque par deux, tandis que les lésions hyperplasiques avec atypie augmentent ce risque d'au moins quatre fois (Key et *al.*, 2001).

II-3-4-5-Facteurs liés aux habitudes de vie et nutrition :

II-3-4-5-1-L'obésité et la prise de poids :

L'obésité augmente d'environ 50% le risque du cancer du sein chez les femmes ménopausées, probablement en raison de l'augmentation des concentrations sériques d'œstradiol libre (Key et *al.*, 2001). Cependant, l'obésité n'augmente pas le risque chez les femmes avant la ménopause. Par ailleurs, les femmes ayant un surpoids de plus de 20 kg à partir de l'âge de 18 ans, présentent, après la ménopause, un risque de cancer du sein multiplié par deux (Wenten et *al.*, 2002). L'excès de tissu adipeux entraîne l'augmentation de la production et du temps d'exposition aux hormones stéroïdiennes (Kirschner et *al.*, 1990).

II- 3-4-5-2-La viande rouge :

La viande rouge représente un facteur de risque pour le cancer du sein (World Cancer Research Fund, 2007). Ceci a été, en partie, expliqué par la graisse élevée qu'elle contient (Goodman et *al.*, 1992), mais également par l'activation des amines hétérocycliques présentes dans la viande rouge bien cuite en métabolites réactifs formant des adduits d'ADN et déclenchant ainsi des tumeurs.

En effet, une étude suggère que cette activation pourrait avoir lieu *in situ*, car les enzymes de métabolismes sont exprimée dans les cellules mammaires humaines et peuvent métaboliser le PhIP en N-hydroxy-PhIP (Lash et *al.*, 2005 ; Turesky, 2002). Peu importe si le N-hydroxy-PhIP se forme dans le foie, la glande mammaire, ou les deux, il subit l'activation (via O-acétylation) par les NAT2 humains (Turesky, 2002).

II-3-4-5-3-Alcool :

L'alcool est le seul facteur nutritionnel établi de risque de cancer du sein. En effet, l'alcool provoque une augmentation du niveau des hormones dans le sérum et une production accrue de facteurs de croissance IGF (*insulin-like growth factor*). Les IGF agissent comme des mitogènes, ils inhibent l'apoptose et interagissent avec les œstrogènes. Une production accrue d'IGF augmente le risque de cancer du sein, surtout avant la ménopause (Yu, 1998).

II-3-4-5-4-Autres déterminants nutritionnels :

L'association entre le risque de cancer du sein et les principales composantes de l'alimentation humaine incluant les fruits et les légumes, les produits laitiers, la viande, les vitamines, les fibres et les phyto-œstrogènes a fait l'objet de nombreuses études rapporté par la fondation mondiale des recherches sur le cancer (World Cancer Research Fund, 1997). Un intérêt particulier a été porté sur les graisses alimentaires. D'une manière générale, les résultats restent discordants (World Cancer Research Fund, 1997 ; Key et *al.*, 2004). Par ailleurs, la restriction de l'apport énergétique durant l'enfance ou avant la première grossesse réduit le risque de cancer du sein de 23 % à 76 % (Michels et Ekbom, 2004). Le mécanisme de cette association impliquerait le recul de l'âge d'apparition des premières règles et la diminution du niveau de l'hormone de croissance IGF-I et des œstrogènes.

Des études épidémiologiques ont révélé des résultats pas toujours concordants pour l'association entre les vitamines B9 et B12 et le risque de de cancer du sein. En effet, une étude récente a démontré que les folates et la vitamine B12 ne seraient pas clairement associés au risque de cancer mammaire (Matejic et *al.*, 2017).

II-3-4-6-Les facteurs environnementaux :

De nombreuses études épidémiologiques ont suggéré que l'environnement peut jouer un rôle important dans le développement du cancer du sein (Henderson, 1993). Les puissants carcinogènes impliqués dans la cancérogenèse mammaire sont les hydrocarbures aromatiques polycycliques, et les amines aromatiques et hétérocycliques (Layton et *al.*, 1995). Les enzymes impliquées dans le métabolisme de ces carcinogènes sont exprimés dans les tissus mammaires normaux ainsi que dans la tumeur du sein (Lee et *al.*, 2003).

Les 4-ABP (4-aminobiphenyl) sont activés par les NATs en métabolites hautement réactifs conduisant à des dommages sur l'ADN initiant la carcinogenèse mammaire (Stephenson et *al.*, 2010). Ces substances sont rencontrées dans la fumée de cigarettes et dans la viande rouge bien cuite. Elles se forment à partir de composés naturellement présents qui seront transformés en ces métabolites hautement cancérigènes.

II-3--4-6-1-Le tabac :

La fumée du tabac est une importante source de substances carcinogènes. Pourtant, la cigarette n'est pas considérée comme un facteur de risque établi du cancer du sein. Certains investigateurs ont trouvé que les fumeuses présentent un risque réduit, d'autres aucun risque, d'autres ont rapporté une augmentation de risque associé au tabagisme. Le tabagisme passif semble associé à un risque augmenté d'environ 60 % ; ce risque est multiplié par trois chez les femmes après la ménopause (Johnson et *al.*, 2000). L'effet protecteur de la cigarette dans le cancer du sein serait dû à une diminution des œstrogènes circulants et à l'action anti-œstrogénique du tabac (Tanko et Christiansen, 2004).

Cependant, la fumée de cigarette est connue pour être une source d'amines aromatiques et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques tels que le 4-ABP (4-aminobiphenyl) qui sont activés par les NATs en métabolites hautement réactifs conduisant à des dommages sur l'ADN initiant la carcinogenèse mammaire (Stephenson et *al.*, 2010).

II-3-5-Les altérations moléculaires à l'origine de la transformation cancéreuse mammaire :

Les altérations moléculaires à l'origine de la transformation cancéreuse et observées dans une tumeur, quel que soit son type, peuvent être classées en trois catégories :

- l'activation des proto-oncogènes ;
- l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs ;
- l'inactivation des gènes de réparation de l'ADN.

II-3-5-1-Les altération génétiques :

Lorsque les altérations sur certains gènes surviennent (cassure de brins d'ADN, mutations, ou inactivations), la prolifération de cellules (évolution de cellules souches en cellules luminales) peut devenir incontrôlée, la mort programmée des cellules indésirables peut également être stoppée.

II-3-5-1-1-Les mutations des gènes *BRCA1* – *BRCA2* :

Les gènes *BRCA1* et *BRCA2* situés respectivement sur les chromosomes 17q et 13q (Miki et al., 1994) sont des gènes suppresseurs de tumeur exprimés dans les cellules mammaires. Les protéines nucléaires *BRCA1* et *BRCA2* sont multifonctionnelles, impliquées entre autres dans la réparation des dommages de l'ADN et la régulation du cycle cellulaire (Figure 12) (Çelik et al., 2015). La transmission de ces gènes suppresseurs de tumeur est autosomale dominante à pénétrance variable (Rahman et al., 2014 ; Pagon et al., 2016).

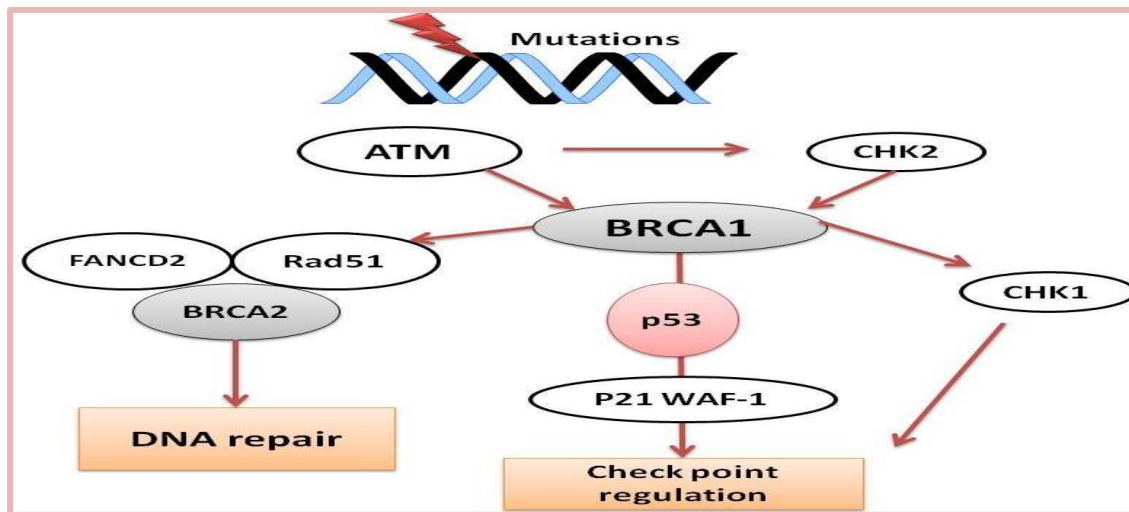


Figure 12 : Rôle du BRCA1/BRCA2 dans les mécanismes de réparation d'ADN et la régulation du cycle cellulaire (Çelik et *al.*, 2015)

Parmi les mutations de ces gènes, certaines augmentent sensiblement le risque de cancer du sein. En effet, la protéine codée par *BRCA1* est impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN, la régulation de la transcription des gènes et la différenciation des tissus lors de la grossesse et l'allaitement. Le gène *BRCA2* est lui aussi impliqué dans un processus de réparation puisqu'il favorise l'action d'une enzyme appelée Recombinase capable d'échanger un fragment d'ADN endommagé par un ADN correct. De ce fait, une déficience en *BRCA1* et *2* va bloquer la réparation de l'ADN. Un mécanisme épigénétique pourrait être à l'origine de l'inactivation du gène *BRCA1*.

Cependant, certaines mutations du gène *BRCA1* ont un d'impact que dans les tissus possédant des récepteurs à œstrogènes. Ceci pourrait être du à des molécules issues de la dégradation des œstrogènes ayant la capacité de provoquer des cassures double brin de l'ADN et que *BRCA1* soit en mesure d'agir sur la réparation (Savage, 2014). Des recherches ont aussi montré que le gène *BRCA1* régulait le métabolisme des œstrogènes.

II-3-5-1-2-Les mutations du gène *HER2* :

L'oncogène *ErbB2* (*HER2*), localisé sur le chromosome 17q21. Ce gène est un membre de la famille du récepteur à l'Epidermal Growth Factor (EGFR ou *HER1*), famille de récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase. Essentiel pour la transmission du signal intracellulaire sous-jacent tel que celui de la voie des mitogen-activated protein kinase (MAPK) et des phosphatidylinositol-3 kinases (PI3K).

Son activation, en particulier dans les cancers du sein, est essentiellement liée à une amplification qui a pour conséquence d'entraîner une surexpression de la protéine à la surface des cellules. Cette amplification concerne le gène *HER2* et les gènes qui l'entourent (figure 13) (Baselga *et al.*, 2009).

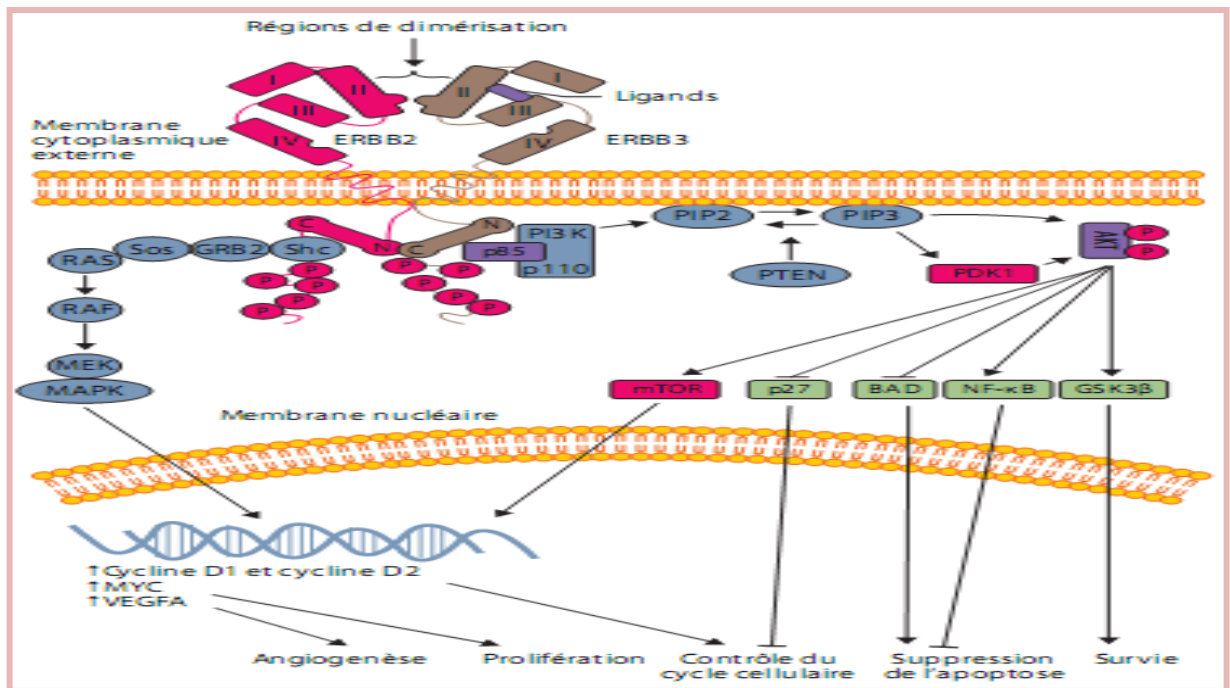


Figure 13 : Voies de signalisation en aval des récepteurs de la famille EGFR et en particulier *HER2* (Baselga *et al.*, 2009).

II-3-5-1-3-Autres gènes :

Des mutations sur d'autres gènes peuvent également expliquer l'apparition du cancer du sein. Le gène Myc par exemple peut être surexprimé. La protéine Myc (série de 439 acides aminés) initie la croissance et la prolifération cellulaire grâce à de nombreux facteurs de croissance, régule la différenciation cellulaire et peut aussi déclencher l'apoptose. Enfin, Myc a la capacité d'activer l'expression de plusieurs autres gènes. Cette surexpression de Myc se retrouve dans les cancers de types basal ou triple négatif (Dey et *al.*, 2015).

Une autre protéine est également en ligne de mire : la protéine p53, dont le gène codant se trouve sur le chromosome 17. Comme Myc, c'est un facteur de transcription, c'est-à-dire que la p53 pourra activer certains gènes, arrêter transitoirement la division cellulaire, ou encore mieux déclencher l'apoptose. La p53 pourra aussi activer des mécanismes de réparation (figure 14).

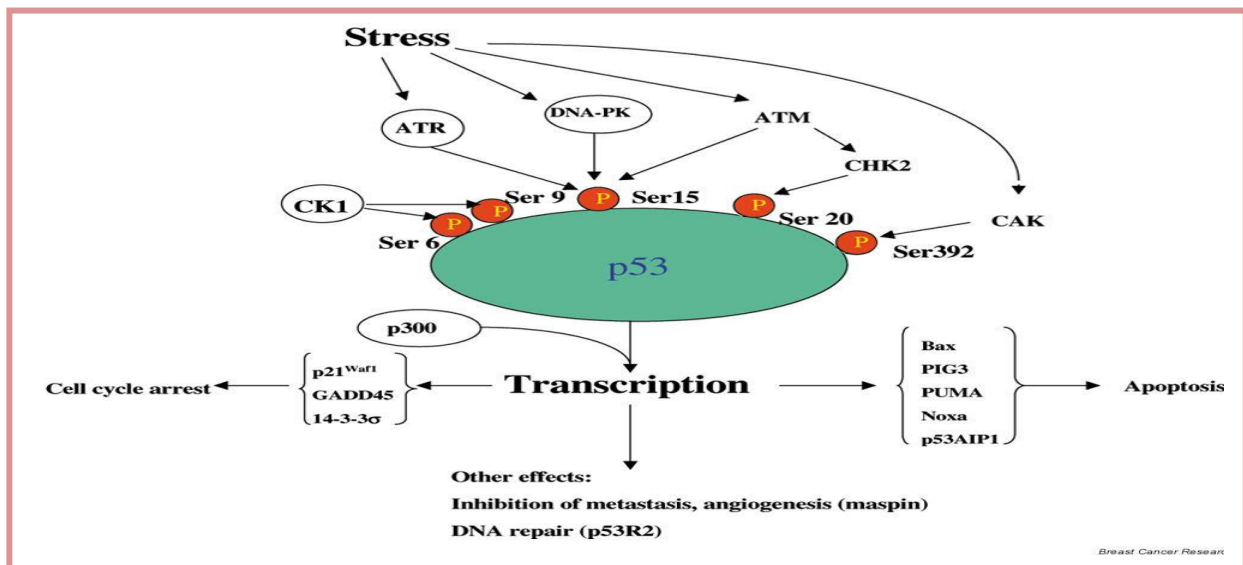


Figure 14: Un modèle simplifié de certains des composants de la signalisation p53 (Gasco et *al.*, 2002).

Des études ont montré que cette protéine limitait la prolifération des cellules souches présentes dans les tissus mammaires. D'autres études ont montré que la perte de l'intégrité de cette protéine (due à la mutation du gène correspondant) était souvent présente dans les cancers du sein (environ 20 à 40 % des tumeurs sont concernées).

II-3-5-2-Les causes hormonales :

II-3-5-2-1-Les œstrogènes :

Certaines cellules présentent des excès en récepteurs en œstrogènes. Lorsqu'ils se trouvent en quantité élevée dans l'organisme, les œstrogènes vont donc se fixer sur ces récepteurs et provoquer la multiplication de cellules (figure 15). Plus la prolifération sera importante, plus on risque d'atteindre un point de non-retour, avec en outre, une augmentation des risques de dommages génétiques à chaque division. Mais d'autres mécanismes sont également mis en jeu pour expliquer l'action cancérigène des œstrogènes.

Notamment, il est avancé que le métabolisme de l'œstradiol (un des principaux œstrogènes) conduit à l'apparition de petites molécules à action néfaste pour le génome.

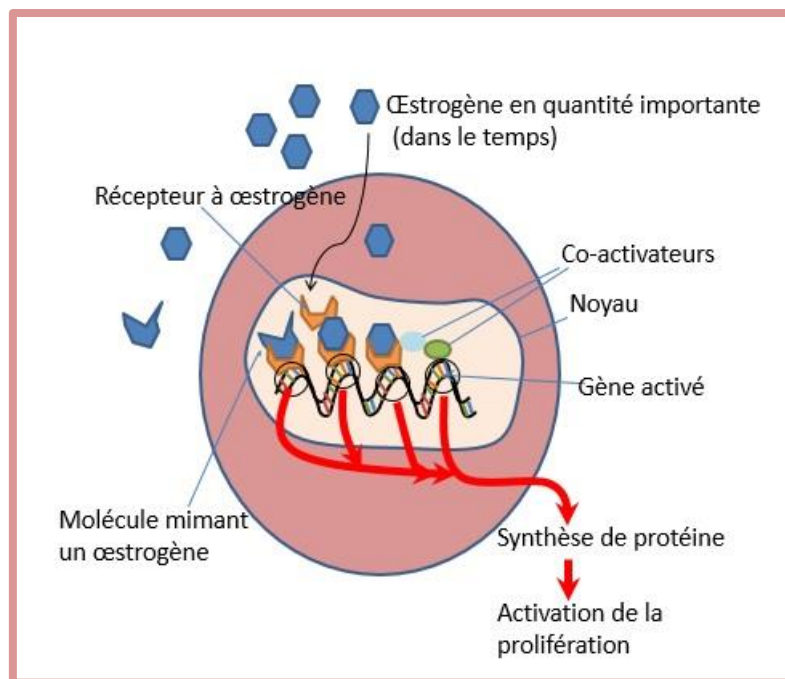


Figure 15 : Rôle des œstrogènes dans la prolifération des cellules cancéreuses mammaires.

Un autre lien avec le gène BRCA1 est en cours de recherches : le gène BRCA semble réprimer la transcription d'enzymes qui dégradent les œstrogènes dans les cellules du sein. Ainsi l'exposition aux œstrogènes (en durée et en quantité) chez une femme est un paramètre plutôt important, potentiellement générateur de cancers hormono-dépendants.

II-3-5-2-2-la progestérone :

Cette hormone semble jouer un rôle important dans la régulation du nombre de cellules souches des glandes mammaires (Joshi et *al.*, 2010). Pendant l'allaitement, en réponse à la progestérone (et prolactine), la différenciation terminale des cellules souches est plus importante ce qui diminue la quantité de celles qui pourraient évoluer négativement. Mais le rôle de cette hormone n'est tout de même pas si aisé à cerner comme l'explique une étude récente. Les auteurs ont bien montré le rôle de la progestérone dans le développement et l'invasion des cellules cancéreuses (métastases) mais ils concluent en indiquant que la fonction de la progestérone était fortement dépendante du contexte dans lequel elle se trouve (notamment la présence de certaines enzymes, d'autres hormones et de récepteurs particuliers) (Lin et *al.*, 2001).

II-3-6-Le diagnostic du cancer mammaire :

II-3-6-1-La mammographie :

La mammographie est l'examen de référence de dépistage du cancer du sein. Elle permet le dépistage précoce des lésions précancéreuses et cancéreuses du sein et le diagnostic des symptômes se rapportant aux pathologies de la glande mammaire (écoulements mamelonnaires, douleurs, nodules, etc...).

II-3-6-2-L'imagerie par résonance magnétique (IRM) :

L'IRM du sein ne remplace pas la mammographie ni l'échographie mammaire. Elle ne constitue pas un examen systématique du diagnostic du cancer du sein. Il s'agit d'un outil supplémentaire employé parfois pour faire la différence entre une anomalie bénigne et une anomalie cancéreuse. Ceci dans le cadre du dépistage des femmes à haut risque ou lorsque l'imagerie standard ne permet pas de conclure avec certitude l'absence de malignité.

II-3-6-3-l'imagerie du sein moléculaire (MBI) :

C'est un type de test qui est utilisé pour détecter les cellules cancéreuses dans les seins de certaines femmes ayant des mammographies anormales ou qui ont des tissus osseux denses.

II-3-6-4-La biopsie mammaire :

Lorsqu'une lésion suspecte est détectée dans un sein à l'occasion d'une mammographie, des examens complémentaires sont nécessaires pour déterminer s'il s'agit ou non d'un cancer. Pour cela, une biopsie est réalisée.

II-3-6-5-Les biomarqueurs tumoraux sériques :

Les biomarqueurs du cancer du sein sont CA 15-3, antigène carcino-embryonnaire (CEA) et CA 27-29.41. Tous ont une faible sensibilité et spécificité et ne sont donc pas utiles dans la détection précoce du cancer du sein car ils peuvent être élevés dans diverses situations physiologiques ou pathologiques.

II-3-7-Le traitement du cancer du sein :

En plus de la chirurgie qui reste l'acte principal dans ce type de pathologie, il existe plusieurs traitements pour pallier aux tumeurs mammaires. La chimiothérapie utilise des médicaments qui ciblent les cellules en division, elle est suivie de la radiothérapie qui, comme son nom l'indique, utilise des radiations ionisantes afin d'induire des cassures sur les brins d'ADN.

La thérapie adjuvante, qui survient directement après la chirurgie est basée sur le phénotype intrinsèque de substitution déterminé par l'évaluation des récepteurs hormonaux ; œstrogène (ER) et progestérone (PR) et le récepteur du proto-oncogène HER2/neu (HER-2) (tableau3).

Tableau 3 : Thérapies conventionnelles du cancer mammaire.

| Luminal A | Luminal B | Her2+ | Triple négatif |
|------------------|------------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Hormonothérapie | Hormonothérapie+ Chimiothérapie | Chimiothérapie + anti-HER-2 | Chimiothérapie seule |

Luminal A: ER positif, HER2 négatif, et PR élevé.

Luminal B: ER positif, HER2 négatif et la protéine Ki-67 élevée (>30%) ou PR faible.

Triple négatif : Les tumeurs sont : ER-, PR- et HER2-.

La thérapie ciblée qui est l'une des thérapies immunes consiste à diriger des anticorps monoclonaux contre la protéine HER2 surexprimée à la surface de la cellule tumorale et qui régule des voies de signalisation vitales pour celle-ci. Elle appartient à la famille des récepteurs à « l'epidermal growth factor » (EGFR). Les produits des gènes EGFR sont des récepteurs transmembranaires de type I à activité tyrosine kinase intrinsèque.

Ce sont des proto-oncogènes. Dans 15 à 20 % des cancers du sein, il existe une surexpression de HER2 qui représente un facteur histopronostic indépendant de tous les autres et qui s'accompagne d'une diminution de la survie globale en raison d'une augmentation de la fréquence des métastases et des rechutes (Chapiro, 2012).

Le trastuzumab (*Herceptin*®), un anticorps monoclonal humanisé anti HER-2, est la première thérapie ciblée mise sur le marché dans le cancer du sein (Smith et *al.*, 2007).

La thérapie hormonale ou l'endocrinothérapie est soit l'équilibre soit le blocage des hormones stéroïdiennes. Elle est indiquée chez tous les patientes dont l'expression ER est détectable, définie comme 1% des cellules cancéreuses invasives, indépendamment de la chimiothérapie et/ou de la thérapie ciblée.

Le tamoxifène (*Nolvadex*®) est le traitement le plus connu en hormonothérapie, c'est un modulateur sélectif des récepteurs des œstrogènes utilisé sous forme orale. En effet, il va bloquer l'action des œstrogènes ayant un rôle central dans la tumeur mammaire.

Récemment, une autre classe d'agents hormonaux, appelés inhibiteurs de l'aromatase (IA), a montré une efficacité supérieure au tamoxifène dans les milieux métastatiques, néoadjuvant et adjuvant chez les femmes ménopausées (Croxtall et McKeage, 2011).

Cependant, l'efficacité de ces traitements est limitée, principalement par l'existence ou l'apparition de résistance des cellules tumorales. Ainsi, l'augmentation de l'activité de ces agents anticancéreux constitue l'objectif prioritaire du traitement du cancer. Pour une meilleure thérapie il faut cibler les cellules cancéreuses tout en évitant les cellules non cancéreuses. Cependant, une individualisation thérapeutique n'est toujours pas très développée et, en particulier, de nombreuses patientes sont toujours exposées à des médicaments sans réellement en tirer de bénéfices importants. L'absence d'individualisation dans les décisions thérapeutiques a, évidemment, aussi un impact majeur sur le coût puisque ces patientes sont exposées à des médicaments de dernière génération particulièrement coûteux.

III-MATERIEL ET METHODES

III- Matériel et Méthodes :

III-1-Matériel :

III-1-1-Sujets étudiés :

Notre étude a porté sur 146 patientes atteintes de cancer mammaire et 145 femmes en bonne santé identifiées et interrogées entre juin 2011 et avril 2015. Tous les sujets sont d'origine Algérienne.

Les prélèvements sanguins des patientes ont été effectués au niveau du service d'oncologie du CPMC-CHU Mustapha d'Alger après accord du chef de service. Le diagnostic de la maladie a été confirmé pour chacune de nos patientes par le médecin oncologue.

Les prélèvements des témoins ont été recueillis auprès d'un laboratoire d'analyse. Ces témoins ont été confirmés saines après échographie mammaire, mammographie ou palpation, elles ne présentent aucun antécédent de cancer ou autres maladies chroniques.

Tous les individus ont signé un consentement éclairé. L'ensemble des informations a été cosigné sur une fiche détaillée répertoriant tous les critères d'inclusion et d'exclusion ainsi qu'un questionnaire portant sur les habitudes de consommation de viande rouge, le degré d'exposition à la fumée de cigarette et la prise de vitamines et de médicaments influençant les paramètres étudiés (annexe 5).

III-1-2-Prélèvements sanguins :

Les prélèvements sanguins ont été récupérés dans des tubes EDTA chez les patients et témoins. Les plasmas ont été obtenus après centrifugation à 2500 rpm pendant 15min puis congelés à -20°C jusqu'à utilisation (dosage biochimique). Par ailleurs, le reste du sang a été destiné à l'extraction de l'ADN afin d'étudier le polymorphisme du gène *NATI* et 2 et *MTHFR*.

III-2-Méthodes :

III-2-1- Etude génétique :

III-2-1-1-Extraction de l'ADN par la méthode des sels :

La technique utilisée au laboratoire est une technique de relargage (Salting out) des protéines à force ionique élevée. Les sels à haute concentration (NaCl 6M) nécessitent d'être entourés par l'eau d'hydratation, ceci se produit au détriment des molécules de protéines. Elles se trouvent ainsi privées d'eau, ce qui favorise leur agrégation et leur insolubilisation. Après centrifugation, elles précipitent au fond du tube et l'ADN sera libre dans le surnageant (Miller *et al.*, 1988).

Mode opératoire :

Prélever 5 ml de sang dans un tube avec anticoagulant. Ajouter la solution de lyse des globules rouge (SLR) en complétant le volume jusqu'à 50 ml et mélanger délicatement. Centrifuger à 6000 rpm pendant 15 mn. Eliminer le surnageant et refaire l'opération jusqu'à obtention de culot blanc. Sur le culot blanc, ajouter une solution composée de 0.6ml de Solution de Lyse des globules Blancs (SLB) +20µl protéinase K à 10mg/ml. Homogénéiser puis incuber une nuit sous agitation à 37°C. Le lendemain ajouter 0.3ml NaCl 6M. Agiter vigoureusement pour obtenir un mélange d'aspect laiteux. Centrifuger à 8000 trs/min pendant 15 mn. Récupérer par pipetage le surnageant (contenant l'ADN). Ajouter au surnageant le même volume d'éthanol absolu. On obtient une méduse par retournement du tube ou agitation au vortex. Transférer délicatement la méduse dans 1ml d'éthanol à 70 %. Rincer 3fois la méduse avec de l'éthanol 70%. Sécher les tubes de l'éthanol en les laissant ouverts. Redissoudre l'ADN dans 200µl ou + de TE10-1. Mettre sous agitation jusqu'à dissolution complète de la méduse. Placer le tube à 4°C.

III-2-1-2-Dosage et contrôle de qualité de l'ADN :

III-2-1-2-1-Dosage de l'ADN :

L'évaluation de la concentration et de la pureté de l'ADN a été réalisée par spectrophotométrie. En effet, les bases puriques et pyrimidiques absorbant fortement dans l'UV à 260 nm. Une unité de DO à 260 nm correspond à une concentration d'ADN double brin de 50µg/ml.

L'éventuelle contamination protéique peut être appréciée par une seconde lecture de DO à 280 nm, un ADN pur doit présenter un rapport DO 260/280 compris entre 1,8 et 2.0.

III-2-1-2-2-Contrôle de qualité d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose :

L'électrophorèse sur gel d'agarose à PH = 8,3 est une méthode simple et efficace pour la séparation, l'identification et la purification des fragments d'ADN. Elle consiste à faire migrer dans un gel soumis à un champ électrique des molécules chargées négativement. Leur distance de migration dépend principalement de leurs poids moléculaires, de la concentration d'agarose et de l'intensité du courant appliqué.

Les ADN ayant un rapport DO 260/280 compris entre 1.8 et 2 et présentant une seule bande en électrophorèse ont été retenus pour l'amplification.

III-2-1-3-Etude du polymorphisme génétique par la technique PCR- RFLP :

III-2-1-3-1-Etude du polymorphisme génétique de *NAT1* :

III-2-1-3-1-1-Amplification de l'ADN génomique :

Le génotype *NAT1* a été déterminé par la méthode de Deitz et *al.* (1997) et modifiée. Dans un premier temps le fragment codant de 870pb contenant les sites polymorphes étudiés a été amplifié à l'aide d'amorces spécifiques sens PAB-1F et anti-sens PAB-1R.

Cette PCR a été réalisée dans un volume réactionnel de 50µl contenant 50-100ng d'ADN génomique, du tampon 1x-PCR, 0,2mM de dNTP, 1,5mM de MgCl₂ et 0,75U de Taq polymérase.

Le programme thermique a été le suivant :

- Un pré traitement.....94°C pendant 5 min
 - Dénaturation.....94°C pendant 1 min
 - Hybridation58°C pendant 1 min
 - Elongation72°C pendant 1 min
 - Une étape d'extension72°C pendant 7 min
- } 30 cycles

Le contrôle de la PCR a été effectué par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% (figure 16).

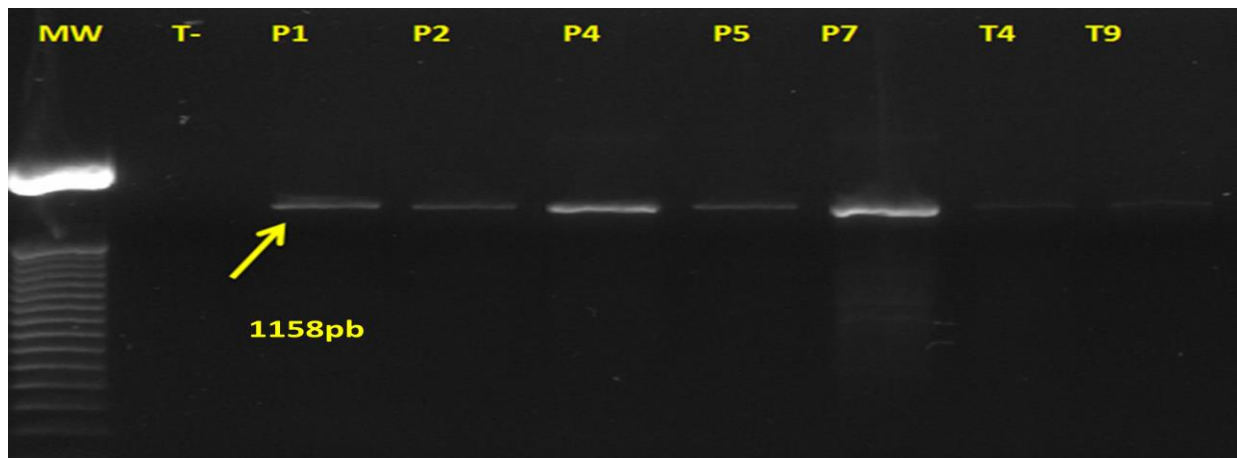


Figure 16 : Profil électrophorétique des fragments amplifiés par PCR du gène *NAT1* sur gel d'agarose.

MW : Marqueur de taille 50pb **T-** : Témoin négatif.

P : Patientes **T** : Témoins

III-2-1-3-1-2-Nested PCR :

Après amplification du gène, les produits amplifiés ont été soumis à une seconde PCR (Nested PCR) qui permet d'amplifier une région spécifique, ensuite ils ont été digérés par les différentes enzymes de restriction (*EcoRI*, *BsaMI*, *VspI*, *HinfI*, *ScaI*) pour la détermination des différents allèles.

Le principe de la technique permet d'affiner notre méthode d'exploration en ciblant une séquence spécifique. Cette ré-amplification utilise des amorces plus internes qui permettent d'amplifier un fragment qui sera utilisé pour la détermination de chaque différent allèle.

Un volume réactionnel de 20µl contenant 1µl du produit amplifié du gène *NAT1*, du tampon 1x-PCR, 0,2mM de dNTP, 1,5mM de MgCl₂, 200-300 ng de chaque amorce sens et antisens (tableau 4) et 0,5U de Taq polymérase (Deitz et *al.*, 1997 ; Zheng et *al.*, 1999) avec modifications.

Le programme thermique a été le suivant :

- Un pré traitement.....94°C pendant 5 min
 - Dénaturation.....94°C pendant 30 sec
 - Hybridation58°C pendant 30 sec
 - Elongation72°C pendant 30 sec
 - Une étape d'extension72°C pendant 5 min
- } 25 cycles

III-2-1-3-1-2-1-Nested 1 :

Cette PCR nous permet d'amplifier une région de 124pb situé entre le nucléotide 169 et le nucléotide 294 du gène *NAT1* afin de détecter le polymorphisme C190T.

III-2-1-3-1-2-2-Nested 2 :

Cette PCR permet d'obtenir un fragment de 261pb situé entre le nucléotide 325 et le nucléotide 345 pour étudier le polymorphisme G560A.

III-2-1-3-1-2-3-Nested 3 :

Un fragment de 132pb situé entre le nucléotide 992 et le nucléotide 1012 a été amplifié à partir du gène *NAT1* afin de détecter le polymorphisme C1095A.

III-2-1-3-1-2-4-Nested 4 :

Cette PCR permet d'obtenir un fragment de 96pb situé entre le nucléotide 1053 et le nucléotide 1087 et éventuellement de détecter le polymorphisme T1088A.

III-2-1-3-1-2-5-Nested 5 :

Un fragment de 138pb situé entre le nucléotide 536 et le nucléotide 558 a été amplifié à partir du gène *NAT1* afin d'explorer le polymorphisme C559T.

Tableau 4 : Position des séquences nucléotidiques d'amorces utilisées pour l'étude du polymorphisme du gène *NAT1*.

| | Taille | Primer |
|-------------------------|---------------|--|
| PCR du gène NAT1 | 1158pb | PAB-1F (-10→29) PAB-1R (1148→1127) |
| Nested 1 | 124pb | PAB 2F (169→189) PAB-2R (292→274) |
| Nested2 | 261pb | PAB-5F (325 → 345) PAB-5R (585 →561) |
| Nested3 | 132pb | PAB-3F (992 → 1012) PAB-3R (1123 →1096) |
| Nested4 | 96pb | PAB-4F (1053→1087) PAB-1R (1148→1127) |
| Nested 5 | 138pb | PAB-6F (536 → 558) PAB-6R (673 → 654) |

III-2-1-3-1-3-Digestion par les enzymes de restriction :

L'étude des polymorphismes *NAT1* utilise l'approche des RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Cette approche est basée sur le fait que les polymorphismes de l'ADN sont révélés par des modifications de coupure par les endonucléases de restriction (polymorphisme de restriction).

Les produits amplifiés ont été digérés dans un volume réactionnel de 20µl contenant l'enzyme de restriction en présence de 10mg/ml BSA et du tampon approprié. La réaction a été incubée à 37°C, pendant une nuit. Les produits digérés ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose/nuseive à 2% (tableau 5).

Tableau 5 : Digestion enzymatique et révélation des produits d'hydrolyse.

| SNP étudié | Enzyme correspondante | Taille de l'amplicon (pb) | Produits générés (pb) | | |
|------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------|-----------|
| | | | Sauvage | Hétérozygote muté | Muté |
| C190T | <i>EcoRI</i> | 124 | 107+17 | 124+107+17 | 124 |
| G560A | <i>HinfI</i> | 261 | 146+115 | 146+115+90+25 | 146+90+25 |
| C1095A | <i>BsaMI</i> | 132 | 107+25 | 132+107+25 | 132 |
| T1088A | <i>VspI</i> | 96 | 64+32 | 96+64+32 | 96 |
| C559T | <i>ScaI</i> | 138 | 138 | 138+117+21 | 117+21 |

III-2-1-3-2-Etude du polymorphisme génétique de *NAT2* :

III-2-1-3-2-1-Amplification de l'ADN génomique :

Le génotype *NAT2* a été déterminé par la méthode de Khelil et al. (2010). Dans un premier temps le fragment codant de 866pb contenant les sites polymorphes étudiés a été amplifié à l'aide d'amorces spécifiques sens N2-F1 et anti-sens N2-R1 (tableau 6).

Cette PCR a été réalisée dans 50 µl de volume réactionnel contenant 50-100ng d'ADN génomique, du tampon 1x-PCR, 0,2mM de dNTP, 2,5mM de MgCl₂ et 0,5U de Taq polymérase.

Le programme thermique a été le suivant :

- Un pré traitement.....94°C pendant 5 min
 - Dénaturation.....94°C pendant 1 min
 - Hybridation58°C pendant 1 min
 - Elongation72°C pendant 1 min
 - Une étape d'extension72°C pendant 5 min
- } 35 cycles

Le contrôle de la PCR a été effectué par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% (figure 17).

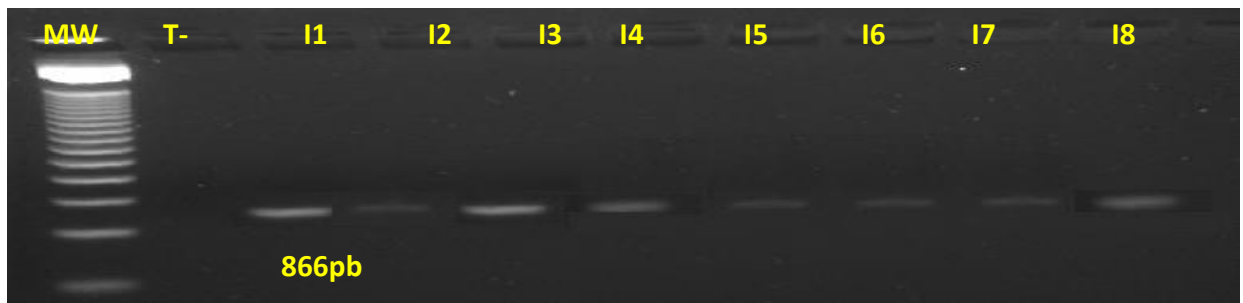


Figure 17 : Profil électrophorétique des fragments amplifiés par PCR du gène *NAT2* sur gel d'agarose à 1%.

MW : 300pb T- : Témoin négatif I : Individu

III-2-1-3-2-2-Nested PCR :

1µl du produit amplifié de PCR *NAT2* a été utilisé comme matrice dans un volume réactionnel de 20µl contenant du tampon 1x-PCR, 0,2mM de dNTP, 1,5mM de MgCl₂, 200-300 ng de chaque amorces sens et anti sens (tableau 6) et 0,5U de Taq polymérase.

Le programme thermique a été le suivant :

- Un pré traitement.....94°C pendant 5 min
 - Dénaturation.....94°C pendant 30 sec
 - Hybridation58°C pendant 30 sec
 - Elongation72°C pendant 30 sec
 - Une étape d'extension72°C pendant 5 min
- } 30 cycles

III-2-1-3--2-2-1-Nested 1 :

Cette PCR nous a permis d'amplifier une région de 141pb du gène *NAT2* afin de détecter le polymorphisme T341C.

III-2-1-3-2-2-2-Nested 2 :

Un fragment de 120pb a été amplifié à partir du gène *NAT2* afin de détecter le polymorphisme A803G.

Tableau 6 : Position des séquences nucléotidiques d'amorces utilisées pour l'étude du polymorphisme du gène *NAT2*.

| | Taille | Primer |
|--------------------------------|--------------|-----------------------------|
| PCR du gène <i>NAT2</i> | 866pb | N2-F1 (30 → 50) |
| | | N2-R1 (895 → 867) |
| Nested 1 | 141pb | N2-F2 (318 → 337) |
| | | N2-R2 (458 → 437) |
| Nested 2 | 120pb | N2-F3 (776 → 799) |
| | | N2-R3 (867 → 896) |

III-2-1-3-2-2-3-Digestion par les enzymes de restriction :

Les produits de ces PCR ont été analysés par la méthode RFLP grâce aux enzymes de restriction (tableau 7).

Tableau 7 : Digestion enzymatique et révélation des produits d'hydrolyse

| SNP étudié | Enzyme correspondante | Taille de l'amplicon (pb) | Produits générés (pb) | |
|------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------|
| | | | Sauvage | Muté |
| T111C | <i>TaqI</i> | 866 | 332+226+170+138 | 252+226+170+138+80 |
| G590A | <i>TaqI</i> | 866 | 332+226+170+138 | 396+332+138 |
| C759T | <i>TaqI</i> | 866 | 332+226+170+138 | 332+308+226 |
| G191A | <i>MspI</i> | 866 | 707+93+66 | 800+66 |
| A434C | <i>MspI</i> | 866 | 707+93+66 | 416+291+93+66 |
| C282T | <i>FokI</i> | 866 | 429+238+199 | 667+199 |
| C481T | <i>KpnI</i> | 866 | 450+416 | 866 |
| A845C | <i>DraIII</i> | 866 | 866 | 820+46 |
| G857A | <i>BamHI</i> | 866 | 826+40 | 866 |
| T341C | <i>AciI</i> | 141 | 141 | 121+20 |
| A803G | <i>DdeI</i> | 120 | 120 | 97+23 |

III-2-1-3-3-Etude du polymorphisme génétique du gène *MTHFR* :

III-2-1-3-3-1-Amplification de l'ADN génomique :

Le génotype *MTHFR* a été déterminé par la méthode de Michael et al. (2008) modifiée. Un fragment contenant le site polymorphe étudié a été amplifié à l'aide d'amorces spécifiques sens M1 et anti-sens M2.

Cette PCR a été réalisée dans un volume réactionnel contenant 50-100ng d'ADN génomique, du tampon 1x-PCR, des dNTP, du MgCl₂, les amorces sens et anti sens et de la Taq polymérase.

Le programme thermique a été le suivant :

- Un pré traitement.....94°C pendant 5 min
 - Dénaturation.....94°C pendant 1min
 - Hybridation65°C pendant 1min
 - Elongation72°C pendant 1min
 - Une étape d'extension72°C pendant 7 min
- } 30 cycles

Le contrôle de la PCR a été effectué par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% (figure 18).

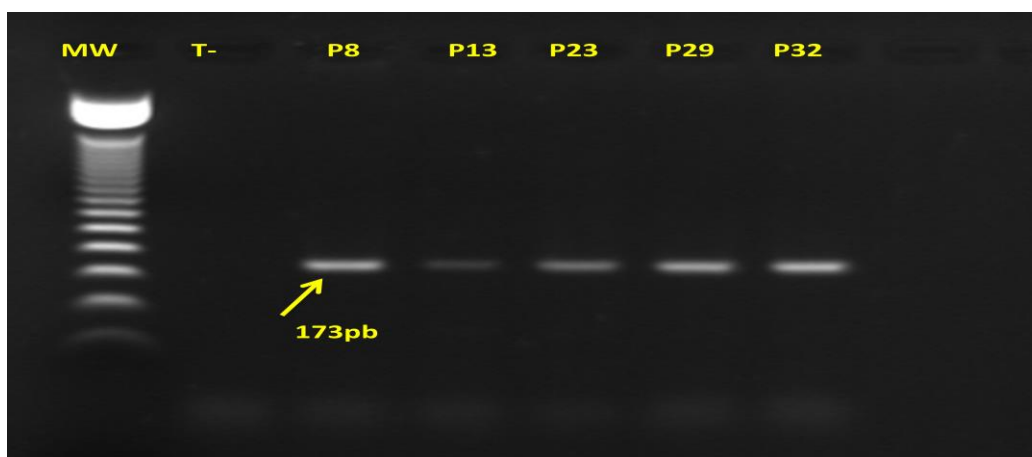


Figure 18 : Profil électrophorétique des fragments amplifiés par PCR du gène *MTHFR* sur gel d'agarose.

MW : Marqueur de taille 50pb T- : Témoin négatif

P : Patientes

III-2-1-3-3-1-2-Digestion des produits de PCR :

Les produits amplifiés ont été digérés dans un volume réactionnel contenant l'enzyme de restriction *Hinf I*.

La réaction a été incubée à 37°C, pendant une nuit. Les produits digérés ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.

III-2-2-Dosages biochimiques :

III-2-2-1-Dosage des Folates et de la vitamine B12 :

Le dosage des folates et de la vitamine B12 a été réalisé au sein du Laboratoire de Biochimie de l'HCA sur l'automate COBAS e411.

III-2-2-1-1-Dosage des folates :

Le dosage des folates dans le sérum a été effectué en utilisant la méthode ECLIA sur l'analyseur Elecsys 2010.

Principe du test de l'ECLIA :

Le test ECLIA pour les folates fait appel au principe de compétition et utilise une protéine de liaison des folates naturelle dite FBP (Folate Binding Protein), spécifique à l'acide folique. L'acide folique contenu dans l'échantillon entre en compétition avec l'acide folique exogène, marqué à la biotine, pour les sites de liaison libres du complexe FBP marqué au ruthénium.

La détermination quantitative des folates contenus dans le serum des individus étudiés consiste en une série de trois incubations. Lors de la première incubation 25µl d'échantillon sérique sont incubés avec deux réactifs de prétraitement l'hydroxyde de sodium à 25g/L et le sodium 2-mercaptoethanesulfonate (MESNA) à 40g/l pH=5,5, respectivement, permettant ainsi la libération de l'acide folique des FBP endogènes.

La seconde étape consiste en une incubation de l'échantillon prétraité avec la FBP marquée au ruthénium. On assiste alors à la formation d'un complexe dont la quantité dépend de la concentration en analyte dans l'échantillon.

Après addition de micro particules tapissées de streptavidine et d'acide folique biotinylé, les sites libres de la FBP marquée au ruthénium sont occupés. Au cours de cette troisième incubation, il se forme donc un complexe acide folique biotinylé-FBP marquée au ruthénium. Le complexe immun est fixé à la phase solide par une liaison biotine-streptavidine. Le mélange réactionnel est finalement transféré dans la cellule de mesure qui fournira une concentration relative à la production de luminescence.

III-2-2-1-2-Dosage de la vitamine B12 :

Le test ECLIA pour vitamine B12 fait appel à un principe de compétition semblable à celui des folates. On notera cependant une différence concernant la protéine de liaison requise soit un facteur intrinsèque spécifique de la vitamine B12. Un des réactifs de prétraitement diffère également. Le dithiothreitol à 1.028g/L pH=5.5 remplace le MESNA (sodium 2-mercaptoethanesulfonate). Le principe de révélation par électrochimiluminescence est aussi utilisé.

III-2-2-2-Dosage de l'homocystéine :

Le dosage de l'Hcy a été réalisé au sein du Laboratoire de Biochimie de l'hôpital Mustapha par le biais d'un automate : l'Immulite 2000.

L'échantillon sérique est dans un premier temps prétraité. Ce prétraitement consiste d'une part, à réduire l'ensemble des formes circulantes d'Hcy par du dithiothréitol afin d'obtenir la molécule sous la forme de thiol libre puis à transformer la totalité de cette homocystéine réduite en SAH sous l'action de la S-adénosyl-L-homocystéine hydrolase bovine, en présence d'adénosine en excès.

On procède ensuite au transfert de l'échantillon dans une cupule réactionnelle contenant des billes de polystyrène tapissées de SAH ainsi qu'un anticorps monoclonal murin spécifique de la SAH et couplé à la phosphatase alcaline. La SAH de l'échantillon et la SAH immobilisée sur les billes entrent alors en compétition pour la capture de l'anticorps. L'anticorps non lié aux billes est ensuite éliminé par un lavage et une centrifugation à bord de l'appareil.

La quantité d'anticorps liée est mesurée par addition d'un substrat qui devient luminescent sous l'action de la phosphatase alcaline. Le signal mesuré en coups par seconde est inversement proportionnel à la quantité d'Hcy présente dans l'échantillon.

III-2-3-Analyse statistique :

Les résultats obtenus ont été traités avec le logiciel SPSS® version 18. L'association entre chaque variable et le cancer du sein a été réalisée par le calcul de l'Odds Ratio (OR), de l'Intervalle de Confiance (IC) à 95% et du degré de significativité p. OR permet d'apprécier l'intensité de l'association entre un marqueur et une maladie décrivant un effet protecteur à une valeur <1 ($OR < 1$) et une susceptibilité à la maladie à une valeur >1 ($OR > 1$). La corrélation entre les différentes variables a été réalisée par le test de Spearman.

La régression logistique univariable a été réalisée afin de sélectionner les variables qui peuvent être de bons candidats à prendre en considération. La régression logistique multivariable permet de détecter les meilleurs prédicteurs de la maladie. Un $P < 0,05$ est considéré comme statistiquement significatif (Preux, 2005).

Nous avons déterminé la puissance statistique et la taille de l'échantillon par le test statistique adéquat.

IV-RESULTATS ET DISCUSSION

IV-1-Etude de la relation entre le polymorphisme génétique de *NAT1* et le cancer du sein :

Le gène *NAT1* présente plusieurs mutations ponctuelles donnant naissance aux différentes formes alléliques constituant son polymorphisme génétique (annexe 2). L'allèle de référence ou allèle sauvage est l'allèle *NAT1**4. Les polymorphismes et les allèles correspondants étudiés dans cette partie de notre travail sont 190C>T (*NAT1**17) ; 560G>A (*NAT1**14B) ; 1095C>A (*NAT1**3) ; 1088T>A et le 559C>T (*NAT1**15).

IV-I-1-Caractéristiques de la population étudiée :

Cette partie de l'étude a porté sur 62 patientes atteintes du cancer du sein et 62 témoins. La moyenne d'âge des patients et des sujets témoins était de $63,31 \pm 10,01$ et de $61,2 \pm 16,22$, respectivement. Nos résultats ont montré une différence significative entre patients et témoins ($P < 0,05$) par rapport à la ménopause, ainsi que la localisation géographique. Toutes les caractéristiques cliniques préalablement établies (annexe 5) sont résumées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Caractéristiques démographiques et cliniques de la population étudiée.

| Caractéristiques | Patientes % | Témoins % | P |
|---------------------------------------|--------------------|------------------|--------------|
| Nombre d'individus | 62 | 62 | - |
| Age (moyenne ± SD) | 63,31 ± 10,01 | 61,2 ± 16,22 | 0,42 |
| Ménopause | | | |
| Pré-ménopause | 41,9 | 15,3 | 0,001 |
| Post-ménopause | 58,1 | 84,7 | |
| Antécédents familiaux | | | |
| Oui | 32,3 | 0 | 0,000 |
| Non | 67,7 | 100 | |
| Localisation de la tumeur | | | |
| Sein droit | 48,2 | - | - |
| Sein gauche | 51,8 | - | - |
| Récepteurs oestrogéniques (ER) | | | |
| ER+ | 83 | - | - |
| ER- | 17 | - | - |
| Localisation géographique | | | |
| Urbaine | 60,7 | 37,9 | 0,045 |
| Rurale | 39,3 | 62,1 | |
| Statut fumeurs | | | |
| Fumeurs passive | 52,5 | 33,3 | 0,069 |
| Non-fumeurs | 47,5 | 66,7 | |
| Consommation de viande rouge | | | |
| Pas de consommation | 3,2 | 10 | |
| Faibleconsommation¹ | 82 | 80 | 0,130 |
| Forte consommation² | 14,8 | 10 | |

Comparaison entre patients et témoins en utilisant le test de Student ou le test de Mann-Whitney U.

1: Moins de 3 fois par semaine; 2: Plus de 1 fois par semaine.

IV-1-2-L'allèle *NATI*17* :

Cette partie inclut 62 patientes et 59 témoins.

La nested 1 PCR génère un fragment de 124pb qui contient un site de restriction polymorphe pour l'enzyme *EcoRI* en position 190pb, en fonction de la mutation C/T (figure 16).

En effet, les individus porteurs de l'allèle sauvage (C) présentent un site de restriction. Le génotype C/C donne 2 fragments de 107pb et 17pb. Les individus porteurs de la mutation *NATI*17* sont caractérisés par l'abolition du site de restriction. Le génotype *NATI*17/17* présente un fragment unique de 124pb (figure 19).



Figure 19 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus du clivage par *EcoRI* présentant différents génotypes de la *NATI*17*.

MW : marqueur de taille de 50pb, **T+** : témoin positif (124pb), **T-** : témoin négatif.

P : Patientes, **T** : Témoins.

Le tableau suivant représente les fréquences alléliques et génotypiques obtenues chez les individus étudiés.

Tableau 9 : Fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme *NAT1*17* chez les patientes atteintes de cancer mammaire vs témoins.

| <i>NAT1*17</i> (190C>T) | Malades n (%) | Témoins n (%) | OR | P |
|----------------------------|------------------|------------------|------|-------|
| <i>NAT1*4/NAT1*4</i> | 61 (98,39) | 55(93,22) | 4,44 | 0,332 |
| <i>NAT1*17/NAT1*17</i> | 1(1,61) | 4 (6,78) | 0,23 | 0,332 |
| Allèle <i>NAT1*17</i> | 2(1,61) | 8 (6,78) | 0,23 | 0,090 |

Le tableau 9 montre les fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme C190T (*NAT1*17*). La fréquence du génotype *NAT1*4/NAT1*4* a été de 98,39% et 93,22 %, respectivement chez les malades et les témoins. Cette différence est non significative ($P=0,332$). De même, la fréquence du génotype *NAT1*17/NAT1*17* a été de 1.61% et 6,78%, respectivement chez les patients et les témoins avec une différence non significative ($P=0,332$). Ceci est en accord avec l'étude de Zheng et al. (1999)

Nous remarquons que la fréquence du génotype *NAT1*4/NAT1*4* est importante chez les témoins et chez les malades (98,4% et 93,2%) par rapport au génotype *NAT1*17/NAT1*17*(1,6% et 6,8%). Par contre il y'a absence totale du génotype *NAT1*4/NAT1*17* dans la population étudiée. Nos résultats sont en accord avec la bibliographie qui a rapporté une fréquence élevée de l'allèle *NAT1*4* et une fréquence faible de l'allèle *NAT1*17* chez les populations Caucasiennes étudiées (Zheng *et al.*, 1999).

La substitution C190T représentant l'allèle *NAT1*17* entraîne une substitution de l'acide aminé Arginine en Tryptophane (Butcher *et al.*, 1998). Cette substitution aboutit à une protéine NAT1 présentant des activités catalytiques de N et O-acétyltransférase réduites par rapport au type sauvage *NAT1*4* (Zhu et Hein, 2008). Ceci suggère que les individus porteurs de l'allèle *NAT1*17* présenteraient un risque pour la formation d'adduits d'ADN et éventuellement le cancer.

IV-1-3-L'allèle *NAT1*14B* :

Cette partie inclut 36 patientes et 39 témoins.

La nested2 PCR génère un fragment de 261pb qui contient un site de restriction polymorphe pour l'enzyme *HinfI*. En effet, les individus porteurs de l'allèle sauvage (G) donnent 3 fragments de 146pb, 90pb et 25pb et les individus porteurs de l'allèle muté (A) donnent deux fragments de 146pb et 115pb (figure 20).

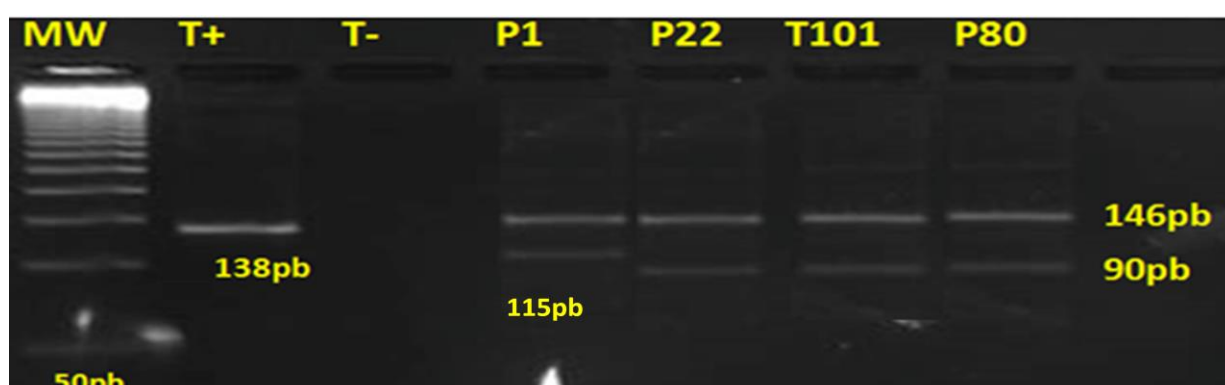


Figure 20 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus du clivage par *HinfI* présentant différents génotypes de la *NAT1*14B*.

MW : marqueur de taille de 50pb, T+ : témoin positif (138pb), T- : témoin négatif.

P : Patientes T : Témoins

Le tableau suivant représente les résultats obtenus chez les patients et témoins.

Tableau 10 : Fréquences génotypiques et alléliques de l'allèle *NAT1*14B* chez les patients atteints de cancer du sein vs témoins.

| <i>NAT1*14B</i> (560G>A) | Malades n (%) | Témoins n (%) | OR | P |
|-----------------------------|------------------|------------------|-------|-------|
| <i>NAT1*4/NAT1*4</i> | 30 (83,33) | 35 (89,74) | 0,57 | 0,418 |
| <i>NAT1*14B/NAT1*14B</i> | 6(16,67) | 4 (10,26) | 1,750 | 0,418 |
| Allèle <i>NAT1*14B</i> | 12 (16,67) | 8 (10,26) | 1,750 | 0,250 |

Le tableau 10 montre les fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme G560A (*NATI*14B*). Aucune différence significative n'a été observée entre patients et témoins pour ce polymorphisme ($p>0,05$). Nos résultats sont accord avec l'étude de Zheng *et al.* (1999), qui ne montre aucune différence significative vis-à-vis de ce polymorphisme avec le cancer du sein. *NATI*14B* a été plutôt associé à un risque accru de cancer du poumon induit par le tabagisme (Bouchardy *et al.*, 1998).

La fréquence du génotype *NATI*4/NATI*4* a été de 83,3% et 89,7 %, respectivement chez les malades et les témoins. Nous remarquons ainsi que la fréquence du génotype *NATI*4/NATI*4* est importante chez les témoins et chez les malades par rapport au génotype *NATI*14B/NATI*14B*. Par contre il y'a absence totale du génotype *NATI*4/NATI*14B* dans la population étudiée.

La fréquence du variant allélique *NATI*14B* a été de 16,7% et 10,3%, respectivement chez les patients et les témoins. Il a été rapporté que cette fréquence est de 23,8% dans la population Libanaise (Dhaini et Levy, 2000), tandis que celle rapportée dans les populations Américaines, Allemandes, Françaises et Canadiennes est inférieure à 5% (Doll et Hein, 2001).

Cependant, un effectif plus important nous permettrait de comparer notre population aux autres populations.

IV-1-4-L'allèle *NATI*3* :

Cette partie inclut 28 patientes et 35 témoins.

La nested 3 PCR du gène *NATI* génère un fragment de 132pb qui contient un site de restriction polymorphe pour l'enzyme *BsaMI* (figure 21). En effet, le génotype sauvage C/C donne 2 fragments de 107pb et 25pb et le génotype muté A/A présente un fragment unique de 132pb.

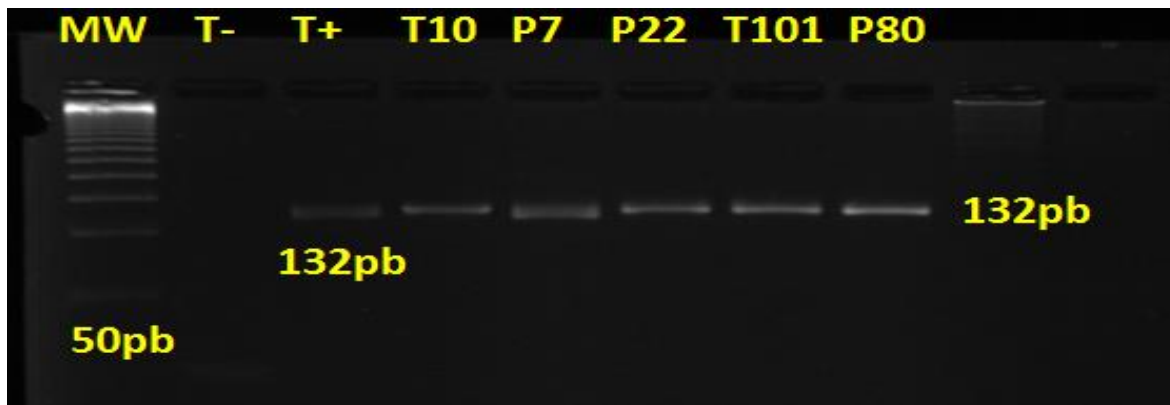


Figure 21 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus du clivage par *Bsa*MI présentant différents génotypes de la *NATI**3.

MW : marqueur de taille de 50pb, **T+** : témoin positif (132pb), **T-**: témoin négatif.

P : Patientes **T** : Témoins

Le tableau suivant montre les résultats obtenus.

Tableau 11 : Fréquences génotypiques et alléliques de l'allèle *NATI**3 chez les patients atteints de cancer du sein vs témoins.

| <i>NATI</i> *3 (1095C>A) | Malades | | Témoins | | OR | P |
|--------------------------------|-----------|---------|---------|---------|------|-------|
| | n | (%) | n | (%) | | |
| <i>NATI</i> *4/ <i>NATI</i> *4 | 2(7,14) | | 1(2,86) | | 2,62 | 0,431 |
| <i>NATI</i> *3/ <i>NATI</i> *3 | 24(85,71) | | 29 | (82,86) | 1,24 | 0,770 |
| <i>NATI</i> *3/ <i>NATI</i> *4 | 2 | (7,14) | 5 | (14,29) | 0,46 | 0,374 |
| Allèle <i>NATI</i> *3 | 50 | (89,29) | 63 | (90) | 0,93 | 0,896 |

Le tableau 11 montre les fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme C1095A (*NATI**3). La fréquence du génotype *NATI**3/*NATI**3 a été de 85,7% et 82,8%, respectivement chez les malades et les témoins. De même, la fréquence du variant allélique *NATI**3 a été de 82,28% et 90%, respectivement chez les patients et les témoins avec une différence non significative (P=0,896). Nous remarquons ainsi que la fréquence du génotype *NATI**3/*NATI**3 est importante chez les témoins et chez les malades par rapport au génotype *NATI**3/*NATI**4 et *NATI**4/*NATI**4 dans la population étudiée.

Ces résultats sont en désaccord avec les résultats rapporté par Zheng et al. (1999), qui rapportent un pourcentage faible de l'allèle *NAT1**3. Ceci pourrait être dû, premièrement, aux différences dans les populations étudiées.

Cependant, nos résultats ne montrent aucune association entre ce polymorphisme et le cancer mammaire ($P>0,05$).

IV-1-5-Le polymorphisme 1088T>A :

Cette partie inclut 16 patientes et 23 témoins.

La nested 4 PCR du gène *NAT1* génère un fragment de 96pb qui contient un site de restriction pour l'enzyme *VspI* chez le type sauvage. En effet, les individus de type muté ne présentent pas de site de restriction et donnent un fragment de 96pb sur le profil électrophorétique. Les individus de type sauvage donnent deux fragments de 64pb et 32pb (figure 22).

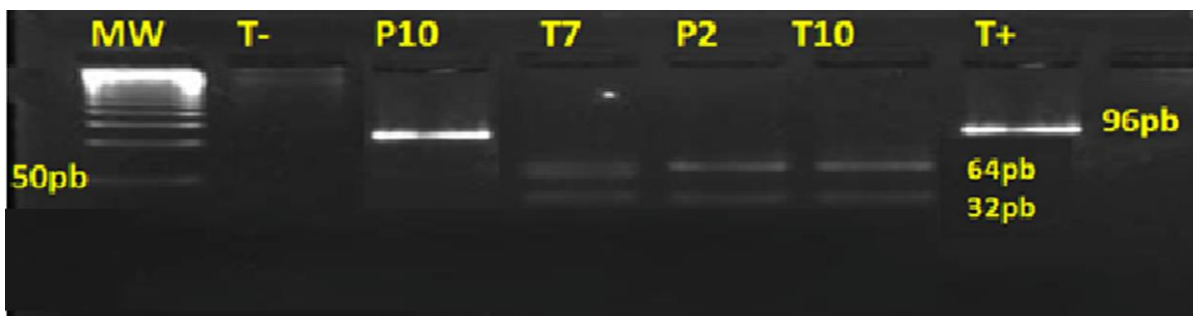


Figure 22 : profil électrophorétique de digestion par la *VspI*.

MW : marqueur de taille de 50pb, T+ : témoin positif (96pb), T-: témoin négatif.

P : Patientes T : Témoins

Le tableau suivant représente les fréquences génotypiques.

Tableau 12 : Fréquences génotypiques du SNP 1088T>A chez les patients atteints de cancer du sein *vs* témoins.

| | Malades | | Témoins | | OR | P |
|-----------|---------|---------|---------|---------|------|-------|
| | n | (%) | n | (%) | | |
| <i>TT</i> | 1 | (6,25) | 1 | (4,35) | 1,47 | 0,794 |
| <i>AA</i> | 13 | (81,25) | 17 | (73,91) | 1,53 | 0,597 |
| <i>TA</i> | 2 | (12,50) | 5 | (21,74) | 0,51 | 0,464 |

La fréquence du génotype *AA* a été de 81,3% et 73,9%, respectivement chez les malades et les témoins. De même, la fréquence du génotype *TT* a été de 6,3% et 4,3%, respectivement chez les patients et les témoins. Nous remarquons ainsi que la fréquence du génotype *AA* est importante chez les témoins et chez les malades par rapport au génotype *TT* et *TA* dans la population étudiée.

Cependant, nos résultats ne montrent aucune association entre le polymorphisme T1088A et le cancer du sein dans notre population.

IV-I-6-L'allèle *NATI*15* :

Cette partie inclut 60 patientes et 60 témoins.

IV-1-6-1-Profils *NATI*15* obtenus :

La nested 5 PCR du produit amplifié a généré un fragment de 138pb contenant un site de restriction polymorphe pour l'enzyme *ScaI* pour le type muté. Les individus homozygotes pour l'allèle sauvage (*NATI*4*) s'accompagnent de l'absence du site de restriction et donnent un fragment de 138pb sur le profil électrophorétique. Les individus homozygotes porteurs du génotype *NATI*15/15* sont caractérisés par la présence du site de restriction et donnent 2 fragments de 138pb et 117pb (figure 23).

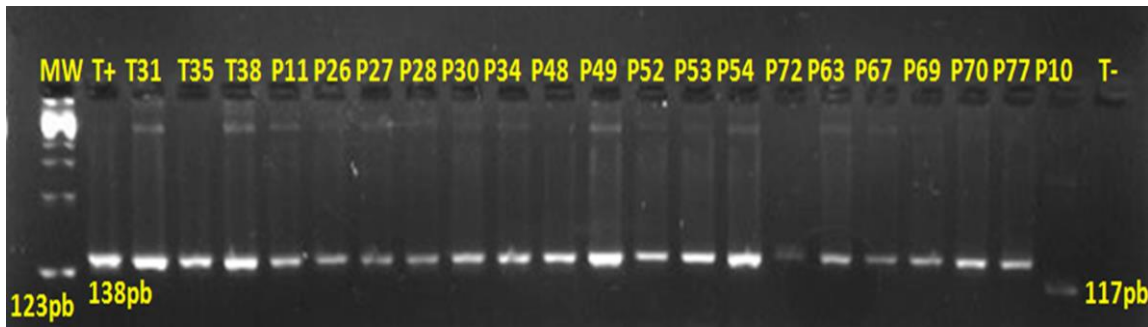


Figure 23 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus du clivage par *ScalI* présentant différents géotypes de la *NAT1*15*.

MW : marqueur de taille de 123pb, T+ : témoin positif (138pb), T- : Témoins négatif.

P : Patientes T : Témoins

IV-1-6-2-Analyse univariée :

Pour l'allèle *NAT1*15* qui code pour une protéine inactive, un modèle de régression logistique inconditionnelle a été réalisé pour déterminer les effets de ce polymorphisme et de la consommation de viande rouge et la fumée de tabac sur le risque de cancer du sein.

Tableau 13 : OR, P et CI à 95% de la régression logistique univariée entre patients et témoins.

| <i>NAT1*15</i> (559C/T) | | P | OR | CI (%95) |
|-------------------------------------|----|--------------|---------------|--------------|
| Génotype | CC | 0,552 | 0,750 | 0,290-1,937 |
| | CT | 0,076 | 4,222 | 0,858-20,779 |
| | TT | 0,307 | 0,512 | 0,142-1,850 |
| Allèles | C | 0,149 | 1,952 | 0,787-4,840 |
| | T | 0,401 | 1,333 | 0,682-2,608 |
| Age | | 0,420 | 0,933 | 0,093-0,608 |
| Ménopause | | 0,230 | 0,259 | 0,108-0,621 |
| Antécédents familiaux | | 0,998 | 2,325 | 0,000-? |
| Localisation géographique | | 0,046 | 2,523 | 1,016-6,262 |
| Statut fumeurs | | 0,070 | 2,207 | 0,938-5,194 |
| Consommation de viande rouge | | 0,000 | 14,370 | 5,236-39,440 |

Nos résultats ne montrent pas de différence significative entre patients et témoins ($P > 0,05$) par rapport à l'âge et la ménopause.

Le tableau 13 montre qu'aucune association n'a été observée entre l'allèle C (OR = 1,952, $p = 0,149$), T (OR = 1,333, $p = 0,401$) et le cancer du sein. Aucune différence significative n'a été observée entre le génotype CC (OR = 0,750, $p = 0,552$), CT (OR = 4,222, $p = 0,076$), TT (OR = 0,512, $p = 0,307$) de *NAT1*15* et le cancer du sein. Ceci est en accord avec l'étude de Zheng et al. (1999).

La substitution de C559T dans l'allèle *NAT1*15* provoque un changement d'acide aminé de Arginine à Stop (Zhu et Hein, 2008). Un individu homozygote pour C559T (R187stop) a montré une activité *NAT1* indétectable dans les lysats sanguins humains (Bruhn et al., 1999) et l'expression recombinante de *NAT1*15* chez les bactéries a entraîné un manque complet d'activité catalytique NAT1 (Hughes et al., 1998).

Les résultats du tableau 13 suggèrent que la consommation de viande rouge (OR=14,370, $p = 0,000$) présenterait un facteur de risque pour la tumeur. Ceci pourrait être expliqué par les arylamines qu'elle pourrait contenir (Cross et Sinha, 2004) et qui sont métabolisés par *NAT1*. Il a été aussi rapporté que ceci pourrait aussi être dû à la présence élevée d'acide gras dans ce type de viande.

No résultats montrent aussi que la localisation urbaine présenterait un facteur de risque (OR=2,523, $p=0,046$) pour le cancer du sein dans notre population. Ceci est en accord avec l'étude d'Emaus et al. (2014) et pourrait être expliqué par la présence de xénobiotiques de type arylamines et amines hétérocycliques dans la pollution au niveau des agglomérations.

Nos résultats suggèrent qu'il n'existerait pas de différence significative entre patients et témoins concernant le tabagisme (OR = 2,207, $p = 0,070$). L'absence d'association pourrait être expliquée par les effets anti-œstrogéniques potentiels de la fumée de cigarette. En effet, il a été démontré que le tabagisme a des effets protecteurs pour le cancer de l'endomètre, Les effets anti-œstrogéniques du tabagisme pourraient masquer ses effets cancérigènes potentiels (Tanko et Christiansen, 2004).

IV-1-6-3-Analyse multivariée :

Une analyse de régression logistique multivariée a été utilisée pour trouver les meilleurs facteurs de risque de la maladie. Dans cette analyse, la consommation de viande rouge apparaît comme un facteur de risque indépendant pour le cancer du sein ($p = 0,017$, OR = 5,337) (tableau 14). Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux de la littérature (La Vecchia et *al.*, 1987; Wise, 2014).

Table 14 : La régression logistique multivariée.

| | <i>P</i> | OR | CI (%95) |
|-------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Consommation de viande rouge | 0,017 | 5,337 | 1,342-21,229 |

La viande a été incluse dans les facteurs de risque pour le cancer par la Fondation mondiale de la recherche sur le cancer (World Cancer Research Fund, 2007).

Il a été démontré que de nombreuses amines hétérocycliques telles que le MeIQx (2-amino-3,8-diaméthylimidasol [4,5-f] quinoxaline) et le PhIP (2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo (4-5-6) pyridine), contenus dans la viande rouge grillé ou bien cuite induisent des tumeurs des glandes mammaires (Keating et Bogen, 2004). En effet, il a été suggéré des mécanismes potentiels à l'association entre la viande rouge et le cancer, tels que les lésions d'ADN causées par les composés N-nitroso, représentés par des nitrosamines, initiant la carcinogénèse mammaire.

De même, il a été démontré qu'un risque accru de développer un cancer du sein a été associé à la consommation de niveaux élevés de graisse alimentaire retrouvés en grande partie dans la viande rouge (Abel et *al.*, 2014).

En outre, il a été suggéré que la génération de radicaux libres par le fer héminique contenu dans la viande rouge pourrait contribuer à la carcinogenèse. En effet, l'oxydation de l'oxymyoglobine ferreuse (Fe^{2+}) à la mémyoglobine ferrique (Fe^{3+}) se produit en présence de certaines espèces réactives et produit une décoloration de la viande et l'initiation de la peroxydation lipidique. L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène produits lors de l'oxydation de l'oxymyoglobine peuvent réagir pour libérer le radical hydroxyle, qui peut initier l'oxydation d'autres molécules comme les lipides et les protéines (Chaijan, 2008).

Il a également été rapporté que l'acide N-glycolylneuraminique (Neu5Gc), un xéno-autoantigène non humain, abondant dans les viandes rouges, peut réagir avec des anticorps anti-Neu5Gc circulants (c'est-à-dire des xéno-auto-anticorps). L'interaction antigène-anticorps résultante est supposée générer ou favoriser une inflammation chronique ou «xénosite», qui pourrait contribuer à la carcinogenèse ou à d'autres maladies exacerbées par une inflammation chronique (Samraja et al., 2015).

IV-2-Etude de la relation du polymorphisme génétique du gène *MTHFR*, des folates, vitamines B12, homocystéine et le cancer du sein

VI-2-1-Caractéristiques de la population étudiée :

Cette partie inclut 64 patientes atteintes de cancer du sein et 83 témoins. Le tableau 15 présente la répartition de ces individus selon des caractères cliniques préalablement établis (annexe 5).

Tableau 15 : Caractéristiques cliniques et démographiques de la population étudiée.

| Caractéristiques | Patientes | Témoins | P |
|------------------------------|---------------------|---------------------|--------------|
| Nombre d'individus | 64 | 83 | - |
| Age (moyenne \pm SD) | 52,84 \pm 11,66 | 49,60 \pm 22,51 | 0,572 |
| Homocystéine (μ mol/L) | 12,34 \pm 7,17 | 13,23 \pm 5,92 | 0,263 |
| Folate (ng/mL) | 10,06 \pm 4,42 | 8,25 \pm 3,45 | 0,008 |
| Vitamine B12 (pg/mL) | 608,16 \pm 464,20 | 432,26 \pm 292,52 | 0,000 |
| Ménopause | | | |
| Pré-ménopause(%) | 42,2 | 41 | 0,507 |
| Post-ménopause (%) | 57,8 | 59 | |
| Grade SBR | | | |
| Stade 0 (%) | 0 | - | - |
| Stade I (%) | 21,1 | - | - |
| Stade II (%) | 63,2 | - | - |
| Stade III (%) | 15,8 | - | - |
| Hormonothérapie (Tmx) | | | |
| Tmx + (%) | 78,7 | - | - |
| Tmx - (%) | 21,3 | - | - |

La moyenne d'âge des patients et des sujets témoins est de 52,84 \pm 11,66 et de 49,60 \pm 22,51, respectivement. Nos résultats ne montrent pas de différence significative entre patients et témoins ($P > 0,05$) par rapport à l'âge et la ménopause (tableau 15).

IV-2-2-Profil *MTHFR* obtenu :

L'amplification du gène *MTHFR* génère un fragment de 173pb celui-ci présente un site de restriction pour l'enzyme *HinfI* chez le type muté. Le site polymorphe est abolit chez le type sauvage.

Les individus homozygotes pour l'allèle sauvage C donnent 1 fragment unique de 173pb sur le profil électrophorétique. Les individus homozygotes pour l'allèle muté T présentent 2 sites de restriction et donnent deux fragments de 129pb et 44pb (figure 24).

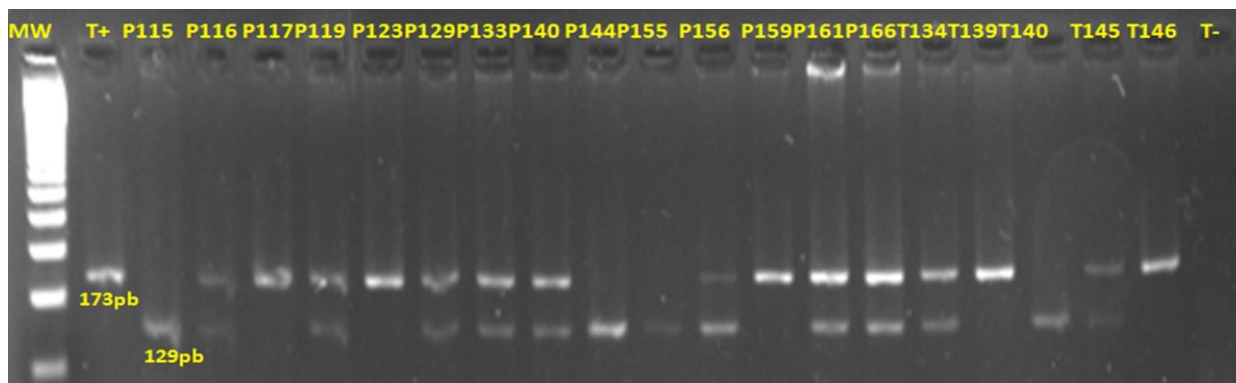


Figure 24 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus du clivage par *HinfI* présentant différents génotypes de la *MTHFR*.

MW : Marqueur de taille 50pb, T+ : Témoins positif (173pb), T- : Témoin négatif.

P : Patientes T : Témoins

IV-2-3-Analyse univariée :

Une régression logistique univariée a été réalisée dans un premier temps afin d'examiner l'association possible entre le polymorphisme C677T *MTHFR*, folate sérique, vitamine B12, Homocystéine (Hcy) totale et cancer du sein chez une population Algérienne (tableau 16).

Tableau 16 : OR, P et CI à 95% de la régression logistique univariée des facteurs : Age, Folate, Vitamine B12, Hcy et polymorphisme du gène *MTHFR*.

| <i>MTHFR</i> (677 C/T) | | <i>P</i> | OR | CI (%95) |
|------------------------|----|--------------|--------------|-------------|
| Génotype | CC | 0,720 | 0,882 | 0,445-1,749 |
| | CT | 0,765 | 1,110 | 0,559-2,203 |
| | TT | 0,931 | 1,043 | 0,402-2,708 |
| Allèles | C | 0,759 | 0,925 | 0,561-1,523 |
| | T | 0,780 | 1,074 | 0,650-1,773 |
| Age (mean ± SD) | | 0,294 | 1,010 | 0,992-1,028 |
| Ménopause | | 0,881 | 0,951 | 0,491-1,842 |
| Hcy | | 0,543 | 0,978 | 0,909-1,052 |
| Folate | | 0,012 | 1,125 | 1,026-1,235 |
| Vitamine B12 | | 0,016 | 1,001 | 1,000-1,003 |

IV-2-3-1-Les vitamines B9 et B12 :

Les résultats du tableau ci-dessus montrent que les taux en folates obtenus constitueraient un facteur de risque significatif pour le cancer du sein (OR=1,125, p=0.012).

L'odds ratio de la vitamine B12 de 1,001, permet une association positive avec le cancer mammaire (p=0.016).

Les concentrations élevées en folates et en vitamines B12 contribuent à des changements épigénétiques dans les mécanismes de régulation des gènes suppresseurs de tumeurs, entraînant l'inhibition de ces gènes et favorisant le développement des cancers (Hartmann et *al.*, 2007).

En effet, le risque de ces facteurs serait lié à l'état de méthylation de l'ADN (Mandaviya et *al.*, 2014). Des concentrations élevées de folate et de vitamine B12 contribuent aux changements dans la méthylation du promoteur qui sont habituellement perçue comme procarcinogènes (van den Donk et *al.*, 2007).

IV-2-3-2-L'Homocystéine :

Les résultats obtenus dans le tableau 16 montrent l'absence d'association significative entre l'Hcy et le cancer du sein dans notre étude (p> 0,05).

Cependant, des études *in vitro* suggèrent que l'accumulation de l'Hcy serait responsable de l'accumulation d'un métabolite procarcinogène, le 4-hydroxyoestradiol, dans le cancer du sein hormonodépendant par une inhibition du mécanisme de méthylation (Zhu, 2003). L'hyperhomocystéinémie serait responsable d'un stress oxydatif accru, d'une méthylation aberrante de l'ADN ainsi que de la production de thiolactone Hcy, des changements biochimiques dont le rôle dans la carcinogenèse a été prouvé (Hsu et *al.*, 2015 ; Wu et Wu, 2002).

IV-2-3-3-Le polymorphisme du gène *MTHFR* :

Les résultats du tableau 16 montrent qu'il n'y a aucune différence significative entre les génotypes CC, TT et CT ainsi que les allèles C et T et le cancer du sein dans notre étude ($p > 0,05$). Ces résultats sont en accord avec des études précédentes qui n'ont pas établi d'association (Weiner *et al.*, 2010; López-Cortés *et al.*, 2015).

Cependant, de nombreuses études ont rapporté que le polymorphisme C677T *MTHFR* serait associé à un risque accru du cancer du sein (Ergula *et al.*, 2003; He *et al.*, 2014 ; Liang *et al.*, 2014). Le risque causé par la mutation de l'allèle C est associé à la thermolabilité de l'enzyme *MTHFR* qui tend à perdre sa forme dimère active avec une capacité de liaison réduite flavine adénine dinucléotide (FAD) et une perte de son activité spécifique. Une diminution de l'activité de *MTHFR* affecte la voie du 5-MTHF en diminuant sa disponibilité et en induisant des niveaux élevés de 5, 10-MTHF (Kang *et al.*, 1988). En raison de l'augmentation du 5, 10-MTHF, donneur de méthyle requis pour la méthylation de dUMP en dTMP, il y a une augmentation de l'activité de la thymidylate synthase dans les cellules cancéreuses qui génère une prolifération cellulaire (Baylin *et al.*, 2005).

IV-2-4-Analyse multivariée :

Après régression logistique multivariable, nos résultats suggèrent que les folates seraient un facteur de risque potentiel indépendant (OR=1,160 ; $p=0,014$) (tableau 17).

Tableau 17 : La régression logistique multivariée

| | <i>P</i> | OR | CI (%95) |
|--------|----------|-------|-------------|
| Folate | 0.014 | 1.160 | 1.031-1.305 |

Dans cette analyse statistique, nos données ont montré une association significative seulement entre les folates et le risque du cancer du sein. Ceci est en accord avec une étude prospective (Stolzenberg-Solomon *et al.*, 2006).

Nos résultats corroborent avec une autre étude sur la supplémentation en acide folique pendant la grossesse : les femmes qui ont pris la dose la plus élevée d'acide folique ont été 70% plus susceptibles de développer un cancer total et 2 fois plus susceptibles de développer le cancer du sein que les femmes du groupe placebo (Charles et *al.*, 2004). De plus, des études chez les rongeurs suggèrent que la carence en acide folique diminuerait l'évolution du cancer mammaire chimiquement induit (Kotsopoulos et *al.*, 2003, 2005; Deghan et *al.*, 2014). Cependant, d'autres études ont démontré que le folate joue un rôle protecteur contre le cancer du sein (Zhang et *al.*, 2003). En fait, comparé aux tissus sains, le tissu tumoral mammaire contient de fortes concentrations de folate (Johanning et *al.*, 2002). Ceci peut expliquer le fait que ces concentrations élevées d'acide folique pourraient favoriser la croissance des tumeurs mammaires qui surexpriment le récepteur des folates. En particulier, ce récepteur qui est surexprimé dans le cas d'une tumeur mammaire (Hartmann et *al.*, 2007). Cependant, l'effet du folate sur ces processus moléculaires au cours du développement de la tumeur est inconnu (Larsson et *al.*, 2007).

IV-2-5-Etude de la corrélation entre les folates, B12, Hcy et les stades de la tumeur :

Les résultats obtenus par régression logistique nous ont poussés à effectuer une corrélation entre les folates, la B12, l'Hcy, le tamoxifène et les stades de la tumeur (tableau 18).

Table 18 : Etude de la corrélation entre les folates, la B12 l'Hcy, le tamoxifène et les stades de la tumeur.

| | | Folate | Vitamine B12 | Hcy | Stade | Tamoxifène |
|---------------|----------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| Folate | <i>r</i> | | +0,210 | - 0,234 | +0,284 | -0,207 |
| | <i>p</i> | | 0,015 | 0,036 | 0,048 | 0,148 |
| Hcy | <i>r</i> | -0,234 | -0,179 | | -0,105 | +0,438 |
| | <i>p</i> | 0,036 | 0,110 | | 0,587 | 0,018 |

Nos résultats ont montré une corrélation positive entre le folate et la vitamine B12. Alors qu'une corrélation négative entre le folate et l'Hcy a été retrouvée. En effet, ceci est en accord avec plusieurs études (Walker et *al.*, 1999, Megahed et Taher, 2004).

Nos résultats ont également montré une corrélation positive entre le folate et le stade de développement de la tumorigénèse. En fait, ces résultats soutiennent l'idée que le folate peut augmenter la tumorigénèse après l'installation des lésions pré-néoplasiques. Cependant, un double effet modulateur du folate sur le cancer a été observé par d'autres études épidémiologiques, cliniques et animales (Kim, 2006). Le folate aurait probablement deux effets antagonistes sur le développement du cancer mammaire. Ainsi, un excès ou une carence en acide folique contribuent au phénomène de cancérogenèse mammaire à partir de différents stades de développement tumoral (Stolzenberg-Solomon et *al.*, 2006). En effet, il a été rapporté que le folate pourrait entraîner une évolution de la tumeur (Lin et *al.*, 2008). Dans ce contexte, la supplémentation en folate peut aider à prévenir le développement des tumeurs avant l'existence de lésions néoplasiques, mais aussi augmenter la tumorigénèse lorsque des lésions pré-néoplasiques existent. Ceci a aussi été rapporté dans des études sur le cancer colorectal (Song et *al.*, 2000; Lindzon et *al.*, 2009).

Une corrélation positive entre le tamoxifène et l'Hcy a également été observée. Cependant, ce résultat est en désaccord avec une étude antérieure qui a rapporté que le tamoxifène réduit le taux de l'Hcy (Anker et *al.*, 1995).

IV-3-Etude du polymorphisme génétique de NAT2 :

Cette partie inclut 137 individus sains.

La reconstruction des haplotypes sur les génotypes observés par le logiciel PHASE software a donné lieu à différents haplotypes (tableau 19).

Tableau 19 : Fréquences haplotypiques du gène NAT2.

| Haplotypes | | | | | | | | | | | Haplotypes (%) (2n = 274) | Allele correspondants nomenclature* |
|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|----------------------|------------------------------|--|
| rs72554615 (T111C) | rs1801279 (G191A) | rs1041983 (C282T) | rs1801280 (T341C) | rs72554616 (A434C) | rs1799929 (C481T) | rs1799930 (G590A) | rs56011192 (C759T) | rs1208 (A803G) | rs56054745 (A845C) | rs1799931 (G857A) | | |
| T | G | C | T | A | C | G | C | A | A | G | 40 (14,60) | NAT2*4 |
| T | G | C | <u>C</u> | A | <u>T</u> | G | C | <u>G</u> | A | G | 65 (23,72) | NAT2*5B |
| T | G | <u>T</u> | T | A | C | <u>A</u> | C | A | A | G | 51 (18,61) | NAT2*6A |
| T | G | C | <u>C</u> | A | <u>T</u> | G | <u>T</u> | <u>G</u> | A | G | 28 (10) | NAT2*5F |
| T | G | <u>T</u> | <u>C</u> | A | <u>T</u> | G | C | <u>G</u> | A | G | 27 (9,8) | NAT2*5G |
| T | G | <u>T</u> | T | A | C | G | C | A | A | G | 18 (7) | NAT2*13 |
| T | G | C | T | A | C | <u>A</u> | C | A | A | G | 10 (3,65) | NAT2*6B |
| T | G | C | T | A | C | G | C | <u>G</u> | A | G | 9 (3,28) | NAT2*12 |
| T | <u>A</u> | C | T | A | C | G | C | A | A | G | 10 (3,65) | NAT2*14 |
| T | G | C | T | A | <u>T</u> | G | C | A | A | G | 8 (3,0) | NAT2*11 |

*La nomenclature officielle (www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT2.html).

Les mutations nucléotidiques identifiées dans cette étude sont soulignées et indiquées avec les haplotypes correspondants.

NAT2 * 4 représente l'haplotype de type sauvage.

Les mutations qui provoquent un changement dans l'activité protéique sont soulignées et représentées en gras.

Seuls les haplotypes de fréquence supérieure à 2,5% ont été présentés.

Le plus fréquent des haplotypes est TGCCATGCGAG (23,72%) suivi de TGTTACACAAG (18,61%), TGCTACGCAAG (14,60%) et TGCCATGTGAG (10%). Ainsi, la prévalence de la fréquence des haplotypes est dans l'ordre NAT2 * 5B > NAT2 * 6A > NAT2 * 4 > NAT2 * 5F.

Ces résultats sont similaires à ceux rapportés dans le Cancer Genome Project Anatomy (<http://snp500cancer.nci.nih.gov>) pour la population Européenne. Nos résultats montrent que les mutations connues pour réduire l'activité de NAT2 comme 341T > C et 590G > A, dans les populations étudiées (Sabbagh et al., 2008), sont également fréquentes dans notre population.

Toutefois, outre les sept principaux polymorphismes largement étudiés (Sabbagh et *al.*, 2008), la fréquence du SNP C759T n'a pas été négligeable dans notre population.

Tableau 20 : Fréquences génotypiques et phénotypiques du gène *NAT2*.*2.

| Génotype/ Phénotype prédit | Fréquences Génotypiques |
|----------------------------------|-------------------------|
| Acétyleurs rapides | |
| <i>NAT2</i> *4/ <i>NAT2</i> *4 | 0,0802 |
| Acétyleurs intermédiaires | |
| <i>NAT2</i> *4/ <i>NAT2</i> *5 | 0,2189 |
| <i>NAT2</i> *4/ <i>NAT2</i> *6 | 0,1314 |
| <i>NAT2</i> *4/ <i>NAT2</i> *7 | 0,0072 |
| <i>NAT2</i> *4/ <i>NAT2</i> *14 | 0,0365 |
| Acétyleurs lents | |
| <i>NAT2</i> *5/ <i>NAT2</i> *5 | 0,1679 |
| <i>NAT2</i> *5/ <i>NAT2</i> *6 | 0,2846 |
| <i>NAT2</i> *5/ <i>NAT2</i> *7 | 0,0219 |
| <i>NAT2</i> *5/ <i>NAT2</i> *14 | 0,0145 |
| <i>NAT2</i> *6/ <i>NAT2</i> *7 | 0,0072 |
| <i>NAT2</i> *6/ <i>NAT2</i> *14 | 0,0219 |

En ce qui concerne les génotypes, la distribution a été la suivante : *NAT2**5/*NAT2**6 (28,46%) ; *NAT2**4/*NAT2**5 (21,89%) ; *NAT2**5/ *NAT2**5 (16,79%), *NAT2**4/*NAT2**6 (13,14%) (tableau 20).

Les individus homozygotes pour les allèles à activité élevée ont été classés comme acétyleurs rapides, les homozygotes pour les allèles à activité lente ont été identifiés comme acétylateurs lents et les individus possédant un allèle rapide et un allèle lent *NAT2* ont été regroupés comme acétylateurs intermédiaires.

Nos résultats montrent aussi que le pourcentage du phénotype acétylateur lent est de 52,55%.

Le tableau 21 montre la distribution allélique des quatre principaux haplotypes *NAT2* chez une population Algérienne comparée à d'autres populations.

Tableau 21 : Fréquences alléliques *NAT2* chez les Algériens comparées à d'autres populations.

| Population | N | *4 | *5 | *6 | *7 | *14 | Références |
|---------------|-----|-------|-------|-------|--------|-------|------------------------------------|
| Algérie | 127 | 0,15 | 0,44 | 0,22 | 0,02 | 0,04 | Notre étude |
| Maroc | 163 | 0,16 | 0,53 | 0,25 | 0,02 | 0,04 | Guaoua e <i>al.</i> , 2014 |
| Tunisie | | 0,223 | 0,278 | 0,189 | 0,036 | - | Khedhaier et <i>al.</i> , 2008 |
| Egypte | 199 | 0,215 | 0,497 | 0,26 | 0,028 | - | Hamdy et <i>al.</i> , 2003 |
| Gabon | 104 | 0,06 | 0,403 | 0,221 | 0,019 | 0,086 | Deloménie et <i>al.</i> , 1996 |
| Dogon | 130 | 0,123 | 0,323 | 0,023 | 0,03 | 0,053 | Deloménie et <i>al.</i> , 1996 |
| Tanzanie | 120 | 0,308 | 0,338 | 0,205 | 0,034 | 0,115 | Dandara et <i>al.</i> , 2003 |
| Venda | 96 | 0,234 | 0,385 | 0,219 | 0,052 | 0,109 | Dandara et <i>al.</i> , 2003 |
| Zimbabwe | 163 | 0,288 | 0,307 | 0,209 | 0,058 | 0,138 | Dandara et <i>al.</i> , 2003 |
| Sénégal | 105 | 0,09 | 0,357 | 0,21 | 0,033 | 0,1 | Touré et <i>al.</i> , 2012 |
| Oman | 127 | 0,25 | 0,44 | 0,27 | 0,04 | 0,00 | Tanira et <i>al.</i> , 2003 |
| Espagne | 258 | 0,25 | 0,47 | 0,25 | 0,006 | 0,004 | Sabbagh et <i>al.</i> , 2008 |
| France | 60 | 0,18 | 0,516 | 0,25 | 0,008 | 0,00 | Sabbagh e <i>al.</i> , 2008 |
| Angleterre | 112 | 0,19 | 0,526 | 0,24 | 0,002 | 0,00 | Sabbagh e <i>al.</i> , 2008 |
| Caucasiens US | 387 | 0,241 | 0,458 | 0,266 | 0,0193 | 0,001 | Sabbagh e <i>al.</i> , 2008 |
| Suède | 113 | 0,23 | 0,47 | 0,28 | 0,01 | 0,00 | Djordjevic et <i>al.</i> , 2012 |
| Serbie | 140 | 0,244 | 0,43 | 0,280 | 0,012 | - | Djordjevic et <i>al.</i> , 2011 |
| Turquie | 303 | 0,23 | 0,417 | 0,305 | 0,045 | 0,00 | Sabbagh e <i>al.</i> , 2008 |
| Inde | | - | 0,30 | 0,315 | 0,133 | 0,00 | Umamaheswaran et <i>al.</i> , 2014 |
| Japon | 144 | 0,72 | 0,007 | 0,19 | 0,076 | 0,00 | Sabbagh et <i>al.</i> , 2008 |
| Corée | 288 | 0,61 | 0,012 | 0,234 | 0,12 | 0,00 | Sabbagh et <i>al.</i> , 2008 |
| Argentine | 185 | 0,299 | 0,37 | 0,256 | 0,08 | 0,013 | Chamorro et <i>al.</i> , 2012 |
| Amérique | 387 | 0,24 | 0,458 | 0,266 | 0,02 | 0,00 | Sabbagh et <i>al.</i> , 2008 |

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Sabbagh et al. (2008) pour la population Européenne. De plus, il n'y a pas de différence dans notre population par rapport aux populations Tunisiennes et Marocaines pour *NAT2*4*, *NAT2*5*, *NAT2*6*, *NAT2*7*, *NAT2*14* (Khedhaier et *al.*, 2008; Guaoua et *al.*, 2014). Cependant, nous avons observé une nouvelle variante commune *NAT2*5F* spécifique à la population Algérienne étudiée.

Nos résultats sont compatibles avec ceux d'une étude antérieure du professeur Khelil M. (Khelil et *al.*, 2010). Il a été rapporté que les génotypes *NAT2*5* et *NAT2*6* étaient associés à une hépatotoxicité induite par l'isoniazide (Singh et *al.*, 2014) et à une susceptibilité plus élevée au cancer de la vessie (Zhu et *al.*, 2015).

V-DISCUSSION GENERALE

L'incidence brute du cancer du sein est en perpétuelle augmentation en Algérie. Il représente le cancer le plus fréquent chez la femme avec une incidence de 11000 nouveaux cas par an en 2010 (Zitouni, 2014). Dans le monde, près de 1,7 million de nouveaux cas de cancer du sein ont été diagnostiqués en 2012, d'après la fondation internationale de recherche sur le cancer. En effet, le cancer mammaire représente 249 260 nouveaux cas par an, avec 40 890 décès en 2016, aux Etats Unis (American Cancer Society, 2016).

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle du polymorphisme de certains gènes dans la susceptibilité individuelle au risque de cancer du sein. En effet, le but est de mettre en évidence des gènes candidats à la susceptibilité aux pathologies pour un pronostic précoce et une élucidation du mécanisme de cancérisation.

Dans notre travail, nous avons exploré, en premier lieu, le rôle du polymorphisme du gène *NAT1* dans la susceptibilité au cancer du sein en présence de xénobiotiques métabolisés par l'enzyme NAT1 comme les amines hétérocycliques et les amines aromatiques, contenus dans le tabac et la viande rouge.

Le gène *NAT1* présente plusieurs formes alléliques caractérisées par une ou plusieurs substitutions nucléotidiques. Les allèles *NAT1*17*, *NAT1*14B*, *NAT1*3* et *NAT1*15* qui ont fait l'objet de notre travail, ont montré une absence d'association avec le risque du cancer du sein dans notre population. Nos résultats sont en accord avec ceux de Millikan et al. (1998), Zheng et al. (1999), Lee et al. (2003) et Ambrosone et al. (2007). Cependant, le risque a été considérablement élevée chez les femmes ménopausées et fumeuses avec l'haplotype *NAT1*10* (Millikan *et al.*, 1998), et chez les femmes fumeuses consommant un taux élevé de viande rouge (Zheng *et al.*, 1999).

En ce qui concerne la distribution des allèles *NAT1* dans notre population, nous avons retrouvé une fréquence faible de l'allèle *NAT1*17* codant pour une protéine avec une faible activité, aussi bien chez les malades que chez les témoins (inférieure à 10% dans les deux cas). Nos résultats sont en accord avec ceux de la bibliographie qui ont rapporté une fréquence de 1% de cet allèle chez les populations Caucasiennes étudiées (Zheng *et al.*, 1999).

Pour l'allèle *NATI*14B* qui code aussi pour une protéine à faible activité, on note une fréquence de 16,7% et 10,3% chez les patientes et les témoins respectivement, ce qui est en accord avec les études rapporté par Dhaini et Levy (2000) sur une population Libanaise.

Concernant l'allèle *NATI*3*, une fréquence élevée a été observé chez les patientes et les témoins (82,28% et 90%, respectivement). Ces résultats sont en désaccord avec les résultats obtenus dans la population Turque rapportant un pourcentage faible de l'allèle *NATI*3* (Arslan et al., 2004). On note que cet allèle peut être associé au risque de la spina bifida chez les enfants de mère fumant au début de grossesse (Jensen et al., 2005).

Nos résultats ne montrent pas d'association entre le tabagisme passif et le risque du cancer du sein. Cependant, Gammon et al. (2004), ont montré l'inverse en suggérant que l'effet soit limité aux personnes exposées à long terme. Plusieurs études ont suggéré que le tabagisme jouerait un rôle important dans le risque du cancer du sein par son contenu en amines hétérocycliques et hydrocarbures aromatiques polycycliques. (Xue et al., 2011; Gaudet et al., 2013). L'absence d'association trouvée dans nos résultats pourrait être expliquée par les effets anti-œstrogéniques potentiels de la fumée de cigarette. En effet, il a été démontré que le tabagisme a des effets protecteurs pour le cancer de l'endomètre, Les effets anti-œstrogéniques du tabagisme pourraient masquer ses effets cancérogènes potentiels (Tanko et Christiansen, 2004).

Notre étude a trouvé une association entre la consommation de viande rouge et le risque du cancer du sein. Ceci est conforme à l'étude de Cho et al. (2006) qui indique que la consommation de la viande rouge serait associée à un risque accru de cancer du sein. Cela s'expliquerait en partie par le fait que la viande rouge bien cuite est une source de substances carcinogènes comme les amines hétérocycliques, les composés N-nitroso et les hydrocarbures aromatiques polycycliques, qui augmenteraient le risque pour le cancer du sein (Felton et al., 2002).

Il a été rapporté que le tissu mammaire humain est sensible à la formation de produits d'adduction d'ADN et de mutations sous l'effet de l'exposition aux amines polycycliques contenus dans les aliments cuits (viande rouge) et autres expositions environnementales (Rundle et al., 2000 ; Li et al., 2002). Ceci provoquerait une tumorigénese mammaire (figure 25).

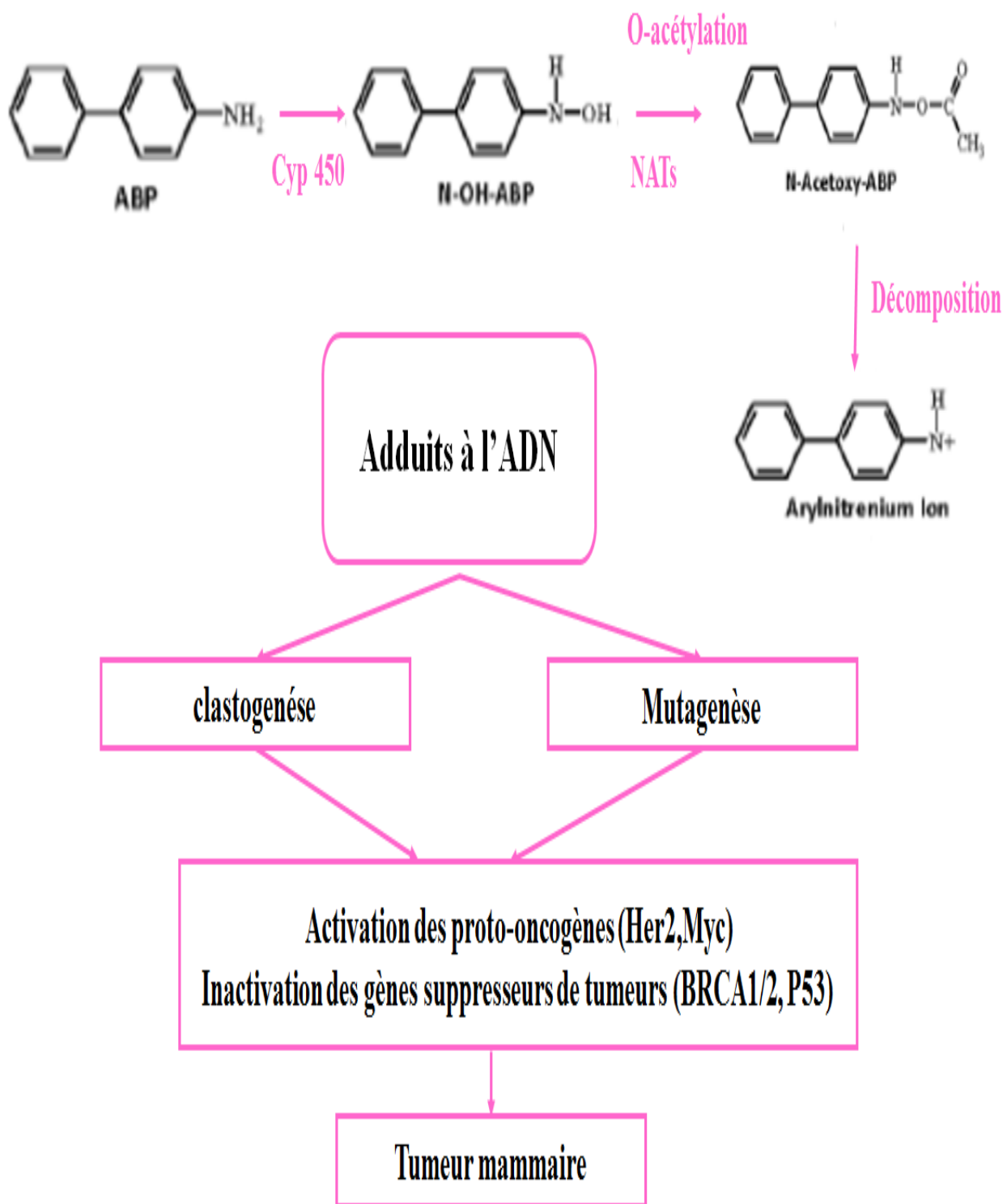


Figure 25 : Formation de produits d'adduction d'ADN et de mutations sous l'effet de l'exposition aux amines polycycliques contenus dans la viande rouge provoquant le cancer du sein.

En outre, plusieurs autres études (Goodman *et al.*, 1992; Matos *et al.*, 1991) ont attribué l'effet facteur de risque de la viande rouge à la graisse élevée qu'elle contient. En effet, l'oxydation des lipides, en particulier des acides gras insaturés peut se produire aussi bien dans les viandes fraîches que cuites (Min et Ahn 2005, Jo *et al.*, 2006) et provoquer des produits toxiques (Kubow, 1992 ; Esterbauer, 1993). Un grand nombre d'études ont suggéré un lien entre les produits finaux de la peroxydation lipidique et divers états de santé, y compris l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives et le cancer.

Une étude récente de Villegas-Comonfort *et al.*, (2014) démontre que l'acide arachidonique, un acide gras polyinsaturé capable d'induire des réponses inflammatoires contribuant à plusieurs maladies chroniques, y compris le cancer, induit la migration et l'invasion des cellules cancéreuses du sein à travers une voie dépendante de l'EGFR-PI3K/Akt dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 (Villegas-Comonfort *et al.*, 2014) (figure 26).

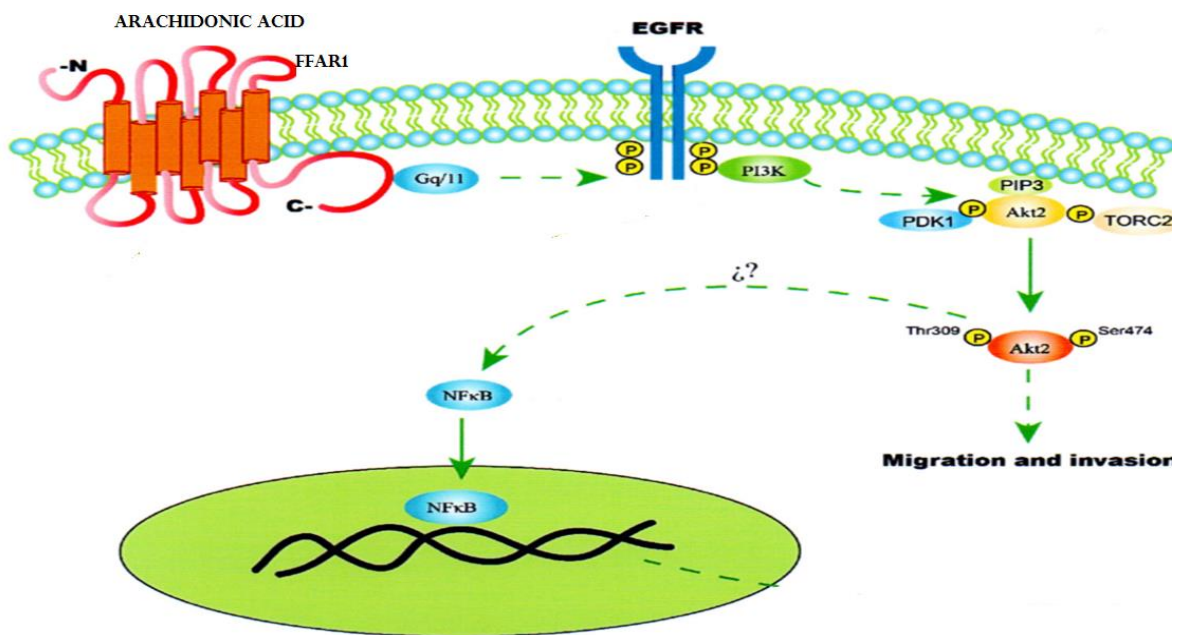


Figure 26 : Modèle de migration cellulaire induite par les acides arachidoniques dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231.

Nous nous sommes intéressées dans la deuxième partie de notre travail à l'exploration d'une éventuelle association du polymorphisme du gène codant l'enzyme MTHFR et de certains facteurs biochimiques en relation avec le métabolisme de cet enzyme (folates, vitamine B12 et homocysteine) dans le cancer du sein.

Notre étude a mis en évidence une association entre les folates et vitamine B12 et le risque de cancer du sein. Ceci pourrait être expliqué par l'état de méthylation de l'ADN. En effet, la méthylation de la cytosine au niveau des îlots CpG est un déterminant épigénétique important dans l'expression des gènes, du maintien de l'intégrité et de la stabilité de l'ADN ainsi que de mutations.

Par ailleurs, les folates possèderaient probablement deux effets antagonistes sur le développement du cancer du sein. Ainsi, un excès tout autant qu'un déficit en folates contribueraient au phénomène de carcinogénèse mammaire en fonction des différents stades du développement tumoral (Stolzenberg-Solomon et *al.*, 2006). Dans cette optique, des suppléments en folates pourraient participer à la prévention du développement tumoral avant l'existence de lésions néoplasiques, mais également augmenter la tumorigénèse lorsque les lésions pré-néoplasiques existent déjà (Stolzenberg-Solomon et *al.*, 2006).

On notera que ces données appuient clairement nos résultats qui révèlent des taux élevés de folates particulièrement chez les patientes à des stades avancés de la maladie mais également le constat d'un déficit en folates chez certaines malades également à des stades moins avancés.

De ce fait, l'implication des folates dans le cancer du sein est un sujet controversé dans la littérature scientifique. De nombreuses études suggèrent que des taux élevés en folates ainsi qu'en vitamines B12 constitueraient un facteur de protection contre le cancer en général dont celui du sein (Zhang et *al.*, 2003) et préconisent une supplémentation en folates et/ou vitamines B12 lors de carences afin d'atténuer ce risque. Elles soutiennent qu'un statut folique diminué peut, entre autres, perturber la synthèse d'ADN ou l'expression de gènes par le biais d'un défaut de méthylation de l'ADN (Zhang et *al.*, 2003). La vitamine B12 quant à elle réduirait la disponibilité de la SAM lors de la méthylation de l'ADN et influencerait donc également l'expression des gènes en cas de déficit (Mason et *al.*, 1996).

Dans la présente étude, l'Hcy n'a pas été caractérisée comme facteur de risque dans le cancer du sein. Cependant, des études *in vitro* suggèrent que l'accumulation de l'Hcy serait responsable de l'accumulation d'un métabolite procarcinogène, le 4-hydroxyoestradiol, dans les cancers ER+ par un mécanisme d'inhibition de la méthylation initié par la SAH (Zhu, 2003). Selon Wu et Wu. (2002), l'Hcy pourrait devenir un probable marqueur tumoral. L'hyperhomocystéinémie serait responsable d'une augmentation du stress oxydatif, d'une méthylation aberrante de l'ADN ainsi que de la production d'Hcy thiolactone, changements biochimiques dont le rôle dans la carcinogénèse est avéré (Wu et Wu, 2002).

Le *MTHFR* est un gène essentiel dans le métabolisme des folates et joue ainsi un rôle important dans la synthèse de l'ADN ainsi que la reméthylation de l'Hcy et la synthèse des protéines. Nos résultats ont montré une absence d'association entre le polymorphisme *MTHFR* C677T et le risque de cancer mammaire. Ceci est en accord avec de nombreuses études (Vařner et al., 2010; De Cássia Carvalho et al., 2012). Cependant, selon Semenza et al. (2003), l'allèle C677T augmenterait le risque de cancer du sein de manière plus prononcée chez les femmes non ménopausées plutôt que chez celles ayant déjà atteint ce stade.

Dans la dernière partie de l'étude, nous nous sommes intéressés à analyser les SNPs du gène *NAT2* dans une population Algérienne dans le but d'évaluer la susceptibilité de notre population aux composés arylamines et hydrazines. Nous avons étudié onze SNPs dans l'exon codant pour déterminer le phénotype acétyleur dans cette population.

Nos résultats montrent que les principaux haplotypes sont *NAT2*5B*, *NAT2*6A*, *NAT2*4* et *NAT2*5F*. Il a été rapporté que les génotypes *NAT2*5* et *NAT2*6* étaient associés à une hépatotoxicité induite par l'isoniazide (Singh et al., 2014) et à une susceptibilité plus élevée au cancer de la vessie (Zhu et al., 2015).

Les résultats des fréquences haplotypiques obtenus sont en accord avec ceux rapportés pour les populations Caucasiennes (Sabbagh et al., 2008). De plus, il n'y a pas de différence dans notre population par rapport aux populations Marocaine et tunisienne pour les allèles *NAT2*4*, *NAT2*5*, *NAT2*6*, *NAT2*7* (Guaoua et al., 2014 ; Khedhaier et al., 2008).

Cependant, nous avons observé une nouvelle variante commune *NAT2*5F* spécifique à la population Algérienne étudiée. Nos résultats sont compatibles avec ceux d'une étude antérieure (Khelil et *al.*, 2010).

Nos résultats montrent aussi que le phénotype acétyleur lent est le plus répandu dans notre population avec presque 53%. En effet, la population d'Afrique du Nord compte parmi la plus riche en acétyleurs lents (Hamdy et *al.*, 2003 ; Lin et *al.*, 1994). En revanche, les Chinois et les Japonais sont essentiellement acétyleurs rapides, avec seulement 10 à 20% d'acétyleurs lents (Grant et *al.*, 1997).

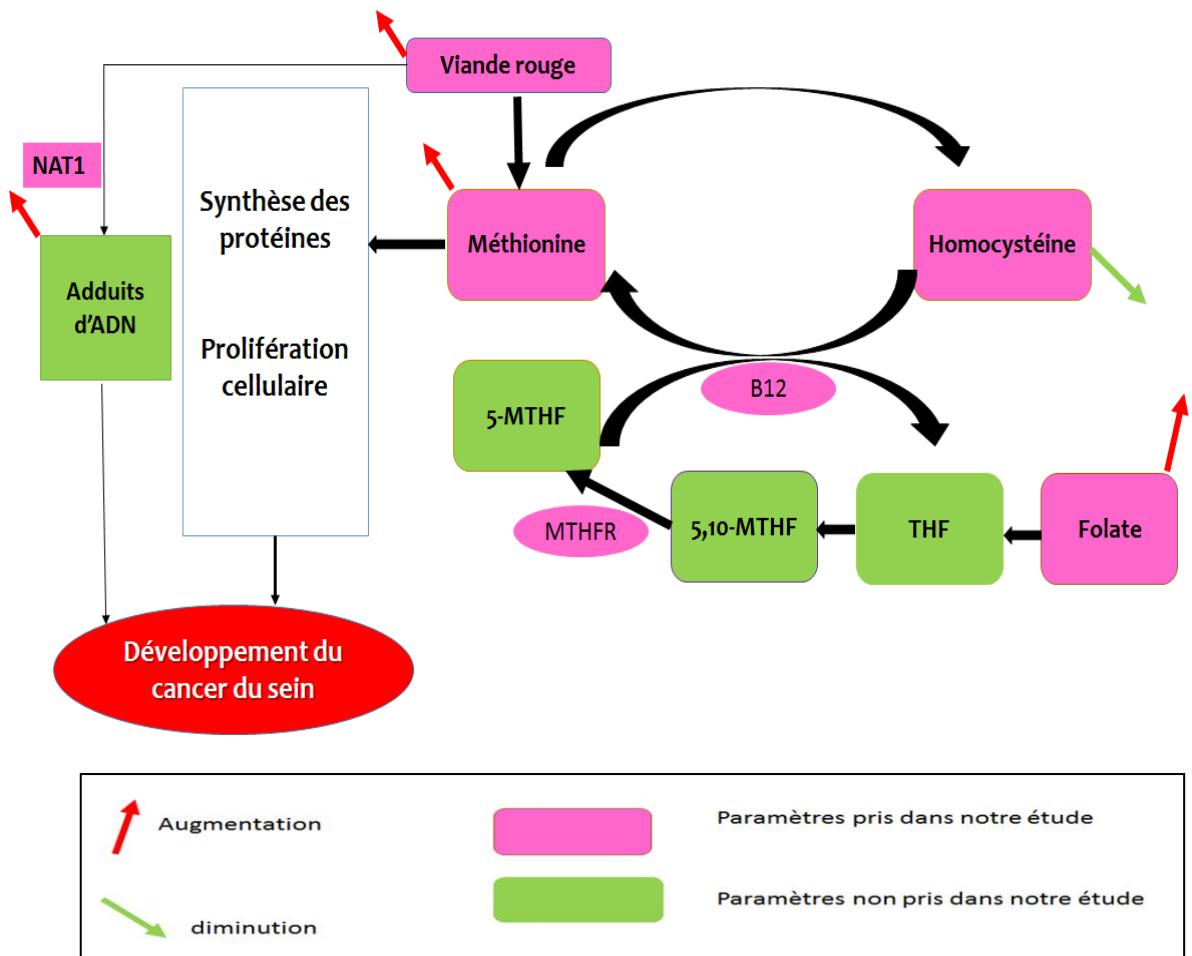


Figure 27 : Schéma récapitulatif de l'implication des différents paramètres étudiés dans le développement du cancer du sein.

VI-CONCLUSION

Notre étude a contribué à la mise en évidence de l'association des folates et de la consommation de la viande rouge au cancer du sein dans la population Algérienne. Cette étude est la première à avoir exploré la relation possible entre l'Hcy totale, la vitamine B12, les folates, la viande rouge, le tabac, ainsi que le polymorphisme génétique de *NAT1*, *MTHFR* et le cancer mammaire dans notre population.

Notre travail nous a permis d'apporter les suggestions suivantes sur la population étudiée :

Les folates présenteraient un risque pour le cancer du sein, notamment dans son évolution. L'étude de la corrélation a permis de lier les taux élevés de folate aux stades avancés de la tumeur. La présente étude soutient le fait qu'une supplémentation en folates pourrait augmenter la tumorigénèse lorsque les lésions pré-néoplasiques existent déjà.

La consommation de viande rouge serait associée au cancer du sein. Cela s'expliquerait en partie par le fait que la viande rouge bien cuite est une source de substances carcinogènes comme les amines hétérocycliques, les composés N-nitroso et les hydrocarbures aromatiques polycycliques, qui augmenteraient le risque pour le cancer du sein.

Il y aurait une absence d'association entre le tabac, l'Hcy, la vitamine B12 et le cancer du sein dans notre population.

Les allèles mutés *NAT1*3*, *NAT1*14B*, *NAT1*15*, *NAT1*17* et le polymorphisme C677T *MTHFR* ne présenteraient pas de risque pour le cancer du sein. Cependant, l'investigation d'autres allèles ainsi que l'utilisation d'un effectif plus important pourraient mettre en évidence une relation avec cette pathologie.

Une prédominance du phénotype acétyleur lent du gène *NAT2* dans la population Algérienne. Ceci suggère une susceptibilité possible de cette population à une hépatotoxicité induite par l'INH et à un développement de cancer.

Nos résultats pourraient contribuer à la connaissance des différents facteurs de risque du cancer du sein afin de mieux comprendre sa physiopathologie qui reste à ce jour inconnu et pour permettre la prévention et le traitement de cette maladie.

Perspectives :

Ce travail devra être complété par :

- L'augmentation de l'effectif de l'étude afin de confirmer ou d'infirmer ces résultats.
- L'étude d'autres SNPs de *NAT1*, principalement ceux à activité rapides afin de déduire une éventuelle association entre le polymorphisme, en présence des xénobiotiques précarcinogènes, et le risque du cancer du sein.
- L'étude du rôle des inhibiteurs *NAT1* dans la tumeur mammaire afin d'élucider son rôle dans l'apoptose des cellules tumorales mammaires.
- L'étude en plus des vitamines B9 e B12, la vitamine B6, vitamine impliquées dans le cycle des folates.
- L'étude du polymorphisme génétique d'autres enzymes impliquées dans le métabolisme des folates tel que la Thymidilate Synthase et la Cystationine Béta Synthase, ce qui permettrait d'aider à élucider le rôle des folates dans le phénomène de cancérisation.
- L'étude des paramètres qui pourraient être responsable de l'apparition du cancer du sein à un âge précoce dans notre population.
- L'étude du polymorphisme du gène *NAT2* chez des malades atteints de cancer et de tuberculose dans notre population.

VII-REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A:

Abel S., Riedel S., Gelderblom W.C. (2014). Dietary PUFA and cancer. *Proc Nutr Soc.*; **73**: 361-7.

Ali S., Coombes R.C. (2002). Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nature reviews Cancer*; **2**: 101-12.

Ambrosone C.B., Abrams S.M., Gorlewska-Roberts K., Kadlubar F.F. (2007). Hair dye use, meat intake, and tobacco exposure and presence of carcinogen-DNA adducts in exfoliated breast ductal epithelial cells. *Arch Biochem Biophys*; **464**:169-175.

American Cancer Society. (2016). Cancer facts and figures 2016. 1rd edition, Atlanta, Georgia, 72p.

Amouzou E.K., Chabi N.W., Adjalla C.E., Rodriguez-Guéant R.M., Feillet F., Villaume C., Sanni A., Guéant J.L. (2004). High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677C-->T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. *Am J Clin Nutr*; **79**: 619-24.

Anker G., Lonning P.E., Ueland P.M., Refsum H., Lien E.A. (1995). Plasma levels of the atherogenic amino acid homocysteine in post-menopausal women with breast cancer treated with tamoxifen. *Int J Cancer*; **60**: 365-368.

Arslan S., Degerli N., and Bardakci F. (2004). Distribution of N-acetyltransferase Type 1 (NAT1) genotypes and alleles in a Turkish Population. *Genetics and Molecular Biology*; **27**(2): 162-164.

Atmane N., Dairou J., Paul A., Dupret J.M., Rodrigues-Lima F. (2003). Redox regulation of the human xenobiotic metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1). Reversible inactivation by hydrogen peroxide. *J.Biol.Chem.*; **278**: 35086-92.

B:

Baselga J, Swain SM. (2009). Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer*; **9**(7):463-75.

Baylin S.B. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*; **2**: 4-11.

Bennouar N., Allami A., Azeddoug H., Bendris A., Laraqui A., El Jaffali A., El Kadiri N., Benzidia R., Benomar A., Fellat S., Benomar M. (2007). Thermolabile Methylene tetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Homocysteine Are Risk Factors for Coronary Artery Disease in Moroccan Population. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*; **2007**: 80687.

Blum. M., Grant. D. M., McBride W., Heim. M., Meyer U.A. (1990). Human Arylamine N-Acetyltransferase Genes: Isolation. Chromosomal Localization and Functional Expression. *DNA & Cell Biol*; **9**: 193-203.

Bouchardy C., Mitrunen K., Wikman H., Husgafvel-Pursiainen K., Dayer P., Benhamou S., Hirvonen A. (1998). N-acetyltransferase NAT1 and NAT2 genotypes and lung cancer risk. *Pharmacogenetics*; **8**:291-298.

Boukouvala S., Sim E. (2005). Structural analysis of the gene for human arylamine NATs and characterization of alternative transcripts. *Basic clin.*; **96** :343-351.

Bruhn C., Brockmoller J., Cascorbi I. (1999). Correlation between genotype and phenotype of the human arylamine N-acetyltransferase type 1 (NAT1). *Biochem Pharmacol*; **58**: 1759-1764.

Butcher N.J., Ilett K.F., Minchin R.F. (1998). Functional polymorphism of the human arylamine N-acetyltransferase type 1 gene caused by C190T and G560A mutations. *Pharmacogenetics*; **8**: 67-72.

Butcher N.J., Boukouvala S., Sim E., Minchin R.F. (2002). Pharmacogenetics of arylamine N-acetyltransferases. *Pharmacogenomics J.* **2**: 30-42.

Butcher N.J., Arulpragasam A., Minchin R.F. (2004). Proteasomal degradation of N-acetyltransferase 1 is prevented by acetylation of the active site cysteine: a mechanism for the slow acetylator phenotype and substrate-dependent down-regulation. *J.Biol.Chem.*; **279**: 22131-22137.

C:

Çelik. A, Muradiye. A, Catherine. ME, Esra. G, Mehmet.G. (2015). Relationship of Breast Cancer with Ovarian Cancer. *Oncology*; .

Chaijan M. (2008). Review: lipid and myoglobin oxidations in muscle foods. *Songklanakarin J Sci Technol*; **30**: 47-53.

Chamorro J.G., Castagnino J.P., Musella R.M., Frías A., Aranda F.M., de Larrañaga G.F. (2011). The distribution of allelic and genotypic frequencies of N-Acetyltransferase-2 variants in an Argentine population. *J Infect Dev Ctries*; **6**: 671-674.

Chapiro J. (2012). Différentes thérapies anti-HER2 dans le cancer du sein: Anticorps monoclonaux (trastuzumab, pertuzumab, T-DM1), inhibiteurs de tyrosine kinase (lapatinib, nératinib). Mécanismes d'action et de résistance. In: Cancer du sein. Springer, Paris

Charles D., Ness A.R., Campbell D., Davey Smith G., Hall M.H. (2004). Taking folate in pregnancy and risk of maternal breast cancer. *BMJ*; **329**: 1375-1376.

Chen P., Li C., Li X., Li J., Chu R., Wang H. (2014). Higher dietary folate intake reduces the breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*; **110**: 2327-2338.

Cho E., Chen W.Y., Hunter D.J. (2006). Red meat intake and risk of breast cancer among premenopausal women. *Arch Intern Med*; **166**: 2253-9.

Cho R.C., Cole P.D., Sohn K.J., Gaisano G., Croxford R., Kamen B.A., Kim Y.I. (2007). Effects of folate and folic polyglutamyl synthase modulation on chemosensitivity of breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*; **6** :2909-20.

Christopoulos P.F., Msaouel P., Koutsilieris M. (2015). The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer. *Mol Cancer*.; **14**: 43.

Cross A.J., Sinha R. (2004). Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environ Mol Mutagen*; **44**: 44-55.

Croxtall J.D., McKeage K. (2011). Fulvestrant: a review of its use in the management of hormone receptor-positive metastatic breast cancer in postmenopausal women. *Drugs*; **71**: 363-380.

D:

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*; **13**: 55-8.

De Batlle P., Ferrari V., Chajes J.Y., Park N., Slimani F., McKenzie K., Overvad N., Roswall A., Tjønneland et al. (2014). Dietary folate intake and breast cancer risk: European prospective investigation into cancer and nutrition. *Jan. Natl Cancer Inst*; **107**(1): 367.

De Cássia Carvalho Barbosa R., da Costa D.M., Cordeiro D.E., Vieira A.P., Rabenhorst S.H. (2012). Interaction of MTHFR C677T and A1298C and MTR A2756G gene polymorphisms in breast cancer risk in a population in Northeast Brazil. *Anticancer Res.*; **32** (11): 4805-11.

Deghan M.S, Ishiguro L., Sohn K.J., Medline A., Renlund R., Croxford R., Kim Y.I. (2014). Folic Acid Supplementation Promotes Mammary Tumor Progression in a Rat Model. *PLoS One*; **9**: 84635.

Deitz A.C., Doll M.A., Hein D.W. (1997). A Restriction Fragment Length Polymorphism Assay that differentiates Human N-Acetyltransferase-1 (NAT1) alleles. *Analytical Biochemistry*; **253**: 219-224.

Deloménie C., Sica L., Grant D.M., Krishnamoorthy R., Dupret J.M. (1996). Genotyping of the polymorphic N-acetyltransferase (NAT*2) gene locus in two native African populations. *Pharmacogenetics*; **6**: 177-85.

Dhaini H.R., Levy G.N. (2000). Arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1) genotypes in a Lebanese population. *Pharmacogenetics*; **10**:79-83.

Djordjevic N., Carrillo J.A., Ueda N., Gervasini G., Fukasawa T., Suda A., Jankovic S., Aklillu E. (2011). N-Acetyltransferase-2 (NAT2) gene polymorphisms and enzyme activity in Serbs: unprecedented high prevalence of rapid acetylators in a White population. *J Clin Pharmacol.*; **51**: 994-1003.

Djordjevic N., Carrillo J.A., Roh H.K., Karlsson S., Ueda N., Bertilsson L., Aklillu E. (2012). Comparison of N-acetyltransferase-2 enzyme genotype-phenotype and xanthine oxidase enzyme activity between Swedes and Koreans. *J Clin Pharmacol*; **52**: 1527-34.

Doll M.A., Jiang W., Deitz A.C., Rustan T.D., Hein D.W. (1997). Identification of a novel allele at the human NAT1 acetyltransferase locus. *Biochem Biophys Res Commun*; **233**:584-591.

Doll M.A., Hein D.W. (2001). Comprehensive human NAT2 genotype method using single nucleotide polymorphism-specific polymerase chain reaction primers and fluorogenic probes. *Anal Biochem.*; **288**: 106-8.

E:

Emaus M.J., Bakker M.F., Beelen R.M., Veldhuis W.B., Peeters P.H., van Gils CH. (2014). Degree of urbanization and mammographic density in Dutch breast cancer screening participants: results from the EPIC-NL cohort. *Breast Cancer Res Treat*; **148**: 655-63.

Ergula E., Sazcia A., Utkanb Z., Canturkb N.Z. (2003). Polymorphisms in the MTHFR Gene Are Associated with Breast Cancer. *Tumor Biol*; **24**: 286-290.

Esterbauer H. (1993). Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr*; **57**: 779S-86S.

F:

Felton J.S., Knize M.G., Salmon C.P. (2002). Human exposure to heterocyclic amine food mutagens/carcinogens: relevance to breast cancer. *Environ Mol Mutagen*; **39**: 112-118.

Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F. (2015). Cancer Incidence and Mortality Worldwide: : sources, methods and major patterns in GLOBOCAN. *Int J Cancer*; **136**: E359-86.

Finkelstein J.D. (2000). Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin Thromb Hemost.*; **26**: 219-25.

Fräter-Schröder M., Hitzig W.H., Grob P.J., Kenny A.B. (1978). Increased unsaturated transcobalamin II in active autoimmune disease. *Lancet*; **2**: 238-9.

Fretland A.J., Doll M.A., Leff M.A., Hein D.W. (2001). Functional characterization of nucleotide polymorphisms in the coding region of N-acetyltransferase 1. *Pharmacogenetics*; **11**(3): 511-520.

Fretland A.J., Doll M.A., Zhu Y., Smith L., Leff M.A, Hein D.W. (2002). Effect of nucleotide substitutions in Nacetyltransferase-1on N-acetylation (deactivation) and O-acetylation (activation) of arylamine carcinogens: implications for cancer predisposition. *Cancer Detect Prev.*; **26**:10-14.

Frost P., Blom H.J., Milos R., Goyette P., Sheppard C.A., Matthews R.G., Boers G.J., den Heijer M., kluijtmans LA., van den Heuvel LP. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.*; **10**: 111-113.

Fullame E., Sim E., Noble M. (2006). Structure and activity of arylamine N-acetyltransferase from *Mycobacterium marinum*. Acid Fast Club Meeting .Porton Down ,UK.

G:

Gammon M.D., Eng S.M., Teitelbaum S.L. (2004). Environmental tobacco smoke and breast cancer incidence. *Environ Res*; **96**: 176-185.

Gasco M., Shami S., Crook T. (2002). The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.*; **4**(2):70-6.

Gaudet M.M., Gapstur S.M., Sun J. (2013). Active smoking and breast cancer risk: original cohort data and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*; **105**: 515-25.

Goodman M.T., Nomura A.M.Y., Wilkens L.R., Hankin J. (1992). The association of diet, obesity, and breast cancer in Hawaii. *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prev*; **1**: 269-275.

Gos M. Jr., Szpecht-Potocka A. (2002). Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. *J Appl Genet.*; **43**: 511-24.

Goyette P., Pai A., Milos R., Frosst P., Tran P., Chen Z., Chan M., Rozen R. (1998). Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR). *MammGenome*; **9**(8): 652-666.

Grant D.M., Hughes N.C., Janezic S.A., Goodfellow G.H., Chen H.J., Gaedigk A., Yu VL., Grewal R. (1997). Human acetyltransferase polymorphisms. *Mutation research*; **376**:61-70.

Guaoua L.S., Ratbi I., Laarabi F.Z., Elalaoui S.C., Cherkaoui Jaouad I., Barkat A., Sefiani A. (2014). Distribution of allelic and genotypic frequencies of NAT2 and CYP2E1 variants in Moroccan population. *BMC Genetics*; **15**: 1-6.

Gurda D., Handschuh L., Kotkowiak W., Jakubowski H. (2015). Homocysteinethiolactone and N-homocysteinylation of protein induce pro-atherogenic changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Amino Acids.*; **47**(7): 1319-39.

H:

Hamdy S., Hiratsuka M., Narahara K., Endo N., El-Enany M., Moursi N.E., Ahmed M.S. (2003). Genotype and allele frequencies of *TPMT*, *NAT2*, *GST*, *SULT1A1* and *MDR-1* in the Egyptian population. *Br J Clin Pharmacol.*; **55**: 560-569.

Hannu M., Stephane S., Henri G., Ursula L. (2013). Folate-Dependent Thymidylate-Forming Enzymes: Parallels between DNA and RNA Metabolic Enzymes and Evolutionary plications. *Landes Bioscience*; p. 275-288.

Hartmann L.C., Keeney G.L., Lingle W.L. Li P., Bremer R.E., Chen H., Wei B., Xiao X., Da J., Skinner K., Hicks D.G., Bu H., Tang P. (2007). Folate receptor overexpression is associated with poor outcome in breast cancer. *Int J Cancer*; **121**: 938-42.

He J.M., Pu Y.D., Wu Y.J., Qin R., Zhang Q.J., Sun Y.S., Zheng W.W., Chen L.P. (2014). Association between dietary intake of folate and MTHFR and MTR genotype with risk of breast cancer. *Genet Mol Res*; **13**: 8925-8931.

Hein D.W., Doll M.A., Fretland A.J., Leff M.A., Webb J., Xiao G.H., Devanaboyina U.S., Nangju N.A., Feng Y. (2000). Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*; **9**: 29-42.

Hein D.W. (2002). Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutation Research*; **506**: 65–77.

Hein D.W., Fretland A.J., Doll MA. (2006). Effects of single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltransferase 2 on metabolic activation (O-acetylation) of heterocyclic amine carcinogens. *Int J Cancer.*; **119**:1208-11.

Hein D.W., Bendaly J., Neale J.R., Doll M.A. (2008). Systemic functional expression of Nacetyltransferase polymorphism in the F344 *Nat2* congenic rat. *Drug Meatbol. Dispos*; **36**: 2452-59.

Hein D.W., Millner L.M., Leggett C.S., Doll M.A. (2010). Relationship between N-acetyltransferase 2 single-nucleotide polymorphisms and phenotype. *Carcinogenesis.*; **31**:326-7.

Henderson I.C. (1993). Risk factors for breast cancer development. *Cancer*; **71**:2127-40.

Hickman D., Risch A., Buckle V., Spurr N.K., Jeremiah S.J., McCarthy A. et al. (1994). Chromosomal localization of human genes for arylamine N-acetyltransferase. *Biochem J*; **297**: 441-445.

Hsu C.C., Cheng C.H., Hsu C.L., Lee W.J., Huang S.C., Huang Y.C. (2015). Role of vitamin B6 status on antioxidant defenses glutathione and related enzyme activities in mice with homocysteine-induced oxidative stress. *Food Nutr Res.*; **59**: 25702.

Hughes N.C., Janezic S.A., McQueen K.L., Jewett M.A., Castranio T., Bell D.A. (1998). Identification and characterization of variant alleles of human acetyltransferase NAT1 with defective function using p-aminosalicylateas an in-vivo and in-vitro probe. *Pharmacogenetics*; **8**: 55-66.

J:

Jensen L.E., Hoess K., Whitehead A.S., Mitchell L.E. (2005). The NAT1 C1095A polymorphism, maternal multivitamin use and smoking and the risk of spina bifida. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.*; **73**(7):512-6.

Jo S., Nam K., Min B., Ahn D.U., Cho S., Park W. (2006). Antioxidant activity of *Prunus mume* extract in cooked chicken breast meat. *Int J Food Sci Technol*; **41**(1):15-9.

Johanning G.L., Heimburger D.C., Piyathilake C.J. (2002). DNA Methylation and Diet in Cancer. *J Nutr*; **132**: 3814S-3818S.

Joshi PA, Jackson HW, Beristain AG, Di Grappa MA, Mote PA, Clarke CL, Stingl J, Waterhouse PD, Khokha R. (2010). Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature*; **465**(7299): 803-807.

K:

Kang S.S., Zhou J., Wong P.W., Kowalisyn J., Strokosch G. (1988). Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolatereductase. *Am J Hum Genet*; **43**:414-421.

Kawamura A., Graham J., Mushtaq A., Tsiftoglou S.A., Vath G.M., Hanna P.E., Wagner C.R., Sim E. (2005). Eukaryotic arylamine N-acetyltransferase: investigation of substrate specificity by high-throughput screening. *Biochem Pharmacol*; **69**:347-359.

Keating G.A., Bogen K.T. (2004). Estimates of heterocyclic amine intake in the US population. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*; **802**: 127-33.

Key T.J., Schatzkin A., Willett W.C., Allen N.E. (2004). Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Publ Health Nutr*; **7**: 187-200.

Khedhaier A., Hassen E., Bouaouina N., Gabbouj S., Ben Ahmed S., Chouchane L. (2008). Implication of Xenobiotic Metabolizing Enzyme gene (CYP2E1, CYP2C19, CYP2D6, mEH and NAT2) Polymorphisms in Breast Carcinoma. *BMC Cancer*; **8**: 1-12.

Khelil M., Zenati A, Makrelouf M, Otmane A, Tayebi B. (2010). Polymorphisms in NAT2 Gene and Atherosclerosis in an Algerian Population. *Archives of Medical Research*; **41**: 215-220.

Kim Y.I. (1999). Folate and cancer prevention: a new medical application of folate beyond hyperhomocysteinemia and neural tube defects. *Nutr Rev.*; **57** (10):314-21.

Kim Y.I. (2006). Does a high folate intake increase the risk of breast cancer? *Nutr Rev*; **64**: 468-475.

Kopans, D.B. (1998). More on sonographic features in the differentiation of fibroadenoma and invasive ductal carcinoma. *American Journal of Roentgenology*, **171**, 1159-1160.

Kotsopoulos J., Sohn K.J., Martin R., Choi M., Renlund R., McKerlie C., Hwang S.W., Medline A., Kim Y.I. (2003). Dietary folate deficiency suppresses N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis*; **24**: 937-944.

Kotsopoulos J., Medline A., Renlund R., Sohn K.J., Martin R., Hwang S.W., Lu S., Archer M.C., Kim Y.I. (2005). Effects of dietary folate on the development and progression of mammary tumors in rats. *Carcinogenesis*; **26**: 1603-1612.

Kryvenko O.N., Yoon J.Y., Chitale D.A., Lee M.W. (2013). Prevalence of terminal duct lobular units and frequency of neoplastic involvement of the nipple in mastectomy. *Arch Pathol Lab Med.*; **137**(7): 955-60.

Kubow S. (1992). Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radic Biol Med*; **12**:63-81.

L:

La Vecchia C., Decarli A., Francheschi S, Gentile A., Negri E., Parazzini F. (1987). Dietary factors and the risk of breast cancer. *Nutr Cancer*; **10**: 205-14.

Larsson S.C., Giovannucci E.,Wolk A. (2007). Folate and Risk of Breast Cancer: A Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*; **99**: 64-76.

Layton D.W., Bogen K.T., Knize M.G., Hatch F.T., Johnson V.M., Felton J.S. (1995). Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research. *Carcinogenesis*; **16**:39 -52.

Leclerc D., Sibani S., Rozen R. (2005). Molecular Biology of Methylene tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Overview of Mutations/Polymorphisms. Madame Curie Bioscience Database. Sept.,15th, 2005 ed: Landes Biosciences.

Lee K.M., Park S.K., Kim S.U., Doll M.A., Yoo K.Y., Ahn S.H., Noh D.Y., Hirvonen A., Hein D.W., Kang D. (2003). N-acetyltransferase (NAT1, NAT2) and glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1) polymorphisms in breast cancer. *Cancer Lett*; **196**:179–186.

Li D., Wang M., Firozi P., et al. (2002). Characterization of a major aromatic DNA adduct detected in human breast tissues. *Environ Mol Mutagen*; **39**: 193-200.

Li S.C., Goto N.K., Williams K.A., Deber C.M. (1996). Alpha-helical, but not beta-sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. *Proc Natl Acad Sci USA*; **93**(13): 6676–6681.

Liang H., Yan Y., Li T., Li R., Li M., Li S., Qin X. (2014). Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms and breast cancer risk in Chinese population: a meta-analysis of 22 case-control studies. *Tumour Biol*; **35**: 1695-1701.

Lin H., Han C.Y., Lin B., Hardy S. (1994). Ethnic distribution of slow acetylator mutations in the polymorphic NAT2 gene. *Pharmacogenetics*; **4**: 125-134.

Lin J., Lee I.M., Cook N.R., Selhub J., Manson J.E., Buring J.E., Zhang S.M. (2008). Plasma folate, vitamin B-6, vitamin B-12, and risk of breast cancer in women. *Am J Clin Nutr*; **87**: 734-743.

Lin J., Lee I.M., Song Y., Cook N.R., Selhub J., Manson J.E., Buring J.E., Zhang S.M. (2010). Plasma homocysteine and cysteine and risk of breast cancer in women. *Cancer Res.*; **70**: 2397-405.

Lin V., Eng AS, Hen NE, Ng EH, Chowdhury SH. (2001). Effect of Progesterone on the Invasive Properties and Tumor Growth of Progesterone Receptor-transfected Breast Cancer Cells MDA-MB-231. *Clinical Cancer Research*; **7**(9):2880-6.

Lindzon G.M., Medline A., Sohn K.J., Depeint F., Croxford R., Kim Y.I. (2009). Effect of folic acid supplementation on the progression of colorectal aberrant crypt foci. *Carcinogenesis*; **30**: 1536-1543.

López-Cortés A., Echeverría C., Oña-Cisneros F., Sánchez M.E., Herrera C., Cabrera-Andrade A., Rosales F., Ortiz M., PAZ-Y-Miño C. (2015). Breast cancer risk associated with gene expression and genotype polymorphisms of the folate-metabolizing MTHFR gene: a case control-study in a high altitude Ecuadorian mestizo population. *Tumour Biol*; **36**:6451-6461.

M:

Mandaviya P.R., Stolk L., Heil S.G. (2014). Homocysteine and DNA methylation: a review of animal and human literature. *Mol Genet Metab.*; **113**:243–52.

Mason J.B., Levesque T. (1996). Folate: effects on carcinogenesis and the potential for cancer chemoprevention. *Oncology (Williston Park)*; **10** (11):1727-36.

Matejcic M., de Batlle J, Ricci C, Biessy C, Perrier F, Huybrechts I, Weiderpass E, Boutron-Ruault MC, Cadeau C, His M, Cox DG, Boeing H, Fortner RT, Kaaks R, et al. (2017). Biomarkers of folate and vitamin B12 and breast cancer risk: report from the EPIC cohort. *Int J Cancer.* ; **140**: 1246-1259.

Matos E.L., Thomas D.B., Sobel N. (1991). Breast cancer in Argentina: case-control study with special reference to meat-eating habits. *Neoplasma*; **38**: 357-366.

McPartlin J., Halligan A., Scott J.M., Darling M., Weir D.G. (1993). Accelerated folate breakdown in pregnancy. *Lancet*; **341**: 148-149.

Megahed M.A., Taher I.M. (2004). Folate and homocysteine levels in pregnancy. *Br J Biomed Sci*; **61**: 84-87.

Michael S., Qamar R., Akhtar F., Khan W.A., Ahmed A. (2008). C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with primary closed angle glaucoma. *Mol Vis.*; **14**: 661–665.

Michels K.B., Ekblom A. (2004). Caloric restriction and incidence of breast cancer. *JAMA*; **291**: 1226-309.

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988). Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*; **16**: 1215.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*; **266**(5182):66–71 .

Millikan R.C., Pittman G.S., Newman B., Tse C-K.J., Selmin O. Rockhill B., Savitz D., Moorman P.G., Bell D.A. (1998). Cigarette smoking, N-acetyltransferases 1 and 2, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev*; **7**: 371-378.

Min B., Ahn D.U. (2005). Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products—a review. *Food Sci Biotechnol*; **14**(1): 152-63.

Minchin R.F., Reeves P.T., Teitel C.H., McManus M.E., Mojarrabi B., Ilett K.F., Kadlubar F.F. (1992). N- and O-acetylation of aromatic and heterocyclic amine carcinogens by human monomorphic and polymorphic acetyltransferases expressed in COS-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*; **185**:839-844.

Minchin R.F., Hanna P.E., Dupret J.M., Wagner C.R., Rodrigues-Lima F., Butcher N.J. (2007). Arylamine N-acetyltransferase 1. *Int.J.Biochem.Cell.Biol.*; **39**: 1999-2005.

Miner S.E., Evrovski J. (1997). Cole DE. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin.Biochem.*; **30** (3) :189-201.

N :

Nkondjock A., Ghadirian P. (2005). Facteurs de risque du cancer du sein. *medecine/sciences*; **21** : 175-80.

O:

Ohsako S., Deguchi T. (1990). Cloning and Expression of cDNAs for Polymorphic and Monomorphic Arylamine N-Acetyltransferases from Human Liver. *J. Biol. Chem.*; **265**: 4630.

Olsson H. (2000). Tumour biology of a breast cancer at least partly reflects the biology of the tissue/epithelial cell of origin at the time of initiation - a hypothesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*; **74**: 345-50.

P:

Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LGH, et al. (2016). GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; (1993—2016).

Palomino-Morales R., Gonzalez-Juanatey C., Vazquez-Rodriguez T.R., Rodriguez L., Miranda-Fillooy J.A., Fernandez-Gutierrez B., Llorca J., Martin J., Gonzalez-Gay M.A. (2010). A1298C polymorphism in the MTHFR gene predisposes to cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.*; **12**: R71.

Parnetti L., Bottiglieri T., Lowenthal D. (1997). Role of homocysteine in age-related vascular and non-vascular diseases. *Aging (Milano)*; **9**(4):241-57.

Preux P.M., Odermatt P., Perna A., Marin B., Vergnenègre A. (2005). Qu'est-ce qu'une regression logistique? *Rev Mal Respir* ; **22**: 159-162.

R:

Rai V. (2014). Methylene tetrahydrofolate Reductase A1298C Polymorphism and Breast Cancer: A Meta-analysis of 33 Studies. *Ann Med Health Sci Res.*; **4**: 841-51.

Rahman N. (2014). Realizing the promise of cancer predisposition genes. *Nature*; **505**:302—8

Ruiz-Mercado M., Vargas M.T., de Soto I.P., Pecellín C.D., Sánchez M.C., Delgado M.A., Ruiz R.B., Pérez-Simón J.A., Díaz-Aguado A.H. (2015). Methionine synthase reductase deficiency (CblE): A report of two patients and a novel mutation. *Hematology*; **21**(3):193-7.

Rundle A., Tang D., Hibshoosh H., Estabrook A., Schnabel F., Cao W., Grumet S., Perera F.P. (2000). The relationship between genetic damage from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer. *Carcinogenesis*; **21**: 1281-1289.

S:

Sabbagh A., Langaney A., Darlu P., Gerard N., Krishnamoorthy R. (2008). Worldwide distribution of NAT2 diversity: implication for NAT2 evolutionary history. *BMC Genet*; **27**: 9-21.

Samraja A.N., Pearce O.M., Läubli H., et al. (2015). A red meat-derived glycan promotes inflammation and cancer progression. *PNAS*; **112**: 542-547.

Savage KI. (2014). BRCA1 deficiency exacerbates estrogen-induced DNA damage and genomic instability. *Cancer Research*; **74**(10): 2773-84.

Sazci A., Ergul E., Kucukali I., Kara I., Kaya G. (2005). Association of the C677T and A1298C polymorphisms of methylene tetrahydrofolate reductase gene with schizophrenia,

association is significant in men but not in women. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; **29**: 1113-23.

Scott J.M., Weir D.G. (1998). Folic acid. Homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *Cardiovasc Risk*; **5**: 223-7.

Semenza J.C., Delfino R.J., Ziogas A., Anton-Culver H. (2003). Breast cancer risk and methylenetetrahydrofolatereductase polymorphism. *Breast Cancer Res Treat.*; **77**(3):217-23.

Serna-Marquez N., Diaz-Aragon R., Reyes-Uribe E., Cortes-Reynosa P., Salazar EP. (2017). Linoleic acid induces migration and invasion through FFAR4- and PI3K-/Akt-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Med Oncol.*; **34**:111.

Shane B. (1995). Folate chemistry and metabolism. In: Bailey LB (eds) Folate in health and disease, Marcel Dekker, New York, pp 1-22.

Sikora M., Twardowski T., Jakubowski H. (2006). The role of homocysteinethiolactone in some of human diseases. *PostepyBiochem.*; **52**(4):417-23.

Sim E., Westwood I., Fullam E. (2007). Arylamine N-acetyltransferases. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*; **3**:169-184.

Sim E., Walters K., Boukouvala S. (2008). Arylamine N- acetyltransferase: From structure to function. *Drug Metab Rev.*; **40**:479-510.

Sim E., Abuhammad A., Ryan A. (2014). Arylamine N-acetyltransferases: from drug metabolism and pharmacogenetics to drug discovery. *Br J Pharmacol*; **171**:2705-2725.

Sinclair J.C., Sandy J., Delgoda R., Sim E., Noble M.E. (2000). Structure of arylamine N-acetyltransferase reveals a catalytic triad. *Nat Struct Biol.*; **7**(7):560-4.

Singh M., Gupta V.H., Amarapurkar D.N, Singh M., Gupta V.H., Amarapurkar D.N., Joshi J.M., Baijal R., Kumar H.R., Amarapurkar A.D. (2014). Association of genetic variants with anti-tuberculosis drug induced hepatotoxicity: A high resolution melting analysis. *Infect Genet Evol.*; **14**: 30-6.

Smith I., Procter M., Gelber R.D. Guillaume S, Feyereislova A., Dowsett M., et al. (2007). 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet*; **369**: 29-36.

Smulders Y.M., Smith D.E., Kok R.M., Teerlink T., Swinkels D.W., Stehouwer C.D., Jakobs C. (2006). Cellular folate vitamer distribution during and after correction of vitamin B12 deficiency: a case for the methylfolate trap. *Br.J.Haematol.*; **132**: 623-9.

Song J., Medline A., Mason J.B., Gallinger S., Kim Y.I. (2000). Effects of dietary folate on intestinal tumorigenesis in the apcMin mouse. *Cancer Res*; **60**: 5434-5440.

Stephenson N., Beckmann L., Chang-Claude J. (2010). Carcinogen metabolism, cigarette smoking, and breast cancer risk: a Bayes model averaging approach. *Epidemiologic Perspectives & Innovations*; **7**:10.

Stolzenberg-Solomon R.Z., Chang S.C., Leitzmann M.F., Johnson C., Buys S.S., Hoover R.N., Ziegler R.G. (2006). Folate intake alcohol use and postmenopausal breast cancer risk in the Prostate. Lung. Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial1.2.3; *Am J Clin Nutr.*; **83** (4): 895-904.

T:

Tanira M.O., Simsek M., Al Balushi K., Al Lawatia K., Al Barawani H., Bayoumi R.A. (2003). Distribution of arylamine N-acetyltransferase 2 (nat2) genotypes among Omanis. *J Sci_Res Med Sci.*; **5**: 9-14.

Tanko L.B., Christiansen C. (2004). An update on the antiestrogenic effect of smoking: a literature review with implications for researchers and practitioners. *Menopause*; **11**: 27.

Tibbetts A.S., Appling D.R. (2010). Compartmentalization of Mammalian folate-mediated one-carbon metabolism. *Annu Rev Nutr*; **30**: 57-81.

Touré A., Diop C., Cabral M., Fall M., Lhermitte M., Diouf A., Broly F., Allorge D. (2012). Study of NAT2 genetic polymorphism in West African subjects: example of an healthy non-smoker Senegalese population. *Mol Biol Rep.*; **39**: 10489-96.

U:

Umamaheswaran G., Krishna Kumar D., Adithan C. (2014). Distribution of genetic polymorphisms of genes encoding drug metabolizing enzymes & drug transporters - a review with Indian perspective. *Indian J Med Res.*; **139**: 27-65.

V:

Vaňner A.S., Boiarskikh U.A., Voronina E.N., Selezneva I.A., Sinkina T.V., Lazarev A.F., Petrova V.D., Filipenko ML. (2010). Polymorphic variants of folate metabolizing genes (C677T and A1298C MTHFR. C1420T SHMT1 and G1958A MTHFD) are not associated with the risk of breast cancer in West Siberian Region of Russia. *MolBiol (Mosk)*; **44**(5):816-23.

van den Donk M., Pellis L., Crott J.W., van Engeland M., Friederich P., Nagengast F.M., van Bergeijk J.D., de Boer S.Y., Mason J.B., Kok F.J., et al. (2007). Folic acid and vitamin B-12 supplementation does not favorably influence uracil incorporation and promoter methylation in rectal mucosa DNA of subjects with previous colorectal adenomas. *J Nutr*; **137**: 2114-2120.

W:

Wakefield L., Robinson J., Long H., Ibbit J. C., Cooke S., Hurst H. C., Sim E. (2008). Arylamine N-acetyltransferase I expression in breast cancer cell lines: A potential marker in estrogen receptor-positive tumors. *Genes Chromosomes Cancer*; **47**:118-126.

- Walker M.C., Smith G.N., Perkins S.L., Keely E.J., Garner P.R. (1999). Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*; **180**: 660-664.
- Walraven J.M., Trent J.O., Hein D.W. (2007). Computational and experimental analyses of mammalian arylamine N-acetyltransferase structure and function. *Drug Metab Dispos*; **35**(6): 1001-1007.
- Walraven J.M., Zang Y., Trent J.O., Hein D.W. (2008a). Structure/Function Evaluations of Single Nucleotide Polymorphisms in Human N-Acetyltransferase 2. *Curr Drug Metab.*; **9**: 471-486.
- Walraven J.M., Trent J.O., Hein D.W. (2008b). Structure fonction evaluation of NAT1. *Curr Drug Metab*; **40**: 169-18.
- Weber W.W., King C.M. (1981). N-acetyltransferase and arylhydroxamic acid acetyltransferase. *Methods in enzymology*; **77**: 272-281.
- Weiner A.S., Boiarskikh U.A., Voronina E.N., Selezneva I.A., Sinkina T.V., Lazarev A.F., Petrova V.D., Filipenko M.L. (2010). Polymorphic variants of folate metabolizing genes (C677T and A1298C MTHFR, C1420T SHMT1 and G1958A MTHFD) are not associated with the risk of breast cancer in West Siberian Region of Russia. *Mol Biol (Mosk)*; **44**: 816-823.
- Weisberg I., Tran P., Christensen B., Sibani S., Rozen R. (1998). Second Genetic Polymorphism in Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Associated with Decreased Enzyme Activity. *Mol Genet Metab.*; **64**: 169-72.
- Wellings S.R., Alpers C.E. (1994). Quantitative analysis of preneoplastic lesions of the breast: a basis for computer modelling. *Surg Pathol*; **5**: 371-82.
- Wise J. (2014). Eating more red meat is linked with raised risk of breast cancer. *BMJ*; **10**: 348-381.
- World Cancer Research Fund; American Institute for Cancer Research. (1997). Expert report. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC: American Institute for Cancer Research,
- World Cancer Research Fund (GB); American Institute for Cancer Research. (2007). Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, (eds) D.C.: American Institute for Cancer Research, pp1-537.
- Wu L.L., Wu J.T. (2002). Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker. *Clin.Chim.Acta.*; **322**(1-2):21-8.

X:

Xue F., Willett W.C., Rosner B.A. (2011). Cigarette smoking and the incidence of breast cancer. *Arch Intern Med*; **171**: 125-33.

Z:

Zang Y., Doll M.A., Zhao S., States J.C., Hein D.W. (2007a). Functional Characterization of Single Nucleotide Polymorphisms and Haplotypes of Human N-Acetyltransferase 2. *Carcinogenesis*; **28**(8): 1665-1671.

Zang Y., Zhao S., Doll M.A., States J.C., Hein D.W. (2007b). Functional characterization of the A411T (L137F) and G364A (D122N) genetic polymorphisms in human N-acetyltransferase 2. *Pharmacogenet Genomics*; **17**(1): 37-45.

Zhang S.M., Willett W.C., Selhub J., Hunter D.J., Giovannucci E.L., Holmes M.D., Colditz G.A., Hankinson S.E. (2003). Plasma Folate. Vitamin B6. Vitamin B12. Homocysteine and Risk of Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst.*; **95**(5): 373-80.

Zheng W., Deitz A.C., Campbell D.R., Wen W.Q., Cerhan J.R., Sellers T.A., Folsom A.R., Hein D.W. (1999). N-acetyltransferase 1 Genetic polymorphism. Cigarette Smoking. Well-Done Meat Intake and breast cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers*; **8**: 233.

Zhu B.T. (2003). Medical hypothesis: hyperhomocysteinemia is a risk factor for estrogen-induced hormonal cancer. *Int J Oncol*; **22**: 499-508.

Zhu Y., Hein D.W. (2008). Functional effects of single nucleotide polymorphisms in the coding region of human N-acetyltransferase 1. *Pharmacogenomics*; **8**: 339-48.

Zhu Z., Zhang J., Jiang W., Zhang X., Li Y., Xu X. (2015). Risks on N-acetyltransferase 2 and bladder cancer: a meta-analysis *Onco Targets Ther.*; **8**: 3715–3720.

Zitouni M. (2014). Plan national cancer (2015-2019) : nouvelle vision stratégique centré sur le malade, 1rd edition, ANDS Alger, Algérie, 178p.

VIII-ANNEXES

ANNEXE 1

Human *NAT1* allele (Haplotype)

Last updated 16/01/2016

| <i>NAT1</i> Allele (Haplotype) | Nucleotide Change(s) and rs Identifier(s) | Amino Acid Change(s) | Phenotype |
|--------------------------------|--|---|--|
| <i>NAT1</i> *4 | Reference | Reference | Reference |
| <i>NAT1</i> *3 | 1095C>A (rs15561) | | |
| <i>NAT1</i> *5 | 350-351GG>CC (rs72554606) 497-499 GGG>CCC (rs72554608) 884A>G (rs55793712) Δ976 (rs72554612) Δ1105 (rs72554613) | R117T R166T; E167Q | |
| <i>NAT1</i> *10 | 1088T>A (rs1057126) 1095C>A (rs15561) | | |
| <i>NAT1</i> *11A | -344C>T (rs4986988) -40A>T (rs4986989) 445G>A (rs4987076) 459G>A (rs4986990) 640T>G (rs4986783) Δ9 between 1065-1090 1095C>A (rs15561) | V149I T153T (synonymous) S214A | |
| <i>NAT1</i> *11B | -344C>T (rs4986988) -40A>T (rs4986989) 445G>A (rs4987076) 459G>A (rs4986990) 640T>G (rs4986783) Δ9 between 1065-1090 | V149I T153T (synonymous) S214A | |
| <i>NAT1</i> *11C | -344C>T (rs4986988) -40A>T (rs4986989) 459G>A (rs4986990) 640T>G (rs4986783) Δ9 between 1065-1090 1095C>A (rs15561) | T153T (synonymous) S214A | |
| <i>NAT1</i> *14A | 560G>A (rs4986782) 1088T>A (rs1057126) 1095C>A (rs15561) | R187Q | Lower than <i>NAT1</i> *4 "Slow" |
| <i>NAT1</i> *14B | 560G>A (rs4986782) | R187Q | Lower than <i>NAT1</i> *4 "Slow" |
| <i>NAT1</i> *15 | 559C>T (rs5030839) | R187Stop | Truncated protein/ no enzyme activity |
| <i>NAT1</i> *16 | [AAA] immediately after 1091 1095C>A (rs15561) | | |
| <i>NAT1</i> *17 | 190C>T (rs56379106) | R64W | Lower than <i>NAT1</i> *4 "Slow" |

ANNEXE 1

| | | | |
|-----------------|--|--|--|
| NAT1*18A | Δ3 between 1065-1087 (rs4646271) 1088T>A (rs1057126) 1095C>A (rs15561) | | |
| NAT1*18B | Δ3 between 1065-1087 (rs4646271) | | |
| NAT1*19A | 97C>T (rs56318881) | R33Stop | Truncated protein/ no enzyme activity |
| NAT1*19B | 97C>T (rs56318881) 190C>T (rs56379106) | R33Stop R64W | Truncated protein/ no enzyme activity |
| NAT1*20 | 402T>C (rs146727732) | P134P (synonymous) | Equivalent to NAT1*4 |
| NAT1*21 | 613A>G (rs72554609) | M205V | Equivalent to NAT1*4 |
| NAT1*22 | 752A>T (rs56172717) | D251V | Lower than NAT1*4 “Slow” |
| NAT1*23 | 777T>C (rs4986991) | S259S (synonymous) | Equivalent to NAT1*4 |
| NAT1*24 | 781G>A (rs72554610) | E261K | Equivalent to NAT1*4 |
| NAT1*25 | 787A>G (rs72554611) | I263V | Equivalent to NAT1*4 |
| NAT1*26A | [TAA] insertion between 1065 and 1090 1095C>A (rs15561) | | |
| NAT1*26B | [TAA] insertion between 1065 and 1090 | | |
| NAT1*27 | 21T>G (rs4986992) 777T>C (rs4986991) | L7L (synonymous) S259S (synonymous) | Equivalent to NAT1*4 |
| NAT1*28 | [TAATAA] deletion between 1065 – 1090 | | |
| NAT1*29 | 1088T>A (rs1057126) 1095C>A (rs15561) Δ1025 | | |
| NAT1*30 | 445G>A (rs4987076) | V149I | |

ANNEXE 2

Human NAT2 allele (Haplotype)

Last updated 18/04/2016

| <i>NAT2</i> Allele (Haplotype) | Nucleotide Change(s) and rs Identifiers | Amino Acid Change(s) | Phenotype |
|--------------------------------|---|--|-----------|
| <i>NAT2*4</i> | Reference | Reference | Rapid |
| <i>NAT2*5A</i> | 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) | I114T L161L (synonymous) | Slow |
| <i>NAT2*5B</i> | 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) | I114T L161L (synonymous) K268R | Slow |
| <i>NAT2*5C</i> | 341T>C (rs1801280) 803A>G (rs1208) | I114T K268R | Slow |
| <i>NAT2*5D</i> | 341T>C (rs1801280) | I114T | Slow |
| <i>NAT2*5E</i> | 341T>C (rs1801280) 590G>A (rs1799930) | I114T R197Q | Slow |
| <i>NAT2*5F</i> | 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 759C>T (rs56011192) 803A>G (rs1208) | I114T L161L (synonymous) V253V (synonymous) K268R | Slow |
| <i>NAT2*5G</i> | 282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) | Y94Y (synonymous) I114T L161L (synonymous) K268R | Slow |
| <i>NAT2*5H</i> | 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) Δ ⁸⁵⁹ | I114T L161L (synonymous) K268R S287 Frameshift | Slow |
| <i>NAT2*5I</i> | 341T>C (rs1801280) 411A>T (rs4986997) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) | I114T L137F L161L (synonymous) K268R | Slow |
| <i>NAT2*5J^e</i> | 282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 590G>A (rs1799930) | Y94Y (synonymous) I114T R197Q | Slow |
| <i>NAT2*5K</i> | 282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) | Y94Y (synonymous) I114T | |
| <i>NAT2*5KA^l</i> | 282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 857G>A (rs1799931) | Y94Y (synonymous) I114T G286E | |
| <i>NAT2*5L</i> | 70T>A (rs45477599) 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) | L24I I114T L161L (synonymous) K268R | |
| <i>NAT2*5M</i> | 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) 838G>A (rs56393504) | I114T L161L (synonymous) K268R V280M | |
| <i>NAT2*5N</i> | 341T>C (rs1801280) 472A>C (rs139351995) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) | I114T I158L L161L (synonymous) K268R | |
| <i>NAT2*5O</i> | 203G>A (rs72466458) 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) | C68Y I114T L161L (synonymous) K268R | |

ANNEXE 2

| | | | |
|-----------------------------|--|---|------|
| <i>NAT2*5P</i> | 282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 578C>T (rs79050330) 590G>A (rs1799930) 803A>G (rs1208) | Y94Y (synonymous) I114T L161L (synonymous) T193M R197Q K268R | |
| <i>NAT2*5Q^f</i> | 341T>C (rs1801280) 590G>A (rs1799930) 803A>G (rs1208) | I114T R197Q K268R | |
| <i>NAT2*5R^f</i> | 282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 590G>A (rs1799930) 803A>G (rs1208) | Y94Y (synonymous) I114T R197Q K268R | |
| <i>NAT2*5S^f</i> | 341T>C (rs1801280) 857G>A (rs1799931) | I114T G286E | |
| <i>NAT2*5T^f</i> | 282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 803A>G (rs1208) | Y94Y (synonymous) I114T K268R | |
| <i>NAT2*5TA^f</i> | 282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 803A>G (rs1208) 857G>A (rs1799931) | Y94Y (synonymous) I114T K268R G286E | |
| <i>NAT2*5U^f</i> | 282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 590G>A (rs1799930) 803A>G (rs1208) | Y94Y (synonymous) I114T L161L (synonymous) R197Q K268R | |
| <i>NAT2*5V^f</i> | 282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) | Y94Y (synonymous) I114T L161L (synonymous) | |
| <i>NAT2*5VA^f</i> | 282C>T (rs1041983) 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 857G>A (rs1799931) | Y94Y (synonymous) I114T L161L (synonymous) G286E | |
| <i>NAT2*5W^f</i> | 341T>C (rs1801280) 354T>C (rs146405047) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) | I114T N118N (synonymous) L161L (synonymous) K268R | |
| <i>NAT2*5X^f</i> | 341T>C (rs1801280) 403C>G (rs12720065) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) | I114T L135V L161L (synonymous) K268R | |
| <i>NAT2*5Y^f</i> | 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 622T>C (rs56387565) 803A>G (rs1208) | I114T L161L (synonymous) Y208H K268R | |
| <i>NAT2*5Z^f</i> | 191G>A (rs1801279) 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) | R64Q I114T L161L (synonymous) | |
| <i>NAT2*6A</i> | 282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) | Y94Y (synonymous) R197Q | Slow |
| <i>NAT2*6B</i> | 590G>A (rs1799930) | R197Q | Slow |

ANNEXE 2

| | | | |
|----------------------------|---|---|------|
| <i>NAT2*6C</i> | 282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 803A>G (rs1208) | Y94Y (synonymous) R197Q K268R | Slow |
| <i>NAT2*6D</i> | 111T>C (rs72554615) 282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) | F37F (synonymous) Y94Y (synonymous) R197Q | Slow |
| <i>NAT2*6E</i> | 481C>T (rs1799929) 590G>A (rs1799930) | L161L (synonymous) R197Q | Slow |
| <i>NAT2*6F</i> | 590G>A (rs1799930) 803A>G (rs1208) | R197Q K268R | |
| <i>NAT2*6G</i> | 282C>T (rs1041983) 518A>G 590G>A (rs1799930) | Y94Y (synonymous) K173R R197Q | |
| <i>NAT2*6H</i> | 282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 766A>G (rs55700793) | Y94Y (synonymous) R197Q K256E | |
| <i>NAT2*6I</i> | 282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 838G>A (rs56393504) 857G>A (rs1799931) | Y94Y (synonymous) R197Q V280M G286E | |
| <i>NAT2*6J</i> | 282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 857G>A (rs1799931) | Y94Y (synonymous) R197Q G286E | |
| <i>NAT2*6K</i> | 282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 638C>T (rs138707146) | Y94Y (synonymous) R197Q P213L | |
| <i>NAT2*6L</i> | 282C>T (rs1041983) 345C>T (rs45532639) 590G>A (rs1799930) | Y94Y (synonymous) D115D (synonymous) R197Q | |
| <i>NAT2*6M</i> | 152G>T (rs72466457) 282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) | G51V Y94Y (synonymous) R197Q | |
| <i>NAT2*6N</i> | 282C>T (rs1041983) 481C>T (rs1799929) 590G>A (rs1799930) | Y94Y (synonymous) L161L (synonymous) R197Q | |
| <i>NAT2*6O^f</i> | 282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 838G>A (rs56393504) | Y94Y (synonymous) R197Q V280M | |
| <i>NAT2*6P^f</i> | 403C>G (rs12720065) 590G>A (rs1799930) | L135V R197Q | |
| <i>NAT2*6Q^f</i> | 282C>T (rs1041983) 308C>T 590G>A (rs1799930) | Y94Y (synonymous) T103I R197Q | |
| <i>NAT2*6R^f</i> | 282C>T (rs1041983) 481C>T (rs1799929) 590G>A (rs1799930) 803A>G (rs1208) | Y94Y (synonymous) L161L (synonymous) R197Q K268R | |
| <i>NAT2*6S^f</i> | 590G>A (rs1799930) 857G>A (rs1799931) | R197Q G286E | |
| <i>NAT2*6T^f</i> | 481C>T (rs1799929) 590G>A (rs1799930) 857G>A (rs1799931) | L161L (synonymous) R197Q G286E | |

ANNEXE 2

| | | | |
|-----------------------------|---|---|----------------------------|
| <i>NAT2*6U^f</i> | 282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) 579G>T (rs144176822) | Y94Y (synonymous) R197Q T193T (synonymous) | |
| <i>NAT2*6V^f</i> | 403C>G (rs12720065) 590G>A (rs1799930) 838G>A (rs56393504) | L135V R197Q V280M | |
| <i>NAT2*7A</i> | 857G>A (rs1799931) | G286E | Slow; Substrate dependent? |
| <i>NAT2*7B</i> | 282C>T (rs1041983) 857G>A (rs1799931) | Y94Y (synonymous) G286E | Slow; Substrate dependent? |
| <i>NAT2*7C</i> | 282C>T (rs1041983) 803A>G (rs1208) 857G>A (rs1799931) | Y94Y (synonymous) K268R G286E | |
| <i>NAT2*7D</i> | 191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983) 857G>A (rs1799931) | R64Q Y94Y (synonymous) G286E | |
| <i>NAT2*7E^f</i> | 282C>T (rs1041983) 481C>T (rs1799929) 857G>A (rs1799931) | Y94Y (synonymous) L161L (synonymous) G286E | |
| <i>NAT2*7F^f</i> | 282C>T (rs1041983) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) 857G>A (rs1799931) | Y94Y (synonymous) L161L (synonymous) K268R G286E | |
| <i>NAT2*7G^f</i> | 226T>G 282C>T (rs1041983) 857G>A (rs1799931) | Y76D Y94Y (synonymous) G286E | |
| <i>NAT2*10</i> | 499G>A (rs72554617) | E167K | Slow; Substrate dependent? |
| <i>NAT2*11A</i> | 481C>T (rs1799929) | L161L (synonymous) | Rapid |
| <i>NAT2*11B</i> | 481C>T (rs1799929) Δ ⁸⁵⁹ | L161L (synonymous) S287 Frameshift | |
| <i>NAT2*12A</i> | 803A>G (rs1208) | K268R | Rapid |
| <i>NAT2*12B</i> | 282C>T (rs1041983) 803A>G (rs1208) | Y94Y (synonymous) K268R | Rapid |
| <i>NAT2*12C</i> | 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) | L161L (synonymous) K268R | Rapid |
| <i>NAT2*12D</i> | 364G>A (rs4986996) 803A>G (rs1208) | D122N K268R | Slow |
| <i>NAT2*12E</i> | 282C>T (rs1041983) 578C>T (rs79050330) 803A>G (rs1208) | Y94Y (synonymous) T193M K268R | |
| <i>NAT2*12F</i> | 622T>C (rs56387565) 803A>G (rs1208) | Y208H K268R | |
| <i>NAT2*12G</i> | 609G>T (rs45618543) 803A>G (rs1208) | E203D K268R | |
| <i>NAT2*12H</i> | 403C>G (rs12720065) 803A>G (rs1208) | L135V K268R | |
| <i>NAT2*12I</i> | 228C>T (rs72466459) 803A>G (rs1208) | Y76Y (synonymous) K268R | |
| <i>NAT2*12J</i> | 29T>C (rs72466456) 803A>G (rs1208) | I10T K268R | |
| <i>NAT2*12K^f</i> | 472A>C (rs139351995) 803A>G (rs1208) | I158L K268R | |

ANNEXE 2

| | | | |
|-----------------------------|---|--|-------|
| <i>NAT2*12L^f</i> | 665T>G 803A>G (rs1208) | F222C K268R | |
| <i>NAT2*12M^f</i> | 282C>T (rs1041983) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) | Y94Y (synonymous) L161L (synonymous) K268R | |
| <i>NAT2*12N^f</i> | 121A>T (rs149283608) 803A>G (rs1208) | N41Y K268R | |
| <i>NAT2*12O^f</i> | 29T>C (rs72466456) 609G>T (rs45618543) 803A>G (rs1208) | I10T E203D K268R | |
| <i>NAT2*12P^f</i> | 472A>C (rs139351995) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) | I158L L161L (synonymous) K268R | |
| <i>NAT2*13A</i> | 282C>T (rs1041983) | Y94Y (synonymous) | Rapid |
| <i>NAT2*13B</i> | 282C>T (rs1041983) 578C>T (rs79050330) | Y94Y (synonymous) T193M | |
| <i>NAT2*13C^f</i> | 282C>T (rs1041983) 665T>G | Y94Y (synonymous) F222C | |
| <i>NAT2*13D^f</i> | 282C>T (rs1041983) 766A>G (rs55700793) | Y94Y (synonymous) K256E | |
| <i>NAT2*13E^f</i> | 282C>T (rs1041983) 641C>T | Y94Y (synonymous) T214I | |
| <i>NAT2*13F^f</i> | 282C>T (rs1041983) 838G>A (rs56393504) | Y94Y (synonymous) V280M | |
| <i>NAT2*13G^f</i> | 282C>T (rs1041983) 472A>C (rs139351995) | Y94Y (synonymous) I158L | |
| <i>NAT2*14A</i> | 191G>A (rs1801279) | R64Q | Slow |
| <i>NAT2*14B</i> | 191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983) | R64Q Y94Y (synonymous) | Slow |
| <i>NAT2*14C</i> | 191G>A (rs1801279) 341T>C (rs1801280) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) | R64Q I114T L161L (synonymous) K268R | Slow |
| <i>NAT2*14D</i> | 191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983) 590G>A (rs1799930) | R64Q Y94Y (synonymous) R197Q | Slow |
| <i>NAT2*14E</i> | 191G>A (rs1801279) 803A>G (rs1208) | R64Q K268R | Slow |
| <i>NAT2*14F</i> | 191G>A (rs1801279) 341T>C (rs1801280) 803A>G (rs1208) | R64Q I114T K268R | Slow |
| <i>NAT2*14G</i> | 191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983) 803A>G (rs1208) | R64Q Y94Y (synonymous) K268R | Slow |
| <i>NAT2*14H</i> | 191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983) 683C>T (rs45518335) | R64Q Y94Y (synonymous) P228L | |
| <i>NAT2*14I</i> | 191G>A (rs1801279) 481C>T (rs1799929) 803A>G (rs1208) | R64Q L161L (synonymous) K268R | |
| <i>NAT2*14J^f</i> | 191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983) 633G>A | R64Q Y94Y (synonymous) T211T (synonymous) | |

ANNEXE 2

| | | | |
|-----------------------------|---|---|--------------|
| <i>NAT2*14K^f</i> | 191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983) 838G>A (rs56393504) | R64Q Y94Y (synonymous) V280M | |
| <i>NAT2*14L^f</i> | 7A>G (rs200893121) 191G>A (rs1801279) 282C>T (rs1041983) | I3V R64Q Y94Y (synonymous) | |
| <i>NAT2*17</i> | 434A>C (rs72554616) | Q145P | Slow |
| <i>NAT2*18</i> | 845A>C (rs56054745) | K282T | Rapid |
| <i>NAT2*19</i> | 190C>T (rs1805158) | R64W | Slow |
| <i>NAT2*20</i> | 600A>G (rs72466461) | E200E (synonymous) | |
| <i>NAT2*21</i> | 458C>T (rs72466460) | T153I | |
| <i>NAT2*22^f</i> | 609G>T (rs45618543) | E203D | |
| <i>NAT2*23^f</i> | 70T>A (rs45477599) | L24I | |
| <i>NAT2*24^f</i> | 403C>G (rs12720065) | L135V | |
| <i>NAT2*25^f</i> | 665T>G | F222C | |
| <i>NAT2*26^f</i> | 809T>C | I270T | |
| <i>NAT2*27^f</i> | 589C>T | R197Stop | |

ANNEXE 3

La classification de l'O.M.S. (proposée en 1981)

| | |
|---|---|
| Carcinomes | <u>Les carcinomes non infiltrants :</u> |
| -98 % des tumeurs malignes du sein | - Le carcinome intracanauxaire ou canauxaire in situ - Le carcinome lobulaire in situ |
| | <u>Les carcinomes infiltrants :</u> |
| | - Le carcinome canauxaire infiltrant - Le carcinome lobulaire infiltrant - Le carcinome mucineux - Le carcinome médullaire |
| Maladie de Paget du mamelon | - Une lésion dans laquelle de grandes cellules peu colorées apparaissent dans l'épiderme du mamelon |
| Autres tumeurs | - Tumeur phyllode - Sarcomes |

La classification TNM (proposée en 1997 et révisée en 2002)

| Tumeur primitive (T) | |
|---|--|
| (cT pour une classification clinique ou radiologique, pT pour une classification anatomopathologique) | |
| Tx | Détermination de la tumeur primitive impossible |
| T0 | Pas de signe de tumeur primitive (non palpable) |
| Tis | Carcinome in situ : carcinome intracanalair, ou carcinome lobulaire in situ, ou maladie de Paget du mamelon sans tumeur décelable |
| Tis (DCIS) | Carcinome canalaire in situ |
| Tis (LCIS) | Carcinome lobulaire in situ |
| Tis (Paget) | Maladie de Paget du mamelon sans tumeur décelable Note : une maladie de Paget avec tumeur décelable est à classer en fonction de la taille de la tumeur. |
| T1 | Tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension |
| T1mic | Micro-invasion ≤ 0,1 cm dans sa plus grande dimension (1) |
| T1a | Tumeur > 0,1 cm et ≤ 0,5 cm dans sa plus grande dimension |
| T1b | Tumeur > 0,5 cm et ≤ 1 cm dans sa plus grande dimension |
| T1c | Tumeur > 1 cm et ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension |
| T2 | Tumeur > 2 cm et ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension |
| T3 | Tumeur > 5 cm dans sa plus grande dimension |
| T4 | Tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique (a) ou à la peau (b) Note : la paroi thoracique comprend les côtes, les muscles intercostaux et grand dentelé, mais ne comprend pas le muscle pectoral |
| T4a | Extension à la paroi thoracique |
| T4b | Oedème y compris la « peau d'orange », ou ulcération cutanée du sein, ou nodules de perméation cutanés limités au même sein |
| T4c | A la fois 4a et 4b |
| T4d | Carcinome inflammatoire (2) |

(1) La **micro-invasion** est l'extension des cellules cancéreuses à travers la membrane basale dans les tissus adjacents sans former de foyer > 0,1 cm dans sa plus grande dimension. Lorsqu'il s'agit de multiples foyers de micro-invasion, on ne tient compte que du plus grand pour la classification. La présence de multiples foyers de micro-invasion doit être notée comme c'est le cas lors d'un carcinome invasif avec multiples foyers.

(2) Le **carcinome inflammatoire du sein** est caractérisé par une induration cutanée diffuse et tendue, à bord érysipéloïdes, habituellement sans tumeur palpable sous-jacente. Si la biopsie de la peau est négative et s'il n'y a pas de cancer primitif localisé mesurable, un carcinome inflammatoire clinique (T4d) est classé pTX sur le plan histopathologique. Une dépression cutanée, la rétraction du mamelon ou toute autre modification des téguments, à l'exception de celles retenues pour la catégorie T4, peuvent exister avec T1, T2 ou T3 sans influencer sur le classement.

Centre Hospitalo -Universitaire Mustapha Bacha -ALGER-

Service Oncologie (CPMC)

Professeur BOUZID K.

Lettre de consentement éclairé

Nom et Prénom du patient

N⁰ :

Je, soussigne, après les explications qui m'ont été fournies par le Docteur _____, Service Oncologie- CPMC - CHU Mustapha Bacha, consentir pleinement aux recherches biologiques qui seront effectuées sur échantillons sanguins.

Ces recherches ne seront utilisées que dans un but scientifique après accord du professeur Bouzid.

Signature

Attestation de consentement éclairé

Alger le

Nom et Prénom du témoin

N⁰ :

Je, soussigné, après les explications qui m'ont été fournies par la Doctorante Chelouti Hiba, Faculté des Sciences Biologiques U.S.T.H.B, consentir pleinement aux recherches biologiques qui seront effectuées sur échantillons sanguins.

Ces recherches ne seront menées que dans un but scientifique.

Signature

Centre Hospitalo -Universitaire Mustapha Bacha

Service Oncologie (CPMC)

Professeur Bouzid K.

**FICHE DE RENSEIGNEMENTS
pour prélèvements sanguins**

Le :

Nom :

Prénom :

Age :

N° :

Ménopause :

ATCD de cancer :

CDD (nodule) :

SD ou SG :

Chirurgie TC /MC :

Classification TNM :

Tumeur (ER+/ER-) :

Type histologique :

Her2 :

Cure :

Chimiothérapie :

Cure :

Hormonothérapie :

Métastase :

Consommation de viande rouge par :

Jour :

Semaine :

Mois :

Fumeurs passifs :

Nul :

Peu :

Beaucoup :

Origine des parents:

Localisation géographique :

Autres maladies :

Prise de médicaments :

Prise de multivitamines :

Prise de vitamines B12 :

Prise d'acide folique :

FICHE DE RENSEIGNEMENTS
pour prélèvements sanguins
(Témoins)

Nom Prénom :

Age :

N° :

Code labo :

Ménopause :

ATCD de cancer :

Autres maladies :

Consommation de viande rouge par :

 Jour :

 Semaine :

 Mois :

Fumeurs passifs :

 Nul :

 Peu :

 Beaucoup :

Origine des parents:

Localisation géographique :

Prise de médicaments :

Prise de multivitamines :

Prise de vitamines B12 :

Prise d'acide folique :

Background: Breast cancer is a major health problem. The aim of our work is to find an association between the genetic polymorphism of the enzyme NAT1 and MTHFR and the risk of breast cancer in an Algerian population and studying the impact of folate, vitamin B12 and homocysteine on breast cancer. On the other hand, to study the genetic polymorphism of the enzyme NAT2 in an Algerian population, in order to evaluate the susceptibility of the Algerian population to the arylamine compounds.

MATERIALS AND METHODS: Homocysteine, vitamin B12 and folate were measured in serum. Moreover, the study of the different polymorphisms of NAT1, NAT2 and MTHFR was carried out by PCR-RLFP.

RESULTS: Multivariable logistic regression detected folate as a risk factor for mammary cancer ($p = 0.0014$, OR = 1.160). No significant differences were found between the different polymorphisms of the NAT1 gene and the MTHFR C677T and the risk of breast cancer. In addition, our results show a significant difference between patients and controls in relation to red meat consumption ($p = 0.017$, OR = 5.337). As regards the NAT2 gene, the average of the expected slow acetylator phenotype was 53%.

CONCLUSION: Our results show that folate may be a risk factor for breast cancer in the Algerian population. In addition, our study also suggests the involvement of red meat as a risk factor for breast cancer in our population.

Key words: Breast cancer, Folate, Homocysteine, MTHFR, NAT1, NAT2, Red meat, Vitamin B12.

الخلفية: سرطان الثدي مشكلة صحية كبيرة. الهدف من عملنا هو إيجاد علاقة بين تعدد الأشكال الوراثية لأنزيم NAT1 و MTHFR وخطر الإصابة بسرطان الثدي لدى السكان الجزائريين ودراسة تأثير حمض الفوليك وفيتامين ب 12 و الهوموسيستين على سرطان الثدي. من ناحية أخرى، لدراسة تعدد الأشكال الوراثية لأنزيم NAT 2 في المجتمع الجزائري، من أجل تقييم قابلية السكان الجزائريين لمركبات الأريلامين.

المواد والطرق: تم قياس الهوموسستين والفيتامين ب 12 والفولات في مصل الدم. وعلاوة على ذلك، أجريت دراسة تعدد الأشكال الوراثية لأنزيم NAT1، NAT2 و MTHFR بطريقة RFLP.

النتائج: كشف الانحدار اللوجستي متعدد المتغيرات عن حمض الفوليك كعامل خطر لسرطان الثدي. لم يتم العثور على فروق ذات دلالة إحصائية بين تعدد الأشكال المختلفة للجين NAT1 و MTHFR C677T وخطر الإصابة بسرطان الثدي. وبالإضافة إلى ذلك، تظهر نتائجنا فرقا كبيرا بين المرضى والأصحاء فيما يتعلق باستهلاك اللحوم الحمراء. وفيما يتعلق بالجين NAT2، كان متوسط النمط الظاهري البطيء الأسييتلاتور المتوقع 53%.

الخلاصة: تظهر نتائجنا أن حمض الفوليك قد يكون عامل خطر لسرطان الثدي لدى السكان الجزائريين. وبالإضافة إلى ذلك، تقترح دراستنا أيضا مشاركة اللحوم الحمراء كعامل خطر لسرطان الثدي عند سكاننا.

الكلمات الدالة: سرطان الثدي، الفولات، الهوموسيستين، مثفر، نات 1، NAT2، اللحوم الحمراء، فيتامين ب 12.