

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

Université des Frères Mentouri Constantine1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre :104/D3C/2019

N° de série :11/BA/2019



Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle
Domaine : **Sciences de la Nature et de la Vie**
Option : **Génétique Moléculaire**

Présentée et soutenue par : **RIBOUH-ARRAS ASMA**

Intitulé :

**IMPLICATION DU POLYMORPHISME GÉNÉTIQUE
(NAT2 ET XPC) DANS LE CANCER DE LA VESSIE**

Membres du jury :

Président :

SATTA Dalila (Prof - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Directrice de thèse :

CHAOUI-KHEROUATOU Naouel (MCA- Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineurs :

BENDJMANA-KELLIL Katia (Prof-Université Abbes Laghrour, Khenchla).

REZGOUNE-CHELLAT Djalila (MCA- Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

DAHDOUH Abderrezak (Prof- Membre invité)

Année Universitaire 2019-2020

Table des matières

Remerciements et dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Listes des photographies

Introduction.....1

Partie bibliographique

1. La vessie	3
1.1. Embryologie de la vessie.....	3
1.2. Anatomie descriptive de la vessie	3
1.3. Histologie de la vessie	5
1.3.1. La muqueuse	5
1.3.2. Le plan musculaire	5
1.3.3. L'adventice.....	6
1.4. Physiologie de la vessie.....	6
2. Cancer de la vessie.....	8
2. 1. Epidémiologie du cancer de la vessie.....	8
2.1.1. Dans le monde.....	8
2.1.2. En Afrique.....	10
2.1.3. En Algérie	10
2.2. Facteurs de risque des cancers de vessie	11
2.2.1. Tabac	11
2.2.2. Exposition professionnelle	12
2.2.3. Facteurs infectieux	13
2.2.4. Facteurs alimentaires.....	14
2.2.5. Facteurs médicaux.....	15
2.2.6. Prédisposition génétique	15
2.3. Classification des cancers vésicaux.....	17
2.3.1. Classification histologique	17
2.3.2. Classification clinicopathologique	17
2.3.2.1. Stade.....	18
2.3.2.2. Grade.....	20
2.4. Symptômes, diagnostique et traitement.....	21
2.4.1. Symptômes.....	21

2.4.2. Diagnostic	22
2.4.3. Traitement	23
2.5. Les voies de progression tumorales.....	24
2.5.1. Les tumeurs de la voie dite « Ta »	24
2.5.2. Les tumeurs de la voie dite « des carcinomes <i>in situ</i> »	25
3. Bases de l'oncogénèse dans le cancer de la vessie	26
3.1. Oncogènes	26
3.1.1. Gène <i>FGFR3</i>	26
3.1.2. Locus c-ha-ras-1 : <i>H-RAS</i>	27
3.1.3. EGFR et ses ligands	28
3.1.4. Gène <i>PI3K</i>	28
3.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs	29
3.2.1. Gène <i>P53</i>	29
3.2.2. Gène <i>RB</i>	30
3.2.3. Gène <i>PTEN</i>	30
3.3. Profil cytogénétique des tumeurs vésicales.....	30
3.4. Altérations épigénétiques	34
3. 5. Gènes d'intérêts.....	34
3.5.1. Gènes de détoxification : les N-acétyltransférases.....	34
3.5.1.1. Mécanisme de détoxification.....	34
3.5.1.2. <i>NAT2</i> Gène et enzyme.....	36
3.5.2. Gène de réparation de l'ADN : Xeroderma pigmentosum complementation groupe C (<i>XPC</i>)	39
3.5.2.1. Mécanisme de réparation par NER.....	39
3.5.2.2. <i>XPC</i> gène et enzyme.....	41

Patients et méthodes

1. Population d'étude.....	44
1.1. Groupe des patients	44
1.2. Groupe des témoins	44
2. Etude épidémiologique	44
3. Etude moléculaire	45
3.1. Extraction de l'ADN génomique.....	45
3.1.1. Principe	45
3.1.2. Contrôle de qualité de l'ADN et estimation de sa concentration.....	45

3.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)-Séquençage du gène <i>NAT2</i>	46
3.2.1. Principe du séquençage	46
3.2.2. Mode opératoire	47
3.2.2.1. Amplification par PCR du fragment à séquencer	47
3.2.2.2. Contrôle des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose.....	48
3.2.2.3. Purification enzymatique des amplicons	49
3.2.2.4. PCR séquence ou marquage des fragments purifiés.....	49
3.2.2.5. Purification des produits de la PCR séquence	50
3.2.2.6. Séquençage sur automate et analyse des résultats.....	50
3.3. Génotypage du gène <i>XPC</i> par technique des sondes TaqMan	52
3.3.1. Principe de la technique	52
3.3.2. Mode opératoire	54
3.3.3. Analyse des résultats	55
4. Etude statistique.....	55

Résultats et discussion

1. Caractéristiques générales de la population d'étude.....	56
1.1. Répartition des sujets selon le sexe	57
1.2. Répartition des sujets selon la tranche d'âge.....	59
1.3. Répartition des sujets selon le statut tabagique	60
1.4. Répartition des sujets selon l'exposition aux facteurs professionnels.....	62
1.5. Répartition des sujets selon le statut clinicopathologique	67
2. Séquençage du gène <i>NAT2</i>	69
2.1. Fréquences génotypiques et alléliques des variants du gène <i>NAT2</i> et leurs association au risque du cancer de la vessie	70
2.2. Fréquences des génotypes <i>NAT2</i> , de leurs phénotypes correspondants et leurs associations au risque du cancer de la vessie.....	74
2.3. Distribution alléliques et génotypiques des polymorphismes du gène <i>NAT2</i> selon l'âge.....	79
2.4. Distribution du profil d'acétylation du gène <i>NAT2</i> selon l'âge.....	82
2.5. Combinaison polymorphismes du gène <i>NAT2</i> -tabac et association au cancer de la vessie	83
2.6. Association entre le phénotype d'acétylation du gène <i>NAT2</i> , le statut tabagique et le cancer de la vessie.....	86
2.7. Combinaison polymorphismes du gène <i>NAT2</i> -profession et association au cancer de la vessie	87
2.8. Association entre le phénotype d'acétylation du gène <i>NAT2</i> , le risque professionnel et le cancer de la vessie.....	88

2.9. Association entre polymorphismes T341C et G590A du gène <i>NAT2</i> et paramètres clinico-pathologiques.....	90
3. Génotypage du polymorphisme rs2228001 du gène <i>XPC</i>	91
3.1. Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme rs2228001 du gène <i>XPC</i> et leurs association au cancer de la vessie.....	94
3.2. Distribution des génotypes du polymorphisme rs2228001 selon la tranche d'âge.....	95
3.3. Combinaison SNP rs2228001-tabac et leurs associations au cancer de la vessie.....	96
3.4. Combinaison SNP rs2228001-risque professionnel et association au cancer de la vessie.....	98
3.5. Interaction entre le polymorphisme rs2228001 et les paramètres clinico-pathologiques.....	99
Conclusion et Perspectives	100
Références Bibliographiques	103
Annexes	
Publications	
Résumés	

Remerciements

Je remercie le Bon Dieu, tout puissant qui nous a aidé et nous a donné patience et, courage pour réaliser ce modeste travail.

Remerciements

La première personne que je tiens à remercier est ma directrice de thèse **Dr. CHAOUI-KHEROUATOU N**, Maître de conférences A à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral. Je lui suis reconnaissante pour sa disponibilité, ses précieux conseils, son orientation, sa sympathie, sa patience, ses recommandations, et ses qualités scientifiques qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines, à sa rigueur, à son professionnalisme et à son ouverture d'esprit. Je suis honorée que ma thèse soit sous sa direction. Aucune expression de gratitude ne sera suffisante pour vous exprimer mon respect et ma reconnaissance.

J'adresse mes remerciements les plus respectueux aux membres du jury pour le grand honneur qu'ils me font en acceptant d'examiner cette thèse :

Tout d'abord j'adresse mes vifs remerciements au **Pr. SATTI D**, responsable de la filière « Génétique moléculaire » à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour sa générosité, sa bonté, son suivi, son dévouement et encouragements durant la réalisation de ce travail. Je la remercie également pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Assurée de l'intérêt que vous portez à ce travail, je reste convaincue que votre présence m'assurera de la valorisation et de la teneur de notre projet. Veuillez croire en mon éternel respect et ma sincère gratitude.

Je voudrais aussi remercier **Pr. BENDJMANA-KELLIL K**, Professeur à l'Université Abbes Laghrour, Khenchla, d'avoir accepté avec une grande amabilité de faire partie de ce jury pour examiner cette thèse et pour m'avoir fait l'honneur de siéger dans mon jury de soutenance. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance et de ma considération respectueuse.

J'adresse mes plus sincères remerciements au **Dr. REZGOUNE-CHELLAT D**, Maître de conférences A à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ce travail et de l'enrichir de ses éminentes compétences scientifiques. Soyez assurée de ma respectueuse gratitude.

Mes remerciements vont également au **Pr. DAHDOUH A**, Médecin professeur à la clinique Rénal Daksi de Constantine. Je le remercie vivement pour son accueil au sein du service d'urologie, qui m'a ainsi permis de réaliser ce modeste travail. Merci de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail de thèse en acceptant de participer à ce jury. Veuillez accepter Monsieur le témoignage de ma reconnaissance et de mon respectueux hommage.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce modeste travail en particulier **Dr. HIRECHE A** pour l'aide précieuse et incomparable qu'il m'a prodigué, veuillez trouver ici l'expression de mon immense gratitude et ma profonde estime.

Je remercie également, tout le personnel du Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire de l'université Constantine 3, en particulier **Pr ABADI N** et **Mme DADCI.Y**, ainsi que tout le personnel du Laboratoire de Biologie

Moléculaire et Cellulaire de l'Université Constantine 1, en particulier, **Mme BELAHRECHE H**, notre adorable Ingénieur du Laboratoire pour sa présence, sa disponibilité, et son soutien durant la réalisation de ce travail.

Je remercie chaleureusement tout le personnel de la clinique Rénal Daksi de Constantine en particulier **Pr. DJAGHRI.T** pour m'avoir ouvert les portes du service d'Urologie. Merci aussi à tout le personnel du service d'Urologie du CHU de Tizi-Ouzou en particulier **Pr. BELASLA N** pour leur implication très positive.

Ce travail est le résultat d'une collaboration avec le laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Institut Curie, Paris (France). Je tiens à remercier vivement mon directeur de stage, **Pr. RADVANYI F**, pour m'avoir accepté dans son équipe, pour sa générosité, son aide, sa gentillesse, et sa disponibilité continue. Malgré toutes ses charges professionnelles, merci d'avoir toujours trouvé un moment pour discuter quand je frappais à votre porte. Votre patience, votre soutien et vos conseils m'ont été d'une grande aide. Soyez assuré de ma profonde gratitude et de ma plus grande estime.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire d'Oncologie Moléculaire de l'institut Curie de Paris. Des gens formidables avec lesquelles j'ai passé deux mois inoubliables, j'ai beaucoup appris avec eux sur le plan scientifique. Je remercie tout particulièrement **Daniella** avec qui j'ai passé la plupart de mes journées, sans oublier **Céline et Clémentine**, qui m'ont énormément aidé sur le plan pratique.

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

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur, et ma réussite, à ma mère qui a toujours été pour moi l'exemple d'une mère respectueuse et honnête, je tiens à honorer la femme que tu es. Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours.

À mon père, qui a été présent durant toutes les années de mes études, et qui a veillé tout au long de ma vie à me donner de l'aide et à me protéger. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, et ta compréhension. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'estime et le respect que j'ai toujours pour toi.

Que Dieu vous procure santé, bonheur et longue vie.

À mon mari, pour son amour, sa patience, ses encouragements constants, son soutien et son incitation à poursuivre mon rêve. Cher mari j'aimerais bien que tu trouves dans ce travail l'expression de mes sentiments de reconnaissance les plus sincères car grâce à ton aide et à ta patience avec moi que ce travail a pu voir le jour. Merci d'avoir toujours été à mes côtés.

À mon petit cœur d'amour Loudjeine, qui m'a donné toute la puissance à pouvoir terminer ce travail avec son simple sourire angélique. C'est à toi mon petit trésor que maman dédie ce travail pour te dire que tu resteras pour toujours le rayon du soleil qui égaye ma vie. Que Dieu tout puissant te protège et te guide dans la bonne voie.

À mon cher frère Sofheib, tous les mots ne sauraient exprimer ma gratitude, mon amour et ma reconnaissance pour l'aide que tu m'as apporté. Tu m'as soutenu, réconforté et encouragé. Puissent nos liens fraternels se consolider et se pérenniser encore plus.

À mon adorable Sœur Oumaima, Merci pour ta présence, ton soutien, ta bonne humeur et tous les moments agréables passés avec toi sœurlette. Je voudrais t'exprimer à travers ces quelques lignes tout l'amour et toute l'affection que j'ai pour toi.

À toutes mes fidèles amis

À tout ceux qui m'aiment et ceux que j'aime

Asma

Liste des abréviations

- AcétylCoA** : Acétylcoenzyme A.
- AJCC** : l'American Joint Committee on Cancer.
- AR** : Androgènes Receptor : récepteur aux androgènes.
- BET** : Bromure d'ETHidium.
- BUB1** : Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1.
- CIN** : instabilité chromosomique.
- CIRC** : Centre International de Recherche sur le Cancer.
- CSA** : Cockayne syndrome A.
- CSB** : Cockayne syndrome B.
- DBCCR1**: Deleted in Bladder Cancer Chromosome Region 1.
- ddNTP** : di-désoxyribo-Nucléotide Tri-Phosphates.
- dNTP** : désoxyribo-Nucléotide Tri-Phosphates.
- DO** : Densité Optique.
- ECBU** : Examen Cytobactériologique d'Urine.
- EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétracétique.
- EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor.
- ERBB2** : Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase.
- ERCC1** : Excision Repair Cross Complementation group 1.
- EDTA** : Ethylène Diamine Tetra-Acetic.
- FGFR3** : Fibroblast Growth Factor Receptor-3.
- FINJEM** : FINish Job-Exposure Matrix.
- FRET** : Fluorescence Resonance Energy Transfer.
- GG-NER** : Global Genome-NER.
- GSTM1** : Glutathion S-Transférase mu 1.
- GSTT1** : Glutathion S-Transférase theta 1.
- HAP** : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.
- hHR23B** : Rad23 homolog B
- H-RAS** : Harvery rat sarcoma viral oncogene homolog.
- IARC** : International Agency for Research on Cancer
- IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique.
- KDM6A** : Lysine Déméthylase 6A.
- MGB**: Minor Grove Binder.

MTHFR : Méthylène Tetra-Hydro-Folate Reductase.

NaCl : Chlorure de Sodium.

NATs : N- Acétyltransférases.

NAT1 : N-Acétyltransférase 1.

NAT2 : N-Acétyltransférase 2.

NER : Nucléotide- Excision Repair.

OMS : Organisation Mondiale de Santé.

OR : Odds Ratio.

P53 : Tumor Protein 53.

PCR : Polymerase Chain Reaction : amplification en chaîne par polymérase.

PI3K : phosphoinositide tri-phosphate 3 kinase.

PTCH : Patched gene.

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog.

QPCR : PCR Quantitative.

RB: rétinoblastome.

RT-PCR : Real Time PCR.

RTUV : Résection transurétrale de la vessie.

SAP : Shrimp Alcaline Phosphatase.

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate.

SNP : Single Nucleotide Polymorphism.

TACC3 : Transforming Acidic Coiled-coil-Containing protein 3.

TBE1X : Tampon Tris-Borate-EDTA.

TCGA : The Cancer Genome Atlas.

TC-NER : Transcription-Coupled-NER.

TNM :(classification) Tumor, Node, Metastasis : tumeur, ganglion, métastases.

TSA : Trial Sequential Analysis.

TSC1 : Tuberous Sclerosis 1.

TSC2 : Tuberous Sclerosis 2.

TVIM : Tumeur Vésicale Infiltrant le Muscle.

TVNIM : Tumeur Vésicale Non Infiltrant le Muscle.

UICC : Union Internationale Contre le Cancer.

UGT1A : UDP-glucuronyltransferase 1A

UTX : Ubiquitously Transcribed X Chromosome.

WHO : World Health Organisation : organisation mondiale de santé.

XPC : Xeroderma Pigmentosum group C.

XRCC1 : X-Ray Repair Cross Complementing 1.

XRCC3 : X-Ray Repair Cross Complementing 3.

XRCC6 : X-Ray Repair Cross Complementing 6.

XRCC7 : X-Ray Repair Cross Complementing 7.

Listes des figures

Figure 1 : Anatomie de l'appareil urinaire chez l'homme (gauche) et chez la femme (droite)	4
Figure 2 : Coupe frontale de la vessie - vue antérieur	5
Figure 3 : Schéma montrant les différentes couches de la paroi de la vessie	6
Figure 4 : Incidence et mortalité du cancer de la vessie chez l'homme dans le monde	9
Figure 5 : Taux standardisés d'incidence par cancer vésical dans le monde.....	10
Figure 6 : Représentation de la classification des tumeurs de vessie.....	19
Figure 7 : les voies de progression des tumeurs vésicales	25
Figure 8 : Fréquence relative et position des mutations de FGFR3 dans les cancers de la vessie.....	27
Figure 9 : Voie MAPK/PI3K dans les cancers de la vessie	29
Figure 10 : Chromosome 9 et ses régions délétées	31
Figure 11 : Récapitulatif des anomalies chromosomiques dans les carcinomes de vessie.....	32
Figure 12 : Activation et inactivation des arylamines par N-acétylation, O-acétylation, et N-, O-acétylation catalysées par la NAT2.	35
Figure 13 : Localisation et structure du gène <i>NAT2</i>	36
Figure 14 : Structure tridimensionnelle de la NAT2 humaine :.....	38
Figure 15 : Mécanisme de réparation par excision de nucléotides (NER).....	41
Figure 16 : Structure et localisation du gène <i>XPC</i>	42
Figure 17 : Domaines d'interaction entre l' <i>XPC</i> et l'ADN ou ses partenaires protéiques.	43
Figure 18 : Schématisation d'un résultat de séquençage après traitement informatique.....	51
Figure 19 : Représentation de la même amplification par PCR.....	52
Figure 20 : Principe de la technique des sondes TaqMan.....	53
Figure 21 : Répartition des sujets selon le sexe.	57
Figure 22 : Répartition des sujets selon la tranche d'âge.....	59
Figure 23 : Répartition des sujets selon le statut tabagique.	60
Figure 24 : Répartition des sujets selon l'exposition aux facteurs professionnels.	62
Figure 25 : Répartition des sujets selon le statut clinicopathologique.....	67
Figure 25a : Répartition selon le stade tumoral.....	67
Figure 25b : Répartition selon le grade tumoral.....	67
Figure 26 : Profil de séquençage d'un homozygote muté (a), d'un homozygote sauvage (b) et d'un hétérozygote (c) du polymorphisme rs2228001 du gène <i>XPC</i>	92
Figure 27 : Profil d'amplification par QPCR analysé par le logiciel LightCycler 480 de l'SNP rs2228001 .	92
Figure 28 : Profil d'amplification par QPCR analysé par le logiciel LightCycler 480 de l'SNP rs2228001 pour les quatre plaques des patients et témoins	93

Liste des tableaux

Tableau 1 : Cancérogènes vésicaux classés par le CIRC.	13
Tableau 2 : Classification TNM 2010 du cancer de la vessie.....	18- 19
Tableau 3 : Equivalence entre les classifications OMS 1973 et OMS 2004	20
Tableau 4 : Amorces utilisées pour l'amplification du gène <i>NAT2</i>	47
Tableau 5 : Milieu réactionnel pour l'amplification du gène <i>NAT2</i>	48
Tableau 6 : Conditions optimisées du programme PCR de la <i>NAT2</i>	48
Tableau 7 : Les compositions d'un mix réactionnel d'un volume final de 10 µl et le programme d'amplification de la PCR séquence.	50
Tableau 8 : Milieu réactionnel pour l'amplification de l'exon 15 du gène <i>XPC</i>	54
Tableau 9 : Conditions optimisées de la qPCR de l'exon 15 du gène <i>XPC</i>	55
Tableau 10 : Caractéristiques générales de la population d'étude.....	57
Tableau 11 : Répartition des patients et des témoins selon la profession.	63
Tableau 12 : Fréquences génotypiques et alléliques des polymorphismes du gène <i>NAT2</i> et leur association au risque de cancer de la vessie	70- 71- 72
Tableau 13 : Nature des allèles du gène <i>NAT2</i> identifiés au sein de notre étude.	75
Tableau 14 : Fréquences génotypiques et phénotypiques du gène <i>NAT2</i> et leur association au cancer de la vessie.....	76
Tableau 15 : Les fréquences alléliques du gène <i>NAT2</i> dans la population algérienne et d'autres groupes ethniques.	78
Tableau 16 : Association des SNPs du gène <i>NAT2</i> avec l'âge de la population d'étude.	79- 80
Tableau 17 : Distribution du profil d'acétylation du gène <i>NAT2</i> selon l'âge.	82
Tableau 18 : Stratification des patients et des témoins selon les polymorphismes <i>NAT2</i> et statut tabagique.....	83- 84
Tableau 19 : Stratification des patients et des témoins selon les phénotypes d'acétylation <i>NAT2</i> et statut tabagique.	86
Tableau 20 : Stratification des patients et des témoins selon les polymorphismes <i>NAT2</i> et occupation professionnelle.	87
Tableau 21 : Stratification des patients et des témoins selon les phénotypes acétyleurs <i>NAT2</i> et occupation professionnelle.	88
Tableau 22 : Association des SNP T341 et G590A du gène <i>NAT2</i> avec le stade et le grade tumoral.	90
Tableau 23 : Résultat du génotypage du polymorphisme rs2228001 du gène <i>XPC</i> par séquençage.	92
Tableau 24 : Fréquences génotypiques et alléliques de l'SNP rs2228001 au sein de la population d'étude.	94
Tableau 25 : Distribution des génotypes de l'SNP rs2228001 selon la tranche d'âge.	95
Tableau 26 : Stratification des patients et des témoins selon les génotypes de l'SNP rs2228001 et le statut tabagique.....	97

Tableau 27 : Stratification des patients et des témoins selon les géotypes rs2228001 et le risque professionnel.....	98
Tableau 28 : Stratification des patients et des témoins selon les géotypes de l'SNP rs2228001 et le stade et/ou le grade tumoral	99

Liste des photographies

Photographie 1 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des fragments amplifiés par PCR.....	49
Photographie 2 : Profil d'amplification de l'exon 2 du gène <i>NAT2</i>	69

Introduction

Le cancer est un processus physiologique, dans lequel les cellules cancéreuses acquièrent ou perdent des spécificités qui favorisent l'invasivité, la prolifération et la résistance au traitement. C'est une maladie qui représente un problème de santé publique majeur, à l'origine de plus de 18 millions de nouveaux cas enregistrés en 2018 à travers le monde et de 9,6 millions de décès (**Bray *et al.*, 2018**).

Le cancer de la vessie est l'un des cancers les plus malveillants du monde. Il occupe le 10^{ème} rang au niveau mondial des cancers par ordre de fréquence. En Algérie, il représente la 5^{ème} cause de décès par cancers et la deuxième maladie maligne d'origine génito-urinaire chez l'homme après le cancer de la prostate (**Bray *et al.*, 2018**).

Le tabagisme et l'exposition professionnelle aux amines aromatiques sont les facteurs de risque les plus incriminés dans cette étiologie (**Freedman *et al.*, 2011; Chu *et al.*, 2013**), mais d'autres facteurs liés au mode de vie, environnementaux et génétiques ont également été impliqués, suggérant une susceptibilité individuelle à la carcinogenèse vésicale (**Cohen *et al.*, 2000; Chu *et al.*, 2013**).

Parmi les facteurs les plus importants qui peuvent initier le processus de tumorigénèse : le métabolisme limité des xénobiotiques et la défaillance des systèmes de réparation de l'ADN. En effet, les voies de biotransformation aboutissent normalement, après une exposition à un xénobiotique, à la formation de métabolites faciles à éliminer. Cependant le métabolisme limité pendant la phase I et II de détoxification augmente les concentrations des xénobiotiques favorisant leur liaison à l'ADN en formant un complexe physique connu sous le nom d'adduits pouvant produire des mutations et initier ainsi le processus cancéreux (**Hanahan & Weinberg, 2011**). Ainsi, certains procarcinogènes chimiques pourront être à l'origine de tumeurs dans les tissus cibles excrétoires comme la vessie, en particulier dans le cas de défaillance dans les mécanismes de détoxification qui peut être causé par des altérations sur plusieurs gènes comme le gène du cytochrome *P450* impliqué dans la phase I et les gènes de la famille N -Acétyltransférases (*NAT*) et de la famille Glutathion S-Transférases (*GST*) impliqués dans la phase II de détoxification. Par ailleurs, le risque de carcinogenèse vésicale suite à la formation d'adduits se trouve d'avantage augmenté si la personne présente en plus des défaillances au niveau des systèmes de réparation notamment le système de réparation par excision de nucléotides NER (de l'anglais Nucleotide Excision Repair).

Dans ce contexte, notre travail vise à réaliser une étude cas-témoins sur des patients atteints de cancers vésicaux et des témoins sains par l'analyse génétique et statistique de plusieurs polymorphismes impliqués dans ces deux voies. Il est à noter, que ce type de cancer reste peu étudié sur le plan moléculaire en Algérie.

Après une recherche bibliographique rigoureuse, nous nous sommes assigné les objectifs suivants :

- l'exploration moléculaire des différents SNPs du gène N-acétyltransférase de type II (*NAT2*) dans notre population d'étude par séquençage ;
- l'évaluation de l'association entre les polymorphismes *NAT2*, leurs phénotypes acétylateur correspondants et le risque du cancer vésical ;
- le génotypage du polymorphisme rs2228001 du gène Xeroderma pigmentosum complementation group C (*XPC*) par discrimination allélique TaqMan ;
- la recherche d'une éventuelle association entre le polymorphisme étudié du gène *XPC* et le risque de ce type de cancer ;
- la prospection de l'interaction de ces variations entre elles et avec les facteurs environnementaux tels le tabac et le risque professionnel ;
- la détermination des fréquences des variations étudiées dans notre population générale et leurs comparaisons à celles rapportées par la littérature.

Partie bibliographique

1. La vessie

1.1. Embryologie de la vessie

Le développement de la vessie débute entre la quatrième et la septième semaine de la vie embryonnaire, à partir du cloaque. Embryologiquement la vessie est formée de deux parties. L'une plus développée d'origine allantoïdienne (provenant de la formation du périnée secondaire et amenant à la division du cloaque à la septième semaine en deux parties entièrement distinctes : le canal ano-rectal en arrière et le sinus uro-génital en avant d'où naîtra la vessie) avec un revêtement entoblastique qui formera la muqueuse vésicale ; l'autre, moins développée : le trigone vésical provenant des canaux de Wolff avec un revêtement mésoblastique. Ce dernier est provisoire ; progressivement, il est remplacé par l'épithélium entoblastique d'origine vésicale, qui migre et vient le recouvrir, si bien qu'en définitive le revêtement du trigone est aussi entoblastique. Ainsi la vessie a une même origine embryonnaire que l'intestin. Ce qui explique que l'on puisse utiliser l'intestin comme matériel de plastie en cas de cystectomie totale (**Poirier *et al.*, 2005 ; Larsen *et al.*, 2011**).

1.2. Anatomie descriptive de la vessie

La vessie est un réservoir musculo-membraneux, dans lequel l'urine s'accumule entre les mictions. C'est un organe creux et extensible, situé dans la cavité pelvienne derrière la symphyse pubienne. Elle est maintenue en place par des replis du péritoine et sa forme dépend de la quantité d'urine qu'elle contient. Quand elle est légèrement distendue à cause de l'accumulation d'urine, elle est sphérique ; lorsqu'elle est vide elle s'affaisse tout en présentant à la coupe une forme grossièrement triangulaire, aplatie de haut en bas et d'avant en arrière, on lui décrit : trois faces, trois bords et trois angles. Au fur et à mesure que le volume d'urine augmente, sa forme rappelle de plus en plus celle d'une poire et elle remonte dans la cavité abdominale (**Netter, 2004 ; Lacombe *et al.*, 2006 ; Tortora & Derrickson, 2007**).

Chez l'homme, elle repose sur la prostate qui la sépare du plancher pelvien. Délimité en bas par les vésicules séminales et en arrière par le rectum, alors que chez la femme, elle repose en avant de l'utérus et du vagin, au-dessus du plancher pelvien (**Tortora & Derrickson, 2007**) (Figure 1).

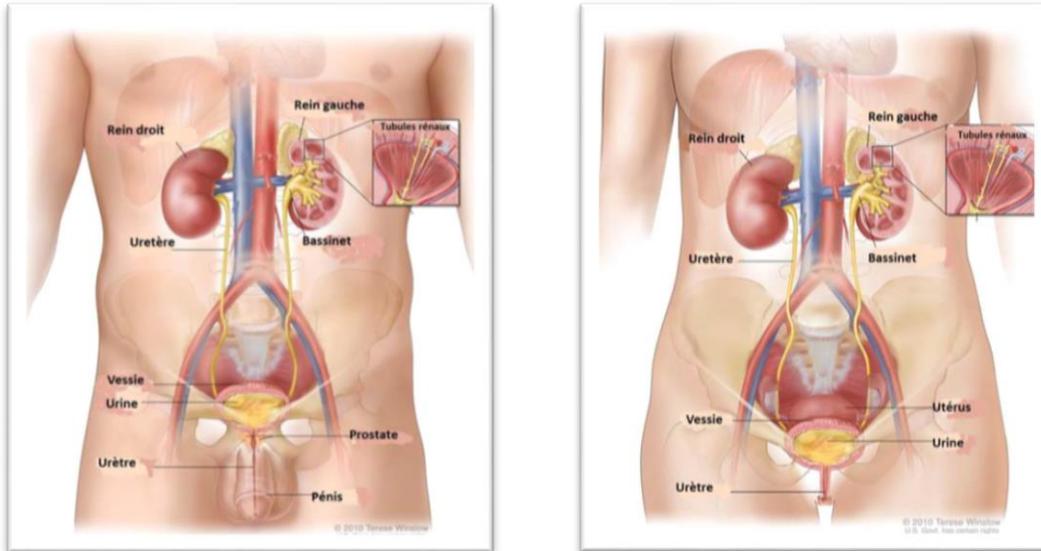


Figure 1 : Anatomie de l'appareil urinaire chez l'homme (gauche) et chez la femme (droite) (**Bourillon et al., 2003**).

Dans le plancher de la vessie se trouve une petite région triangulaire appelée **trigone vésical** d'où le trigone de Lieutaud. Les deux sommets postérieurs du trigone contiennent les ostiums des uretères (ouvertures par lesquelles l'urine s'écoule des uretères à la vessie) et le sommet antérieur contient l'ostium interne de l'urètre (ouverture par laquelle l'urine s'écoule de la vessie à l'urètre (Figure 2). Le trigone présente une surface lisse parce que sa muqueuse est solidement attachée à la musculuse (**Tortora & Derrickson, 2007**).

Le trigone est important au point de vue clinique, car les infections tendent à y persister (**Bourillon et al., 2003**).

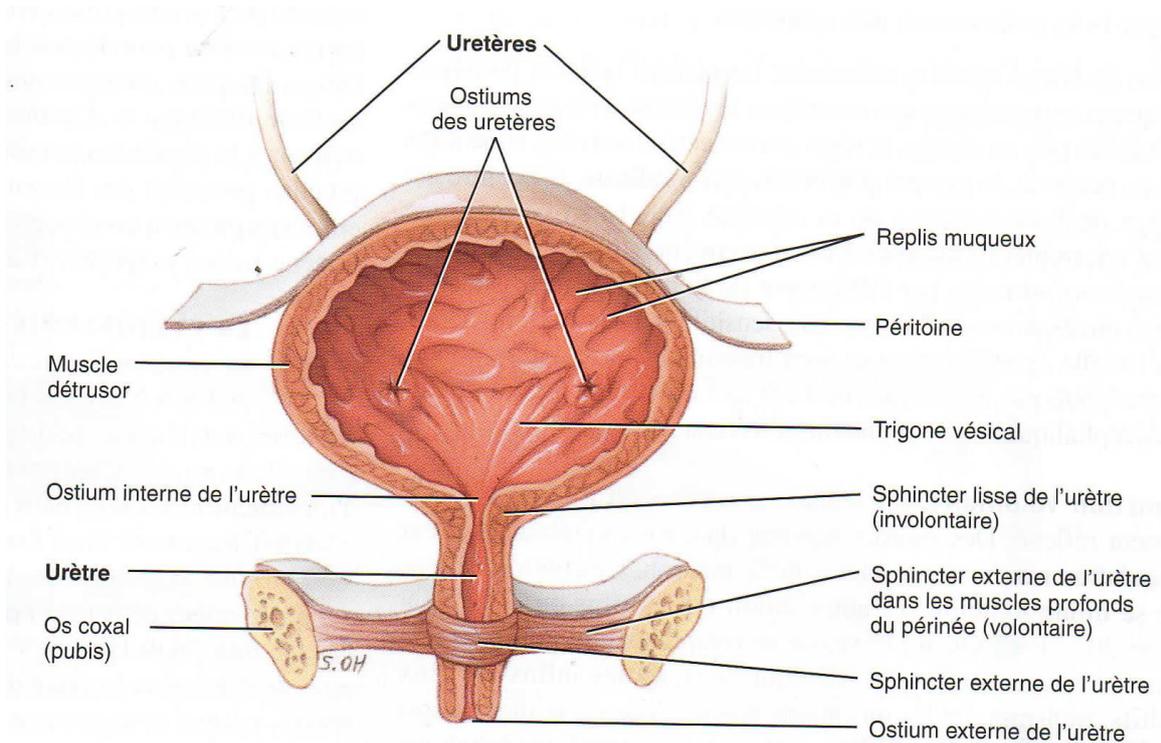


Figure 2 : Coupe frontale de la vessie - vue antérieure (Tortora & Derrickson, 2007).

1.3. Histologie de la vessie

La paroi vésicale est constituée de trois principales couches de tissus : La muqueuse, le plan musculaire, et l'adventice couvert par la séreuse à la partie supérieure de la vessie (Billerey & Sibony, 2001) (Figure 3).

1.3.1. La muqueuse

Elle est composée d'un épithélium transitionnel et d'un chorion sous-jacent. Elle est semblable à celle des uretères et présente aussi des replis muqueux qui permettent la dilatation de la vessie.

L'épithélium vésical est appelé urothélium: c'est un épithélium pseudo-stratifié, constitué de plusieurs assises cellulaires, dont le nombre varie de 3 à 7 selon que la vessie est vide ou distendue. Il repose sur une membrane basale très mince qui recouvre le chorion ou lamina propria. Cette dernière est composée d'une lame de tissu conjonctif qui tapisse le plan musculaire sous-jacent. Elle est très mince au niveau du trigone et du col et plus épaisse au pourtour des orifices urétéraux et sur le dôme (Wheater *et al.*, 2001 ; Sherwood, 2015).

1.3.2. Le plan musculaire

La couche qui enveloppe la muqueuse est la musculature intermédiaire, aussi appelé muscle détrusor (detrudere : pousser violement) ou encore muscle vésical. La musculature est composée de trois couches de

myocytes lisses : une couche longitudinal interne, une couche circulaire moyenne et une couche longitudinal externe. Autour de l'ostium de l'urètre, les myocytes lisses de la couche circulaire forment le sphincter lisse de l'urètre (muscle involontaire) ; au-dessous se trouve le sphincter externe de l'urètre (muscle volontaire), qui est composé de fibres musculaires striées du plancher du bassin (**Tortora & Derrickson, 2007 ; Nguyen et al., 2008**).

1.3.3. L'adventice

Elle est composée de tissus adipeux, elle couvre le plan musculaire et est tapissée d'un revêtement mésothélial au niveau de la calotte vésicale (**Nguyen et al., 2008**).

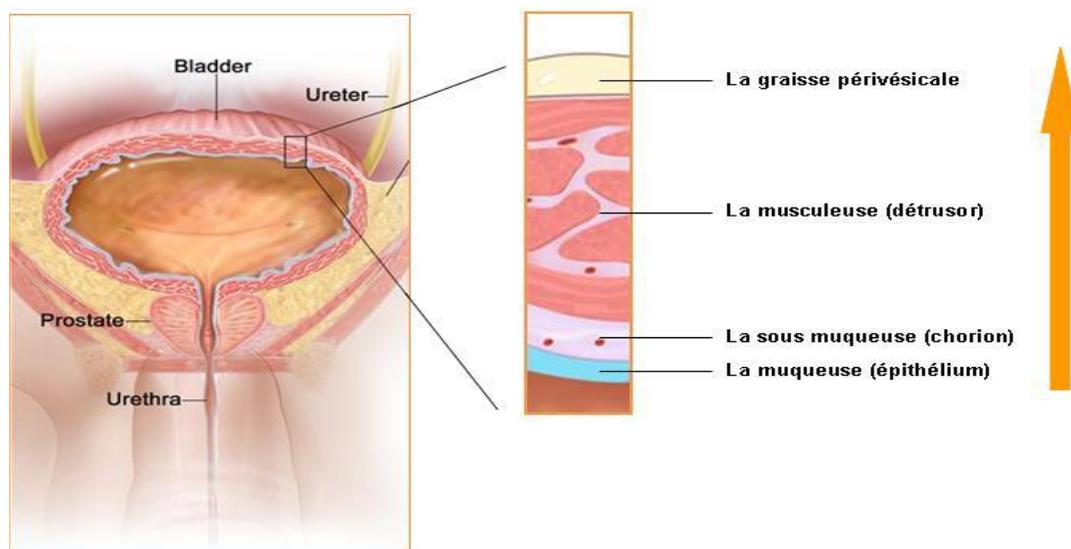


Figure 3 : Schéma montrant les différentes couches de la paroi de la vessie (**Nguyen et al., 2008**).

1.4. Physiologie de la vessie

La capacité physiologique moyenne de la vessie est d'environ 350 ml. Cette capacité moyenne correspond à un besoin pressant d'uriner. En dessous, (à 200 ml) la sensation de réplétion vésicale est réelle et entraîne un besoin moins pressant. Au-dessus de 500 ml, le besoin est alors franchement douloureux. Il est à noter que la capacité maximum de la vessie dans certains états pathologiques peut dépasser trois litres (**Lacombe et al., 2006**).

La vessie assure une double fonction : elle assure alternativement la continence urinaire et la miction (**Netter, 2004**).

Durant la phase de continence, la vessie se laisse progressivement distendre par l'urine sécrétée par le rein. Durant cette phase, les sphincters de l'urètre sont fermés et assurent l'étanchéité de l'ensemble et l'absence de contraction vésicale involontaire. Lorsque le remplissage de la vessie est terminé, on ressent le besoin d'uriner (**Brooker *et al.*, 2000 ; Pan *et al.*, 2012**).

La miction est déclenchée volontairement par l'augmentation de la pression intra-vésicale, produisant ainsi une sensation de distension. Durant cette phase, il se produit une diminution des résistances sphinctériennes, une contraction vésicale avec émission du jet urinaire (**Brooker *et al.*, 2000 ; Pan *et al.*, 2012**).

2. Cancer de la vessie

2. 1. Epidémiologie du cancer de la vessie

2.1.1. Dans le monde

L'incidence du cancer vésical est en augmentation d'environ 1% par an au cours des dernières années (augmentation associée au taux de mortalité) (**Pointreau *et al.*, 2010**).

En 2008, 386 300 nouveaux cas ont été diagnostiqués dans le monde avec 150 200 décès (**Jemal *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2012**). Le taux de mortalité le plus élevé a été enregistré chez les hommes Egyptiens (16,3/100.000 personnes) (**Jemal *et al.*, 2011**).

En 2012, le nombre de nouveaux cas diagnostiqués a augmenté et a atteint 429 800 avec 165 100 décès en précisant que le taux de mortalité le plus élevé a été enregistré cette fois-ci en Turquie (12,8/100.000 personnes) (**Torre *et al.*, 2015**).

En 2018, le cancer de la vessie a occupé le 10ème rang des cancers les plus répandus dans le monde, avec environ 549 393 nouveaux cas et 200 000 décès. Il est plus fréquent chez les hommes que chez les femmes (**Jemal *et al.*, 2011 ; Torre *et al.*, 2015 ; Bray *et al.*, 2018**). Il occupe la 6ème place en terme de fréquence avec une incidence de 9,6 pour 100 000 hommes et représente la 9ème cause de décès par cancer avec un taux de mortalité de 3,2 pour 100 000 hommes : environ 4 fois celles des femmes (0,9 pour 100 000 femmes) (**Bray *et al.*, 2018**) (Figure 1).

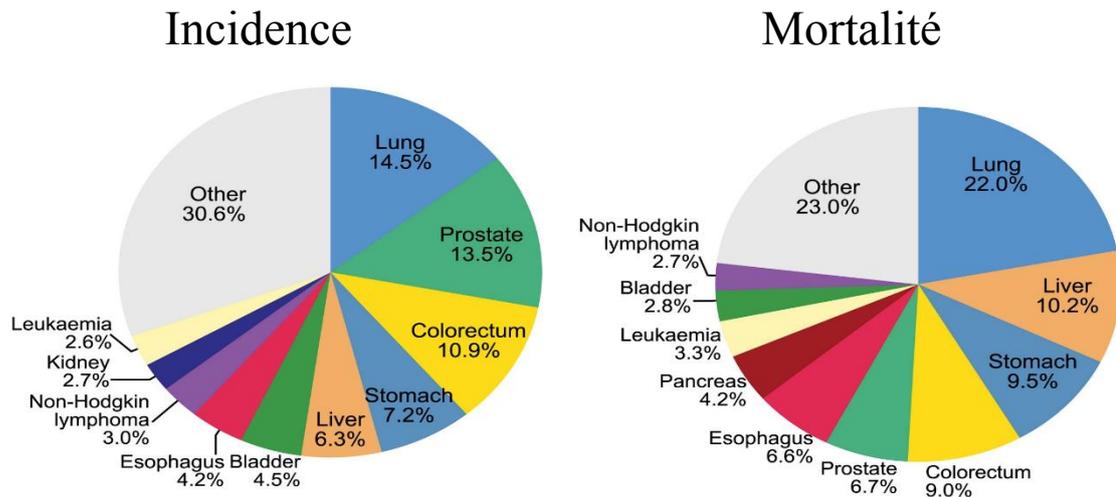


Figure 4: Incidence et mortalité du cancer de la vessie chez l'homme dans le monde (Bray *et al.*, 2018).

L'incidence du cancer vésical varie considérablement selon la localisation géographique et les différences ethniques (Gandomani *et al.*, 2017), les hausses d'incidences sont observées surtout dans les régions du Sud Europe (Grèce, Espagne; Italie), Europe occidentale (Belgique et Pays-Bas), et en Amérique du Nord, alors que la plus faible incidence est présente dans les pays Asiatiques orientales et ceux de l'Amérique latine (Jemal *et al.*, 2011 ;Torre *et al.*, 2015 ; Bray *et al.*, 2018; Wong *et al.*, 2018) (Figure 5). Il est à noter que les taux de mortalité les plus élevés sont observés dans les régions de l'Ouest de l'Asie et du Nord de l'Afrique (Wong *et al.*, 2018).

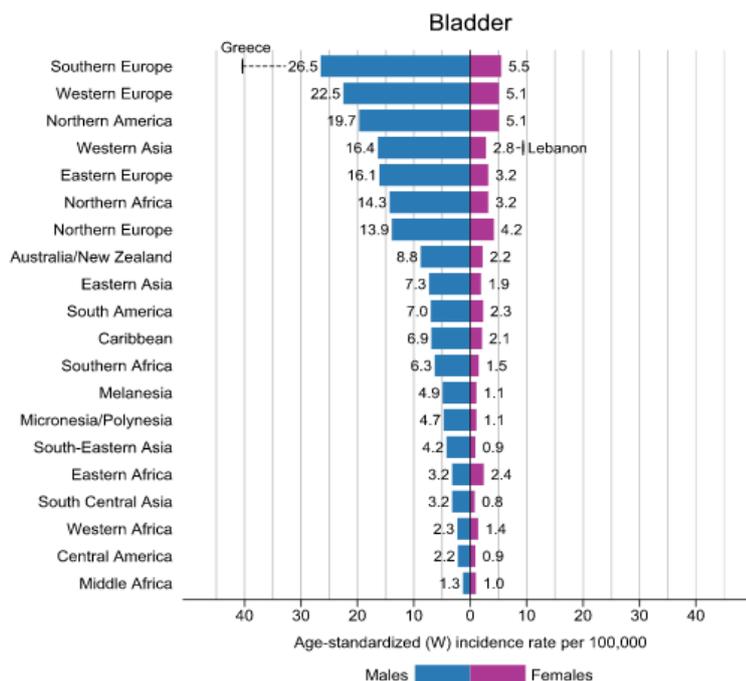


Figure 5 : Taux standardisés d’incidence par cancer vésical dans le monde. ASR (W) : age-standardised rate (World) (**Bray *et al.*, 2018**).

2.1.2. En Afrique

Le cancer de la vessie est très fréquent dans les pays du Maghreb et de l’Afrique du Nord ; en Egypte il représente 30% des cancers suivi par la Tunisie et la Lybie (**El Mawla *et al.*, 2001 ; Bray *et al.*, 2018**).

Au Maroc, son incidence est estimée à 4,6 % pour 100 000 habitants. Cette incidence est de 5,5 % au Mali, de 3,7 % au Sénégal et de l’ordre de 3,9 % au Gabon et Malawi (**Bray *et al.*, 2018**), tandis qu’au Cameroun et selon une étude rétrospective, ce cancer ne représente que 1 % de l’ensemble des cancers avec la particularité du jeune âge de la survenue. En effet, il a été constaté que presque 61% des patients ont moins de 40 ans lors du diagnostic (**Sow *et al.*, 2006**).

2.1.3. En Algérie

Le taux d’incidence du cancer de la vessie augmente de façon significative, il est passé de 1,6/100 000 personnes entre 1986 et 1990 à 10,3/100 000 personnes entre 2006 et 2010 chez les hommes et de 0,2 à 1,2/100 000 personnes chez les femmes durant les mêmes périodes (**Hamdi Cherif *et al.*, 2010 ; Hamdi Cherif *et al.*, 2014b**). Durant la période 2006/ 2010, il a

représenté 9,1% de l'ensemble des cancers incidents et 55% des cancers urologiques (**Hamdi Cherif et al., 2014a**).

En 2018, le cancer de la vessie a occupé le 4^{ème} rang des cancers les plus fréquents derrière le cancer du sein, le cancer broncho-pulmonaire et le cancer colorectal, avec un taux d'incidence de 7,5/100 000 personnes et un taux de mortalité de 3,4 / 100 000. Il représente également la 5^{ème} cause de décès par cancers et a été classé deuxième maladie maligne d'origine génito-urinaire chez l'homme après le cancer de la prostate (**Bray et al., 2018**).

2.2. Facteurs de risque des cancers de vessie

2.2.1. Tabac

Le tabagisme est le facteur de risque le plus clairement démontré en matière de cancérogenèse vésicale pour les deux sexes et serait responsable de 50 à 65% des cas diagnostiqués (**Kuper et al., 2002 ; Zeegers et al., 2004 ; Volanis et al., 2010, Bray et al., 2018**). Il a été démontré que la fumée de tabac contient de nombreux cancérogènes tels que les amines aromatiques (4-amino-biphényle, β -naphtylamine, orthotoluidine), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), ou encore les nitrosamines qui sont aussi présents dans l'urine des fumeurs (**Zeegers et al., 2004**). Ces substances chimiques causent des dommages aux cellules qui tapissent l'intérieur de la vessie (les cellules urothéliales) (**Burger et al., 2013**). En effet, l'exposition à ces différentes substances chimiques augmente le risque de l'accumulation d'altérations génétiques causant la transformation maligne et la carcinogenèse (**Volanis et al., 2010 ; Burger et al., 2013 ; Matic et al., 2013**). Ce risque est lié également au nombre de cigarettes fumées par jour, au nombre d'années pendant lesquelles une personne a fumé et à l'âge auquel une personne a commencé à fumer (**Mitra et al., 2009 ; Hireche et al., 2018**). En effet, les ex-fumeurs risquent deux fois plus que les personnes qui n'ont jamais fumé de développer un cancer de la vessie (**Aveyard et al., 2002**). Toutefois, l'arrêt du tabagisme réduirait à 40% le risque de parution ainsi que le risque de la récurrence de la maladie au bout d'un an, mais ce risque persiste quand même jusqu'à 25 ans après le sevrage tabagique (**Aveyard et al., 2002 ; Volanis et al., 2010**).

2.2.2. Exposition professionnelle

Le deuxième facteur de risque le plus impliqué dans l'étiologie du cancer de la vessie concerne l'exposition professionnelle régulière et prolongée à certaines substances chimiques, comme les amines aromatiques, les HAP, et les nitrosamines (**Burger *et al.*, 2013 ; Ferris *et al.*, 2013 ; Kherouatou-Chaoui *et al.*, 2015**).

Il a été constaté que l'exposition à ces produits chimiques a été associée à plusieurs secteurs professionnels comme l'industrie du tabac, du pétrole, du plastique, du cuir, de l'automobile, du métal, du papier, du caoutchouc, et des colorants (**Volanis *et al.*, 2010 ; Cumberbatch *et al.*, 2018**). D'autres produits chimiques tels que ceux liés à la fabrication et développement des films photographiques, dérivés chlorés présents dans l'eau des piscines, sel de cadmium ...etc, ont été aussi signalés à être causalement liés au cancer de la vessie (**Malats *et al.*, 2015**).

Il a été démontré que l'exposition aux amines aromatiques, en particulier la β -naphthylamine, la benzidine, le 4-amino-biphényl et la 4-o-toluidine (**Ward *et al.*, 1991 ; Ward *et al.*, 1996**), aux HAP, et au gaz d'échappement des moteurs diesel font le plus souvent augmenter le risque d'un cancer vésical (**Carreón *et al.*, 2010 ; Pira *et al.*, 2010 ; Cumberbatch & Noon, 2019**).

Il est à noter que le Centre International de Recherche sur le cancer (CIRC) ou IARC en anglais (International Agency for Research on Cancer) a établi une liste d'agents, de circonstances d'exposition et de secteurs d'activité professionnelle pour lesquels il existe des preuves suffisantes ou limitées de cancérogénicité vésicale (Tableau1) (**Cogliano *et al.*, 2011, CIRC, 2019**).

Tableau

1 : Cancérogènes vésicaux classés par le CIRC.

Preuves SUFFISANTES de cancérogénicité vésicale	Preuves LIMITEES de cancérogénicité vésicale
<ul style="list-style-type: none"> • Production d'aluminium • 4 Aminobiphényl • Arsenic et ses composés inorganiques • Production d'auramine • Benzidine • Chlornaphazine • Cyclophosphamide • Production de magenta • 2 Naphtylamine • Activités de peinture • Industrie de production du caoutchouc • <i>Schistosoma Haematobium</i> • Tabagisme • Ortho-toluidine • Rayons X et Gamma 	<ul style="list-style-type: none"> • 4-Chloro-ortho-toluidine • Brai de houille • Café • Nettoyage à sec • Gaz d'échappement diesel • Profession de coiffeur • Imprimerie • Suie • Industrie textile

2.2.3. Facteurs infectieux

L'irritation chronique de la vessie semble augmenter le risque de développement de cancers vésicaux. Elle peut être due à une inflammation ou un traumatisme de la vessie. En effet, l'inflammation de la vessie peut être provoquée par une infection chronique des voies urinaires, des calculs vésicaux, ou peut être aussi causée par une schistosomiase (bilharziose) ; une infection engendrée par un ver parasite (*Schistosoma haematobium*) qui apparaît habituellement dans les pays du Moyen Orient et en Afrique du Nord (Héry, 2009 ; Nesi *et al.*, 2015). En effet, chez les personnes infectées, les schistosomes adultes sont retrouvés dans les veinules de la vessie. Lorsqu'ils pondent leurs oeufs, ceux-ci se retrouvent dans la vessie, entraînent une irritation de la vessie et le développement d'une fibrose tissulaire qui peut favoriser le développement de carcinome vésical (Zaghloul, 2012). Il a été rapporté que cette infection est à l'origine de 75% des tumeurs vésicales de type épidermoïde (Kantor *et al.*, 1985).

Egalement, le traumatisme vésical peut être causé par des calculs vésicaux ou une sonde à demeure en place depuis longtemps, où les bactéries produisant des nitrates, peuvent alors transformer les nitrates en nitrites puis en nitrosamines (Puppo *et al.*, 1995).

2.2.4. Facteurs alimentaires

Selon le CIRC, l'arsenic est classé dans le groupe 1 comme cancérigène pour l'homme (Annexe 1). Il est admis que sa présence dans l'eau potable augmente significativement le risque de cancer de la vessie pour une ingestion supérieure à 80 µg/jour (**Lamm *et al.*, 2006 ; CIRC, 2019**).

D'autres part, les édulcorants artificiels comme l'aspartame ont été au départ évoqués comme facteurs de risques du cancer vésical mais le CIRC les a déclassés dernièrement, passant de la classe 2B à la classe 3 (agent inclassable quant à sa cancérigénicité) (Annexe 1).

D'autre part le manque d'apport hydrique nécessaire, en particulier d'eau, augmente le risque du cancer de la vessie. En effet, l'accumulation de produits chimiques en raison du retard de la miction, entraîne un risque accru de cancers vésicaux en raison de l'exposition du tissu urothélial aux carcinogènes pour une longue période (**Ros *et al.*, 2011**).

L'acide aristolochique (composé faisant partie de la classe des amines aromatiques) présent dans certains aliments notamment certaines herbes chinoises amaigrissantes a également été évoqué comme facteur de risque de développer un cancer de la vessie (**Fajkovic *et al.*, 2011 ; Mahdavifar *et al.*, 2016**).

L'implication de la consommation d'alcool dans l'apparition du cancer vésical a été un sujet de débat depuis toujours, il a été démontré que parmi 19 études réalisées entre 1983 et 2009, deux seulement ont révélé une association entre la consommation d'alcool et le risque de développer un cancer de la vessie (**Slattery *et al.*, 1988 ; Donato *et al.*, 1997 ; Pelucchi *et al.*, 2002**). Une autre méta-analyse portant sur 10 pays européens cherchant l'implication de la consommation d'alcool dans la carcinogénèse vésicale n'a montré d'association que chez les hommes fumeurs. D'après les auteurs cette association n'a été relatée qu'au tabagisme (**Botteri *et al.*, 2017**).

Concernant la consommation de café et de thé, les résultats de la littérature semblent être controversés ; certaines études s'attachent à démontrer qu'il existe une augmentation du risque de cancer de vessie chez les consommateurs de café (**Clavel & Cordier, 1991 ; Woolcott *et al.*, 2002 ; Wu *et al.*, 2015, Yu *et al.*, 2019**), tandis que d'autres postulent qu'il n'existe actuellement aucun élément probant permettant de mettre en cause une consommation excessive de café ou de thé (**Viscoli *et al.*, 1993 ; Hachemian *et al.*, 2019**).

2.2.5. Facteurs médicaux

Le traitement des tumeurs primitives par radiothérapie pelvienne augmente le risque de développer des cancers secondaires (**Burger et al., 2013**). En effet, il a été rapporté que les patients sous radiothérapie pour des tumeurs malignes du bassin, y compris les cancers de la prostate, de l'endomètre et du col d'utérus sont sujets au risque du cancer de la vessie (**Godmani et al., 2017 ; Moschini et al., 2019**). Il a été rapporté préalablement que ces tumeurs secondaires à la radiothérapie sont généralement de haut grade et localement avancés lors du diagnostic (**Quilty et Kerr, 1987 ; Abern et al., 2013**).

La consommation massive et chronique d'antalgiques à base de phénacétine (**Fortuny et al., 2007**), ou encore les chimiothérapies composées de chlornaphazine ou de cyclophosphamide (**Figuroa et al., 2015 ; Hadkhal et al., 2017**) sont des facteurs favorisant la survenue de tumeurs vésicales. Il est à rappeler que la phénacétine a une structure chimique similaire à celle des colorants anyline et donc des amines aromatiques. La période de latence est longue et implique au moins deux décades (**Fortuny et al., 2007**). D'autres part, certaines méta-analyses ont montré une forte corrélation entre la prise de pioglitazone (anti-diabétique oral) et la survenue du cancer vésical. Ce risque se trouve augmenté par la prise d'une dose journalière supérieure à 28 g (**Li et al., 2017**).

2.2.6. Prédisposition génétique

Le cancer de la vessie est une maladie multifactorielle due à l'interaction entre plusieurs facteurs. Ainsi, en plus des facteurs environnementaux influençant le risque de survenue des cancers vésicaux, des facteurs génétiques peuvent également être à l'origine de l'émergence de ce type de cancer (**Chu et al., 2013 ; Burger et al., 2013 ; Cumberbatch et al., 2018**).

L'expression de certains enzymes impliqués dans divers voies métaboliques comme le le métabolisme du folate, le métabolisme des xénobiotiques et les voies de la réparation de l'ADN est très variable en fonction de facteurs environnementaux, physiopathologiques et notamment génétiques. Il est à savoir que l'expression de ces gènes est elle-même modulée par le polymorphisme génétique porté par chaque gène (**An et al., 2015 ; Zhu et al., 2015 ; Wu et al., 2016**).

Dans ce contexte, plusieurs études ont montré une association entre les polymorphismes portés par les gènes codant les enzymes du métabolisme des xénobiotiques et la survenue du

cancer de la vessie. En effet, les délétions des gènes des Glutathion S-Transférases mu 1 et /ou theta 1 « *GSTM1* et/ou *GSTT1* » ont été décrites chez les malades atteints du cancer de la vessie dans plusieurs populations (**Rouissi *et al.*, 2011 ; Savic-Radojevic *et al.*, 2013 ; Chirilă *et al.*, 2015 ; Hireche *et al.*, 2018**).

De même, la N-acetyltransferase-2 «NAT2» qui est une enzyme impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques, a été corrélée à une augmentation de risque de cancer de la vessie chez les individus présentant un profil d'acétylation lent. Ainsi chez ces derniers, le mécanisme de détoxification moins rapide conduit à une persistance des molécules carcinogènes dans l'organisme (**An *et al.*, 2015 ; Zhu *et al.*, 2015 ; Silverman *et al.*, 2017**).

Il a été rapporté que l'effet additif du profil acétyleur lent du gène *NAT2*, de la délétion du gène *GSTM1*, du tabagisme ou de l'exposition professionnelle à certains composés carcinogènes augmenterait d'avantage le risque d'atteinte par cancers vésicaux (**Antonova *et al.*, 2015 ; Silverman *et al.*, 2017**).

Dans ce sens, une étude cas-témoins incluant 143 patients présentant des cancers vésicaux suspectés d'origine professionnelle et 337 témoins ont été génotypés pour les polymorphismes suivants : N-acetyltransferase 2 (*NAT2*), glutathion S-transferase M1 (*GSTM1*), glutathion S-transferase T1 (*GSTT1*), UDP-glucuronyltransferase 1A rs11892031 (*UGT1A*), rs9642880 (proche du gène *MYC*), and rs710521 (proche du gène *TP63*). D'après les résultats de cette étude les polymorphismes les plus incriminés dans la carcinogénèse vésicale d'origine professionnelle serait la coexistence des génotypes *GSTM1 nul* et rs11892031[A/A]. Il est à signaler que le génotype *GSTM1 nul* est apparu plus fréquemment chez les patients exposés aux amines aromatiques, au carbolineum, peintres et vernisseurs, tandis que le génotype rs11892031[A/A] semble être plus fréquent chez les cas exposés au carbolineum, HAP, aérosols détecteurs de fissures et également chez les peintres et vernisseurs (**Lukas *et al.*, 2017**).

Une étude GWAS a montré également que parmi 12 SNPs testés les variants : *NAT2* (8p22), *UGT1A6* (2q37.1), *GSTM1*(1p13.3), *PSCA* (8q24.3), *MYC* (8q24.21),et *CBX6/APOBEC3A* (22q13.1) ont présenté un effet additif avec le tabac dans la carcinogénèse vésicale (**Garcia-Closas *et al.*, 2013**).

Des études cherchant l'implication des gènes de réparation de l'ADN dans l'étiologie du cancer vésical ont montré que les polymorphismes (Lys939Gln, Ala499Val and PAT-/+) du

gène *XPC* (pour en anglais Xeroderma pigmentosum group C) augmentent considérablement le risque du cancer de la vessie (**Dai et al., 2014**).

Par ailleurs certaines certaines méta-analyses ont suggéré aussi que les polymorphismes *XRCC3* (Thr241Met), *XRCC1* (Arg399Gln) et *XRCC1*(Arg280His) étaient associés à un risque accru de cancer de la vessie, en particulier chez les Asiatiques (**Li et al., 2013**). Cette association a été également observée pour le gène *XRCC6* (rs2284082) (**Corral et al., 2014**).

D'autre part, il a été rapporté que les malades doubles homozygotes récessifs de l'*XPC* (Lys939Gln) et de l'*XRCC7* (G6721T) présentent quatre fois plus de risque d'atteinte par cette étiologie (**Zhi et al., 2012**).

2.3. Classification des cancers vésicaux

2.3.1. Classification histologique

D'un point de vue histologique, les tumeurs de la vessie peuvent se présenter sous différentes formes en fonction du type cellulaire qui compose la tumeur. Le carcinome transitionnel, aussi connu sous le nom de carcinome urothélial, est le type le plus fréquent des tumeurs vésicales avec une fréquence de 90%. Ces tumeurs sont caractérisées d'une part par leur degré d'infiltration dit : stade tumoral et d'autre part par leur différenciation cellulaire dite : grade histologique. Dans ce contexte ces carcinomes peuvent être non infiltrants restreints aux couches superficielles de la paroi de la vessie (TVNIM) ou infiltrants (TVIM) s'ils envahissent le muscle vésical (**Camilo & Thomas, 2006**).

Les autres types histologiques englobent 10 % des tumeurs vésicales. Ces tumeurs sont plus rares et sont représentés par les carcinomes à cellules squameuses ou épidermoïdes, qui sont causés généralement par la schistomiase et ne représentent que 5 % des tumeurs de la vessie. On retrouve également les adénocarcinomes avec une fréquence allant de 0,5 % à 2% des tumeurs malignes de vessie. Enfin, avec une fréquence d'environ 1%, vient les cancers à cellules indifférenciées qui regroupent tous les autres cancers y compris les cancers à petites cellules (**Tiguert et al., 1999 ; Prasad et al., 2011**).

2.3.2. Classification clinicopathologique

La classification clinicopathologique repose sur deux facteurs histologiques qui sont le stade tumoral et le grade de différenciation des cellules tumorales. Ces deux paramètres sont définis suite à l'étude histologique des copeaux de résection de la tumeur primitive, permettant

ainsi le bon diagnostic de la pathologie et le bon choix de la thérapie à suivre (**Pointreau *et al.*, 2010**).

2.3.2.1. Stade

Le stade tumoral est un facteur de pronostic très important qui décrit le degré d'infiltration de la tumeur dans la paroi vésicale, l'extension de la tumeur en dehors de la vessie et même l'envahissement éventuel des ganglions et d'autres organes à distance (**Adrian *et al.*, 1998 ; Van der Meijden *et al.*, 1998**).

La détermination du stade tumoral repose principalement sur la classification (Tumor-Node-Metastasis) TNM approuvé par l'Union International Contre le Cancer (UICC) et l'American Joint Committee on Cancer (l'AJCC). Ce système repose sur l'évaluation de trois critères symbolisés par des lettres: la lettre « T » représente la taille de la tumeur et invasion des tissus avoisinants, la lettre « N » l'atteinte des ganglions lymphatiques et enfin la lettre « M » indique la présence de métastases ou la propagation du cancer à un autre organe du corps. Les métastases du cancer de la vessie sont généralement les os, les poumons, et les ganglions lymphatiques éloignés de la vessie. Il est à noter également que le suffixe « is » peut être ajouté à toute catégorie T pour indiquer l'existence de carcinome in situ associé, qui est une lésion de haut grade, développée en muqueuse plane (**Pointreau *et al.*, 2010**).

Les caractéristiques de cette classification sont répertoriées dans un seul tableau regroupant les différents stades possibles pour une tumeur de la vessie (Tableau 2).

Tableau 2: Classification TNM 2010 du cancer de la vessie (**Flaig *et al.*, 2018**).

T Tumeur primitive	PTx	Tumeur primitive non évaluable
	PT0	Tumeur primitive non retrouvée
	PTa	Carcinome papillaire non invasif
	PTis	Carcinome in situ « plan »
	PT1	Tumeur envahissant le chorion
	PT2	Tumeur envahissant la musculature – T2a Tumeur envahissant le muscle superficiel (moitié interne) – T2b Tumeur envahissant le muscle profond (moitié externe)

	PT3	Tumeur envahissant le tissu péri-vésical – T3a Envahissement microscopique – T3b Envahissement extra-vésical macroscopique
	PT4	Tumeur envahissant une structure péri-vésicale – T4a Prostate, vagin ou utérus – T4b Paroi pelvienne ou abdominale
N Ganglions lymphatiques régionaux	Nx	Ganglions non évaluables
	N0	Absence de métastase ganglionnaire régionale
	N1	Métastase ganglionnaire unique < 2 cm
	N2	Métastase ganglionnaire unique > 2 cm et < 5 cm ou métastases ganglionnaires multiples < 5 cm
	N3	Métastase(s) ganglionnaire(s) > 5 cm
M Métastases à distance	Mx	Métastase non évaluable
	M0	Absence de métastase à distance
	M1	Métastase (s) à distance

Le système TNM est directement liée à la classification TVNIM / TVIM (**InfoCancer, 2016 ; Flaig *et al.*, 2018**) puisque les tumeurs de vessie non infiltrantes du muscle (TVNIM) ne touchent que la muqueuse et regroupent les stades PTis, PTa et PT1, alors que les tumeurs de vessie infiltrantes du muscle (TVIM) atteignent le muscle vésical et englobent les PT2 et plus (Figure 6).

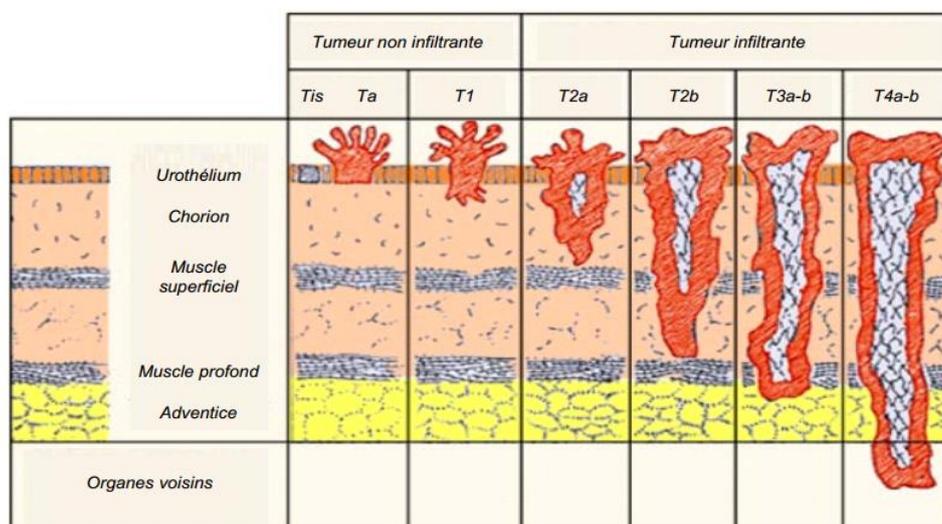


Figure 6 : Représentation de la classification des tumeurs de vessie (**Pointreau *et al.*, 2010**).

2.3.2.2. Grade

Repose sur l'examen microscopique de l'échantillon prélevé lors de la biopsie et permet d'analyser l'aspect architectural ainsi que le comportement et le degré de différenciation des cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales.

Deux classifications distinctes existent à nos jours : la classification WHO (World Health Organisation) ou OMS en français (Organisation Mondiale de Santé) de 1973 qui distingue 3 grades d'agressivité : grades G1 (cellules bien différenciées), G2 (cellules moyennement différenciées) et G3 (cellules indifférenciées), et celle datant de 2004 qui classe les tumeurs en carcinome de bas grade ou en carcinome de haut grade. Les urologues et pathologistes européens recommandent d'utiliser la classification de 2004, cependant certains protocoles thérapeutiques mentionnent encore les 3 grades de l'OMS 1973. Dans ce contexte il est préférable, d'établir le grade des tumeurs vésicales selon les deux classifications à la fois (**Clark et al., 2013**).

Nous pouvons proposer le tableau d'équivalence regroupant les 2 classifications de l'OMS (Tableau 3) :

Tableau 3 : Equivalence entre les classifications OMS 1973 et OMS 2004

OMS 1973	Carcinome G1	Carcinome G2	Carcinome G3
OMS 2004	Tumeur uréthéliale papillaire de faible potentiel de malignité	Carcinome bas grade	Carcinome de haut grade

D'après le tableau 3, le grade 1 de la classification de 1973 a été réassigné aux tumeurs urothéliales papillaires de faible potentiel de malignité et aux carcinomes de bas grade dans la classification 2004, le Grade 2 aux carcinomes de bas et haut grade. Finalement toutes les tumeurs de grades 3 de la classification 1973 ont été réassignés aux carcinomes de haut grade dans la classification 2004 (**Pavone-Macaluso et al., 2006**).

2.4. Symptômes, diagnostique et traitement

2.4.1. Symptômes

Le cancer de la vessie, ne provoque presque pas de symptômes aux stades précoces (**Massard et al., 2010**), cependant certains signes cliniques -peu spécifiques- peuvent être observés tels que:

- ✓ L'hématurie : c'est le symptôme le plus fréquent du cancer de la vessie, il consiste en la présence du sang dans les urines, ces dernières, qui prennent alors une couleur allant du roux très claire au rouge vif (**Chopin et al., 2001**). Elle peut être macroscopique ou microscopique (suite à une analyse réalisée sur bandelette urinaire) (**Bourillon et al., 2003**). C'est un phénomène indolore (pour 85% des patients) (**Bouchet et al., 2006 ; witjes, 2016**).
- ✓ Mictions impérieuses : mictions dont l'urgence raccourcit considérablement la phase d'attente, surtout chez des patients présentant des tumeurs avancées (comme les TVIM) (**Bourillon et al., 2003 ; witjes, 2016**).
- ✓ Pollakiurie: mictions fréquentes (**Koehly et al., 2010**).
- ✓ La cystite : infection vésicale caractérisée par des mictions fréquentes, et douloureuses (**Koehly et al., 2010 ; witjes, 2016**).
- ✓ Et plus rarement la dysurie : le besoin d'uriner sans toutefois en être capable (miction nécessitant un effort) (**Chopin et al., 2006 ; Koehly et al., 2010; witjes, 2016**).

Dans le cas de découverte métastatique, ou plus avancée, les patients peuvent présenter d'autres symptômes comme : la fièvre, l'anorexie, douleurs dans la région rectale, anale ou pelvienne, douleurs lombaires et osseuses, manifestations hépatiques et altération de l'état général (**Bourillon et al., 2003; witjes, 2016**).

Il est également possible que le cancer de la vessie, bloque l'écoulement d'urine provenant du rein, ce qui conduit à une hydronéphrose (distension du rein) suite à une rétention d'urine dans cet organe (**Bouchet et al., 2006**).

En effet, ces symptômes ne sont pas spécifiques aux tumeurs vésicales, et peuvent également suspecter une infection urinaire, des calculs rénaux ou même une hyperplasie bénigne de la prostate, et c'est la raison pour laquelle un examen clinique ainsi qu'une série de tests sont recommandés afin de confirmer le diagnostic et mieux évaluer le stade qui déterminera par la suite la meilleure stratégie de prise en charge.

2.4.2. Diagnostic

Le diagnostic des tumeurs vésicales est basé sur plusieurs examens :

✓ **Examen cyto bactériologique des urines (ECBU)**

Cette analyse comporte un examen direct de l'urine au microscope et une mise en culture afin de rechercher et d'identifier la présence de germes. L'ECBU permet de rechercher une infection urinaire (cystite, pyélonéphrite) et d'identifier le(s) germe(s) en cause (**Claude & Jhuret, 2002**).

✓ **L'examen clinique**

Cet examen consiste à examiner le rectum et le vagin (chez la femme), et permet de déterminer la taille de la tumeur et de mesurer son étendue en cas de propagation (**Claude & Jhuret, 2002 ; Bourillon et al., 2003**).

✓ **Echographie vésicale**

C'est l'étude de la vessie par ultrasons, elle objective la présence d'une tumeur dans la cavité vésicale (**Claude & Jhuret, 2002**).

✓ **La cytologie urinaire**

Permet de déterminer s'il y a présence ou non de cellules malignes, par la recherche de cellules néoplasiques desquamées dans l'urine (**Fernandes et al., 2007**). Si la sensibilité est bonne pour les tumeurs de haut grade, elle est par contre faible pour les tumeurs de bas grade. La présence de cellules malignes dans l'urine détectées lors d'un test de cytologie, indique donc la présence d'une tumeur n'importe où dans le système urinaire, *a contrario*, un test négatif ne peut pas exclure la présence d'une tumeur. Il est donc important de réaliser d'autres tests de validation, notamment une cystoscopie (**Babjuk et al., 2013**).

✓ **Examen radiologique**

Réalisé suite à un examen anatomopathologique, si ce dernier révèle que la tumeur c'est propagée dans les couches musculaires de la vessie.

L'examen radiologique est nécessaire pour déterminer si la tumeur s'est également développée dans les ganglions lymphatiques et les tissus situés à l'extérieur de la vessie.

Il consiste en la réalisation d'un scanner ou d'une imagerie par résonance magnétique (IRM) de l'abdomen et du bassin (**Claude & Jhuret, 2002; Bourillon *et al.*, 2003 ; Bouchet *et al.*, 2006**).

✓ **La cystoscopie**

Elément de base du diagnostic, qui permet de confirmer ou d'exclure la présence d'une tumeur vésicale.

La cystoscopie peut être réalisée par anesthésie locale ou générale, et se fait par l'insertion dans l'urètre d'un tube lumineux dont l'extrémité est dotée d'une caméra afin de rechercher la tumeur à l'intérieur de la vessie et de l'urètre.

Le médecin peut insérer un instrument chirurgical très fin dans le tube du cystoscope afin de prélever une biopsie (**Sun & Trinh, 2015**).

✓ **Examen anatomopathologique**

Cet examen révèle les caractéristiques spécifiques de la tumeur et permet de déterminer le type du cancer de la vessie.

En fait, Il s'agit de l'analyse en laboratoire des cellules tumorales. Cette analyse est effectuée sur le ou les échantillons de tumeur retirés lors de la cystoscopie (**Bouchet *et al.*, 2006**).

2.4.3. Traitement

De nos jours plusieurs options du traitement peuvent être proposées au patient dont la chirurgie, la chimiothérapie, la thérapie biologique et la radiothérapie.

En effet, la prise en charge d'un patient souffrant d'un cancer de la vessie dépend du stade de la tumeur ainsi que la localisation de cette dernière avec prise en considération de l'âge et de l'état de santé général du patient.

✓ **Traitement des tumeurs superficielles (TVNIM)**

La prise en charge thérapeutique repose alors sur un traitement conservateur par résection transurétrale de la vessie RTUV suivie dans la plus part des cas par un traitement complémentaire, ce dernier est administré au patient sous formes d'instillations endovésicales de mitomycine C ou de BCG selon le risque de récurrence ou de progression avec prise en considération bien sûr des capacités du patient à tolérer les effets secondaires (**Van der Meijden, 1998 ; Babjuk *et al.*, 2013**).

✓ **Traitement des tumeurs invasives (TVIM)**

Le traitement de référence consiste en une cystectomie totale associée à une dissection ganglionnaire pelvienne. Selon les circonstances, une intervention chirurgicale peut être complétée par une chimiothérapie adjuvante.

Selon plusieurs études, une chimiothérapie néo-adjuvante est recommandée pour les patients présentant des tumeurs de stades T2 (**Van der Meijden, 1998**) afin de diminuer le volume tumoral rendant opérables certaines tumeurs jugées initialement inextirpables.

En cas de refus d'intervention ou de patient non éligible à la chirurgie, d'autres options thérapeutiques sont disponibles comme la réalisation d'une radiochimiothérapie ou le traitement trimodal qui consiste en une combinaison d'une radiothérapie, une chimiothérapie et une résection transurétrale de la vessie qui permet la conservation de la vessie, mais jusqu'à nos jours la cystectomie totale reste l'option la plus fiable (**Kim et al., 2017**).

On connaît également la thérapie génique qui est proposé comme cible thérapeutique - toujours en essais clinique- dans les cancers de vessie, cette dernière consiste à développer des médicaments visant les récepteurs à activité tyrosine kinase qui envahissent le muscle vésical en présence de tumeurs tels : *EGFR*, *ERBB2*, *FGFR3* (**Smith et al., 1989 ; Peyromaure et al., 2005 ; Hussain et al., 2007 ; Villares et al., 2007 ; Qing et al., 2009 ; Lae et al., 2010 ; Pruthi et al., 2010, Tony et al., 2019**).

2.5. Les voies de progression tumorales

En effet, l'évolution des cancers de la vessie se fait différemment tout dépend la voie selon laquelle la tumeur va progresser, puisque à chacune des deux voies correspondent des altérations génétiques et épigénétiques affectant des protéines dans des voies de signalisation intra-cellulaire différentes (**Castillo-Martin et al., 2010 ; Goebell & Knowles, 2010 ; Kamat & Mathew, 2011**) (Figure 7).

2.5.1. Les tumeurs de la voie dite « Ta »

Les tumeurs de la voie dite « Ta » sont des carcinomes papillaires superficielles de bas grade Ta G1/G2 - n'ayant pas franchi la membrane basale-, elles représentent 70 à 80 % des tumeurs de vessie à la première constatation du diagnostic. Ces tumeurs récidivent fréquemment à un pourcentage variant entre 60 à 70% mais progressent rarement vers des tumeurs T1 puis T_≥2 (7 à 17%) (**Billerey et al., 2001 ; Jebar et al., 2005**). Donc elles n'évoluent que très rarement en maladie métastatique. La mortalité liée à ce type de cancer reste faible (**Kamat & Mathew, 2011**).

Ces tumeurs sont porteuses de mutations des oncogènes *FGFR3*, *H-RAS* (et *PI3K*, 3. entrainant un gain de fonction (Sibley *et al.*, 2001, Rhijn *et al.*, 2001, Rieger-Christ *et al.*, 2003).

2.5.2. Les tumeurs de la voie dite « des carcinomes *in situ* »

Les tumeurs de la voie dite « des carcinomes *in situ* », sont des carcinomes urothéliaux de haut grade dont l'origine est actuellement incertaine; elles pourraient effectivement provenir à partir de lésions de carcinome *in situ* « Cis », de tumeurs papillaires de bas grade Ta G1/G2 dont le degré d'anaplasie aurait augmenté, mais aussi survenir *de novo*, à partir de l'urothélium normal (Billrrey *et al.*, 2001 ; Knowles, 2008).

Ces tumeurs récidivent fréquemment et peuvent progresser vers des tumeurs T1 puis T \geq 2 avec une probabilité d'environ 40% (Heney *et al.*, 1983). Donc, elles évoluent en grande majorité vers une maladie agressive et envahissante, aboutissant à la formation de métastases. Ces derniers possèdent un risque élevé de mortalité lié au cancer (Kamat & Mathew, 2011).

Elles sont caractérisées par la perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs tels *p53*, *Rb* et *PTEN* (Castillo-Martin *et al.*, 2010 ; Kamat & Mathew, 2011).

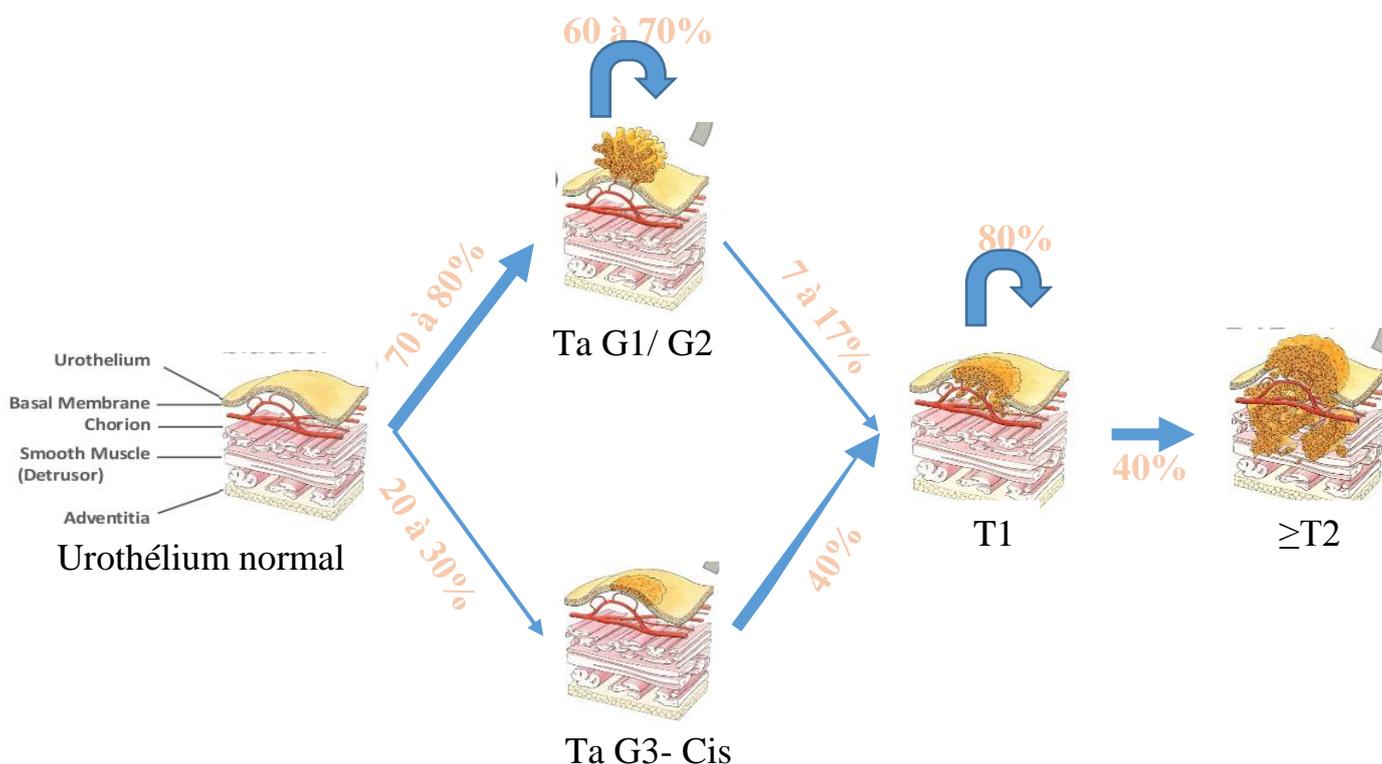


Figure 7 : Les voies de progression des tumeurs vésicales.

3. Bases de l'oncogénèse dans le cancer de la vessie

Les données cliniques précédemment exposées ont donc permis d'établir qu'il existait deux voies de progression tumorale des carcinomes de vessie : l'une passant par les tumeurs Ta, qui progressent peu mais récidivent fréquemment, l'autre passant par les carcinomes *in situ*, plus rares mais progressant souvent vers des stades invasifs. Ces observations cliniques ont été confortées par des études moléculaires. Dans ce sens, de nombreux travaux de biologie moléculaire ont clairement démontré qu'il existait deux voies majeures dans la cancérogénèse vésicale : l'une pour les tumeurs infiltrantes et à haut risque de malignité caractérisée généralement par la présence de mutations du gène suppresseur de tumeur *p53* (Tumor Protein of 53 Kilo dalton), l'autre pour les tumeurs non-infiltrantes et à faible risque de malignité caractérisée essentiellement par des mutations de l'oncogène *FGFR3* (Fibroblast Growth Factor Receptor 3) (Bakkar *et al.*, 2003 ; Van Rhijn *et al.*, 2004).

3.1. Oncogènes

3.1.1. Gène *FGFR3*

Le *FGFR3* appartient à une famille de récepteurs à activité tyrosine kinase, codés par 4 gènes différents (*FGFR 1-4*). Il est codé par un gène de 19 exons localisé sur le bras court (p) du chromosome 4, en position 16.3, et plus précisément de la paire de base 1795038 jusqu'à la paire de base 1810598.

Ce récepteur est une glycoprotéine transmembranaire de 115 kDa, formée de 806 acides aminés et divisée en 3 régions : un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire. La partie extracellulaire possède 2 à 3 domaines de type immunoglobuline et la partie intracellulaire un domaine tyrosine kinase (Figure 8).

Suite à son interaction avec le ligand, le récepteur *FGFR3* subit une dimérisation, et une transphosphorylation des domaines kinases, permettant ainsi son activation. Une fois activé, le récepteur devient alors capable de lier et de phosphoryler des protéines effectrices, déclenchant ainsi dans la cellule différentes voies de signalisation.

Le *FGFR3* est impliqué dans différents syndromes de nanisme, il a un contrôle négatif de la croissance osseuse. Son rôle oncogénique avait été mis au point pour la première fois dans les myélomes puis dans les carcinomes vésicaux (Chopin *et al.*, 2001 ; Radvanyi *et al.*, 2001 ; Golka *et al.*, 2011).

Dans une étude réalisée sur des échantillons issus de tumeurs de patients humains, une surexpression de *FGFR3* était observée dans 85% des tumeurs présentant une mutation de ce gène et cette expression était significativement plus fréquente dans les tumeurs non invasives de bas grade (Ta) comparée aux tumeurs invasives (T2) (Tomlinson *et al.*, 2007). Il a été rapporté que les mutations de *FGFR3* sont associées à des tumeurs de vessie de bon pronostic (Hernandez *et al.*, 2009).

Ce sont les mutations apparaissant dans le domaine tyrosine kinase ou dans la région extracellulaire, induisant une stabilisation du dimère, qui sont susceptibles d’engendrer une activation constitutive du récepteur, et ainsi une activation permanente des cascades de signalisation (Tomlinson *et al.*, 2007) (Figure 8).

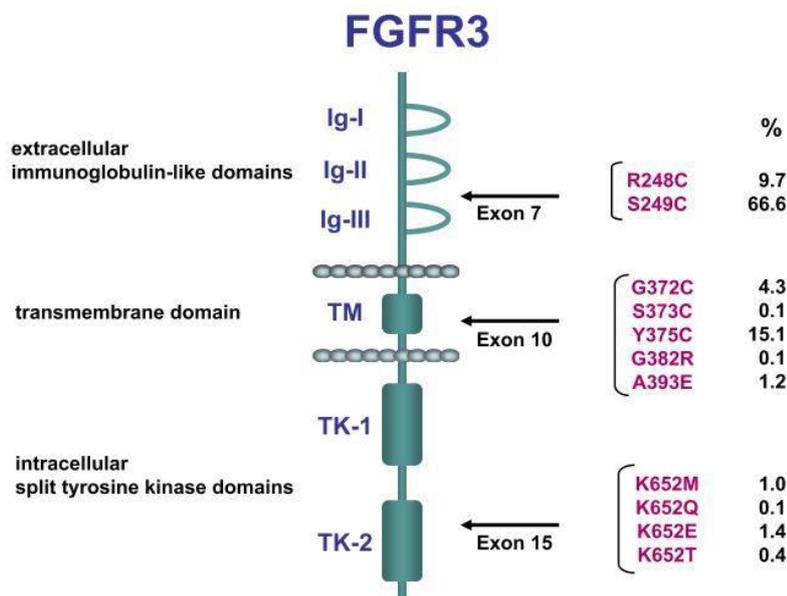


Figure 8 : Fréquence relative et position des mutations de *FGFR3* dans les cancers de la vessie (Tomlinson *et al.*, 2007).

3.1.2. Locus c-ha-ras-1 : *H-RAS*

Officiellement connu sous le nom : Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog.

Le gène c-ha-ras 1 est localisé sur le bras court (p), du chromosome 11 en position 5.5 et plus précisément de la paire de base 532241 jusqu'à la paire de base 535549.

Il code pour la protéine H-Ras ou la p21, impliquée dans la régulation du cycle cellulaire ainsi que la transduction du signal. C’est une protéine dite GTPase ; dont l’activation se fait après liaison à une molécule GTP.

Le gène *H-Ras* appartient à la famille d'oncogène « Ras », qui contient deux autres gènes : *K-Ras* et *N-Ras*, impliqués dans la régulation de la division cellulaire, la différenciation et le phénomène d'apoptose.

HRAS a été le premier oncogène mis en évidence dans les carcinomes urothéliaux (**Reddy et al., 1982**). La mutation, qui concerne le plus souvent les codons 12, 13 et 61, provoque l'activation constitutive de *HRAS*. Le gène *KRAS* et beaucoup plus rarement le gène *NRAS* sont retrouvés également mutés.

Il est à noter que les mutations activatrices des gènes *RAS*, et notamment *HRAS* avaient été rapportées dans 30 à 40 % des cas des tumeurs papillaires de bas grade (**Mitra et al., 2006**; **Pasin et al., 2008**).

3.1.3. EGFR et ses ligands

Le facteur de croissance pour l'épiderme EGF (Epidermal growth factor), est une protéine de 53 acide aminés, dont le gène est localisé sur le bras court (p) du chromosome 7 en position 12, et plus particulièrement de la paire de base 55086724 à la paire de base 55275030.

L'importance de l'EGF dans la carcinogénèse vésicale a été suggérée par de nombreuses études qui ont démontré l'association de la surexpression du récepteur EGFR ainsi que la surexpression du récepteur EGFR associé à un de ces ligands (EGF, TGF alpha principalement) à la progression tumorale vésicale (**Chopin et al., 2001** ; **Izumi et al., 2012**).

3.1.4. Gène *PI3K*

Le gène *PI3K*, situé sur le chromosome 3 code pour une sous unité catalytique appelée p110 α . Cette dernière associée à une autre sous unité dite régulatrice (p85) forme la phosphoinositide tri-phosphate 3 kinase de type I (*PI3K3* de type I), lequel constitue le messenger activateur d'*AKT* (Figure 9). Dans ce sens, le gène *PI3k* prend place dans une voie de signalisation intracellulaire indispensable dans l'homéostasie cellulaire, dont l'activation est dépendante de *FGFR3* et liée aux gènes *RAS*.

Le gène *PI3K*, possède une mutation activatrice dans 20-30% des tumeurs superficielles de la vessie de bas grade et de faible stade (**Lopez-Knowles et al., 2006** ; **Goebell et al., 2010**) Par opposition, ces mutations ont une prévalence très faible dans les tumeurs de vessie de haut grade et invasives. Ces mutations sont aussi retrouvées dans les néoplasmes urothéliaux papillaires à

potentiel malin incertain, ce qui suggère que la mutation de *PI3K*, survient précocement dans la carcinogénèse urothéliale. Il a été rapporté également que la mutation *PI3K*, est fortement associée à la mutation *FGFR3* (Lopez-Knowles *et al.*, 2006).

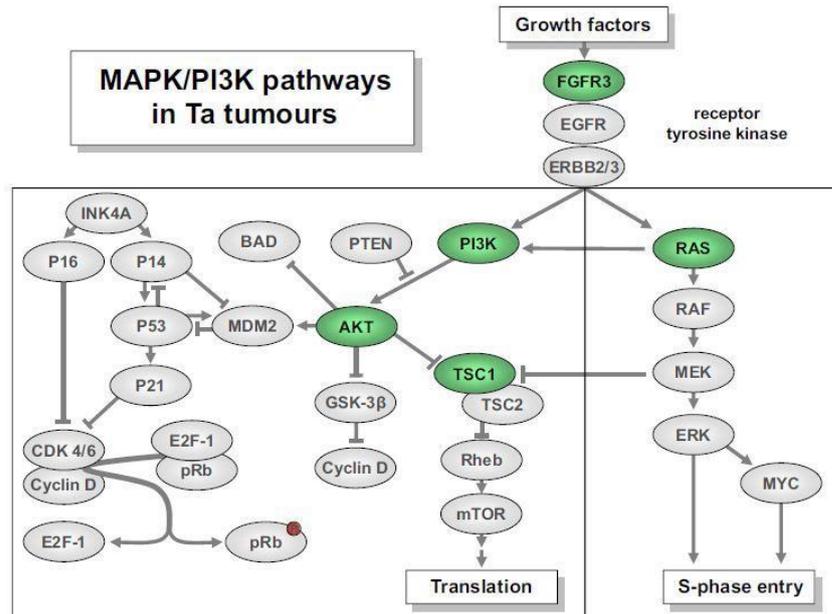


Figure 9 : Voie MAPK/PI3K dans les cancers de la vessie (Goebell *et al.*, 2010).

3.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs

3.2.1. Gène *P53*

La P53 ou TP 53 (Tumor Protein of 53 kDa), est une phosphoprotéine nucléaire de 393 acides aminés, dont le gène est localisé sur le bras court (p) du chromosome 17 au locus 17p13.1. La TP53, est une protéine exprimée sur toutes les cellules, elle possède une demi-vie très courte, et a pour rôle de bloquer le cycle cellulaire en phase G1 et d'activer l'apoptose, lorsque l'ADN est altéré et qu'il existe une possibilité de dégénérer en croissance non régulée ; la cellule potentiellement tumorale est donc détruite.

A l'opposé, la protéine mutée -dont la demi-vie est plus longue- n'a pas les mêmes propriétés anti-oncogènes ; elle permet à la cellule de croître anarchiquement en accumulant des mutations.

La mutation *TP53* jouerait un rôle central dans le développement et la progression du carcinome urothélial, avec environ 50% des TVIM qui contiendraient cette mutation contre seulement 25% dans les TVNIM. Ceci soulignerait donc le mauvais pronostic de cette mutation (Goebell *et al.*, 2010).

3.2.2. Gène *RB*

Localisé sur le bras long (q) du chromosome 13, au niveau du locus 13q14. Il code pour la protéine RB (rétinoblastome), dont la fonction est de se lier et d'inhiber le facteur de transcription E2F. Ce facteur de transcription, lorsqu'il est libre, a pour rôle de promouvoir la transcription de gènes indispensables à la continuité du cycle cellulaire.

Il est à noter que l'expression, et la fonction de RB sont fréquemment perdues dans différents types de cancers. Les personnes ayant des mutations germinales de *RB* présentent un risque accru de développer un carcinome épithélial, notamment celui de la vessie (**Fletcher et al., 2004**). La perte d'hétérozygotie du gène *RBI* est fréquente dans le cancer de la vessie (**Cairns et al., 1991**) entraînant dans 30 à 40 % de tumeurs invasives (**Lee & Droller, 2000**).

Ainsi le cancer de la vessie à stade avancé et/ou métastatique est caractérisé par des mutations des gènes *P53* et *RBI* (**Ouerhani et al., 2009 ; Neuzillet et al., 2012**).

3.2.3. Gène *PTEN*

Le gène *PTEN* (Phosphatase and TENsin homolog) situé sur le chromosome 10 code pour la protéine PTEN, impliquée dans la régulation négative de la voie *PI3K*, et apparaît donc comme un répresseur de la prolifération cellulaire (Figure 9). La protéine PTEN est une phosphatase impliquée dans la déphosphorylation du phosphatidil inositol tri-phosphate (PIP3). Le phosphatidil inositol bi-phosphate (PIP2) ainsi formé ne peut plus activer la voie *AKT*. La délétion du gène *PTEN* est fréquemment retrouvée dans les tumeurs invasives, mais rare dans les tumeurs non invasives (**Puzio-Kuter et al., 2009**).

3.3. Profil cytogénétique des tumeurs vésicales

Des instabilités génomiques ont été également rapportées. Alors que les tumeurs papillaires superficielles de bas grade apparaissent le plus souvent génétiquement stables, ne montrant pas d'autres anomalies que des pertes du chromosome 9 (**Habuchi et al., 1995**), les tumeurs invasives présentent de nombreux remaniements chromosomiques (**Tilborg, 2000**).

Il s'agit d'une instabilité chromosomique (CIN) entraînant des pertes d'hétérozygotie. **Yamamoto et al. (2007)** ont suggéré que la surexpression de BUB1 (budding uninhibited by benzimidazoles 1), protéine impliquée dans la régulation de la formation du fuseau mitotique, est associée avec cette instabilité chromosomique des tumeurs invasives.

L'anomalie la plus fréquente et la plus recherchée en cytogénétique est la délétion du chromosome 9 observée dans plus de 50 % des tumeurs (Goebell *et al.*, 2010). Les pertes d’hétérozygotie sont fréquemment retrouvées à la fois sur les bras court et long du chromosome 9. Elles touchent les régions 9p22.1, 9q22.3 et 9q32-33.1, sur lesquels on trouve les gènes suppresseurs de tumeurs *PTCH* (Patched gene) et *DBCCR1* (Deleted in Bladder Cancer Chromosome Region 1) (Wada *et al.*, 2003), mais aussi 9p21 sur lequel se trouve les locus des inhibiteurs de kinase cycline dépendants *CDKN2A* et *CKN2B*, et 9q34 sur lequel se trouve le gène *TSC1* (Tuberous Sclerosis 1) (Figure 10).

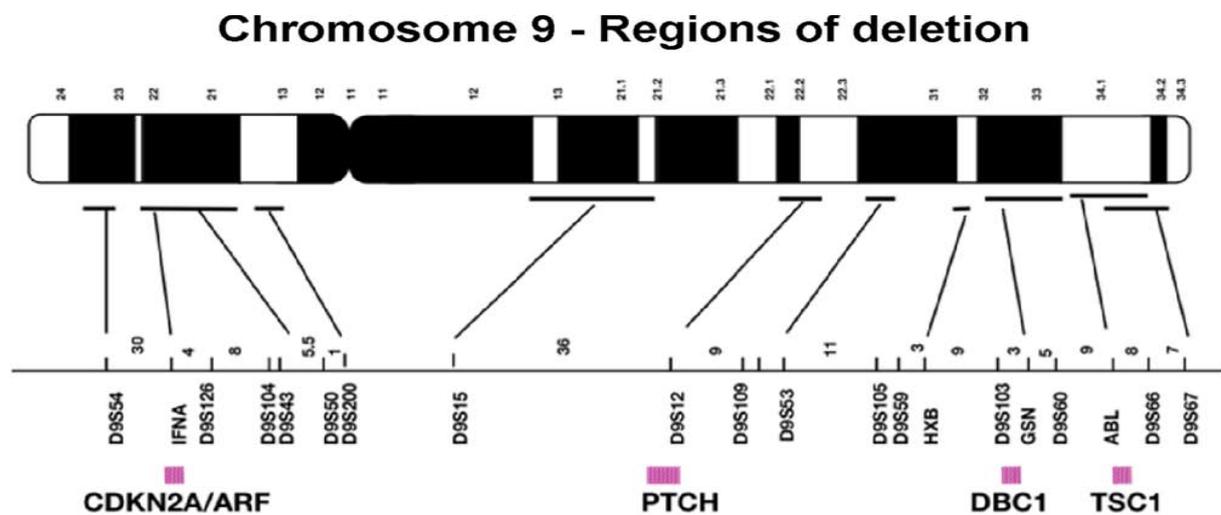


Figure 10 : Chromosome 9 et ses régions délétées (Goebell *et al.*, 2010).

Il est à noter que le locus *CDKN2A* code pour les protéines p16 et p14, et le locus *CDKN2B* code pour la protéine p15 (Pasin *et al.*, 2008). p16, p14 et p15 étant impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (Chapman *et al.*, 2005).

Le gène *TSC1* code pour une protéine nommée hamartin, qui interagit avec le produit du gène *TSC2* impliqué dans la voie de signalisation PI3Kinase/AKT en promouvant la régulation négative de mTOR, protéine centrale dans le contrôle de la synthèse protéique et de la croissance cellulaire (Pasin *et al.*, 2008). Des mutations du gène *TSC1* ont été identifiées dans 14,5% des tumeurs de vessie (Pymar *et al.*, 2008).

Il a été rapporté aussi que des gains ou délétions de matériel génétique ont également été mis en évidence sur plusieurs chromosomes. Ces régions contiendraient des oncogènes ou des suppresseurs qui par une sur-expression ou sous expression et/ou des mutations ponctuelles participent à la genèse du cancer vésical invasif. Selon les travaux de Claude & Jhuret. (2002),

le résultat de l'établissement de 120 caryotypes de tumeurs vésicales, a conduit à deux remarques :

- ✓ Aucune anomalie de structure spécifique de type translocation réciproque n'a été décrite
- ✓ Le profil cytogénétique globale est dominé par des pertes chromosomiques que des gains (Figure 11).

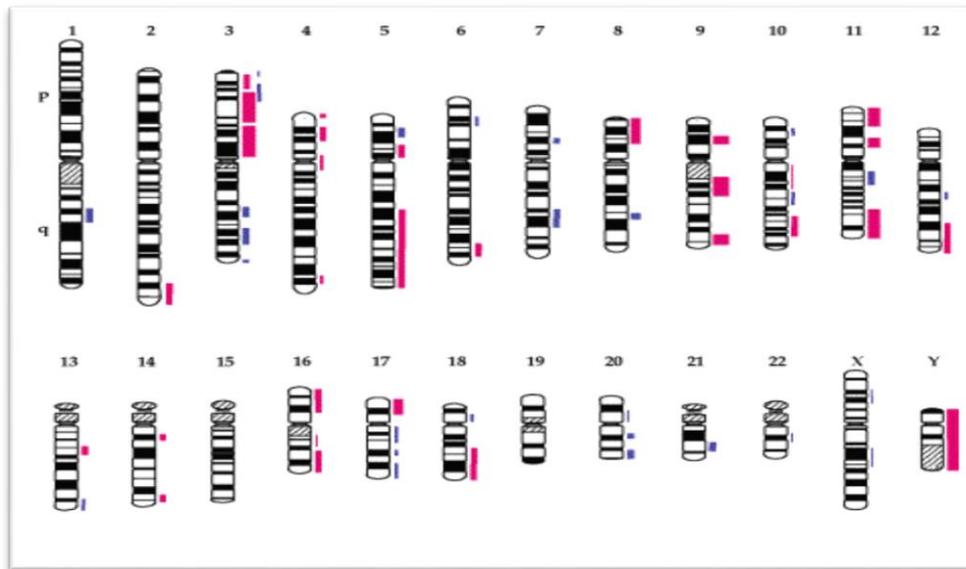


Figure 11 : Récapitulatif des anomalies chromosomiques dans les carcinomes de vessie (Claude & Jhuret, 2002).

Les anomalies chromosomiques ayant été décrites sont comme suit :

- ✓ **Chromosome 1** : caractérisé par une délétion 1p ; les bandes les plus souvent touchées sont 1p22 et 1q31. Des duplications 1q sont fréquemment retrouvées en CGH dans les stades et/ou grades avancés, et des amplifications en 1p32 et 1q21-24 ont été notées.
- ✓ **Chromosome 2** : caractérisé par des délétions 2q, en particulier dans les stades/grades avancés
- ✓ **Chromosome 3** : une amplification en 3p21-24 et/ou 3q24 a été notée. Avec des délétions 3p qui semblent associées à un haut grade/stade.
- ✓ **Chromosome 4** : des délétions ou pertes d'hétérozygotie en 4q, plus rarement en 4p au niveau des locus, 4p16 et 4q13-23. Une amplification en 4q26 a également été notée.
- ✓ **Chromosome 5** : un déséquilibre entre le nombre de copies de 5p et de 5q, souvent par formation d'un isochromosome i(5p) avec une perte d'hétérozygotie en 5p12-13, corrélée à une progression tumorale

- ✓ **Chromosome 6** : il existe une délétion 6q, qui pourrait être corrélée avec l'invasion tumorale. Une amplification a été trouvée par CGH en 6p22.
- ✓ **Chromosome 8** : une délétion 8p, les pertes d'hétérozygotie en 8p22 ou plus largement en 8p12 peuvent être associées à un haut grade/stade. Des gains de 8q pourraient, quant à eux, être associés à une progression tumorale, en particulier en 8q23.
- ✓ **Chromosome 10** : une délétion/perte d'hétérozygotie a été retrouvée en 10q23-25, avec des amplifications en 10p12-14 et en 10q13-14 sont possibles.
- ✓ **Chromosome 12** : une délétion 12q et une amplification de 12q13-15 et/ou 12q15-24 a été décrite.
- ✓ **Chromosome 14** : une délétion 14q, en particulier au niveau des bandes 14q12 et 14q32 semble associée à la progression tumorale.
- ✓ **Chromosome 18** : il existe une délétion ou perte d'hétérozygotie en 18q, corrélée avec le grade/stade et une amplification de 18q11 et/ou de 18q22.
- ✓ **Chromosome 20** : une duplication 20q, et, moins souvent 20p, corrélée avec le stade/grade.
- ✓ **Chromosome 21** : une délétion du 21q comme seule anomalie a été décrite dans 2 tumeurs.
- ✓ **Chromosome 22** : il existe une amplification possible en 22q11-12.
- ✓ **Chromosome Y** : la perte de l'Y est fréquente (30 % des cas) et ne semble, finalement, pas associée au stade, au grade.

La complexification du caryotype est progressive : les remaniements de structure, de nombre, de ploïdie s'accumulent. Le passage à la tétraploïdie est un phénomène secondaire, associé aux tumeurs de haut grade. Il existe des tumeurs pseudo-octoploïdes (**Claude & Jhuret, 2002**).

Par ailleurs, ces dernières années le groupement de chercheur TCGA (The Cancer Genome Atlas) (TCGA, 2014) a également identifié 2529 aberrations structurales et plus de 1000 fusions de gènes incluant des translocations pouvant favoriser le développement et la progression du cancer. Parmi ces dernières, dans le cas des cancers vésicaux, le *FGFR3* est retrouvé fréquemment dans les translocations notamment avec *TACC3*, un gène jouant un rôle dans la stabilisation des microtubules durant la mitose. La fusion *FGFR3-TACC3* induit l'activation constitutive de *FGFR3*, générant l'activation de la voie des MAP-kinase et la prolifération

cellulaire. Nous signalons que le gène *TACC3* a été étudié par notre équipe de recherche et a fait l'objet d'un article soumis (**Hireche et al., 2019**).

3.4. Altérations épigénétiques

Des modifications épigénétiques, notamment des changements dans la méthylation de l'ADN, la modification des histones et le remodelage de la chromatine ont également été rapportés dans les tumeurs de vessie. Ainsi un grand nombre de mutations somatiques dans les gènes de remodelage de la chromatine ont été retrouvés dans les carcinomes urothéliaux (59%) tels que *KDM6A* (Lysine Déméthylase 6A) aussi connu sous le nom de *UTX* (Ubiquitously Transcribed X Chromosome), qui joue le rôle de déméthylase (déméthylase de H3K27Me2 et H3K27Me3) clé dans le code des histones et qui est fréquemment muté (mutation inactivatrice) dans les tumeurs de vessie (**TCGA, 2014 ; Glaser et al., 2017**). 34% des tumeurs présentent des îlots CpG, contenant les gènes suppresseurs de tumeurs, hyperméthylés, induisant la répression de ces gènes (**Lauss et al., 2012**). D'après les travaux du TCGA, 76% des tumeurs analysées renfermeraient aussi des mutations non-sens dans les gènes de remodelage de la chromatine (**TCGA, 2014**).

3.5. Gènes d'intérêts

3.5.1. Gènes de détoxification : les N-acétyltransférases

Les arylamine-N-acétyltransférases (NAT) sont une famille unique d'enzymes impliqués dans la phase II de biotransformation des xénobiotiques (**Weber & Hein, 1985**). Deux isoenzymes des NATs, NAT1 et NAT2, ont été identifiées chez l'homme. Elles agissent comme des enzymes importantes dans la voie métabolique des amines primaires, des hydrazides, hydrazines et des xénobiotiques contenant des amines aromatiques par *N*- et/ou *O*-acétylation (**Lang et al., 1994**).

3.5.1.1. Mécanisme de détoxification

La métabolisation des amines aromatiques et des carcinogènes hétérocycliques par les NATs correspond à une activation ou une détoxification de ces xénobiotiques.

Les NATs acétylent les composés arylamines, arylhydrazines et arylhydroxylamines, en utilisant l'acétylcoenzyme A (acétylCoA) (**Weber & Hein, 1985**) comme cofacteur. Ils

catalysent le transfert d'un groupement acétyl issu de l'acétylcoenzyme A, sur l'azote du groupement amine primaire (-NH₂) ou hydrazine (-NH-NH₂) d'une molécule aromatique ou arylamine receveuse. Le produit formé est une arylamide. En plus des réactions de *N*-acétylation, les NATs peuvent catalyser la *O*-acétylation de substrats aromatiques *N*-hydroxylés, ainsi que la *N*-, *O*-transacétylation intramolécule de composés *N*-hydroxylés et *N*-acétylés. La *N*-acétylation est considérée de façon générale comme exerçant une détoxication relative des arylamines puisque cette réaction les rend en effet moins actives, alors que la *O*-acétylation serait plutôt activatrice (Figure 12).

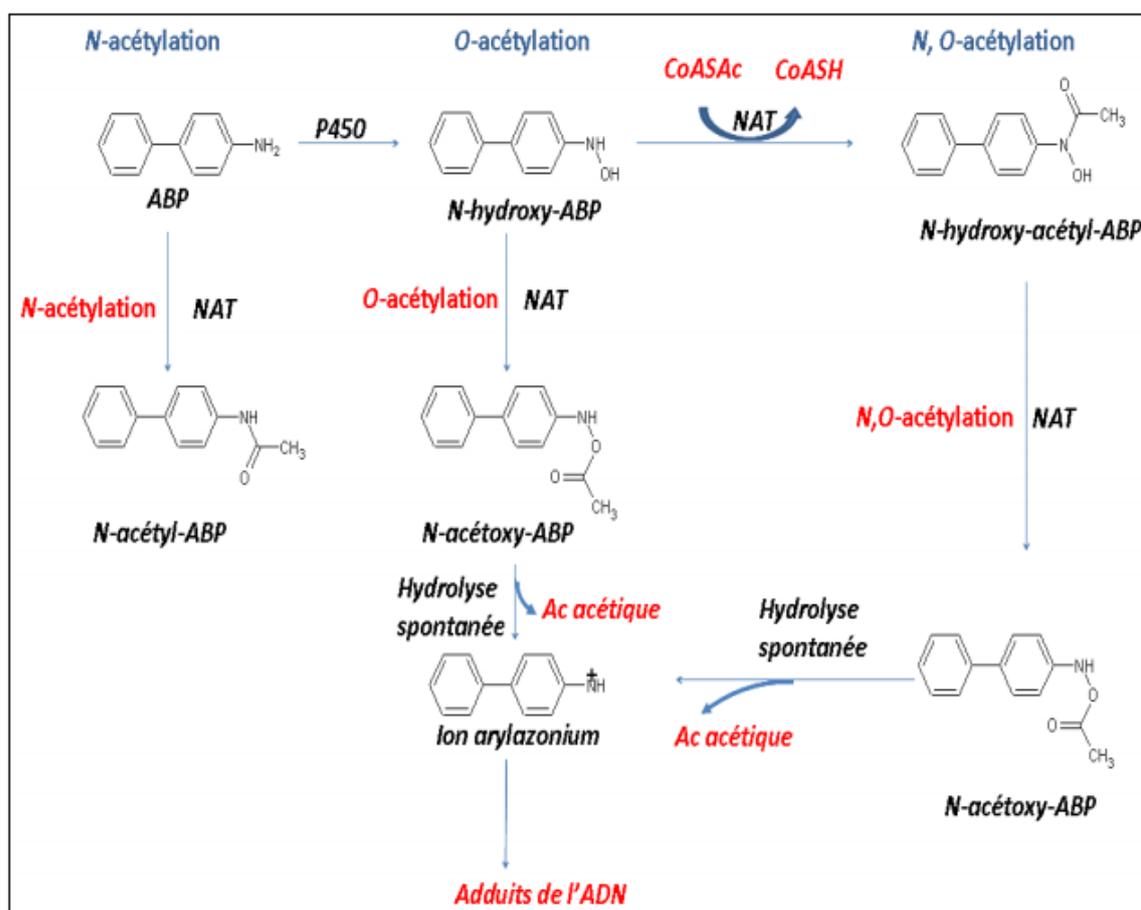


Figure 12 : Activation et inactivation des arylamines par *N*-acétylation, *O*-acétylation, et *N*-, *O*-acétylation catalysées par la NAT2. Ces réactions sont représentées pour le cancérigène ABP (arylamine 4-aminobiphényle), conduisant finalement à la formation d'électrophiles hautement réactifs qui se lient à l'ADN et pouvant entraîner des phénomènes de mutagénèse et de cancérogénèse (Hein *et al.*, 1992).

3.5.1.2. *NAT2* gène et enzyme

✓ Localisation et structure du gène :

Le gène *NAT2* appartient à la famille des N-acétyltransférases qui comprend trois gènes dont *NAT1*, *NAT2* et *NATp*. *NAT1* et *NAT2* sont deux gènes codant pour des enzymes actives, contrairement à *NATp* qui est un pseudogène, et qui n'est pas transcrit en protéine (Boukouvala & Fakis, 2005 ; Westwood *et al.*, 2006 ; Minchin *et al.*, 2007 ; Sim *et al.*, 2007 et 2008).

Le gène *NAT2* est localisé sur le bras court du chromosome 8 et plus précisément au niveau de la région 8p22, en aval du pseudogène *NATp* qui est lui-même précédé par le gène *NAT1* avec une distance de 25 kb séparant les deux gènes *NAT1* et *NAT2* l'un de l'autre (Toure *et al.*, 2012 ; Di Pietro *et al.*, 2012) (Figure 13).

NAT2 a une taille de 31 kDa et est codée par deux exons dont seul l'exon 2 qui est réparti sur 870 pb est transcrit en une protéine de 290 acides aminés. Avec *NAT1*, il partage 87 % d'homologie nucléotidique dans la région codante, ce qui se traduit par 81 % d'homologie au niveau de la séquence des acides aminés (Grant *et al.*, 1983 ; Blum *et al.*, 1990).

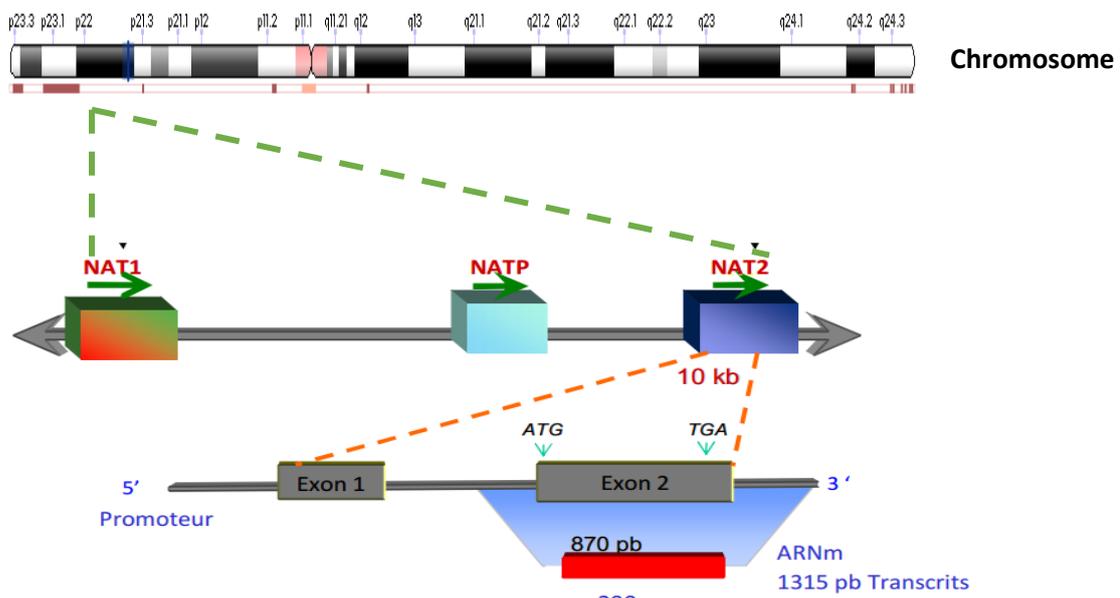


Figure 13 : Localisation et structure du gène *NAT2*.

✓ Polymorphismes génétiques du gène *NAT2*

De nos jours, il est bien connu que le gène *NAT2* est polymorphe et son polymorphisme génétique a bien été identifié chez plusieurs espèces y compris l'homme.

En effet, plus de 25 polymorphismes dans la séquence codante du gène humains *NAT2* ont été mis en évidence à travers les différentes populations, dont treize substitutions nucléotidiques ou SNPs ponctuelles sont les plus importants (c.191G>A, c.341T>C, c.590G>A, c.857G>A, c.803A>G, c.282C>T, c.481C>T, c.345C>T, c.403C>G, c.434A>C, c.481C>T, c.638G>A, c.838G>A) (Hein, 2002 ; Di Pietro *et al.*, 2012), puisque les autres SNP ont été retrouvés à des fréquences faibles chez certains groupes ethniques. En effet, dépendant de la nature de ces variations génétiques, l'activité enzymatique est affectée décrivant ainsi trois phénotypes différents de la N-acétyltransférase : lent, rapide et intermédiaire (Sanderson *et al.*, 2007 ; Song *et al.*, 2009 ; Guaoua *et al.*, 2014).

Selon le consensus de la nomenclature du gène *NAT2* humain, la combinaison de d'un ou de quatre SNPs présents dans le même allèle caractérise les variants alléliques (Vatsis *et al.*, 1995 ; Hein *et al.*, 2000 ; Boukouvala, 2016). Ainsi, 36 variants alléliques du gène *NAT2* existent selon la base de données sur la nomenclature des *NATs* (Khedhiri *et al.*, 2010 ; Di Pietro *et al.*, 2012).

Il est intéressant de souligner que l'ensemble des allèles du *NAT2* connus sont issus de la combinaison d'une vingtaine d'SNPs seulement, situés aux positions 111, 190, 191, 282, 341, 345, 364, 403, 411, 434, 481, 499, 590, 638, 759, 803, 838, 845, 857 et 859 de la région codante de la *NAT2* (Boukouvala, 2016). Parmi ces allèles, treize sont considérés comme majeurs, c'est-à-dire rencontrés à des fréquences significatives dans plusieurs populations (Hein, 2002).

*NAT2*4* est considéré comme l'allèle sauvage, et est associé au phénotype d'acétylation rapide. Il est l'allèle intacte qui ne présente aucun polymorphisme au sein de sa séquence nucléotidique (Hein *et al.*, 2000 ; Walker *et al.*, 2009 ; Toure *et al.*, 2012). En fait, les individus homozygotes pour l'allèle lent, sont considérés comme acétylateurs lent, les individus homozygotes pour l'allèle rapide sont considérés comme acétylateurs rapide, alors que les individus hétérozygotes possédant un allèle lent et un allèle rapide sont considérés comme acétylateurs intermédiaire (Hein, 2006).

Une très grande variation selon l'origine ethnique caractérise les différents polymorphismes - et donc formes alléliques- à travers les populations. C'est ainsi que les populations caucasiennes comptent en moyenne des proportions équivalentes d'acétylateurs rapides, intermédiaire et lents, alors que les populations Nord-africaines comptent parmi les plus riches en acétylateurs lents (Hein, 2002).

De nombreuses études ont analysés la relation entre l'acétylation lente et le risque du cancer de la vessie, cependant, les résultats sont controversés à travers les populations (**Vatsis *et al.*, 1995** ; **Hein, 2002** ; **García-Closas *et al.*, 2005** ; **Sanderson *et al.*, 2007**).

✓ Protéine NAT2

Sujette à un polymorphisme génétique, l'expression de la protéine NAT2 est trimodale : lente, rapide ou intermédiaire, tout dépend de sa vitesse de dégradation des substances qui lui sont soumises. Chez les individus de type acétyleur rapide, la NAT2 est exprimée dans le foie en quantité supérieure -comparée à celle de la NAT1- (12 fois environ). Chez les acétyleurs lents, les contenus hépatiques en enzymes NAT1 et NAT2 seraient par contre comparables (activité NAT2 jusqu'à deux fois plus forte seulement) (**Hein *et al.*, 1993**).

Chez l'Homme, l'enzyme présente une triade catalytique située au niveau de la partie N-Terminale. Elle est composée de la cystéine 68, de l'histidine et de l'aspartate (Cys-His-Asp). Des analyses structurales ont permis de distinguer trois domaines au niveau de la protéine NAT2 (**Butcher *et al.*, 2002** ; **Walraven *et al.*, 2008**) (Figure 14).

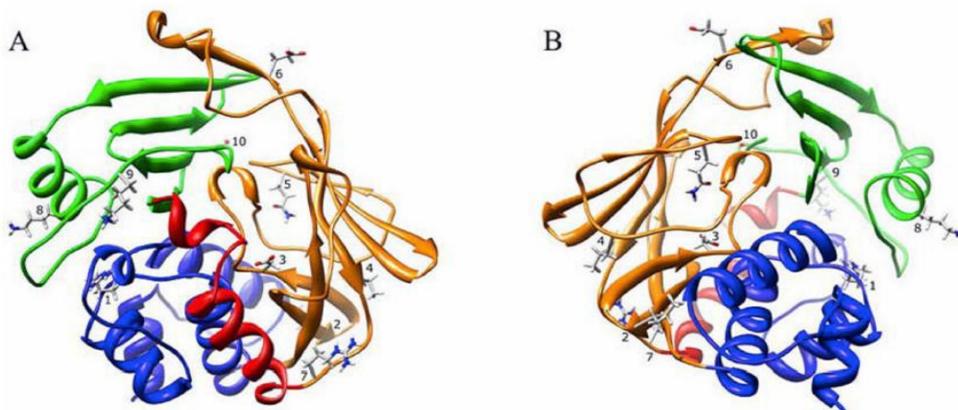


Figure 14 : Structure tridimensionnelle de la NAT2 humaine : diagramme en ruban.

La couleur du ruban indique les domaines protéiques de la NAT2 : domaine I (bleu), la région interdomaine (rouge), domaine II (orange), et le domaine III (vert). Deux orientations sont représentées, une sur le site d'entrée de substrat dans le site actif (A) et l'autre sur la face arrière de la structure (B) (**Walraven *et al.*, 2008**).

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

- Le deuxième domaine s'étend de l'acide aminé 90 jusqu'à l'acide aminé 210. Il forme l'autre partie de la crevasse et se présente essentiellement sous forme de bâtonnet β . Cette zone est spécifique de l'enzyme NAT2.
- Le dernier domaine intéresse particulièrement le groupement carboxyle. Il est formé d'une combinaison entre des hélices α et des bâtonnets β . C'est le domaine le plus diversifié entre les espèces.

3.5.2. Gène de réparation de l'ADN : Xeroderma pigmentosum complémentation groupe C (XPC)

Les mécanismes de réparation de l'ADN jouent un rôle crucial dans la préservation de l'intégrité du génome. Ils permettent également de lutter contre les dommages de l'ADN induits par une grande majorité d'agents endogènes et exogènes.

3.5.2.1. Mécanisme de réparation par NER

Le système de réparation par excision nucléotidique (NER : *Nucléotide- Excision Repair*) est l'un des les différentes voies existantes pour réparer le génome humain. Bien que son existence soit probablement liée à la réparation des lésions de l'ADN induites par les rayonnements ultraviolets de la lumière solaire, ce système est capable de reconnaître une grande variété d'adduits volumineux induits par des carcinogènes d'origine environnementale ou médicamenteuse.

Le NER fait intervenir un très grand nombre de protéines incluant les protéines XP (A à G) dont la déficience chez l'homme provoque une maladie récessive rare appelée xeroderma pigmentosum, qui se caractérise par une hypersensibilité aux rayons ultraviolets de la lumière solaire et une prédisposition de développer le cancer de la peau (**Sak et al., 2005 ; Xiao et al., 2010**).

Le NER repose sur deux voies : le GG-NER (Global Genome-NER), qui répare les lésions de l'ADN indépendamment de leur localisation dans le génome, et le TC-NER (Transcription-Coupled-NER) qui est induit par la présence de lésions au niveau des régions transcrites de l'ADN (**Figure 15**). Seules les étapes de reconnaissance de la lésion varient entre ces deux voies. Dans le GG-NER, c'est le complexe formé par XPC et hHR23B (Rad23 homolog B) qui reconnaît la distorsion de l'ADN associée à la lésion, alors que dans le TC-NER, le mécanisme est induit par l'arrêt de la progression de l'ARN polymérase II au

niveau de la lésion sur le brin transcrit et fait intervenir deux facteurs spécifiques, CSA et CSB (pour Cockayne syndrome A et B) (**Fousteri & Mullenders, 2008**). Il est à signaler que certains auteurs ont rapporté l'implication d'une autre protéine nommée la centrine 2 avec le complexe XPC-hHR23B dans la reconnaissance de la lésion dans la voie GG-NER (**Nishi *et al.*, 2005, Schäfer *et al.*, 2013**).

Dans les deux cas, le maintien de l'ouverture de la double hélice d'ADN est assuré par les deux hélicases XPD et XPB faisant partie de la dizaine de facteurs du complexe TFIIH. Cela rend la lésion accessible aux autres facteurs du NER et permet le recrutement du complexe XPA-RPA et de l'endonucléase XPG. XPA reconnaît et vérifie la présence de la lésion, RPA (Replication Protein A) se lie à l'ADN simple brin non endommagé et XPG incise le brin endommagé en 3' de la lésion. Dans un deuxième temps, l'endonucléase XPF, en association avec le facteur ERCC1 (Excision Repair Cross Complementation group1), réalise la coupure de l'ADN endommagé en 5' de la lésion et libère un fragment de 24 à 32 bases. L'ADN polymérase et l'ADN ligase sont alors recrutées pour effectuer une nouvelle synthèse de brin et restaurer la continuité de l'ADN (**Pourquier, 2006**).

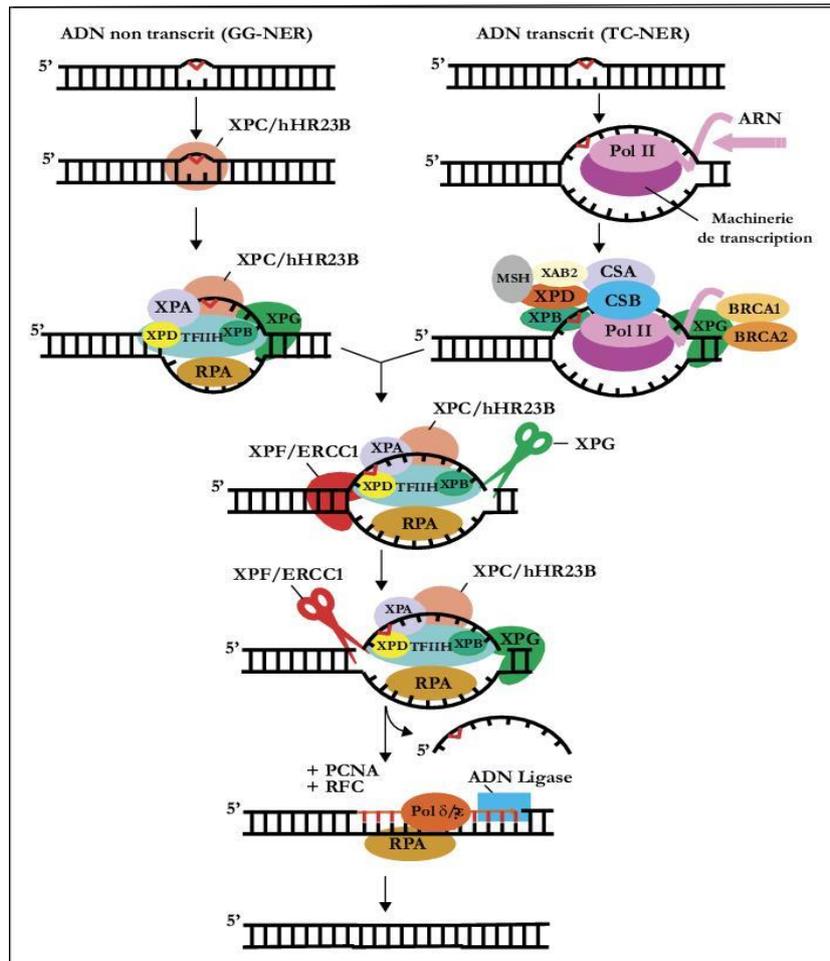


Figure 15 : Mécanisme de réparation par excision de nucléotides (NER). Il existe deux voies du NER selon que la lésion se trouve dans l'ADN non transcrit (GG-NER) ou l'ADN transcrit (TC-NER) (Pourquier, 2006).

Plusieurs études dans la littérature ont rapporté la relation existante entre les gènes de la famille *XP*, notamment les différents polymorphismes du gène *XPC* et le cancer de la vessie. Cependant les résultats sont controversés (Dou *et al.*, 2013 ; Dai *et al.*, 2014 ; Sankhwar *et al.*, 2016).

3.5.2.2. *XPC* gène et enzyme

✓ Localisation et structure du gène

Le gène *XPC* l'un des gènes de la famille *XP* qui regroupe huit (8) gènes, nommés selon leur chronologie de découverte : A, B, C, D, E, F et G, et *XPV*. L'*XP* du groupe C est le plus

fréquent, et sa prévalence prédomine dans les pays méditerranéens et Nord-Africains (**Pourquier, 2006**).

Le gène *XPC* est localisé sur le bras court du chromosome 3 et plus précisément au niveau de la région 3p25.1, et comprend 18 exons au total (Figure 16).

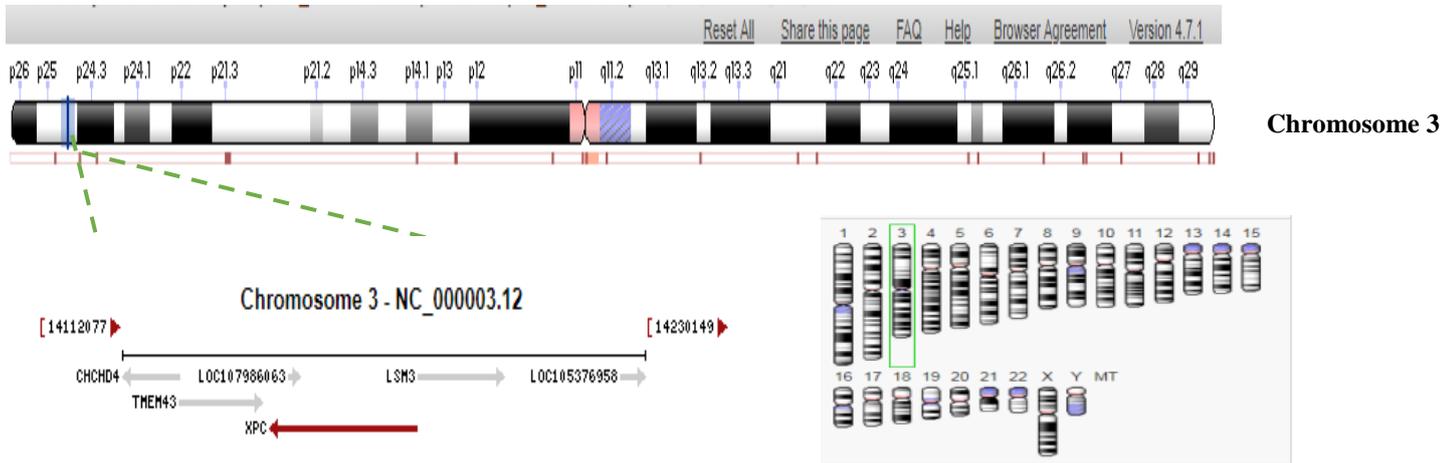


Figure 16 : Structure et localisation du gène *XPC*.

✓ **Polymorphismes génétiques de l’*XPC* :**

En raison du rôle de l’*XPC* dans la réparation de l’ADN et des conséquences biologiques des variations de ce gène, un intérêt significatif s’est porté sur la recherche de polymorphismes afin d’identifier des rôles potentiels dans la prédisposition au cancer de la peau mais également à d’autres types de cancer y compris le cancer de la vessie. Divers polymorphismes dont Ala944Val et Lys939Gln ont été investigués à la recherche de l’impact que peuvent porter ces mutations sur le cancer de la vessie. Plusieurs études cas témoins, méta-analyses et TSA (Trial Sequential Analysis) ont montré l’implication du polymorphisme Ala944Val dans l’étiologie du cancer de la vessie notamment chez les Européens (**Sak et al., 2006 ; De verdier et al., 2010 ; Sankhwar et al., 2016**). Par ailleurs, d’après l’analyse TSA et la méta-analyse de **Sankhwar et al. (2016)**, le polymorphisme Lys939Gln ne semble pas être un facteur de risque de ce type de cancer quel que soit le groupe ethnique. Peu d’études cas témoins ont rapporté son implication (**Wen et al., 2009 ; De verdier et al., 2010 ; Rouissi et al., 2011**).

✓ **Protéine XPC :**

La protéine XPC est constituée de 940 acides aminés et est d'une taille de 125 kDa. Elle existe sous la forme d'un hétérotrimère avec les protéines Rad23B et la centrine 2 (Araki *et al.*, 2001).

Ce complexe est essentiel pour le recrutement des autres composants de la machinerie NER, pour former le complexe de pré-incision de l'ADN (Wood *et al.*, 2005). La centrine 2 et Rad23B permettent de stabiliser le complexe, inhibent la polyubiquitination de XPC et le protègent de la dégradation par le protéasome (Ng *et al.*, 2003).

Le complexe XPC/Rad23B reconnaît les photoproduits, des cross-links intra-brin ADN-cisplatine, les mono-adduits de psoralène mais également des cross-links inter-brin en coopération avec XPA (Thoma *et al.*, 2005). Pour accomplir son rôle dans la reconnaissance des lésions et le déclenchement du NER, la protéine XPC doit interagir avec différents domaines et facteurs protéiques, tous situés dans sa partie C-terminale (Uchida *et al.*, 2002 ; Popescu *et al.*, 2003) (Figure 17).

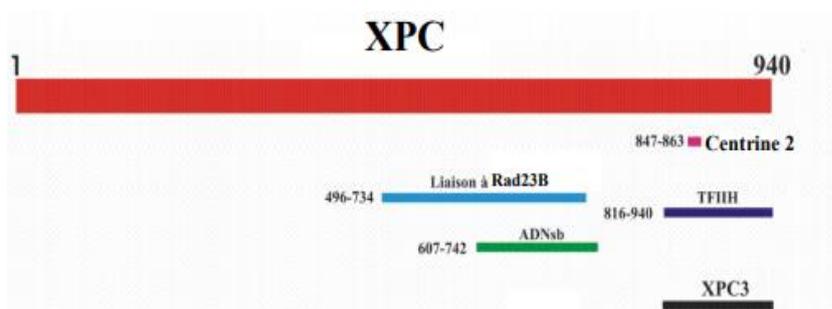


Figure 17 : Domaines d'interaction entre l'XPC et l'ADN ou ses partenaires protéiques. *Ils sont situés dans la moitié C-terminale de XPC. Les domaines de liaison à Rad23B et l'ADN se chevauchent, ainsi que les domaines d'interaction avec la centrine 2 et TFIIH. XPC3 : peptide utilisé pour l'obtention d'anticorps anti-XPC (Renaud, 2008).*

Il est à noter que le complexe XPC/Rad23B présente une certaine affinité pour l'ADN sain, et celle-ci augmente d'un facteur 400 quand l'ADN est endommagé (Batty *et al.*, 2000).

Partie pratique

1. Population d'étude

L'étude entreprise est transversale de type cas-témoins ; elle a porté sur **364** individus non apparentés. Tous les sujets sont originaires du Nord Algérien, âgés de 24 à 90 ans. La population d'étude est subdivisée en deux groupes :

1.1. Groupe des patients

Ce groupe est composé de **175** patients (**165** hommes et **10** femmes) diagnostiqués porteurs de tumeurs vésicales (TV) de différents stades et grades de sévérité et ayant subis soit une cystectomie soit une résection trans-urétrale de la vessie. Ces patients ont été recrutés au sein des départements d'Urologie de la Clinique Rénale Daksi de Constantine et du Centre Hospitalier Universitaire de Tizi-Ouzou, entre Janvier 2014 et Mai 2016. Tous les cas présentaient un compte rendu anatomopathologique confirmant le diagnostic avec précision du stade -selon la classification TNM de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC ; 1997)- et du grade -selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS ; 1973)- de la tumeur. Seuls ont été exclus de l'étude les sujets métastatiques ou ayant subis une transfusion sanguine.

1.2. Groupe des témoins

Les **189** témoins inclus dans cette étude sont des sujets présumés sains des deux sexes, recrutés de façon aléatoire dans les différents milieux professionnels avec exclusion de tout sujet présentant un antécédent familial d'un type de cancer. Ces témoins ont été appariés selon l'âge le sexe et l'origine avec les patients.

Un consentement éclairé a été signé par tous les patients et les témoins ayant participé dans cette recherche, après lecture et explication nous autorisant à utiliser leur matériel génétique (Annexe 2).

2. Etude épidémiologique

Un questionnaire détaillé a été établi et complété pour tous les patients suite à une étude exhaustive des dossiers médicaux, ainsi que des informations obtenus directement des patients ou de leurs médecins traitants (Annexe 3).

L'objectif de cette étude est d'établir la répartition des patients selon les paramètres étudiés (l'âge, le sexe, l'origine géographique, le statut tabagique, l'exposition aux risques

professionnels, le stade et le grade tumoral) dont le but est de déceler lequel de ces facteurs est impliqué dans la carcinogénèse vésicale.

Dans le cadre de l'étude cas-témoins, la traçabilité de chaque sujet témoin a été également enregistrée en utilisant un questionnaire (Annexe 4).

3. Etude moléculaire

L'extraction de l'ADN s'est réalisée au niveau du laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire de l'Université Constantine 3. L'analyse moléculaire comprenant le séquençage du gène *NAT2*, l'étude des différents variants qui lui sont associés ainsi que le séquençage et la PCR en temps réel du polymorphisme Lys939Gln du gène *XPC* s'est déroulée au niveau de la plateforme de Biologie Moléculaire de l'institut Curie, Paris, France.

3.1. Extraction de l'ADN génomique

Les prélèvements sanguins préconisés pour l'extraction de l'ADN génomique ont été recueillis dans des conditions stériles par ponction veineuse dans des tubes vacutainer EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétracétique), en quantité de 5 à 10 ml. L'ADN génomique est ensuite extrait à partir des leucocytes en utilisant la méthode d'extraction au NaCl « *salting out* » (**Miller et al., 1988**).

3.1.1. Principe

Les leucocytes sont séparés du sang total par lyse hypotonique des globules rouges ; ils seront ensuite traités en premier lieu par l' SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) qui possède une action lytique sur les membranes cellulaires, dénature les protéines par destruction de leur structure tertiaire et inhibe l'action des nucléases. L'ADN des leucocytes ainsi libéré est ensuite traité par la protéinase K qui le débarrasse de toutes les protéines qui lui sont associées. Ces dernières sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl hautement concentré. Suite à l'ajout de l'éthanol pur, l'ADN est précipité sous forme de filaments blanchâtres formant une pelote appelée méduse. Enfin, après séchage à température ambiante l'ADN pur est solubilisé en phase aqueuse (eau stérile bidistillée) (Annexe 5).

3.1.2. Contrôle de qualité de l'ADN et estimation de sa concentration

Pour éviter tout doute et réserve dans l'interprétation des résultats, il convient dès le départ de s'assurer de la pureté des différents extraits d'ADN en mesurant l'absorbance pour

chaque échantillon à une longueur d'onde de 260nm et aussi de 280nm, à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop (Thermo Scientific, France). En effet les acides nucléiques absorbent aussi bien à 260nm qu'à 280nm mais ont un spectre d'absorption maximum en UV à 260nm, alors que les protéines qui représentent les témoins de contamination absorbent à 280nm (longueur d'onde d'absorption des protéines).

Avoir un ADN pur signifie que le rapport (R) des densités optiques (DO): $R = DO_{260nm} / DO_{280nm}$ soit compris entre 1,6 et 2 ($1,6 < R \leq 2$). Un rapport $< 1,6$ témoigne une contamination par les protéines et un rapport > 2 indique une contamination par les ARN. Par ailleurs, la DO est aussi déterminée à 270 nm et le rapport DO_{260nm} / DO_{270nm} est calculé pour s'assurer que la solution contient peu ou pas d'alcool résiduel. Pour cela, le rapport doit être inférieur à 1 ($R < 1$).

La concentration des ADN extrait est estimée par la mesure de l'absorbance à 260nm. Sachant qu'une unité de DO à 260nm est équivalente à 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ d'ADN, il est possible d'évaluer la quantité d'ADN d'un échantillon par la formule : facteur de dilution x 50 x DO_{260} .

Les ADN purs sont conservés à + 4°C jusqu'à utilisation (ou congelés à - 20°C dans le but de les conservés pour une longue durée).

3.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)-Séquençage du gène NAT2

L'identification des différents polymorphismes du gène NAT2 (OMIM : 612182) au sein des deux populations d'étude (cas et témoins) a été réalisée par la technique de PCR-séquençage directe. Ces analyses ont été complétées par l'étude des différentes combinaisons existantes entre les SNPs (Single Nucleotid Polymorphisms) obtenus permettant ainsi de déterminer les différents allèles NAT2, de prédire les phénotypes NAT2 et de classer les sujets en acétyleurs lents, intermédiaires ou rapides selon les combinaisons des différents variants du gène d'intérêt.

3.2.1. Principe du séquençage

Le séquençage utilisé dans notre travail repose sur le principe de la méthode enzymatique de Sanger (**Sanger *et al.*, 1977**). Cette méthode consiste en la synthèse d'un brin d'ADN, à partir de la séquence que l'on veut explorer, par une Taq polymérase d'une haute-fidélité. L'enzyme polymérise à partir de l'extrémité 3' d'une amorce, ajoutant des nucléotides complémentaires de ceux du brin d'ADN qu'elle copie, avec pour substrats des désoxynucléotides triphosphates normaux (dNTP) mélangés avec des didésoxy nucléotides

(ddNTP). Un ddNTP diffère d'un dNTP, par l'absence du groupe hydroxyle (OH, nécessaire à l'extension) et la présence d'hydrogène (H) en position 3' du carbone (empêchant alors la poursuite de l'élongation). Il en résulte un mélange de fragments de taille croissante, se terminant tous au niveau d'un des ddNTP.

Les ddNTP incorporés sont marqués spécifiquement par des molécules fluorescentes. Les fragments synthétisés sont alors séparés dans un séquenceur en fonction de leur longueur et identifiés grâce à une lecture par laser, permettant après extraction et analyse des données d'obtenir des électrophorégrammes ensuite traduits en séquences (Tracy & Mulcahy, 1991).

3.2.2. Mode opératoire

La réalisation du séquençage passe par trois étapes : l'amplification du fragment du gène d'intérêt par PCR, la purification du produit PCR, la réalisation d'une PCR séquence par marquage du fragment purifié.

3.2.2.1. Amplification par PCR du fragment à séquencer

Pour une réaction de séquençage par la méthode de Sanger sur le gène *NAT2*, un fragment de 771 pb couvrant la région codante du gène *NAT2* a été amplifié par réaction de polymérisation en chaîne PCR. Une paire d'amorces sens et antisens a été conçue (Tableau 4) par le biais du logiciel Primer3 afin de réaliser cette amplification.

Tableau 4 : Amorces utilisées pour l'amplification du gène *NAT2*

Gène	Noms	Séquences des amorces 5' → 3'	Orientation
<i>NAT2</i>	<i>NAT2</i> Forward	5'- CATGGAGTTGGGCTTAGAGG-3'	Sens
	<i>NAT2</i> Reverse	5'-GGGTGATACATACACAAGGGTTT-3'	Antisens

Un total de 364 échantillons d'ADN a été amplifié. Pour chaque échantillon, la PCR a été réalisée dans un mélange réactionnel d'un volume final de 20 µl (Tableau 5).

35 cycles ont été réalisés dans un thermocycleur (Mastercycler pro, Eppendorf, France). Chaque cycle repose sur trois étapes indispensables : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation avec les conditions décrites sur le Tableau 6. Des témoins négatifs ont permis de contrôler l'absence de contamination pendant la manipulation.

Tableau 5 : Milieu réactionnel pour l'amplification du gène *NAT2*.

Réactifs	[C] initiale	[C] finale	Volume initial (µl)
Tampon	10X	1X	2
dNTP	1mM	0,2mM	4
Oligos F	5 µM	0,3 µM	1,2
Oligos R	5 µM	0,3 µM	1,2
Taq Hotstar	5 U/µl	0,05 U/µl	0,2
ADN ng	10 ng/µl	20 ng	2
H ₂ O	qsp 20µl		10,6

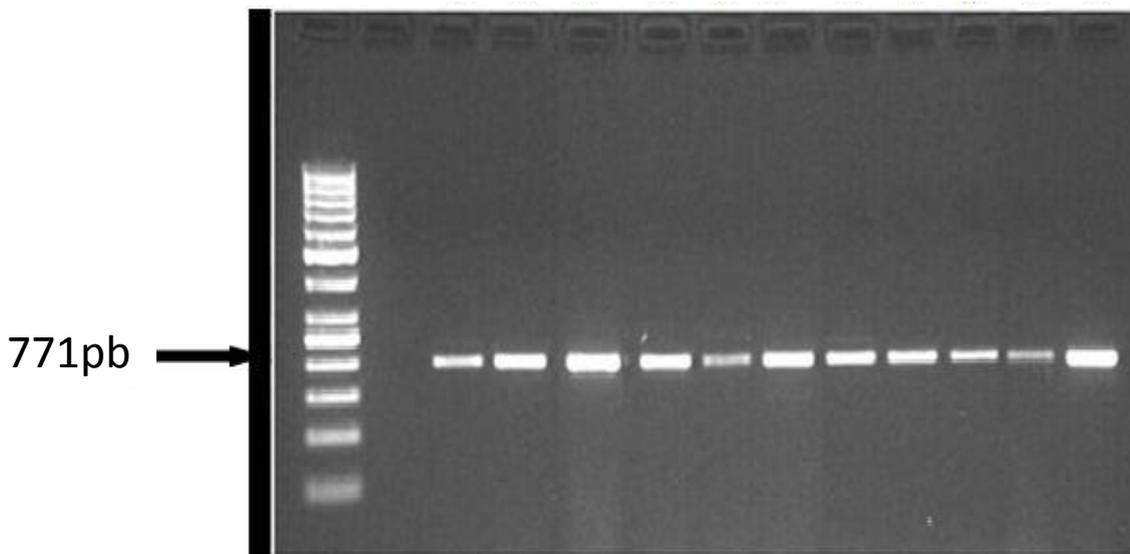
Tableau 6 : Conditions optimisées du programme PCR de la *NAT2*

Etape de la PCR	Température	Durée
Dénaturation initiale	94 °C	10 min
Dénaturation	94 °C	1 min
Hybridation	56 °C	30 sec
Extension	72 °C	1 min
Elongation finale	72 °C	10 min

} 35 cycles

3.2.2.2. Contrôle des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose

Le contrôle de la taille des fragments amplifiés s'est effectué par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 %. Ce dernier est préparé par mélange de 1,5 g d'agarose avec 100 ml de TBE1X (Tampon Tris-Borate-EDTA) et 4 µl de SybrSafe. Dans chaque puits du gel, ont été déposés : 5 µl de produit d'amplification + 1 µl de Bleu/Orange 6x loading Dye de promega, ce dernier permet de suivre le front de migration. On dépose également 5 µl d'un marqueur de taille (DNA leader 100-1500 pb de promega). La cuve d'électrophorèse est ensuite soumise à un champ électrique de 100V/mA pendant 10 min. Après la migration électrophorétique, le gel est soumis aux rayons UV permettant ainsi la visualisation des fragments amplifiés (Photographie 1).



Photographie 1 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des fragments amplifiés par PCR.

3.2.2.3. Purification enzymatique des amplicons

Cette étape a été réalisée grâce à l'ExoSAP-IT (GE HEALTHCARE) composé de deux enzymes hydrolytiques : l'exonucléase I et la SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase). Ce mélange enzymatique permet de supprimer les dNTPs et les amorces indésirables à partir des produits de la PCR. 5 μ l du produit de PCR ont été mélangés à 2 μ l d'ExoSAP et 6 μ l d' H_2O et le tout a été soumis dans le thermocycleur (Mastercycler pro, Eppendorf, France). Ce dernier a été programmé pour deux phases : une phase d'activation des enzymes à 37 °C pendant 15 min puis une phase de leur inactivation à 80 °C pendant 15 min.

3.2.2.4. PCR séquence ou Marquage des fragments purifiés

La réaction de séquence consiste en une PCR classique des produits amplifiés purifiés qui s'effectue dans un thermocycleur (Mastercycler pro, Eppendorf, France) avec un milieu réactionnel et des conditions d'amplifications comme décrit dans le Tableau 7. Deux plaques de séquences ont été préparées en utilisant l'une des deux amorces *NAT2F* ou *NAT2R*, ainsi que les composants du Kit de séquençage BigDye® Terminator V.3.1. (Applied Biosystems, France). Ce dernier, comprend le BigDye terminator contenant l'ADN polymérase, les dNTP, ainsi que les ddNTP marqués et le tampon de séquençage (permettant la polymérisation des fragments dans des conditions optimales).

Tableau 7 : Les compositions d'un mix réactionnel d'un volume final de 10 μ l et le programme d'amplification de la PCR séquence.

Réactifs	Volume (μ l)	Conditions d'amplification	Cycles
Produit PCR	2 μ l	96°C, 1min	1
BigDye V1.3	1 μ l		
Tampon 5X	1,5 μ l	96 °C, 20s	
Amorce F ou R (5 μ M)	1 μ l	50 °C, 15s	25
H ₂ O	4,5 μ l	60 °C, 4min	

3.2.2.5. Purification des produits de la PCR séquence

La réaction de séquence est suivie par une purification afin d'éliminer l'excès des réactifs de séquençage : amorces libres, dNTPs, ddNTPs non incorporés, et toutes les impuretés, qui peuvent altérer la lecture de la séquence. Pour ce faire, à 10 μ l du produit de PCR séquence (par puits) sont ajoutés 80 μ l d'éthanol 76 %, en laissant les plaques sur paillasse ou sur glace pendant 15 à 30 min. Les plaques de séquences sont par la suite centrifugées pendant 15min à 4000 tpm à température ambiante et renversées rapidement afin de retirer le surnageant. Centrifuger à nouveau les plaques à l'envers sur papier absorbant (Wathman) pendant 1 min à 1000 tpm. Une fois terminée, 10 μ l d' H₂O (par puits) sont ajoutés aux échantillons à fin d'éviter l'évaporation de ces derniers une fois dans le séquenceur.

3.2.2.6. Séquençage sur automate et analyse des résultats

Les échantillons sont ensuite introduits dans le séquenceur automatique ABI 3130 XL Genetic analyzers (Applied Biosystems, France) où les fragments amplifiés vont subir une électrophorèse capillaire. Les bandes issues de la PAGE passent devant un détecteur de fluorescence, capable d'identifier chaque un des différents marqueurs des ddNTP qui seront ensuite converti par un algorithme en fluorogramme coloré. Ces fluorogrammes sont assemblés donnant la séquence du fragment étudié (Figure 18).

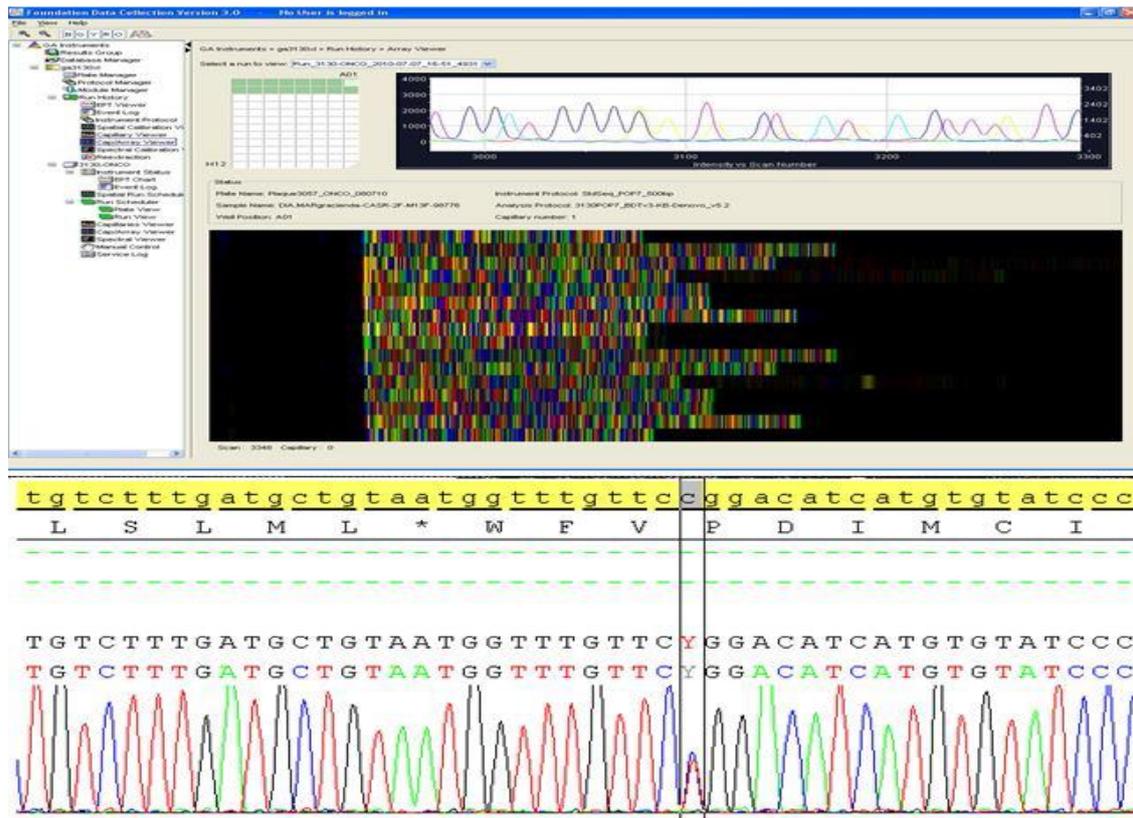


Figure 18 : Schématisation d'un résultat de séquençage après traitement informatique.

Les courbes obtenues du séquençage ont été analysés par le logiciel Sequencher V 5.0 qui permet de détecter les différences existantes entre la séquence d'étude et la séquence de référence.

La séquence de référence utilisée est issue de la base de données d'Ensembl Genom Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) et la séquence sauvage utilisée est ENST00000286479. (Annexe 6). Sequencher V5.0 nous a permis de détecter toutes les mutations présentes sur la séquence d'étude que ce soit à l'état homozygote ou hétérozygote.

L'utilisation du logiciel NAT2PRED (**Kuznetsov *et al.*, 2009**) nous a permis de déterminer le phénotype de la NAT2 en utilisant les résultats de génotypage de cette enzyme. Le logiciel NAT2PRED est un serveur qui met en œuvre un modèle surveillé afin de déterminer la méthode de reconnaissance et de déduction du phénotype de la NAT2 en fonction des mutations retrouvées au niveau du gène de la NAT2 dans les positions 282, 341, 481, 590, 803 et 857. Cette reconnaissance des mutations a été complétée par le consensus sur la nomenclature des allèles de la NAT2 publié en 1995 et réactualisé en juillet 2011 (<http://nacetyltransferasenomenclature.louisville.edu/>).

3.3. Génotypage du gène *XPC* par technique des sondes TaqMan

3.3.1. Principe de la technique

Contrairement à la PCR quantitative conventionnelle où les amplicons ne sont détectés qu'à la fin du processus au niveau de la phase de saturation, la PCR en temps réel (RT-PCR) - aussi appelée Real Time PCR- permet le suivi et la collecte des données d'amplification au point de départ de la phase exponentielle, rendant ainsi la quantification beaucoup plus fiable et sensible que la PCR classique (Figure 19).

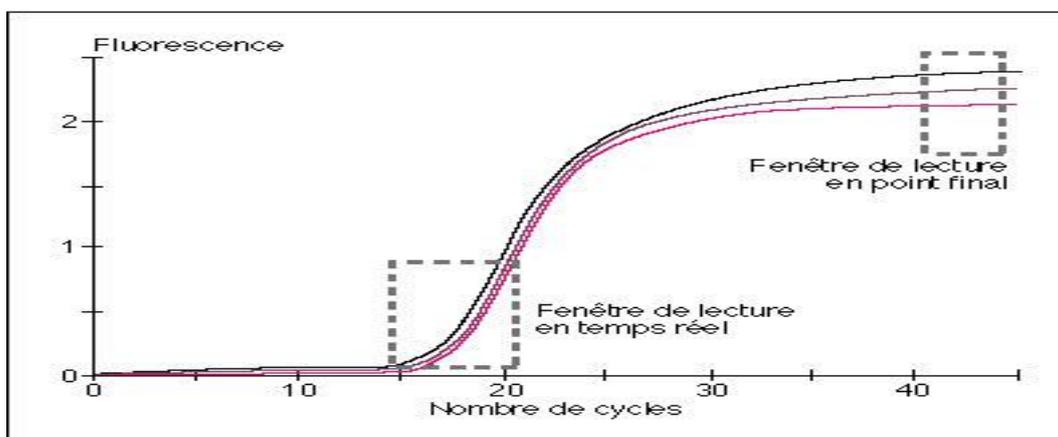


Figure 19 : Représentation de la même amplification par PCR réalisée trois fois. *Les courbes sont identiques au niveau de la phase exponentielle et différentes au niveau de la phase plateau (saturation) (Collot et al., 2001)*

La collecte des données d'amplification par PCR en temps réel repose sur le suivi de la fluorescence émise durant chaque cycle de la réaction. Cette fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant le processus.

Deux systèmes majeurs de détection des données de la PCR en temps réel ont été mises en place : les agents intercalants et les sondes (**Poitras & Houde, 2002**). Ces dernières connaissent à l'heure actuelle plusieurs technologies dont la technologie des sondes TaqMan qu'on a utilisé pour le génotypage de l'exon 15 du gène *XPC*.

La technologie des sondes TaqMan repose sur la fonction 5'-3' exonucléatique de la Taq polymérase et sur l'utilisation de deux sondes fluorescentes bi-marquées. Ces dernières

diffèrent uniquement par un nucléotide et sont complémentaires soit de l'allèle sauvage soit de l'allèle muté (Verstuyft *et al.*, 2003).

Chaque sonde est marquée par un fluorochrome dit reporter (FAM ou VIC) à son extrémité 5' et un fluorochrome dit quencher (MGB: Minor Grove Binder) à son extrémité 3'. Lorsque le reporter transfère son énergie au quencher par le principe de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), l'émission du reporter est atténuée « quenchée » produisant ainsi de la chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence (Mackay *et al.*, 2002). Ce phénomène est extrêmement sensible à la distance existante entre les deux fluorochromes.

Durant l'étape d'extension, l'activité 5'-3' exonucléasique de la polymérase dégrade uniquement la sonde préalablement fixée sur la séquence cible entraînant l'éloignement des deux marqueurs et le reporter peut alors à son tour émettre une fluorescence. À chaque brin synthétisé, une molécule reporter est ainsi libérée et la quantité de fluorescence est par conséquent directement proportionnelle au nombre de copies du gène amplifié (Collot *et al.*, 2001; Poitras & Houde, 2002) (Figure 20).

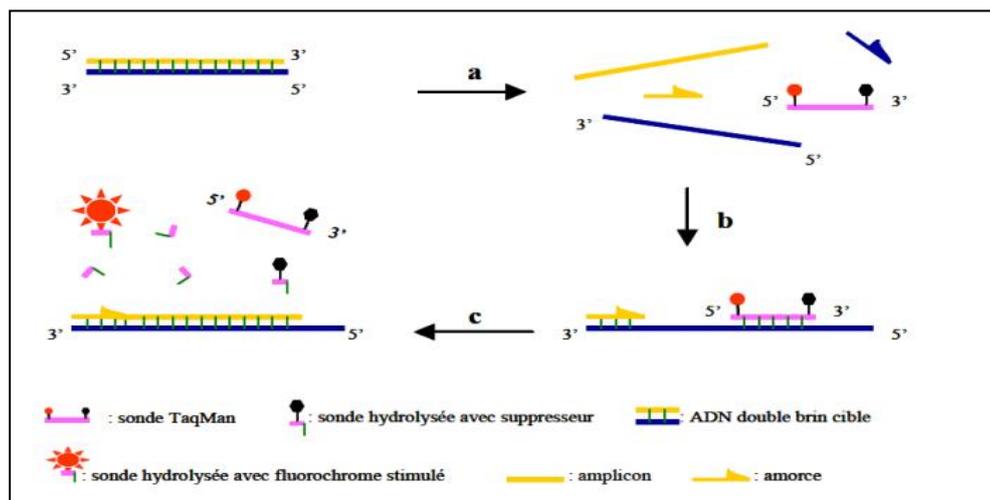


Figure 20 : Principe de la technique des sondes TaqMan. (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du supprimeur permettant ainsi l'émission de la fluorescence (Poitras & Houde, 2002).

Puisque la Taq polymérase hydrolysera la sonde seulement lorsque celle-ci est hybridée à sa séquence complémentaire, la technologie TaqMan utilise une étape combinée d'hybridation et de polymérisation à 60-62°C permettant l'hybridation et la stabilité de la sonde durant l'extension.

3.3.2. Mode opératoire

Le génotypage du gène *XPC* a été réalisé à l'aide du Kit TaqMan® SNP Genotyping Assays de life technologie (Thermo Fisher®). Ce Kit contient deux amorces sens et antisens spécifiques de la région qui renferme le polymorphisme étudié, et deux sondes, identiques à leur extrémité 3' car marqué par le même fluorochrome MGB mais différentes au niveau d'un seul nucléotide d'où l'une est complémentaire à la séquence de l'allèle sauvage (marquée par le fluorochrome FAM™ à son extrémité 5') et l'autre est complémentaire à la séquence de l'allèle muté (marquée par le fluorochrome VIC® à son extrémité 5').

Suivant les instructions du fournisseur le Kit TaqMan® SNP Genotyping Assays a été conservé entre -15 à -25 °C à l'abri de la lumière. La PCR a été réalisée dans un volume total de 10µl (Tableau 8).

Tableau 8 : Milieu réactionnel pour l'amplification de l'exon 15 du gène *XPC*.

Réactifs	Volume (µl)
TaqMan genotyping master mix X2.	5,0
TaqMan genotyping assay X20.	0,5
ADN	1,0
H ₂ O	3,5

Une centrifugation brève est recommandée afin de ramasser tous les composants en culot et éliminer les bulles d'aires des mixes. Ces derniers sont ensuite déposés sur des plaques Star Lab transparentes (réf: I1402-9909-BC) adaptées au thermocycleur Lightcycler 480 (Roche®) puis recouvertes avec un film adhésif.

Les conditions optimisées de la qPCR au sein du thermocycleur Lightcycler 480 sont présentées dans le Tableau 9. Des échantillons issus de notre propre banque d'ADN ont été préalablement génotypés par PCR-Séquençage afin d'être utilisés comme calibrateurs de la PCR fluorescente : calibrateur allèle sauvage (AA) et calibrateur allèle muté (CC).

Tableau 9 : Conditions optimisées de la qPCR de l'exon 15 du gène *XPC*.

Etape	Température	Durée	
Activation de l'enzyme	95°C	10 min	
Dénaturation	95°C	15sec	} 40 cycles
Hybridation/ Extension	60°C	1min	

3.3.3. Analyse des résultats

Les résultats ont été analysés grâce au logiciel LightCycler® 480 Software V1.5. La fluorescence émise par les sondes VIC ou FAM, hybridées à l'allèle sauvage et l'allèle muté respectivement a permis la distinction de trois génotypes différents : le génotype homozygote sauvage (AA) lorsque la fluorescence est émise par FAM uniquement, le génotype homozygote muté (CC) lorsque la fluorescence est émise par VIC uniquement et le génotype hétérozygote si les deux fluorescences VIC et FAM sont émises simultanément.

4. Etude statistique

Les résultats statistiques de la distribution des mutations dans les populations ainsi que tous les paramètres considérés ont été traités par le logiciel R V3.3.3. La comparaison de tous les paramètres étudiés a été réalisée par le test khi-deux (χ^2) ou le test Fisher par le calcul de l'Odds Ratio (OR) avec un seuil de signification maximum de 5 % et un intervalle de confiance calculé à 95 %. Le test a été choisi en fonction du nombre des échantillons ; si le nombre d'échantillons est supérieur ou égale à 30 les calculs sont réalisés par le test khi-deux et si le nombre d'échantillons est inférieur à 30 les calculs sont réalisés par le test Fisher.

Résultats et discussions

Afin de déterminer les facteurs de risque favorisant le cancer vésical au sein de la population Algérienne, nous avons réalisé deux études : **une étude épidémiologique** visant l'analyse des différentes caractéristiques générales des deux populations d'études (cas et témoins) avec détermination des différents facteurs pouvant être impliqués dans la survenue de ce type de cancer, et **une étude moléculaire** au cours de laquelle deux gènes ont été analysés (*NAT 2* et *XPC*), dans le but d'étudier les différentes mutations existantes dans la population Algérienne et rechercher d'éventuelles associations entre ces gènes et la carcinogénèse vésicale.

Ce travail a été complété par l'étude de la combinaison des différents allèles obtenus avec les facteurs environnementaux.

1. Caractéristiques générales de la population d'étude

Cette étude a été portée sur 364 sujets, (189 témoins supposés sains et 175 patients atteints de tumeurs vésicales de différents stades et grades).

Les témoins sont répartis en 21 (11,11%) sujets de sexe féminin et 168 (88,89%) sujets de sexe masculin, avec un sexe ratio de huit hommes pour une femme et une moyenne d'âge de $60,83 \pm 14,87$ ans. Parmi les 189 sujets, 76 (40,21%) sont fumeurs, 113 (59,79%) non-fumeurs et aucun d'entre eux ne présente d'antécédents familiaux.

D'autre part, l'âge moyen des patients est de $59,57 \pm 16,56$ ans et regroupe 162 (92,57%) hommes et 13 (7,43%) femmes (le sexe Ratio est de 12:1). Parmi les 175 patients étudiés, 122 (69,71%) sont fumeurs et 113 (64,57%) présentent des risques professionnels. La présence de tumeurs vésicales chez ces patients a été prouvée par des examens histologiques (Anapathologie) et cliniques (scanner, échographie, IRM) permettant de classer ces tumeurs en stade et grade; en effet, nos patient sont répartis en 33 patients de grade G1, 42 patients de grade G2 et 100 patients de grade G3 parmi lesquels 119 cas présentent des tumeurs superficielles ou non invasives du muscle (TVNIM) tandis que 56 cas présentent des tumeurs invasives du muscle (TVIM) (Tableau 10).

Tableau 10 : Caractéristiques générales de la population d'étude.

Caractéristiques	Cas % (n= 175)	Témoins % (n=189)	OR (CI 95%)	p-valeur
Genre				
Hommes	162 (92,57%)	168 (88,89%)		0,28^b
Femmes	13 (7,43%)	21 (11,11%)		
Age (années)				
< 50	35 (20%)	42 (22,22%)		0,60^a
≥ 50	140 (80%)	147 (77,78%)		
Statut tabagique				
Non-fumeurs	53 (30,29%)	113 (59,79%)		3,42 (2,21- 5,28)
Fumeurs	122 (69,71%)	76 (40,21%)		
Grade				
G1	33 (18,86%)			
G2	42 (24%)			
G3	100 (57,14%)			
Stade TNM				
Ta	36 (20,57%)			
T1	83 (47,43%)			
T2	40 (22,86%)			
T3	16 (9,14%)			

^a Test khi-deux (χ^2) - ^b Test Fisher

1.1.Répartition des sujets selon le sexe

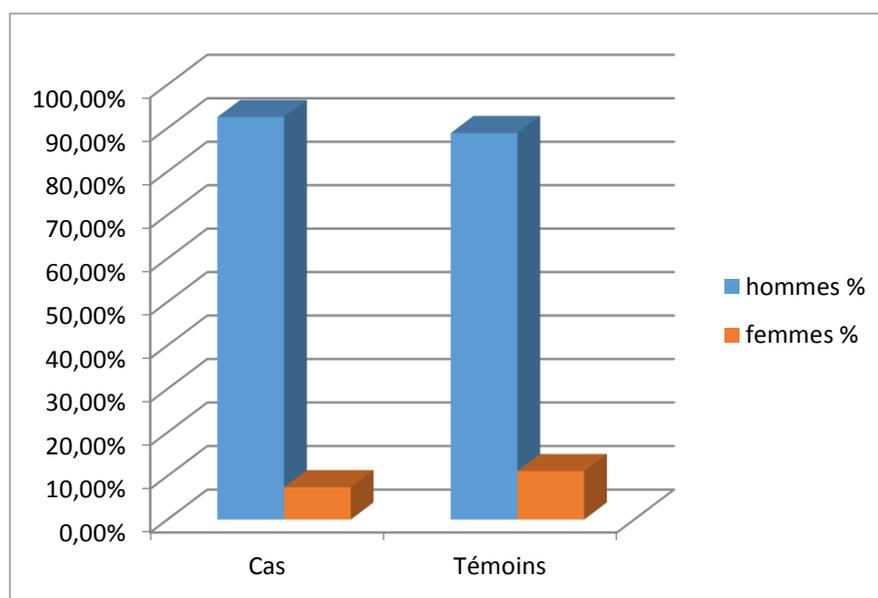


Figure 21 : Répartition des sujets selon le sexe.

Dans la population étudiée, on a noté une prédominance masculine frappante, avec un sexe ratio de 12 hommes pour une femme pour les patients, cela signifie que dans la population originaire du Nord Est Algérien les hommes sont préférentiellement touchés par le cancer vésical que les femmes (Figure 21). Cette prédominance masculine est rapportée dans la totalité des travaux réalisés sur ce type de cancer quel que soit le groupe ethnique mais avec des incidences variables d'une population à une autre (sexe ratio compris en général entre 4: 1 et 6: 1) (**Parkin et al., 2001; Irani, 2003; Pointreau et al., 2010; Fajkovic et al., 2011**). Ces mêmes constatations ont été signalées par les statistiques mondiales qui ont montré que le cancer de la vessie est le 6^{ème} cancer le plus fréquent chez les hommes et vient au 17^{ème} rang chez les femmes, avec 549393 nouveaux cas et 199922 décès, ce qui représente un taux de mortalité standardisé respectivement chez l'homme et chez la femme de 3,2 et de 0,9 pour 100 000 habitants (**Bray et al., 2018**).

En Algérie, l'étude réalisée dans l'Est Algérien (région de Sétif) (**Hamdi Cherif et al., 2014b**) a révélé que depuis 1986 l'incidence des cancers de la vessie est stable dans la population féminine, cependant elle ne cesse d'augmenter chez les hommes (sex-ratio : 10:1). Ce même résultat a été retrouvé dans l'Ouest Algérien (région de Sidi Bel Abas) (**Salah et al., 2015**). Ce qui est presque comparable à celui de notre population d'étude.

Ce fait, que les hommes aient un risque d'atteinte plus accru par rapport aux femmes peut être expliqué par l'exposition des hommes à un certains nombres de facteurs de susceptibilité qui sont soit environnementaux soit moléculaires. A ce sujet, **Irani (2003)** a montré que la mortalité est 5 fois plus élevée chez l'homme que chez la femme suite à la consommation de tabac, ainsi qu'à l'exposition professionnelle aux produits chimiques. **Silverman et al. (1989)** et **Vineis & Simonato. (1991)** ont également montré que le facteur professionnel augmente le risque du cancer vésical de 27% chez l'homme et de 11% chez la femme. D'autre part, l'étude de **Plna & Hemminki. (2001)** et celle de **Cheng et al. (2004)** ont suggéré que le cancer de la vessie peut être une maladie récessive liée au chromosome X expliquant ainsi la survenue plus fréquente de ce dernier chez les hommes que chez les femmes.

D'autres études (**Kadlubar et al., 1991; van Haarst et al., 2004**) ont expliqué cette prédominance masculine par le fait que l'uréthélium masculin soit potentiellement plus exposé aux substances cancérogènes que l'uréthélium féminin suite au fait que la fréquence mictionnelle journalière est plus élevée chez les femmes comparée à celle des hommes. Plusieurs études

(Madeb & Messing, 2004; Prizment *et al.*, 2007; Wolpert *et al.*, 2010; Burger *et al.*, 2013) ont associé cette différence sexuelle dans la fréquence de survenue du cancer vésical aux facteurs anatomiques et hormonaux qui peuvent avoir un effet protecteur chez la femme. En effet, il a été rapporté récemment que l'expression du récepteur aux androgènes (AR) se trouve augmenté dans les tumeurs des patients atteints de cancers de la vessie et que l'AR serait impliqué dans plusieurs voies de signalisation favorisant la tumorigénèse et la progression de ce type de cancer (Lombard & Mudryj, 2015 ; Li *et al.*, 2017).

1.2. Répartition des sujets selon la tranche d'âge

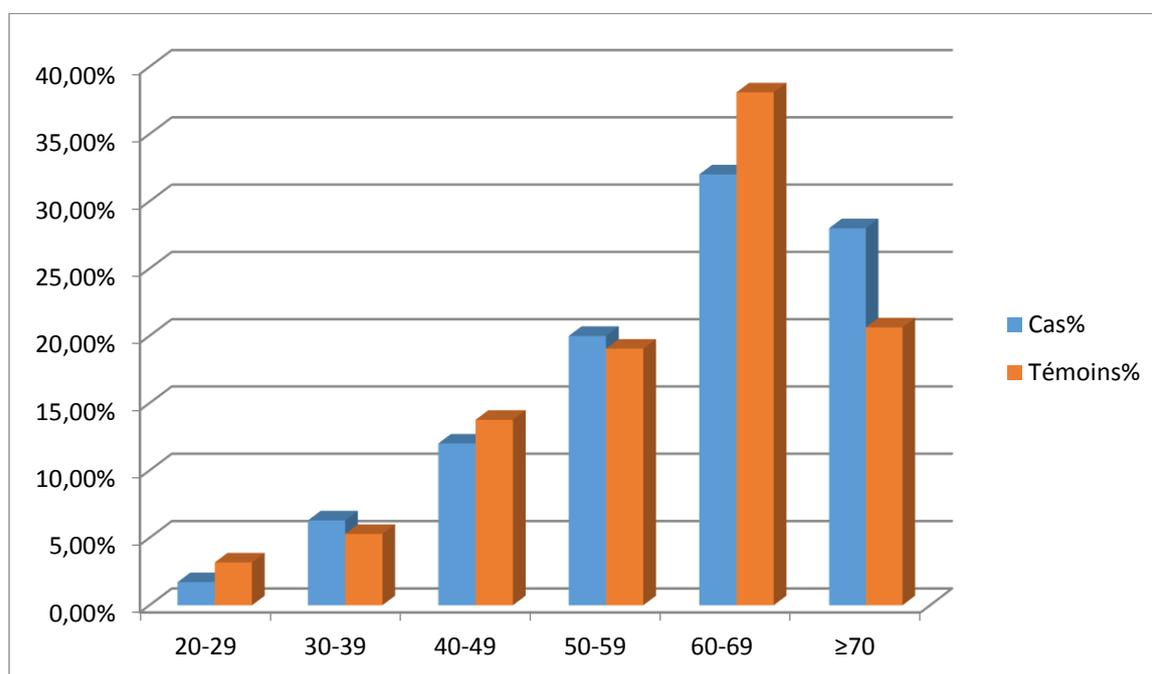


Figure 22 : Répartition des sujets selon la tranche d'âge.

L'histogramme représentant la répartition des cas selon les tranches d'âges, montre bien que l'apparition du cancer vésical augmente proportionnellement avec l'âge. La fréquence maximale des tumeurs vésicales tous types confondus lors du diagnostic se situe entre 60 et 69 ans (32 % des cas) avec une moyenne d'âge de $59,57 \pm 16,56$ ans (Figure 22). Nos résultats se trouvent rapprochés de ceux de nos voisins Marocains (Benchekroun *et al.*, 2003 ; Dehayni *et al.*, 2018) et Tunisiens (Ayadi *et al.*, 2016) et diffèrent de la moyenne d'âge internationale comprise entre 65 et 73 ans (Martinache *et al.*, 2008; Pointreau *et al.*, 2010; Hamdi Cherif *et al.*, 2010; Kiriluk *et al.*, 2012). Par ailleurs, ils sont complètement différents de ceux des séries Africaines rapportant un diagnostic précoce de la maladie (âge moyen allant de 45 à 49 ans) qui

s'expliquerait par une schistosomiase (la Bilhaziose) qui reste le principal facteur de risque de la carcinogénèse vésicale dans les pays Africains (Nesi *et al.*, 2015).

Par contre, nos résultats ont montré que les fréquences de survenue de cette étiologie avant l'âge de 40 ans sont un peu élevées (8%), comparées aux années précédentes et aux résultats de la littérature rapportant que les tumeurs vésicales chez le sujet jeune sont rares et ne représentent que 0,4 à 1% de l'ensemble des tumeurs de vessie (Blanchard *et al.*, 2003; Statoua *et al.*, 2014). Ceci peut être expliqué par le fait que de nos jours l'exposition à certains facteurs de risques tel le tabac, la pollution, le régime alimentaire...etc, se fait à un jeune âge induisant la survenue précoce du cancer vésical. Dans ce contexte, le rapport de l'OMS 2018 montre que 15,5% des fumeurs sont âgés de 13 à 15 ans sachant bien que sur l'ensemble des fumeurs 24% d'entre eux ont commencé à fumer avant l'âge de 10 ans.

D'autre part, nous avons trouvé que les hommes sont plus âgés par rapport aux femmes lors du premier diagnostic ceci peut être expliqué par la survenue fréquente des infections urinaires chroniques chez les femmes induisant l'apparition précoce du cancer vésical chez ces dernières. Les mêmes constatations ont été signalées par Dobruch *et al.* (2016). Cependant, ce résultat se trouve contradictoire avec ceux de Puente *et al.* (2003) et Nicholson *et al.* (2014).

1.3. Répartition des sujets selon le statut tabagique

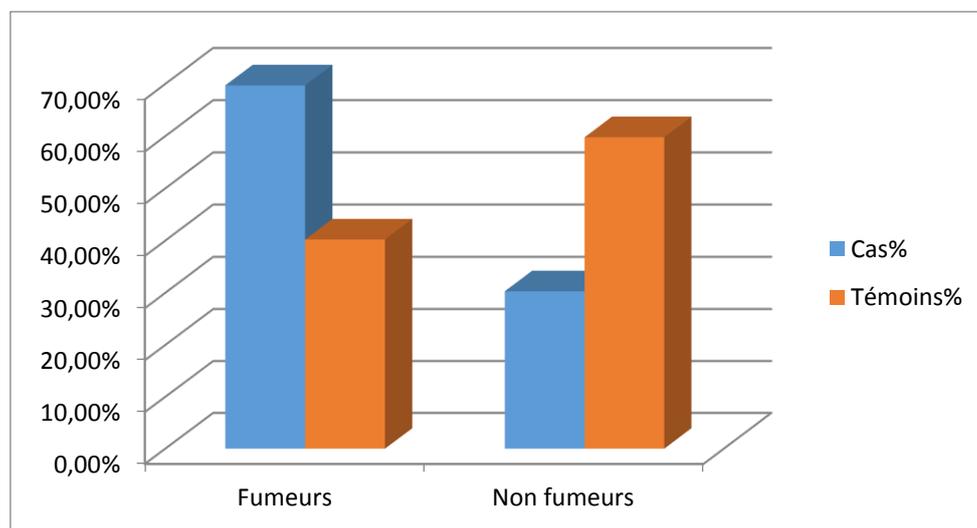


Figure 23 : Répartition des sujets selon le statut tabagique.

L'association entre le risque de développement d'un cancer vésical et la consommation du tabac fumé est présentée dans le Tableau 10 et Figure 23.

Selon les fréquences obtenues, il s'avère que tabagisme actif est plus répandue dans le groupe des patients atteints de cancer vésical (69,71%) que dans le groupe des témoins (40,21%) (OR = 3,42 ; CI 95% : 2,21- 5,28; $p = 2,78 \times 10^{-8}$), confirmant l'implication de ce facteur dans la carcinogénèse vésicale. Ce résultat est en accord avec ceux de **Brennan *et al.* (2000)** et de **Baris *et al.* (2009)**, qui ont montré que la fumée du tabac est le facteur de risque le plus incriminé dans la survenue de ce type de cancer. Ces mêmes conclusions ont été tirées au cours de la méta-analyse de **Zeegers *et al.* (2000)** -portant sur 43 études épidémiologiques-notant qu'en Europe environ la moitié des cas des cancers vésicaux chez les hommes et un tiers des cas chez les femmes pourraient être imputables au tabagisme actif.

En effet, il a été démontré que le risque de développer un cancer de vessie chez un individu non-fumeur serait 2 à 6 fois moindre que le risque chez un fumeur (**Zeegers *et al.*, 2000**) et ceci est dû à l'action des substances carcinogènes tels : la alpha- naphthylamine, la beta-naphthylamine et la 4-Amino-biphényl sécrétées dans l'urine des fumeurs (**Zeegers *et al.*, 2000; Burger *et al.*, 2013**). Ces substances chimiques causent des dommages aux cellules qui tapissent l'intérieur de la vessie (les cellules urothéliales), ce qui augmente le risque de l'accumulation d'altérations génétiques causant la transformation maligne et la carcinogénèse.

D'autre part, selon le recueil d'informations lors du questionnaire nous avons noté que la durée du tabagisme s'avère longue pour la majorité des patients fumeurs actifs (93/98 ont fumé plus de 10 ans) sachant bien que la moitié d'entre eux sont de gros fumeurs (49/98 consomment entre 20 et 40 cigarettes ou plus). En effet, une relation dose-durée du tabagisme et cancer vésical a été mise en évidence dans un grand nombre d'études (**Zeegers *et al.*, 2000; Negri & La Vecchia, 2001**), démontrant que le risque de survenue du cancer vésical est lié au nombre de cigarettes fumées par jour, au nombre d'années pendant lesquelles une personne a fumé et à l'âge auquel une personne a commencé à fumer. Certaines études ont rapporté qu'un tabagisme même occasionnel expose à un plus grand risque d'atteinte de ce type de cancer par rapport à un non-fumeur (**Bjerregaard *et al.*, 2006**). Il a été prouvé également que dans le cas du sevrage tabagique le risque diminue lentement et rejoindrait celui de la population générale au bout de vingt ans (**Zeegers *et al.*, 2000; Freedman *et al.*, 2011**). **Aveyard *et al.*** en 2002, ont rapporté que l'arrêt de la consommation du tabac réduit le risque de récurrence de cette étiologie et aurait donc un impact bénéfique sur la santé d'un patient atteint d'un cancer vésical. Ce qui a été confirmé par les résultats d'une récente étude américaine (**Boeri *et al.*, 2019**) qui a démontré que les patients traités pour un cancer de la vessie augmentaient leur risque de récurrence lorsqu'ils

fumaient et que le tabac serait également lié à une faible réponse au traitement par chimiothérapie.

Par ailleurs, dans notre population d'étude le risque de développer le cancer vésical chez les fumeurs n'a été retrouvé que chez les hommes puisque les patientes de notre population d'études ont déclaré toutes être non fumeuses, cependant certaines d'entre elles ont témoigné être exposées au tabagisme passif. A ce sujet, une étude a montré que le tabac passif est significativement impliqué dans la survenue du cancer de la vessie chez les femmes, et ce risque demeure plus accru chez les femmes n'ayant jamais fumé comparées à celles qui fument (**Jiang et al., 2007**). En effet, le risque lié à la fumée secondaire semble important puisque d'après la méta-analyse de **Yan et al. (2018)** -portant sur 14 études- il s'avère que le tabagisme passif augmenterait le risque de survenue du cancer vésical chez les sujets non-fumeurs exposés à la fumée secondaire de 22 % comparés au sujets non-fumeurs non exposés.

1.4. Répartition des sujets selon l'exposition aux facteurs professionnels

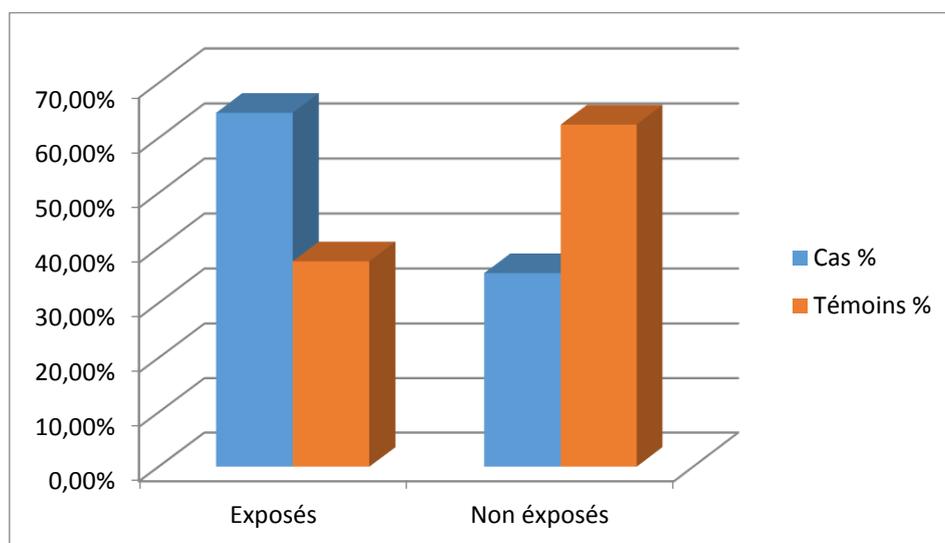


Figure 24 : Répartition des sujets selon l'exposition aux facteurs professionnels.

Une forte corrélation entre le risque d'atteinte par le cancer vésical et l'exposition aux différents facteurs professionnels a été observée. En effet, nous avons enregistré une fréquence élevée de **64,57 %** des patients atteints de cancers vésicaux d'origine professionnelle (Figure 25). Ces résultats sont en accord avec ceux de **Burger et al. (2013)** qui ont montré que le risque professionnel est considéré comme le deuxième facteur favorisant le cancer de la vessie après le tabac. **Kogevinas et al. (2003)** ont également démontré dans une méta-analyse impliquant 3346

cas et 6840 témoins qu'entre 5 à 10% des cas de cancers de la vessie dans les populations Européenne ont été attribués au risque professionnel, ce dernier été de 20% dans les populations américaines.

En effet, l'origine professionnelle des cancers de vessie a été évoquée dès 1895 par Rehn qui a décrit la survenue de cancers de vessie pour des travailleurs dans l'industrie des colorants (**Rehn, 1895**).

Il est admis que les 3 principales familles de substances chimiques impliquées dans la cancérogénèse vésicale d'origine professionnelle sont les HAP, certaines amines aromatiques et les nitrosamines, substances qui se retrouvent dans de nombreux secteurs d'activité (**Chopin et al., 2001; Kogevinas et al., 2003 ; Cumberbatch et al., 2015**). Dans ce sens, nous avons recueilli les données concernant les différents secteurs de travail aux quels notre population d'étude a dû être exposée aux agents carcinogènes et essayer d'identifier de ce fait les secteurs présentant un risque dans la survenue et le développement du cancer vésical.

Tableau 11 : Répartition des patients et des témoins selon la profession.

Secteur de profession	Nb (%)	<i>p-valeur</i>	OR (IC)
Agents de Fonderie/ Caoutchouc/ Textiles	24 (21,24%)	0,02	2,33 (1,08- 5,31)
Chimistes et utilisateurs de produits chimiques	23(20,36 %)	0,03	2,22 (1,02- 5,08)
Agriculteurs et fermiers	28 (24,78%)	0,03	2,05 (1,03- 4,24)
Femmes et hommes de ménage	19 (16,81%)	0,01	2,74 (1,11- 7,47)
Maçons	19 (16,81%)	0,7	0,88 (0,43- 1,76)

Selon les informations recueillis lors du questionnaire et après calcul de l'OR et de la *p-valeur*, on constate que les patients qui travaillent dans les secteurs de fonderies, du métal, du textile, du plastique et du caoutchouc sont à haut risque. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par d'autres auteurs (**Kogevinas et al., 2003; Colt et al., 2004**).

Selon la méta-analyse de **Nurminen & Karjalainen (2001)**, il s'avèrerait que 1,9% des cancers de vessie seraient attribuables à une exposition professionnelle aux HAPs. Ces derniers sont impliqués à 70% dans le domaine du métal, du caoutchouc et de la fabrication des produits

pétroliers (**Colt et al., 2004**). De même, il a été montré que la fraction de cancers vésicaux attribuables à des expositions professionnelles à des amines aromatiques est estimée à 5,4% (**Nurminen & Karjalainen, 2001**). Ces derniers tout comme les nitrosamines sont impliqués dans l'industrie du caoutchouc par l'utilisation d'accélérateurs de vulcanisation ainsi que dans l'industrie du textile par l'emploi de la benzidine dans les procédés de coloration (**Andujar & Paireon, 2010**). En effet, les mécanismes par lesquels ces substances induisent la carcinogénèse vésicale sont référés à leur accumulation lorsque les voies de détoxification sont altérés ce qui entraîne la formation des adduits par interaction avec l'hémoglobine et l'urothélium vésical, conduisant de ce fait à la formation de cellules mutantes potentiellement cancéreuses (**Hours et al., 1994; Calvert et al., 1998**).

D'autres part, d'après le recueil des informations, nous avons trouvé une forte association entre le secteur des utilisateurs de produits chimiques et le risque du cancer vésical, notamment chez les peintres, les infirmiers, les travailleurs dans le domaine de la santé, les agents de laboratoires pharmaceutiques et de laboratoires de recherches. En effet, l'IARC a classé le métier de peintre comme étant cancérigène pour l'être humain. Ainsi, en 2010, **Guha et al.** ont démontré qu'il y'avait significativement une forte association entre le cancer de la vessie et le métier de peintre après analyse de 41 études cohortes impliquant 2900 cas. Ceci est dû à l'implication de certains amines aromatiques dans la fabrication des peintures (**Andujar & Paireon, 2010**). Ces mêmes constatations ont été faites par **Hadkhale et al. (2017)** lors de l'exploration de 73 653 cas de cancer vésical d'origine professionnel dans les pays Nordiques et Canadiens. **Colt et al. (2011)** ont également montré que le risque été élevé chez les travailleurs dans le domaine de la santé, ce qui peut être dû à l'exposition à certains produits de la chimiothérapie d'où le contact avec les agents chimiothérapeutiques et les différents fluides des patients traitant contre les différents types de cancers. Une autre étude a également mentionné l'utilisation de certaines amines classées comme cancérigènes par les laboratoires de recherches, ce qui peut en être la cause de l'augmentation du risque de développer le cancer vésical chez les travailleurs de ce secteur (**Andujar & Paireon, 2010**).

Nos résultats ont révélés également une forte association entre les métiers d'agriculteurs et de fermiers et le risque du cancer de la vessie (OR = 2,05, $p = 0,03$). A ce sujet, les résultats de la littérature sont controversés ; selon diverses études, l'utilisation de pesticides serait un facteur de risque du cancer vésical accru chez les travailleurs du monde agricole (**Kogevinas et**

al., 2003; Colt *et al.*, 2011). Ainsi, le chlordimeform acaricide à base de 4-chloro-o-toluidine, a été cité comme facteur favorisant le développement du cancer de vessie lors des étapes de sa fabrication (Stasik, 1988). De même, l'étude de cohorte de Koutros *et al.* (2009), a conclu que les applicateurs d'Imazethapyr (une amine aromatique hétérocyclique utilisée comme pesticide aux Etats-Unis) présentaient un risque accru de développer un cancer de vessie (étude menée auprès de plus de 20 000 applicateurs de 1993 à 1997). Ce même auteur sur une étude ultérieure (menée sur 57 310 applicateurs de pesticides de 1993 à 2011) a montré l'implication de deux herbicides dans l'étiologie du cancer vésical : l'imazethapyr et l'imazaquin (deux amines aromatiques) (Koutros *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'étude de Pelaez *et al.* (2004) a démontré que des sujets ayant une exposition professionnelle aux pesticides sans distinction avaient un risque plus élevé de développer cette pathologie. A contrario, la littérature a rapporté également l'existence d'un certain nombre d'études où l'exposition au pesticides chez les agriculteurs n'avaient aucun impact sur la survenue et le développement du cancer de la vessie (Schoenberg *et al.*, 1984; Barbone *et al.*, 1994; Band *et al.*, 2005; Samanic *et al.*, 2008).

Nous avons aussi remarqué l'existence d'une association frappante entre le cancer de la vessie et le métier femme ou homme de ménage (OR = 2,75, $p = 0,01$). Cette association peut être liée à l'utilisation de différents solvants chlorés. Dans ce contexte, les représentants de la famille des solvants chlorés les plus connus du grand public sont le tétrachloroéthylène et le perchloroéthylène (PCE), principalement utilisé dans le secteur du nettoyage, sont classés dans le groupe 2A par l'IARC en 1995 (Lynge & Hemminki, 1997).

La littérature a ramené des résultats divergents en ce qui concerne l'implication des solvants chlorés et la tumorigénèse vésicale. Ainsi, Kogevinas *et al.* (2003) n'ont pas rapporté un excès de risque du cancer vésical chez des hommes exposés à des solvants chlorés après analyse de 11 études cas-témoins conduites de 1976 à 1996, tandis que Cordier *et al.* (1993) et Pesch *et al.* (2000), ont démontré qu'il y avait significativement plus de cas de cancers de vessie déclarés chez des personnes exposées à ces mêmes substances.

Selon nos résultats, nous n'avons pas constaté une association statistiquement significative entre les métiers de chauffeurs ou de conducteurs d'engins et le cancer de la vessie (OR = 0,9, $p = 0,8$). Ce résultat est contradictoire avec celui de Kogevinas *et al.* (2003) qui ont démontré l'implication de ces métiers dans la survenue du cancer de la vessie suite à

l'exposition au gaz d'échappement des moteurs diesels. Sachant bien que le diesel a été classé comme cancérogène certain pour l'être humain en 2012 par l'IARC.

En effet, le faible effectif des patients exerçant ce métier comparé à celui des témoins peut être en cause de ce résultat ce qui implique de viser dans l'avenir à élargir d'avantage notre échantillonnage d'étude afin de mieux explorer cette profession et mieux identifier son implication dans l'étiologie du cancer vésical au sein de la population Algérienne.

Selon la littérature, plusieurs autres professions tels : la sidérurgie, l'industrie automobile, le domaine de la coiffure et l'industrie du cuir ont été considérés comme facteur favorisant le cancer de la vessie (**Samanic et al., 2008; Bourgkard et al., 2009; Colt et al., 2011**). Cependant le nombre restreint des patients fonctionnaires dans ces domaines nous a privés d'étudier leurs implications dans la carcinogénèse vésicale dans notre population.

Pour ce qui est du domaine de coiffure, il est à mentionner que l'IARC a classé l'exposition professionnelle aux colorants capillaires pour coiffeurs / coiffeuses probablement cancérogènes (IARC Groupe 2A) ; cependant, il n'existe aucune preuve claire à l'appui d'une association entre le cancer de la vessie et les personnes utilisant la teinture pour cheveux à domicile et de ce fait, le risque pour ces derniers reste inclassable (IARC Groupe 3) (**Baan et al., 2008**).

Lors du recueil des informations nous avons remarqué que les patients avaient pratiqué une profession au moins 10 ans. En effet, plusieurs études ont rapporté que le risque de développer un cancer vésical augmentait avec le nombre d'années de pratique des professions confirmant ainsi l'effet dose c'est-à-dire l'accumulation des effets nocifs au fil des temps (**Kogevinas et al., 2003; Samanic et al., 2008**).

La base de données FINJEM (FINish Job-Exposure Matrix) a également noté une relation dose-réponse entre les HAP et l'augmentation du risque de ce type de cancer.

1.5. Répartition des sujets selon le statut clinicopathologique

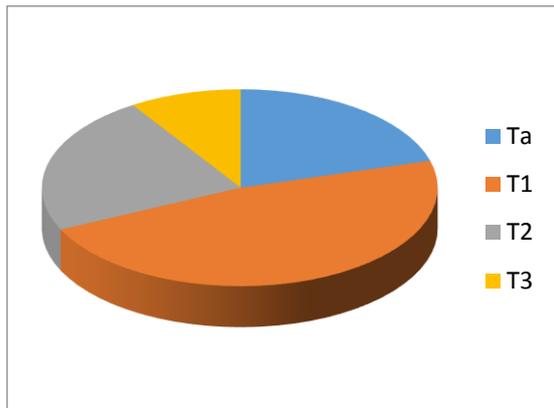


Figure 25a: Répartition selon le stade tumoral

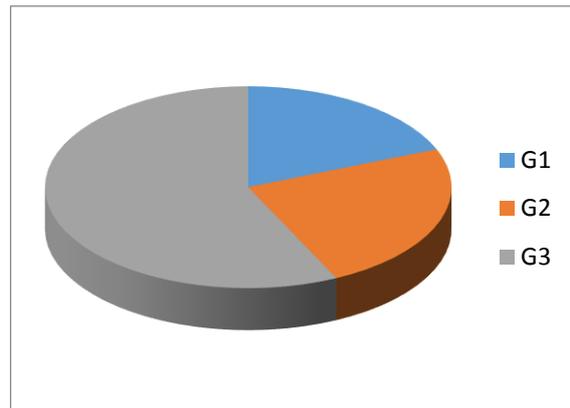


Figure 25b: Répartition selon de grade tumoral

Figure 25 : Répartition des sujets selon le statut clinicopathologique.

Notre étude a porté sur 175 patients atteints de tumeurs vésicales au premier diagnostic à différents stades et grades.

La classification anatomopathologique TNM a permis de diviser la population cas en quatre groupes : Ta, T1, T2 et T3 avec les pourcentages respectifs de 20,57%, 47,43%, 22,86% et 9,14%.

D'après la Figure 25a, les tumeurs superficielles ou non-invasives (TVNIM) représentent 68% (119/175) de l'ensemble des tumeurs vésicales. Cette valeur est plus faible que celles décrites dans la littérature qui estime une fréquence des tumeurs superficielles au moment du premier diagnostic de 70 à 80% (**Irani 2009**). Notons que les tumeurs invasives (TVIM), représentent 32% (56/175) de l'ensemble des tumeurs vésicales; valeur un peu élevée par rapport à celles rapportées par la littérature (20 à 30%) (**Irani 2009**).

D'après la Figure 25b les tumeurs vésicales sont classées selon la classification de grade de l'OMS-1973 en tumeurs de grade G1 : 18,68% (33/175), tumeurs de grade G2 : 24% (44/175) et tumeurs de grade G3 : 57,14% (100/175).

Il est à noter que la plupart de nos patients présentent des tumeurs superficielles (Ta et T1) le plus souvent de grade G3 (54,62%) ce qui renseigne sur l'agressivité des tumeurs de vessie dans notre population d'étude.

Au cours de notre étude, nous avons aussi essayé de suivre l'histoire évolutive du cancer de la vessie chez nos patients depuis son initiation jusqu'à sa progression. Le suivi des patients a été réalisé entre trois à cinq ans après l'apparition des tumeurs primaires. Le suivi de l'évolution de la maladie a été réalisé après le traitement. Nous avons constaté que le taux de

récidive semble être important dans notre population, puisque plus de la moitié des malades (53,71 %: 94/175) rechutent après une simple résection vésicale ou après un traitement.

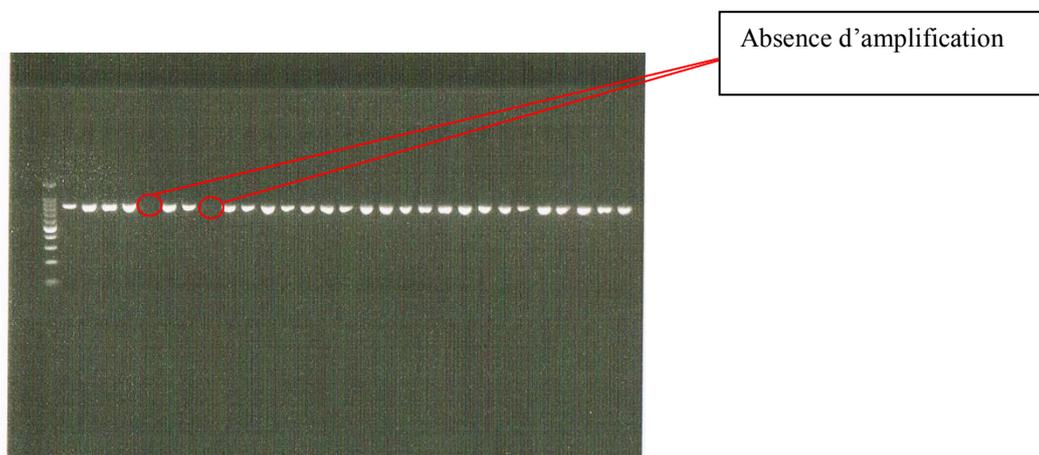
Le taux de récurrence le plus important est observé chez les patients présentant des tumeurs pTa (G1 et G2) (18/20 cas) et ceux présentant des tumeurs pTa G3 (13/16 cas). En effet, dans ce contexte, il a été rapporté que les tumeurs de faible grade auront tendance à récidiver alors que celles de haut grade risquent plus de progresser. Le groupe des tumeurs superficielles «pTa » présente le risque le plus élevé de récurrence et de progression vers un stade plus agressif **(Martinache *et al.*, 2008)**.

Suite à la consultation des dossiers médicaux, il s'avère que la plupart des patients pT1 ont subi plusieurs résections (2 à 8 résections). Ces informations nous donnent une idée sur la gravité de l'état de nos malades qui probablement résistent aux traitements et sont de mauvais répondeurs d'où la récurrence ou la progression tumorale.

L'importance des fréquences de récurrence reste un problème majeur dans le cancer de la vessie ce qui nécessite une surveillance des patients à vie et un intérêt de chercher de nouvelles thérapies qui limitent la rechute, la résistance aux traitements et qui augmentent les chances de guérison.

2. Séquençage du gène *NAT2*

Dans cette étude nous avons mené une investigation pour prospector l'implication des différents polymorphismes du gène *NAT2* dans la genèse du cancer de la vessie en Algérie. Le génotypage a été fait par séquençage dans le but de rechercher les mutations et/ou SNPs sur la totalité de l'exon 2 pour les cas et les témoins. Le profil d'amplification est représenté dans la Photographie 2.



Photographie 2 : Profil d'amplification de l'exon 2 du gène *NAT2*.

La réussite de l'amplification se traduit par une bande nette. L'absence de bande d'amplification dans certains échantillons (encerclés en rouge sur la photographie 2) correspond à un problème technique (échec de l'amplification, problème de dépôt sur gel). La vérification de ces échantillons a été faite par une autre amplification, présentant les mêmes résultats et témoignant d'ADN dégradé à éliminer.

Les résultats du séquençage formulés en fichier (Abi) ont été traités et analysés sur ordinateur grâce au logiciel Sequencher V5.0, permettant ainsi de repérer les différentes positions de mutation et/ou polymorphismes présentes sur le gène *NAT2* avec distinction entre les échantillons homozygote sauvage, homozygote muté et hétérozygote.

Une analyse statistique a été réalisée par la suite grâce au logiciel R software version 3.2.1 afin d'étudier la relation existante entre les différents SNPs du gène *NAT2* et le cancer de la vessie. En effet, cette étude a abouti à la caractérisation de treize polymorphismes répartis sur la totalité du fragment d'intérêt du gène *NAT2*. Il est à noter que tous ces SNPs ont déjà été décrits dans la littérature et qu'aucune nouvelle mutation n'a été repérée dans notre population d'étude.

2.1. Fréquences génotypiques et alléliques des variants du gène *NAT2* et leurs association au risque du cancer de la vessie

Les fréquences alléliques et génotypiques des différents polymorphismes détectés dans notre population d'étude et leurs OR correspondants sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Fréquences génotypiques et alléliques des polymorphismes du gène *NAT2* et leur association au risque de cancer de la vessie

Identifiant rs	SNP	Génotypes & allèles	N(%)		<i>p</i> -valeur	OR	CI (95%)	
			Cas	Témoins				
rs 1801279	G191A	GG	125 (71,43)	146 (77,24)	0,10 ^b	1,00 (ref)	0,85- 4,27	
		GA	21 (12,00)	13 (06,89)		1,88 ^b		
		AA	29 (16,57)	30 (15,87)		0,77 ^b		
		G	271 (77,43)	305 (80,69)		0,28 ^a		1,05 ^a
		A	79 (22,57)	73 (19,31)				
rs1041983	C282T	CC	110 (62,86)	126 (66,67)	0,41 ^a	1,00 (ref)	0,72-2,15	
		CT	35 (20,00)	32 (16,93)		1,25 ^a		
		TT	30 (17,14)	31 (16,40)		0,72 ^b		
		C	255 (72,86)	284 (75,13)		0,48 ^a		1,12 ^a
		T	95 (27,14)	94 (24,87)				
rs 1801280	T341C	TT	44 (25,14)	85 (44,97)	0,0006^a	1,00 (ref)	1,44- 3,86	
		TC	77 (44,00)	63 (33,34)		2,36^a		
		CC	54 (30,86)	41 (21,69)		0,0007^a		2,54^a
		T	165 (47,14)	233 (61,64)		9,17e⁻⁵^a		1,80^a
		C	185 (52,86)	145 (38,36)				
rs 45532639	C345T	CC	87 (49,72)	125 (66,14)	0,02 ^a	1,00 (ref)	1,07-3,01	
		CT	45 (25,71)	36 (19,05)		1,79 ^a		
		TT	43 (24,57)	28 (14,81)				

Résultats et discussion

		C	219 (62,57)	286 (75,66)			
		T	131 (37,43)	92 (24,34)	0,18 ^a	0,55 ^a	0,22- 1,27
rs12720065	C403G	CC	169 (96,57)	187 (98,94)		1,00 (ref)	0,58- 33,95
		CG	6 (03,43)	2 (01,06)	0,16 ^b	3,30 ^b	
		GG	0 (00,00)	0 (00,00)			
		C	344 (98,29)	376 (99,47)			
		G	6 (01,71)	2 (00,53)	0,16 ^b	3,27 ^b	
rs72554616	A434C	AA	175 (100)	189 (100,00)		1,00 (ref)	
		AC	0 (00,00)	0 (00,00)			
		CC	0 (00,00)	0 (00,00)			
		A	350 (100,00)	378 (100,00)			
		C	0 (00,00)	0 (00,00)			
rs1799929	C481T	CC	71 (40,57)	95 (50,26)		1,00 (ref)	0,91- 2,47
		CT	54 (30,86)	48 (25,40)	0,1 ^a	1,50 ^a	
		TT	50 (28,57)	46 (24,34)	0,14 ^a	1,45 ^a	
		C	196 (56,00)	238 (62,96)			
		T	154 (44,00)	140 (37,04)	0,05 ^a	1,33 ^a	
rs1799930	G590A	GG	50 (28,57)	97 (51,32)		1,00 (ref)	1,52- 4,37
		GA	56 (32,00)	42 (22,22)	0,0003^a	2,58^a	
		AA	69 (39,43)	50 (26,46)	0,0001^a	2,67^a	
		G	156 (44,57)	236 (62,43)			
		A	194 (55,43)	142 (37,57)	1,55e⁻⁶^a	2,06^a	
rs138707146	C638T	CC	175 (100,00)	189 (100,00)		1,00 (ref)	
		CT	0 (00,00)	0 (00,00)			
		TT	0 (00,00)	0 (00,00)			
		C	350 (100,00)	378 (100,00)			
		T	0 (00,00)	0 (00,00)			

rs 1208	A803G	AA	46 (26,28)	55 (29,10)		1,00 (ref)	
		AG	82 (46,86)	83 (43,92)	0,51 ^a	1,18 ^a	0,71- 1,94
		GG	47 (26,86)	51 (26,98)	0,73 ^a	1,10 ^a	0,63-1,92
		A	174 (49,71)	193 (51,06)			
		G	176 (50,29)	185 (48,94)	0,71 ^a	1,05 ^a	0,78- 1,41
rs 563935	G838A	GG	175 (100,00)	188 (99,47)		1,00 (ref)	
		GA	0 (00,00)	1 (00,53)			
		AA	0 (00,00)	0 (00,00)			
		G	350 (100,00)	377 (99,74)			
		A	0 (00,00)	1 (00,26)			
rs 56054745	A845C	AA	173 (98,86)	189 (100,00)		1,00 (ref)	
		AC	2 (01,14)	0 (00,00)			
		CC	0 (00,00)	0 (00,00)			
		A	348 (99,43)	378 (100,00)			
		C	2 (00,57)	0 (00,00)			
rs179931	G857A	GG	168 (96,00)	180 (95,24)		1,00 (ref)	
		GA	7 (04,00)	9 (04,76)	0,8 ^b	0,83 ^b	0,25- 2,57
		AA	0 (00,00)	0 (00,00)			
		G	343 (98,00)	369 (97,62)			
		A	7 (02,00)	9 (02,38)	0,8 ^b	0,83 ^b	0,26- 2,55

^a Test khi-deux (χ^2) - ^b Test Fisher

Parmi les treize polymorphismes étudiés, seuls ceux en position T341C et G590A ont montré une association statistiquement significative avec le risque de développer un cancer de la vessie, que ce soit chez les patients hétérozygotes (OR = 2,36, 95% CI = 1,44- 3,86 et OR = 2,58, 95% CI = 1,52- 4,37 respectivement) ou chez les patients mutants homozygotes (OR = 2,54, 95% CI = 1,47- 4,38 et OR = 2,67, 95% CI = 1,62- 4,40 respectivement).

Ces résultats sont partiellement en accord avec ceux trouvés lors de l'étude de **Brockmoller *et al.* (1996)**, réalisée en Allemagne sur 374 cas et 373 témoins où le

polymorphisme *NAT2* T341C et non pas le polymorphisme *NAT2* G590A été associé au risque de développement du cancer de la vessie.

Selon la littérature, il a été rapporté que les mutations T341C et G590A sont des mutations faux-sens entraînant une forte réduction de l'activité de la protéine *NAT2* par dégradation de celle-ci (Hein, 2006 ; Zang *et al.*, 2007 ; Selinski *et al.*, 2013 ; Boukouvala, 2016).

Par ailleurs, les études fonctionnelles de ces deux variantes chez les bactéries, les levures et les cellules de mammifères ont démontré que la substitution T341C conduit à une réduction du taux de la protéine *NAT2* suite à un changement structurel aboutissant à sa dégradation sans altérer sa stabilité tandis que la mutation G590A provoquerait une réduction du taux de la protéine *NAT2* ainsi que de son activité suite à la réduction de sa thermostabilité (Zang *et al.*, 2007 ; Walraven *et al.*, 2008). De plus, ces mêmes auteurs ont rapporté que ces deux SNPs sont associés à une réduction de la capacité de l'N- et O-acétylation dans différents systèmes d'expression bactériens et eucaryotes.

D'autre part, les SNPs en position C282T, C345T, C481T et A803G n'ont révélé aucune association avec le cancer de la vessie au sein de notre population d'étude. Ces mêmes constatations ont été rapportées par Selinski *et al.* (2013) dans une méta-analyse qui a porté sur 1712 cas et 20120 témoins. Ceci peut s'expliquer par les différences de nature des SNPs et du mécanisme par lequel ils affectent l'activité de l'enzyme *NAT2*.

En effet, plusieurs études ont montré que les polymorphismes C282T et C481T sont des mutations silencieuses qui n'ont aucun effet sur la capacité enzymatique d'acétylation ou la stabilité protéique (Zang *et al.*, 2007 ; Selinski *et al.*, 2013 ; Boukouvala, 2016).

D'autre part, les polymorphismes C345T et A803G sont des mutations faux-sens qui causent des changements au niveau de la chaîne des acides aminés de la protéine mature (Walraven *et al.*, 2008 ; Toure *et al.*, 2012 ; Boukouvala, 2016), et qui ne présentent aucun effet sur la fonction enzymatique.

Dans notre population d'étude, le variant G191A semble ne pas être impliqué dans l'étiologie du cancer de la vessie, bien qu'il a été démontré que ce même polymorphisme réduit nettement le taux et l'activité de la protéine *NAT2* par perte des interactions hydrogènes et électrostatiques et réduction de ce fait de la thermostabilité de l'enzyme (Toure *et al.*, 2012 ; Boukouvala, 2016). Cette non association peut s'expliquer par le fait que le nombre d'individus porteur du génotype mutant homozygote ou hétérozygote est moins important comparé à celui

des individus portants le génotype sauvage ($GA+ AA = 28,57\%$ vs $GG = 71 ;43\%$) sachant que cette mutation demeure très fréquente chez les Africains (**Hein, 2006 ; Sabbagh et al., 2008**).

Nos résultats ont également montré que les polymorphismes *NAT2* C403G et G857A n'ont pas été associés au risque de la carcinogénèse vésicale. Cela peut être expliqué par la structure génétique particulière de notre population pour laquelle nous avons observé un nombre restreint d'individus portant ces deux variantes (SNP C403G :6 cas et 2 témoins pour le génotype hétérozygote ; SNP G857A : 7 cas et 9 témoins pour le génotype hétérozygote). **Patin et al. (2006)** et **Teixeira et al. (2007)** ont suggéré que la substitution en position 403 peut ou pas altérer l'activité enzymatique de la protéine tout dépend de la population dans laquelle elle s'exprime. D'autre part le polymorphisme G857A a été identifié dans la littérature comme étant une mutation inactivatrice substrat-dépendante entraînant la réduction de l'activité enzymatique (**Toure et al., 2012 ; Boukouvala, 2016**), et s'est avérée plus fréquente en Inde du Sud et en Corée que dans les autres populations testées (**Hein, 2006**).

Les substitutions *NAT2* A434C, C638T, G838A et A845C étaient absentes aussi bien chez les patients que chez les témoins de notre population d'étude. Ceci confirme que la nature et les fréquences des polymorphismes du gène *NAT2* varient remarquablement selon l'origine ethnique. Dans ce contexte, **Patin et al. (2006)** et **Teixeira et al. (2007)** ont démontré que ces quatre SNPs peuvent ou pas altérer l'activité d'acétylation de l'enzyme *NAT2* et que leurs substitutions correspondantes ont été retrouvées à de faibles fréquences dans certaines régions comme le Brésil et l'Afrique subsaharienne.

2.2. Fréquences des génotypes *NAT2*, de leurs phénotypes correspondants et leurs associations au risque du cancer de la vessie

Basé sur le consensus de la nomenclature des variants alléliques du gène *NAT2* (**Vatsis et al., 1995 ; Hein et al., 2000 ; Boukouvala, 2016**), un total de 8 allèles-identifiés préalablement dans la littérature- a été retrouvé chez les 364 sujets testés. En plus de l'allèle sauvage *NAT2**4, les allèles *NAT2**5, *NAT2**6, *NAT2**7, *NAT2**12, *NAT2**13, *NAT2**14, et *NAT2**18 ont été mis en évidence ; en effet chaque allèle est caractérisé par la présence d'un polymorphisme spécifique, par exemple les polymorphismes T341C, G590A et G191A sont les SNPs caractéristiques des allèles respectives *NAT2**5, *NAT2**6 et *NAT2**14. La combinaison des différents SNPs décrivant l'allèle sauvage *NAT2**4 ainsi que les autres allèles identifiés au sein de notre population d'étude sont présentés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Nature des allèles du gène *NAT2* identifiés au sein de notre étude.

	G191A	C282T	T341C	C345T	C403G	C481T	G590A	A803G	G838A	A845C	G857A
NAT2*4	G	C	T	C	C	C	G	A	G	A	G
NAT2*5			C								
*5A			C			T					
*5B			C			T		G			
*5C			C					G			
*5D			C								
*5E			C				A				
*5G		T	C			T		G			
*5J		T	C				A				
*5K		T	C								
*5											
(341+590+803)			C				A	G			
*5 (341+345)			C	T							
NAT2*6							A				
*6A		T					A				
*6B							A				
*6C		T					A	G			
*6E						T	A				
*6F							A	G			
*6I		T					A		A		A
*6J		T					A				A
*6L		T		T			A				
*6N		T				T	A				
*6											
(282+590+838)		T					A		A		
*6 (590+857)							A				A
*6											
(481+590+857)						T	A				A
NAT2*7											A
*7A											A
*7B		T									A
*7C		T						G			A
NAT2*12								G			
*12A								G			
*12B		T						G			
*12 (282+481+803)		T				T		G			
NAT2*13		T									
*13A		T									
*13 (282+838)		T							A		
NAT2*14	A										
*14A	A										
*14B	A	T									
*14D	A	T					A				
*14G	A	T						G			
NAT2*18										C	

La combinaison des 8 allèles obtenus dans notre étude ont été utilisés pour prédire le statut d'acétylation (phénotype) correspondant à tous les individus de notre population d'étude (Tableau 14).

Tableau 14 : Fréquences génotypiques et phénotypiques du gène *NAT2* et leur association au cancer de la vessie.

Génotypes	Phénotype prédit	Patients (%)	Témoins (%)	<i>p</i> -valeur	OR (CI 95%)
<i>NAT2</i> *5/*5	Lent	53 (30,29)	40 (21,16)	0,0008^a	2,91 (1,55- 5,45)
<i>NAT2</i> *5/*6	Lent	41 (23,43)	28 (14,81)	0,0008^b	3,19 (1,55- 6,68)
<i>NAT2</i> *5/*7	Lent	03 (01,71)	04 (02,12)		
<i>NAT2</i> *5/*14	Lent	02 (01,14)	00 (00,00)		
<i>NAT2</i> *6/*6	Lent	15 (08,57)	30 (15,87)		
<i>NAT2</i> *6/*7	Lent	00 (00,00)	02 (01,06)		
<i>NAT2</i> *7/*14	Lent	00 (00,00)	02 (01,06)		
<i>NAT2</i> *6/*14	Lent	17 (09,71)	03 (01,59)		
<i>NAT2</i> *14/*14	Lent	19 (10,86)	25 (13,23)		
Total lent		150 (85,71)	134 (70,90)	0,0009^b	2,45 (1,41- 4,35)
<i>NAT2</i> *4/*6	Intermédiaire	02 (01,14)	10 (5,29)		
<i>NAT2</i> *4/*7	Intermédiaire	01 (00,57)	00 (00,00)		
<i>NAT2</i> *4/*14	Intermédiaire	02 (01,14)	09 (04,76)		
<i>NAT2</i> *5/*12	Intermédiaire	04 (02,29)	12 (06,35)		
<i>NAT2</i> *5/*13	Intermédiaire	00 (00,00)	02 (01,06)		
<i>NAT2</i> *6/*12	Intermédiaire	00 (00,00)	03 (01,59)		
<i>NAT2</i> *6/*13	Intermédiaire	01 (00,57)	03 (01,59)		
<i>NAT2</i> *4/*5	Intermédiaire	12 (06,86)	09 (04,76)		
<i>NAT2</i> *4/*4	Rapide	00 (00,00)	02 (01,06)		
<i>NAT2</i> *4/*12	Rapide	01 (00,57)	01 (00,52)		
<i>NAT2</i> *12/*13	Rapide	00 (00,00)	02 (01,06)		
<i>NAT2</i> *13/*14	Rapide	01 (00,57)	02 (01,06)		
<i>NAT2</i> *14/*18	Rapide	01 (00,57)	00 (00,00)		
Total rapide/Intermédiaire		25 (14,29)	55 (29,10)		1 (Référence)

^a Test khi-deux (χ^2) - ^b Test Fisher

Les différents génotypes observés ont permis de classer les sujets en acétylateurs lents, intermédiaires et rapides. Chez les 364 sujets séquencés (175 patients et 189 témoins), 85,71% des patients et 70,90% des témoins ont été de phénotype lent, alors que les acétylateurs rapides / intermédiaires ont été identifiés chez 14,29% et 29,10% des patients et des témoins, respectivement (Tableau 14).

Nos résultats montrent que l'acétylation lente est le profil d'acétylation le plus fréquent dans la population algérienne (70,90% des témoins), et concordent avec ceux publiés sur les populations marocaine, éthiopienne et saoudienne avec des pourcentages respectifs

d'acétyleurs lents de 72,39%, 73,6% et 78,5% (**Guaoua et al., 2014 ; Aklillu et al., 2018 ; Al-Ahmed et al., 2017**). En effet, le pourcentage d'acétyleurs lents varie remarquablement selon les groupes ethniques allant de 90% dans les pays Nord-africains à moins de 10% dans la plupart des populations asiatiques avec une fréquence d'environ 50% chez les blancs (**El Desoky et al., 2005 ; Hein, 2006**).

Comme présenté dans le Tableau 14 et suite à la comparaison au groupe de référence (acétyleurs rapides/intermédiaires), nous avons enregistré une association remarquablement significative entre les phénotypes acétylateurs lents et le risque de cancer de la vessie (OR= 2,45, 95% CI = 1,41- 4,35, $p = 0,0009$). Ce résultat est en accord avec plusieurs travaux de la littérature qui ont expliqué que les acétyleurs lents sont moins efficaces dans la détoxification des arylamines et d'autres cancérigènes environnementaux (**Garcia-Closas et al. 2005 ; Gu et al., 2005 ; Rothman et al., 2007 ; Song et al., 2009 ; Moore et al., 2011 ; Pesch et al., 2013**).

Effectivement il a été rapporté que la balance entre l'activation et la détoxification des carcinogènes affecte la quantité d'ADN endommagé dont l'effet sera traduit par la suite au niveau cellulaire (**Safarinejad et al., 2013**). Les métabolites des arylamines sont transportés par le système circulatoire et sont absorbés par l'épithélium de la vessie d'où l'activation métabolique aboutit à l'acquisition de propriétés cancérigènes par la formation d'adduits à l'ADN pouvant éventuellement conduire au développement d'un cancer vésical (**Zang et al., 2004**).

En ce qui concerne les génotypes, les résultats montrent que les génotypes *NAT2*5/5* et *NAT2*5/6* -caractérisés par les SNPs T341C et G590A respectivement- été aussi associés au risque du cancer vésical (OR = 2,91, 95% CI = 1,55- 5,45, $p = 0,0008$ et OR = 3,19, 95% CI = 1,55- 6,68, $p = 0,0008$ respectivement). Ce résultat a été confirmé par d'autres études ayant montré que le risque de développer un cancer de la vessie été plus élevé chez les individus possédant l'allèle *NAT2*5* qui entraîne une dégradation accrue de la protéine NAT2 s'exprimant par la diminution de son taux et de son activité enzymatique (**Brockmoller et al., 1996 ; Okkels et al., 1997 ; Zang et al., 2004 ; El Desoky et al., 2005**).

Les quatre variants *NAT2*5*, *NAT2*6*, *NAT2*7* et *NAT2*14* sont les variants les plus répondus dans notre population d'étude avec les fréquences alléliques respectives de 71,43%, 57,67%, 4,23% et 34,92%. Le Tableau 15 montre les fréquences alléliques de ces quatre

variants dans la population algérienne (notre étude) comparé à d'autres populations rapportées dans la littérature.

Tableau 15 : Les fréquences alléliques du gène *NAT2* dans la population algérienne et d'autres groupes ethniques.

	Auteur/ Année	n*	<i>NAT2</i> *5	<i>NAT2</i> *6	<i>NAT2</i> *7	<i>NAT2</i> *14
Caucasiens	Garte <i>et al.</i> , 2001	3531	00,46	0,285	0,029	00,00
Allemands	Sabbagh <i>et al.</i> , 2008	0844	0,425	0,278	0,013	0,001
Américains	Sabbagh <i>et al.</i> , 2008	0387	0,437	0,266	0,819	0,001
Sud-Coréen	Sabbagh <i>et al.</i> , 2008	0288	00,01	0,224	0,132	0,000
Espagnols	Sabbagh <i>et al.</i> , 2008	0258	00,47	00,25	0,006	0,004
Brésiliens	Teixeira <i>et al.</i> , 2001	0254	0,287	0,104	0,021	00,14
Egyptiens	Hamdy <i>et al.</i> , 2003	0199	0,497	00,26	0,028	-
Argentins	Chamorro <i>et al.</i> , 2012	0185	00,37	0,256	00,08	0,013
Omaniens	Tanira <i>et al.</i> , 2003	0127	00,44	00,27	00,04	0
Sénégalais	Sabbagh <i>et al.</i> , 2008	0101	0,322	0,188	-	00,84
Japonais	Yang <i>et al.</i> , 2001	0079	0,019	00,23	0,001	-
Indiens	Yang <i>et al.</i> , 2001	0061	00,33	00,38	00,03	-
Sud-Africains	Sabbagh <i>et al.</i> , 2008	0097	0,361	00,17	0,065	0,103
Tunisiens	Bendjemana <i>et al.</i> , 2006	0100	0,315	0,175	00,15	00,05
Marocains	Guaoua <i>et al.</i> , 2014	0163	00,53	00,25	00,02	00,04
Notre étude		0189	0,714	0,577	00,04	00,35

n : Taille de l'échantillon

En comparant les fréquences alléliques des quatre variants du gène *NAT2* rapportées dans le tableau 15, il s'avère que la fréquence de l'allèle *NAT2**7 de notre population d'étude ne varie pas considérablement de celles des autres populations.

Par ailleurs, les fréquences des trois allèles *NAT2**5 ,6 et 14 dans notre population s'avèrent différentes de celles des autres groupes ethniques.

Cette différence de distribution alléliques avec nos voisins tunisiens et marocains pourrait être expliquée par les origines algériennes, tunisiennes et marocaines. Depuis environ 8000 ans, les amazighs ont été le principal groupe qui constitue toute la population de la région d'Afrique du Nord, mais à travers les siècles, les amazighs ont été mélangé différemment avec beaucoup d'autres groupes ethniques dont les phéniciens, carthaginois, romains, vandales, byzantins, et les arabes alors que la domination ottomane a atteint l'Algérie et la Tunisie seulement (**Sefiani, 2010**), sans oublier 132 ans de la colonisation française en Algérie où les Algériens ont été encore mélangés avec les colons français et les pieds noirs qui étaient de différentes origines (**Montagnon, 2012**). Une autre explication de la différence entre notre population et les tunisiens et marocains pourrait être un biais de sélection, et la taille limitée des échantillons.

2.3. Distribution alléliques et génotypiques des polymorphismes du gène *NAT2* selon l'âge

Nous avons analysé la répartition des polymorphismes *NAT2* en divisant notre échantillon en deux groupes selon l'âge (inférieur à 50 ans pour le 1^{er} groupe et plus ou égal à 50 ans pour le 2^{ème} groupe). Les résultats ainsi que les calculs statistiques obtenus sont présentés dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Association des SNPs du gène *NAT2* avec l'âge de la population d'étude.

	< 50 ans				≥ 50 ans			
	Patients (%)	Témoins (%)	<i>p</i> -valeur	OR (CI 95%)	Patients (%)	Témoins (%)	<i>p</i> -valeur	OR (CI 95%)
G191A								
GG	25	36		1 (référence)	100	110		1 (référence)
GA	4	3	0,45 ^b	1,90 (0,29-14,13)	17	10	0,15 ^b	1,87 (0,76-4,79)
AA	6	3	0,17 ^b	2,84 (0,54-19,18)	23	27	0,88 ^b	0,94 (0,48-1,82)
C282T								
CC	26	33		1 (référence)	84	93		1 (référence)
CT	6	0			29	32	1 ^b	1 (0,54-1,87)
TT	3	9	0,34 ^b	0,43 (0,07-1,95)	27	22	0,42 ^b	1,36 (0,69-2,71)
T341C								
TT	7	29		1 (référence)	37	57		1 (référence)
TC	13	7	0,001^b	7,36 (1,92-31,83)	64	56	0,04^a	1,76 (1,02-3,04)
CC	15	6	0,0001^b	9,83 (2,54-44,18)	39	34	0,07 ^a	1,77 (0,95-3,28)
C345T								

Résultats et discussion

CC	18	12		1 (référence)	69	113		1 (référence)
CT	8	21	0,01 ^b	0,26 (0,07-0,86)	37	15	3,03e^{-05b}	4,01 (1,98-8,49)
TT	9	9	0,56 ^b	0,67 (0,18-2,54)	34	19	0,0009^b	2,92 (1,49-5,87)
C403G								
CC	34	41		1 (référence)	135	146		1 (référence)
CG	1	1	1 ^b	1,21 (0,01-96,86)	5	1	0,11 ^b	5,38 (0,59-257,15)
GG	0	0			0 (00,00)	0		
A434C								
AA	35	42		1 (référence)	140	147		1 (référence)
AC	0 (00,00)	0			0 (00,00)	0		
CC	0 (00,00)	0			0 (00,00)	0		
C481T								
CC	15	36		1 (référence)	56	59		1 (référence)
CT	11	0			43	48	0,84 ^a	0,94 (0,54-1,64)
TT	9	6	0,03^b	3,52 (0,93-14,41)	41	40	0,79 ^a	1,08 (0,61-1,91)
G590A								
GG	8	16		1 (référence)	42	81		1 (référence)
GA	10	3	0,01^b	6,30 (1,18-45,91)	46	39	0,004^a	2,27 (1,29-4,00)
AA	17	23	0,59 ^b	1,47 (0,46-4,95)	52	27	1,31e^{-05b}	3,69 (1,97-7,05)
C638T								
CC	35	42		1 (référence)	140	147		1 (référence)
CT	0 (00,00)	0			0 (00,00)	0		
TT	0 (00,00)	0			0 (00,00)	0		
A803G								
AA	6	8		1 (référence)	40	47		1 (référence)
AG	18	25	1 ^b	0,96 (0,24-3,99)	64	58	0,36 ^a	1,30 (0,75-2,25)
GG	11	9	0,73 ^b	1,61 (0,34-8,06)	36	42	0,98 ^a	1,01 (0,55-1,86)
G838A								
GG	35	42		1 (référence)	140	146		1 (référence)
GA	0 (00,00)	0			1 (01,32)	1	1 ^b	1,04 (0,01-82,36)
AA	0 (00,00)	0			0 (00,00)	0		
A845C								
AA	33	42		1 (référence)	140	147		1 (référence)
AC	2	0			0 (00,00)	0		
CC	0 (00,00)	0			0 (00,00)	0		
G857A								
GG	34	40		1 (référence)	134	140		1 (référence)
GA	1	2	1 ^b	0,59 (0,009-11,84)	6	7	1 ^b	0,90 (0,24-3,20)
AA	0 (00,00)	0			0 (00,00)	0		

^a Test khi-deux (χ^2) - ^b Test Fisher

Nos résultats montrent que les polymorphismes T341C et G590A sont associés au cancer de la vessie pour les deux tranches d'âge moins de 50 ans et plus de 50 ans, cependant, on

remarque bien que l'association est beaucoup plus accentuée pour le groupe inférieur à 50 ans. En effet, les personnes héritant de ces deux polymorphismes présentent de très grandes réductions du taux et de l'activité de la protéine NAT2 (**Hein, 2002**). Une faible activité de NAT2 est sans aucun doute un facteur de risque de cancer de la vessie, en particulier chez les personnes qui fument ou qui sont exposées à des risques professionnels spécifiques (**Cascorbi, 2001**). De nos jours, l'exposition à certains facteurs de risque se fait à un âge très précoce tel le tabac (actif ou passif) ou certains composés du milieu professionnel. Une défaillance dans la détoxification et effet additif du cumul des mutations suite au contact fréquent aux xénobiotiques font que le groupe moins de 50 ans soit un groupe à risque pour ces polymorphismes.

Le polymorphisme C345T du gène *NAT2*, est associé au cancer de la vessie uniquement chez les patients qui ont plus de 50 ans. Cette association que nous avons liée à la vulnérabilité du système immunitaire et la fragilité de l'organisme avec l'âge, puisque d'après **Boukouvala et al. (2016)**, ce polymorphisme entraîne une mutation faux-sens qui n'a aucun effet sur la fonction enzymatique de NAT2. En effet, Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer les interactions entre la cancérogenèse en général et le processus de vieillissement. Tout d'abord, à mesure qu'ils vieillissent, les individus sont exposés de manière cumulative à des substances cancérogènes dans l'environnement. Deuxièmement, le vieillissement laisse suffisamment de temps pour le développement et l'accumulation d'événements cellulaires pouvant conduire à une transformation néoplasique. Troisièmement, le vieillissement pourrait s'accompagner d'une diminution de la capacité de vider complètement la vessie, prolongeant potentiellement le temps de contact pour l'exposition à des agents cancérogènes excrétés dans l'urine. De plus, en raison de symptômes gênants de miction, il est possible que les gens boivent moins en vieillissant. Avec le temps, cela augmenterait la concentration urinaire de substances cancérogènes auxquelles les personnes âgées sont exposées. Un autre facteur contribuant à l'augmentation de la concentration de cancérogènes dans les urines pourrait être la capacité réduite de détoxifier les cancérogènes potentiels du fait de la détérioration du système organique avec le vieillissement (**Shariat et al., 2010**).

C481T SNP semble être à première vue un facteur de risque pour la carcinogénèse vésicale pour la tranche d'âge inférieure à 50ans (OR =3,52, CI 95% = 0,93-14,41, $p = 0,03$). Cependant, selon les travaux de la littérature ce polymorphisme n'entraîne qu'une mutation

silencieuse qui n'a aucun effet sur l'activité protéique de l'enzyme NAT2 (**Boukouvala et al., 2016**). Cette association de l'étiologie étudiée au groupe moins de 50 ans ne peut être relatée qu'à l'exposition de ces patients aux facteurs environnementaux.

En revanche, le petit nombre d'effectif pour les cas (n = 9) et pour les témoins (n = 6) fait qu'il est recommandé d'élargir l'échantillonnage si on veut vraiment en tirer des conclusions plus concrètes et plus fiables.

Les polymorphismes G191A, C282T et A803G semblent ne pas être des facteurs de risque pour le cancer de la vessie que ce soit pour le premier ou le deuxième groupe. En fait cette non-association peut être expliquée d'une part par la nature de ces SNPs, et d'autre part par l'origine ethnique qui fait que certains polymorphismes sont présents chez certaines populations et pas chez d'autres.

Pour les polymorphismes C403G, A434C, C638T, G838A, A845C et G857A, le manque ou l'absence totale d'effectifs pour certains SNPs a fait qu'il été impossible de calculer l'association de ces facteurs de risque au cancer vésical.

2.4. Distribution du profil d'acétylation du gène NAT2 selon l'âge

Tableau 17 : Distribution du profil d'acétylation du gène NAT2 selon l'âge.

Phénotype	< 50 ans				≥ 50 ans			
	patients (%)	Témoins (%)	p-valeur	OR (CI 95%)	Patients (%)	Témoins (%)	p-valeur	OR (CI 95%)
R/I	08 (15,09)	30 (31,91)		1 (référence)	17 (13,93)	25 (26,32)		1 (référence)
Lent	45 (84,91)	64 (68,09)	0,03	2,62 (1,05- 7,25)	105 (86,07)	70 (73,68)	0,02	2,20 (1,05- 4,68)

*R/I : Rapide/Intermédiaire

L'investigation sur l'association du profil d'acétylation lent à la carcinogénèse vésicale en fonction de la tranche d'âge : moins de 50 ans ou plus de 50 ans a montré que les acétylateurs lents présentent un facteur de risque pour le cancer de la vessie pour les deux groupes (moins de 50 ans et plus de 50 ans), cependant l'association demeure plus élevée chez la catégorie regroupant les patients ayant moins de 50 ans (OR = 2,62, CI 95% = 1,05-7,25, p = 0,03) comparé à celle regroupant les patients de plus de 50 ans (OR = 2,20, CI 95% = 1,05-4,68, p = 0,02) (Tableau 17). Cette dernière constatation est contradictoire aux résultats de **Gu et al. (2005)** qui ont montré que le risque du cancer vésical chez les acétylateurs lents NAT2 était significatif chez les patients âgées (OR = 1,41, IC 95%, 1,01 -1,98) mais ne l'était pas chez les

sujets plus jeunes (OR = 1,15, IC 95%, 0,76-1,74), et ont expliqué cet effet par l'exposition cumulative plus importante des carcinogènes au fil du temps chez les personnes âgées.

2.5. Combinaison polymorphismes du gène *NAT2*-tabac et association au cancer de la vessie

Comme mentionné précédemment les Arylamine-N-acétyltransférases (NATs) en générale et la *NAT2* en particulier sont des enzymes uniques jouant un rôle important dans la phase II de biotransformations des xénobiotiques y compris les HAP. Au cours de notre étude, nous avons aussi démontré préalablement que le tabac qui à son tour renferme un grand nombre de xénobiotiques dont les HAP est un facteur de risque du cancer de la vessie au sein de notre population d'étude. Par conséquent vu que le rôle des gènes d'intérêt est nettement lié au tabagisme nous avons cherché l'implication de la combinaison des différents polymorphismes *NAT2* avec la consommation du tabac dans l'étiologie du cancer vésical.

La stratification des cas et des témoins selon les génotypes *NAT2* et le statut tabagique est illustrée dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Stratification des patients et des témoins selon les polymorphismes *NAT2* et statut tabagique.

	Non-fumeurs				Fumeurs			
	Patients (%)	Témoins (%)	<i>p</i>	OR (CI 95%)	Patients (%)	Témoins (%)	<i>p</i>	OR (CI 95%)
G191A								
GG	50 (94,34)	70 (61,95)		1 (référence)	75 (61,48)	76 (100,00)	0,18 ^a	1,38 (0,85- 2,23)
GA	03 (05,66)	13 (11,50)	0,10 ^b	0,32 (0,05-1,27)	18 (14,75)	00 (00,00)		
AA	00 (00,00)	30 (26,55)			29 (23,77)	00 (00,00)		
C282T								
CC	30 (56,60)	50 (44,25)		1 (référence)	80 (65,57)	76 (100,00)	0,05 ^b	1,75 (0,97- 3,17)
CT	10 (18,87)	32 (28,32)	0,15 ^b	0,52 (0,19- 1,28)	25 (20,49)	00 (00,00)		
TT	13 (24,53)	31 (27,43)	0,43 ^b	0,70 (0,28- 1,63)	17 (13,94)	00 (00,00)		
T341C								
TT	12 (22,64)	52 (46,02)		1 (référence)	32 (26,23)	33 (43,42)	0,0003^b	4,15 (1,78-10,19)
TC	19 (35,85)	30 (26,55)	0,02^b	2,71 (1,08- 7,08)	58 (47,54)	33 (43,42)	3,49e^{-8b}	7,50 (3,37-17,77)
CC	22 (41,51)	31 (27,43)	0,008^b	3,04 (1,24- 7,77)	32 (26,23)	10 (13,16)	5,06e^{-9b}	13,41 (4,91-40,11)
C345T								
CC	47 (88,68)	95 (84,07)		1 (référence)	40 (32,78)	30 (39,47)	0,0009^b	2.69 (1,49-4,85)
CT	04 (07,55)	10 (08,85)	1 ^b	0,80 (0,17-2,99)	41 (33,61)	26 (34,21)	0,0001^b	3.16 (1,67- 6,10)

Résultats et discussion

TT	02 (03,77)	08 (07,08)	0,5 ^b	0,50 (0,05-2,68)	41 (33,61)	20 (26,32)	1,15e^{-5b}	4.11 (2,09- 8,29)
C403G								
		113						
CC	52 (98,11)	(100,00)		1 (référence)	117 (95,90)	74 (97,37)	3,54e^{-8a}	3,43 (2,21-5,32)
CG	01 (01,89)	000 (00,00)			005 (04,10)	02 (02,63)	0,04 ^b	5,37 (0,84- 58,11)
GG	00 (00,00)	000 (00,00)			000 (00,00)	00 (00,00)		
A434C								
		113						
AA	53 (100,00)	(100,00)		1 (référence)	(100,00)	76 (100,00)	2,78e^{-8a}	3,42 (2,21- 5,28)
AC	00 (00,00)	000 (00,00)			000 (00,00)	00 (00,00)		
CC	00 (00,00)	000 (00,00)			000 (00,00)	00 (00,00)		
C481T								
CC	20 (37,73)	50 (44,25)		1 (référence)	51 (41,80)	45 (59,21)	0,002^b	2,81 (1,40- 5,78)
CT	23 (43,40)	32 (28,32)	0,1 ^b	1,78 (0,79- 4,05)	31 (25,41)	16 (21,05)	0,0001^b	4,77 (2,03- 11,61)
TT	10 (18,87)	31 (27,43)	0,6 ^b	0,80 (0,29-2,09)	40 (32,79)	15 (19,74)	9,72e^{-7b}	6,55 (2,83- 15,86)
G590A								
GG	20 (37,73)	74 (65,49)		1 (référence)	30 (24,60)	23 (30,26)	2,37e^{-5b}	4,76 (2,17-10,74)
GA	10 (18,87)	12 (10,62)	0,02^b	3,04 (1,02- 9,03)	46 (37,70)	30 (39,48)	2,67e^{-7b}	5,60 (2,74- 11,81)
AA	23 (43,40)	27 (23,89)	0,003^b	3,12 (1,40- 7,08)	46 (37,70)	23 (30,26)	7,78e^{-9b}	7,29 (3,46-15,91)
C638T								
	53	113						
CC	(100,00)	(100,00)		1 (référence)	(100,00)	76 (100,00)	2,78e^{-8a}	3,42 (2,21- 5,28)
CT	00 (00,00)	000 (00,00)			000 (00,00)	00 (00,00)		
TT	00 (00,00)	000 (00,00)			000 (00,00)	00 (00,00)		
A803G								
AA	20 (37,74)	35 (30,97)		1 (référence)	26 (21,31)	20 (26,32)	0,004^b	2,25 (0,94- 5,47)
AG	20 (37,74)	43 (38,06)	0,69 ^b	0,81 (0,35-1,87)	62 (50,82)	40 (52,63)	0,004^b	2,69 (1,30- 5,67)
GG	13 (24,52)	35 (30,97)	0,39 ^b	0,65 (0,25- 1,62)	34 (27,87)	16 (21,05)	0,001^b	3,66 (1,54-9,06)
G838A								
		113						
GG	53 (100,00)	(100,00)		1 (référence)	(100,00)	75 (98,68)	2,09e^{-8a}	3,46 (2,24- 5,35)
GA	00 (00,00)	000 (00,00)			0 (00,00)	1 (01,32)		
AA	00 (00,00)	000 (00,00)			0 (00,00)	0 (00,00)		
A845C								
		113						
AA	53 (100,00)	(100,00)		1 (référence)	120 (98,36)	76 (100,00)	4,45e^{-8a}	3,36 (2,17- 5,19)
AC	00 (00,00)	000 (00,00)			002 (01,64)	00 (00,00)		
CC	00 (00,00)	000 (00,00)			000 (00,00)	00 (00,00)		
G857A								
GG	51 (96,23)	108 (95,58)		1 (référence)	117 (95,90)	72 (94,74)	4,86e^{-8a}	3,44 (2,20- 5,36)
GA	02 (03,77)	05 (4,42)	1 ^b	0,84 (0,07- 5,39)	005 (04,10)	04 (05,26)	0,4 ^b	0,63 (0,17- 2,27)
AA	00 (00,00)	00 (00,00)			000 (00,00)	00 (00,00)		

^a Test khi-deux (χ^2) - ^b Test Fisher

La stratification des patients et des témoins selon leur génotypes *NAT2* et leurs statut tabagique, en prenant en considération comme groupe de référence : les non-fumeurs porteurs du génotype sauvage pour chacun des SNPs identifiés révèle une association significative entre le polymorphisme *NAT2* T341C et G590A et le cancer de la vessie chez les deux groupes non-fumeurs et fumeurs.

Cependant le risque semble croître si on prend en considération la nature de la mutation ; puisque l'association est plus élevée chez les individus homozygotes mutés comparé aux individus hétérozygotes mutés (Tableau 18).

De même, on remarque qu'en présence de ces deux SNPs le risque du cancer de la vessie demeure plus accru chez les fumeurs comparé aux non-fumeurs (Tableau 18).

Les variants *NAT2* C403G, A434C, C638T, G838A, A845C et G857A ne sont associés au cancer de la vessie que chez les fumeurs et uniquement à l'état homozygote sauvage pour chacun de ces polymorphismes. Ces résultats confirment que le tabac est le facteur de risque prédominant du cancer de la vessie comme nous l'avons déjà démontré dans le Tableau 10 (OR= 3,42, 95% CI = 2,21- 5,28, $p = 2,78 \times 10^{-8}$) et comme il a déjà été mentionné dans la littérature (**Brennan *et al.*, 2000 ; Zeegers *et al.*, 2004**). En effet, les substances cancérigènes présentes dans le tabac ont été impliquées depuis longtemps dans l'étiologie du cancer de la vessie chez les fumeurs (**Probst-Hensch *et al.*, 2000**). Par ailleurs, outre le grand nombre de polymorphismes de *NAT2* reporté, les polymorphismes d'autres gènes tels que La N-acétyltransférase 1 (*NAT1*) et les glutathion S-transférases M1 et T1 (*GSTM1* et *GSTT1*) peuvent altérer la capacité des enzymes xénobiotiques à métaboliser les carcinogènes (**Khedhiri *et al.*, 2010**).

Aucune association n'a été constatée entre les polymorphismes *NAT2* C345T, C481T et A803G et la susceptibilité au cancer de la vessie chez les non-fumeurs. Cependant, testés chez les fumeurs, ces polymorphismes ont montré une association notable dans le développement du cancer de la vessie pour tous les génotypes. Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'effet combiné des variants du gène *NAT2* et du tabagisme a un effet biologiquement plausible et augmente considérablement le risque de ce type de cancer (**Garcia-Closas *et al.*, 2005**).

En revanche, aucune association significative n'a été enregistrée entre le risque du cancer vésical et les polymorphismes *NAT2* suivants : G191A, C282T que ce soit chez les fumeurs ou les non-fumeurs. Cela pourrait être lié au fait que le nombre d'échantillon soit restreints d'une part et d'autre part, à la variation inter-ethnique qui fait que les fréquences des polymorphismes du gène *NAT2* varient considérablement d'une population à une autre d'où l'absence de certains polymorphismes dans certaines populations (**Gaedigk, 2000**).

Nous concluons que l'association simultanée des facteurs de risque donne une forte probabilité de développer un cancer de la vessie, comme indiqué par l'augmentation de la valeur de l'odds ratio présentée dans nos résultats (Tableau 18).

2.6. Association entre le phénotype d'acétylation du gène *NAT2*, le statut tabagique et le cancer de la vessie

Le risque du cancer vésical lié au phénotype d'acétylation prédit *NAT2* est étudié par stratification du statut tabagique et est mentionné sur le Tableau 19.

Tableau 19 : Stratification des patients et des témoins selon les phénotypes d'acétylation *NAT2* et statut tabagique.

Phénotype	Non-fumeur				Fumeurs			
	patients (%)	Témoins (%)	<i>p</i> - valeur	OR (CI 95%)	Patients (%)	Témoins (%)	<i>p</i> - valeur	OR (CI 95%)
R/I	8	23		1 (référence)	17	32	0,46	1,51 (0,51- 4,80)
Lent	45	90	0,52	1,43 (0,56-4,01)	105	44	7,20e⁻⁶	6,77 (2,67- 18,93)

*R/I : Rapide/Intermédiaire

Les résultats n'ont montré aucune association significative pour le phénotype d'acétylation rapide/intermédiaire chez les patients et chez les témoins du groupe des fumeurs ($p = 0,46$). En revanche, le phénotype d'acétylation lent a été associé à un risque accru de cancer de la vessie chez les fumeurs (OR = 6,77, IC 95% = 2,67-18,93, $p = 7,20e^{-6}$), ce qui n'est pas le cas chez les non-fumeurs ($p = 0,52$). Nos résultats sont en accord avec plusieurs études précédentes (**Brockmoller et al., 1996; Gu et al., 2005; Hein 2006; Moore et al., 2011**), selon lesquelles, la disposition génétique a été suggérée pour affecter la susceptibilité individuelle aux cancérogènes extrinsèques, principalement fumée de tabac. Les Enzymes N-acétyltransférases (NAT1, NAT2) sont impliqués dans la bioactivation et la détoxification de ces agents cancérigènes ; un phénotype acétylateur NAT2 lent s'est avéré être un facteur de

risque significatif pour le cancer de la vessie, particulièrement chez les fumeurs. Cette interaction gène-environnement a un fort effet biologique sur l'activité de l'enzyme NAT2, car les acétylateurs lents ne peuvent pas détoxifier rapidement les amines aromatiques par N-acétylation. De plus, le tabac est considéré comme la première source d'exposition aux amines aromatiques soupçonnées d'être les principaux cancérogènes de la vessie (Tao *et al.*, 2012). En outre, de nombreuses autres études ont signalé que l'efficacité de détoxification des xénobiotiques du tabac chez les individus présentant le phénotype NAT2 acétylateur lent dépendait de l'intensité de l'exposition au tabagisme plutôt que de sa durée (Lubin *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2011). Dans ce sens, il a été suggéré que chez les acétylateurs lents, la détoxification des arylamines présentes dans la fumée de cigarette pourrait devenir saturée à une intensité de consommation tabagique très élevée, ce qui minimiserait davantage l'efficacité de détoxification par NAT2 chez les acétylateurs lents (Lubin *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 2011).

2.7. Combinaison polymorphismes du gène NAT2-profession et association au cancer de la vessie

L'exposition au risque professionnel, notamment aux amines aromatiques et HAP augmente le risque de développer un cancer de la vessie à une fréquence de 10% (Kellen *et al.*, 2007).

Le Tableau 20, représente l'impact du risque professionnel associé aux polymorphismes T341C et G590A du gène NAT2 sur le cancer de la vessie :

Tableau 20 : Stratification des patients et des témoins selon les polymorphismes NAT2 et occupation professionnelle.

	Profession sans risque				Profession à risque			
	Patients (%)	Témoins (%)	<i>p</i> -valeur	OR (CI 95%)	Patients (%)	Témoins (%)	<i>p</i> -valeur	OR (CI 95%)
T341C								
TT	15 (18,52)	60 (42,55)		1 (référence)	29 (30,85)	25 (52,08)	0,0001	4,58 (1,99-10,93)
TC	36 (44,44)	51 (36,17)	0,003	2,81 (1,32-6,18)	41(43,62)	12 (25,00)	8,25e⁻¹¹	13,30 (5,38-35,35)
CC	30 (37,04)	30 (21,28)	0,0004	3,95 (1,76-9,23)	24(25,53)	11 (22,92)	1,30e⁻⁶	8,51 (3,22-24,12)
G590A								
GG	20 (24,69)	65 (46,10)		1 (référence)	30 (31,91)	32 (66,67)	0,002	3,02 (1,42-6,57)
GA	30 (37,04)	35 (24,82)	0,005	2,77 (1,31-5,96)	26 (27,66)	07 (14,58)	4,85e⁻⁸	11,75 (4,21-37,14)
AA	31 (38,27)	41 (29,08)	0,01	2,44 (1,17-5,18)	38 (40,43)	09 (18,75)	1,53e⁻¹⁰	13,38 (5,29-37,21)

La classification des patients et des témoins selon le risque professionnel et leur constitution allélique pour les polymorphismes *NAT2* T341C, G590A révèle une association significative entre les polymorphismes étudiés et le cancer vésical, que ce soit chez les fonctionnaires dans les secteurs à risque ou ceux qui travaillent dans les secteurs sans risque. Cependant on remarque que l'association est plus élevée chez les individus homozygotes mutés comparé aux individus hétérozygotes mutés (Tableau 20).

De même, nous remarquons qu'en présence de ces deux SNPs le risque du cancer de la vessie demeure plus accru chez les travailleurs dans les secteurs à risque comparé à ceux exerçant dans les secteurs sans risque pour cette étiologie (Tableau 20).

Nous signalons qu'aucun travail n'a été réalisé au préalable explorant l'impact des polymorphismes *NAT2* associés au risque professionnel sur le cancer de la vessie. Dans ce contexte, nous pouvons interpréter nos résultats par le fait que le rôle primordial dans le processus de carcinogénèse vésicale est joué par le polymorphisme génétique. Sachant que ce dernier contribue à la variation inter-individuelle dans la susceptibilité aux cancérogènes environnementaux, et expliquant pourquoi au sein d'un même groupe exposé aux mêmes cancérogènes environnementaux, ce n'est qu'un nombre restreint d'individus qui développent des tumeurs. Nous concluons également que le risque professionnel ne représente qu'un facteur additif au risque de développer un cancer de la vessie.

2.8. Association entre le phénotype d'acétylation du gène *NAT2*, le risque professionnel et le cancer de la vessie

Le Tableau 21 représente la répartition des sujets selon leurs profils d'acétylation *NAT2* et risque professionnel.

Tableau 21 : Stratification des patients et des témoins selon les phénotypes acétylateurs *NAT2* et occupation professionnelle.

Phénotype	Profession sans risque				Profession à risque			
	patients (%)	Témoins (%)	<i>p</i> -valeur	OR (CI 95%)	Patients (%)	Témoins (%)	<i>p</i> -valeur	OR (CI 95%)
R/I	10 (12,35)	42 (29,79)		1 (référence)	15 (15,96)	13 (27,08)	0,002	4,74 (1,57-15,12)
Lent	71 (87,65)	99 (70,21)	0,003	2,99 (1,37- 7,16)	79 (84,04)	35 (72,92)	1,58e⁻⁹	9,33 (4,05- 23,34)

*R/I : Rapide/Intermédiaire

Nos résultats ont montré une association significative pour le phénotype d'acétylation rapide/intermédiaire chez les patients exerçant dans des secteurs à risque ($p = 0,002$) (groupe de référence : patients exerçant dans des secteurs sans risque avec un phénotype d'acétylation rapide/intermédiaire). Ceci confirme nos résultats ainsi que ceux de la littérature à propos de l'association existante entre le risque professionnel et le cancer vésical (**Chopin *et al.*, 2001; Nurminen & Karjalainen, 2001 ; Kogevinas *et al.*, 2003 ; Burger *et al.*, 2013**).

Similairement, le phénotype d'acétylation lent a été associé au risque de la carcinogénèse vésicale pour les travailleurs dans les secteurs d'activités ne présentant aucun risque (OR = 2,99, IC 95% = 1,37-7,16, $p = 0,003$). Ce risque se trouve accru pour ceux fonctionnant dans les secteurs d'activités à risque (OR = 9,33, IC 95% = 4,05-23,34, $p = 1,58e^{-9}$). Nos résultats sont en accord avec ceux de la méta-analyse de **Vineis *et al.* (2001)** incluant 1530 cas et 731 témoins ou l'interaction entre l'exposition professionnelle et le phénotype acétylateur lent du gène *NAT2* a été corrélée à la tumorigénèse vésicale. A contrario, **Kelen *et al.* (2007)** n'ont trouvé aucune association entre le facteur de risque professionnel chez les acétylateurs lents et ce type de cancer.

Par ailleurs, les conclusions européennes présentent une grande susceptibilité vis-à-vis du cancer vésical pour les acétylateurs lents exposés professionnellement contrairement au résultats issus d'une large étude réalisée en Extrême-Orient (**Golka *et al.*, 2002**); il est important de noter que, dans les populations européennes, les groupes d'acétylateurs lents, intermédiaires et rapides sont à peu près également répartis alors qu'en Extrême-Orient, les acétylateurs lents ne représentent que 10 % de la population générale (**Thier *et al.*, 2003**).

2.9. Association entre polymorphismes T341C et G590A du gène *NAT2* et paramètres clinico-pathologiques

Tableau 22 : Association des SNP T341 et G590A du gène *NAT2* avec le stade et le grade tumoral.

	<i>TaG1-G2 (%)</i>	<i>TaG3 (%)</i>	<i>T1 (%)</i>	$\geq T2$ (%)	<i>p-valeur</i>
<i>T341C</i>					
<i>TT</i>	05 (27,78)	06 (33,33)	23 (27,71)	10 (17,86)	
<i>TC+CC</i>	13 (72,22)	12 (66,67)	60 (72,29)	46 (82,14)	0,4
<i>T</i>	20 (55,56)	19 (52,78)	71 (42,77)	55 (49,11)	
<i>C</i>	16 (44,44)	17 (47,22)	95 (57,23)	57 (50,89)	0,4
<i>G590A</i>					
<i>GG</i>	3 (15,00)	4 (25,00)	27 (32,53)	16 (28,57)	
<i>GA+AA</i>	17 (85,00)	12 (75,00)	56 (67,47)	40 (71,43)	0,5
<i>G</i>	16 (40,00)	17 (53,13)	66 (39,76)	57 (50,89)	
<i>A</i>	24 (60,00)	15 (46,87)	100 (60,24)	55 (49,11)	0,2

Comme mentionné dans le Tableau 22, aucune association significative n'a été détectée entre les polymorphismes T341C et G590A du gène *NAT2* et stades et grades tumoraux du cancer vésical ($p > 0,05$). Cependant, on remarque bien dans notre population d'étude que la plupart des patients avec des tumeurs de stade Ta présente une mutation du gène *NAT2* (25/36 pour le variant T341C et 29/36 pour le variant G590A), en particulier chez les patients qui ont des tumeurs TaG1-G2.

Par ailleurs, selon les travaux réalisés par **Hanahan & Weinberg (2000)**, il s'avère que l'acquisition de capacités tumorales qui permettent à une cellule normale de se transformer en cellule maligne serait un processus multi-étapes qui se fait progressivement.

Dans ce sens, la combinaison des résultats obtenus dans le Tableau 22 à ceux de Hanahan et Weinberg (2000), nous permet de suggérer que les polymorphismes T341C et G590A du gène *NAT2* puissent être impliqués dans l'initiation du processus de la carcinogénèse.

3. Génotypage du polymorphisme rs2228001 du gène *XPC*

L'*XPC* est un gène responsable de la synthèse d'une protéine impliquée dans l'initiation du processus de réparation d'ADN par le système d'excision de nucléotides (NER). Ce dernier, comme nous l'avons décrit précédemment comprend deux voies : la voie GG-NER et la voie TC-NER. En effet, c'est au niveau de la voie GG-NER qu'intervient la protéine XPC grâce au complexe XPC-Rad23B-centrine 2 qui reconnaît la distorsion de l'ADN associé à la lésion permettant ainsi par la suite l'intervention des autres protéines afin de restaurer l'intégrité de l'ADN.

D'un point de vue fonctionnel, en raison du rôle de l'*XPC* dans la réparation de l'ADN et des conséquences biologiques des variations de ce gène, un intérêt significatif s'est porté sur la recherche de polymorphismes afin d'identifier des rôles potentiels dans la prédisposition au cancer de la peau mais également à d'autres types de cancer.

En effet, de nombreuses études ont montré que les polymorphismes du gène *XPC* sont associés au risque du carcinome épidermoïde de l'oesophage, de l'adénocarcinome cardiaque ou gastrique, du carcinome épidermoïde de la tête et du cou, de cancer du sein, du carcinome rénal, du cancer de la vessie, de l'adénome colorectal avancé, du carcinome épidermoïde oral, du cancer du poumon et de l'adénocarcinome pancréatique (Sak *et al.*, 2005 ; Xiao *et al.*, 2010).

Afin de mettre en évidence une éventuelle association entre le polymorphisme rs2228001 du gène *XPC* et la survenue du cancer vésical dans notre population d'étude nous avons procédé au génotypage de l'exon 15 par méthode TaqMan.

Avant de pouvoir mettre au point un protocole pour la QPCR, nous avons procédé au séquençage de huit (8) échantillons pris au hasard parmi nos ADN. Trois (3) d'entre eux ont été utilisés comme contrôles représentant les trois (3) génotypes possibles du polymorphisme d'intérêt (homozygote muté, hétérozygote et homozygote sauvage). Ces ADN dont le génotype a été obtenu par séquençage sont utilisés en tant que calibrateurs de la QPCR (pour le bon déroulement de cette technique et confirmation des résultats du génotypage obtenus).

Les résultats obtenus par séquençage sont comme suit : 3 homozygotes sauvages AA, 3 hétérozygotes AC, et 2 homozygotes mutés CC comme présentés sur le Tableau 23 et la Figure 26 (le traitement des résultats de séquençage a été réalisé par le logiciel Sequencher V5.0).

Tableau 23 : Résultat du génotypage du polymorphisme rs2228001 du gène *XPC* par séquençage.

N° d'échantillon	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Génotype	AA	AC	AA	AC	AC	CC	CC	AA

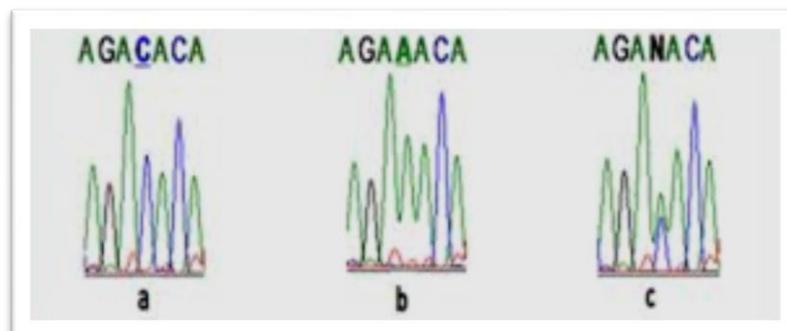


Figure 26 : Profil de séquençage d'un homozygote muté (a), d'un homozygote sauvage (b) et d'un hétérozygote (c) du polymorphisme rs2228001 du gène *XPC*.

Après plusieurs essais de température d'hybridation, un bon profil d'amplification par QPCR était obtenu à 60°C avec une fluorescence optimale et des résultats de génotypage identiques à ceux obtenus préalablement par séquençage (Figure 27).

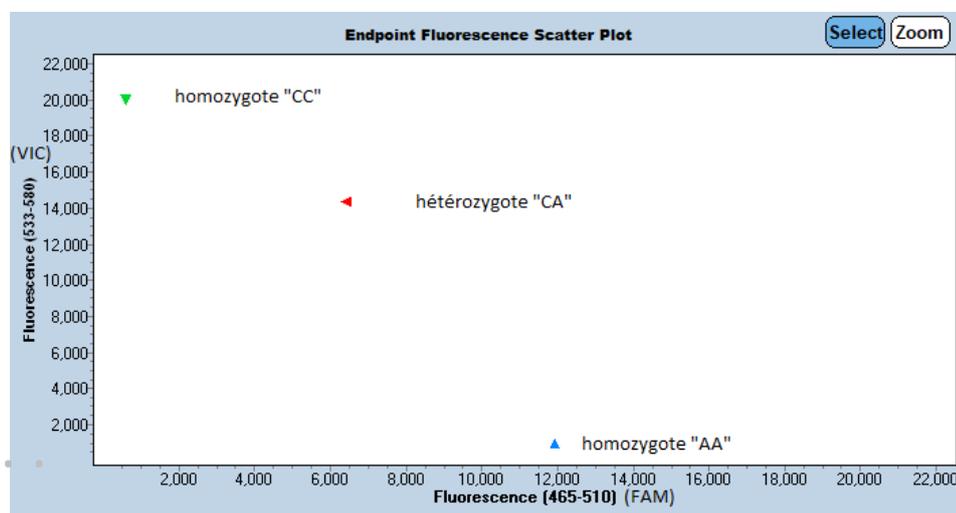


Figure 27 : Profil d'amplification par QPCR analysé par le logiciel LightCycler 480 de l'SNP rs2228001. L'axe des « y » fluorescence à 533-580 (VIC), l'axe des « x » fluorescence à 465-510 (FAM). Les points en gris : blanc PCR (témoins négatif de la PCR, mix PCR sans ADN) ; en vert : homozygote muté marqué par le VIC, en bleu : homozygote sauvage marqué par le FAM, et en rouge : hétérozygote marqué par les deux fluorochromes VIC/FAM.

Les résultats obtenus pour les quatre plaques de 96 puits correspondantes au génotypage de tous nos ADN (patients et témoins) sont présentés dans la Figure 28.

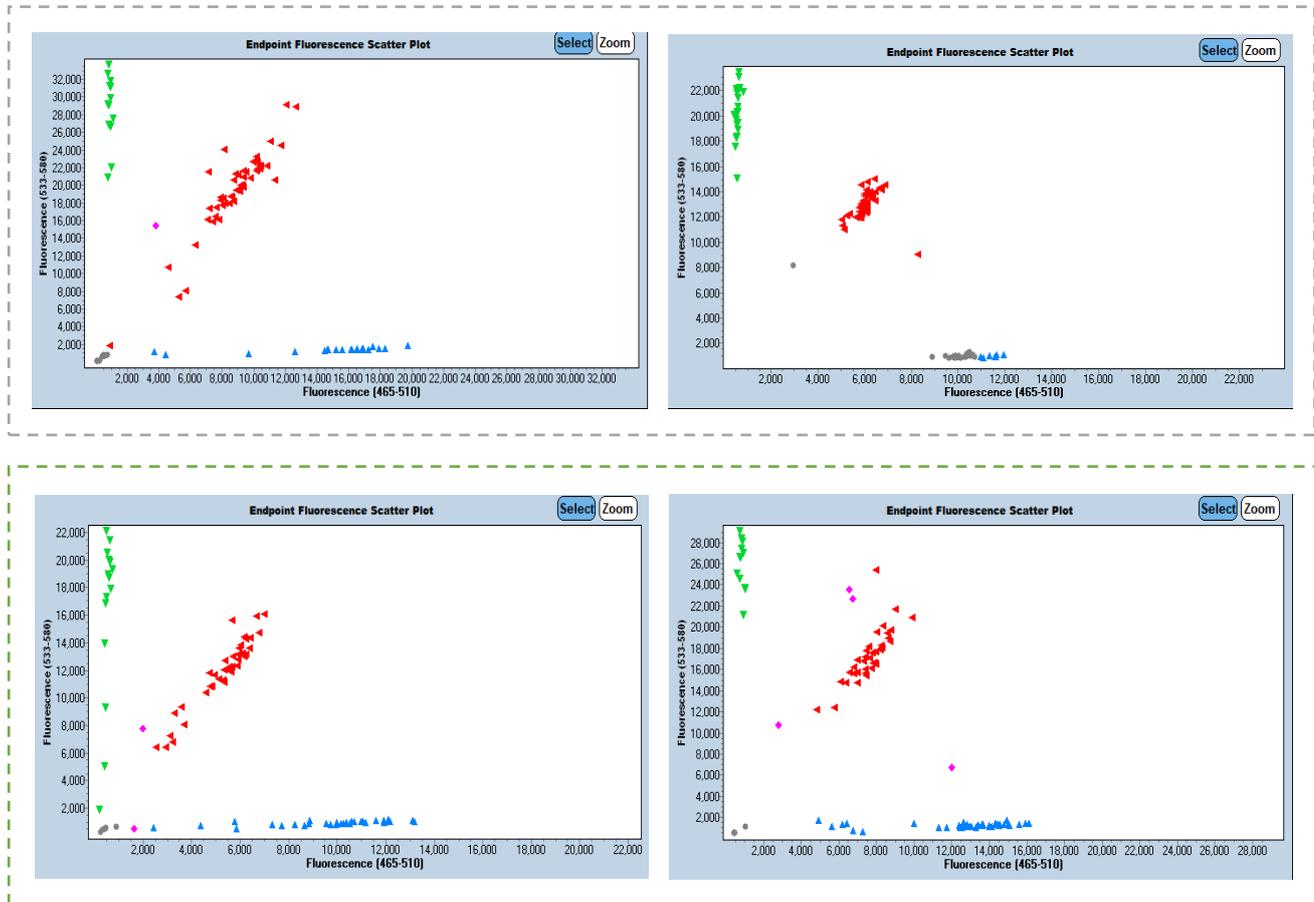


Figure 28 : Profil d’amplification par QPCR analysé par le logiciel LightCycler 480 de l’SNP rs2228001 pour les quatre plaques des patients et témoins. *Les profils encadrés en vert correspondent à ceux des patients, les profils encadrés en orange correspondent à ceux des témoins. Les triangles verts : hybridation avec la sonde VIC seulement (génotype homozygote muté) ; les triangles bleus : hybridation avec la sonde FAM seulement (génotype homozygote sauvage) ; les triangles rouges : double hybridation avec les deux sondes VIC et FAM (génotype hétérozygote) ; les points roses: génotype non déterminé.*

Pour quelques ADN (points roses de la Figure 28), le logiciel LightCycler 480 n’a pas pu déterminer le génotype ou bien il a donné un résultat négatif (pas d’amplification). Un autre essai a été réalisé pour ces échantillons dont certains avait donné un génotype précis contrairement à d’autres dont le génotype était indéterminé.

3.1. Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme rs2228001 du gène *XPC* et leurs association au cancer de la vessie

Le Tableau 24 présente la distribution des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme rs2228001 du gène *XPC* chez 153 patients et 182 témoins de notre population d'étude.

Tableau 24 : Fréquences génotypiques et alléliques de l'SNP rs2228001 au sein de la population d'étude.

<i>rs2228001</i>	patients (%)	Témoins (%)	<i>p-valeur</i>	OR IC 95%
AA	43 (28,10)	69 (37,91)		1 (Référence)
AC	83 (54,25)	81 (44,51)	0,04	1,64 (1,01-2,68)
CC	27 (17,65)	32 (17,58)	0,3	1,35 (0,71-2,56)
<i>allèle A</i>	169 (55,23)	219 (60,16)		1 (Référence)
<i>allèle C</i>	137 (44,77)	145 (39,84)	0,2	1,22 (0,90-1,67)

Nos résultats montre que la fréquence des trois génotypes, sauvage, hétérozygote et muté est presque comparables pour les cas et les témoins -avec une faible marge d'environ 9% pour les génotypes sauvage et hétérozygote- (AA : 28,10% vs 37,91%, AC : 54,25% vs 44,51%, et CC : 17,65% vs 17,58% respectivement pour les cas et les témoins).

On remarque également qu'il n'y a pas une grande différence entre la répartition des fréquences alléliques entre les deux groupes cas et témoins (A : 55,23% pour les cas vs 60,16% pour les témoins, et C : 44,77% pour les cas vs 39,84% pour les témoins). En effet, la fréquence allélique de l'allèle muté dans notre population témoins est similaire à celle rapportée par **Mechanic et al. (2006)** dont l'étude a été réalisée sur une population américaine incluant les Afro-Américains et les blancs. Cependant, elle s'avère légèrement différente de celle de nos voisins tunisiens estimée à 35 % (**Rouissi et al., 2011**) et complètement différente de celle d'une étude américaine portant sur deux races (Afro-Américaine et caucasienne) estimée à 48 % (**Agalliu et al., 2010**).

Comme mentionné dans le Tableau 24, le test statistique montre une association significative entre le polymorphisme rs2228001 et le cancer de la vessie uniquement pour les hétérozygotes

(OR=1,64, IC 95% = 1,01-2,68, $p = 0,04$), tandis que pour les homozygotes mutés l'association est présente mais non significative (OR = 1,35, IC 95% = 0,71-2,56, $p = 0,3$).

Dans ce cadre, les résultats d'études cherchant l'implication du polymorphisme rs2228001 du gène *XPC* et la carcinogénèse vésicale demeurent controversés. En effet, la méta-analyse de **Dou et al. (2013)**, ayant porté sur 12 études épidémiologiques incluant 4828 cas et 4890 témoins ainsi que la méta-analyse de **Dai et al. (2014)**, portant sur 10 études épidémiologiques rassemblant 3934 cas et 4269 témoins, ont révélés une association entre le polymorphisme d'intérêt et le cancer de la vessie. Contrairement à ces constatations **Sankhwar et al. (2016)** ont rapportés dans leurs études (individuelle, méta-analyse et TSA) que le polymorphisme rs2228001 n'était pas un facteur de risque pour le cancer de la vessie.

Pareillement au niveau des études individuelles, où l'absence d'association statistique entre le polymorphisme rs2228001 et le cancer de la vessie été conclue dans plusieurs études Européennes (Suède, Espagne, Royaume-Uni et France) (**Sanyal et al., 2004 ; Sak et al., 2005 ; Garcia-Closas et al., 2006 ; Fontana et al., 2008 ; Verdier et al., 2010**), et non conclue dans les études menées sur des populations Asiatiques (**Gangwar et al., 2010 ; Mittal & Mandal, 2012 ; Liu et al., 2012**) et Africaines (**Rouissi et al., 2011**) rapportant que le polymorphisme d'intérêt peut être considéré comme un éventuel facteur de risque génétique du cancer vésical. Les incohérences entre ces études indiquent que l'association du polymorphisme *XPC* au risque du cancer de la vessie peut dépendre du type de populations, des facteurs environnementaux et du patrimoine génétique (**Sankhwar et al., 2016**).

3.2. Distribution des génotypes du polymorphisme rs2228001 selon la tranche d'âge

Tableau 25 : Distribution des génotypes de l'SNP rs2228001 selon la tranche d'âge.

rs2228001	< 50 ans				≥ 50 ans			
	patients (%)	Témoins (%)	p-valeur	OR (CI 95%)	Patients (%)	Témoins (%)	p-valeur	OR (CI 95%)
AA	24 (63,16)	21 (53,85)		1 (Référence)	19 (16,52)	48 (33,57)		1 (Référence)
AC	13 (34,21)	11 (28,20)	1	1,03 (0,34-3,15)	70 (60,87)	70 (48,95)	0,004	2,51 (1,30-5,01)
CC	01 (02,63)	07 (17,95)	-	-	26 (22,61)	25 (17,48)	0,01	2,60 (1,14-6,06)
A	61 (80,26)	53 (67,95)		1 (Référence)	108 (46,96)	166 (58,04)		1 (Référence)
C	15 (19,74)	25 (32,05)	0,09	0,52 (0,23-1,16)	122 (53,04)	120 (41,96)	0,01	1,56 (1,10-2,22)

La division de nos effectifs selon la tranche d'âge, montre une association significative pour la catégorie d'âge de plus ou égale à 50 ans, que ce soit pour le génotype hétérozygote ou homozygote muté (OR = 2,51, IC 95% = 1,30-5,01, $p = 0,004$; OR = 2,60, IC 95% = 1,14-6,06, $p = 0,01$ respectivement), cependant, nous n'avons remarqué aucune différence au niveau des fréquences génotypiques du polymorphisme rs2228001 entre les patients et les témoins de notre population d'étude pour la catégorie d'âge moins de 50 ans.

D'après les fréquences alléliques, on remarque que l'allèle muté C est un facteur de risque favorisant le développement du cancer vésical uniquement chez le groupe de plus au égale à 50 ans (OR = 1,56, IC 95% = 1,10- 2,22, $p = 0,01$).

Nous avons relaté ces résultats d'une part à l'effectif restreint de la catégorie des patients moins de 50 ans (38/153 patients et 39/182 témoins) et d'autre part à la détérioration des systèmes de réparation en général avec l'âge. Selon la littérature, il existe des preuves suffisantes que toutes les voies de réparation de l'ADN deviennent moins efficaces avec l'âge, entraînant de ce fait une accumulation de mutations (**Gorbunova et al., 2007, Kim et al., 2018**). Dans ce sens, plusieurs études soulignent la diminution de l'activité des enzymes de réparation de l'ADN liée à l'âge (**Intano et al., 2003 ; Um et al., 2003 ; Seluanov et al., 2007**). Des altérations de la réponse des protéines de réparation de l'ADN aux dommages de l'ADN ont été également rapportées (**Doria et al., 2004 ; Cabelof et al., 2006 ; Seluanov et al., 2007**). De plus, l'apoptose, qui est un autre processus déclenché par des dommages à l'ADN, s'est avérée devenir régulée négativement lors du vieillissement (**Suh et al., 2002**) et la sénescence, qui en outre est liée à une activité modifiée de la p53 (**Hinkle et al., 2009**). Il a été admis également que les organismes âgés deviennent plus sensibles au stress, ce qui peut en altérer les réactions et affecter les réparations de l'ADN (**Niedernhofer et al., 2006**). Le résultat de toutes ces recherches contribuent à mieux comprendre pourquoi les patients plus âgés sont plus exposés au risque de développer le cancer vésical suite à une déficience des systèmes de réparation de l'ADN.

3.3. Combinaison SNP rs2228001-tabac et leurs associations au cancer de la vessie

Le gène *XPC* est un gène de réparation d'ADN capable de reconnaître une grande variété d'adduits volumineux induits par des carcinogènes d'origine environnementale, parmi lesquels

le tabac qui représente le premier facteur environnemental impliqué dans l'étiologie du cancer vésical. Vu la relation directe existante entre le gène d'intérêt et la consommation du tabac, nous avons étudié l'effet combiné du polymorphisme rs2228001 et tabac sur le risque du cancer vésical. Les résultats sont présentés sur le Tableau 26.

Tableau 26 : Stratification des patients et des témoins selon les génotypes de l'SNP rs2228001 et le statut tabagique.

rs2228001	Non-fumeurs				Fumeurs			
	patients (%)	Témoins (%)	p-valeur	OR (CI 95%)	Patients (%)	Témoins (%)	p-valeur	OR (CI 95%)
AA	15 (19,74)	39 (37,14)			28 (36,36)	30 (38,96)	0,03	2,41 (1,03-5,78)
AC	36 (47,37)	41 (39,05)	0,03	2,26 (1,02-5,20)	47 (61,04)	40 (51,95)	0,002	3,03 (1,39-6,83)
CC	25 (32,89)	25 (23,81)	0,02	2,57 (1,07-6,38)	02 (02,60)	07 (09,09)	-	-

Lorsque nous avons établi la stratification des patients et des témoins selon leurs génotypes *XPC* et statut tabagique, nous avons remarqué que chez les non-fumeurs les génotypes hétérozygotes et homozygotes mutés (AC et CC) semblent être des facteurs de risque du cancer vésical (OR = 2,26, IC 95% = 1,02- 5,20, $p = 0,03$; OR = 2,57, IC 95% = 1,07- 6,38, $p=0,02$, respectivement). Pareillement pour les individus fumeurs incluant le génotype sauvage, mettant en exergue encore une fois pour cette dernière constatation nos résultats concernant l'implication du tabac dans l'étiologie du cancer vésical (OR = 2,41, IC 95% = 1,03-5,78, $p = 0,03$). Par contre chez la catégorie fumeurs, par rapport à l'allèle muté, seul le génotype hétérozygote AC présente un facteur de risque (OR = 3,03, IC 95% = 1,39-6,83, $p = 0,002$) puisque chez les individus homozygote muté le manque d'échantillons nous a privés de déterminer l'association (2 patient et 7 témoins).

Le même résultat est rapporté par **Rouissi et al. (2011)**, qui ont mis en évidence l'effet additif entre l'SNP rs2228001 et le statut tabagique. Ce résultat peut être expliqué par le fait que les personnes qui sont exposés à une forte intensité de cancérogènes du tabac et en outre présentent des défaillances des voies enzymatiques de réparation de l'ADN ne peuvent pas restaurer les mutations provoquées par des adduits d'ADN volumineux généralement générés par l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans la fumée de tabac. Une récente étude a rapporté que les aldéhydes représentent les agents cancérigènes majeurs de la fumée du tabac induisant des adduits mutagènes, altérant de ce fait les fonctions de réparation

de l'ADN à savoir le système NER et le système BER que ce soit dans les tissus du poumon ou tissu de l'épithélium urothélial (Weng *et al.*, 2018).

A contrario, certaines études n'ont trouvé aucune association entre le cancer de la vessie et le polymorphisme rs2228001 chez les fumeurs (Zhi *et al.*, 2012; Mittal & Mandal, 2012).

3.4. Combinaison SNP rs2228001-risque professionnel et association au cancer de la vessie

L'impact de la combinaison rs2228001-risque professionnel sur le cancer de la vessie, a été réalisé par classification des patients et des témoins en fonction de leurs génotypes pour le polymorphisme rs2228001 du gène *XPC* et en fonction de leurs professions qu'elles soient sans risque ou à risque pour le cancer de la vessie. Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau 27.

Tableau 27 : Stratification des patients et des témoins selon les génotypes rs2228001 et le risque professionnel.

<i>rs2228001</i>	<i>Profession sans risque</i>				<i>Profession à risque</i>			
	<i>Patients (%)</i>	<i>Témoins (%)</i>	<i>p-valeur</i>	<i>OR (CI 95%)</i>	<i>Patients (%)</i>	<i>Témoins (%)</i>	<i>p-valeur</i>	<i>OR (CI 95%)</i>
AA	15 (27,78)	50 (36,76)		1 (référence)	28 (28,28)	19 (43,18)	0,0001	4,83 (2,00-12,13)
AC	36 (66,67)	56 (41,18)	0,03	2,13 (1,00-4,72)	47 (47,48)	23 (52,27)	3,60e⁻⁷	6,70 (2,99-15,75)
CC	03 (05,55)	30 (22,06)	-	-	24 (24,24)	02 (04,55)	-	-

En prenant comme référence les travailleurs dans les secteurs ne présentant aucun risque vis-à-vis du cancer de la vessie et portant le génotype AA, les résultats révèlent que le génotype hétérozygote AC est un génotype à risque pour le cancer de la vessie, que ce soit chez les travailleurs dans les secteurs d'activité sans risque ou ceux travaillant dans les secteurs à risque pour ce type de cancer. Il est à noter que ce risque est 3 fois supérieur pour les patients hétérozygotes occupant des secteurs d'activités à risques pour cette étiologie (OR = 6,70 pour le groupes de professions à risque vs OR = 2,13 pour le groupes de professions sans risque).

Cependant le petit nombre d'individus porteur du génotype homozygote muté dans les deux groupes étudiés nous a privés de calculer l'association de ces derniers au cancer de la vessie (Tableau 26).

Nos résultats concluent que le polymorphisme rs2228001 du gène *XPC* augmente le risque du cancer vésical en présence d'un certain nombre d'expositions professionnelles, ce qui peut être interprété par le fait que, les adduits volumineux d'ADN formés par les amines aromatiques - présents dans plusieurs secteurs de travail- sont réparés par le système de réparation d'ADN par excision de nucléotides (NER), ce dernier, dont la capacité peut être altérée en présence d'un polymorphisme du gène *XPC* affectant ainsi la prédisposition génétique au cancer de la vessie (Sankhwar *et al.*, 2016).

3.5. Interaction entre le polymorphisme rs2228001 et les paramètres clinico-pathologiques

Les calculs statistique obtenus pour l'interaction entre le polymorphisme d'intérêt et les paramètres clinico-pathologiques sont mentionnés sur le Tableau 28.

Tableau 28 : Stratification des patients et des témoins selon les génotypes de l'SNP rs2228001 et le stade et/ ou le grade tumoral

<i>rs2228001</i>	<i>TaG1-G2 (%)</i>	<i>TaG3 (%)</i>	<i>T1 (%)</i>	<i>≥T2 (%)</i>	<i>p-valeur</i>
AA	05 (20,00)	06 (26,09)	22 (32,84)	10 (26,32)	
AC	13 (52,00)	12 (52,17)	37 (55,22)	21 (55,26)	0,9
CC	07 (28,00)	05 (21,74)	08 (11,94)	07 (18,42)	0,2

En ce qui concerne les paramètres clinico-pathologiques, aucune association n'a été détectée entre le polymorphisme étudié et le stade ou le grade tumoral ($p > 0,05$). En effet nos résultats sont similaires avec ceux de Rouissi *et al.* (2011) mais différents de ceux de Chen *et al.* (2007) qui ont rapporté une forte corrélation entre le déficit en *XPC* et le degré croissant de malignité des tumeurs de la vessie. Cette association s'explique par la grande corrélation entre le déficit en *XPC* et les mutations *Tp53*, sachant que les altérations de *p53* se produisent principalement dans les tumeurs superficielles invasives et de haut grade (Soussi & Bérourd, 2001).

Conclusion et perspectives

Nous avons voulu à travers cette étude déceler certains facteurs de risque moléculaires ou environnementaux impliqués dans la survenue du cancer vésical.

Notre étude a révélé en premier lieu que ce type de cancer touche préférentiellement les hommes (sex-ratio 12:1) et est typique de l'âge avancé puisque la fréquence maximale des tumeurs vésicales tous types confondus lors du diagnostic se situe entre 60 et 69 ans. Nos résultats ont montré également que presque 70 % de nos patients sont des fumeurs et 64,57% présentent des risques professionnels. Le risque se trouve augmenté avec la durée d'exposition au tabac, la quantité de cigarettes consommées et le nombre d'années de pratique des professions confirmant ainsi d'une part, que le tabagisme et l'occupation professionnelle sont des facteurs de risque importants incriminés dans la survenue et le développement des cancers vésicaux ; et d'autre part, l'effet dose c'est-à-dire l'accumulation des effets nocifs au fil des temps. Par ailleurs, les données clinico-pathologiques ont rapporté que la majorité des cas présentent des tumeurs PT1 de grade III, ce qui justifie la fréquence élevée de récurrence (54%).

Notre travail de recherche a démontré que parmi les 13 polymorphismes NAT2 identifiés dans notre population d'étude seuls ceux en position T341C et G590A ont montré une association statistiquement significative avec le risque de développer un cancer vésical. Ces mutations faux-sens entraînent une forte réduction de l'activité de la protéine NAT2 conduisant à un défaut de détoxification des substances carcinogènes, dont l'accumulation est responsable d'un effet génotoxique, favorisant la tumorigénèse. L'association de ces polymorphismes avec les carcinogènes du tabac ou ceux retrouvés dans les secteurs d'activités à risque augmentent nettement le risque de susceptibilité à ce type de cancer.

Nos résultats montrent que l'acétylation lente est le profil d'acétylation le plus fréquent dans la population Algérienne (70,90% des témoins) et qu'une association remarquablement significative a été enregistrée entre les phénotypes acétylateurs lents et le risque de cancer de la vessie. En ce qui concerne les génotypes, les génotypes *NAT2*5/5* et *NAT2*5/6* -caractérisés par les SNPs T341C et G590A respectivement- été aussi associés au risque du cancer vésical confirmant l'implication de l'allèle *NAT2*5* dans la survenue de ce type de cancer. Pour ces mêmes polymorphismes le risque du cancer de la vessie demeure plus important chez les fumeurs comparés aux non-fumeurs et chez les travailleurs dans les secteurs à risque comparés à ceux travaillant dans les secteurs d'activités non à risque ce qui nous mène à en déduire que

les variations de l'expression du gène *NAT2* influence la réponse biologique des individus par rapport aux différents carcinogènes environnementaux.

Les résultats que nous avons obtenus lors de la prospection du polymorphisme rs2228001 porté par le gène *XPC* ont montré que le génotype hétérozygote **AC** est un facteur de risque du cancer vésical. Cependant, la division de nos effectifs selon la tranche d'âge, montre une association significative pour la catégorie d'âge de plus ou égale à 50 ans, que ce soit pour le génotype hétérozygote **AC** ou homozygote muté **CC**, ce qui peut être relié à la détérioration des systèmes de réparation en général avec l'âge. En outre, nos résultats concluent que le polymorphisme rs2228001 du gène *XPC* augmente le risque du cancer vésical en présence du tabac et d'un certain nombre d'expositions professionnelles suite à l'altération de la capacité de réparation des adduits volumineux formés par les amines aromatiques ou HAP.

A partir de tous ces résultats, il paraît évident que le cancer vésical n'est ni le résultat d'une exposition environnementale isolée, ni celui d'une mutation génétique unique mais le résultat de l'effet conjugué de facteurs génétiques et environnementaux.

Les résultats obtenus laissent entrevoir de nombreuses perspectives, il serait donc judicieux :

- d'avoir une idée sur les secteurs d'activité les plus impliqués dans cette étiologie ainsi que d'identifier les facteurs d'exposition (exposition à quel type de substance, durée d'exposition, intensité, période d'exposition...) dont le but est de sensibiliser les institutions professionnelles pour la prise en charge médico-légale des travailleurs exposés ou ayant été exposés à des carcinogènes de vessie. Dans ce contexte, comme moyen de prévention nous suggérons la mise en place au niveau de la médecine de travail d'une unité de biologie moléculaire visant le génotypage des gènes de détoxification dans le but de chercher les travailleurs susceptibles de développer ce type de cancer.
- d'élargir la taille de l'échantillon afin de pouvoir tirer des conclusions cohérentes sur l'association du polymorphisme rs2228001 à la tumorigenèse vésicale.
- d'analyser d'autres polymorphismes génétiques impliqués soit dans le métabolisme des xénobiotiques, soit dans les systèmes de réparation d'ADN qui permettraient de mieux tracer la voie de carcinogénèse urothéliale.

- de rechercher les pertes d'hétérozygotie notamment pour le chromosome 9 comme moyen de dépistage précoce des cancers vésicaux de bas grade.
- de connaître le profil acétylateur des patients pour une meilleure optimisation du traitement.

*Références
bibliographiques*

Abern MR, Dude AM, Tsivian M, Coogan CL. The characteristics of bladder cancer after radiotherapy for prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2013;31(8):1628-34.

Adrian PM. Bladder cancer. *BMJ*. 1998;317:1366-69.

Agalliu I, Kwon EM, Salinas CA, Koopmeiners JS, Ostrander EA, Stanford JL. Genetic variation in DNA repair genes and prostate cancer risk: results from a population-based study. *Cancer Causes Control*. 2010;21(2):289-300.

Akllilu L, Carrillo JA, Makonnen E, Bertilsson L, Djordjevic N. N-Acetyltransferase-2 (NAT2) phenotype is influenced by genotype-environment interaction in Ethiopians. *Eur J Clin Pharmacol*. 2018;74(7):903-11.

Al-Ahmad MM, Amir N, Dhanasekaran S, John A, Abdulrazzag YM, Ali BR, et al. Studies on N-Acetyltransferase (NAT2) Genotype Relationships in Emiratis: Confirmation of the Existence of Phenotype Variation among Slow Acetylators. *Annals of Human Genetics*. 2017:1-8.

An Y, Li H, Wang K, Liu X, Qiu M, Liao Y, et al. Meta-analysis of the relationship between slow acetylation of N-acetyl transferase 2 and the risk of bladder cancer. *Genetics and Molecular Research*. 2015;14:16896-904.

Andujar P, Pairon JC. Comment déclarer les cancers professionnels de la vessie et des voies urinaires excrétrices?. *Progres en Urologie-FMC*. 2010;20:F21-6.

Antonova O, Toncheva D, Grigorov E. Bladder cancer risk from the perspective of genetic polymorphisms in the carcinogen metabolizing enzymes. *J BUON*. 2015;20(6):1397-406.

Araki M, Masutani C, Takemura M, Uchida A, Sugasawa K, Kondoh J, et al. Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem*. 2001;276:18665-72.

Aveyard P, Adab P, Cheng KK, Wallace DMA, Hey K, Murphy MFG. Does smoking status influence the prognosis of bladder cancer? A systematic review. *BJU International*. 2002;90(3):228-39.

Ayadi ID, Nouaili EB, Talbi E, Ghdemssi A, Rached C, Bahlous A, et al. Prevalence of vitamin D deficiency in mothers and their newborns in a Tunisian population. *Int J Gynaecol Obstet*. 2016;133(2):192-5.

Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, et al. Carcinogenicity of some aromatic amines, organic dyes, and related exposures. *Lancet Oncol*. 2008;9(4):322-3.

- Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, van Rhijn BW, Compérat E, et al.** EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol.* 2013;64(4):639-53.
- Bakkar AA, Wallerand H, Radvanyi F, Lahaye JB, Pissard S, Lecerf L, et al.** *FGFR3* and *TP53* gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer research.* 2003;63(23):8108-12.
- Band PR, Le ND, MacArthur AC, Fang R, Gallagher RP.** Identification of occupational cancer risks in British Columbia: a population-based case-control study of 1129 cases of bladder cancer. *Journal of occupational and environmental medicine.* 2005;47 854-8..
- Barbone FSL, Talamini R, Bidoli E, LA VECCHIA C.** Occupation and bladder cancer in Pordenone (north-east Italy): a case-control study. *Int J Epidemiol.* 1994;23:58-65.
- Baris D, Karagas MR, Verrill C, Johnson A, Andrew AS, Marsit CJ, et al.** A case-control study of smoking and bladder cancer risk emergent patterns over time. *Nati cancer int.* 2009;101(22):1553-61.
- Batty D, Ropic-Otrin V, Levine AS, Wood RD.** Stable binding of human XPC complex to irradiated DNA confers strong discrimination for damaged sites. *J Mol Biol.* 200;300:275-90.
- Benckroun A, El Alj HA, Essayegh H, Iken A, Nouini Y, Lachkar A et al.** Tumeurs infiltrantes de vessie : étude rétrospective à propos de 225 cas. *Annales d'urologie* 2003;37:279-83.
- Bendjemana K, Abdennebi M, Gara S, Jmal A, Ghanem A, Touati S, et al.** [Genetic polymorphism of glutathione-S transferases and N-acetyl transferases 2 and nasopharyngeal carcinoma: the Tunisia experience]. *Bull Cancer.* 2006;93(3):297-302.
- Bjerregaard BK, Raaschou-Nielsen O, Sorensen M, Frederiksen K, Christensen J, Tjonneland A, et al.** Tobacco smoke and bladder cancer R in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *International Journal of Cancer.* 2006;119(10):2412-6.
- Blanchard JM, Graziana JP, Bonnal JL, Biserte J, Mauroy B.** Tumeurs de vessie du sujet jeune: à propos de 26 cas. Comparaison aux données de la littérature. *Prog Urol.* 2003;13:227-33.
- Billerey C, Sibony M.** Tumeurs superficielles de la vessie. *Prog. Urol.* 2001;11(5):807-18.
- Billerey C, Chopin D, ubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de MS, Van RB, et al.** Frequent *FGFR3* mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol.* 2001;158:1955-9.
- Blum M, Grant DM, McBride W, Heim M, Meyer UA.** Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization, and functional expression. *DNA Cell Biol.* 1990;9:193-203.

- Boeri L, Soligo M, Frank I, Boorjian SA, Thompson RH, Tollefson M, et al.** Cigarette smoking is associated with adverse pathological response and increased disease recurrence amongst patients with muscle-invasive bladder cancer treated with cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy: a single-centre experience. *BJU Int.* 2019;123(6):1011-9.
- Botteri E, Ferrari P, Roswall N, Tjønneland A, Hjartåker A, Huerta JM, et al.** Alcohol consumption and risk of urothelial cell bladder cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition cohort. *Int J Cancer.* 2017;141(10):1963-70.
- Bouchet BP, Carron C, Puisieux A, Galmarini CM.** p53 as a target for anti-cancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006;58(3):190-207.
- Boukouvala S, Fakis G.** Arylamine N-acetyltransferases: what we learn from genes and genomes. *Drug Metab Rev.* 2005;37:511-64.
- Boukouvala. S.** Human NAT2 Alleles (haplotypes). http://nat.mbg.duth.gr/Human%20NAT2%20alleles_2013.htm. Last update: 18/04/2016 Accessed: 09/10/2019.
- Bourgkard E, Wild P, Courcot B, Diss M, Ettliger J, Goutet P, et al.** Lung cancer mortality and iron oxide exposure in a French steel-producing factory. *Occup Environ Med.* 2009;66(3):175-81.
- Bourrillon A, Cabanis EA, Chapuis Y.** Larousse Médicale: Ed 3^{ème} édition. Tatiana Dellesalle-Féat, paris; 2003.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A.** Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA CANCER J CLIN.* 2018;68:394-424.
- Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, et al.** Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int. J. Cancer.* 2000;86(2):289-94.
- Brokmoller J, Cascorbi I, Kerb R, Roots I.** Combined Analysis of Inherited Polymorphisms in Arylamine N-Acetyltransferase 2, Glutathione S-Transferases M1 and T1, Microsomal Epoxide Hydrolase, and Cytochrome P450 Enzymes as Modulators of Bladder Cancer Risk. *Cancer Res.* 1996;56(17): 3915-25.
- Brooker C, Langlois-Wils I, Lepresle É.** Le corps humain: Étude, structure et fonction: Ed. De Boeck Supérieur; 2000.
- Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al.** Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *European Urology.* 2013;63(2):234-41.
- Butcher NJ, Boukouvala S, Sim E, Minchin RF.** Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases. *Pharmacogenomics J.* 2002;2:30-42.

Cabelof DC, Raffoul JJ, Ge Y, Van Remmen H, Matherly LH, Heydari AR. Age-related loss of the DNA repair response following exposure to oxidative stress. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2006;61:427-34.

Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA. Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene.* 1991;6:2305-9.

Calvert GM, Ward E, Schnorr TM, Fine LJ. Cancer risks among workers exposed to metalworking fluids: a systematic review. *American journal of industrial medicine.* 1998;33:282-92.

Camilo A, Thomas P. Méméto de pathologie: Ed 2ème édition. Editions Vernazobres-grégo; 2006.

Carreón T, Hein MJ, Viet SM, Hanley MW, Ruder AM, Ward EM. Increased bladder cancer risk among workers exposed to O-toluidine and aniline: a reanalysis. *Occup Environ Med.* 2010;67(5):348-50.

Cascorbi I, Roots I, Brockmüller J. Association of *NAT1* and *NAT2* Polymorphisms to Urinary Bladder Cancer. *Cancer Res.* 2001;61(13):5051-6.

Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, Matos T, Cordon-Cardo C. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urol Oncol.* 2010;28:401-8.

Centre International de Recherche Contre le Cancer. Agents classés par les monographies du CIRC, volume1-124. 2019. Available from: <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>. Last update: 23/09/2019. Accessed: 08/10/2019.

Chamorro JG, Castagnino JP, Musella RM, Frias A, Aranda FM, De Larranaga GF. The distribution of allelic and genotypic frequencies of N-Acetyltransferase-2 variants in an Argentine population. *J Infect Dev Ctries.* 2012;6(9):671-4.

Chapman EJ, Harnden P, Chambers P, Johnston C, Knowles MA. Comprehensive analysis of CDKN2A status in microdissected urothelial cell carcinoma reveals potential haploinsufficiency, a high frequency of homozygous co-deletion and associations with clinical phenotype. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research.* 2005;11(16):5740-7.

Chen Z, Yang J, Wang G, Song B, Li J, Xu Z. Attenuated expression of xeroderma pigmentosum group C is associated with critical events in human bladder cancer carcinogenesis and progression. *Cancer Res.* 2007;67:4578-85.

Chen H, Lin YW, Mao YQ, Wu J, Liu YF, Zheng XY, et al. MicroRNA-449a acts as a tumor suppressor in human bladder cancer through the regulation of pocket proteins. *Cancer letter.* 2012;320(1):40-7.

Cheng L, MacLennan GT, Pan CX, Jones TD, Moore CR, Zhang S, et al. Allelic loss of the active X chromosome during bladder carcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med.* 2004;128(2):187-90.

- Chirila DN, Popp R, Vesa S, Balacescu O, Coman I, Constantea NA, et al.** GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Genetic Variants in Multiple Urologic Cancers. *Chirurgia (Bucur)*. 2015;110:254-61.
- Chopin D, Cappellen D, Fradvanyi F, Gattegno B.** Tumeurs superficielles de la vessie. *Progrès en urologie*. 2001;11 (5): 879-924.
- Chu H, Wang M, Zhang Z.** Bladder cancer epidemiology and genetic susceptibility. *J Biomed Res*. 2013;27:170-78.
- Clark P, Agarwal N, Biagioli M, Eisenberger M, Greenberg R, Herr H et al.** bladder cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2013;11:446-75.
- Claude L, Jhuret JL.** De la cytogénétique à la cytogénomique des cancers de la vessie. *Bulletin du cancer*. 2002;2:166-73.
- Cogliano VJ, Baan R, Straif K, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, et al.** Preventable Exposures Associated With Human Cancers. *JNCI*. 2011;103(24):1827-39.
- Cohen SM, Shirai T, Steineck G.** Epidemiology and etiology of premalignant and malignant urothelial changes. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. 2000;205:105-15.
- Collot S, Alain S, Denis F, Ranger-Rogez S.** Quantification par PCR en temps réel, technologie TaqMan et applications en virologie. *Virologie*. 2001;5(6):439-48.
- Colt JS, Karagas MR, Schwenn M, Baris D, Johnson A, Stewart P, et al.** Occupation and bladder cancer in a population-based case-control study in Northern New England. *Occupational and environmental medicine*. 2011;68:239-49.
- Cordier SJC, Limasset JC, Boccon-Gibod L, Le Moual N, Mandereau L, Hemon D.** Occupational risks of bladder cancer in France: a multicentre case-control study. *Int J Epidemiol*. 1993;22:403-11.
- Corral R, Lewinger JP, Van Den Berg D, Joshi AD, Yuan JM, Gago-Dominguez M, et al.** Comprehensive analyses of DNA repair pathways, smoking and bladder cancer risk in Los Angeles and Shanghai. *Int J Cancer*. 2014;135(2):335-47.
- Cumberbatch MGK, Cox A, Teare D, Catto JWF.** Contemporary Occupational Carcinogen Exposure and Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2015;1(9):1282-1290.
- Cumberbatch MGK, Jubber I, Black PC, Esperto F, Figueroa JD, Kamat AM, et al.** Epidemiology of bladder cancer: A Systematic review and contemporary update of risk factors in 2018. 2018;74(6):784-95.
- Cumberbatch MGK, Noon AP.** Epidemiology, aetiology and screening of bladder cancer. *Transl Androl Urol*. 2019;8(1):5-11.
- Dai QS, Hua RX, Zeng RF, Long JT, Peng ZW.** XPC gene polymorphisms contribute to bladder cancer susceptibility: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2014;35:447-53.

Dehayni Y, Tetou M, Khdach Y, Janane A, Alami M, Ameer A. Prognostic of older age for patients with invasive-muscle-bladder cancer and treated by radical cystectomy. *Prog Urol.* 2018;28(3):166-72.

de Verdier PJ, Sanyal S, Bermejo JL, Steineck G, Hemminki K, Kumar R. Genotypes, haplotypes and diplotypes of three XPC polymorphisms in urinary-bladder cancer patients. *Mutat. Res.* 2010;694(1-2):39-44.

Di Pietro G, Gadelha SR, Sousa SMB, Santana de Melo PR, Rios Santos F. N-acetyltransferase 2: Slow, intermediate or fast? A booming question of the molecular epidemiology in cancer research. *Open J. Genet.* 2012;2:221-35.

Dobruch J, Daneshmand S, Fisch M, Lotan Y, Noon AP, Resnick MJ, et al. Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. *Eur Urol.* 2016;69(2):300-10.

Donato F, Boffetta P, Fazioli R, Aulenti V, Gelatti U, Porru S. Bladder cancer, tobacco smoking, coffee and alcohol drinking in Brescia, northern Italy. *European Journal of Epidemiology.* 1997;13(7):795-800.

Doria G, Barattini P, Scarpaci S, Puel A, Guidi L, Frasca D. Role of immune responsiveness and DNA repair capacity genes in ageing. *Ageing Res Rev.* 2004;3:143-51.

Dou, K, Xu Q, Han X. The association between XPC Lys939Gln gene polymorphism and urinary bladder cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *Diagn. Pathol.* 2013;8:112.

El Desoky ES, AbdelSalam YM, Salama RH, El Akkad MA, Atanasova S, von Ahnen N, et al. NAT2*5/*5 genotype (341T>C) is a potential risk factor for schistosomiasis-associated bladder cancer in Egyptians. *Ther Drug Monit.* 2005;27(3): 297-304.

El Mawla NG, El Bolkainy MN, Khaled HM. Bladder cancer in Africa: Update. *Semin Oncol.* 2001;28:174-78.

Fajkovic H, Halpern JA, Cha EK, Bahadori A, Chromecki TF, Karakiewicz PI, et al. Impact of gender on bladder cancer incidence, staging, and prognosis. *World J Urol.* 2011;29(4):457-63.

Fernandes GLC, Descotes F, André J, Perrin P, Devonec M, Ruffion A. Intérêt des marqueurs urinaires dans le diagnostic et le suivi des tumeurs urothéliales de la vessie. *Progrès en urologie.* 2007;17(1):23-34.

Ferris J, Garcia J, Berbel O, Ortega JA. Constitutional and occupational risk factors associated with bladder cancer. *Actas Urologicas Espanolas.* 2013;37(8):513-22.

Flaig TW, Spiess PE, Agarwal N, Bangs R, Boorjian SA, Buyyounouski MK, et al. NCCN Guidelines Insights: Bladder Cancer, Version 5.2018. *JNCCN.* 2018;16(9).

Fletcher O, Easton D, Anderson K, Gilham C, Jay M, Peto J. Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:357-63.

Fontana L, Bosviel R, Delort L, Guy L, Chalabi N, Kwiatkowski F, et al. DNA Repair Gene ERCC2, XPC, XRCC1, XRCC3 Polymorphisms and associations with bladder cancer risk in a French Cohort. *Anticancer Res.* 2008;28:1853-6.

Fortuny J, Kogevinas M, Zens MS, Schned A, Andrew AS, Heaney J, et al. Analgesic and anti-inflammatory drug use and risk of bladder cancer: a population based case control study. *BMC Urol.* 2007;7:13-21.

Fousteri M, Mullenders LH. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res.* 2008;18(1):73-84.

Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA.* 2011;306: 737-45.

Gaedigk A. Interethnic differences of drug-metabolizing enzymes. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2000;38(2):61-8.

Gandomani H, Tarazoj A, Siri F, Rozveh A, Hosseini S, Borujeni N, et al. Essenciels of bladder cancer worldwide: incidence, mortality rate and risk factors. *Biomedical Reserch and Therapy.* 2017;4(9):1638-55.

Gangwar R, Mandhani A, Mittal RD. XPC gene variants: a risk factor for recurrence of urothelial bladder carcinoma in patients on BCG immunotherapy. *J. Cancer Res.Clin. Oncol.* 2010;136:779-86.

García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, et al. NAT2 slow acetylation, *GSTM1* null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet.* 2005;366:649-59.

García-Closas M, Malats N, Real FX, Welch R, Kogevinas M, Chatterjee N, et al. Genetic Variation in the Nucleotide Excision Repair Pathway and Bladder Cancer Risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006;15, 536-42.

Garcia-Closas M, Rothman N, Figueroa JD, Prokunina-Olsson L, Han SS, Baris D, et al. Common genetic polymorphisms modify the effect of smoking on absolute risk of bladder cancer. *Cancer Res.* 2013;73(7):2211-20.

Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, et al. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(12):1239-48.

Glaser AP, Fantini D, Shilatifard A, Schaeffer EM, Meeks JJ. The evolving genomic landscape of urothelial carcinoma. *Nat. Rev. Urol.* 2017;14:215-29.

Gandomani H, Tarazoj A, Siri F, Rozveh A, Hosseini S, Borujeni N, et al. Essenciels of bladder cancer worldwide: incidence, mortality rate and risk factors. *Biomedical Reserch and Therapy.* 2017;4(9):1638-55.

Goebell PJ, Knowles MA. Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant

conditions of the urothelium. *Urol Oncol.* 2010;28:409-28.

Golka K, Prior V, Blaszkewicz M, Bolt HM. The enhanced bladder cancer susceptibility of NAT2 slow acetylators towards aromatic amines: a review considering ethnic differences. *Toxicol Lett.* 2002;128(1-3):229-41.

Golka K, Selinski S, Lehmann ML, Blaszkewicz M, Marchan R, Ickstadt K, et al. Genetic variant in urinary bladder cancer: collective power of the wimp SNP. *Arch toxicol.* 2011;85(6):539-54.

Gorbunova V, Seluanov A, Mao Z, Hine C. Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:7466-74.

Grant DM, Tang BK, Kalow W. Variability in caffeine metabolite. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1983;33:591-601.

Gu J, Liang D, Wang Y, Lu C, Wu X. Effects of N-acetyltransferase 1 and 2 polymorphisms on bladder cancer risk in Caucasians. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2005;581:97-104.

Guaoua S, Ratbi I, Laarabi FZ, Chafai Elalaoui S, Charkaoui Jaouad I, Barkat A, et al. Distribution of allelic and genotypic frequencies of NAT2 and CYP2E1 variants in Moroccan population. *BMC Genet.* 2014;15:156-61.

Guha N, Steenland NK, Merletti F, Altieri A, Coglianò V, Straif K. Bladder cancer risk in painters: a meta-analysis. *Occup Environ Med.* 2010;67(8):568-73.

Habuchi T, Devlin J, Elder PA, Knowles MA. Detailed deletion mapping of chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two tumour suppressor loci. *Oncogene.* 1995;11:1671-74.

Hadkhale K, MacLeod J, Demers PA, Martinsen JI, Weiderpass E, Kjaerheim K, et al. Occupational variation in incidence of bladder cancer: a comparison of population-representative cohorts from Nordic countries and Canada. *BMJ Open.* 2017;7(8):e01653.

Hamdi Cherif M, Zaidi Z, Abdellouche D, Hamdi S, Lakhdari N, Djema Benjazia A, et al. Cancer registry of Setif (Algeria): Cancer incidence, trend and survival, 1986- 2005. *Afr. J. Cancer.* 2010;2:245-58.

Hamdi Cherif M, Serraino D, Mahnane A, Laouamri S, Zaidi Z, Boukharouba H, et al. Time trends of cancer incidence in Setif, Algeria, 1986- 2010: an observational study. *BMC Cancer.* 2014a;14:637-44.

Hamdi Cherif M, Bidoli E, Birri S, Mahnane A, Laouamri S, Zaidi Z, et al. Le cancer à Sétif, Algérie, 1986–2010. *Journal Africain du Cancer / African Journal of Cancer.* 2014b;6(3):166-73.

Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, Endo N, El-Enany M, et al. Genotype and allele frequencies of TPMT, NAT2, GST, SULT1A1 and MDR-1 in the Egyptian population. *Br J Clin Pharmacol.* 2003;55(6):560-9.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.

- Hanahan D, Weinberg RA.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
- Hashemian M, Sinha R, Murphy G, Weinstein SJ, Liao LM, Freedman ND, et al.** Coffee and tea drinking and risk of cancer of the urinary tract in male smokers. *Ann Epidemiol.* 2019;34:33-9.
- Hein DW, Rustan TD, Doll MA, Bucher KD, Ferguson RJ, Feng Y, et al.** Acetyltransferases and susceptibility to chemicals. *Toxicol Lett.* 1992;64(65):123-30.
- Hein DW, Doll MA, Gray K, Feng Y, Ferguson R.** Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2. *Carcinogenesis.* 1993;14:1633-8.
- Hein DW, Grant DM, Sim E.** Update on consensus arylamine N-acetyltransferase gene nomenclature. *Pharmacogenetics.* 2000;10(4):291-2.
- Hein DW.** Molecular genetics and function of *NAT1* and *NAT2*: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 2002;506(507) 65-77.
- Hein DW.** N-acetyltransferase 2 genetic polymorphism: effects of carcinogen and haplotype on urinary bladder cancer risk. *Oncogene.* 2006; 25(11):1649-58.
- Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ, Frable W, Corder MP, Hafermann MD, et al.** Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *The Journal of Urology.* 1983;130(6):1083-6.
- Hernandez S, de MS, Agell L, Juanpere N, Esgueva R, Lorente JA, et al.** FGFR3 mutations in prostate cancer: association with low-grade tumors. *Mod Pathol.* 2009;22:848-56.
- Héry M.** *Cancers de la vessie et risques professionnels*: Ed. EDP sciences, Paris; 2009.
- Hinkal GW, Gatza CE, Parikh N, Donehower LA.** Altered senescence, apoptosis, and DNA damage response in a mutant p53 model of accelerated aging. *Mech Ageing Dev.* 2009;130(4): 262-71.
- Hireche A, Chaoui-Kherouatou N, Ribouh A, Abadi N, Shi MJ, Satta D.** Polymorphic deletions of glutathione S-transferases M1, T1 and bladder cancer risk in Algerian population. *Asian J Pharm Clin Res.*2018;11(5):458-62.
- Hireche A; Chaoui-Kherouatou N ; Ribouh A, Abadi N; Shi MJ ; SattaA D.** (2019). rs798766 IN TACC3 GENE AND BLADDER CANCER RISK IN ALGERIAN POPULATION. *Medical oncology*, soumis.
- Hours M, Dananche B, Fevotte J, Bergeret A, Ayzac L, Cardis E, et al.** Bladder cancer and occupational exposures. *Scand J Work Environ Health.* 1994;322-30.
- Hussain MH, MacVicar GR, Petrylak DP, Dunn RL, Vaishampayan U, Lara PN Jr et al.** Trastuzumab, paclitaxel, carboplatin, and gemcitabine in advanced human epidermal growth factor receptor-2/neu-positive urothelial carcinoma: results of a multicenter phase II National Cancer Institute trial. *Journal of Clinical Oncology* : 2007;25(16):2218-24.

- InfoCancer.** Tumeurs de la vessie, les différents stades. 2016. Available from: <http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/rein-et-voies-urinaires/cancer-vessie/maladie/avant-propos.html/>. Last update: 02/01/2018. Accessed: 08/10/2019.
- Intano GW, Cho EJ, McMahan CA, Walter CA.** Age-related base excision repair activity in mouse brain and liver nuclear extracts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2003;58:205-11.
- Irani J.** Epidémiologie du cancer de la vessie. *Prog uro.* 2003;13(5):1207-8.
- Irani J.** Treatment of non-muscle infiltrating tumours of the bladder. *Progres en urologie: journal de l'Association française d'urologie et de la Société française d'urologie.* 2009;19:248.
- Izumi K, Zheng Y, Li Y, Zaengle J, Miyamoto H.** Epidermal growth factor induces bladder cancer cell proliferation through activation of the androgen receptor. *Int.J. of oncology.* 2012;4(1):1587-92.
- Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, Johnston C, Taylor CF, Knowles MA.** FGFR3 and Ras gene mutation are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene.* 2005;24:5218-25.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D.** Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2011;61(2):69-90.
- Jiang X, Yuan JM, Skipper PL, Tannenbaum SR, Mimi CY.** Environmental tobacco smoke and bladder cancer risk in never smokers of Los Angeles County. *Cancer Res.* 2007;67:7540-5.
- Kadlubar FF, Dooley KL, Teitel CH, Roberts DW, Benson RW, Butler MA, et al.** Frequency of urination and its effects on metabolism, pharmacokinetics, blood hemoglobin adduct formation, and liver and urinary bladder DNA adduct levels in beagle dogs given the carcinogen 4-aminobiphenyl. *Cancer Res.* 1991;51(16):4371-7.
- Kamat AM, Mathew P.** Bladder cancer: imperatives for personalized medicine. *Oncology (Williston Park).* 2011;25:951-60.
- Kantor AF, Hartge P, Hoover RN, Fraumeni JF Jr.** Familial and environmental interactions in bladder cancer risk. *Int. J. cancer.* 1985;6 (35):703-6.
- Kellen E, Zeegers M, Paulussen A, Vlietinck R, Vlem EV, Veulemans H, et al.** Does occupational exposure to PAHs, diesel and aromatic amines interact with smoking and metabolic genetic polymorphisms to increase the risk on bladder cancer?; The Belgian case control study on bladder cancer risk. *Cancer Letters.* 2007;245(1-2):51-60.
- Khedhiri S, Stambouli N, Ouerhani S, Rouissi K, Marrakchi R, Gaaied AB, et al.** The impact of smoking and polymorphic enzymes of xenobiotic metabolism on the stage of bladder tumors: a generalized ordered logistic regression analysis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2010;136(7):1111-6.

Kherouatou-Chaoui N, Chellat-Rezgoune D, Ribouh A, Hireche A, Tellouche S, Semmame O, et al. Combined effect of *MTHFR* genotypes, tobacco and occupational exposure on bladder cancer susceptibility in Algerian population. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2015;35(2):195-201.

Kim YJ, Byun SJ, Ahn H, Kim CS, Hong BS, Yoo S, et al. Comparison of outcomes between trimodal therapy and radical cystectomy in muscle-invasive bladder cancer: a propensity score matching analysis. *Oncotarget.* 2017;8(40): 68996-9004.

Kim YJ, Kim HS, Seo YR. Genomic Approach to Understand the Association of DNA Repair with Longevity and Healthy Aging Using Genomic Databases of Oldest-Old Population. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2018; Article ID 2984730:12 pages.

Kiriluk KJ, Prasad SM, Patel AR, Steinberg GD, Smith ND. Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures. *Urologic Oncology.* 2012;30:199-211.

Koehly C, Rolling A.C, Marchand S. Cancer urothéliaux. In. *Cancérologie: Principaux processus*: Ed. De Boeck, Paris; 2010.

Kogevinas M, Mannetje A, Cordier S, Ranft U, Gonzalez CA, Vineis P, et al. Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. *Cancer cause control.* 2003;14(10):907-14.

Koutros S, Lynch CF, Ma X, Lee WJ, Hoppin JA, Christensen CH, et al. Heterocyclic aromatic amine pesticide use and human cancer risk: results from the U.S. Agricultural Health Study. *Int J Cancer.* 2009;124(5):1206-12.

Koutros S, Silverman DT, Alavanja MC, Andreotti G, Lerro CC, Heltshe S, et al. Occupational exposure to pesticides and bladder cancer risk. *Int J Epidemiol.* 2016;45(3):792-805.

KNOWLES MA. Molecular pathogenesis of bladder cancer. *Int J Clin Oncol.* 2008;13:287-97.

Kuper H, Boffetta P, Adami HO. Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *Journal of Internal Medicine.* 2002; 252: 206-24.

Kuznetsov IB, McDuffie M, Moslehi R. A web-server for inferring the human *N*-acetyltransferase-2 (*NAT2*) enzymatic phenotype from *NAT2* genotype. *Bioinformatics.* 2009;25(9):1185-6

Lacombe M. Abrégé d'anatomie et de physiologie humaine: les fondamentaux: Ed, 6^{ème} édition. Lamarre, Paris; 2006.

Lae M, Couturier J, Oudard S, Radvanyi F, Beuzeboc P, Vieillefond A. Assessing HER2 gene amplification as a potential target for therapy in invasive urothelial bladder cancer with a standardized methodology: results in 1005 patients. *Annals of Oncology.* 2010;21(4):815-9.

- Lamm SH, Engel A, Penn CA, Chen R.** Arsenic cancer risk confounder in Southwest Taiwan data set. *Environ Health Perspect.* 2006;114(7):1077-82.
- Lang NP, Butler MA, Massengill J, Lawson M, Stotts RC, Hauer-Jensen M, et al.** Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994;3(8): 675-82.
- Larsen W, schoenwolf GC, Bleyl S, Brauer P, Francis-West P.** *Embryologie humaine*: Ed, 3^{ème} édition. De boeck Université; 2011.
- Lauss M, Aine M, Sjö Dahl G, Veerla S, Patschan O, Gudjonsson S. et al.** DNA methylation analyses of urothelial carcinoma reveal distinct epigenetic subtypes and an association between gene copy number and methylation status. *Epigenetics.* 2012; 7(8), 858-67.
- Lee R, Droller MJ.** The natural history of bladder cancer. Implications for therapy. *Urol Clin North Am.* 2000;27:1-13.
- Li S, Peng Q, Chen Y, You J, Chen Z, Deng Y, et al.** DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and bladder cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(9):e73448.
- Li Z, Sun M, Wang F, Shi J, Wang K.** Association between pioglitazone use and the risk of bladder cancer among subjects with diabetes mellitus: a dose-response meta-analysis. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2017;55(3):210-19.
- Liu Y, Wang H, Lin T, Wei Q, Zhi Y, Yuan F, et al.** Interactions between cigarette smoking and XPC-PAT genetic polymorphism enhance bladder cancer risk. *Oncol. Rep.* 2012;28:337-45.
- Lombard AP, Mudryj M.** The emerging role of the androgen receptor in bladder cancer. *Endocrine Related Cancer.* 2015;22(5):265-77.
- Lopez-Knowles E, Hernandez S, Malats N, Kogevinas M, Lloreta J, Carrato A, et al.** PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors. *Cancer Res.* 2006;66:7401-4.
- Lubin JH, Kogevinas M, Silverman D, Malats N, García-Closas M, Tardón A, et al.** Evidence for an intensity-dependent interaction of NAT2 acetylation genotype and cigarette smoking in the Spanish Bladder cancer study. *Int J Epidemiol.* 2007;36:236-41.
- Lukas C, Selinski S, Prager HM, Blaszkewicz M, Hengstler JG, Golka K.** Occupational bladder cancer: Polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes, exposures, and prognosis. *J Toxicol Environ Health A.* 2017;80(7-8):439-52.
- Lynge EAA, Hemminki K.** Organic solvents and cancer. *Cancer Causes & Control.* 1997;8:406-19.
- Mackay IM, Arden KE, Nitsche A.** Real time PCR in virology. *Nucleic Acids Research.* 2002;30:1292-305.

- Madeb R, Messing EM.** Gender, racial and age differences in bladder cancer incidence and mortality. *Urol Oncol.* 2004;22:86-92.
- Mahdavifar N, Ghoncheh M, Pakzad R, Momenimovahed Z, Salehiniya H.** Epidemiology, Incidence and Mortality of Bladder Cancer and their Relationship with the Development Index in the World. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2016;17(1):381-6.
- Malats N, Real FX.** Epidemiology of bladder cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2015;29:177-89.
- Martinache G, Zerbib M, Descazeaud A, Debre B, Peyromaure M.** PTa bladder tumours: prognostic factors of recurrence and progression. *Prog Urol.* 2008;18:35-40.
- Massard C, Albouy B, Goupil MG, Ravaud A.** Nouvelles molécules dans le cancer de la vessie. *Bulletin du cancer.* 2010;97(3):150-4.
- Matic M, Pekmezovic T, Djukic T, Mimic-Oka J, Dragicevic D, Krivic B, et al.** GSTA1, GSTM1, GSTP1, and GSTT1 polymorphisms and susceptibility to smoking-related bladder cancer: a case-control study. *Urologic Oncology.* 2013;31(7):1184-92.
- Mechanic LE, Millikan RC, Player J, de Cotret AR, Winkel S, Worley K, et al.** Polymorphisms in nucleotide excision repair genes, smoking and breast cancer in African Americans and whites: a population-based case control study. *Carcinogenesis.* 2006;27:1377-85.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research.* 1988;16(3):1215.
- Minchin RF, Hanna PE, Dupret JM, Wagner CR, Rodrigues-Lima F, Butcher NJ.** Arylamine N-acetyltransferase I. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:1999-2005.
- Mitra AP, Datar RH, Cote RJ.** Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2006;24(35):5552–64.
- Mitra AP, Cote RJ.** Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Annual Review of Pathology.* 2009;4:251-85.
- Mittal RD, Mandal RK.** Genetic variation in nucleotide excision repair pathway genes influence prostate and bladder cancer susceptibility in north Indian population. *Ind. J. Hum. Genet.* 2012;18:47-55 .
- Montagnon P.** *Histoire de l'Algérie: des origines à nos jours*: Ed. pygmalion; 2012.
- Moore LE, Baris DR, Figueroa JD, García-Closas M, Karagas MR, Schwenn MR, et al.** GSTM1 null and NAT2 slow acetylation genotypes, smoking intensity and bladder cancer risk: results from the New England bladder cancer study and NAT2 meta-analysis. *Carcinogenesis.* 2010;32(2):182-9.
- Moschini M, Zaffuto E, Karakiewicz PI, Andrea DD, Foerster B, Abufaraj M, et al.** External Beam Radiotherapy Increases the Risk of Bladder Cancer When Compared with

Radical Prostatectomy in Patients Affected by Prostate Cancer: A Population-based Analysis. 2019;75(2):319-28.

Negri E, La Vecchia C. Epidemiology and prevention of bladder cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2001;10:7-14.

Nesi G, Nobili S, Cai T, Caini S, Santi R. Chronic inflammation in urothelial bladder cancer. *Virchows Arch.* 2015;467:623-33.

Netter FH. Atlas d'anatomie humaine: Ed, 3^{ème} édition. Icon learning systems. Planche, New Jersey; 2004.

Neuzillet Y, Roupret M, Wallerand H, Pignot G, Larre S, Irani J, et al. Diagnosis and management of adverse events occurring during BCG therapy for non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC): review of the Cancer Committee of the French Association of Urology. *Prog Urol.* 2012;22:989-98.

Ng JM, Vermeulen W, van der Horst GT, Bergink S, Sugawara K, Vrieling H, et al. A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. *Genes Dev.* 2003;17:1630-45.

Nguyen SH, Allin-Pfister AC, Bourouina R. Manuel d'anatomie et de physiologie: Ed. Lamarre; 2008.

Nicholson BD, McGrath JS, Hamilton W. Bladder cancer in women. *BJM.* 2014;348:g2171-4.

Niedernhofer LJ, Garinis GA, Raams A, Lalai AS, Robinson AR., Appeldoorn E, et al. A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis. *Nature.* 2006;444:1038-43.

Nishi R, Okuda Y, Watanabe E, Mori T, Iwai S, Masutani C, et al. Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Mol. Cell. Biol.* 2005;25:5664-74.

Nurminen M, Karjalainen A. Epidemiologic estimate of the proportion of fatalities related to occupational factors in Finland. *Scand J Work Env Hea.* 2001;27(3):161-213.

Okkels H, Sigsgaard T, Wolf H, Autrup H. Arylamine N-Acetyltransferase 1 (NA Ti) and 2 (NAT2) Polymorphisms in Susceptibility to Bladder Cancer: The Influence of Smoking. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1997;6(4):225-31.

Ouerhani S, Rouissi K, Kourda N, Marrakchi R, Bougateg K, Riadh Ben Slama M, et al. Combined analysis of smoking, TP53, and FGFR3 mutations in Tunisian patients with invasive and superficial high-grade bladder tumors. *Cancer Invest.* 2009;27:998-1007.

Pan Q, Thariat J, Bogalhas F, Lagrange JL. Assessment of movements of the different anatomic portions of the bladder, implications for image-guided radiation therapy for bladder cancer. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique.* 2012;16(3):167-78.

- Parkin DM, Bray FI, Devesa SS.** Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J cancer.* 2001;37(8):4-66.
- Pasin, E, Josephson DY, Mitra AP, Cote RJ, Stein JP.** Superficial Bladder Cancer : An Update on Etiology, Molecular Development, Classification, and natural history. *Rev Urol.* 2008;10(1):31-43.
- Patin E, Harmant C, Kidd K, Kidd J, Kidd J, Froment A, et al.** Sub-Saharan African coding sequence variation and haplotype diversity at the *NAT2* gene. *Hum. Mutat.* 2006;27(7):720.
- Pavone-Macaluso M, Lopez-Beltran A, Aragona F, Bassi P, Fitzpatrick JM.** The pathology of bladder cancer: An update on selected issues. *BJU Int.* 2006;98(6):1161-5.
- Pelaez S, Hierro I, Ona S, Alonso L, Matilla A.** Relationship between pesticide exposure and low-grade superficial bladder urothelial carcinoma. *Med Clin Barc.*2004;123(15):571-4.
- Pelucchi C, Negri E, Franceschi S, Talamini R, La Vecchia C.** Alcohol drinking and bladder cancer. *Journal of Clinical Epidemiology.* 2002;55(7):637-41.
- Pesch B, Haerting J, Ranft U, Klimpel A, Oelschlägel B, Schill W.** Occupational risk factors for urothelial carcinoma : agent-specific results from a case-control study in Germany. Multicenter Urothelial and Renal Cancer Study Group. *Int J Epidemiol.* 2000;29(2):238-47.
- Pesch B, Gawrych K, Rabstein S, Weiss T, Casjens S, Rihs HP, et al.** N-acetyltransferase 2 Phenotype, Occupation, and Bladder Cancer Risk: Results from the EPIC Cohort. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2013;22(11):2055-65.
- Peyromaure M, Scotte F, Amsellem-Ouazana D, Vieillefond A, Oudard S, Beuzeboc P.** Trastuzumab (Herceptin) in metastatic transitional cell carcinoma of the urinary tract: report on six patients. *European Urology.* 2005;48(5):771-5.
- Pira E, Piolatto G, Negri E, Romano C, Boffetta P, Lipworth L, et al.** Bladder cancer mortality of workers exposed to aromatic amines: a58-year follow-up. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(14):1096-99.
- Plna K, Hemminki K.** Familial bladder cancer in the National Swedish Family Cancer Database. *J Urol.* 2001;166(6):2129-33.
- Pointreau Y, Klotz S, Denis F, Durdux C.** Cancer de la vessie. *Cancer/radiothérapie.* 2010;14(1):189-97.
- Poirier J, Catala M, Poirier I, Baudet J.** Leçon d'embryologie humaine: Ed 4^{ème} édition. Maloine; 2005.
- Poitras E, Houde A.** La PCR en temps réel: principes et applications.Reviews in Biology and Biotechnology. 2002;2(2):2-11.
- Popescu A, Miron S, Blouquit Y, Duchambon P, Craescu CT.** Xeroderma pigmentosum group C protein possesses a high affinity binding site for human centrin 2 and calmodulin. *J. Biol. Chem.* 2003;278:40252-61.

POURQUIER P. La réparation de l'ADN, cible potentielle d'un développement thérapeutique en cancérologie. *Bull Cancer*. 2006;hors série :124-44.

Prasad SM, Decastro G, Steinberg GD, Medscape. Urothelial carcinoma of the bladder: definition, treatment and future efforts. *Nature Reviews Urology*. 2011;8(11):631-42.

Prizment AE, Anderson KE, Harlow BL, Folsom AR. Reproductive risk factors for incident bladder cancer: Iowa Women's Health Study. *Int J Cancer*. 2007;120:1093-8.

Probst-Hensch NM, Bell DA, Watson MA, Skipper PL, Tannenbaum SR, Chan KK, et al. N-acetyltransferase 2 phenotype but not Nat1*10 genotype affects aminobiphenyl-hemoglobin adduct levels. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2000;9:619-23.

Pruthi RS, Nielsen M, Heathcote S, Wallen EM, Rathmell WK, Godley P, et al. A phase II trial of neoadjuvant erlotinib in patients with muscle-invasive bladder cancer undergoing radical cystectomy: clinical and pathological results. *BJU international*. 2010;106(3):349-54.

Puente D, Malats N, Cecchini L, Tardón A, García-Closas R, Serra C, et al. Study Group Investigators: Gender-Related Differences in Clinical and Pathological Characteristics and Therapy of Bladder Cancer. *European Urology*. 2003;43(1):53-62.

Puppo P, Perachino M, Ricciotti G, Bozzo W, Gallucci M, Carmignani G. Laparoscopically assisted transvaginal radical cystectomy. *Eur Urol*. 1995;27(1):80-4.

Puzio-Kuter AM, Castillo-Martin M, Kinkade CW, Wang X, Shen TH, Matos T, et al. Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. *Genes Dev*. 2009;23:675-80.

Qing J, Du X, Chen Y, Chan P, Li H, Wu P, et al. Antibody-based targeting of FGFR3 in bladder carcinoma and t(4;14)-positive multiple myeloma in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(5):1216-29.

Quilty PM, Kerr GR. Bladder cancer following low or high dose pelvic irradiation. *Clinical Radiology*. 1987;38(6):583-5.

Radvanyi F, thiéry JP, billerey C, et al. Le récepteur de type 3 des FGF (FGFR3): de la chondrodysplasie au cancer de la vessie. *Médecine/ science*. 2001;17(11):1189-91.

Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature*. 1982;300:149-52.

Rehn L. Blasengeschwuelste bei Fuchsin-Arbeiten. *Arch Klin Chir*. 1895;50:588-600.

Renaud E, Miccoli L, Zacal N, Biard DS, Craescu CT, Rainbow AJ, et al. Differential contribution of XPC, Rad23A, Rad23B and centrin 2 to the UV-response in human cells. *DNA Repair (Amst)*. 2011;10(8):835-47.

Rhijn VBW, Lurkin I, Radvanyi F, Kirkels WJ, van der Kwast TH, Zwarthoff EC. The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate. *Cancer Res*. 2001;61:1265-8.

Rieger-Christ KM, Mourtzinou A, Lee PJ, Zaghera RM, Cain J, Silverman M, et al. Identification of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in urine sediment DNA samples complements cytology in bladder tumor detection. *Cancer*. 2003;98:737-44.

Ros MM, Bas Bueno-de-Mesquita H, Büchner F, Aben KK, Kampman E, Egevad L, et al. Fluid intake and the risk of urothelial cell carcinomas in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *International Journal of Cancer*. 2011;128(11):2695-708.

Rothman N, García-Closas M, Hein DW. Commentary: Reflections on G. M. Lower and colleagues' 1979 study associating slow acetylator phenotype with urinary bladder cancer: meta-analysis, historical refinements of the hypothesis, and lessons learned. *Int J Epidemiol*. 2007;36:23-28.

Rouissi K, Ouerhani S, Hamrita B, Bougateg K, Marrakchi R, Cherif M, et al. Smoking and polymorphisms in xenobiotic metabolism and DNA repair genes are additive risk factors affecting bladder cancer in Northern Tunisia. *Pathology Oncology Research*. 2011a;17(4):879-86.

Sabbagh A, Langaney A, Darlu P, Gerard N, Krishnamoorthy R, Poloni ES. Worldwide distribution of *NAT2* diversity: implications for *NAT2* evolutionary history. *BMC Genet*. 2008;9:21-34.

Safarinejad MR, Safarinejad S, Shafiei N, Safarinejad S. Association of genetic polymorphism of glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1, GSTP1) with bladder cancer susceptibility. *Urologic Oncology*. 2013;31(7):1193-203.

Sak SC, Barrett JH, Paul AB, Bishop DT, Kiltie AE. The polyAT, intronic IVS11-6 and Lys939Gln XPC polymorphisms are not associated with transitional cell carcinoma of the bladder. *Br. J. Cancer*. 2005;92, 2262-5.

Sak SC, Barrett JH, Paul AB, Bishop DT, Kiltie AE. Comprehensive analysis of 22 XPC polymorphisms and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2006;15:2537-41.

Salah N, Harir S, Zeggai F, Sellam NM, Merabent S, Moullessehou M. Cancers urologiques en Algérie : profil histoépidémiologique à propos de 348 cas. *Journal Africain du Cancer / African Journal of Cancer*. 2015;7(2):126-31.

Samanic CM, Kogevinas M, Silverman DT, Tardon A, Serra C, Malats N, et al. Occupation and bladder cancer in a hospital-based case-control study in Spain. *Occupational and environmental medicine*. 2008;65:347-53.

Sanderson S, Salanti G, Higgins J. Joint Effects of the N-Acetyltransferase 1 and 2 (*NAT1* and *NAT2*) Genes and Smoking on Bladder Carcinogenesis: A Literature-based Systematic HuGE Review and Evidence Synthesis. *Am. J. Epidemiol*. 2007;166:741-51.

- Sankhwar M, Sankhwar SN, Bansal SK, Gupta G, Rajender S.** Polymorphisms in the XPC gene affect urinary bladder cancer risk: a case-control study, meta-analyses and trial sequential analyses. *Sci Rep.* 2016;6:27018.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.
- Sanyal S, Festa F, Sakano S, Zhang Z, Steineck G, Norming U, et al.** Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis.* 2004;25,729-34.
- Savic-Radojevic A, Djukic T, Simic T, Pljesa-Ercegovac M, Dragicevic D, Pekmezovic T, et al.** GSTM1-null and GSTA1-low activity genotypes are associated with enhanced oxidative damage in bladder cancer. *Redox Rep.* 2013;18:1-7.
- Schäfer A, Hofmann L, Gratchev A, Laspe P, Schubert S, Schürer A, et al.** Molecular genetic analysis of 16 XP-C patients from Germany: environmental factors predominately contribute to phenotype variations. *Exp Dermatol.* 2013;22(1):24-9.
- Schoenberg JB, Stemhagen A, Mogielnicki AP, Altman R, Abe T, Mason TJ.** Case-control study of bladder cancer in New Jersey. I. Occupational exposures in white males. *J Natl Cancer Inst.* 1984;72:973-81.
- Sefiani A.** Genetic disorders Among Arab populations: Ed. Teebi A: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg; 2010.
- Selinski S, Blaszkewicz M, Ickstadt K, Hengstler JG, Golka K.** Refinement of the prediction of N-acetyltransferase 2 (*NAT2*) phenotypes with respect to enzyme activity and urinary bladder cancer risk. *Arch. Toxicol.* 2013;87:2129-39.
- Seluanov A, Danek J, Hause N, Gorbunova V.** Changes in the level and distribution of Ku proteins during cellular senescence. *DNA Repair (Amst).* 2007;6:1740-8.
- Shariat SF, Sfakianos JP, Droller MJ, Karakiewicz PI, Meryn S, Bochner BH.** The effect of age and gender on bladder cancer: a critical review of the literature. *BJU Int.* 2010;105(3):300-8.
- Sherwood L.** Physiologie humaine: Ed, 3^{ème} édition. De boeck; 2015.
- Sibley K, Stern P, Knowles MA.** Frequency of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in sporadic tumours. *Oncogene*, 2001,20, 4416-4418.
- Silverman DT, Levin LI, Hoover RN.** Occupational risks of bladder cancer in the United States: II Nonwhite men. *J Natl Cancer Inst.* 1989;81(19):1480-3.
- Sim E, Westwood I, Fullam E.** Arylamine N-acetyltransferases. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2007;3:169-84.
- Sim E, Walters K, Boukouvala S.** Arylamine N-acetyltransferases: from structure to function. *Drug Metab Rev.* 2008;40:479-510.
- Slattery ML, West DW, Robison LM.** Fluid intake and bladder cancer in Utah. *International Journal of Cancer.* 1988;42:17-22.

Smith K, Fennelly JA, Neal DE, Hall RR, Harris AL. Characterization and quantitation of the epidermal growth factor receptor in invasive and superficial bladder tumors. *Cancer research*. 1989;49(21):5810-5.

Song DK, Xing DL, Zhang LR, Li ZX, Liu J, Qiao BP. Association of *NAT2*, *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2A6*, and *CYP2A13* gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics of bladder cancer in Central China. *Cancer Detect. Prev.* 2009;32:416-23.

Soussi T, Béroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(3):233-40.

Sow M, Nkegoum B, Essame JL, Garoua, Nzokou A. Aspects épidémiologiques et histopathologiques des tumeurs urogénitales au Cameroun. *Prog Urol*. 2006;16(1):36-9.

Statoua M, El Ghanmi J, Karmouni T, El Khader k, Koutani A, Iben Attya A. Tumeur de vessie chez le sujet jeune: à propos de 36 cas. *Pan Afr Med J*. 2014;18.

Stasik MJ. Carcinomas of the urinary bladder in a 4-chloro-o-toluidine cohort. *International archives of occupational and environmental health*. 1988;60:21-4.

Suh Y, Lee KA, Kim WH, Han BG, Vijg J, Park SC. Aging alters the apoptotic response to genotoxic stress. *Nat Med*. 2002;8(1):3-4.

Sun M, Trinh QD. Diagnosis and staging of bladder cancer. 2015;29(2):205-18.

Tanira MO, Simsek M, Al Balushi K, Al Lawatia K, Al Barawani H, Bayoumi RA. Distribution of arylamine N-acetyltransferase 2 (*nat2*) genotypes among Omanis. *J Sci Res Med Sci*. 2003;5(1-2):9-14.

Tao L, Xiang YB, Chan KK, Wang R, Gao YT, Yu1 MC, et al. Cytochrome P4501A2 Phenotype and Bladder Cancer Risk: The Shanghai Bladder Cancer Study. *Int. J. Cancer*. 2012;130(5):1174-83.

TCGA: The Cancer Genom Atlas. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 2014;507(7492):315-22.

Teixeira RLF, Miranda AB, Pacheco AG, Lopes MQP, FonsecaCosta J, Rabahi MF, et al. Genetic profile of the arylamine N-acetyltransferase 2 coding gene among individuals from two different regions of Brazil. *Mutat. Res*. 2007;624:31-40.

Teixeira RL, Morato RG, Cabello PH, Muniz LM, Moreira Ada S, Kritski AL, et al. Genetic polymorphisms of *NAT2*, *CYP2E1* and *GST* enzymes and the occurrence of antituberculosis drug-induced hepatitis in Brazilian TB patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(6):716-24.

Thier R, Brüning T, Roos PH, Rihs HP, Golka K, Ko Y, et al. Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected *CYP*, *NAT* and *GST* genes. *Int J Hyg Environ Health*. 2003;206(3):149-71.

Thoma BS, Wakasugi M, Christensen J, Reddy MC, Vasquez KM. Human XPChHR23B interacts with XPA-RPA in the recognition of triplex-directed psoralen DNA interstrand crosslinks. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:2993-3001.

Tiguert R, Ravery V, Gheiler E, Grignon D, Gudziak M, Wood D, et al. Les cancers primitifs à petites cellules de la vessie. *Progrès en Urology.* 1999;9(2):256-60.

Tilborg VAA, de Vries A, de Bont M, Groenfeld LE, van der Kwast TH, Zwarthoff EC. Molecular evolution of multiple recurrent cancers of the bladder. *Hum Mol Genet.* 2000;9:2973-80.

Tomlinson DC, Baldo O, Harnden P, Knowles MA. FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *J Pathol.* 2007;213:91-8.

Tony I, Marco G, Ratislav B, Yohann L. Clinical Development of FGFR3 Inhibitors for the Treatment of Urothelial Cancer. *Bladder Cancer.* 2019;5(2):87-102.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2015;65(2):87-108.

Tortora J, Derrickson B. Principes d'anatomie et de physiologie: Ed, 4^{ème} édition. De boeck; 2007.

Toure A, Diop C, Cabral M, Fall M, Lhermitte M, Diouf A, et al. Study of NAT2 genetic polymorphism in West African subjects: example of an healthy non-smoker Senegalese population. *Mol. Biol. Rep.* 2012;39:10489-96.

Tracy TE, Mulcahy LS. A simple method for direct automated sequencing of PCR fragments. *BioTechniques.* 1991;11(1):68-75.

Uchida A, Sugasawa K, Masutani C, Dohmae N, Araki M, Yokoi M, et al. The carboxy-terminal domain of XPC protein plays a crucial role in nucleotide excision repair through interactions with transcription factor IIIH. *DNA Rep.* 2002;1:449-61.

Um JH, Kim SJ, Kim DW, Ha MY, Jang JH, Kim DW, et al. Tissue-specific changes of DNA repair protein Ku and mtHSP70 in aging rats and their retardation by caloric restriction. *Mech Ageing Dev.* 2003;124:967-75.

Van der Meijden AP. Bladder cancer. *BMJ.* 1998;317:1366-9.

van Haarst EP, Heldeweg EA, Newling DW, Schlatmann TJ, et al. The 24-h frequency-volume chart in adults reporting no voiding complaints: defining reference values and analysing variables. *BJU Int.* 2004;93(9):1257-61.

van Rhijn BW, van der Kwast TH, Vis AN, Kirkels WJ, Boevé ER, Jöbsis AC, et al. FGFR3 and TP53 characterize alternative genetic pathways in pathogenesis of urothelial cell carcinoma. *Cancer Res.* 2004; 64(6):1911-4.

- Vatsis KP, Weber WW, Bell DA, Dupret JM, Evans DA, Grant DM, et al.** Nomenclature for N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics*. 1995;5(1):1-17.
- Verdier PJ, Sanyal S, Bermejo JL, Steineck G, Hemminki K, Kumar R.** Genotypes, haplotypes and diplotypes of three XPC polymorphisms in urinary-bladder cancer patients. *Mutat. Res*. 2010;694: 39-44.
- Verstuyft C, Morin S, Yang J, Lorient MA, Barbu V, Kerb R, et al.** A new, rapid and robust genotyping method for CYP2C9 and MDR1 *Ann Biol Clin (Paris)*. 2003;61(3):305-9.
- Villares GJ, Zigler M, Blehm K, Bogdan C, McConkey D, Colin D, et al.** Targeting EGFR in bladder cancer. *World Journal of Urology*. 2007;25(6):573-9.
- Vineis P, Simonato L.** roportion of lung and bladder cancers in males resulting from occupation: a systematic approach. *Arch Environ Health*. 1991;46(1):6-15.
- Vineis P, Marinelli D, Autrup H, Brockmoller J, Cascorbi I, Daly AK, et al.** Current smoking, occupation, N-acetyltransferase-2 and bladder cancer: a pooled analysis of genotype-based studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10(12):1249-52.
- Viscoli CM, Lachs MS, Horwitz RI.** Bladder cancer and coffee drinking: a summary of case-control research. *Lancet*. 1993;5(341):1432-7.
- Volanis D, Kadiyska T, Galanis A, Delakas D, Logotheti S, Zoumpourlis V.** Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer. *Toxicology Letters*. 2010;193(2):131-7.
- Wada T, Berggren P, Steineck G, Adolfsson J, Wijkstro H, Hansson J, et al.** Bladder Neoplasms-Regions at Chromosome 9 with Putative Tumour Suppressor Genes. *Scand J Urol Nephrol*. 2003;37(2):106-11.
- Walker K, Ginsberg G, Hattis D, Johns DO, Guyton KZ, Sonawane B.** Genetic Polymorphism in N-Acetyltransferase (NAT): Population Distribution of NAT1 and NAT2 Activity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2009;12:440-72.
- Walraven JM, Zang Y, Trent JO, Hein DW.** Structure/function evaluations of single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltransferase 2. *Curr. Drug Metab*. 2008;9:471-86.
- Ward E, Carpenter A, Markowitz S, Roberts D, Halperin W.** Excess number of bladder cancers in workers exposed to ortho-toluidine and aniline. *J Natl Cancer Inst*. 1991;83:501-6.
- Ward EM, Sabbioni G, DeBord DG, Teass AW, Brown KK, Talaska GG, et al.** Monitoring of aromatic amines exposures in workers at a chemical plant with a known bladder cancer excess. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(15):1046-52.
- Weber WW, Hein DW.** N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol Rev*. 1985;37:25-79.

Wen H, Ding Q, Fang ZJ, Xia GW, Fang J. Population study of genetic polymorphisms and superficial bladder cancer risk in Han-Chinese smokers in Shanghai. *Int. Urol. Nephrol.* 2009;41(4):855-64.

Weng MW, Leea HW, Parka SH, Hua Y, Wanga HT, Chena LC, et al. Aldehydes are the predominant forces inducing DNA damage and inhibiting DNA repair in tobacco smoke carcinogenesis. 2018;115(27):E6152-61

Westwood IM, Kawamura A, Fullam E, Russell AJ, Davies SG, Sim E. Structure and mechanism of arylamine N-acetyltransferases. *Curr Top Med Chem.* 2006;6:1641-54.

Wheater PR, Young B, Heath JW. Histologie fonctionnelle. Bruxelles: Ed. De Boeck Supérieur; 2001.

Witjes JA. Bladder cancer in 2015: Improving indication, technique and outcome of radical cystectomy. *Nat Rev Urol.* 2016;13(2):74-6.

Wolpert BJ, AmrS, Ezzat S, Saleh D, Gouda I, Loay I, et al. Estrogen exposure and bladder cancer risk in Egyptian women. *Maturitas.* 2010;67:353-7.

Wong MCS, Fung FDH, Leung C, Cheung WWL, Goggins WB, Ng CF. The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Sci Rep.* 2018;8(1):1129-40.

Wood RD, Mitchell, M, Lindahl T. Human DNA repair genes. *Mutat Res.* 2005;577:275-83.

Woolcott CG, King WD, Marrett LD. Coffee and tea consumption and cancers of the bladder, colon and rectum. *Eur J Cancer Prevention.* 2002;11(2):137-45.

Wu W, Tong Y, Zhao Q, Yu G, Wei X, Lu Q. Coffee consumption and bladder cancer: a meta-analysis of observational studies. *Sci Rep.* 2015;5(1):951-9.

Wu H, Wang X, Zhang L, Mo N, Lv Z. Association between N-acetyltransferase 2 polymorphism and bladder cancer risk: Results from studies of the past decade and a meta-analysis. *Clinical Genitourinary Cancer.* 2016;14:122-9.

Xiao-li, Z. et al. XPC Lys939Gln polymorphism is associated with the decreased response to platinum based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *Chinese Medical Journal.* 2010;123:3427-32.

Yamamoto Y¹, Matsuyama H, Chochi Y, Okuda M, Kawauchi S, Inoue R, et al. Overexpression of BUBR1 is associated with chromosomal instability in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007;174(1):42-7.

Yan H, Ying Y, Xie H, Li J, Wang X, He L, et al. Secondhand smoking increases bladder cancer risk in nonsmoking population: a meta-analysis. *Cancer Manag Res.* 2018;10:3781-91.

Yang B, O'Reilly DA, Demaine AG, Kingsnorth AN. Study of polymorphisms in the CYP2E1 gene in patients with alcoholic pancreatitis. *Alcohol.* 2001;23(2):91-97.

Yu EY, Wesselius A, van Osch F, Stern MC, Jiang X, Kellen E, et al. The association between coffee consumption and bladder cancer in the bladder cancer epidemiology and nutritional determinants (BLEND) international pooled study. *Cancer Causes Control*. 2019;30(8):859-70.

Yuan JM, Chan KK, Coetzee GA, Castelao JE, Watson MA, Bell DA, et al. Genetic determinants in the metabolism of bladder carcinogens in relation to risk of bladder cancer. *Carcinogenesis*. 2008;29(7):1386-93.

Zaghloul MS. Bladder cancer and schistosomiasis. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. 2012;24(4):151-59.

Zang Y, Zhao S, Doll MA, States JC, Hein DW. The T341C (Ile114Thr) polymorphism of N-acetyltransferase 2 yields slow acetylator phenotype by enhanced protein degradation. *Pharmacogenetics*. 2004;14(11):717-23.

Zang Y, Doll MA, Zhao S, States JC, Hein DW. Functional characterization of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of human N-acetyltransferase 2. *Carcinogenesis*. 2007;28(8):1665-71.

Zeegers MP, Tan FE, Dorant E, van den Brandt VA. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer*. 2000;89:630-9.

Zeegers MP, Kellen E, Buntinx F, Van den Brant PA. The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World J Urol*. 2004;21(6):392-401.

Zhi Y, Yu J, Liu Y, Wei Q, Yuan F, Zhou X, et al. Interaction between polymorphisms of DNA repair genes significantly modulated bladder cancer risk. *Int J Med Sci*. 2012;9:498-505.

Zhu Z, Zhang J, Jiang W, Zhang W, Li Y, Xu X. Risks on N-acetyltransferase 2 and bladder cancer: a meta-analysis. *Onco Targets Ther*. 2015;8:3715-20.

Annexes

ANNEXE 1 : Agents Classés par les Monographies du CIRC (CIRC, 2019).

Group 1 L'agent est *cancérogène pour l'Homme*

Group 2A L'agent est *probablement cancérogène pour l'Homme*

Group 2B L'agent est *peut-être cancérogène pour l'Homme*

Group 3 L'agent est *inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme*

ANNEXE 2 : Consentement pour la participation à une étude scientifique

Intitulé de l'étude : Étude génétique du cancer de la vessie

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

déclare avoir été informé(e), de la nature, des objectifs et du déroulement de l'étude scientifique concernant le cancer de la vessie. A cet effet, je donne mon accord pour la participation à cette étude et je permets, l'utilisation de mon ADN extrait à partir du sang prélevé.

J'ai compris que ma participation est totalement volontaire. Je peux refuser de participer ou me retirer de l'étude à tout moment.

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

Lieu, date	Signature du patient (e)
Signature du médecin traitant	Signature du chercheur

ANNEXE 5 : Protocole d'extraction de l'ADN (méthode au NaCl)

(Miller *et al.*, 1988)

1. Dans un tube de 50 ml, ajouter 40 ml de solution SLR (Solution de Lyse des globules Rouges, 10 mM Tris, pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl) pour 10 ml de sang total (recueilli dans un tube avec anticoagulant) et le mettre dans de la glace pendant 20 min.
2. Centrifuger à 2500 tpm à 4°C, puis éliminer le surnageant.
3. Répéter les étapes de lyse des globules rouges (rajout de 40 ml de SLR, centrifugation et élimination du surnageant) jusqu'à éclaircissement du culot de globules blancs.
4. Resuspendre le culot de globules blancs dans 2 ml de solution SLB (Solution de Lyse des globules Blancs, 10 mM Tris, pH 7,6, 10 mM EDTA, pH 8,0, 10 mM NaCl).
5. Rajouter 200 µl de l'SDS 10% et 10 µl de Protéinase K (20 mg/ml) (Sigma®).
6. Incuber sous agitation à 37°C pendant toute une nuit.
7. Ajouter 600 µl de NaCl 6M et agiter vigoureusement.
8. Centrifuger à 5000 tpm pendant 15 min à 4°C.
9. Transférer le surnageant dans un tube de 50 ml.
10. Ajouter 2,5 volumes d'Ethanol absolu glacial.
11. Mélanger doucement par retournement jusqu'à formation d'une méduse d'ADN.
12. Transférer la méduse d'ADN à l'aide d'une pipette Pasteur dans un microtube de 1,5 ml.
13. Rincer la méduse dans 1 ml d'Ethanol à 70%, puis éliminer ce liquide.
14. Sécher l'ADN à 37°C pendant 30 min ou à température ambiante.
15. Resuspendre l'ADN dans de l'eau ultra-pure.

ANNEXE 6 : Séquence codante du gène NAT2 : ENST00000286479
(<http://www.ensembl.org/index.html>)

CATGGAGTTGGGCTTAGAGGCTATTTTTGATCACATTGTAAGAAGAAACC
GGGGTGGGTGGTGTCTCCAGGTCAATCAACTTCTGTACTGGGCTCTGAC
CACAATCGGTTTTTCAGACCACAATGTTAGGAGGGTATTTTTACATCCCTC
CAGTTAACAATAACAGCACTGGCATGGTTCACCTTCTCCTGCAGGTGACC
ATTGACGGCAGGAATTACATTGTCGATGCTGGGTCTGGAAGCTCCTCCCA
GATGTGGCAGCCTCTAGAATTAATTTCTGGGAAGGATCAGCCTCAGGTGC
CTTGCATTTTCTGCTTGACAGAAGAGAGAGGAATCTGGTACCTGGACCAA
ATCAGGAGAGAGCAGTATATTACAAACAAAGAATTTCTTAATTCTCATCT
CCTGCCAAAGAAGAAACACCAAAAAATATACTTATTTACGCTTGAACCTC
GAACAATTGAAGATTTTGAGTCTATGAATACATACCTGCAGACGTCTCCA
ACATCTTCATTTATAACCACATCATTTTGTTCCTTGCAGACCCCAGAAGG
GGTTTACTGTTTGGTGGGCTTCATCCTCACCTATAGAAAATTCAATTATA
AAGACAATACAGATCTGGTTCGAGTTTAAACTCTCACTGAGGAAGAGGTT
GAAGAAGTGCTGAGAAATATATTTAAGATTTCTTGGGGAGAAATCTCGT
GCCCAAACCTGGTGATGGATCCCTTACTATTTAGAATAAGGAACAAAATA
AACCTTGTGTATGTATCACCC

Publications



Joint effect of N-acetyltransferase 2 gene and smoking status on bladder carcinogenesis in Algerian population

ASMA RIBOUH-ARRAS*, NAOUEL CHAOU-KHEROUATOU, AHMED HIRECHE,
DALILA SATTI, NOUREDDINE ABADI

University Constantine, Constantine, Algeria

Abstract

Background. Toxic compounds are detoxified by several xenobiotic metabolizing enzymes such as N-acetyltransferase 2 (NAT2). The role for NAT2 genetic polymorphisms in different malignancies risk has been the subject of numerous studies. In the current study we investigated the association of genetic NAT2 variants or their corresponding acetylator phenotypes with bladder cancer risk. The relationship between NAT2 genotype/phenotype and smoking status was also evaluated as potential risk factor of urinary bladder cancer. **Material and methods.** As few data on the association between genetic polymorphisms of NAT2 and bladder cancer are available in the Algerian population, we performed an extensive identification of NAT2 variants in 175 bladder cancer patients and 189 healthy controls by direct PCR sequencing of the coding region. **Results.** Thirteen previously described SNPs were identified in this study; only T341C and G590A were associated with increased risk of bladder cancer ($P < 0.05$). NAT2 slow acetylator phenotype is at higher risk (OR = 2.45, 95% CI = 1.41–4.35) with the greatest risk noted for the allele NAT2*5. When combined to smoking status, T341C and G590A SNPs were of significant correlation with bladder cancer risk ($P < 0.05$) among non smokers. A correlation that increased among smokers. However, a relationship emerged only when smoking habit was considered between C345T, C481T and A803G SNPs and bladder cancer risk ($P < 0.05$). Our study showed a strong interaction between NAT2 slow acetylator phenotype and smoking ($P = 7.20e^{-6}$). **Conclusions.** These findings provided evidence of an additive effect between smoking status and NAT2 slow acetylation in influencing bladder cancer risk.

Key words: single nucleotide polymorphisms, smoking, phenotype, urinary bladder cancer, N-acetyltransferase 2 (NAT2)

Introduction

Worldwide, bladder cancer is recognized as the tenth most common cancer, with statistical data showing 549 393 newly diagnosed cases and 199 922 cancer-related deaths for both genders in 2018 (Ferlay et al., 2018). In North African men, bladder cancer is the third most frequent cancer after liver and lung cancers, and twelfth in women with an annual incidence rate of 14.3/100 000 in men and 3.2/100 000 in women. In Algerian men, bladder cancer is the first most common genitourinary malignant disease accounting for an incidence rate of 13/100 000 person-years and a mortality rate of 5.8/100 000 person-years (Ferlay et al., 2018).

Tobacco smoking and occupational exposure to aromatic amines are identified to be the most important risk factors for this disease (Freedman et al., 2011; Chu et al., 2013), but other lifestyle, environmental, as well as hereditary factors have also attracted interest, suggesting individual susceptibility to bladder carcinogenesis (Cohen et al., 2000; Chu et al., 2013).

Toxic compounds such as 4-aminobiphenol, acrolein, and oxygen free radicals contained in tobacco and other aromatic amines are also known to be present in several industrial compounds, especially those used in farming, chemical plants, rubber industry, painting, and textiles (Dolin, 1992; Viel et al., 1995; Ward et al., 1996; Car-

* Corresponding author: University Constantine 1, Route Ain El Bey, 25000 Constantine, Algeria; e-mail: asma.ribouh@hotmail.fr

reón et al., 2010; Pira et al., 2010; Tsai et al., 2011). These compounds have been identified as group I carcinogens by the International Agency of Research on Cancer (Sanderson et al., 2007; Tao et al., 2012; Pesch et al., 2013). These substances as well as various polycyclic aromatic hydrocarbons have been reported to be carcinogenic to urinary bladder (García-Closas et al., 2005; Tao et al., 2012).

These compounds act by forming an adduct with human DNA, thus exerting their carcinogenic effect and subsequently leading to the development of bladder cancer (Tao et al., 2012). The bladder urothelium like many other tissues, expresses various enzymes, for example, N-acetyltransferase 2 (*NAT2*), that help in metabolizing xenobiotic substances (Inatomi et al., 1999; Khedhiri et al., 2010; Tao et al., 2012). This detoxifying enzyme catalyzes the N-acetylation reaction of exogenous chemicals present in diet, cigarette smoke, and environment (Sanderson et al., 2007; Song et al., 2009; Rihs et al., 2011; Di Pietro et al., 2012; Guaoua et al., 2014).

Humans present wide inter-individual variability with regard to *NAT2* enzyme activity, which is caused by mutations in *NAT2* gene (Di Pietro et al., 2012; Guaoua et al., 2014), a gene mapped to the human chromosome 8p22 having an open reading frame of 870 bp (Di Pietro et al., 2012).

Till date, over 25 polymorphisms have been detected in the *NAT2* coding region among the populations of different ethnic origins (Hein, 2002; Di Pietro et al., 2012). These genetic variations in the *NAT2* gene affect the enzyme activity and result in the formation of three different *NAT2* phenotypes: fast, intermediate, and slow acetylators (Sanderson et al., 2007; Song et al., 2009; Guaoua et al., 2014).

Thirty-six allelic variants of *NAT2* gene have been reported, and each allele is classified as fast or slow depending on the combination of different single nucleotide polymorphisms (SNPs) present in its coding region (Khedhiri et al., 2010; Di Pietro et al., 2012). *NAT2* *4 allele is defined as the wild-type allele and has been associated with the fast acetylation phenotype (Hein et al., 2000a; Walker et al., 2009; Toure et al., 2012). Individuals homozygous for rapid *NAT2* acetylator alleles are classified as rapid acetylators, those homozygous for slow *NAT2* acetylator alleles as slow acetylators, and those possessing one rapid and one slow *NAT2* acetylator alleles as intermediate acetylators (Hein, 2006).

Many studies have analyzed the relationship between *NAT2* slow acetylation phenotype and risk of bladder cancer (Vatsis et al., 1995; Hein, 2002; García-Closas et al., 2005; Sanderson et al., 2007). However, results were controversial at the level of individual studies, which may be explained by the differences in exposure to bladder carcinogens and ethnicity, as well as variations in the relative number of cases and statistical power limitations in various studies (Moore et al., 2011; Selinski et al., 2013; Zhu et al., 2015). In the present study, we first identified *NAT2* variants among 364 subjects through complete sequencing of the *NAT2* coding region. Then, we evaluated the association between polymorphisms within the gene and their corresponding acetylator phenotypes and bladder cancer risk. Finally, we assessed the combined effect of *NAT2* genotypes and smoking status on susceptibility to bladder cancer.

Materials and methods

Subjects

The study population comprised 175 patients and 189 controls. Bladder cancer patients diagnosed with the disease during the period 2014–2016 at the Urology Departments of Daksi Renal Clinic and Central Hospital University of Constantine and Tizi-Ouzou cities, Algeria, were included in the study.

All subjects were from the northern region of Algeria, with an age range between 24 and 90 years. All the bladder cancer cases, including 165 males and 10 females, were confirmed by clinical histopathology and staged according to the Tumor-Node-Metastasis (TNM) classification system of the Union International Contre le Cancer (UICC, 1997). Tumors were graded according to the World Health Organization 1973 classification. The control group included healthy individuals without a family history of cancer who were approximately matched for gender proportion, geographic origin, and age range to those in the case group.

After obtaining informed consent from the participants, a detailed questionnaire was administered to both cases and controls to obtain study information.

DNA extraction

Blood samples were obtained from the peripheral veins of each participant using a veno jet-system (Terumo™, France) and collected in a vacutainer EDTA

tube (Dutscher, France). Genomic DNA was extracted from leukocytes using standard NaCl extraction method according to the protocol suggested by Miller and co-workers (1988). The quality of DNA obtained by the recommended method was evaluated by determining A260/A280 ratio using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, France). DNA samples were stored at -20°C until further analyses.

PCR amplification and sequencing analysis

A fragment of length 771 bp spanning the coding region of *NAT2*, was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using the following specific primers: F: CATGGAGTTGGGCTTAGAGG and R: GGGTGATACATACACAAGGGTTT. The reference fragment of *NAT2* gene was taken from Ensembl Genome Browser database (ID: ENSG00000156006).

The amplification reaction (PCR) was carried out in 20 μl of total reaction mixture containing 2 μl (20 ng) of template DNA, 4 μl (0.2 mM) of dNTPs, 1.2 μl (0.3 μM) each of Oligo F and Oligo R, 2 μl of $1 \times$ buffer, 0.2 μl (0.05 U/ μl) of Taq Hotstar (QIAGEN, Germany) and 9.4 μl of H_2O .

PCR amplification was carried out using a Mastercycler pro thermocycler (Eppendorf, France) as follows: an initial heat activation step at 95°C for 15 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 56°C for 30 s and extension at 72°C for 1 min, and finally an extension cycle was performed at 72°C for 10 min. The quality of the obtained PCR fragments was assessed by analyzing them on a 1.5% agarose gel. Afterward, the PCR products were purified by using ExoSAP-IT reagent (GE HEALTHCARE, France), which involved the addition of 2 μl of ExoSAP to 5 μl of PCR product. This purification procedure was carried out in two steps and performed by using Mastercycler pro (Eppendorf, France): first step at 37°C for 15 min followed by a second step at 80°C for 15 min. The purified PCR products (10–15 ng of DNA) were then utilized to perform double-stranded sequencing reaction in the presence of the aforementioned primers using the Big Dye Terminator version 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, France). The sequencing reactions were carried out using a Mastercycler pro (Eppendorf, France) under the following cycling conditions: initial denaturation at 96°C for 1 min, and 25 cycles at 96°C for 20 s, 50°C for 15 s, and 60°C for 4 min. The amplicons

were directly sequenced using an ABI 3130 XL automated DNA sequencer (Applied Biosystems, France). The sequenced products were analyzed using Sequencher v5.0 software.

Statistical analysis

The characterization and designation of the sequenced alleles were performed using the *NAT2* allele nomenclature published in 1995 (Vatsis et al., 1995).

All the statistical analyses were performed using the R software version 3.2.1. The genotypic and allelic frequencies of the *NAT2* polymorphisms within the two populations were estimated by direct counting method. Chi-square test or Fisher's test was used to calculate the odds ratios (ORs) with the corresponding 95% confidence interval (95% CI) to determine the association between *NAT2* gene polymorphisms or corresponding acetylator phenotypes and susceptibility to bladder cancer, as well as to assess the outcomes following their additive interactions with smoking status. Significance was set at *P*-value less than 0.05.

Results

Subject characteristics

The characteristics of the study population are given in Table 1. As expected, cases and controls appeared to be adequately matched for age and gender with 92.57% males in the case group versus 88.89% males in the control group ($P = 0.28$). The mean ages were 59.57 ± 16.56 and 60.83 ± 14.87 years for the cases and controls respectively ($P = 0.60$). Smoking was more widespread among patients with bladder cancer (69.71%) than among controls (40.21%), considering that controls were taken randomly ($P = 2.78e^{-5}$).

According to the TNM staging of bladder cancer, patients were classified into non-muscle-invasive (T_a = 20.57% and T₁ = 47.43%) and muscle-invasive (T₂ = 22.86% and T₃ = 9.14%) groups. We also classified the patients according to their cancer grade into three groups: well differentiated (G₁ = 18.86%), moderately differentiated (G₂ = 24%) and poorly differentiated (G₃ = 57.14%).

Genotypic and allelic frequencies of NAT2 SNPs and their association with bladder cancer risk

A total of 13 different SNPs have been identified during the sequencing analysis of the *NAT2* coding region

Table 1. General characteristics of the bladder cancer patients and controls subjects

Characteristics	Patients % (n = 175)	Controls % (n = 189)	OR (CI 95%)	P-value
Gender				
Males	162 (92.57%)	168 (88.89%)		0.28^b
Females	13 (7.43%)	21 (11.11%)		
Age (years)				
< 50	35 (20%)	42 (22.22%)		
≥ 50	140 (80%)	147 (77.78%)		0.60^a
Cigarette smoking				
Never or former smokers	53 (30.29%)	113 (59.79%)		
Current smokers	122 (69.71%)	76 (40.21%)	3.42 (2.21–5.28)	2.78 e⁻⁸^a
Grade				
G1	33 (18.86%)			
G2	42 (24%)			
G3	100 (57.14%)			
TNM stage				
Ta	36 (20.57%)			
T1	83 (47.43%)			
T2	40 (22.86%)			
T3	16 (9.14%)			

^a - Chi-square test; ^b - Fisher test

among the bladder cancer patients and controls representing the Algerian population (Table 2). All those SNPs have been previously described in various studies (Boukouvala, 2016) and no new mutation was identified in this study. The allelic and genotypic frequencies and their calculated ORs are presented in Table 2.

Among the 13 SNPs, T341C and G590A polymorphisms have shown statistically significant association with bladder cancer risk in the patients possessing heterozygous genotype (OR = 2.36, 95% CI = 1.44–3.86 and OR = 2.58, 95% CI = 1.52–4.37, respectively) or mutant homozygous genotype (OR = 2.54, 95% CI = 1.47–4.38 and OR = 2.67, 95% CI = 1.62–4.40, respectively). However, no significant association was observed between the risk of bladder cancer and the occurrence of SNPs G191A, C282T, C345T, C481T, and A803G for genotypic and allelic distributions.

The genotypic and the allelic distributions of C403G and G857A SNP variants in the bladder cancer patients were not significantly different from those of the control

group ($P = 0.16$ and $P = 0.8$, respectively), and the number of individuals carrying these two polymorphisms was too small (six patients and two controls for C403G SNP, seven patients and nine controls for G857A SNP).

Finally, no evidence has been registered in cancer patients and controls for the presence of *NAT2* A434C, C638T, G838A, and A845C SNPs.

Frequencies of predicted phenotypes and their association with bladder cancer risk

Based on the consensus nomenclature of *NAT2* alleles (Vatsis et al., 1995; Hein et al., 2000b; Boukouvala, 2016), a total of eight previously described alleles have been identified among patients and controls (*NAT2**4, *NAT2**5, *NAT2**6, *NAT2**7, *NAT2**12, *NAT2**13, *NAT2**14, and *NAT2**18); moreover, each allele is characterized by specific SNP, for example, the SNPs T341C, G590A, and G191A are characteristic of the alleles *NAT2**5, *NAT2**6, and *NAT2**14, respectively. Combination of different SNPs for *NAT2**4 wild-type allele, and combination of SNPs for other alleles identi-

fied in our study are presented in Table 3. Furthermore, different combinations of these alleles were used to predict the acetylation phenotype for all the individuals of our study population (Table 4).

In total, out of 175 patients and 189 controls, 85.71% of patients and 70.90% of controls were predicted to be slow acetylators, whereas the rapid/intermediate acetylators were identified in 14.29% and 29.10% of patients and controls, respectively (Table 4).

As presented in Table 4, when compared to the reference group (rapid/intermediate acetylators), the slow acetylation phenotype was associated with an increased risk for bladder cancer (OR = 2.45, 95% CI = 1.41–4.35, $P = 0.0009$).

When studied separately, the slow acetylators *NAT2**5/5 and *NAT2**5/6 were significantly associated with the development of bladder cancer (OR = 2.91, 95% CI = 1.55–5.45, $P = 0.0008$ and OR = 3.19, 95% CI = 1.55–6.68, $P = 0.0008$, respectively).

Effect of smoking status and genetic polymorphisms of *NAT2* on bladder cancer risk

The stratification of patients and controls according to *NAT2* genotypes and tobacco consumption (reference group: non-smokers harboring the wild-type genotype for each of the studied SNPs) revealed a significant association between *NAT2*T341C and G590A variants and bladder cancer risk, for both non-smokers and smokers. The risk was found to be escalated in smokers (OR = 7.50, 95% CI = 3.37–17.77, $P = 3.49e^{-8}$ and OR = 13.41, 95% CI = 4.91–40.11, $P = 5.06e^{-9}$ for heterozygous and homozygous *NAT2* T341C variant; OR = 5.60, 95% CI = 2.74–11.81, $P = 2.67e^{-7}$ and OR = 7.29, 95% CI = 3.46–15.91, $P = 7.78e^{-9}$ for heterozygous and homozygous *NAT2* G590A variant).

A significant association has been observed between other mutations of *NAT2* (C345T, C481T, and A803G) and bladder cancer risk among smokers possessing non-mutant homozygous genotype (OR = 2.69, 95% CI = 1.49–4.85, $P = 0.0009$; OR = 2.81, 95% CI = 1.40–5.78, $P = 0.002$ and OR = 2.25, 95% CI = 0.94–5.47, $P = 0.004$, respectively), heterozygous genotype (OR = 3.16, 95% CI = 1.67–6.10, $P = 0.0001$; OR = 4.77, 95% CI = 2.03–11.61, $P = 0.0001$; and OR = 2.69, 95% CI = 1.30–5.67, $P = 0.004$, respectively), and mutant homozygous genotype (OR = 4.11, 95% CI = 2.09–8.29, $P = 1.15e^{-5}$; OR = 6.55, 95% CI = 2.83–15.86, $P = 9.72e^{-7}$; and OR = 3.66, 95% CI

= 1.54–9.06, $P = 0.001$, respectively). This association was not observed in the non-smokers group (Table 5).

In contrast, no significant association has been registered between the risk of bladder cancer and the *NAT2* polymorphisms G191A, C282T, C403G, A434C, C638T, G838A, A845C, G857A among smokers and non-smokers (Table 5).

Association and stratification analysis between the predicted acetylation phenotype, smoking status, and bladder cancer risk

The risk of bladder cancer related to the *NAT2* acetylation phenotype was further investigated by stratification of smoking (Table 6). The results showed no significant association between the patients and controls for the rapid/intermediate acetylation phenotype among smokers group ($P = 0.46$).

In contrast, the slow acetylation phenotype has been associated with an increased risk of bladder cancer in the smokers group (OR = 6.77, 95% CI = 2.67–18.93, $P = 7.20e^{-6}$); however the association was not significant in the case of non-smokers group ($P = 0.52$).

Discussion

The prevalence of bladder cancer was found to be high in Algeria. There has been an alarming increase in the number of newly diagnosed year after year; in the recent decades, the incidence of bladder cancer increased from 2.2 to 8.7 per 100 000 persons (Hamdi Cherif et al., 2010; Hamdi Cherif et al., 2014). Various previous epidemiological studies on humans showed the presence of a relationship between the *NAT2* genotype and its acetylation profile with the increased risk of urinary bladder cancer (Garcia-Closas et al., 2005; Song et al., 2009; Pesch et al., 2013). The lack of sufficient knowledge regarding the profile of the acetylator phenotype in the Algerian population is a short coming that may affect the success of treatment. It is well-known that Arylamine N-acetyltransferases play an important role in the detoxification of xenobiotic compounds such as therapeutic drugs. It has been reported that clinical consequences in drugs therapies are applied differently for slow and rapid acetylators (Meisel, 2002).

The sequencing of the *NAT2* coding region, revealed that only T341C and G590A polymorphisms have been significantly associated with an increased risk of bladder cancer in the tested population. This result is partially in

Table 2. Genotypic and allelic frequencies of NAT2 SNPs and their association with bladder cancer risk

	SNP	Genotypes and alleles	N [%]		P-value	OR	CI (95%)
			patients	controls			
rs 1801279	G191A	GG	125 (71.43)	146 (77.24)		1.00 (reference)	
		GA	21 (12.00)	13 (06.89)	0.10 ^b	1.88 ^b	0.85–4.27
		AA	29 (16.57)	30 (15.87)	0.77 ^b	1.12 ^b	0.61–2.06
		G	271 (77.43)	305 (80.69)			
		A	79 (22.57)	73 (19.31)	0.28 ^a	1.05 ^a	0.78–1.41
rs1041983	C282T	CC	110 (62.86)	126 (66.67)		1.00 (reference)	
		CT	35 (20.00)	32 (16.93)	0.41 ^a	1.25 ^a	0.72–2.15
		TT	30 (17.14)	31 (16.40)	0.72 ^b	1.10 ^b	0.63–1.94
		C	255 (72.86)	284 (75.13)			
		T	95 (27.14)	94 (24.87)	0.48 ^a	1.12 ^a	0.80–1.56
rs 1801280	T341C	TT	44 (25.14)	85 (44.97)		1.00 (reference)	
		TC	77 (44.00)	63 (33.34)	0.0006^a	2.36^a	1.44–3.86
		CC	54 (30.86)	41 (21.69)	0.0007^a	2.54^a	1.47–4.38
		T	165 (47.14)	233 (61.64)			
		C	185 (52.86)	145 (38.36)	9.17e⁻⁵^a	1.80^a	1.34–2.41
rs 45532639	C345T	CC	87 (49.72)	125 (66.14)		1.00 (reference)	
		CT	45 (25.71)	36 (19.05)	0.02 ^a	1.79 ^a	1.07–3.01
		TT	43 (24.57)	28 (14.81)			
		C	219 (62.57)	286 (75.66)			
		T	131 (37.43)	92 (24.34)	0.18 ^a	0.55 ^a	0.22–1.27
rs12720065	C403G	CC	169 (96.57)	187 (98.94)		1.00 (reference)	
		CG	6 (03.43)	2 (01.06)	0.16 ^b	3.30 ^b	0.58–33.95
		GG	0 (00.00)	0 (00.00)			
		C	344 (98.29)	376 (99.47)			
		G	6 (01.71)	2 (00.53)	0.16 ^b	3.27 ^b	0.58–33.37
rs72554616	A434C	AA	175 (100.00)	189 (100.00)		1.00 (reference)	
		AC	0 (00.00)	0 (00.00)			
		CC	0 (00.00)	0 (00.00)			
		A	350 (100.00)	378 (100.00)			
		C	0 (00.00)	0 (00.00)			
rs1799929	C481T	CC	71 (40.57)	95 (50.26)		1.00 (reference)	
		CT	54 (30.86)	48 (25.40)	0.1 ^a	1.50 ^a	0.91–2.47
		TT	50 (28.57)	46 (24.34)	0.14 ^a	1.45 ^a	0.87–2.40
		C	196 (56.00)	238 (62.96)			
		T	154 (44.00)	140 (37.04)	0.05 ^a	1.33 ^a	0.99–1.79
rs1799930	G590A	GG	50 (28.57)	97 (51.32)		1.00 (reference)	
		GA	56 (32.00)	42 (22.22)	0.0003^a	2.58^a	1.52–4.37
		AA	69 (39.43)	50 (26.46)	0.0001^a	2.67^a	1.62–4.40
		G	156 (44.57)	236 (62.43)			
		A	194 (55.43)	142 (37.57)	1.55e⁻⁶^a	2.06^a	1.53–2.77

rs138707146	C638T	CC	175 (100.00)	189 (100.00)		1.00 (reference)	
		CT	0 (00.00)	0 (00.00)			
		TT	0 (00.00)	0 (00.00)			
		C	350 (100.00)	378 (100.00)			
		T	0 (00.00)	0 (00.00)			
rs 1208	A803G	AA	46 (26.28)	55 (29.10)		1.00 (reference)	
		AG	82 (46.86)	83 (43.92)	0.51 ^a	1.18 ^a	0.71–1.94
		GG	47 (26.86)	51 (26.98)	0.73 ^a	1.10 ^a	0.63–1.92
		A	174 (49.71)	193 (51.06)			
		G	176 (50.29)	185 (48.94)	0.71 ^a	1.05 ^a	0.78–1.41
rs 563935	G838A	GG	175 (100.00)	188 (99.47)		1.00 (reference)	
		GA	0 (00.00)	1 (00.53)			
		AA	0 (00.00)	0 (00.00)			
		G	350 (100.00)	377 (99.74)			
		A	0 (00.00)	1 (00.26)			
rs 56054745	A845C	AA	173 (98.86)	189 (100.00)		1.00 (reference)	
		AC	2 (01.14)	0 (00.00)			
		CC	0 (00.00)	0 (00.00)			
		A	348 (99.43)	378 (100.00)			
		C	2 (00.57)	0 (00.00)			
rs179931	G857A	GG	168 (96.00)	180 (95.24)		1.00 (reference)	
		GA	7 (04.00)	9 (04.76)	0.8 ^b	0.83 ^b	0.25–2.57
		AA	0 (00.00)	0 (00.00)			
		G	343 (98.00)	369 (97.62)			
		A	7 (02.00)	9 (02.38)	0.8 ^b	0.83 ^b	0.26–2.55

^a – Chi-square test; ^b – Fisher test

agreement with the study of Brokmoller et al. (1996) comprising 374 cases and 373 controls from Germany, where T341C but not G590A SNP was associated with bladder cancer risk. It has been reported that mutations at these two positions result in the production of non-synonymous SNPs that subsequently lead to a significant reduction in the NAT2 protein activity due to protein degradation (Hein, 2006; Zang et al., 2007; Selinski et al., 2013; Boukouvala, 2016). Furthermore Zang et al. (2007) and Walraven et al. (2008) demonstrated that both T341C and G590A SNPs are associated with a reduction in N- and O-acetylation capacity in different bacterial and eukaryotic expression systems.

On the other hand, no association has been found between the NAT2 polymorphisms G191A, C282T, C345T, C481T, and A803G and bladder cancer risk in our study population. Similar results were observed in a meta-analysis

conducted by Selinski et al. (2013). This may be explained by differences in the nature of the SNPs and the mechanism by which they affect the NAT2 enzyme activity. Actually, it has been reported that C282T and C481T SNPs are synonymous changes and seem to exert no effect on NAT2 acetylation capacity or protein stability (Zang et al., 2007; Selinski et al., 2013; Boukouvala, 2016). It has been shown that G191A, C345T, and A803G SNPs are missense mutations that cause amino acid changes in a mature protein (Walraven et al., 2008; Toure et al., 2012; Boukouvala, 2016). Polymorphisms C345T and A803G seem to have no functional effect on NAT2 enzyme, in contrast to the G191A SNP which has been associated with reduced catalytic activity (Toure et al., 2012; Selinski et al., 2013; Boukouvala, 2016).

NAT2 G191A SNP variant presents equal allelic and genotypic distributions between the controls and pa-

Table 3. Nature of NAT2 alleles identified in the study population

	G191A	C282T	T341C	C345T	C403G	C481T	G590A	A803G	G838A	A845C	G857A
NAT2*4	G	C	T	C	C	C	G	A	G	A	G
NAT2*5			C								
*5A			C			T					
*5B			C			T		G			
*5C			C					G			
*5D			C								
*5E			C				A				
*5G		T	C			T		G			
*5J		T	C				A				
*5K		T	C								
*5 (341+590+803)			C				A	G			
*5 (341+345)			C	T							
NAT2*6							A				
*6A		T					A				
*6B							A				
*6C		T					A	G			
*6E						T	A				
*6F							A	G			
*6I		T					A		A		A
*6J		T					A				A
*6L		T		T			A				
*6N		T				T	A				
*6 (282+590+838)		T					A		A		
*6 (590+857)							A				A
*6 (481+590+857)						T	A				A
NAT2*7											A
*7A											A
*7B		T									A
*7C		T						G			A
NAT2*12								G			
*12A								G			
*12B		T						G			
*12 (282+481+803)		T				T		G			
NAT2*13		T									
*13A		T									
*13 (282+838)		T							A		
NAT2*14	A										
*14A	A										
*14B	A	T									
*14D	A	T					A				
*14G	A	T						G			
*14 (191+282+838)	A	T							A		
NAT2*18										C	

Table 4. Nat 2 genotypes and predicted phenotypes frequencies in patients vs controls subjects

	Predicted phenotype	Patients [%]	Controls [%]	<i>P</i> -value	OR (CI 95%)
<i>NAT2</i> *5/*5	slow	53 (30.29)	40 (21.16)	0.0008 ^a	2.91 (1.55–5.45)
<i>NAT2</i> *5/*6	slow	41 (23.43)	28 (14.81)	0.0008 ^b	3.19 (1.55–6.68)
<i>NAT2</i> *5/*7	slow	03 (01.71)	04 (2.12)		
<i>NAT2</i> *5/*14	slow	02 (01.14)	00 (00.00)		
<i>NAT2</i> *6/*6	slow	15 (08.57)	30 (15.87)		
<i>NAT2</i> *6/*7	slow	00 (00.00)	02 (1.06)		
<i>NAT2</i> *7/*14	slow	00 (00.00)	02 (1.06)		
<i>NAT2</i> *6/*14	slow	17 (09.71)	03 (1.59)		
<i>NAT2</i> *14/*14	slow	19 (10.86)	25 (13.23)		
Total slow		150 (85.71)	134 (70.90)	0.0009 ^a	2.45 (1.41–4.35)
<i>NAT2</i> *4/*6	intermediate	02 (01.14)	10 (5.29)		
<i>NAT2</i> *4/*7	intermediate	01 (00.57)	00 (00.00)		
<i>NAT2</i> *4/*14	intermediate	02 (01.14)	09(4.76)		
<i>NAT2</i> *5/*12	intermediate	04 (02.29)	12 (6.35)		
<i>NAT2</i> *5/*13	intermediate	00 (00.00)	02 (1.06)		
<i>NAT2</i> *6/*12	intermediate	00 (00.00)	03 (1.59)		
<i>NAT2</i> *6/*13	intermediate	01 (00.57)	03 (1.59)		
<i>NAT2</i> *4/*5	intermediate	12 (06.86)	09 (4.76)		
<i>NAT2</i> *4/*4	rapid	00 (00.00)	02 (1.06)		
<i>NAT2</i> *4/*12	rapid	01 (00.57)	01 (0.52)		
<i>NAT2</i> *12/*13	rapid	00 (00.00)	02 (1.06)		
<i>NAT2</i> *13/*14	rapid	01 (00.57)	02 (1.06)		
<i>NAT2</i> *14/*18	rapid	01 (00.57)	00 (00.00)		
Total rapid/intermediate		25 (14.29)	55 (29.10)		1 (Reference)

^a - Chi-square test; ^b - Fisher test

tients and does not show an association with urinary bladder cancer in our population study. This non-association can be explained by the very low number of patients harboring the change compared with those carrying the wild-type *NAT2* genotype (Table 2), despite the fact that G191A variant is more frequent in Africans (Hein, 2006; Sabbagh et al., 2008).

Our results also showed no association with bladder cancer risk for C403G and G857A SNPs. This may be related to the less number of subjects carrying these SNPs in our population study (Table 2). Patin et al. (2006) and Teixeira et al. (2007) suggested that the *NAT2*C403G SNP may or may not alter the enzyme activity depending on the population it is expressed in. On the other hand, the G857A polymorphism has been

identified by Toure et al. (2012) as a substrate-dependent inactivating mutation and has been found to be more frequent in South India and Korea than in the other tasted populations (Hein, 2006).

The remaining SNPs (A434C, C638T, G838A, and A845C) were absent in both patients and controls. This can be interpreted by the fact that the nature and frequency of the *NAT2* polymorphisms vary remarkably between the populations of different ethnic origins. In this context, it has been demonstrated by Patin et al. (2006) and Teixeira et al. (2007) that these four SNPs occur at a low frequency in some populations like Brazilian and Sub-Saharan African populations and may or may not alter the *NAT2* acetylation activity.

Table 5. Nat2 polymorphisms and bladder cancer risk stratified by smoking

	Non-smokers				Smokers			
	Patients [%]	Controls [%]	P-value	OR (CI 95%)	Patients [%]	Controls [%]	P-value	OR (CI 95%)
G191A								
GG	50 (94.34)	70 (61.95)		1 (reference)	75 (61.48)	76 (100.00)	0.18 ^a	1.38 (0.85–2.23)
GA	3 (05.66)	13 (11.50)	0.10 ^b	0.32 (0.05–1.27)	18 (14.75)	0 (00.00)		
AA	0 (00.00)	30 (26.55)			29 (23.77)	0 (00.00)		
C282T								
CC	30 (56.60)	50 (44.25)		1 (reference)	80 (65.57)	76 (100.00)	0.05 ^b	1.75 (0.97–3.17)
CT	10 (18.87)	32 (28.32)	0.15 ^b	0.52 (0.19–1.28)	25 (20.49)	0 (00.00)		
TT	13 (24.53)	31 (27.43)	0.43 ^b	0.70 (0.28–1.63)	17 (13.94)	0 (00.00)		
T341C								
TT	12 (22.64)	52 (46.02)		1 (reference)	32 (26.23)	33 (43.42)	0.0003^b	4.15 (1.78–10.19)
TC	19 (35.85)	30 (26.55)	0.02^b	2.71 (1.08–7.08)	58 (47.54)	33 (43.42)	3.49e⁻⁸^b	7.50 (3.37–17.77)
CC	22 (41.51)	31 (27.43)	0.008^b	3.04 (1.24–7.77)	32 (26.23)	10 (13.16)	5.06e⁻⁹^b	13.41 (4.91–40.11)
C345T								
CC	47 (88.68)	95 (84.07)		1 (reference)	40 (32.78)	30 (39.47)	0.0009^b	2.69 (1.49–4.85)
CT	4 (07.55)	10 (08.85)	1 ^b	0.80 (0.17–2.99)	41 (33.61)	26 (34.21)	0.0001^b	3.16 (1.67–6.10)
TT	2 (03.77)	8 (07.08)	0.5 ^b	0.50 (0.05–2.68)	41 (33.61)	20 (26.32)	1.15e⁻⁵^b	4.11 (2.09–8.29)
C403G								
CC	52 (98.11)	113 (100.00)		1 (reference)	117 (95.90)	74 (97.37)	3.54e⁻⁸^a	3.43 (2.21–5.32)
CG	1 (01.89)	0 (00.00)			5 (04.10)	2 (02.63)	0.04 ^b	5.37 (0.84–58.11)
GG	0 (00.00)	0 (00.00)			0 (00.00)	0 (00.00)		
A434C								
AA	53 (100.00)	113 (100.00)		1 (reference)	122 (100.00)	76 (100.00)	2.78e⁻⁸^a	3.42 (2.21–5.28)
AC	0 (00.00)	0 (00.00)			0 (00.00)	0 (00.00)		
CC	0 (00.00)	0 (00.00)			0 (00.00)	0 (00.00)		
C481T								
CC	20 (37.73)	50 (44.25)		1 (reference)	51 (41.80)	45 (59.21)	0.002^b	2.81 (1.40–5.78)
CT	23 (43.40)	32 (28.32)	0.1 ^b	1.78 (0.79–4.05)	31 (25.41)	16 (21.05)	0.0001^b	4.77 (2.03–11.61)
TT	10 (18.87)	31 (27.43)	0.6 ^b	0.80 (0.29–2.09)	40 (32.79)	15 (19.74)	9.72e⁻⁷^b	6.55 (2.83–15.86)
G590A								
GG	20 (37.73)	74 (65.49)		1 (reference)	30 (24.60)	23 (30.26)	2.37e⁻⁵^b	4.76 (2.17–10.74)
GA	10 (18.87)	12 (10.62)	0.02^b	3.04 (1.02–9.03)	46 (37.70)	30 (39.48)	2.67e⁻⁷^b	5.60 (2.74–11.81)
AA	23 (43.40)	27 (23.89)	0.003^b	3.12 (1.40–7.08)	46 (37.70)	23 (30.26)	7.78e⁻⁹^b	7.29 (3.46–15.91)
C638T								
CC	53 (100.00)	113 (100.00)		1 (reference)	122 (100.00)	76 (100.00)	2.78e⁻⁸^a	3.42 (2.21–5.28)
CT	0 (00.00)	0 (00.00)			0 (00.00)	0 (00.00)		
TT	0 (00.00)	0 (00.00)			0 (00.00)	0 (00.00)		
A803G								
AA	20 (37.74)	35 (30.97)		1 (reference)	26 (21.31)	20 (26.32)	0.004^b	2.25 (0.94–5.47)
AG	20 (37.74)	43 (38.06)	0.69 ^b	0.81 (0.35–1.87)	62 (50.82)	40 (52.63)	0.004^b	2.69 (1.30–5.67)
GG	13 (24.52)	35 (30.97)	0.39 ^b	0.65 (0.25–1.62)	34 (27.87)	16 (21.05)	0.001^b	3.66 (1.54–9.06)

G838A								
GG	53 (100.00)	113 (100.00)		1 (reference)	122 (100.00)	75 (98.68)	2.09e⁻⁸ a	3.46 (2.24–5.35)
GA	0 (00.00)	0 (00.00)			0 (00.00)	1 (01.32)		
AA	0 (00.00)	0 (00.00)			0 (00.00)	0 (00.00)		
A845C								
AA	53 (100.00)	113 (100.00)		1 (reference)	120 (98.36)	76 (100.00)	4.45e⁻⁸ a	3.36 (2.17–5.19)
AC	0 (00.00)	0 (00.00)			2 (01.64)	0 (00.00)		
CC	0 (00.00)	0 (00.00)			0 (00.00)	0 (00.00)		
G857A								
GG	51 (96.23)	108 (95.58)		1 (reference)	117 (95.90)	72 (94.74)	4.86e⁻⁸ a	3.44 (2.20–5.36)
GA	2 (03.77)	5 (04.42)	1 ^b	0.84 (0.07–5.39)	5 (04.10)	4 (05.26)	0.4 ^b	0.63 (0.17–2.27)
AA	0 (00.00)	0 (00.00)			0 (00.00)	0 (00.00)		

^a – Chi-square test; ^b – Fisher test

With regard to phenotype, the results show that slow acetylators are most frequent in the Algerian population (85.71% for patients vs 70.90% for controls) and that NAT2*5 is the most represented allele (Table 4). These findings are in accordance with those reported by Guoua et al (2014) for Moroccan population. Furthermore, we registered a strikingly significant association between slow acetylator phenotypes and bladder cancer risk, consistent with several previous studies (Garcia-Closas et al., 2005; Gu et al., 2005; Rothman et al., 2007; Song et al., 2009; Moore et al., 2011; Pesch et al., 2013). Additionally, it has been reported that the balance between activation and detoxification of carcinogens affects the extent of DNA damage that occurs in the cells (Safarinejad et al., 2013). Individuals possessing a NAT2 slow acetylation phenotype are less efficient in detoxifying the arylamines and other environmental carcinogens. The metabolites of arylamines are transported through the circulatory system and are absorbed into the bladder epithelium. The metabolic activation results in the acquisition of carcinogenic properties through the formation of DNA adducts that may eventually lead to the development of bladder cancer (Zang et al., 2004).

Interestingly, some slow acetylator phenotypes showed a significant association with bladder cancer risk, such as those corresponding to NAT2*5/5 and NAT2*5/6 genotypes (Table 4). This finding has been confirmed by several earlier studies which showed that urinary bladder cancer risk was higher in the individuals possessing NAT2*5 allele, and proposed enhanced protein degradation as the mechanism for the reduced

amounts of NAT2 protein and activity (Brockmoller et al., 1996; Okkels et al., 1997; Zang et al., 2004; El Desoky et al., 2005).

The classification of patients and controls according to the NAT2 polymorphisms and smoking status showed that NAT2 T341C and G590A SNPs displayed a strong correlation with bladder cancer risk, an association that exhibited an increasing trend with cigarette consumption (Table 5).

C403G, A434C, C638T, G838A, A845C, and G857A SNP variants of NAT2 have shown an association with the homozygous wild-type genotype for each variant only in tobacco smokers (Table 5). Our findings confirm that cigarette smoking is the predominant risk factor for bladder cancer (OR = 3.42, 95% CI = 2.21–5.28), as shown previously in Table 1 and as observed in other published data (Brennan et al., 2000; Zeegers et al., 2004). Moreover, for a long time, carcinogens found in tobacco have been implicated in bladder cancer etiology among smokers (Probst-Hensch et al., 2000). On the other hand, besides the large number of NAT2 polymorphisms reported, polymorphisms in other genes such as N-acetyltransferase 1 (NAT1) and glutathione S-transferases M1 and T1 (GSTM1 and GSTT1) can also alter the ability of xenobiotic enzymes to metabolize carcinogens (Khedhiri et al., 2010).

No association was registered for the G191A and C282T SNPs with bladder cancer risk in non-smokers (Table 5). However, association of these SNPs with the bladder cancer risk in smokers could not be estimated because of their rare occurrence within the control group.

Table 6. Association of the predicted phenotype, smoking status and the bladder cancer risk

Predicted phenotypes	No-smokers				Smokers			
	patients [%]	controls [%]	P-value	OR (CI 95%)	patients [%]	controls [%]	P-value	OR (CI 95%)
Rapid/intermediate	8	23		1 (reference)	17	32	0.46	1.51 (0.51–4.80)
Slow	45	90	0.52	1.43 (0.56–4.01)	105	44	7.20e⁻⁶	6.77 (2.67–18.93)

Also, no association has been noted between the *NAT2*-C345T, C481T, and A803G SNPs and bladder cancer susceptibility in non-smokers; however, in the smoker category, these polymorphisms have shown a remarkable association with the development of bladder cancer (Table 5). This could be explained by the fact that the joint effects of *NAT2* polymorphisms and smoking status exhibit a strong biological effect and increase the risk of bladder cancer (Garcia-Closas et al., 2005).

In this study, we also showed that the *NAT2* slow acetylator phenotype was significantly associated with bladder carcinogenesis among smokers (Table 6). This gene-environment interaction has strong biological effect on *NAT2* enzyme activity because slow acetylators are unable to detoxify the aromatic amines rapidly by N-acetylation. Moreover, tobacco is considered to be the first source of exposure to aromatic amines, which are suspected to be the primary carcinogens for bladder cancer in cigarette (Tao et al., 2012). Our findings are in agreement with several previous studies (Brockmoller et al., 1996; Hein, 2006; Moore et al., 2011). Furthermore, many other studies provided evidence for the fact that the *NAT2* slow acetylation phenotype interacts with tobacco smoking as a function of exposure intensity rather than exposure duration (Lubin et al., 2007; Yuan et al., 2008; Moore et al., 2011). It has been suggested that among the slow acetylators, detoxification of arylamines present in cigarette smoke may become saturated at higher smoking intensity, thus minimizing the effect of *NAT2* detoxification to a greater extent in slow acetylators (Lubin et al., 2007; Moore et al., 2011).

Conclusions

NAT2 T341C and G590A SNPs are found to be risk factors for bladder cancer. *NAT2* slow acetylator phenotype is associated with higher risk of bladder cancer, with the greatest risk observed for the allele *NAT2**5 harboring the *NAT2* T341C SNP.

We also found that tobacco smoking interacts additively with *NAT2* T341C and G590A SNPs in influencing the bladder cancer risk. Moreover, *NAT2* C345T, C481T, and A803G SNPs were associated with bladder cancer risk only in patients of the smokers group.

Furthermore, our analysis provides strong evidence for the fact that smoking increases the risk of bladder cancer in *NAT2* slow acetylators.

Our findings support the need for the conductance of future studies on the potential gene–gene and gene–environment interactions among larger sample sizes.

Acknowledgements

The authors acknowledge Prof. Abderrezak Dahdouh, Prof. Taoufik Djaghri (Department of Urology and Renal Transplantation, Daksi Renal Clinic of Constantine) and Prof. Nacer Balasla (Department of Urology, University Hospital of Tizi-Ouzou) for their support. They also extend their thanks to Prof. François Radvanyi and all the staff of the Laboratory of Molecular Oncology, Institut Curie, Paris, France for their help and assistance.

References

- Boukouvala S. (2016) Human *NAT2* alleles (haplotypes). http://nat.mbg.duth.gr/Human%20NAT2%20alleles_2013.htm. Accessed 03 Dec 2017.
- Brennan P., Bogillot O., Cordier S., Greiser E., Schill W., Vineis P., Lopez-Abente G., Tzonou A., Chang-Claude J., Bolm-Audorff U. et al. (2000) *Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies*. Int. J. Cancer. 86(2): 289–294.
- Brokmoller J., Cascorbi I., Kerb R., Roots I. (1996) *Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk*. Cancer Res. 56(17): 3915–3925.
- Carreón T., Hein M.J., Viet S.M., Hanley M.W., Ruder A.M., Ward E.M. (2010) *Increased bladder cancer risk among workers exposed to O-toluidine and aniline: a reanalysis*. Occup. Environ. Med. 67(5): 348–350.
- Chu H., Wang M., Zhang Z. (2013) *Bladder cancer epidemiology and genetic susceptibility*. J. Biomed. Res. 27: 170–178.

- Cohen S.M., Shirai T., Steineck G. (2000) *Epidemiology and etiology of premalignant and malignant urothelial changes*. Scand. J. Urol. Nephrol Suppl. 205: 105–115.
- Di Pietro G., Gadelha S.R., Sousa S.M.B., Santana de Melo P.R., Rios Santos F. (2012) *N-acetyltransferase 2: slow, intermediate or fast? A booming question of the molecular epidemiology in cancer research*. Open J. Genet. 2: 221–235.
- Dolin P.J. (1992) *A descriptive study of occupation and bladder cancer in England and Wales*. Br. J. Cancer. 65(3): 467–468.
- El Desoky E.S., AbdelSalam Y.M., Salama R.H., El Akkad M.A., Atanasova S., von Ahsen N., Armstrong V.W., Oellerich M. (2005) *NAT2*5/*5 genotype (341T>C) is a potential risk factor for schistosomiasis-associated bladder cancer in Egyptians*. Ther. Drug Monit. 27(3): 297–304.
- Ferlay J., Ervik M., Lam F., Colombet M., Mery L., Piñeros M., Znaor A., Soerjomataram I., Bray F. (2018) *Global cancer observatory: cancer today*. International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr/today>. accessed 1 Feb 2019.
- Freedman N.D., Silverman D.T., Hollenbeck A.R., Schatzkin A., Abnet C.C. (2011) *Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women*. JAMA. 306: 737–745.
- García-Closas M., Malats N., Silverman D., Dosemeci M., Kogevinas M., Hein D.W., Tardón A., Serra C., Carrato A., García-Closas R. et al. (2005) *NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses*. Lancet 366: 649–659.
- Gu J., Liang D., Wang Y., Lu C., Wu X. (2005) *Effects of N-acetyltransferase 1 and 2 polymorphisms on bladder cancer risk in Caucasians*. Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 581: 97–104.
- Guauoa S., Ratbi I., Laarabi F.Z., Chafai Elalaoui S., Charkaoui Jaouad I., Barkat A., Sefiani A. (2014) *Distribution of allelic and genotypic frequencies of NAT2 and CYP2E1 variants in Moroccan population*. BMC Genet. 15: 156–161.
- Hamdi Cherif M., Zaidi Z., Abdellouche D., Hamdi S., Lakhdari N., Djema Benjazia A., Laouamri S., Mahnane A., Moussaoui H., Kadri L., et al. (2010) *Cancer registry of Setif (Algeria): cancer incidence, trend and survival, 1986-2005*. Afr. J. Cancer 2: 245–258.
- Hamdi Cherif M., Serraino D., Mahnane A., Laouamri S., Zaidi Z., Boukharouba H., Cherka D., Rakeb M., Kara L., Ayat A., et al. (2014) *Time trends of cancer incidence in Setif, Algeria, 1986-2010: an observational study*. BMC Cancer. 14: 637–644.
- Hein D.W., Doll M.A., Fretland A.J., Leff M.A., Webb S.J., Xiao G.H., Devanaboyina U.S., Nangju N.A., Feng Y. (2000a) *Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 9(1): 29–42.
- Hein D.W., Grant D.M., Sim E. (2000b) *Update on consensus arylamine N-acetyltransferase gene nomenclature*. Pharmacogenetics 10(4): 291–292.
- Hein D.W. (2002) *Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis*. Mutat. Res. 506–507: 65–77.
- Hein D.W. (2006) *N-acetyltransferase 2 genetic polymorphism: effects of carcinogen and haplotype on urinary bladder cancer risk*. Oncogene 25(11): 1649–1658.
- Inatomi H., Katoh T., Kawamoto T., Matsumoto T. (1999) *NAT2 gene polymorphism as a possible marker for susceptibility to bladder cancer in Japanese*. Int. J. Urol. 6: 446–454.
- Khedhiri S., Stambouli N., Ouerhani S., Rouissi K., Marrakchi R., Gaaied A.B., Slama M.B. (2010) *The impact of smoking and polymorphic enzymes of xenobiotic metabolism on the stage of bladder tumors: a generalized ordered logistic regression analysis*. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 136(7): 1111–1116.
- Lubin J.H., Kogevinas M., Silverman D., Malats N., García-Closas M., Tardón A., Hein D.W., García-Closas R., Serra C., Dosemeci M. et al. (2007) *Evidence for an intensity-dependent interaction of NAT2 acetylation genotype and cigarette smoking in the Spanish Bladder cancer study*. Int. J. Epidemiol. 36: 236–241.
- Meisel P. (2002) *Arylamine N-acetyltransferases and drug response*. Pharmacogenomics 3(3): 349–366.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988) *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucl. Acids Res. 16(3): 1215.
- Moore L.E., Baris D.R., Figueroa J.D., García-Closas M., Karagas M.R., Schwenn M.R., Johnson A.T., Lubin J.H., Hein D.W., Dagnall C.L., et al. (2010) *GSTM1 null and NAT2 slow acetylation genotypes, smoking intensity and bladder cancer risk: results from the New England bladder cancer study and NAT2 meta-analysis*. Carcinogenesis 32(2): 182–189.
- Okkels H., Sigsgaard T., Wolf H., Autrup H. (1997) *Arylamine N-Acetyltransferase 1 (NA Ti) and 2 (NAT2) polymorphisms in susceptibility to bladder cancer: the influence of smoking*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 6(4): 225–231.
- Patin E., Harmant C., Kidd K., Kidd J., Froment A., Mehdi S.Q., Sica L., Heyer E., Quintana-Murci L. (2006) *Sub-Saharan African coding sequence variation and haplotype diversity at the NAT2 gene*. Hum. Mutat. 27(7): 720.
- Pesch B., Gawrych K., Rabstein S., Weiss T., Casjens S., Rihs H.P., Ding H., Angerer J., Illig T., Klopp N., et al. (2013) *N-acetyltransferase 2 phenotype, occupation, and bladder cancer risk: results from the EPIC Cohort*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 22(11): 2055–2065.
- Pira E., Piolatto G., Negri E., Romano C., Boffetta P., Lipworth L., McLaughlin J.K., La Vecchia C. (2010) *Bladder cancer mortality of workers exposed to aromatic amines: a 58-year follow-up*. J. Natl. Cancer Inst. 102(14): 1096–1099.
- Probst-Hensch N.M., Bell D.A., Watson M.A., Skipper P.L., Tannenbaum S.R., Chan K.K., Ross R.K., Yu M.C. (2000) *N-acetyltransferase 2 phenotype but not Nat1*10 genotype affects aminobiphenyl-hemoglobin adduct levels*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 9: 619–623.

- Rihs H.P., Spickenheuer A., Heinze E., Pesch B., Raulf-Heimsoth M., Angerer J., Brüning T. (2011) *Modulation of urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites by enzyme polymorphisms in workers of the German Human Bitumen Study*. Arch. Toxicol. 85(suppl. 1): S73–S79.
- Rothman N., García-Closas M., Hein D.W. (2007) *Commentary: reflections on G. M. Lower and colleagues' 1979 study associating slow acetylator phenotype with urinary bladder cancer: meta-analysis, historical refinements of the hypothesis, and lessons learned*. Int. J. Epidemiol. 36: 23–28.
- Sabbagh A., Langaney A., Darlu P., Gerard N., Krishnamoorthy R., Poloni E.S. (2008) *Worldwide distribution of NAT2 diversity: implications for NAT2 evolutionary history*. BMC Genet. 9: 21–34.
- Safarinejad M.R., Safarinejad S., Shafiei N., Safarinejad S. (2013) *Association of genetic polymorphism of glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1, GSTP1) with bladder cancer susceptibility*. Urol. Oncol. 31(7): 1193–1203.
- Sanderson S., Salanti G., Higgins J. (2007) *Joint effects of the N-Acetyltransferase 1 and 2 (NAT1 and NAT2) genes and smoking on bladder carcinogenesis: a literature-based systematic HuGE review and evidence synthesis*. Am. J. Epidemiol. 166: 741–751.
- Selinski S., Blaszkewicz M., Ickstadt K., Hengstler J.G., Golka K. (2013) *Refinement of the prediction of N-acetyltransferase 2 (NAT2) phenotypes with respect to enzyme activity and urinary bladder cancer risk*. Arch. Toxicol. 87: 2129–2139.
- Song D.K., Xing D.L., Zhang L.R., Li Z.X., Liu J., Qiao B.P. (2009) *Association of NAT2, GSTM1, GSTT1, CYP2A6, and CYP2A13 gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics of bladder cancer in Central China*. Cancer Detect. Prev. 32: 416–423.
- Tao L., Xiang Y.B., Chan K.K., Wang R., Gao Y.T., Yu M.C., Yuan J.M. (2012) *Cytochrome P4501A2 phenotype and bladder cancer risk: the Shanghai bladder cancer study*. Int. J. Cancer. 130(5): 1174–1183.
- Teixeira R.L.F., Miranda A.B., Pacheco A.G., Lopes M.Q.P., Fonseca Costa J., Rabahi M.F., Melo H.M., Kritski A.L., Mello F.C.Q., Suffys P.N., et al. (2007) *Genetic profile of the arylamine N-acetyltransferase 2 coding gene among individuals from two different regions of Brazil*. Mutat. Res. 624: 31–40.
- Toure 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 a healthy non-smoker Senegalese population*. Mol. Biol. Rep. 39: 10489–10496.
- Tsai C.W., Hsu C.F., Tsai M.H., Tsou Y.A., Hua C.H., Chang W.S., Lin C.C., Bau D.T. (2011) *Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotype, smoking habit, metastasis and oral cancer in Taiwan*. Anticancer Res. 31(6): 2395–2399.
- Vatsis K.P., Weber W.W., Bell D.A., Dupret J.M., Evans D.A., Grant D.M., Hein D.W., Lin H.J., Meyer U.A., Relling M.V. (1995) *Nomenclature for N-acetyltransferases*. Pharmacogenetics 5(1): 1–17.
- Viel J.F., Challier B. (1995) *Bladder cancer among French farmers: does exposure to pesticides in vineyards play a part?* Occup. Environ. Med. 52(9): 587–592.
- Walker K., Ginsberg G., Hattis D., Johns D.O., Guyton K.Z., Sonawane B. (2009) *Genetic polymorphism in N-acetyltransferase (NAT): population distribution of NAT1 and NAT2 activity*. J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev. 12: 440–472.
- Walraven J.M., Zang Y., Trent J.O., Hein D.W. (2008) *Structure/function evaluations of single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltransferase 2*. Curr. Drug Metab. 9: 471–486.
- Ward E.M., Sabbioni G., DeBord D.G., Teass A.W., Brown K.K., Talaska G.G., Roberts D.R., Ruder A.M., Streicher R.P. (1996) *Monitoring of aromatic amines exposures in workers at a chemical plant with a known bladder cancer excess*. J. Natl. Cancer Inst. 88(15): 1046–1052.
- Yuan J.M., Chan K.K., Coetzee G.A., Castelao J.E., Watson M.A., Bell D.A., Wang R., Yu M.C. (2008) *Genetic determinants in the metabolism of bladder carcinogens in relation to risk of bladder cancer*. Carcinogenesis 29(7): 1386–1393.
- Zang Y., Zhao S., Doll M.A., States J.C., Hein D.W. (2004) *The T341C (Ile114Thr) polymorphism of N-acetyltransferase 2 yields slow acetylator phenotype by enhanced protein degradation*. Pharmacogenetics 14(11): 717–723.
- Zang Y., Doll M.A., Zhao S., States J.C., Hein D.W. (2007) *Functional characterization of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of human N-acetyltransferase 2*. Carcinogenesis 28(8): 1665–1671.
- Zeegers M.P., Kellen E., Buntinx F., Van den Brant P.A. (2004) *The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review*. World J. Urol. 21(6): 392–401.
- Zhu Z., Zhang J., Jiang W., Zhang W., Li Y., Xu X. (2015) *Risks on N-acetyltransferase 2 and bladder cancer: a meta-analysis*. Onco. Targets Ther. 8: 3715–3720.

Résumés

RÉSUMÉ

Le cancer de la vessie est une maladie multifactorielle due à l'interaction entre des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux. La susceptibilité individuelle par rapport au risque du cancer de la vessie est modulée par les polymorphismes génétiques portés par certains gènes dont les gènes codant pour les enzymes de détoxification. Parmi ces gènes les N -Acétyltransférases (*NAT*) impliqués dans la phase II de détoxification de plusieurs xénobiotiques et dont les variations représentent des facteurs de risque incriminés dans plusieurs cancers. Un autre polymorphisme rs2228001 a été récemment impliqué dans l'étiologie du cancer vésical. Il est porté sur le gène *XPC* (Xeroderma pigmentosum complementation group C), responsable de la synthèse d'une protéine impliquée dans l'initiation du processus de réparation de l'ADN par le système d'excision de nucléotides (NER).

Objectifs : Notre travail vise à analyser premièrement l'impact de la consommation du tabac et du milieu professionnel à risque sur la survenue du cancer vésical. De chercher, dans un deuxième temps, une éventuelle association entre le risque de ce type de cancer et les différents SNPs du gène de détoxification *NAT2*. Cette association a été également cherchée pour les différents profils d'acétylation *NAT2*. Nous avons exploré aussi l'implication de l'allèle à risque du polymorphisme rs2228001 dans la carcinogénèse vésicale. L'effet combiné des polymorphismes étudiés ainsi que la stratification des génotypes et des phénotypes d'acétylation selon le statut tabagique, l'exposition professionnelle et les paramètres clinico-pathologiques ont été également testés.

Méthodes : Cette étude cas-témoins inclus **175** malades atteints d'un cancer vésical et **189** témoins appariés avec les malades selon l'âge, le sexe et l'origine ethnique. Les génotypes des différents SNPs du gène *NAT2* sont déterminés par séquençage en utilisant l'ADN extrait de sang périphérique. Les génotypes du polymorphisme rs2228001 sont déterminés par la technique TaqMan et séquençage. La comparaison des fréquences alléliques et génotypiques entre les deux groupes a été établie par le calcul de l'odds ratio avec un intervalle de confiance à 95%.

Résultats : 13 SNPs du gène *NAT2* préalablement décrits ont été identifiés dans cette étude, seuls ceux en position T341C et G590A ont montré une association statistiquement significative avec le risque du cancer vésical ($p < 0,05$). Le phénotype acétylateur lent représente un risque élevé pour la carcinogénèse vésical ($p = 0,0009$), avec un risque accru pour l'allèle *NAT2**5. Pour ces mêmes polymorphismes le risque du cancer de la vessie demeure plus important chez les fumeurs comparés aux non-fumeurs et chez les travailleurs dans les secteurs à risque comparés à ceux dans les secteurs d'activités non à risque. Notre étude a montré également une

forte interaction entre le phénotype NAT2 acétylateur lent et tabagisme ($p = 7,20e^{-6}$) de même pour le secteur professionnel à risque ($p = 1,58e^{-9}$). En outre, le polymorphisme rs2228001 du gène *XPC* a montré une association significative avec le cancer vésical uniquement pour les hétérozygotes (OR = 1,64, IC 95% = 1,01-2,68, $p = 0,04$), tandis que pour les homozygotes mutés l'association est présente mais non significative (OR = 1,35, IC 95% = 0,71-2,56, $p = 0,3$). Ce risque se trouve augmenté chez les hétérozygotes fumeurs ($p = 0,002$) ou chez ceux occupant des secteurs d'activités à risques ($p = 3,60e^{-7}$).

Conclusion : Cette étude montre que le tabagisme, l'exposition professionnelle, les variants T341C et G590A du gène *NAT2*, le phénotype acétylateur lent NAT2, ainsi que le génotype hétérozygote du polymorphisme rs2228001 représentent individuellement un facteur de risque du cancer vésical dans la population Algérienne. L'interaction gène-tabac ou gène-profession augmente considérablement ce risque. Aucune interaction n'a été trouvée entre les polymorphismes étudiés et les paramètres clinico-pathologiques.

Mots clés : *NAT2*, SNP, acétylateur lent, *XPC*, tabac, profession, cancer de la vessie.

Summary

Bladder cancer is a multifactorial disease due to the interaction between genetic factors and environmental factors. The individual susceptibility to the risk of bladder cancer is modulated by genetic polymorphisms carried by certain genes including the genes encoding the detoxifying enzymes. Among these genes, the N-acetyltransferases (NAT) involved in the detoxification phase II of several xenobiotics and whose variations represent risk factors incriminated in several cancers. Another rs2228001 polymorphism has recently been implicated in the etiology of bladder cancer. It is focused on the *XPC* gene (Xeroderma pigmentosum complementation group C), responsible for the synthesis of a protein involved in the initiation of the DNA repair process by the nucleotide excision repair system (NER).

Objectives: Our work aims to analyze firstly the impact of tobacco consumption and the professional environment at risk on the occurrence of bladder cancer. In a second step, to look for a possible association between the risk of this type of cancer and the different SNPs of the NAT2 detoxification gene. This association was also sought for the different NAT2 acetylation profiles. We also explored the involvement of the allele at risk of rs2228001 polymorphism in bladder carcinogenesis. The combined effect of the studied polymorphisms as well as the stratification of genotypes and acetylation phenotypes according to smoking status, occupational exposure and clinico-pathological parameters were tested.

Methods: This case-control study included 175 patients with bladder cancer and 189 controls matched to patients by age, sex and ethnicity. The genotypes of the different SNPs of the NAT2 gene are determined by sequencing using DNA extracted from peripheral blood. The genotypes of the rs2228001 polymorphism are determined by the TaqMan technique and sequencing. The comparison of allelic and genotypic frequencies between the two groups was established by calculating the odds ratio with a 95% confidence interval.

Results: 13 previously described SNPs were identified in this study, only those in position T341C and G590A showed a statistically significant association with the risk of bladder cancer ($p < 0.05$). The slow acetylator phenotype represents a high risk for bladder carcinogenesis ($p = 0.0009$), with an increased risk for the NAT2 *5 allele. For these same polymorphisms, the risk of bladder cancer remains higher for smokers compared to non-smokers and for workers in risk sectors compared to those working in non-risk sectors. Our study showed a strong interaction between the NAT2 phenotype slow acetylator and smoking ($p = 7.20e^{-6}$) similarly for the professional sector at risk ($p = 1.58e^{-9}$). However, the rs2228001 polymorphism showed a significant association with bladder cancer only for heterozygotes (OR = 1.64, 95% CI = 1.01-2.68, $p = 0.04$), whereas for mutated homozygotes the association is present but not significant

(OR = 1.35, 95% CI = 0.71-2.56, $p = 0.3$). This risk is increased in heterozygous smokers ($p = 0.002$) or in those occupying risky activity sectors ($p = 3.60e^{-7}$).

Conclusion : This study shows that smoking, occupational exposure, T341C and G590A variants of the NAT2 gene, the NAT2 slow acetylator phenotype, and the heterozygous genotype of the rs2228001 polymorphism individually represent a risk factor for bladder cancer in the Algerian population. The gene-tobacco or gene-profession interaction greatly increases this risk. No interaction was found between the studied polymorphisms and clinical-pathological parameters.

Key words: NAT2, SNP, slow acetylator, XPC, tobacco, occupation, bladder cancer.

الملخص:

سرطان المثانة هو مرض متعدد العوامل بسبب التفاعل بين العوامل الوراثية والعوامل البيئية. تتأثر القابلية الفردية لخطر الإصابة بسرطان المثانة عن طريق تعدد الأشكال الوراثية التي تحملها جينات معينة بما في ذلك الجينات التي تشفر إنزيمات إزالة السموم.

N-acetyltransferases المشاركة في المرحلة الثانية لإزالة السموم من العديد من الكائنات الحية المجهرية والتي تمثل اختلافاتها عوامل خطر مجرّمة في العديد من أنواع السرطان.

مؤخرا تعدد الأشكال rs2228001 المتورطين في مسببات سرطان المثانة. وهو يركز على الجين XPC مجموعة (Xeroderma pigmentosum التكميلية C) ، المسؤولة عن تخليق بروتين مشارك في بدء عملية إصلاح الحمض النووي بواسطة نظام استئصال النوكليوتيدات (NER).

الأهداف: يهدف عملنا إلى تحليل أولاً تأثير استهلاك التبغ والبيئة المهنية المعرضة للخطر على حدوث سرطان المثانة. في خطوة ثانية ، للبحث عن ارتباط محتمل بين خطر هذا النوع من السرطان ومختلف تعدد الأشكال لجين إزالة السموم من NAT2. كما تم السعي للحصول على هذه الارتباطات لمحات استئيل مختلفة من NAT2. استكشفنا أيضاً مشاركة الأليل في خطر تعدد الأشكال rs2228001 في تسرطن المثانة. تم اختبار التأثير المشترك للأشكال المتعددة التي تمت دراستها بالإضافة إلى التقسيم الطبقي للأنماط الجينية والأنماط الظهارية الخلوية وفقاً لحالة التدخين والتعرض المهني والمعلومات الإكلينيكية المرضية.

الطريقة: شملت هذه الدراسة الحالات والشواهد 175 مريضاً بسرطان المثانة و 189 الضوابط المتطابقة مع المرضى حسب العمر والجنس والعرق. يتم تحديد الأنماط الجينية لمختلف SNPs من الجين NAT2 عن طريق التسلسل باستخدام الحمض النووي المستخرج من الدم المحيطي. يتم تحديد الأنماط الجينية للأشكال rs2228001 بواسطة تقنية TaqMan وتسلسلها.

تم تأسيس مقارنة الترددات الأليلية والوراثية بين المجموعتين من خلال حساب نسبة الأرجحية مع فاصل الثقة 95%. **النتائج:** تم تحديد 13 SNPs من الجين NAT2 الموصوف سابقاً في هذه الدراسة ، فقط أولئك الموجودون في الموقع T341C و G590A أظهروا ارتباطاً ذي دلالة إحصائية مع خطر الإصابة بسرطان المثانة ($P > 0.05$). يمثل النمط الظاهري للأسيتيل البطيء خطراً كبيراً على تسرطن المثانة ($P = 0.0009$) ، مع زيادة خطر الأليل 5 * NAT2. بالنسبة إلى هذه الأشكال نفسها ، يظل خطر الإصابة بسرطان المثانة أعلى بالنسبة للمدخنين مقارنةً بغير المدخنين وللعمال في مناطق الخطر مقارنةً بغير المدخنين. أظهرت دراستنا أيضاً تفاعلاً قوياً بين النمط الظاهري لأسيتاتور NAT2 والتدخين ($P = e^{-6} 7.20$) على نحو مماثل بالنسبة لقطاع المعرضين للخطر المهني ($P = e^{-9} 1.58$). بالإضافة إلى ذلك ، أظهر تعدد الأشكال rs2228001 لجين XPC ارتباطاً مهماً بسرطان المثانة فقط للزيجوت غير المتجانسة ($OR = 1.64$ ، CI 95% ، $p = 0.04$) ، بينما بالنسبة للزيجوت المتغيرة المتحورة ، تكون الرابطة موجودة ولكنها ليست ذات أهمية ($OR = 1.35$ ، CI 95% ، $p = 0.3$ ، $CI = 0.71-2.56$). يزداد هذا الخطر لدى المدخنين غير المتجانسين ($P = 0.002$) أو أولئك الذين يشغلون مهن محفوفة بالمخاطر ($P = e^{-7} 3.60$).

الاستنتاج: توضح هذه الدراسة أن التدخين والتعرض المهني ومتغيرات T341C و G590A من جين NAT2 ، والنمط الظاهري لأسيتيل البطيء NAT2 ، والنمط الوراثي غير المتماثل للزيجوت لنمط تعدد الأشكال rs2228001 يمثل بشكل فردي عامل خطر للإصابة بسرطان الحويصلات في الشعب الجزائري. يزيد التفاعل بين الجينات والتبغ أو المهنة من هذا الخطر بشكل كبير. لم يتم العثور على أي تفاعل بين الأشكال المدروسة والمعلومات السريرية المرضية.

الكلمات المفتاحية: NAT2 ، SNP ، الأسييتيل البطيء ، XPC ، التبغ ، المهنة ، سرطان المثانة.

IMPLICATION DU POLYMORPHISME GÉNÉTIQUE (NAT2 ET XPC) DANS LE CANCER DE LA VESSIEThèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat 3^{ème} cycle**RESUME**

Le cancer de la vessie est une maladie multifactorielle due à l'interaction entre des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux. La susceptibilité individuelle par rapport au risque du cancer de la vessie est modulée par les polymorphismes génétiques portés par certains gènes dont les gènes codant pour les enzymes de détoxification. Parmi ces gènes les N -Acétyltransférases (*NAT*) impliqués dans la phase II de détoxification de plusieurs xénobiotiques et dont les variations représentent des facteurs de risque incriminés dans plusieurs cancers. Un autre polymorphisme rs2228001 a été récemment impliqué dans l'étiologie du cancer vésical. Il est porté sur le gène *XPC* (Xeroderma pigmentosum complementation group C), responsable de la synthèse d'une protéine impliquée dans l'initiation du processus de réparation de l'ADN par le système d'excision de nucléotides (NER).

Objectifs : Notre travail vise à analyser premièrement l'impact de la consommation du tabac et du milieu professionnel à risque sur la survenue du cancer vésical. De chercher, dans un deuxième temps, une éventuelle association entre le risque de ce type de cancer et les différents SNPs du gène de détoxification *NAT2*. Cette association a été également cherchée pour les différents profils d'acétylation *NAT2*. Nous avons exploré aussi l'implication de l'allèle à risque du polymorphisme rs2228001 dans la carcinogénèse vésicale. L'effet combiné des polymorphismes étudiés ainsi que la stratification des génotypes et des phénotypes d'acétylation selon le statut tabagique, l'exposition professionnelle et les paramètres clinico-pathologiques ont été également testés.

Méthodes : Cette étude cas-témoins inclus **175** malades atteints d'un cancer vésical et **189** témoins appariés avec les malades selon l'âge, le sexe et l'origine ethnique. Les génotypes des différents SNPs du gène *NAT2* sont déterminés par séquençage en utilisant l'ADN extrait de sang périphérique. Les génotypes du polymorphisme rs2228001 sont déterminés par la technique TaqMan et séquençage. La comparaison des fréquences alléliques et génotypiques entre les deux groupes a été établie par le calcul de l'odds ratio avec un intervalle de confiance à 95%.

Résultats : 13 SNPs du gène *NAT2* préalablement décrits ont été identifiés dans cette étude, seuls ceux en position T341C et G590A ont montré une association statistiquement significative avec le risque du cancer vésical ($p < 0,05$). Le phénotype acétylateur lent représente un risque élevé pour la carcinogénèse vésical ($p = 0,0009$), avec un risque accru pour l'allèle *NAT2**5. Pour ces mêmes polymorphismes le risque du cancer de la vessie demeure plus important chez les fumeurs comparés aux non-fumeurs et chez les travailleurs dans les secteurs à risque comparés à ceux dans les secteurs d'activités non à risque. Notre étude a montré également une forte interaction entre le phénotype *NAT2* acétylateur lent et tabagisme ($p = 7,20e^{-6}$) de même pour le secteur professionnel à risque ($p = 1,58e^{-9}$). En outre, le polymorphisme rs2228001 du gène *XPC* a montré une association significative avec le cancer vésical uniquement pour les hétérozygotes (OR = 1,64, IC 95% = 1,01-2,68, $p = 0,04$), tandis que pour les homozygotes mutés l'association est présente mais non significative (OR = 1,35, IC 95% = 0,71-2,56, $p = 0,3$). Ce risque se trouve augmenté chez les hétérozygotes fumeurs ($p = 0,002$) ou chez ceux occupant des secteurs d'activités à risques ($p = 3,60e^{-7}$).

Conclusion : Cette étude montre que le tabagisme, l'exposition professionnelle, les variants T341C et G590A du gène *NAT2*, le phénotype acétylateur lent *NAT2*, ainsi que le génotype hétérozygote du polymorphisme rs2228001 représentent individuellement un facteur de risque du cancer vésical dans la population Algérienne. L'interaction gène-tabac ou gène-profession augmente considérablement ce risque. Aucune interaction n'a été trouvée entre les polymorphismes étudiés et les paramètres clinico-pathologiques.

Mots clés : *NAT2*, SNP, acétylateur lent, *XPC*, tabac, profession, cancer de la vessie.

Laboratoire de recherche :

Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire (Université Constantine 3).

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Université des Frères Mentouri, Constantine 1).