



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**



Inserm
Institut national
de la santé et de la recherche médicale

École Doctorale BioSE (Biologie - Santé - Environnement)

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : «Sciences de la Vie et de la Santé»

Présentée par : Patrice Hodonou AVOGBE

Titre de la thèse :

**DÉTERMINANTS GÉNÉTIQUES DE LA RÉPARATION D'ADN ET DU
MÉTABOLISME DES MONOCARBONES : APPROCHE GÈNE CANDIDAT ET
ÉTUDES D'ASSOCIATION AVEC LE RISQUE DE CARCINOME
HÉPATOCELLULAIRE ET DE CANCER DU POUMON**

Date de Soutenance : 27/11/2012

Membres du jury :

Rapporteurs:	Mme Micheline MISRAHI	Professeur des Universités, PU-PH, Université de Paris XI
	Mr. Yves MALTHIERY	Professeur des Universités, PU-PH, Université d'Angers
Examineurs:	Mr. Jean-Louis GUÉANT	Professeur des Universités, PU-PH, Université de Lorraine, NANCY
	Mr. Ambaliou SANNI	Professeur des Universités, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, BÉNIN
	Mr. François FEILLET	Professeur des Universités, Centre de référence des maladies héréditaires du métabolisme, CHU Nancy, Directeur de thèse
	Mr. Abalo CHANGO	Docteur, HDR, Institut Polytechnique LaSalle, Beauvais, Président du jury
Membre invité:	Mr. Jean-Pierre BRONOWICKI	Professeur des Universités, PU-PH, Université de Lorraine, NANCY

INSERM U954 : NGERE – Nutrition, Génétique et Exposition aux Risques Environnementaux, 9 Av. de la Forêt de Haye, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France

DÉDICACE

*A ma femme Hermione Chantal, pour la patience, le soutien, les conseils, la compréhension et encouragements
dont elle a fait preuve pendant toute la durée de cette thèse.*

*A mes enfants Max–Aurel et Axel Horace, qui résument si bien le mot ‘enfant’
qu’il serait superflu d’y ajouter quelque chose.*

*A mes parents, les mots ne sauraient exprimer tous les efforts et sacrifices que vous n’avez
jamais cessés de consentir pour mon instruction. J’espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi.*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le professeur Jean-Louis Guéant, directeur de l'U954, de m'avoir chaleureusement accueilli au sein de son équipe pour préparer cette thèse en me donnant la possibilité de travailler sur différents axes de recherche développés au sein de son laboratoire. Ce fut une expérience enrichissante pour ma carrière professionnelle, aussi bien sur le plan scientifique qu'humain.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude au professeur Ambalion Sanni — avec qui je travaille depuis quelques années — qui n'a pas ménagé ses efforts pour voir cette thèse se réaliser.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au professeur François Feillet qui a bien accepté de diriger cette thèse. Sa disponibilité n'a jamais fait défaut malgré ses multiples occupations.

Je voudrais également remercier les professeurs Yves Malthiery et Micheline Misrabi qui m'ont fait l'honneur en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse.

Au professeur Michel Vidailhet, je lui exprime ma profonde gratitude d'avoir accepté d'être mon tuteur pour le « Prix Alimentation et Santé » de l'Institut Danone. Son enthousiasme, sa disponibilité et ses conseils éclairés n'ont jamais fait défaut.

Aux professeurs Christophe Paris et Jean-Michel Vignaud, je leur exprime mes plus vifs remerciements pour leur participation active dans mon travail. Je tiens à exprimer ma gratitude au Docteur Luc Ferrari.

Je tiens à remercier le Professeur Jean-Pierre Bronowicki pour sa participation active dans cette thèse et surtout pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur le carcinome hépatocellulaire.

Je tiens à exprimer ma gratitude au Dr Abderrahim Oussalah pour les nombreuses discussions que nous avons eues, notamment lors de l'analyse statistique des données. Je le remercie aussi pour son enthousiasme et sa disponibilité.

Au Dr Abalo Chango, je lui exprime toute ma gratitude de m'avoir chaleureusement accueilli dans son laboratoire et de m'avoir initié à la méthode chromatographique de détermination de m^5dC et dU . Je ne saurais oublier Abdel Afif Nour pour son précieux soutien pendant mon séjour à Beauvais.

A mes collègues et le personnel de l'U954, qu'ils trouvent ici l'expression de mes chaleureux remerciements pour leur précieuse aide et nombreuses discussions que nous avons eues. Ma profonde sympathie va à : Pierre Rouyer, Céline Chéry, Jean-Marc Alberto, Philippe Gérard, Sophie Lorentz, Déborah Helle et Feresteh Amoghly.

Je remercie chaleureusement toutes les secrétaires de l'Unité 954 : Nicole Mazetti, Dominique Guillaume, Catherine Tavera et Aline Cazé pour leurs précieuses aides.

Ma gratitude va également au personnel du laboratoire de biologie moléculaire au CHU Brabois. Il s'agit de Rosa-Maria Rodriguez-Guéant, René Debard, Thomas Josse, Denise Tramoy, Corinne Payet, Pascal Perrin, Jean-Pierre Huet.

Je voudrais aussi remercier tous mes collègues et enseignants du laboratoire de Biochimie et de Biologie moléculaire de Cotonou, notamment Mme Ayi-Fanou Lucie et Nicodème W. Chabi.

A Élise Jeannesson, Maryline Schwartz, Laurence Camus, je ne saurais oublier leur aide très précieuse durant la mise au point de la méthode de mesure de la méthylation d'ADN. Je voudrais qu'elles trouvent ici toute l'expression de ma reconnaissance et ma sympathie.

Mes sincères remerciements à Stéphanie Lacomme, Aude Bressenot, Guillaume Gauchotte, Roseline Varsovie, Amandine Luc, Idrissia Hanriot, Paul Taton, Marie-Laure Asensio, leur collaboration et leur constante disponibilité m'ont beaucoup aidé dans la collecte des données sur les projets PNES et CIRCE

A Laetitia Goffinet, Nicolas Martin, Ma'atem Foufou-Caillerez, Sonia gkikopoulou, Hélène Pellanda, Shabnam Pooya, Rania Akoum, Racha Kerek, Sarah

A mes amies Zoul Kifouli Adéoti, Ernest Blenon, Francis Agougnon, Joël Tossou, Crépin Yabouédébou, Hervé Hounzandji, merci de votre soutien et pour les bons moments qu'on a passés ensemble.

Je remercie tout particulièrement ma tante Hortense Meyissèdé — qui m'a toujours considéré comme son fils —, et mon cousin Honoré Doto pour leur profonde gratitude, soutien, encouragements et affection.

A mes frères et sœur Moïse, Lambert, Gérard, Simon, Noël et Bénédicte ; mes beaux frères et belle sœur Marius, Landry et Sandra Aïssoun, et à mes beaux parents Anatole Aïssoun et Élisabeth Affo-Aïssoun, pour leur soutien affectueux, leurs encouragements dans l'accomplissement de cette formidable aventure.

ABREVIATIONS

ADN :	acide désoxyribonucléique
ADK :	adénocarcinomes
ADT :	<i>assay Design Tool</i>
BER :	réparation par excision de base (<i>base excision repair</i>)
<i>BRCA1</i> :	<i>Breast Cancer 1</i>
<i>BRCA2</i> :	<i>Breast cancer 2, early onset</i>
<i>BRIP1</i> :	<i>BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1</i>
Cbl :	cobalamine
CDBs :	cassures double brin d'ADN
CDK :	kinase dépendante des cyclines
CHC :	carcinome hépatocellulaire
COVs :	composés organiques volatils
CP :	cancer du poumon
CRB :	centre des ressources biologiques
CS :	syndrome de Cockayne
CSA/B :	Cockayne Syndrom A/B protein
CTM :	conducteurs de taxi-moto
<i>DMGDH</i> :	<i>Diméthylglycine déshydrogénase</i>
DSBR :	réparation des cassures doubles brins
dUMP :	désoxyuridine monophosphate
<i>ERCC1</i> :	<i>Excision Repair Cross–Complementing rodent repair deficiency, complementation group 1</i>
ERO :	espèces réactives oxygénées
<i>GGH</i> :	<i>gamma–glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolyglutamyl hydrolase)</i>
GGR ou GG-NER :	réparation globale du génome
HAPs :	hydrocarbures aromatiques polycycliques
Hcy :	homocystéine
HR :	recombinaison homologue
HWE :	<i>Hardy–Weinberg Equilibrium</i>
IMC:	indice de masse corporelle
LC-MS/MS :	chromatographie liquide/masse spectrométrie
<i>LINE-1</i> :	Long interspersed nuclear element–1

MMA :	acide méthylmalonique
MMC :	métabolisme des monocarbones
<i>MGMT :</i>	<i>O–6–methylguanine–DNA methyltransferase</i>
MMR :	réparation des mésappariements (<i>Mismatch repair</i>)
NER :	réparation par excision de nucléotides (<i>Nucleotide excision repair</i>)
NHEJ :	<i>Non Homologous End Joining</i>
OR :	odds ratio
PNES:	Programme National d'Excellence Spécialisé
<i>POLL :</i>	<i>Polymerase (DNA directed) lambda</i>
<i>PRKDC :</i>	<i>protein kinase, DNA–activated, catalytic polypeptide</i>
SAH :	S–adénosyl homocystéine
SAM :	S–adénosylméthionine
SNPs :	<i>single nucleotide polymorphisms</i>
<i>TEP1 :</i>	<i>Telomerase–associated protein 1</i>
<i>XRCC5 :</i>	<i>X–ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells5</i>
UDGs :	Uracile–DNA glycosylases
UPLC :	chromatographe liquide ultra haute performance
VHB :	virus de l'hépatite B
VHC :	virus de l'hépatite C
5–méthyl–THF :	5–méthyl–tétrahydrofolate
8–oxodG :	8–oxo–7,8–dihydro–2–déoxyguanosine

TABLE DES MATIÈRES

ABREVIATIONS.....	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES TABLEAUX	XV
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. ALTERATIONS GENETIQUES ET SYSTEMES DE REPARATION D'ADN	6
1.1. PRINCIPALES SOURCES DE FORMATION DE LESIONS D'ADN	6
1.1.1. Formation des espèces réactives (radicales) de l'oxygène et stress oxydatif	7
1.1.1.1. Lésions oxydatives	8
1.1.1.2. Sites abasiques de l'ADN	9
1.2. DIFFERENTS SYSTEMES DE REPARATION DE L'ADN	10
1.2.1. Le système de réparation par excision de bases (BER)	10
1.2.1.1. Reconnaissance de la lésion	11
1.2.1.2. Incision du brin d'ADN	11
1.2.1.3. Resynthèse de la zone excisée	12
1.2.1.4. L'étape de ligation	12
1.2.1.5. Cas des lésions de 8-oxodG et d'uracile	13
1.2.1.5.1. L'uracile	14
1.2.1.5.1.1. Sources de l'uracile dans l'ADN	14
1.2.1.5.1.1.1. Désamination spontanée de la cytosine	15
1.2.1.5.1.1.2. Désamination spontanée et enzymatique de la cytosine	16
1.2.1.5.1.1.3. Taux de misincorporation de résidus de dUMP dans l'ADN	16
1.2.1.5.1.2. Enzymes impliquées dans la réparation des lésions d'uracile	17
1.2.1.5.1.3. Misincorporation d'uracile et statut en folates	18
1.2.1.5.2. La 8-oxo-7,8-dihydro-2-désoxyguanosine (8-oxodG)	19
1.2.1.5.2.1. Formation de la 8-oxodG	19
1.2.1.5.2.2. Influence des gènes de la réparation sur le niveau de la 8-oxodG dans l'ADN	20
1.2.1.5.2.3. Association entre carcinogènes environnementaux et niveaux de 8-oxodG	20
1.2.2. Mécanismes de réparation des cassures double brin d'ADN	21
1.2.2.1. Réparation des cassures double brin d'ADN par recombinaison homologue	23
1.2.2.2. Réparation des cassures double brin d'ADN par recombinaison non homologue (NHEJ pour <i>non homologous end joining</i>)	23
1.2.3. La réparation des lésions d'ADN par excision de nucléotides (système NER)	25
1.2.3.1. Pathologies associées aux anomalies de la réparation de la voie NER	26
1.2.3.1.1. Le Xeroderma Pigmentosum (XP)	27
1.2.3.1.2. Le syndrome de Cockayne (CS)	27
1.2.3.1.3. La Trichothiodystrophie (TTD)	27
1.2.4. Réparation des mésappariements d'ADN (système MMR)	28
1.3. ASSOCIATION ENTRE LE STATUT EN DONNEUR DE METHYLES ET STABILITE GENOMIQUE	30
1.3.1. Les folates	31
1.3.1.1. Structure, sources d'apport et causes de carence en folates	31
1.3.1.2. Apport nutritionnel conseillé (ANC) en folates	32
1.3.1.3. Le métabolisme des folates : absorption et transport des folates	32
1.3.2. La vitamine B12	34
1.3.2.1. Découverte de la vitamine B12	34
1.3.2.2. Structure et formes de la vitamine B12	34
1.3.2.3. Apport nutritionnel conseillé en vitamine B12	35

1.3.2.4. Métabolisme de la vitamine B12	36
1.3.2.4.1. Absorption et transport de la vitamine B12	36
1.3.2.4.2. Distribution des Cbl par la transcobalamine II.....	38
1.3.2.5. Fonctions des cobalamines.....	38
1.3.2.5.1. Action des cobalamines sur les enzymes B12-dépendantes	38
1.3.2.6. L'homocystéine et l'acide méthylmalonique (MMA), deux marqueurs métaboliques de la carence en cobalamine et en folates	40
1.4. ALTERATIONS EPIGENETIQUES ET STABILITE ET GENOMIQUE	41
1.4.1. Définition du terme 'épigénétique'	41
1.4.2. Profils de méthylation de l'ADN.....	41
1.4.3. Rôles de la méthylation de l'ADN	43
1.4.4. Déterminants de la méthylation d'ADN.....	43
1.4.4.1. Les ADN méthyltransférases (DNMTs).....	43
1.4.4.2. Facteurs démographiques	43
1.4.4.2.1. L'âge et le sexe	43
1.4.4.3. Les facteurs environnementaux.	44
1.4.4.3.1. Le benzène et le plomb	44
1.4.4.3.2. Pollution de l'air	44
1.4.4.3.4. La fumée de tabac	45
1.4.4.3.5. L'alcool	45
1.4.4.4. Les folates.....	45
1.5. LE CARCINOME HEPATOCELLULAIRE (CHC)	47
1.5.1. Taux d'incidence et de mortalité du carcinome hépatocellulaire dans le monde.....	47
1.5.2. Facteurs aggravants le risque de carcinome hépatocellulaire	48
1.5.2.1. Virus de l'hépatite B et C et leur rôle dans la carcinogenèse hépatique	48
1.5.2.2. La consommation d'alcool.....	49
1.5.2.3. Les mycotoxines	49
1.5.3. SNPs des gènes de la réparation d'ADN et du MMC avec le risque de CHC.....	50
1.5.3.1. Polymorphismes des gènes de la réparation d'ADN et carcinome hépatocellulaire.....	50
1.5.3.1.1. SNPs des gènes de la voie BER et risque de carcinome hépatocellulaire	50
1.5.3.1.2. Gènes de la voie DSB et risque de carcinome hépatocellulaire	50
1.5.3.1.3. SNPs des gènes de la voie NER et risque de carcinome hépatocellulaire.....	51
1.5.3.2. Déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme des monocarbones avec le risque de carcinome hépatocellulaire.....	51
1.5.3.2.1. Statut en donneurs de méthyles et risque de carcinome hépatocellulaire.....	51
1.5.3.2.2. Polymorphismes des enzymes du métabolisme des monocarbones et risque de carcinome hépatocellulaire	52
1.6. LE CANCER DU POU MON (CP)	54
1.6.1. Épidémiologie du cancer du poumon	54
1.6.2. Facteurs aggravant le risque de cancer du poumon.....	54
1.6.2.1. Le tabagisme.....	54
1.6.2.2. L'exposition à l'amiante.....	55
1.6.3. Déterminants génétiques de la réparation d'ADN et risque de cancer du poumon	55
1.6.3.1. Polymorphismes des gènes de la réparation d'ADN et risque de CP.....	55
1.6.3.1.1. Influences des SNPs des gènes de la voie BER sur le risque de cancer du poumon	55
1.6.3.1.1.1. SNPs d'APEX1 et risque de cancer du poumon	55
1.6.3.1.1.2. Polymorphismes de XRCC1 et risque de cancer du poumon	56
1.6.3.1.1.3. Polymorphismes d'OGG1 et risque de cancer du poumon	57
1.6.3.1.2. Influence des SNPs du système NER sur le risque de cancer du poumon	58
1.6.3.1.2.1. ERCC1 rs11615 (Asn118Asn) et ERCC1 rs3212986 et risque de CP	58
1.6.3.1.2.2. SNPs de ERCC2/XPD : ERCC2 rs1799793 et ERCC2 rs13181 (Lys751Gln).....	58
1.6.3.1.2.3. SNPs d'ERCC4/XPF et risque de cancer du poumon.....	59
1.6.3.1.2.4. SNPs d'ERCC5/XPG et risque de cancer du poumon	59

1.6.3.1.3. Polymorphismes des gènes de la voie <i>DSBR</i> et risque de cancer du poumon	59
1.6.3.1.3.1. Polymorphismes de <i>RCQEL</i> et <i>RAD52</i> , <i>MRE11A</i> et <i>NBS1</i> et risque de cancer du poumon	59
1.6.3.1.3.2. Polymorphismes de <i>XRCC3</i> et risque de cancer du poumon	60
1.6.3.1.4. Polymorphismes des gènes de la voie <i>MMR</i> et risque de cancer du poumon	60
1.7. OBJECTIFS DE LA THESE	61
CHAPITRE II : DONNEES PHENOTYPIQUES ET METABOLIQUES SUR CIRCE, PNES ET L'ÉTUDE TAXI-MOTO.....	64
2. ASPECTS GENERAUX DES PROTOCOLES EXPERIMENTAUX SUR LE CARCINOME HEPATOCELLULAIRE (CHC : ETUDE CIRCE), LE CANCER DU POUMON (CP OU ETUDE PNES) ET DE L'ÉTUDE SUR LES CONDUCTEURS DE TAXI-MOTO DE COTONOU (CTM)	65
2.1. PLANIFICATION ET CONDUITE DE L'ÉTUDE CIRCE : RECRUTEMENT DES PATIENTS ATTEINTS D'UNE CIRRHOSE AVEC CHC (CAS) ET DES TEMOINS (CIRRHOSE SANS CHC)	65
2.1.1. Critères d'inclusion dans l'étude 'CIRCE'	65
2.1.2. Critères de non inclusion dans l'étude 'CIRCE'	66
2.1.3. Collecte des données cliniques et biologiques sur CIRCE (voir Annexe 1)	66
2.2. ASPECTS GENERAUX DU PROGRAMME NATIONAL D'EXCELLENCE SPECIALISE (PNES CANCER DU POUMON)	66
2.2.1. Recrutement des patients souffrant de cancer du poumon et la population témoin	66
2.2.2. Données relatives à la consommation de tabac	67
2.2.3. Expositions professionnelles	67
2.2.4. Constitution de la tumorothèque et contrôle qualité	67
2.2.5. Diagnostic histologique	68
2.3. ASPECTS GENERAUX DE L'ÉTUDE D'ÉVALUATION DES RISQUES ENVIRONNEMENTAUX DE POLLUTION DE L'AIR SUR L'ADN CHEZ LES POPULATIONS EXPOSEES DE COTONOU : 'ÉTUDE TAXI-MOTO'	68
2.3.1. Recrutement des conducteurs de taxi-moto et des sujets témoins	68
2.3.1.1. Critères d'inclusion dans l'étude 'taxi-moto'	68
2.3.1.2. Critères d'exclusion dans l'étude 'taxi-moto'	69
2.3.3. Estimation des composés organiques volatils (COVs) chez les conducteurs de taxi-moto	69
2.3.4. Bilan hématologique.....	69
2.4. ÉVALUATION DU NIVEAU PLASMATIQUE DES MARQUEURS METABOLIQUES DU CYCLE DES MONOCARBONES	69
2.4.1. Dosage de l'homocystéine, d'acides méthylmalonique et succinique	69
2.4.2. Dosage simultané de la vitamine B12 et des folates par immuno-compétition : Radio Immuno Assay (RIA)	69
2.5. EXTRACTIONS D'ADN	70
2.5.1. Extraction d'ADN à partir du sang total (Kit BACC3 NUCLEON)	70
2.5.2. Extraction d'ADN de tissu frais ou congelé (Kit Qiagen).....	70
2.6. RÉSULTATS DES DONNÉES PHÉNOTYPIQUES CHEZ LES PATIENTS DES ÉTUDES CIRCE, PNES ET 'TAXI-MOTO'	71
2.6.1. Étude CIRCE : axe carcinome hépatocellulaire (CHC).....	71
2.6.1.1. Caractéristiques phénotypiques chez les patients atteints d'une cirrhose avec CHC, comparées aux patients avec une cirrhose sans CHC.....	71
2.6.1.2. Comparaison du niveau des marqueurs métaboliques du métabolisme des monocarbones chez les cas CHC et témoins cirrhotiques.....	76
2.6.1.3. Répartition des facteurs de risque du carcinome hépatocellulaire suivant le sexe.....	77
2.6.2. Caractéristiques phénotypiques des patients sur l'axe cancer du poumon	78
2.6.2.1. Facteurs démographiques et tabagisme	78
2.6.2.2. Répartition des formes histologiques de cancer du poumon	78
2.6.2.3. Répartition des cancers du poumon et des données cliniques suivant le sexe.....	80
2.6.3. Caractéristiques phénotypiques et métaboliques chez les CTM vs témoins.....	81
2.6.3.1. Données démographiques et métaboliques dans la population cible.....	81
2.6.3.2. Estimation du niveau des composés organiques volatils (COVs) chez les conducteurs de taxi-moto et à quatre carrefours de Cotonou	81

2.6.3.3. Étude comparée des profils hématologiques chez les conducteurs de taxi-moto et témoins non exposés à la pollution de l'air par le benzène (article dans <i>AJEST</i>)	83
2.6.3.4. Synthèse des résultats de l'article parue dans <i>AJEST</i>	83
2.6.4. Discussion des résultats relatifs à la répartition des facteurs phénotypiques sur l'axe carcinome hépatocellulaire et l'axe cancer du poumon.....	85
2.6.4.1. Répartition du carcinome hépatocellulaire suivant le sexe	85
2.6.4.2. Données métaboliques associées au risque du carcinome hépatocellulaire.....	85
2.6.4.3. Répartition des cancers du poumon.....	86
CHAPITRE III : MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE CHROMATOGRAPHIQUE DE DÉTERMINATION SIMULTANÉE DES NIVEAUX DE M⁵DC, DU ET 8-OXODG.....	87
3. MISE AU POINT ET VALIDATION DE LA METHODE DE QUANTIFICATION SIMULTANEE DE M⁵DC, DU, ET 8-OXODG PAR LC-MS/MS (FICHE TECHNIQUE 6)	88
3.1. POURQUOI EVALUER LES CONCENTRATIONS GENOMIQUES DE M ⁵ DC, DU, ET 8-OXODG ?	88
3.2. OBJECTIFS ET INTERETS DU DEVELOPPEMENT DE LA TECHNIQUE DE QUANTIFICATION SIMULTANEE DE M ⁵ DC, DU, ET 8-OXODG	89
3.3. SYSTEMES UPLC ET QTRAP 4000	89
3.3.1. <i>Ionisation en mode Electrospray (ESI)</i>	89
3.4. OPTIMISATION DE LA METHODE D'ANALYSE DE M ⁵ DC, DU ET 8-OXODG	90
3.4.1. <i>Étape d'infusion</i>	90
3.4.2. <i>Étape d'acquisition du signal</i>	91
3.4.3. <i>Étape du FIA (Flow Injection Analysis)</i>	92
3.5. CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES	93
3.5.1. <i>Choix de la colonne et sa température</i>	93
3.5.2. <i>Choix de la phase mobile</i>	93
3.6. LIMITES DE DETECTION, DE QUANTIFICATION ET TEMPS DE RETENTION DES NUCLEOSIDES	94
3.7. CHROMATOGRAMME D'ELUTION DES DIFFERENTS NUCLEOSIDES	96
3.8. TRANSITIONS RETENUES POUR LA QUANTIFICATION DES NUCLEOSIDES ANALYSES	96
3.9. VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE	97
3.9.1. <i>Test de stabilité des nucléosides</i>	97
3.9.2. <i>Linéarité et Sensibilité</i>	98
3.9.3. <i>L'exactitude et la fidélité</i>	98
3.9.4. <i>La répétabilité et la reproductibilité</i>	98
3.10. ÉVALUATION DES NIVEAUX DE M ⁵ DC, DE DU ET DE 8-oxodG SUR LES AXES CHC, CP ET CTM	99
3.10.1. <i>L'axe CHC (carcinome hépatocellulaire)</i>	99
3.10.1.1. Analyse comparée de m ⁵ dC, de dU et de 8-oxodG chez les cas et témoins	99
3.10.1.2. Corrélations entre les marqueurs métaboliques du MMC et les taux de m ⁵ dC, dU et 8-oxodG	99
3.10.2. <i>Évaluation des taux de m⁵dC, dU et de 8-oxodG sur l'axe CP (cas vs. témoins)</i>	102
3.10.2.1. Étude comparée des niveaux de m ⁵ dC, dU et 8-oxodG sur tissu sain et tumoral.....	103
3.10.2.1.1. Niveaux de m ⁵ dC, de dU et 8-oxodG dans la tumeur comparée au tissu sain adjacent.....	103
3.10.2.2. L'histologie influence-t-elle les concentrations de m ⁵ dC, dU et 8-oxodG ?.....	104
3.10.2.2.1. Comparaison des niveaux de m ⁵ dC, dU et 8-oxodG dans le tissu sain en fonction de l'histologie (adénocarcinomes vs. carcinome épidermoïde)	104
3.10.2.2.2. Comparaison des niveaux de m ⁵ dC, dU et 8-oxodG dans la tumeur en fonction de l'histologie: adénocarcinomes vs. carcinomes épidermoïdes.....	104
3.10.2.3. Corrélations entre m ⁵ dC, dU et 8-oxodG dans le tissu sain et la tumeur	105
3.10.3. <i>Évaluation des niveaux de m⁵dC, dU et de 8-oxodG et recherche d'adduits d'ADN chez les conducteurs de taxi-moto exposés à la pollution de l'air</i>	107
3.10.3.1. Évaluation des niveaux de m ⁵ dC, dU et 8-oxodG	107
3.10.3.2 Recherche des adduits d'ADN chez les populations exposées à la pollution de l'air par rapport aux habitants du village (Synthèse article <i>Environ Toxicol.</i>).....	107

3.11. DISCUSSION DES RESULTATS RELATIFS AUX ALTERATIONS GENETIQUES (dU ET 8-OXODG, ADDUITS D'ADN) ET EPIGENETIQUES (m ⁵ DC) DANS LE CHC, LE CP ET SUR L'AXE 'POLLUTION DE L'AIR'	109
3.11.1. Niveaux de m ⁵ dC, dU et 8-oxodG dans le carcinome hépatocellulaire	109
3.11.2. Niveaux de m ⁵ dC, dU et 8-oxodG dans le cancer du poumon.....	110
3.11.3. Corrélations entre m ⁵ dC, dU et 8-oxodG dans le carcinome hépatocellulaire et le cancer du poumon.....	111
3.11.4. Niveaux de m ⁵ dC, dU et 8-oxodG sur l'axe 'pollution de l'air' à Cotonou.....	111
CHAPITRE IV : DÉTERMINANTS GÉNÉTIQUES DU RISQUE DE CARCINOME HÉPATOCELLULAIRE ET DE CANCER DU POUMON.....	112
4. DETERMINANTS GENETIQUES DE LA REPARATION D'ADN ET DU METABOLISME DES MONOCARBONES AVEC LE RISQUE DE CARCINOME HEPATOCELLULAIRE ET DE CANCER DU POUMON	113
4.1. APPROCHE DE SELECTION DES GENES CANDIDATS A LA REPARATION D'ADN	113
4.2. APPROCHE DE SELECTION DES GENES CANDIDATS AU METABOLISME DES MONOCARBONES	113
4.3. APPROCHE UTILISEE DANS LA SELECTION DES SNPs CANDIDATS SUR LES DEUX PLEX (REPARATION D'ADN ET METABOLISME DES MONOCARBONES)	120
4.3.1. Validation in silico des SNPs retenus	120
4.4. LA TECHNOLOGIE DE GENOTYPAGE ILLUMINA® GOLDENGATE® ASSAY®	121
4.4.1. Procédure standard de génotypage avec la technologie GoldenGate®.....	121
4.4.1.1. Biotinylation de l'ADN génomique (étape 1).	122
4.4.1.2. Hybridation des oligonucléotides à l'ADN génomique (étape 2).....	122
4.4.1.3. Extension et ligation des oligonucléotides (étape 3).	122
4.4.1.4. Amplification par PCR (étape 4).....	123
4.4.1.5. Préparation du produit de PCR (étape 5).	123
4.4.1.6. Hybridation Vera Code (étape 6), lavage (étape 7), et lecture (étape 8).....	123
4.4.1.7. Identification des génotypes (étape 9).	124
4.4.1.8. Analyse des clusters des différents SNPs étudiés	124
4.5. VALIDATION DES GENOTYPAGES DE LA PLATEFORME ILLUMINA® PAR SEQUENÇAGE	125
4.5.1. Principe du séquençage	125
4.5.2. Procédure standard de séquençage	125
4.5.2.1. Choix et caractéristiques des amorces	125
4.5.2.2. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	125
4.5.2.3. Purification des produits PCR	126
4.5.2.3.1. Principe	126
4.5.2.3.2. Réaction de séquençage.....	126
4.5.2.3.3. Purification sur plaque G50.....	127
4.6. ANALYSE STATISTIQUE	128
4.7. RÉSULTATS DES DÉTERMINANTS GÉNÉTIQUES DE LA RÉPARATION D'ADN ET DU MÉTABOLISME DES MONOCARBONES AVEC LE RISQUE DU CARCINOME HÉPATOCELLULAIRE ET DE CANCER DU POUMON	129
4.7.1. Déterminants génétiques de la réparation d'ADN associés au risque de carcinome hépatocellulaire	129
4.7.1.1. SNPs de la réparation d'ADN associés au risque de CHC parmi les patients ayant une cirrhose d'étiologie virale.....	129
4.7.1.1.1. SNPs de la réparation d'ADN associés au risque de carcinome hépatocellulaire selon le modèle génétique additif.....	129
4.7.1.1.2. Associations entre SNPs de la réparation d'ADN et risque de carcinome hépatocellulaire chez les patients avec une cirrhose d'étiologie virale.....	133
4.7.1.2. SNPs de la réparation d'ADN associés au risque de CHC parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale.....	136
4.7.1.2.1. SNPs de la réparation d'ADN associés au risque de CHC parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale dans le modèle génétique additif.....	136

4.7.1.2.2. SNPs de la réparation d'ADN associés au risque de CHC chez les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale en analyse de régression logistique.....	139
4.7.2. Déterminants génétiques du métabolisme des monocarbones associés au risque de carcinome hépatocellulaire	140
4.7.2.1. SNPs du métabolisme des monocarbones associés au risque de CHC parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie virale dans le modèle génétique additif	140
4.7.2.2. SNPs du métabolisme des monocarbones associés au risque de carcinome hépatocellulaire chez les patients avec une cirrhose d'étiologie virale (analyse en régression logistique)	143
4.7.2.3. SNPs du métabolisme des monocarbones associés au risque de carcinome hépatocellulaire chez les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale selon le modèle génétique additif	144
4.7.2.4. SNPs du métabolisme des monocarbones associés au risque de carcinome hépatocellulaire parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale (analyse en régression logistique)	147
4.7.2.5. Association entre SNPs du 'cluster' « transport et métabolisme des folates » et risque de carcinome hépatocellulaire.....	148
4.7.2.6. Analyse de l'influence des 3 SNPs de <i>GGH</i> sur les concentrations plasmatiques de folates et d'homocystéine dans le sous-groupe des patients souffrant d'une cirrhose d'étiologie non virale	148
4.7.3. Facteurs phénotypiques associés significativement au risque de carcinome hépatocellulaire	151
4.8. RÉSULTATS DES DÉTERMINANTS GÉNÉTIQUES DE LA RÉPARATION D'ADN ASSOCIÉS AU RISQUE DE CANCER DE POUMON	152
4.8.1. Déterminants génétiques de la réparation d'ADN associés au risque de CP	152
4.8.1.1. Analyse univariée	152
4.8.1.1.1. SNPs associés au risque de cancer du poudon dans le modèle récessif.....	152
4.8.1.1.2. SNPs de la réparation d'ADN associés au risque de cancer bronchique en analyse multivariée	152
4.8.1.1.3. Facteurs phénotypiques associés au risque de cancer du poudon	154
4.10. DISCUSSION DES RESULTATS SUR LE RECHERCHE DES DETERMINANTS GENETIQUES ASSOCIES AU RISQUE DE CARCINOME HEPATOCELLULAIRE ET DE CANCER DU POU MON	155
4.10.1. Polymorphismes de la réparation d'ADN associés au risque de CHC.....	155
4.10.2. Polymorphismes du métabolisme des monocarbones et risque de carcinome hépatocellulaire...	157
4.10.3. Polymorphismes de la réparation d'ADN significativement associés au risque de cancer du poudon	157
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	159
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	162
FICHES TECHNIQUES	187
FICHE TECHNIQUE 1. QUANTIFICATION DE L'Hcy, DE L'ACIDE METHYLMALONIQUE ET SUCCINIQUE PAR LC-MS/MS	188
FICHE TECHNIQUE 2. DOSAGE QUANTITATIF ET SIMULTANE DE LA VITAMINE B ₁₂ ET DES FOLATES	191
FICHE TECHNIQUE 3. MICRODISSECTION DE LA TUMEUR AU CRYOSTAT ET COLORATION DES LAMES	195
FICHE TECHNIQUE 4. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE DU SANG AVEC LE KIT BACC NUCLEON®	196
FICHE TECHNIQUE 5. PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN A PARTIR DE TISSUS FRAIS OU CONGELES	197
FICHE TECHNIQUE 6 DETERMINATION SIMULTANEE DU NIVEAU GLOBAL DE M ⁵ dC, DE L'URACILE ET DE LA 8-oxodG DANS L'ADN GENOMIQUE PAR LC-MS/MS	200
FICHE TECHNIQUE 7. GENOTYPAGE AVEC LA TECHNOLOGIE GOLDENGATE	204
FICHE TECHNIQUE 8. PURIFICATION DES PRODUITS PCR	214
FICHE TECHNIQUE 9. REACTION DE SEQUENÇAGE	215
FICHE TECHNIQUE 10. PREPARATION DE LA PLAQUE G 50	216
LISTE DES PUBLICATIONS	217
PUBLICATIONS.....	218

LISTE DES FIGURES

Figure I.1. Lésions d'ADN associées à l'exposition aux carcinogènes environnementaux et mécanismes de réparation mis en jeu (Hoeijmakers 2001).	7
Figure I.2. Structures de quelques lésions oxydatives des bases d'ADN (Evans et al. 2004)	9
Figure I.3. Mécanisme de la réparation par excision de bases (Pourquier 2006)	13
Figure I.4. Potentiel mutagène de quelques bases modifiées d'ADN (Wilson and Bohr 2007)	14
Figure I.5. Sources d'uracile dans l'ADN et mécanismes de réparation mis en jeu (Kavli <i>et al.</i> 2007).....	15
Figure I.6. Interconversion des nucléotides pyrimidiques (Olinski <i>et al.</i> 2010).....	16
Figure I.7. Formation de la 8-oxodG par action du radical hydroxyle sur la guanine	19
Figure I.8 : Cassures double brin d'ADN, activation d'ATM et voies de signalisation activées (van den Bosch et al. 2003).....	22
Figure I.9. Mécanisme de réparation des cassures double brin d'ADN (Pourquier 2006).....	24
Figure I.10. Mécanisme de réparation des lésions d'ADN par excision de nucléotides (Pourquier 2006).....	26
Figure I.11. Mécanisme de réparation des mésappariements d'ADN (adapté selon Stojic <i>et al.</i> 2004).....	29
Figure I.12. Cycle du métabolisme des monocarbones et sa relation avec la carcinogenèse	30
Figure I.13. Structure des différents dérivés du THF	31
Figure I.14. Absorption intestinale des folates alimentaires (Zhao, R. <i>et al.</i> 2009)	33
Figure I.15. Structure de la cobalamine avec ses principales formes	35
Figure I.16. Métabolisme et causes du déficit en cobalamine (Chanarin and Metz 1997)	37
Figure I.17. Reméthylation de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthase	39
Figure I.18. Métabolisme intracellulaire des cobalamines et voies interconnectées (Carrillo-Carrasco <i>et al.</i> 2012)	39
Figure I. 19. Réaction de la méthylation de la cytosine par les ADN méthyltransférase (DNMTs).....	41
Figure I.20. Modifications épigénétiques pendant le développement	42
Figure I.21. Taux d'incidence et mortalité liés au carcinome hépatocellulaire ajustés sur l'âge dans le monde en 2008/100.000 habitants (d'après Ferlay <i>et al.</i> 2010).....	47
Figure I.22. Taux d'incidence et mortalité liés au cancer du poumon ajustés sur l'âge dans le monde en 2008/100.000 habitants (d'après Ferlay et al. 2010).....	54
Figure III.1. Réaction de conversion de dUMP en dTMP	88
Figure III.2. Ionisation par <i>Electrospray</i>	90
Figure III.3. Ions fragments majoritaires obtenus après l'infusion des sept nucléosides	92
Figure III.4. Chromatogramme montrant le profil d'élution des nucléosides	96
Figure III.5. Autoradiographie des profils d'adduits d'ADN dans la population cible (marquage au ³² P)	108
Figure IV.1. Technologie de génotypage GoldenGate® (Adapté de Fan et al., 2006).....	121
Figure IV.2. Représentation polaire et cartésienne des clusters (SNP d'ATM rs228599)	124

Figure IV.3. TagSNPs sur le gène <i>BRIP1</i> (Source : http://snpinfo.niehs.nih.gov/cgi-bin/snpinfo/snptag.cgi)	130
Figure IV.4. Risque de carcinome hépatocellulaire associés aux allèles variants des six SNPs identifiés sur le gène <i>BRIP1</i>	135
Figure IV.5. Tag SNPs sur le gène <i>POLL</i> (source : http://snpinfo.niehs.nih.gov/cgi-bin/snpinfo/snptag.cgi)	152

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1. Spécificité des enzymes impliquées dans la réparation des résidus d'uracile	17
Tableau I.2. Besoin en folates suivant l'âge et le sexe.....	32
Tableau I.3. Besoin en vitamine B12 suivant l'âge et le sexe	36
Tableau II.1. Caractéristiques des 489 sujets inclus dans l'étude CHC	71
Tableau II. 2. Comparaison des cas (cirrhose avec carcinome hépatocellulaire) et des témoins (cirrhose sans carcinome hépatocellulaire) parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie virale	74
Tableau II.3. Comparaison des cas (cirrhose avec carcinome hépatocellulaire) et des témoins (cirrhose sans carcinome hépatocellulaire) parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale.....	75
Tableau II.4. Comparaison des niveaux des marqueurs métaboliques du cycle des monocarbones chez les cas (cirrhose avec carcinome hépatocellulaire) et des témoins (cirrhose sans carcinome hépatocellulaire)	76
Tableau II.5. Comparaison des facteurs de risque du carcinome hépatocellulaire en fonction du sexe.....	77
Tableau II.6. Comparaison des données démographiques chez les témoins (patients sans CP) et cas (patients souffrant d'un CP).....	78
Tableau II.7. Caractéristiques cliniques et répartition des formes histologiques chez les 382 cas de patients souffrant de cancer du poumon.....	79
Tableau II.8. Répartition des données démographiques, cliniques, et histologiques en suivant le sexe chez les patients souffrant de cancer du poumon	80
Tableau II.9. Caractéristiques démographiques et métaboliques des conducteurs de taxi-moto (sujets exposés à la pollution de l'air) et témoins (sujets non exposés).....	81
Tableau II.10. Concentrations des composés organiques volatils chez les conducteurs de taxi-moto et au niveau de quatre grands carrefours de Cotonou.....	82
Tableau II.11. Comparaison des profils hématologiques des conducteurs de taxi-moto à ceux des habitants du village non exposé (témoins)	83
Tableau III. 1. Détails du gradient utilisé lors de la mise au point.....	94
Tableau III.2. Transitions, temps de rétention, limites de détection et de quantification des différents analytes.....	95
Tableau III.3. Niveaux de m ⁵ dC, de dU et de 8-oxodG chez les cas (Cirrhose avec CHC) comparés aux témoins (Cirrhose sans CHC)	99
Tableau III.4. Coefficients de corrélations de Spearman entre les acteurs du cycle des monocarbones et les concentrations de m ⁵ dC, dU et 8-oxodG chez les cas (cirrhose avec CHC) et témoins (cirrhose sans CHC)	101
Tableau III.5. Comparaison des niveaux de m ⁵ dC, de dU et de 8-oxodG chez les patients souffrant de cancer du poumon (cas) et chez les témoins (patients sans CP)	102

Tableau III.6. Comparaison des niveaux de m ⁵ dC, de dU et 8-oxodG dans la tumeur et dans le tissu sain adjacent	103
Tableau III.7. Comparaison des niveaux de m ⁵ dC, de dU et 8-oxodG dans le tissu sain suivant l'histologie (carcinomes épidermoïdes vs. adénocarcinomes)	104
Tableau III.8. Évaluation des niveaux de m ⁵ dC, de dU et 8-oxodG dans la tumeur (carcinomes épidermoïdes vs. adénocarcinomes)	105
Tableau III.9. Coefficients de corrélations de Spearman entre le tabagisme et les niveaux de m ⁵ dC, dU et de 8-oxodG dans le tissu sain	106
Tableau III.10. Coefficients de corrélations de Spearman entre le tabagisme et les niveaux de m ⁵ dC, dU et de 8-oxodG dans la tumeur	106
Tableau III.11. Comparaison des niveaux de m ⁵ dC, dU et 8-oxodG chez les conducteurs de taxi-moto comparés aux témoins du village	107
Tableau IV.1. Gènes candidats à la réparation d'ADN	114
Tableau IV.2. Liste des gènes candidats au métabolisme des monocarbones	117
Tableau IV.3. Fluorochromes spécifiques aux ddNTP	127
Tableau IV.4. SNPs de la réparation d'ADN significativement associés au risque de CHC chez les patients ayant une cirrhose d'étiologie virale selon le modèle génétique additif (83 témoins et 54 cas)	131
Tableau IV.5. Contrôles qualités et caractéristiques des SNPs de la réparation d'ADN significativement associés au CHC chez les patients avec une cirrhose d'étiologie virale (modèle génétique additif ^a)	132
Tableau IV.6. Association entre les SNPs de <i>BRIP1</i> et le risque de carcinome hépatocellulaire parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie virale selon le modèle génétique additif ^a (83 témoins et 54 cas)	134
Tableau IV.7. SNPs de la réparation d'ADN significativement associés au risque de carcinome hépatocellulaire chez les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale selon le modèle génétique additif (238 témoins et 109 cas)	137
Tableau IV.8. Contrôles qualités et caractéristiques des SNPs de la réparation d'ADN significativement associés au CHC chez les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale selon le modèle génétique additif	138
Tableau IV.9. Association entre les SNPs de <i>CHK2</i> , <i>BRCA2</i> , <i>EME1</i> , <i>EPHX1</i> , <i>ERCC5</i> et <i>NTHL1</i> avec le risque de carcinome hépatocellulaire parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale selon le modèle génétique additif ^a	139
Tableau IV.10. SNPs du métabolisme des monocarbones significativement associés au risque de CHC chez les patients avec une cirrhose d'étiologie virale selon le modèle génétique additif (83 témoins et 54 cas)	141
Tableau IV.11. Contrôles qualités et caractéristiques des SNPs du métabolisme des monocarbones significativement associés au CHC chez les patients avec une cirrhose d'étiologie virale (modèle additif)	142

Tableau IV.12. Association entre les SNPs d' <i>ALDH1L1</i> , <i>CTH</i> , <i>CUBN</i> , <i>TCN2</i> avec le risque de carcinome hépatocellulaire parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie virale selon le modèle génétique additif ^a	143
Tableau IV.13. SNPs du métabolisme des monocarbones significativement associés au risque de CHC chez les patients souffrant d'une cirrhose d'étiologie non virale selon le modèle additif (238 témoins et 109 cas).....	145
Tableau IV.14. Contrôles qualités et caractéristiques des SNPs du métabolisme des monocarbones significativement associés au CHC chez les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale (modèle additif).....	146
Tableau IV.15. Association entre les SNPs de <i>GGH</i> , <i>DMGDH</i> , et <i>FOLH1</i> avec le risque de carcinome hépatocellulaire parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale selon le modèle génétique additif ^a	147
Tableau IV.16. SNPs du cluster « transport et métabolisme des monocarbones » associés au risque de carcinome hépatocellulaire dans le sous-groupe des patients souffrant d'une cirrhose d'étiologie non virale (238 témoins et 109 cas).....	149
Tableau IV.17. Analyse de l'influence des 3 SNPs de <i>GGH</i> sur les concentrations plasmatiques de folates dans le sous-groupe des patients souffrant d'une cirrhose d'étiologie non virale.....	149
Tableau IV.18. Analyse de l'influence des 3 SNPs de <i>GGH</i> sur les concentrations plasmatiques d'homocystéine dans le sous-groupe des patients souffrant d'une cirrhose d'étiologie non virale	150
Tableau IV. 19. Facteurs phénotypiques indépendamment associés au risque de carcinome hépatocellulaire chez les patients avec une cirrhose d'étiologie virale et non virale.....	151
Tableau IV.20. SNPs de la réparation d'ADN significativement associés au risque de cancer du poumon selon le modèle génétique récessif ^a	153
Tableau IV.21. Contrôles qualités et caractéristiques des SNPs de la réparation d'ADN associés au risque de cancer du poumon selon le modèle génétique récessif ^a	153
Tableau IV.22. Association entre le polymorphisme <i>POLL</i> rs3730477, l'âge et le tabagisme avec le risque de cancer du poumon selon le modèle génétique récessif ^a	154
Tableau IV.23. Facteurs phénotypiques associés au risque de cancer du poumon	154

RÉSUMÉ

Mondialement, le carcinome hépatocellulaire (CHC) et le cancer du poumon (CP) constituent un problème majeur de santé publique.

Plusieurs études d'association gène candidat ont montré que les SNPs de gènes candidats à la réparation d'ADN et au métabolisme des monocarbones (MMC) influencent le risque de CHC et CP. Toutefois, aucune étude n'a évalué, de façon exhaustive, l'influence des SNPs de la réparation d'ADN ou du MMC avec le risque de CP ou de CHC.

Notre étude vise à identifier — à l'aide de deux *SNP-array* de 384 SNPs — les polymorphismes génétiques de la réparation d'ADN et du MMC qui sont prédictifs du risque de CHC chez des Caucasiens cirrhotiques. Nous avons aussi recherché les déterminants génétiques de la réparation d'ADN associés au risque de CP.

Nos résultats ont montré que six SNPs du gène *BRIP1* (*BRC A1 interacting protein C-terminal helicase*; rs4986763, rs4986764, rs1557720, rs4986765, rs2191248, et rs11871785) étaient significativement associés au risque de CHC chez les patients porteurs d'une cirrhose d'étiologie virale selon le modèle génétique additif. Après correction de 'False Discovery Rate', *BRIP1* rs4986764 et rs1557720 étaient significativement associés au risque de CHC.

Deux SNPs du MMC situés sur *GGH* (rs11545076 et rs11545077) étaient significativement associés au risque de CHC chez les patients porteurs d'une cirrhose d'étiologie non virale. Par ailleurs, seul le polymorphisme *POLL* rs3730477 était associé à un risque accru de CP dans le modèle génétique récessif.

La dernière partie de notre étude était consacrée à l'analyse comparée d'hémogrammes et des dommages d'ADN chez des conducteurs de taxi-moto (CTM) de Cotonou — exposés à l'air pollué par le benzène et les HAPs —, et les témoins non exposés.

Nos résultats ont montré une réduction significative du nombre des globules blancs, lymphocytes, neutrophiles et plaquettes, avec une misincorporation accrue d'uracile, de 8-oxodG et la présence d'un adduit majeur d'ADN chez les CTM par rapport aux témoins.

En conclusion, nous avons identifié six variants sur *BRIP1* et deux variants sur *GGH* associés au risque de CHC sur une cirrhose d'étiologie virale et non virale, respectivement. De plus, nous avons montré que *POLL* rs3730477 est un prédicteur significatif du risque de cancer du poumon.

Une validation de ces résultats dans des cohortes indépendantes s'avère indispensable.

Mots clés : *BRIP1*, carcinome hépatocellulaire, cancer du poumon, *GGH*, métabolisme des monocarbones, *POLL*, réparation d'ADN, SNPs

SUMMARY

Worldwide, hepatocellular carcinoma (HCC) and lung cancer (LC) represent a major public health problem.

Previous studies reported associations between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in DNA repair or monocarbon metabolism (MCM) genes and LC or HCC risk. However, influences of these SNPs on LC or HCC risk have not been comprehensively evaluated.

Our study aimed to identify potential interesting DNA repair and MCM gene variants associated with HCC risk in cirrhotic Caucasians. To this end, we used the Illumina's GoldenGate® technology and performed a comprehensive investigation of 384 SNPs on 94 DNA repair genes and 384 SNPs on 77 MCM genes. This comprehensive SNP–array fine mapping approach was also used to identify potential interesting DNA repair gene variants associated with susceptibility to LC in Caucasians.

Our results showed that six variants on *BRIP1* gene (*BRC A1 interacting protein C-terminal helicase*: rs4986763, rs4986764, rs1557720, rs4986765, rs2191248, and rs11871785) were significantly associated with HCC risk in patients carrying hepatitis virus-associated cirrhosis under an additive genetic model. After false discovery rate (FDR) correction for multiple testing, *BRIP1* rs4986764 and rs1557720 displayed statistically significant associations with HCC risk. Two SNPs on *GGH* gene were associated with HCC risk in patients carrying non-viral cirrhosis.

In our study, only *POLL* rs3730477 was associated with an increased LC risk under a recessive genetic model (OR=2.81, 95% CI 1.51–5.24).

Lastly, we evaluated hematologic changes and levels of DNA adducts, 8–oxodG, dU, and m⁵dC in Cotonou's motorbike taxi drivers (MBTD) — exposed to air pollution by benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) — compared to unexposed controls. Compared to controls, MBTD displayed a significant decrease in the number of white blood cells, lymphocytes, neutrophils and platelets, with the formation of an unknown DNA adduct, whereas uracil misincorporation and 8–oxodG levels in DNA were significantly increased.

In conclusion, we identified six variants on *BRIP1* gene and two variants on *GGH* gene that are associated with susceptibility to HCC. In addition, *POLL* rs3730477 variant was associated with susceptibility to LC. Replication of these findings in independent cohorts is warranted.

Key words: *BRIP1*, DNA repair, *GGH*, hepatocellular carcinoma, Lung cancer, monocarbon metabolism, *POLL*, SNPs

INTRODUCTION

L'intégrité de l'ADN (ou acide désoxyribonucléique) est constamment menacée par un large spectre de facteurs tels que : (1) les génotoxiques environnementaux (fumée de tabac, agents alkylants, radiations UV, rayonnements ionisant X ou gamma, amiante, agents mutagènes, etc.), (2) les molécules endogènes dérivant du métabolisme cellulaire ou espèces réactives de l'oxygène (ERO), (3) les carences en micronutriments dans la cellule, notamment en vitamine B9 ou folates et vitamine B12 ainsi que (4) les modifications épigénétiques telles que la méthylation des cytosines d'ADN et l'acétylation des histones.

Les gènes du métabolisme des carcinogènes environnementaux participent à la formation d'une variété de métabolites réactifs susceptibles d'attaquer les macromolécules biologiques, comme l'ADN, pour produire une variété de lésions oxydatives potentiellement impliquées dans la carcinogenèse (Tudek *et al.* 2010, Wen *et al.* 2011). Par exemple, l'une des lésions oxydatives la plus étudiée dans la littérature est la 8-oxo-7,8-dihydro-2-désoxyguanosine (8-oxodG).

Les folates participent au maintien de la stabilité de l'ADN via deux mécanismes distincts : (1) sous la forme de 5,10-méthylène tétrahydrofolate, les folates constituent des donneurs de groupements méthyles qui servent à la conversion de l'uracile en thymine, indispensable à la synthèse et à la réparation de l'ADN, et (2) les groupements méthyles servent aussi pour la reméthylation de l'homocystéine (Hcy) en méthionine, laquelle transformée en S-adenosylméthionine (SAM) sert à la méthylation des cytosines de l'ADN.

Plusieurs données de la littérature ont montré qu'une carence en folates entraîne un défaut de méthylation d'ADN (hypométhylation), favorisant ainsi une activation des proto-oncogènes et donc une instabilité génomique avec une misincorporation accrue d'uracile dans l'ADN (Duthie *et al.* 2004).

La réparation des lésions d'ADN constitue un processus fondamental pour le maintien de la stabilité génomique. Les cellules eucaryotes disposent de plusieurs systèmes de réparation d'ADN qui permettent de réduire la fréquence des mutations. Une accumulation de lésions dans la cellule ou une réparation inefficace de celles-ci peuvent conduire à une instabilité génétique, notamment (1) des cassures de brins d'ADN, simple brin ou double, (2) des mésappariements de bases, (3) la formation d'adduits, et (4) d'anomalies chromosomiques qui sont potentiellement en lien avec la carcinogenèse (Halliwell 2000).

Par ailleurs, plusieurs études d'association gène candidat (Park, S. W. *et al.* 2003 ; Saffroy *et al.* 2004 ; Kato *et al.* 2005 ; Di Benedetto *et al.* 2006 ; Fabris *et al.* 2009) et les études d'association pangénomique (GWAS pour '*genome wide association studies*') (Casper *et al.* 2011 ; Chan *et al.* 2011 ; Kumar, V. *et al.* 2011 ; Zhang, H., Zhai *et al.* 2010) ont montré que les polymorphismes nucléotidiques simples (SNPs) de plusieurs gènes – assurant des fonctions cellulaires variées –

étaient associés à la susceptibilité au carcinome hépatocellulaire (CHC). Par exemple, il est documenté une association entre les SNPs des gènes candidats à la réparation d'ADN ou du métabolisme des monocarbones (MMC) avec le risque du CHC ou de cancer du poumon (CP) (Campayo *et al.* 2011 ; Jin, G. *et al.* 2010 ; Zhang, M., Hu *et al.* 2010 ; Yin, J. *et al.* 2009).

Toutefois, l'analyse des données de la littérature montre que la plupart des études d'association ont examiné l'influence de quelques polymorphismes des gènes de la réparation d'ADN ou du MMC sur le risque de CHC ou de CP et ont rapportés des résultats discordants.

Cette thèse s'organise autour de trois axes de recherche et a pour objectifs de :

- (1) rechercher, par une approche gène candidat, — approche consistant à sélectionner un ou plusieurs gènes sur la base de leurs fonctions connues —, les déterminants génétiques de la réparation d'ADN et du MMC qui sont associés à la susceptibilité au CHC chez des Caucasiens cirrhotiques,
- (2) rechercher les déterminants génétiques de la réparation d'ADN associés au risque de cancer du poumon,
- (3) d'analyser la génotoxicité des polluants de l'air, en évaluant les dommages d'ADN tels que les adduits d'ADN, les niveaux de 8-oxodG et dU, méthylation globale d'ADN chez des conducteurs de taxi-moto (CTM) de Cotonou — exposés à une pollution de l'air par l' benzène et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) —, comparés aux habitants d'une zone rurale non affectée par la pollution de l'air.

Ce manuscrit s'organise en quatre chapitres.

Le premier chapitre comporte la revue de littérature, qui est subdivisée en trois parties :

- (1) la première partie présente une revue générale des lésions d'ADN, avec un accent particulier sur les microlésions d'uracile et de la 8-oxodG, et une description des différents systèmes impliqués dans la réparation de l'ADN ;
- (2) la seconde partie présente le rôle des acteurs majeurs du métabolisme des monocarbones (folates, vitamine B12), leur importance dans le maintien de la stabilité génomique, et en particulier les conséquences associées à une carence en donneur de groupements méthyles sur le niveau des altérations génétiques et épigénétiques d'ADN.
- (3) la troisième partie, subdivisée en deux, fait, dans un premier temps, le point sur l'épidémiologie du CHC, les facteurs aggravant le risque de CHC, les polymorphismes SNPs au sein des gènes de la réparation d'ADN et du MMC indépendamment associés au risque de CHC dans les études d'association gènes candidats. Elle présente, dans un second temps,

l'épidémiologie du cancer de poumon (CP), les facteurs aggravant le risque de CP et les polymorphismes SNPs de la réparation d'ADN indépendamment associés au risque de CP.

Sont présentés à la fin de ce premier chapitre les objectifs détaillés de notre étude.

Le deuxième chapitre décrit les populations cibles (CHC, CP et CTM de Cotonou), les méthodes utilisées pour les dosages des marqueurs métaboliques du cycle des monocarbones. Les détails sur les méthodes sont présentés sous forme de fiches techniques à la fin du manuscrit.

Les résultats sont présentés avec une discussion.

Le troisième chapitre présente une démarche méthodologique de mise au point d'une technique chromatographique de détermination simultanée du niveau global de méthylation d'ADN (m^5dC), de misincorporation d'uracile ainsi que la 8-oxodG dans l'ADN. Cette méthode a été utilisée pour évaluer le niveau de m^5dC , dU et 8-oxodG chez les populations cibles de notre étude. Les résultats obtenus sur chacun des trois axes de recherche sont présentés avec une discussion.

Le quatrième chapitre décrit une technique de génotypage à haut débit avec un degré de multiplexage inégalé : la technologie GoldenGate® Illumina®. Sont présentés ici, la démarche de sélection des gènes et SNPs candidats examinés, les résultats obtenus sur l'axe CHC et l'axe CP, avec une discussion générale et enfin une conclusion générale et les perspectives.

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Altérations génétiques et systèmes de réparation d'ADN

1.1. Principales sources de formation de lésions d'ADN

La diversité des lésions observées dans l'ADN résulte de l'attaque de celui-ci par trois principaux facteurs :

(1) on peut citer les carcinogènes environnementaux (benzène, particules fines de l'air, les HAPs, etc.), les rayons ultraviolet (UV) composant la lumière du soleil, les rayonnements ionisants ainsi que de nombreux produits polluants génotoxiques. Plusieurs études ont montré que l'exposition à ces composés était associée à une augmentation des taux de cassures de brin d'ADN, de modifications de bases (Avogbe *et al.* 2005) et une formation d'adduits d'ADN (Ayi-Fanou *et al.* 2011), qui sont source de mutations dans l'ADN, lorsqu'ils ne sont pas réparés efficacement.

(2) Les sous-produits du métabolisme cellulaire constituent une deuxième catégorie de facteurs menaçant l'intégrité de l'ADN. Ils regroupent les espèces réactives (radicalaires) de l'oxygène (ERO) provenant de la respiration et de la peroxydation lipidique. On peut citer les anions super oxydes, radicaux hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène.

(3) Enfin, certaines liaisons chimiques d'ADN ont tendance à se désintégrer spontanément dans des conditions physiologiques générant ainsi la formation de sites abasiques. Par exemple, une désamination spontanée ou induite de la cytosine, l'adénine, la guanine et la 5-méthylcytosine convertit ces bases en uracile, l'hypoxanthine, la xanthine et la thymine, respectivement (Lindahl 1993).

La **Figure I.1** résume quelques lésions fréquemment retrouvées dans l'ADN, les sources de leurs formations ainsi que les systèmes de réparation mis en jeu.

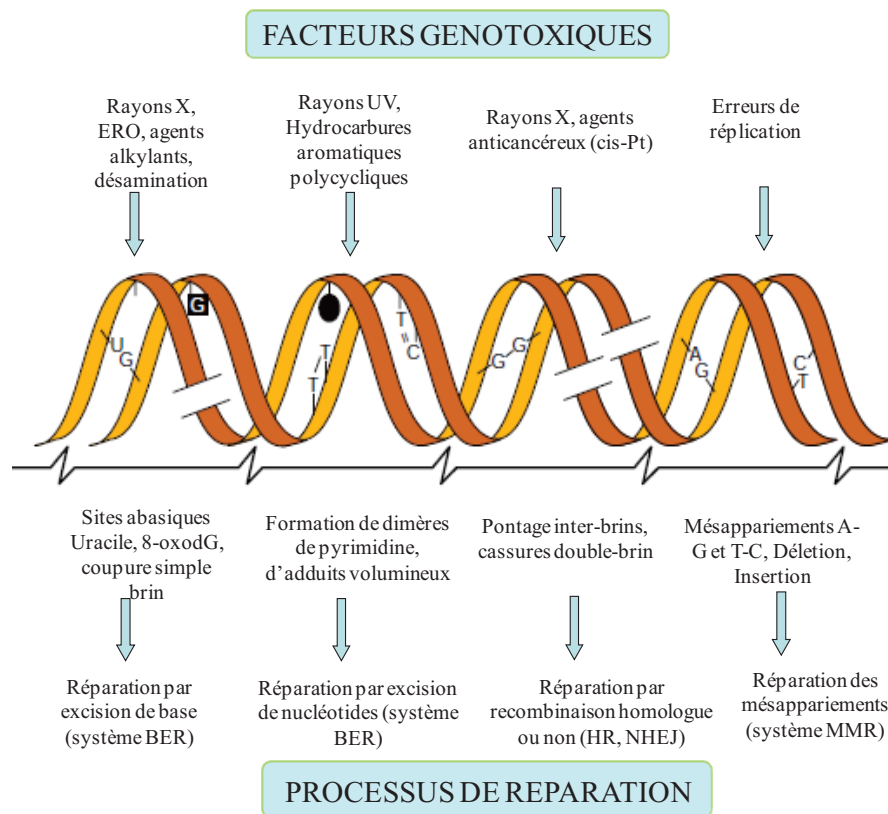


Figure I.1. Lésions d'ADN associées à l'exposition aux carcinogènes environnementaux et mécanismes de réparation mis en jeu (Hoeijmakers 2001).

1.1.1. Formation des espèces réactives (radicalaires) de l'oxygène et stress oxydatif

Dans les conditions physiologiques normales, il y a un équilibre entre les oxydants endogènes et les antioxydants (systèmes de défense enzymatique et non enzymatiques).

Le stress oxydatif se définit par un déséquilibre entre la production d'espèces radicalaires de l'oxygène (EROs ou oxydant) et leur élimination de la cellule par les systèmes antioxydants (Durackova, 2010).

La formation ou l'induction des EROs résulte de plusieurs sources :

- (1) Complexe enzymatique de la chaîne respiratoire mitochondriale : production de radicaux super oxydes $O_2^{\cdot -}$ via une activité NAD(P)H oxydase membranaire,
- (2) Processus inflammatoire, notamment par l'intermédiaire de cellules phagocytaires qui sont le siège d'une activation du complexe NADPH oxydase, enzyme capable de produire de grandes quantités d'anion super oxyde à partir de l'oxygène moléculaire,
- (3) Expositions environnementales aux hydrocarbures aromatiques polycycliques, les métaux, les rayonnements ionisants et les fibres d'amiante.

Le radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$ est l'oxydant le plus puissant des EROs. Le radical super oxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ représente une autre ERO qui possède une plus faible réactivité vis-à-vis des substrats bio-organiques.

La production d'EROs peut, dans certaines situations pathologiques (comme le cancer), être importante et prolongée. Dans ce cas, la réponse antioxydant est inefficace pour corriger le déséquilibre.

Les EROs sont capables de générer de nombreux dommages oxydatifs au niveau de diverses macromolécules : lipides, protéines, et acides nucléiques. Plusieurs arguments militent en faveur de l'implication des EROs dans plusieurs processus pathologiques, tels que la carcinogenèse, l'inflammation, le vieillissement et l'auto-immunité (Durackova, 2010).

On distingue au moins cinq classes de dommages oxydatifs d'ADN : (1) les bases oxydées, (2) les sites abasiques, formés par rupture de la liaison entre le désoxyribose et la base, (3) les pontages intra-brins, (4) les cassures de brins, et (5) les pontages ADN-protéines.

1.1.1.1. Lésions oxydatives

Les réactions principales sont l'addition du radical $\text{HO}\cdot$ sur la double liaison des bases en position C5 et C6 des bases pyrimidiques (cytosine, thymine) et C4 et C8 des bases puriques (adénine, guanine) (80 %). L'attaque de l'ADN par les EROs entraîne la formation d'une diversité de lésions, dont seulement une vingtaine de bases modifiées ont été mises en évidence (**Figure I.2**). Beaucoup de bases modifiées sont instables et se décomposent spontanément en produits plus stables.

La guanine est l'une des cibles préférentielle des EROs dans l'ADN. Par exemple, il a été estimé qu'en moyenne 300 à 1 000 lésions oxydatives de la guanine survenaient chaque jour dans une cellule humaine normale (Loft and Poulsen 1996).

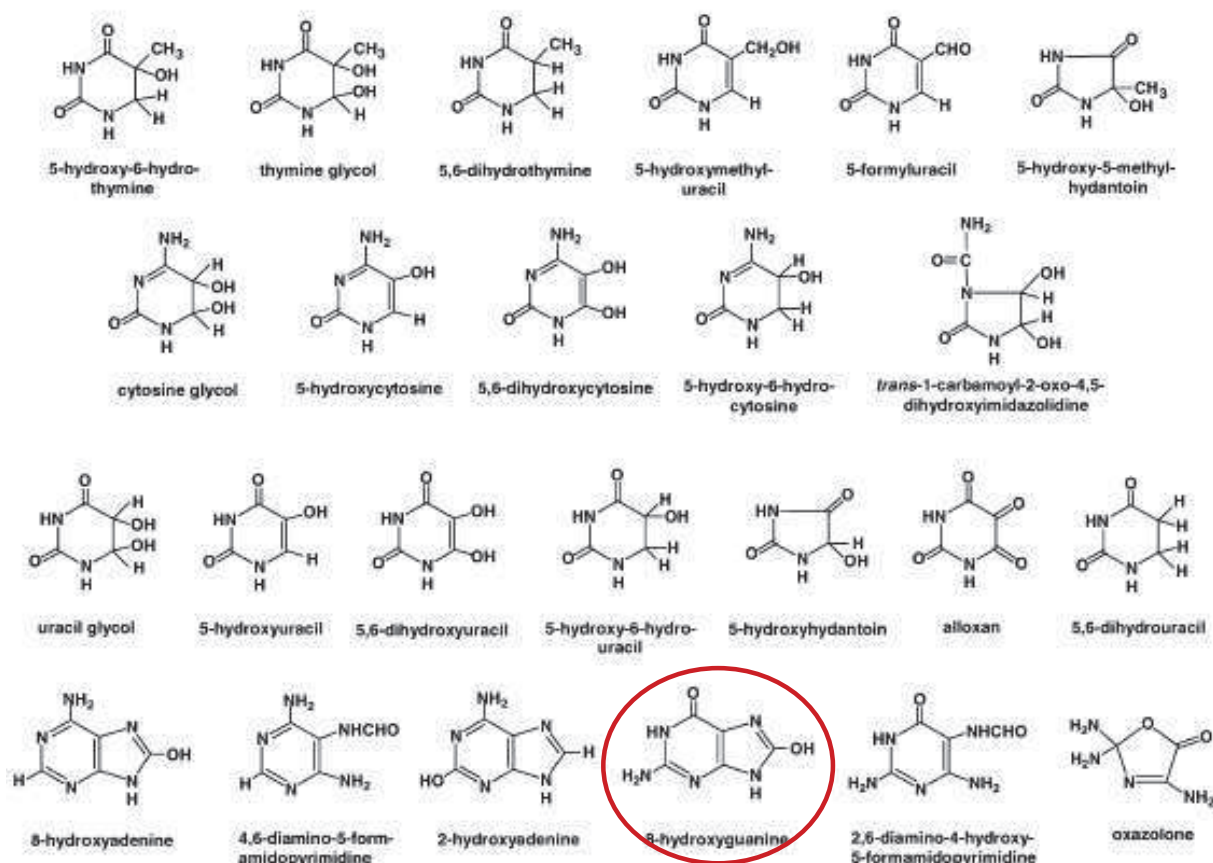


Figure I.2. Structures de quelques lésions oxydatives des bases d'ADN (Evans et al. 2004)

La plupart de ces lésions d'ADN ne sont pas quantifiables en raison de leur caractère instable. La lésion oxydative la plus fréquemment examinée en lien avec la carcinogenèse est celle de la *8-oxo-7,8-dihydro-2-désoxyguanosine* (8-oxodG) qui est entourée en rouge sur la figure I.2.

1.1.1.2. Sites abasiques de l'ADN

Estimées à plus de 10.000 par jour et par cellule humaine (Lindahl 1993), les sites abasiques dérivent essentiellement de l'action des produits ou sous-produits du métabolisme cellulaire. Les sites abasiques sont formés soit par action des ADN glycosylases pendant la réparation de l'ADN, soit par rupture spontanée de la liaison glycosidique entre la base et le désoxyribose (Scharer and Jiricny 2001).

Ces sites abasiques sont très labiles et conduisent le plus souvent à des cassures simple brin d'ADN dont la persistance peut entraîner la formation de lésions irréversibles conduisant à la mort cellulaire (Friedberg 2003).

1.2. Différents systèmes de réparation de l'ADN

Les cellules disposent de plusieurs systèmes de réparation qui permettent d'éviter une accumulation des lésions dans l'ADN. En effet, en réponse à la formation des lésions, et suivant leurs natures, plusieurs protéines sont activées dans la cellule et induisent une cascade de signalisation entraînant par exemple l'activation des systèmes de la réparation de l'ADN, l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire ainsi que l'apoptose. La réparation de l'ADN comprend un ensemble de processus mis en œuvre par une cellule pour identifier et corriger les dommages d'ADN génomique.

Il existe cinq grands systèmes de réparation des lésions d'ADN (Fortini *et al.* 2003) :

- (1) la réparation directe (*MGMT : O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*),
- (2) la réparation par excision de base (*BER : base excision repair*) ciblant les lésions oxydatives les déaminations, l'hydroxylation et les cassures simple brins,
- (3) réparation par excision de nucléotides (*NER : nucleotide excision repair*), corrigeant une variété de lésions dont les dimères de pyrimidines,
- (4) réparation des cassures double brin (*DSBR : double strand break repair*) faisant intervenir deux mécanismes : la recombinaison homologue (RH) et recombinaison non-homologue (*NHEJ : non homologous end joining*),
- (5) la réparation des mésappariements de bases (*MMR*) quant à elle assure la correction des erreurs d'appariement par l'ADN polymérase pendant la réplication de l'ADN.

1.2.1. Le système de réparation par excision de bases (BER)

Cette voie de la réparation d'ADN existe aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Ce système prend en charge la réparation des microlésions oxydatives issues principalement du métabolisme cellulaire : les sites abasiques, les bases modifiées provenant de l'attaque de l'ADN par les EROs (processus d'oxydation), les bases alkylées ainsi que l'uracile. Outre ces lésions, le système BER est capable de réparer les cassures d'ADN simple brin induites par les rayonnements ionisants (Whitehouse *et al.* 2001).

Le système BER joue un rôle majeur dans la mutagenèse et la carcinogenèse (Lu, A. L. *et al.* 2001).

Les altérations prises en charge par le système BER modifient la structure chimique de l'ADN, mais n'altèrent pas sa structure tridimensionnelle.

Le système BER fait intervenir plusieurs enzymes qui sont principalement impliquées dans la reconnaissance, l'excision et la resynthèse de l'ADN.

1.2.1.1. Reconnaissance de la lésion

La reconnaissance de la base modifiée se fait grâce à une ADN-glycosylase. Après sa fixation sur la base lésée, l'ADN-glycosylase coupe la lésion N-glycosidique qui relie la base au sucre, générant ainsi un site abasique.

La cellule eucaryote dispose de plusieurs ADN N-glycosylases avec une spécificité variable suivant la nature de modifications. Contrairement aux modifications de bases, où une ADN- N-glycosylase reconnaît la lésion, la reconnaissance des cassures simple brin d'ADN est induite par *X-ray repair complementing defective repair 1* (XRCC1, protéine d'échafaudage assurant probablement l'échange des différents facteurs du BER) et par la *poly(ADP) ribosyl polymerase 1* (PARP1). Le recrutement de la polynucléotide kinase permet ensuite la phosphorylation l'extrémité 5' et la déphosphorylation l'extrémité 3' au niveau de l'interruption, permettant ainsi une nouvelle synthèse de brin (Sobol *et al.* 1996).

1.2.1.2. Incision du brin d'ADN

Après la formation du site abasique par l'ADN N-Glycosylase, une incision dans le brin d'ADN est nécessaire pour permettre la resynthèse de la base éliminée.

Elle peut être réalisée suivant deux mécanismes distincts : l'incision par les endonucléases apuriniques (APEX) et l'incision par les ADN glycosylases AP lyase.

a) Incision par les endonucléases apuriniques (APEX)

Cette incision est réalisée chez les mammifères par deux familles d'endonucléases : *Apurinic endonuclease* ; *APEX1*, *APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1 et 2* (APEX1 et APEX2). Ces protéines ont la capacité de reconnaître les sites abasiques et d'hydrolyser la liaison phosphodiester qui se trouve en 5' provoquant ainsi l'ouverture de la double hélice ; elles présentent aussi une faible activité exonucléase.

b) Incision par les ADN glycosylases AP lyase

Grâce à leur activité AP lyase, les ADN glycosylases sont capables d'hydrolyser la liaison phosphodiester qui est en 3' d'un site abasique. Ainsi, une ADN glycosylase bi-fonctionnelle crée non seulement un site abasique, mais aussi une coupure en 3' de celui-ci permettant ainsi une réparation plus rapide puisque dans ce cas le recrutement d'une endonucléase n'est plus nécessaire.

L'hydrolyse de la liaison phosphodiester sur laquelle est fixée la base modifiée est indispensable pour permettre la resynthèse d'ADN. Cette hydrolyse est réalisée par une phosphodiesterase, permettant la formation d'un 3'OH nécessaire pour l'élongation du brin d'ADN néo synthétisé.

1.2.1.3. Resynthèse de la zone excisée

Deux voies de resynthèse sont décrites dans la littérature ; elles ne diffèrent que par le nombre de nucléotides incorporés lors de la phase d'élongation : (1) la voie de resynthèse courte (ou BER *short patch* ; **Figure I.3** à gauche) et (2) la voie de resynthèse longue (BER *long patch* ; **Figure I.3** à droite).

La voie de resynthèse courte

Cette voie est la plus majoritaire et consiste à remplacer le nucléotide endommagé par l'ADN polymérase β associée au facteur XRCC1 (Klungland and Lindahl 1997). En même temps que les nucléotides sont polymérisés, la polymérase β , qui a aussi une activité ADN désoxyribophosphatase, enlève le 5' désoxyribose-phosphate généré lors de la coupure par l'endonucléase.

La voie de resynthèse longue

Cette voie implique la synthèse de plusieurs nucléotides après la lésion (environ deux à six nucléotides) par la polymérase β en association avec la protéine PCNA. Cette voie induit la formation d'une zone de recouvrement de brin d'ADN ou *flap* qui est éliminé spécifiquement par l'endonucléase FEN1 (FEN1 pour *flap endonuclease*) (Prasad *et al.* 2000). L'ADN polymérase β est également capable d'assurer cette étape d'élongation qui est stimulée par PARP de manière FEN1-dépendante (Kurz and Lees-Miller 2004).

1.2.1.4. L'étape de ligation

Elle diffère selon la voie de resynthèse utilisée. Dans la voie courte, c'est le complexe ligase III/XRCC1 qui restaure la continuité du brin d'ADN, tandis que l'ADN ligase 1 qui remplit cette fonction dans la voie BER *long patch*.

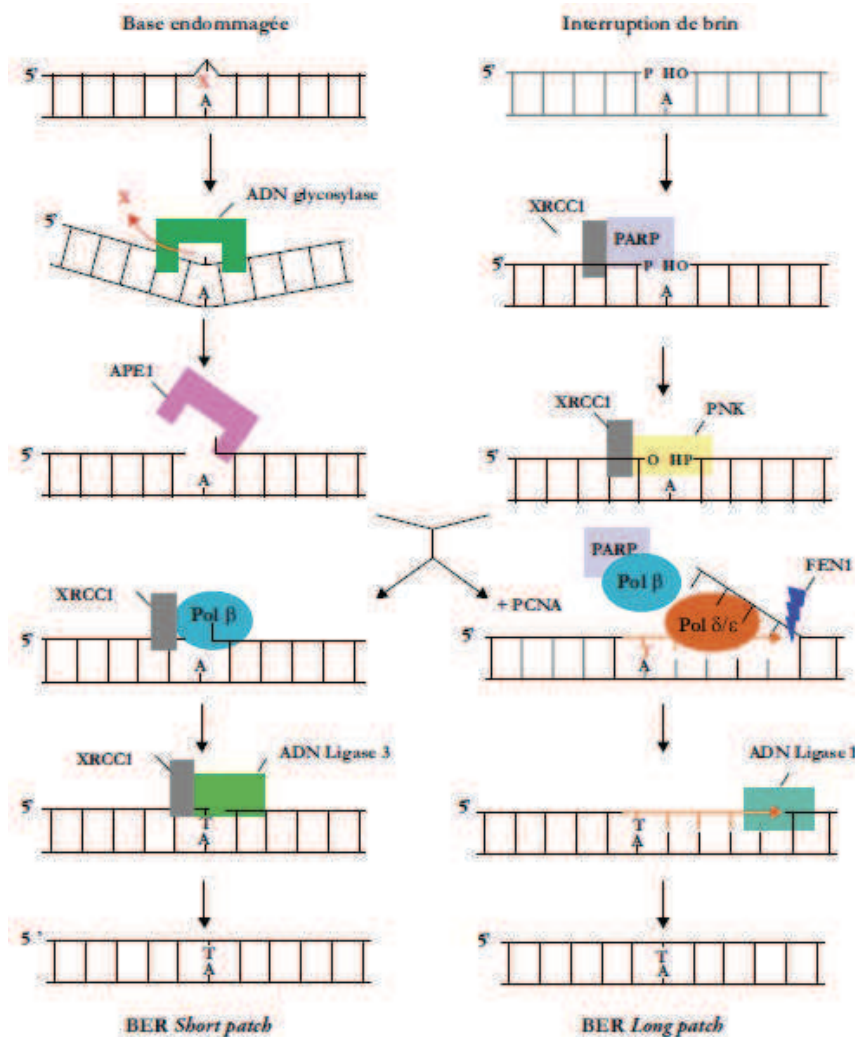


Figure I.3. Mécanisme de la réparation par excision de bases (Pourquier 2006)

La base endommagée (X) est éliminée par une ADN glycosylase spécifique du type de dommage et l'ADN est incisé par l'endonuclease APE1 au niveau du site abasique formé. L'interruption de brin peut alors être réparée par deux voies : une voie majoritaire appelée short-patch où la base manquante est simplement remplacée par l'ADN polymérase et la ligation réalisée par l'ADN ligase 3 ; et une voie alternative appelée long-patch où il y a formation d'un chevauchement de brin spécifiquement éliminé par l'enzyme FEN1

1.2.1.5. Cas des lésions de 8-oxodG et d'uracile

La 8-oxo-7,8-dihydro-2-désoxyguanosine (8-oxodG) est l'une des lésions oxydatives d'ADN avec un potentiel mutagène élevé (**Figure I.4**). En effet, les ADN polymérases peuvent incorporer le monophosphate de désoxyadénosine (dAMP) en face de la guanine modifiée, ce qui entraîne une transversion GC : TA après deux réplifications successives (Wagner *et al.* 1997).

L'uracile constitue une autre lésion à fort potentiel mutagène qui est formée par désamination de la cytosine (**Figure I.4**).

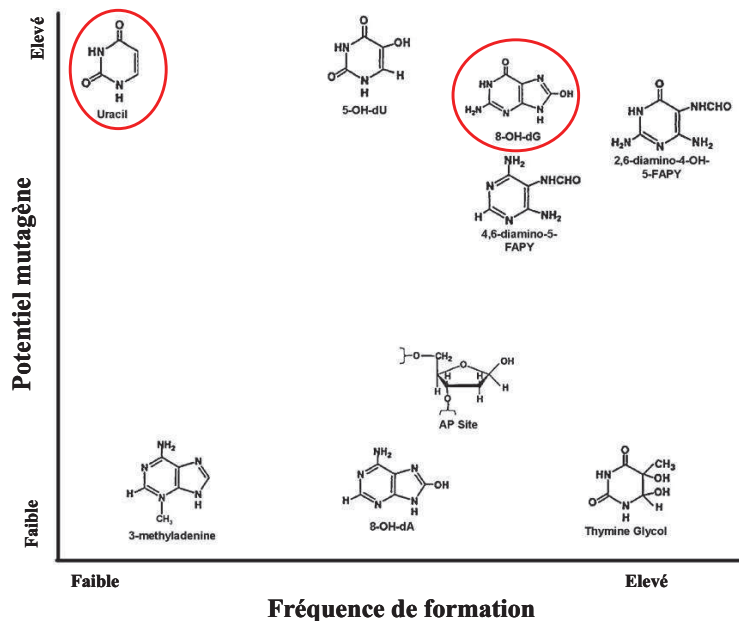


Figure I.4. Potentiel mutagène de quelques bases modifiées d'ADN (Wilson and Bohr 2007)

Par rapport à la 8-oxodG, l'uracile a une faible fréquence de formation, mais les deux lésions ont un potentiel mutagène élevé.

1.2.1.5.1. L'uracile

1.2.1.5.1.1. Sources de l'uracile dans l'ADN

Bien que naturellement présent dans l'ARN, l'uracile peut être retrouvée en petites quantités dans l'ADN. Cette présence d'uracile dans l'ADN peut résulter de la :

- (1) désamination spontanée de la cytosine, conduisant à un mésappariement de type U:G ou de la
- (2) misincorporation de dUMP au lieu de dTMP au cours de la réplication, formant ainsi des appariements de type U:A (Krokan *et al.* 1997).

Les appariements de type U:A ne sont pas directement mutagènes, mais ils peuvent conduire à des mutations lorsque l'uracile est reconnue et éliminée par l'uracile-ADN glycosylases (UNG) avec formation d'un site abasique. En revanche, les mésappariement de type U:G ont un potentiel mutagène et conduisent à des transitions C→T. La **Figure I.5** ci-dessous montre les sources d'uracile dans l'ADN, ses analogues, les enzymes avec leurs localisations ainsi que les mécanismes mis en jeu par la cellule pour la réparation des mésappariements d'uracile.

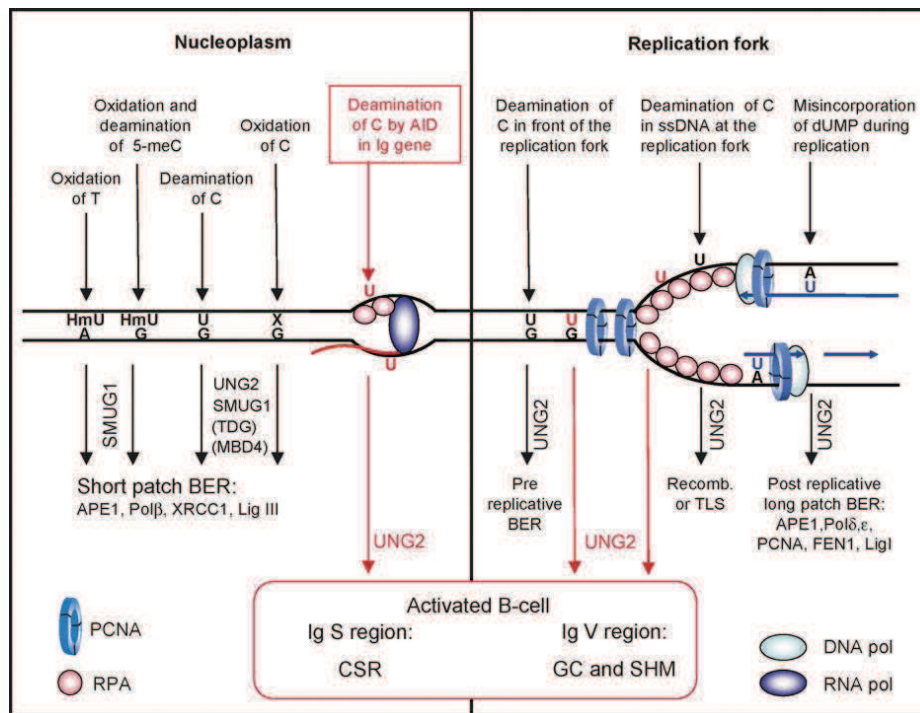


Figure I.5. Sources d'uracile dans l'ADN et mécanismes de réparation mis en jeu (Kavli *et al.* 2007)

1.2.1.5.1.1.1. Désamination spontanée de la cytosine

Une désamination spontanée de la cytosine peut se produire dans certaines conditions physiologiques et conduire à la formation d'uracile. La déamination de la cytosine génère 60 à 500 résidus d'uracile par jour et par cellule (Barnes and Lindahl 2004). Cette forte variabilité du nombre de résidus est due au fait que la déamination se produit à une fréquence 140 à 300 fois plus dans un ADN simple brin que double brin (Lindahl 1993). En effet, la déamination mesurée à 37 °C montre un taux de 1.7×10^{-5} par cytosine par jour dans un ADN simple brin alors que ce taux est de l'ordre de 6.9×10^{-8} par cytosine par jour dans un ADN double brin (Lindahl and Nyberg 1974).

Des taux élevés de désaminations spontanées de la cytosine ont été rapportés chez *Saccharomyces cerevisiae* que chez *Escherichia coli* puisque la vitesse de transcription est plus basse chez les eucaryotes et de ce fait l'ADN est conservé sous la forme simple brin pendant une longue période (Lindahl 1993).

1.2.1.5.1.1.2. Désamination spontanée et enzymatique de la cytosine

La déamination enzymatique de la cytosine peut également conduire à la formation d'uracile. En effet, il a été démontré que les enzymes de la famille des cytidines désaminases sont capables d'induire une déamination de la cytosine de l'ADN en uracile (Harris, R. S. *et al.* 2002). Il a été observé dans plusieurs tumeurs qu'une déamination de la cytosine par la cytosine 5-méthyltransférase peut se produire lorsque la concentration de cette dernière est très élevée ou lorsque la concentration de la S-adenosylméthionine (SAM) est faible (Krokan *et al.* 1997).

1.2.1.5.1.1.3. Taux de misincorporation de résidus de dUMP dans l'ADN

Les ADN polymérases incorporent les résidus de dUMP dans l'ADN avec une efficacité comparable à celle de dTMP (Friedberg EC 1995). Les concentrations physiologiques de dUTP et dTTP ont été estimées à environ 0,2 et $37 \pm 30 \mu\text{M}$, respectivement, avec un ratio intracellulaire bien inférieur à 1 % (Traut 1994). Bien que dUMP soit un intermédiaire normal qui intervenant dans la biosynthèse du thymidylate, son accumulation peut entraîner son incorporation dans l'ADN. L'uracile ADN glycosylase (UDG) est l'enzyme clé réparant les lésions de dUTP. Il a été estimé, à partir du ratio dUTP/dTTP, qu'environ un résidu dUTP est incorporé pour 104 dTTP dans l'ADN par jour (Mosbaugh and Bennett 1994). Il apparait donc que l'incorporation de dUTP dans l'ADN va fortement dépendre du ratio dUTP/dTTP.

Le niveau de dUTP est finement régulé par la dUTPase, qui joue un rôle double : la dUMP, produit de la réaction catalysée par dUTPase, est un précurseur nécessaire à la synthèse de dTTP et l'hydrolyse de dUTP empêchant l'incorporation d'uracile dans l'ADN (Figure I.6).

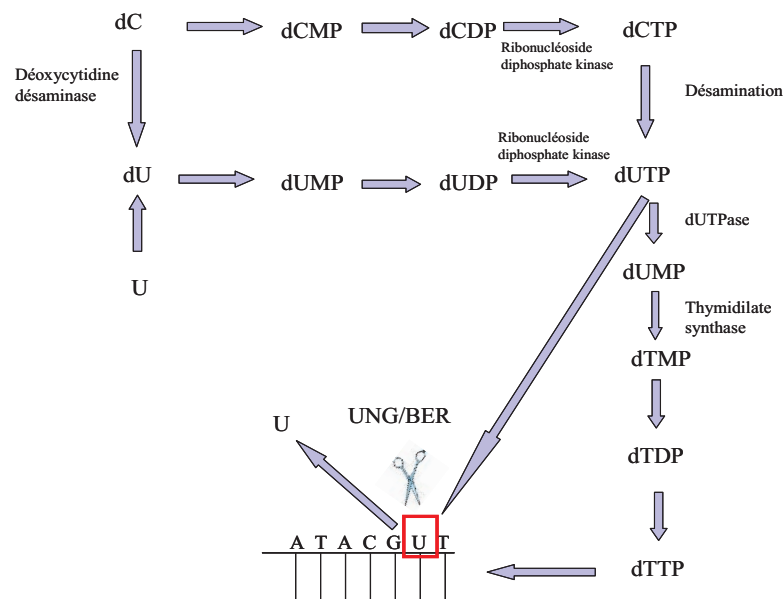


Figure I.6. Interconversion des nucléotides pyrimidiques (Olinski *et al.* 2010)

1.2.1.5.1.2. Enzymes impliquées dans la réparation des lésions d'uracile

Plusieurs uracile–DNA glycosylases (UDGs) à large spectre d'action sont décrites dans la littérature (Krokan *et al.* 2002). Sont présentés dans le (**Tableau I.1**) ci-dessous, quatre enzymes impliquées dans la réparation des lésions d'uracile. Ce sont : UNG (*Uracile–DNA glycosylase*), SMUG (*Single strand–selective Monofunctional Uracile–DNA Glycosylase*), TDG (*Thymidine DNA glycosylase*), MBD4 (*methyl binding domain 4*) (Krokan *et al.* 2002).

UNG et SMUG réparent l'uracile présent dans l'ADN simple brin, mais ils peuvent aussi réparer l'uracile dans l'ADN double brin (**Tableau I.1**). En revanche TDG et MBD4 sont strictement spécifiques pour la réparation des uraciles présents dans l'ADN double brin (**Tableau I.1**).

UNG joue un rôle central dans la réparation des uraciles provenant de la misincorporation des résidus de dUMP pendant la réplication de l'ADN (mésappariement de type U:A) (Nilsen *et al.* 2000). SMUG1 a une spécificité d'action sur les uraciles provenant de la déamination des cytosines (Nilsen *et al.* 2001). TDG jouerait un rôle majeur dans la réparation des mésappariement d'uracile et de la thymine avec la guanine dans l'ADN double brin (Hardeland *et al.* 2001). TDG répare également les mésappariements résultant de la déamination de la cytosine ou de la 5-méthylcytosine (m⁵dC). MBD4 a une spécificité sur les mésappariements G:T ainsi que certains pyrimidines endommagés dans l'ADN double brin, particulièrement dans les contextes CpG et 5-méthylCpG (Bellacosa 2001).

Tableau I.1. Spécificité des enzymes impliquées dans la réparation des résidus d'uracile

Type de mésappariement	UNG	SMUG	TDG	MBD4
T:G	non	non	oui	oui
U dans ssDNA	oui	oui	non	non
U dans dsDNA	oui	oui	oui	oui
5hmeU dans ssDNA	non	oui	non	non
5hmeU dans dsDNA	non	oui	oui	non
εC dans ssDNA	non	oui	non	non
εC dans dsDNA	non	oui	oui	oui
5–FU dans ssDNA	oui	oui	oui	non
5–FU dans dsDNA	oui	oui	oui	oui

Note. MBD4 : *methyl binding domain 4* ; SMUG : *Single strand-selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase*, TDG : *Thymidine DNA glycosylase* ; UNG : *Uracil-DNA glycosylase*, ssDNA : *single strand DNA* ; dsDNA : *double strand DNA*; 5-hmU : *5-hydroxy-methyluracil*, εC : *3, N⁴-ethenocytosine*, 5–FU : *5-fluorouracil*.

1.2.1.5.1.3. Misincorporation d'uracile et statut en folates

Un niveau optimal en folates est indispensable pour préserver la stabilité génomique. Les folates participent à la synthèse des thymidylates qui sont indispensables à la synthèse et à la réparation de l'ADN. Le rôle des folates dans la synthèse et la réparation d'ADN a été examiné dans plusieurs études (Kuo *et al.* 2008 ; Wu *et al.* 2009). Des travaux ont montré qu'une carence en folates était associée à une augmentation du ratio dUMP/dTMP, avec une misincorporation d'uracile dans l'ADN ainsi que des coupures de brins d'ADN (Blount *et al.* 1997 ; Duthie, Grant *et al.* 2000 ; Duthie, Narayanan *et al.* 2000 ; Kapiszewska *et al.* 2005). L'augmentation du ratio dUMP/dTMP et la misincorporation d'uracile étaient majorés par une carence progressive en folates, avec une augmentation des taux de cassures de brins d'ADN et de formation de sites abasiques (Melnik *et al.* 1999).

Différents modèles expérimentaux ont montré qu'une carence en folates induisait une misincorporation d'uracile, une fragmentation d'ADN ainsi que des aberrations chromosomiques (Duthie *et al.*; Kim, Y. I. *et al.* 2000 ; Bird 2002).

La présence d'uracile était également rapportée dans l'ADN d'individus sains normaux (Narayanan *et al.* 2004), et son niveau dans l'ADN était influencé par une supplémentation en acide folique (Basten *et al.* 2006). Une supplémentation en acide folique à raison de 1,2 mg/jour pendant 12 semaines entraîne une diminution du niveau de misincorporation d'uracile dans les lymphocytes, notamment chez des sujets ayant un statut adéquat en folates (Basten *et al.* 2006).

Par ailleurs, il a été montré qu'un apport de fortes quantités de folates et vitamine B12 (5 mg et 1,25 mg/jour, respectivement sur six mois) était associé à une augmentation du niveau d'uracile dans les biopsies de patients atteint d'un cancer colorectal (van den Donk *et al.* 2007).

On observe une association entre l'accumulation des lésions d'uracile et la carence en folates. Toutefois, un retour à un niveau normal de la concentration en folates n'avait aucune influence sur le niveau des pyrimidines oxydées, suggérant que la misincorporation d'uracile induite par une carence en folates est irréversible (Duthie and Hawdon 1998). La misincorporation d'uracile dans l'ADN est plus sensible aux variations de taux de folates que d'autres marqueurs de stabilité génomique (coupures de brins, méthylation d'ADN). Il a été proposé comme un marqueur spécifique du statut en folates (Basten *et al.* 2006). Toutefois, certaines études ont rapporté des résultats contradictoires. Des niveaux d'uracile similaires dans l'ADN ont été rapportés chez des sujets ayant une carence en folates, comparés à des sujets avec un statut en folates érythrocytaire normal (Ren *et al.* 2002).

La concentration en vitamine B12 influence le taux de misincorporation d'uracile dans l'ADN (Berger *et al.* 2008 ; Zhang, X. J. *et al.* 2008). Une étude n'ayant trouvé aucune corrélation entre le

niveau de misincorporation d'uracile et la concentration plasmatique en folates a, cependant, rapporté que le niveau d'uracile était significativement plus faible chez les sujets supplémentés en acide folique qui ont une concentration plasmatique de vitamine B12 supérieure à 400 pg / ml (Kapiszewska *et al.* 2005).

Pendant la réplication l'uracile est incorporée dans l'ADN à la place de thymidine puisqu'elle ne diffère de la thymidine que par un seul groupement méthyle. L'uracile est rapidement éliminé par les enzymes de réparation d'ADN, ce qui entraîne la formation de cassures simple brin d'ADN. Lorsque la concentration en folates reste toujours limitant ce '*cycle catastrophique*' de cassure simple brin et réparation continue et conduit à la formation de cassures double brin d'ADN, des aberrations chromosomiques et une transformation maligne (Blount *et al.* 1997).

1.2.1.5.2. La 8-oxo-7,8-dihydro-2-désoxyguanosine (8-oxodG)

1.2.1.5.2.1. Formation de la 8-oxodG

La 8-oxodG ou 8-OHdG est l'une des formes majeure de lésions oxydatives provenant de l'action des EROs sur la guanine. Elle est largement utilisée comme un biomarqueur du stress oxydatif et de la carcinogenèse.

Le mécanisme de formation de la 8-oxodG ou son tautomère 8-oxodG est formé est présenté ci-dessous (**Figure I.7**).

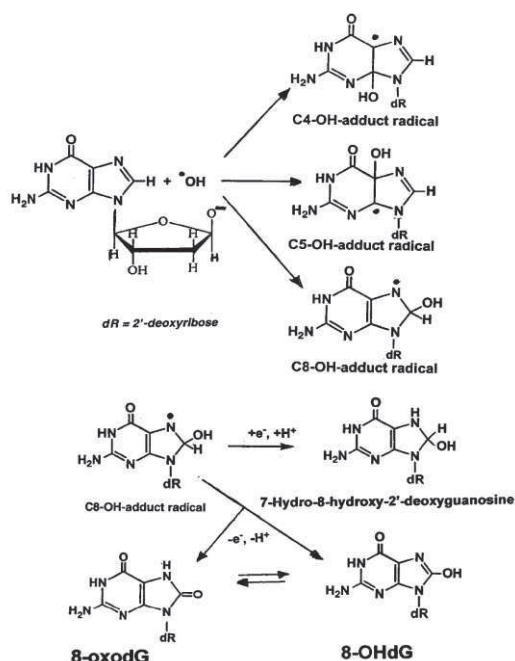


Figure I.7. Formation de la 8-oxodG par action du radical hydroxyle sur la guanine

1.2.1.5.2.2. Influence des gènes de la réparation sur le niveau de la 8-oxodG dans l'ADN

La réparation de la 8-oxodG fait intervenir principalement le système BER et à un degré moindre le système de réparation par excision de nucléotide (NER).

L'acteur clé de la réparation des lésions de 8-oxodG dans le système BER est la *8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1)*. Chez les souris *OGG1* répare efficacement la 8-oxodG appariée avec dC ; mais avait une activité faible sur la 8-oxodG appariée à dT ou dG, et totalement inactif sur les appariements de 8-oxodG avec dA (Rosenquist *et al.* 1997).

Les polymorphismes de gènes de la réparation d'ADN affectent le niveau de 8-oxodG dans l'ADN. Une diminution des capacités de réparation de la 8-oxodG a été rapportée dans les poumons et leucocytes, avec une augmentation du taux de 8-oxodG chez les sujets homozygotes mutés ou hétérozygotes (Cys326Cys et Ser326Cys) du gène *OGG1* par rapport aux sujets homozygotes sains (Ser326Ser) (Janik *et al.* 2011). Il est aussi documenté que le niveau de 8-oxodG urinaire était positivement corrélé au niveau d'expression d'*OGG1* (Hatt *et al.* 2008).

1.2.1.5.2.3. Association entre carcinogènes environnementaux et niveaux de 8-oxodG

Un niveau basal de 8-oxodG est présent dans plusieurs types de cellules, et il a été suspecté, depuis longtemps, que cette lésion pourrait jouer un rôle dans l'initiation de la cancérogenèse. Son niveau varie suivant le mode de vie. Chez les fumeurs, par exemple, des niveaux élevés de 8-oxodG ont été rapportés aussi bien dans le tissu pulmonaire que dans les leucocytes périphériques (Asami *et al.* 1996). Des modèles expérimentaux ont aussi montré que l'exposition environnementale à la fumée de tabac pourrait entraîner une augmentation du niveau de 8-oxodG. Une exposition de l'ordre de 1mg/m³ de fumée de tabac chez des rats en gestation entraînait une augmentation significative du niveau de 8-oxodG dans le foie des mères ainsi que dans le foie fœtal et le cerveau (Maciag *et al.* 2003).

Une augmentation des niveaux de 8-oxodG a été rapportée chez des sujets exposés à la fumée de tabac dans leur environnement professionnel (Howard *et al.* 1998) ; il en est de même chez les sujets souffrant un cancer de sein ou d'ovaire par rapport à des témoins sains (Dziaman *et al.* 2009).

Des cellules cultivées avec ou sans amiante ont montré que les fibres d'amiante pouvaient initier la production des radicaux hydroxyles et causer des dommages oxydatifs dans l'ADN (Chen, Q. *et al.* 1996). D'autres études ont montré que l'inhalation des fibres d'amiante pourrait induire la formation de 8-oxodG dans l'ADN de travailleurs fortement exposés (Marczynski *et al.* 2000 ; Unfried *et al.* 2002).

Une exposition aux hydrocarbures polycycliques aromatiques était associée à une augmentation des concentrations de 8-oxodG urinaire et dans l'ADN chez des travailleurs de différents secteurs d'activité (Marczynski *et al.* 2002 ; Marczynski *et al.* 2005 ; Ayi Fanou *et al.* 2006).

1.2.2. Mécanismes de réparation des cassures double brin d'ADN

Les cassures double brin (CDBs) d'ADN constituent une classe de lésions potentiellement dangereuses pour la cellule. Une réparation inefficace des CDBs peut conduire à des réarrangements chromosomiques tels que des délétions, des translocations et fusion de chromosomes et à la mort cellulaire. Chez les mammifères, deux voies sont utilisées pour réparer des CDBs : la recombinaison homologue (HR) et la recombinaison non homologue (NHEJ).

Une des caractéristiques de la réponse cellulaire aux CDBs est l'induction d'un réseau de signalisation des dommages à l'ADN et l'accumulation de protéines de réparation d'ADN dans le voisinage de la lésion. Chez les eucaryotes, cette cascade de signalisation est initiée par deux protéines clés de la famille des *phosphatidylinositol-3 kinase like kinase* (PI3KK) : **ATM** (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) et **ATR** (*Ataxia Telangiectasia Related*). La protéine ATM, une sérine/thréonine kinase composée de 3056 acides aminés, est le principal acteur qui coordonne la réponse cellulaire suite à la formation des CDBs, par une phosphorylation de plusieurs protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, et la réparation d'ADN (Shiloh 2003) (**Figure I.8**).

En effet, après formation des dommages dans l'ADN, les cellules activent plusieurs voies de signalisation conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire et une induction de la transcription de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. Tout dysfonctionnement dans cette réponse conduit à une instabilité génomique. Chez les eucaryotes, l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire, après formation des dommages d'ADN, est initiée par plusieurs protéines kinases, dont ATM, ATR, Mec1, RAD3, Rad53, Cds1, Chk1 et Dun1 (Elledge 1996). Chez les mammifères, ATM coordonne l'arrêt du cycle cellulaire en phases G1 et G2 en empêchant toute nouvelle synthèse d'ADN après détection des CDBs (Elledge 1996). De plus, la protéine p53 joue un rôle majeur dans le contrôle de la phase G1/S, par exemple, après une irradiation (Kastan *et al.* 1991). Une induction optimale de p53 requiert la présence d'ATM (Kastan *et al.* 1992) pour induire la transcription de l'inhibiteur de Cdk (p21 CIP1/WAF1) et l'arrêt du cycle en phase G (Walworth and Bernards 1996). L'arrêt en G2 se fait grâce au maintien de la protéine Cdc2 dans un état phosphorylé, lequel état est crucial pour prévenir toute entrée de la cellule en mitose lorsque l'ADN est endommagé (Elledge 1996).

ATM intervient aussi dans la phosphorylation de protéines importantes pour le contrôle du cycle cellulaire telles que NBS1 et BRCA1. NBS1 est une protéine qui fait partie du complexe MRN qui est impliqué dans l'arrêt du cycle en phase S (Lim *et al.* 2000).

La voie de signalisation impliquant le gène *BRCA1* (*Breast Cancer Associated 1*) joue également un rôle important dans l'arrêt du cycle cellulaire. En effet, il est démontré qu'ATM pouvait phosphoryler BRCA1 sur plusieurs sites, et conduire à des phénotypes différents suivant la phase du cycle cellulaire. Par exemple la phosphorylation de la sérine en position 1387 était essentielle pour l'arrêt en phase S après exposition aux rayonnements ionisants (Xu *et al.* 2002), alors que la phosphorylation sur la sérine 1423 était nécessaire pour l'arrêt en phase G2/M (Xu *et al.* 2001).

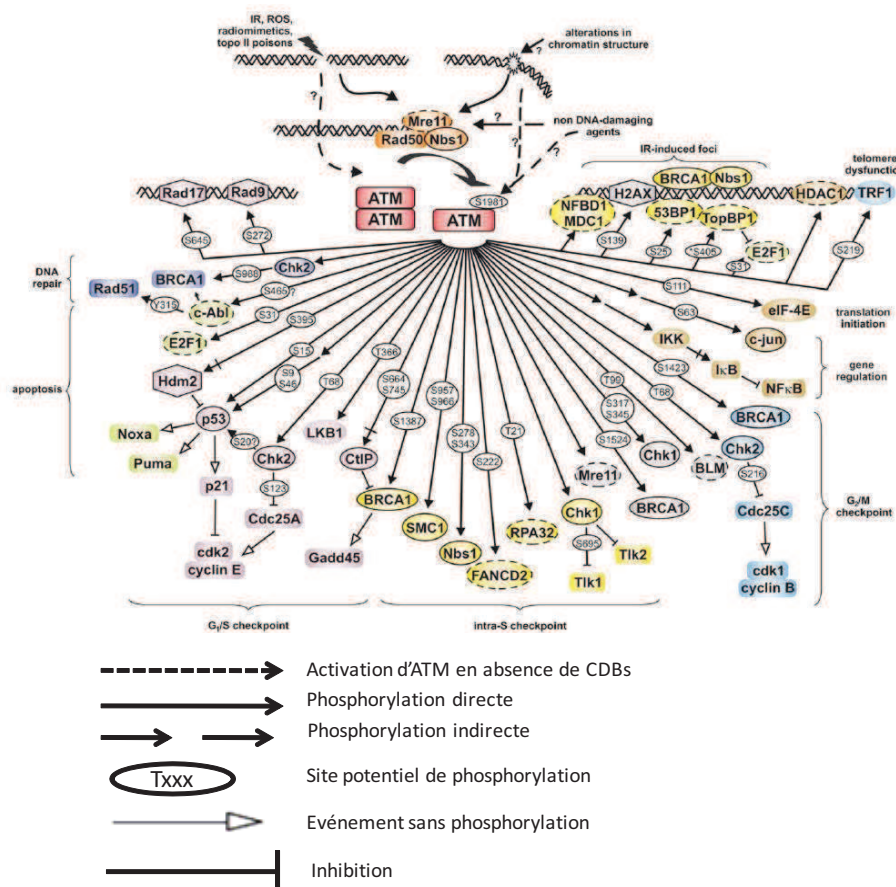


Figure I.8 : Cassures double brin d'ADN, activation d'ATM et voies de signalisation activées (van den Bosch et al. 2003).

Les cassures double brin sont détectées par le complexe MRN (MRE11–RAD50–NBS1) qui recrute la kinase ATM à proximité de la lésion. La phosphorylation de l'histone H2AX par ATM permet l'accumulation de la protéine MDC1 et le recrutement d'une deuxième vague de protéines (53BP1, le BRCA1, et RAD18) facilitant la réparation des lésions

1.2.2.1. Réparation des cassures double brin d'ADN par recombinaison homologue

C'est un mécanisme fidèle de réparation de l'ADN basé sur l'utilisation de la chromatide sœur qui se déroule principalement en trois étapes (**Figure I.9**) :

- (1) recherche d'homologie de séquence,
- (2) invasion des brins complémentaires,
- (3) synthèse d'ADN et formation d'une jonction de Holiday.

L'étape d'invasion du brin endommagé par une séquence homologue est facilitée par l'activité exonucléase du complexe MRN (Mre11–Rad50–Nbs1). Cette caractéristique du complexe MRN en fait un marqueur important dans la recherche des lésions double brin d'ADN. La protéine RPA se fixe sur l'ADN simple brin et assure le recrutement de Rad50, Mre11, XRCC2, XRCC3, Rad51B, C et D. BRCA1 et BRCA2 facilitent la translocation nucléaire de Rad51, qui a la particularité d'échanger un ADN simple brin par une séquence homologue située sur un ADN double brin. À la suite de l'identification de la séquence homologue, la copie intacte située sur l'ADN double brin est utilisée comme matrice pour corriger la lésion double brin et l'élimination de la jonction de Holiday, structure intermédiaire, est facilitée par les résolvases (**Figure I.9**).

Cette voie de réparation des CDBs intervient pendant les phases S et G2 du cycle cellulaire, alors que la voie NHEJ est privilégiée pendant les autres phases du cycle (Larijani *et al.* 2005).

1.2.2.2. Réparation des cassures double brin d'ADN par recombinaison non homologue (NHEJ pour *non homologous end joining*)

Contrairement à la recombinaison homologue, la recombinaison non homologue est un mécanisme de réparation d'ADN peu fidèle puisqu'il implique une ligation de deux brins d'ADN non homologues et peut donc mener à des pertes de nucléotides, des translocations chromosomiques ou des fusions. Cette voie implique également plusieurs protéines parmi lesquelles, les protéines Ku70 et Ku80, la DNA-PKcs (sous-unité catalytique de la DNA-PK), ainsi que les protéines Artemis, ADN ligase IV, XLF (XRCC4-like factor).

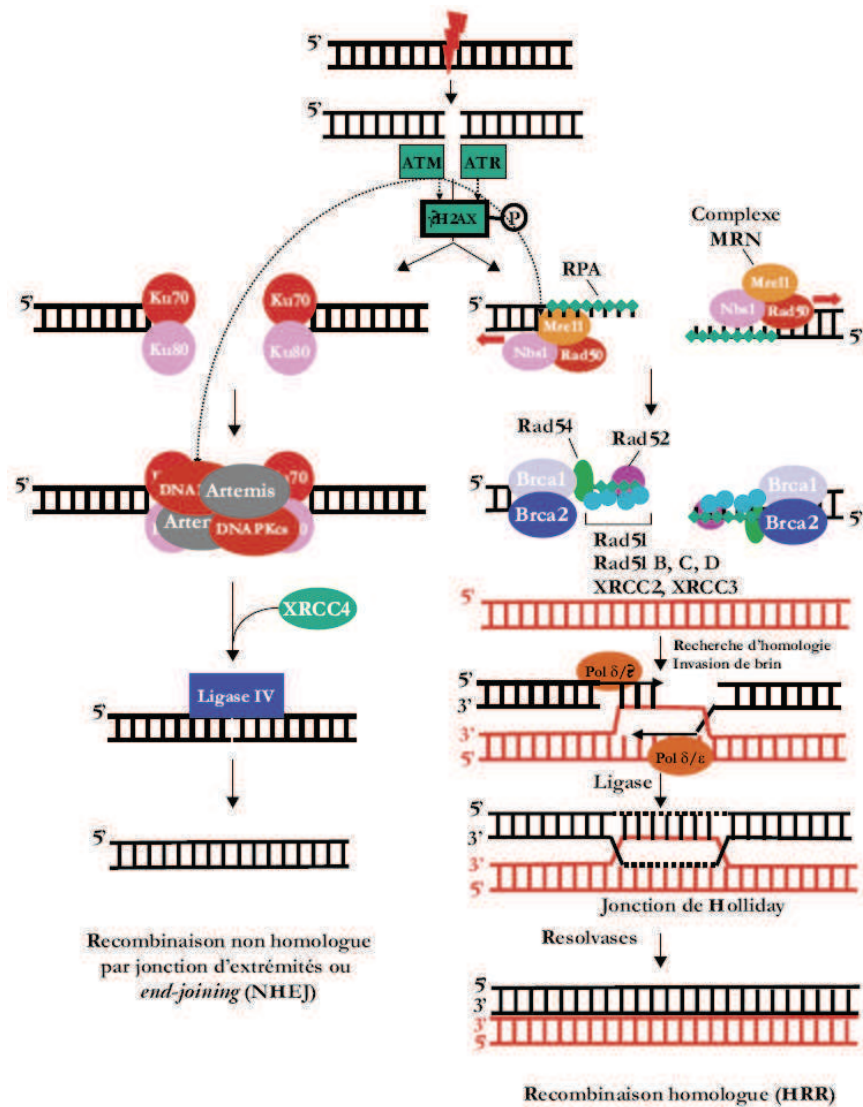


Figure I.9. Mécanisme de réparation des cassures double brin d'ADN (Pourquier 2006)

La présence de cassures double brin d'ADN est détectée par des protéines senseurs de la famille des PIKK : ATM et ATR qui phosphorylent certaines protéines effectrices, dont l'histone H2AX qui joue un rôle essentiel dans le remodelage de la chromatine après formation des dommages. Deux voies de recombinaison existent : la voie de recombinaison homologue (à droite), utilisée principalement chez les procaryotes et la levure et qui se sert de la chromatide sœur pour réparer la cassure, implique notamment une résection des extrémités de l'ADN au niveau de la cassure qui est assurée par l'activité nucléasique du complexe MRN et une invasion de brin permettant d'induire la nouvelle synthèse en se servant du chromosome intact comme matrice. Cette voie, bien que complexe, minimise le nombre d'erreurs ; l'autre voie de recombinaison (à gauche), qui est majoritaire chez l'homme, est celle de la recombinaison non homologue, encore appelée recombinaison par jonction d'extrémités ou end-joining. Elle consiste à « rabouter » les extrémités de la cassure et implique essentiellement les protéines du complexe DNA-PK associé à la protéine Artémis. Cette voie est plus rapide mais génère des erreurs d'insertion ou de délétion de quelques bases.

1.2.3. La réparation des lésions d'ADN par excision de nucléotides (système NER)

Ce système de réparation prend en charge les lésions causant une distorsion dans la structure de l'ADN. Il s'agit des lésions induites par les rayonnements ultraviolet (dimères de pyrimidines), des adduits volumineux induits par les carcinogènes d'origine environnemental ou médicamenteuse.

Le système NER est subdivisé en deux voies :

- (1) une voie communément appelée GG-NER (pour *global genome NER*) qui répare les lésions dans le génome indépendamment de leur localisation et,
- (2) la voie TC-NER (pour *transcription coupled-NER*) induite par les lésions au niveau des régions transcrites de l'ADN (**Figure I.10**).

Ces deux voies ne diffèrent que par le mode de reconnaissance de la lésion. Dans la voie GG-NER, c'est le complexe XPC-hHR23B qui reconnaît la lésion, tandis que dans la voie TC-NER c'est l'arrêt de la progression de l'ARN polymérase II qui facilite l'identification de la lésion.

De nombreuses protéines interviennent dans ce système de réparation : *XPC-hHR23B* (reconnaissance des dommages), *DDB* (remodelage de la chromatine), *XPA* (appariement au dommage), *RPA1* (appariement à l'ADN simple brin), *TFIIH*, *ERCC1-XPF* (activité 5' endonucléase), *XPG* (activité 3' endonucléase), *PCNA*, Pol ϵ (DNA polymérase), et *LIG1* (ligase) (**Figure I.10**) (Gillet and Scharer 2006).

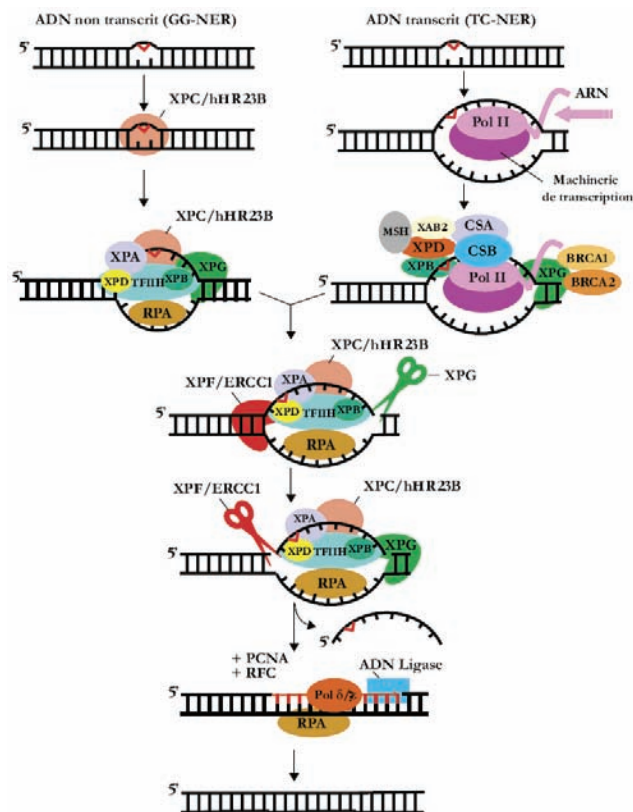


Figure I.10. Mécanisme de réparation des lésions d'ADN par excision de nucléotides (Pourquier 2006)

Il existe deux voies du NER selon que la lésion se trouve dans l'ADN non transcrit (GG-NER pour global genome-NER) ou l'ADN transcrit (TC-NER pour transcription-coupled-NER). Le complexe XPC-hHR23B permet la détection de la lésion dans la voie GG-NER et le blocage de la machinerie de transcription facilite l'identification de la lésion dans la voie TC-NER. Pour le TC-NER, les molécules CSA et CSB participent à la détection du dommage au même titre que l'ADN polymérase impliquée dans la synthèse de brin. Une fois détectée, la lésion est rendue accessible pour les autres protéines de la réparation par maintien de l'ouverture de la double hélice grâce aux deux hélicases XPB et XPD du complexe TFIIH. Les nucléases XPG et XPF-ERCC1 effectuent alors l'excision d'une partie du brin endommagé puis l'ADN polymérase effectue une nouvelle synthèse de brin et la religation est assurée par l'ADN ligase.

1.2.3.1. Pathologies associées aux anomalies de la réparation de la voie NER

Trois pathologies autosomiques récessives rares sont associées aux mutations de gènes impliqués dans la voie NER : (1) le Xeroderma Pigmentosum (XP), (2) le syndrome de Cockayne (CS), et (3) la Trichothiodystrophie (TTD) (Lehmann 2003 ; Cleaver 2005).

1.2.3.1.1. Le Xeroderma Pigmentosum (XP)

Le XP est une maladie multigénique caractérisée principalement par une hypersensibilité des patients aux ultraviolets avec un risque accru de cancer de la peau (> 1000 fois). Une activation des oncogènes *ras*, *Ink4a-Arf* et *p53*, ainsi que de nombreuses altérations de plusieurs protéines partenaires et une prédominance de transition C>T ont été rapportées dans les tumeurs de la peau (Daya-Grosjean and Sarasin 2005). Sept groupes de complémentation ont été identifiés chez les patients XP (*XP-A* à *G*). Un huitième gène *POLH* est à l'origine d'un variant de XP (*XP-V*) non associé à un défaut dans la voie NER, mais à une synthèse translésionnelle.

La majorité des mutations identifiées dans *XP-C* codent pour une protéine tronquée avec une perte de fonction. Les mutations dans *XPC* sont plus fréquentes, suivies de celles dans *XP-E* chez les patients XP. En général, le niveau de synthèse/réparation dans les cellules de patients *XP-E* est de l'ordre de 50 à 80 % par rapport à celui de cellules normales. Les patients *XP-A* présentent une sensibilité accrue UV que ceux qui sont *XP-C*. Peu de patients *XP-B* sont compatibles avec la vie puisque celui-ci joue un rôle majeur dans l'initiation de la transcription.

1.2.3.1.2. Le syndrome de Cockayne (CS)

Ce syndrome combine l'hypersensibilité aux UV, caractéristique du XP, aggravée par des troubles neurologiques, une dysmorphie faciale avec un retard mental et de croissance staturo-pondérale (Nance and Berry 1992). De plus, le CS est associé à une perte de l'audition, et des atteintes oculaires comme la rétinopathie pigmentaire et la cataracte pendant les trois premières années de vie, avec une espérance de vie située autour de 12,5 ans (Nance and Berry 1992). Deux groupes de complémentation sont décrits dans le CS : *CS-A* et *CS-B*, impliqués dans la voie TC-NER. Aucune prédisposition au cancer n'est observée dans le CS. Toutefois, une induction d'apoptose avec un blocage de la progression du cycle cellulaire des cellules de l'épiderme a été rapportée dans les souris *knock out* pour *CS-B* (van Oosten *et al.* 2000).

1.2.3.1.3. La Trichothiodystrophie (TTD)

Cette pathologie s'apparente au syndrome de Cockayne, mais s'accompagne d'autres manifestations comme les cheveux ultra-cassants, une extrême sécheresse de la peau, un retard mental, une hypofertilité ainsi qu'un nanisme (Itin *et al.* 2001). Des mutations dans les gènes *XPB* et *XPD* sont associées à la TTD.

1.2.4. Réparation des mésappariements d'ADN (système MMR)

Le système MMR est un système de réparation post-réplicationnelle d'ADN. Il participe également au maintien de l'intégrité du génome et est conservé depuis les bactéries jusqu'aux mammifères. Ce système reconnaît et corrige les erreurs de réplication ayant échappé à l'ADN polymérase, plus particulièrement les mésappariements de bases et les petites insertions/délétions.

En plus de ce rôle majeur, les protéines du système MMR interviennent dans la réparation des cassures double brin par le mécanisme NHEJ au cours de la phase G1 du cycle cellulaire (Jiricny 2006).

Chez les eucaryotes la reconnaissance des mésappariements est initiée par MutS α composé de l'hétérodimère hMSH2/hMSH6 qui, après un changement conformationnel ATP-dépendant, recrute l'hétérodimère hMLH1/hPMS2 (Li, G. M. and Modrich 1995) (**Figure I.11**). Ce complexe peut se lier aux mésappariements de bases et aux boucles des petites insertions/délétions constituées d'un ou de deux nucléotides. Dans la recherche des discontinuités au sein de la molécule d'ADN, ce complexe se déplace le long de l'ADN, et ce dans le sens 3' ou 5'. À la rencontre d'une discontinuité de brin d'ADN (représentée par un cercle bleu sur la **Figure I.11**), ce complexe recrute une exonucléase (EXO1) qui initie la dégradation du brin d'ADN en direction du mésappariement. La stabilisation de l'ADN simple brin se fait grâce à la protéine RPA, si EXO1 se dissociait avant que le complexe n'atteigne la lésion. Une nouvelle formation du complexe hMSH2/hMSH6/hMLH1/hPMS2 au niveau du mésappariement va stimuler la dégradation exonucléolytique. Une troisième répétition de ce processus permet l'élimination du mésappariement. Une ADN polymérase et une ligase restaurent la continuité de l'ADN.

La reconnaissance de la lésion peut aussi être initiée par MutS β composé de (MSH2-MSH3) qui se lie aux boucles d'insertions/délétions plus grande, ayant entre 2 et 8 nucléotides (Blount and Ames 1995 ; Duthie *et al.* 2002). Dans ce cas, les complexes MutL α (MLH1-PMS1) et MutL γ (MLH1-MLH2) interviennent dans l'excision et la réparation des mésappariements. D'autres acteurs comme EXO1, RPA (*Replication protein A*), de RFC (*Replication Factor C*), PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) sont également impliqués dans ce processus d'excision/réparation.

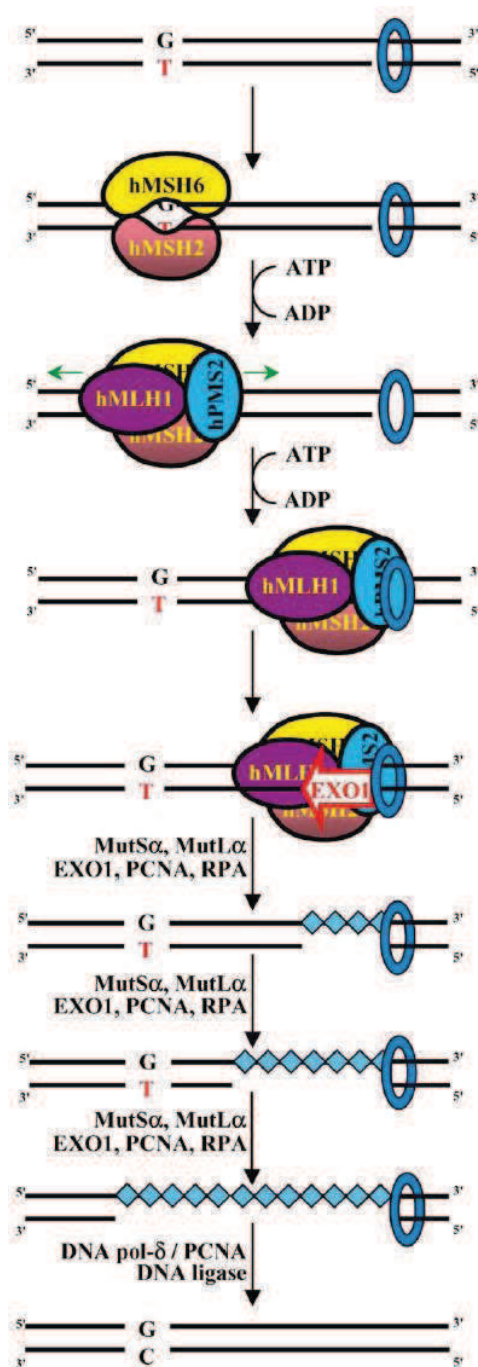


Figure I.11. Mécanisme de réparation des mésappariements d'ADN (adapté selon Stojic *et al.* 2004)

1.3. Association entre le statut en donneur de méthyles et stabilité génomique

Folates et vitamine B12 (cobalamines) sont deux vitamines du groupe B ayant une fonction de coenzyme assurant, avec des enzymes spécifiques, le transfert de radicaux monocarbonés regroupé sous le terme de ‘*métabolisme monocarboné*’. Ces radicaux monocarbonés sont impliqués dans différentes réactions de méthylation telles que la reméthylation de l’homocystéine en méthionine, la synthèse des thymidylates à partir des désoxyuridine (dUMP) ainsi que la méthylation des cytosines d’ADN. Une carence en folates peut entraîner un défaut de méthylation et de réparation d’ADN et contribuer à la carcinogenèse (**Figure I.12**).

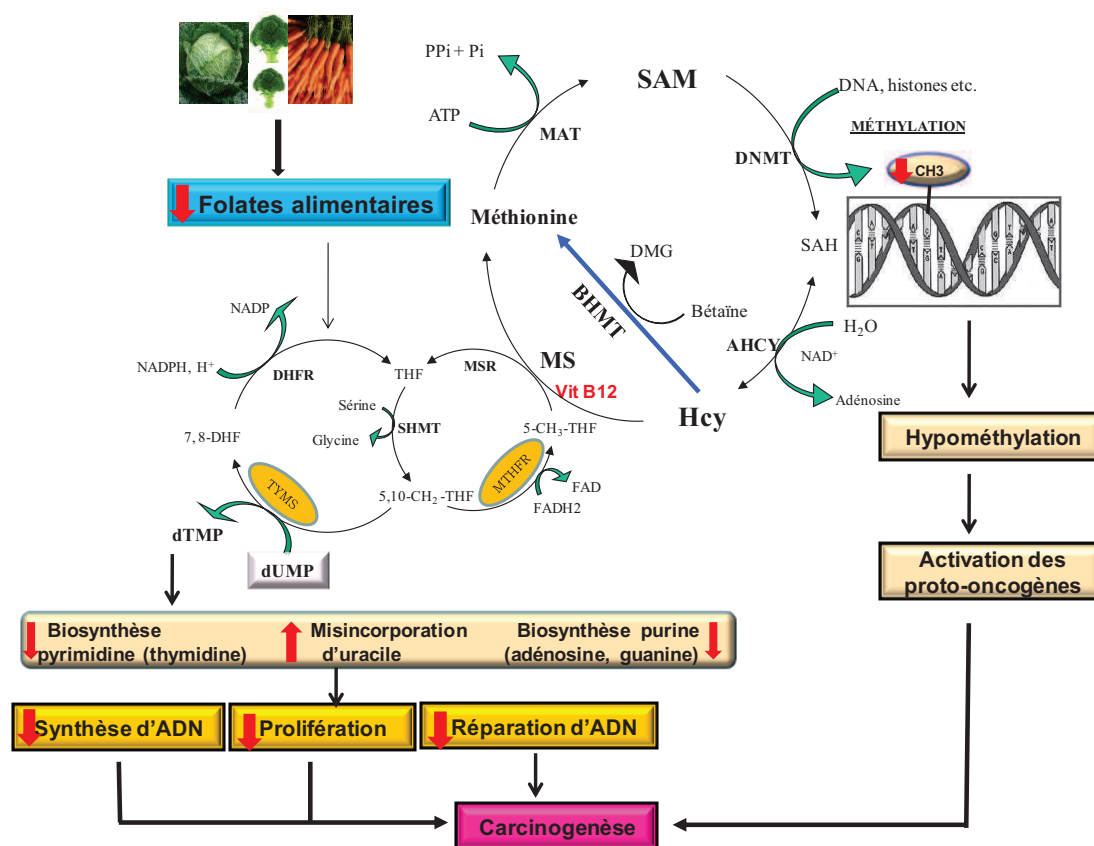


Figure I.12. Cycle du métabolisme des monocarbonés et sa relation avec la carcinogenèse

Abréviations : AHCY : Adénosylhomocystéine ; BHMT : Bétaine homocystéine méthyltransférase ; DNMT : DNA méthyltransférase, DHFR : Dihydrofolate réductase, Hcy : homocystéine ; MAT : méthionine adénosyl-transférase ; MTHFR : Méthylène tétrahydrofolate réductase ; MS : Méthionine synthase ; MSR : Méthionine synthase réductase ; SAM : S-adenosylméthionine ; SAH : S-adenosylhomocystéine ; SHMT : sérine hydroxyméthyltransférase 1 ; TYMS : Thymidylate synthase

La MTHFR, enzyme clé du métabolisme des folates convertit, de manière irréversible, la 5, 10 méthylène-THF en 5-méthyl-THF, donneur de groupement méthyle permettant la conversion de l'Hcy en méthionine. Dans le cycle de la méthionine, la 5-méthyl THF intervient dans la

reméthylation de l'Hcy en méthionine, qui est ensuite métabolisée en S-adénosylméthionine (SAM), principale donneur de groupement méthyles dans la plupart des réactions cellulaires. La dUMP est convertie en thymidine monophosphate (TMP) par la thymidylate synthase (TS) grâce à la 5,10-méthylène THF comme donneur de méthyles. La production continue de ces précurseurs d'ADN est essentielle pour la synthèse et la réparation de l'ADN. La disponibilité ainsi que l'équilibre de ces désoxyribonucléosides dans le pool d'oligonucléosides sont essentiels pour la fidélité de la synthèse et la réparation de l'ADN.

1.3.1. Les folates

1.3.1.1. Structure, sources d'apport et causes de carence en folates

Les folates, aussi connus sous le terme de vitamine B9, désignent un ensemble de complexes vitaminés biologiques ayant les propriétés de l'acide ptéroylglutamique (ou acide folique). Leur découverte remonte dans les années 1930 dans le traitement de l'anémie mégaloblastique en fin de grossesse (Wills 1978). On distingue trois parties dans la structure des folates (**Figure I.13**) : **(1)** le noyau ptérine, **(2)** l'acide para aminobenzoïque (p-ABA), **(3)** une ou plusieurs molécules d'acide glutamique.

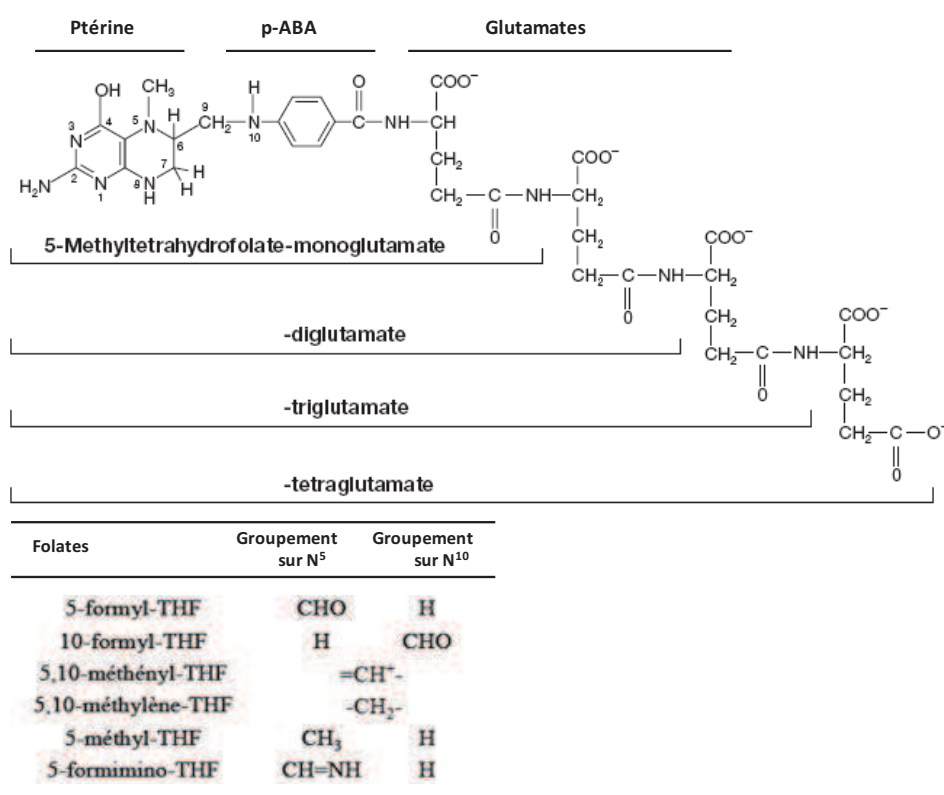


Figure I.13. Structure des différents dérivés du THF

Les folates ne peuvent être synthétisés chez les eucaryotes et doivent être apportés par l'alimentation. Dans les aliments les folates sont principalement apportés sous forme de polyglutamates (90 % des folates). On les retrouve principalement dans les fruits secs ou frais, abats, graines (noix, amandes, châtaignes, pois chiches) et légumes (haricots, lentilles, carottes, concombre, etc.).

La carence en folates peut dépendre de plusieurs facteurs : **(1)** d'un apport insuffisant, cause la plus fréquente de carence, **(2)** d'une augmentation des besoins (par exemple pendant la grossesse) ou d'une **(3)** malabsorption ou anomalies du métabolisme (résultant d'une affection lésant l'intestin grêle proximal, siège d'absorption des folates).

1.3.1.2. Apport nutritionnel conseillé (ANC) en folates

L'apport nutritionnel quotidien moyen et suffisant pour répondre aux besoins des personnes en bonne santé varient suivant les tranches d'âge et le sexe (**Tableau I.2**). Les besoins en folates peuvent augmenter lors de la prise de certains médicaments.

Tableau I.2. Besoin en folates suivant l'âge et le sexe

Catégorie	ANC (µg/jour)
Nourrissons	70
Enfant de 1 à 12 ans	100 à 250
Adolescents de 13 à 19 ans	300
Hommes adultes	330
Femmes adultes	300
Femme enceinte	400
Femme allaitante	400
Personnes âgées valides	400

Source : Martin A. 2000. Apports nutritionnels conseillés pour la population française, 3^e édition

1.3.1.3. Le métabolisme des folates : absorption et transport des folates

Les folates alimentaires existent sous forme de polyglutamates et doivent être hydrolysés par la glutamate carboxypeptidase II (GC II) avant de pouvoir être absorbés par les cellules intestinales. Dans la bordure en brosse de l'intestin grêle, les polyglutamates sont clivés en monoglutamates par la glutamyl hydrolase, et transformés, pour la majeure partie, en méthyl THF, forme plasmatique circulante.

En raison de la charge négative des folates au pH physiologique, leur diffusion passive est minimale à travers la membrane cellulaire. Des systèmes spécifiques de transport sont requis pour l'absorption et le transport des folates à l'intérieur de la cellule. L'absorption des folates (sous la forme de méthyl-THF) au niveau de l'intestin est effectuée par un transporteur spécifique appelé 'Reduced Folates Carrier' (RFC, symbole du gène *SLC19A1*). RFC qui fait partie de la superfamille des transporteurs de solutés, est un échangeur anionique jouant un rôle majeur dans l'absorption des folates au niveau intestinal (Balamurugan and Said, 2006). Deux récepteurs des folates ($FR\alpha$ et $FR\beta$) incorporés dans la membrane cellulaire servent au transport des folates à pH neutre ou légèrement acide. $FR\alpha$ et $FR\beta$ transportent les folates par un mécanisme d'endocytose.

Récemment, un troisième transporteur des folates a été identifié : le PCFT (*Proton-couple folate transporter*, symbole du gène *SLC46A1*). PCFT appartient aussi à la superfamille des transporteurs de solutés et fonctionne de façon optimale à pH acide (Qiu *et al.* 2006).

Il est démontré que PCFT représente le transporteur idéal des folates à pH acide dans de nombreux tissus normaux et tumoraux, plus particulièrement dans l'intestin grêle (Min *et al.* 2008). Le rôle majeur de PCFT dans le transport des folates au niveau intestinal a été démontré par l'identification de deux mutations dans le gène *PCFT* chez des patients souffrant d'une malabsorption héréditaire des folates (Andres *et al.* 2004).

Les folates, sous la forme de 5-méthyl-THF entrent dans la circulation puis sont transportés vers le foie, principal organe de stockage des folates. Le pancréas représente le deuxième réservoir le plus important des folates.

Le schéma simplifié du transport intestinal des folates est représenté sur la **Figure I.14**.

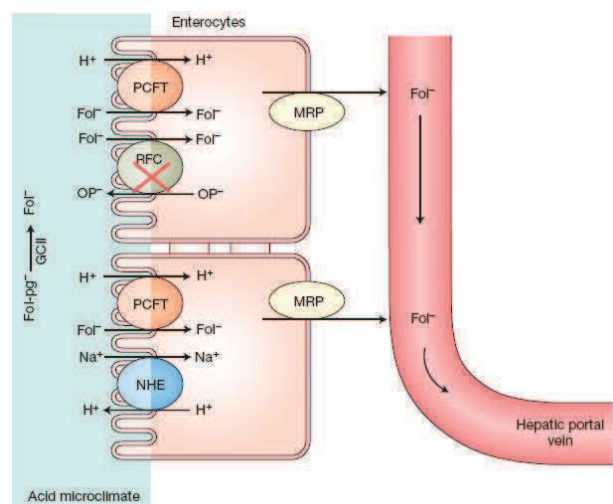


Figure I.14. Absorption intestinale des folates alimentaires (Zhao, R. *et al.* 2009)

Les polyglutamates ($Fol-pg^-$) sont hydrolysés en monoglutamate (Fol^-) par le glutamate carboxypeptidase II (GCII), puis transporté dans cellules via le transporteur PCFT. L'hydrolyse et le transport requiert un environnement acide. RFC est

exprimé à la bordure en brosse, mais comme indiqué par la croix rouge il n'est pas fonctionnel au pH de cette région. Folate Cellulaire quitter la membrane basale des entérocytes par un mécanisme qui implique probablement la protéine MRP.

1.3.2. La vitamine B12

1.3.2.1. Découverte de la vitamine B12

La vitamine B12, également désignée par le terme cobalamine, appartient au groupe des vitamines polaires hydrosolubles contenant du cobalt.

Elle n'est synthétisée que par les microorganismes (bactérie, levures etc.). Elle est donc apportée chez l'homme que par l'alimentation.

La découverte de la vitamine B12 remonte en 1929 par Castle qui a montré son importance dans le traitement de l'anémie pernicieuse par administration du foie de veau combiné à du suc gastrique provenant d'individus sains. Castle a suggéré que l'effet dépendait de deux facteurs : le facteur exogène apporté par l'alimentation sous forme de foie ou de viande qu'il a appelé « facteur extrinsèque » qui est de la vitamine B12. Plus tard elle est purifiée sous forme de cyano-cobalamine dans les années 1950. Le second facteur endogène appelé « facteur intrinsèque » (FI) qui permettait cet effet curatif est contenu dans le suc gastrique.

Les cobalamines exogènes proviennent essentiellement d'aliments d'origine animale (foie, rognons, poissons etc.).

1.3.2.2. Structure et formes de la vitamine B12

La vitamine B12 est une macromolécule contenant un atome de cobalt d'où son nom de cobalamine (cbl). L'ion cobalt est entouré par un noyau corrine formé de quatre molécules de pyrole. Les cobalamines existent sous diverses formes suivant la nature du substituant qui se trouve sur l'ion cobalt. On obtient :

- (1) la cyanocobalamine (CNCbl) lorsque le substituant est du cyanure,
- (2) l'hydroxycobalamine (OHCbl) lorsqu'on a un groupement hydroxyle sur l'ion cobalt,
- (3) la méthylcobalamine (MeCbl) lorsque l'ion cobalt porte un groupement méthyle,
- (4) l'adénosylcobalamine (AdoCbl) lorsque l'ion cobalt porte le groupement 5-désoxyadénosyl.

La structure de la vitamine B12 ainsi que ses diverses formes sont représentées sur la **Figure I.15** ci-dessous.

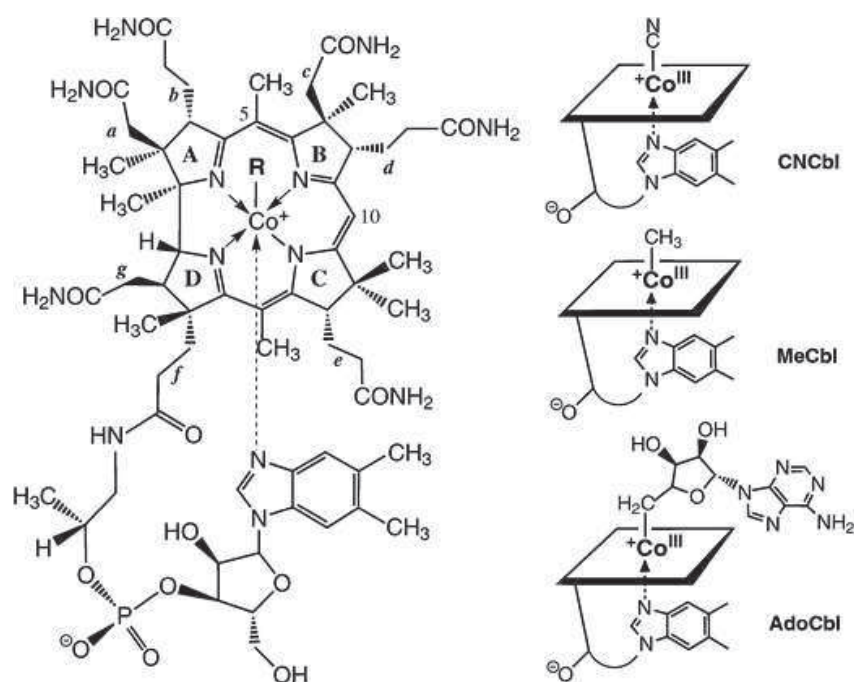


Figure I.15. Structure de la cobalamine avec ses principales formes

Deux formes majeures de cobalamines sont identifiées chez l'homme : la méthylcobalamine et l'adénosylcobalamine.

— La MeCbl, cofacteur de la méthionine synthase (MS), représente la principale forme circulante de la vitamine B12 (60 à 80 % de la vitamine B12 plasmatique totale).

— L'adoCbl représente la forme tissulaire principale ; son taux circulant est faible. Elle permet l'activation de la méthylmalonyl coenzyme A mutase (MMCoA mutase).

1.3.2.3. Apport nutritionnel conseillé en vitamine B12

Les besoins journaliers en cobalamine varient suivant l'âge : 0,5 µg/j chez le nourrisson, homme et femme adulte 2,4 µg/j, 2,6 µg/j ; chez la femme enceinte et 2,8 µg/j chez la femme allaitante (**Tableau I.3**). Ils sont largement couverts par une alimentation équilibrée comportant les protéines animales. Les réserves du corps humain sont estimées entre 2 et 5 mg de cobalamines stockées principalement dans le foie et les muscles. Les carences ne sont généralement pas liées à un déficit d'apport, mais concerne surtout une malabsorption au niveau du tube digestif mettant en jeu le facteur intrinsèque (FI) et l'haptocorrine (HC).

Tableau I.3. Besoin en vitamine B12 suivant l'âge et le sexe

Catégorie	ANC (µg/jour)
Nourrisson	0,5
Enfant de 1 à 12 ans	0,8 à 1,9
Adolescent de 13 à 19 ans	2,4
Homme adulte	2,4
Femme adulte	2,4
Femme enceinte	2,6
Femme allaitante	2,8
Personnes âgées	3

Source : Martin A. 2000. Apports nutritionnels conseillés pour la population française, 3^e édition

1.3.2.4. Métabolisme de la vitamine B12

1.3.2.4.1. Absorption et transport de la vitamine B12

La cobalamine alimentaire est liée à des protéines alimentaires et doit donc être libérée de son complexe protéique par l'acidité et les enzymes gastriques. Après être libérée de son complexe protéique, elle se lie à une glycoprotéine : l'haptocorrine. L'haptocorrine encore appelée protéine R ou transcobalamine I et III (TCI+TCIII) est une glycoprotéine de 120 kDa découverte par Gräsbeck dans le suc gastrique que l'on retrouve aussi dans nombre de fluides biologiques (salive, liquide amniotique, bile, plasma sanguin etc.).

C'est sous la forme Cbl–R qu'elle circule dans le tractus digestif (**Figure I.16**). Au niveau de la partie haute de l'intestin grêle, les protéases pancréatiques dégradent partiellement l'haptocorrine et la cobalamine ainsi libérée se complexe à un autre transporteur appelé facteur intrinsèque (FI) qui est sécrété par les cellules pariétales gastriques.

Le complexe Cbl–FI migre jusqu'à l'iléon terminal grâce au péristaltisme intestinal et se fixe par sa partie protéique sur la cubiline, récepteur cellulaire spécifique localisé à la surface des entérocytes. Le complexe Cbl–FI pénètre dans l'entérocyte par endocytose où il y est dissocié. Cette absorption se fait suivant un mécanisme de transport actif, saturable et très spécifique. Elle est lente car 8–12 heures sont nécessaires pour que la cobalamine se retrouve dans la circulation sanguine.

La Cbl quitte l'entérocyte lié à un autre transporteur protéique : la transcobalamine II (TC II), une protéine synthétisée par l'hépatocyte et transportant la majorité de la vitamine B12 aux cellules

utilisatrices. Les différentes protéines intervenant dans le transport et l'absorption des cobalamines sont décrites sur la **Figure I.16** ci-dessous.

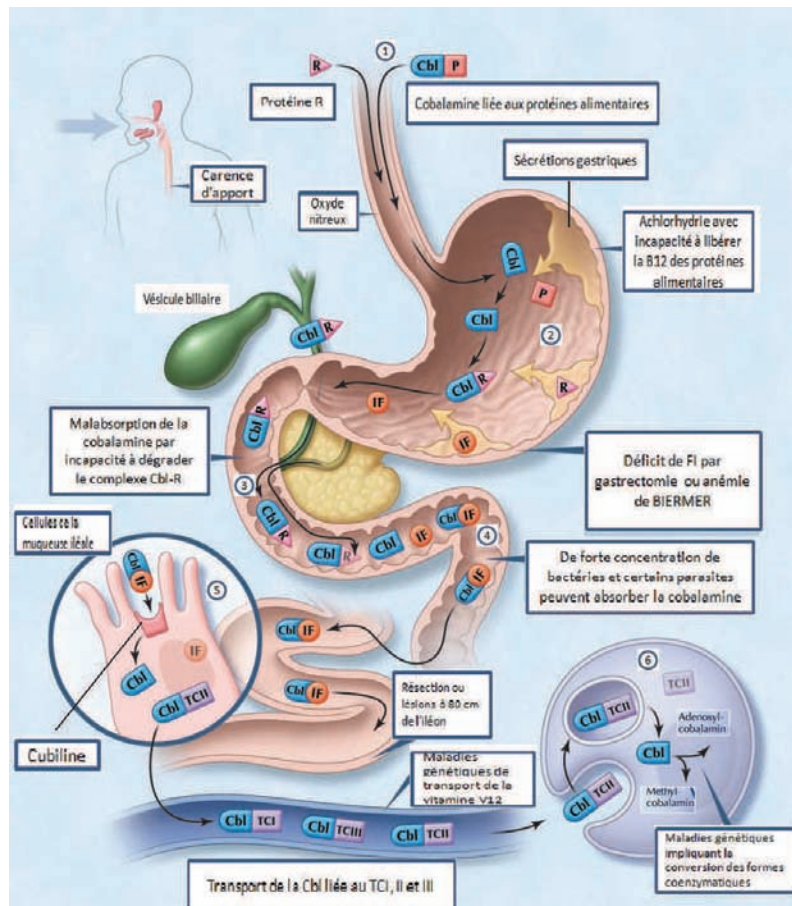


Figure I.16. Métabolisme et causes du déficit en cobalamine (Chanarin and Metz 1997)

(1) La voie métabolique commence quand lors que la cobalamine (Cbl) alimentaire entre dans l'estomac lié aux protéines animales (P). (2) Libération de la Cbl dans l'estomac par hydrolyse enzymatique (acide chlorhydrique et pepsine). La majeure partie de la Cbl libre est alors liée à la protéine R-(R), sécrétée par les cellules pariétales et salivaires. Le facteur intrinsèque (FI) est également sécrété dans l'estomac, mais sa liaison à la cobalamine est faible, en présence de la protéine R gastrique et salivaire. (3) Dans le duodénum, la cobalamine alimentaire liée à la protéine R rejoint le complexe cobalamine- protéines R été sécrété dans la bile. Les enzymes pancréatiques dégradent la cobalamine alimentaire et biliaires, générant ainsi la cobalamine libre. (4) La cobalamine se lie alors avec facteur intrinsèque. Le complexe facteur intrinsèque-cobalamine reste intact jusqu'à 80 cm de l'iléon distale où (5) il se lie à des récepteurs cellulaires des muqueuses (cubiline) et ensuite la cobalamine se lie aux protéines de transport comme la transcobalamine I, II et III (TCI, TCII et TCIII). La TCII, bien qu'elle ne représente qu'une petite fraction (environ 10 %) des transcobalamines, est la plus importante car elle est capable de délivrer la cobalamine à toutes les cellules du corps. La cobalamine est ensuite transporté par voie systémique via le système porte. (6) Dans chaque cellule, le complexe TCII-cobalamine est repris par

endocytose et la cobalamine libérée est ensuite convertie enzymatiquement sous deux formes de coenzymes : la méthylcobalamine et l'adénosylcobalamine.

1.3.2.4.2. Distribution des Cbl par la transcobalamine II

La Cbl est apportée aux cellules de l'organisme par l'intermédiaire de la circulation sanguine, et ce grâce à trois protéines de transport : les transcobalamines I, II et III. TC I et III transportent la Cbl vers les organes de réserve (foie), alors que la TC II, synthétisée en partie par les hépatocytes, assurent le transport de la Cbl vers les cellules utilisatrices (moelle osseuse). La TC II, une protéine de 38 kDa synthétisée par plusieurs cellules (hépatocytes, macrophages, fibroblastes etc.), transporte 10 à 30 % de méthyl-Cbl.

L'entrée des Cbl dans la circulation sanguine est facilitée par leur liaison à la TC II qui se fait en deux étapes : la première étape nécessite la présence d'ions calcium, alors que la deuxième étape plus lente consiste en l'internalisation par endocytose du complexe TCII–Cbl suivi de la dégradation de la TC II au niveau des lysosomes. La Cbl ainsi libérée est convertie en MeCbl au niveau du cytoplasme ou en AdoCbl dans la mitochondrie.

1.3.2.5. Fonctions des cobalamines

1.3.2.5.1. Action des cobalamines sur les enzymes B12-dépendantes

Les cobalamines sous la forme de méthylcobalamine (Me–Cbl), forme majeure circulante de la vitamine B12, représentent un cofacteur indispensable pour la méthionine synthase ou la N⁵ méthyltétrahydrofolate-homocystéine-méthyltransférase. Cette dernière catalyse la conversion de l'Hcy en méthionine (**Figure I.17**). Cette réaction permet la régénération de l'acide tétrahydrofolique, forme active indispensable à la synthèse des thymidylates de l'ADN. Il y a donc une interrelation entre les taux de folates et vitamine B12 : une carence en cobalamine aura des répercussions sur le métabolisme des folates. En effet, un déficit de Me-Cbl entraîne une accumulation de l'acide N⁵ méthyl-THF, aux dépens de THF libre, provoquant un blocage de la conversion de dUMP en dTMP (**Figure I.12**).

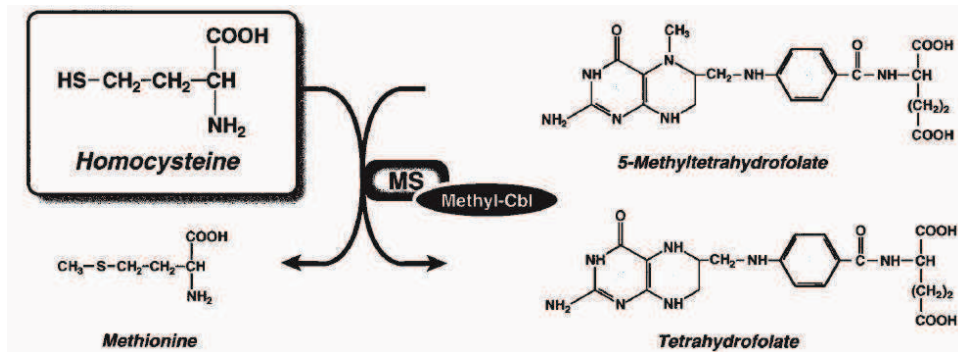


Figure I.17. Reméthylation de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthase

Sous la forme d'adénosylcobalamine (ado-Cbl), la vitamine B12 constitue un cofacteur de l'enzyme méthylmalonyl coenzyme A mutase qui catalyse la transformation du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA qui transformé en acide succinique entre dans le cycle de Krebs (**Figure I.18**). La Me-Cbl est majoritaire dans le plasma, tandis que l'ado-Cbl l'est dans le tissu hépatique.

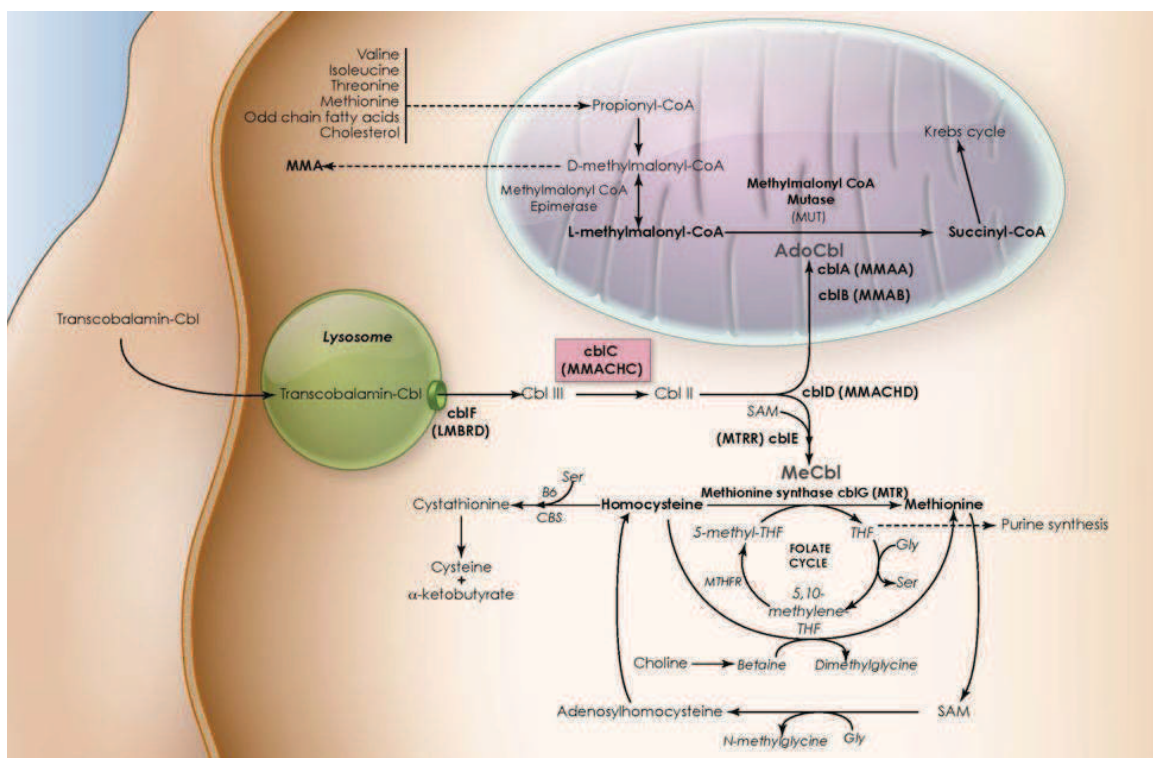


Figure I.18. Métabolisme intracellulaire des cobalamines et voies interconnectées (Carrillo-Carrasco *et al.* 2012)

Abréviations : AdoCbl : 5'-déoxyadénosylcobalamine, CBS : Cystathionine beta synthase ; Gly : Glycine ; Me-Cbl : Méthylcobalamine ; MMAA : gène responsable de l'acidémie méthylmalonique, type cblA ; MMAB : gène responsable de

l'acidémie méthylmalonique, type cblB ; MMACHC : gène responsable de la méthylmalonique acidémie et l'homocystinurie, type cblC ; MMADHC : gène responsable de l'acidémie méthylmalonique et/ou l'homocystinurie, type cblD ; MUT : méthylmalonyl-CoA mutase ; MTR : 5-méthyltétrahydrofolate-homocystéine méthyltransférase aussi connu comme la méthionine synthase ; MTRR : la méthionine synthase réductase ; SAM : S-adenosylméthionine ; Ser : Serine ; THF : tétrahydrofolate

Dans le cytoplasme, l'atome de cobalt qui est trivalent, cob(III)alamine subit une réduction pour devenir divalent : cob(II)alamine. Ce dernier peut être méthylé pour former le Me-Cbl et se lier à la méthionine synthase. Dans la mitochondrie, cob(II)alamine peut être réduite en cob(I)alamine convertie en désoxyadénosyl-cobalamine par la 5'adénosyl-transférase.

1.3.2.6. L'homocystéine et l'acide méthylmalonique (MMA), deux marqueurs métaboliques de la carence en cobalamine et en folates

Dans la circulation sanguine, la vitamine B12 se trouve principalement liée aux deux protéines de transport : la transcobalamine et l'haptocorrine et seulement une petite fraction liée à la transcobalamine II (environ 10 à 25 %) est bio-disponible.

Les mesures des taux sériques de vitamine B12 ont une spécificité et une sensibilité limitées pour évaluer les réserves de vitamine B12. La confirmation d'une réelle carence en vitamine B12 est réalisée par dosages combinés de l'holo-transcobalamine (Holo-TC ; transcobalamine associée à la vitamine B12), de l'acide méthylmalonique (MMA) et de l'Hcy. La combinaison de ces dosages permet d'éclaircir une suspicion clinique d'hypovitaminose. Un déficit de vitamine B12 entraîne une diminution du taux d'Holo-TC, tandis que les concentrations de MMA et d'Hcy augmentent suite aux perturbations touchant leur transformation en succinate et en méthionine, respectivement.

Le taux sérique de MMA constitue un marqueur sensible et spécifique pour le dépistage précoce ou la confirmation d'une carence en cobalamine. Le taux de MMA augmente dès les premiers instants de la carence en cobalamine, avant même que les concentrations de la vitamine B12 ne s'abaissent de manière mesurable (Holleland *et al.* 1999).

Une corrélation forte entre les concentration en MMA et d'Hcy a été rapportée, et la sensibilité du taux d'Hcy pour identifier carence en vitamine B12 est supérieure à 95 % (Berger *et al.* 2008).

1.4. Altérations épigénétiques et stabilité et génomique

1.4.1. Définition du terme ‘épigénétique’

Le terme ‘épigénétique’ désigne l’ensemble des modifications stables qui sont transmises au cours des divisions cellulaires, et qui modulent l’activité du génome sans aucun changement de sa séquence (Shervington and Patel 2008).

Les supports de l’information épigénétique sont nombreux, mais deux sont particulièrement importants : les histones - protéines basiques assemblées en octamères autour duquel s’enroule l’ADN - et la molécule d’ADN elle-même. L’ADN lui-même est la cible d’une seule modification épigénétique : la méthylation des cytosines situées dans les îlots CpG (l’ajout d’un groupement méthyle s’effectuant presque invariablement sur le carbone 5 du cycle pyrimidique). Par contre, un grand nombre de résidus des molécules d’histones peuvent subir des modifications biochimiques, telle que l’acétylation et la méthylation. Au cours de ce travail nous n’avons étudié que la méthylation de l’ADN. La réaction de formation de la 5-méthylcytosine est décrite sur la **Figure I.19**.

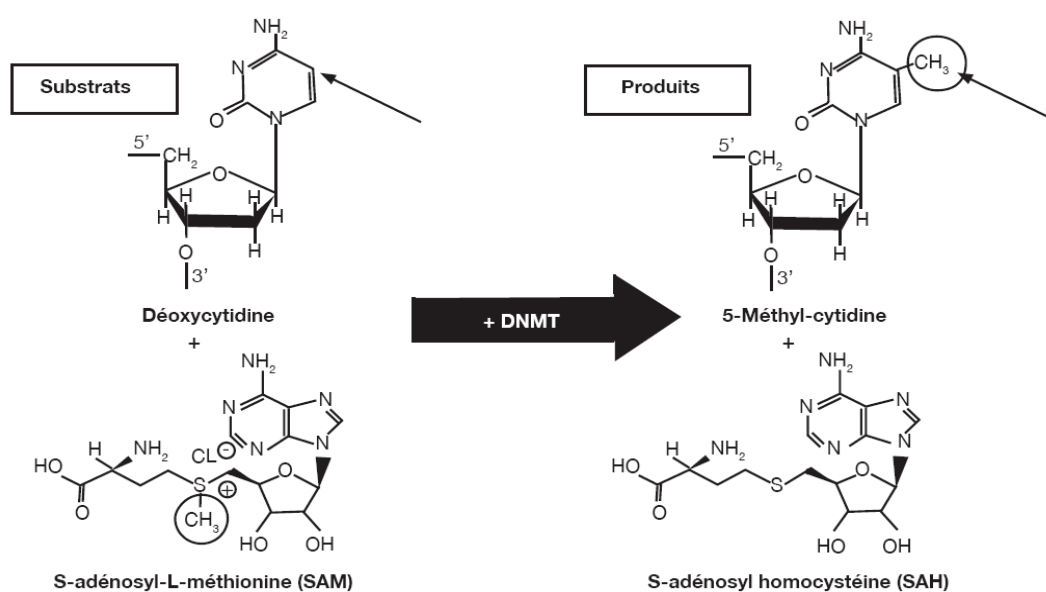


Figure I. 19. Réaction de la méthylation de la cytosine par les ADN méthyltransférase (DNMTs)

1.4.2. Profils de méthylation de l’ADN

Le profil de méthylation de l’ADN est stable et transmissible par mitose et parfois par méiose. Plusieurs patterns de méthylation sont observés dans la cellule :

(1) la méthylation *de novo* : elle joue un rôle important dans le développement. Cette forme de méthylation intervient dans la méthylation des gènes zygotiques au stade blastocystes avant

l'implantation du zygote (**Figure I.20**). En effet, après la fécondation, il se produit une vague de déméthylation complète des séquences codantes et des séquences répétées ; n'affectant pas les gènes soumis à empreinte génétique. Les groupements méthyles sont transférés en des sites spécifiques grâce à l'ADN méthyltransférase 3 (DNMT3a, DNMT3b),

(2) la méthylation de maintenance qui intervient pendant la réplication de l'ADN pour conserver le profil de méthylation sur le nouveau brin synthétisé. Cette méthylation dite de maintenance est assurée par les DNMT1,

(3) la déméthylation active en l'absence de réplication d'ADN via un processus enzymatique (Baylin and Herman 2000),

(4) la déméthylation passive, correspondant à une suppression de l'activité de méthylation de maintenance, entraînant ainsi une diminution de 50 % du niveau de méthylation pendant chaque cycle de réplication d'ADN. Après fécondation, le profil de méthylation hérité des parents est effacé pour permettre la mise en place d'un nouveau profil de méthylation : c'est la déméthylation globale.

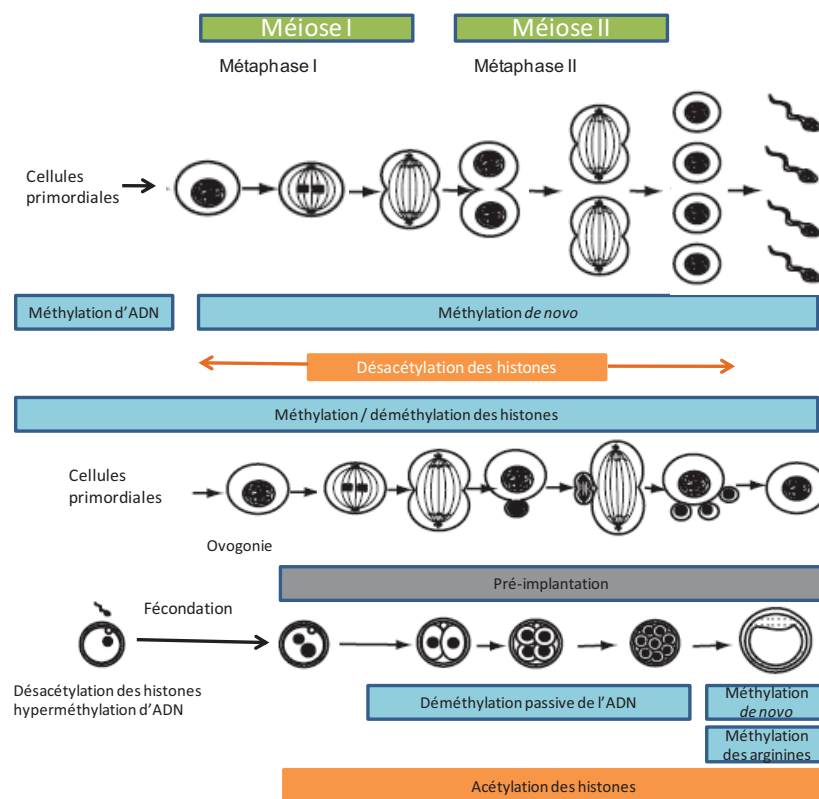


Figure I.20. Modifications épigénétiques pendant le développement

1.4.3. Rôles de la méthylation de l'ADN

Le rôle de la méthylation d'ADN chez les eucaryotes est complexe. Cependant, il est bien accepté que la méthylation d'ADN intervient dans le verrouillage de l'expression génique, et joue, par conséquent, un rôle important dans le processus de la carcinogenèse. En effet, une méthylation aberrante peut perturber l'expression des gènes suppresseurs de tumeur ainsi que ceux impliqués dans la réparation de l'ADN, prédisposant ainsi à des altérations génétiques et à un processus de tumorigenèse comparable à celui induit par les mutations génétiques (Baylin and Herman 2000 ; Laird 2003). Toutefois, il a été démontré que la méthylation d'ADN n'est pas un mécanisme de répression par défaut puisque certains promoteurs inactifs restent non méthylés (Weber 2008). Par exemple, 5 % des îlots CpG sont méthylés dans les fibroblastes ; ce qui n'est pas le cas des cellules germinales. Ces observations suggèrent que la méthylation d'ADN contribue à la régulation d'un nombre restreint de gènes au cours du développement (Weber 2008).

La méthylation joue un rôle majeur dans l'établissement de l'empreinte parentale, l'inactivation du chromosome X chez les mammifères femelles et le maintien de la stabilité chromosomique.

1.4.4. Déterminants de la méthylation d'ADN

Le niveau de la méthylation d'ADN dépend de plusieurs facteurs : les enzymes utilisant la SAM comme donneur de groupement méthyles aussi appelées ADN méthyltransférases (DNMTs); les facteurs démographiques (âge, sexe), nutritionnels (consommation d'alcool) et environnementaux (pollution de l'air et fumée de tabac).

1.4.4.1. Les ADN méthyltransférases (DNMTs)

Trois familles de DNMTs agissent de façon coordonnée pour réguler la méthylation de l'ADN chez les mammifères. Ce sont : DNMT1, DNMT3a et DNMT3b.

DNMT1 ou DNMT de maintenance intervient dans la méthylation de l'ADN au cours des divisions. DNMT3a et DNMT3b interviennent plutôt dans la méthylation de novo, des séquences régulatrices de l'expression des gènes et des séquences satellites.

1.4.4.2. Facteurs démographiques

1.4.4.2.1. L'âge et le sexe

Plusieurs évidences suggèrent que le niveau global de la méthylation d'ADN varie avec l'âge (Fuke *et al.* 2004 ; Bjornsson *et al.* 2008). Une hypométhylation statistiquement significative a été observée chez les sujets âgés par rapport aux sujets plus jeunes (Fuke *et al.* 2004). En revanche

une autre étude cas témoins sur le cancer de la vessie n'a trouvé aucune influence de l'âge sur le niveau global de m⁵dC (Moore *et al.* 2008).

Des études ont aussi rapporté une corrélation entre le niveau de m⁵dC de séquences répétées (LINE-1 et Alu) avec l'âge. Une seule étude a montré une corrélation entre l'âge et la méthylation de LINE-1 (Bollati *et al.* 2009). Et plusieurs autres études n'ont pu confirmer l'influence de l'âge sur le niveau de méthylation de LINE-1 (Wilhelm *et al.* 2010 ; Hsiung *et al.* 2007).

Les variations inter-individuelles de niveau de m⁵dC sont estimées entre 5 et 25 % pour les séquences répétées d'ADN (El-Maarri *et al.* 2007).

Nombre d'études ont rapporté une hyperméthylation globale d'ADN chez des sujets de le sexe masculin par rapport au sexe féminin (Zhu, Z. Z. *et al.* 2012 ; Fuke *et al.* 2004). Toutefois, cette observation n'a pu être répliquée dans d'autres travaux (Moore *et al.* 2008). L'influence du sexe sur le niveau de m⁵dC a été confirmée pour certains gènes comme *CALCA*, *MGMT*, *MTHFR* (Sarter *et al.* 2005).

1.4.4.3. Les facteurs environnementaux.

Plusieurs études chez l'homme ont montré une association entre la méthylation de l'ADN et les polluants environnementaux, notamment le benzène, les polluants organiques persistants, le plomb, l'arsenic et les contaminants de l'air.

1.4.4.3.1. Le benzène et le plomb

L'exposition au benzène à faible dose était associée à une hypométhylation de *LINE-1* ; *MAGE-1* et des séquences Alu, mais à une hyperméthylation de *p15* (Bollati *et al.* 2007). Par exemple, le niveau de méthylation de *p16* (mais pas de la *p15*) était plus élevé chez 11 patients souffrant d'une intoxication au benzène que dans un groupe témoin (Xing *et al.* 2010).

Une étude de cohorte mexicaine a rapporté une relation inverse entre le niveau de la méthylation des séquences répétées (Alu et LINE-1) et l'exposition maternelle au plomb dans la période prénatale (Pilsner *et al.* 2009).

1.4.4.3.2. Pollution de l'air

L'exposition à long terme aux particules fines de l'air (*PM10*) altère de profil de méthylation des séquences *Alu* et *LINE-1* (Tarantini *et al.* 2009). Cette étude a rapporté qu'une exposition prolongée aux PM 2,5 µm, particules de sulfates et de charbon noir était associée à une hypométhylation de *LINE-1* et Alu (Madrigano *et al.* 2011).

1.4.4.3.4. La fumée de tabac

L'exposition aux carcinogènes de la fumée de cigarette est associée à la formation des adduits d'ADN, de micronoyaux, des aberrations chromosomiques, telles que les échanges de chromatide sœur et coupures de brin d'ADN (DeMarini 2004). Par ailleurs, les ADN méthyltransférases ont une forte affinité pour les lésions d'ADN, ce qui entraîne une méthylation différentielle au niveau de ces régions ; ce qui suggère un autre mécanisme moléculaire de méthylation aberrante de l'ADN par une exposition aux carcinogènes (Mortusewicz *et al.* 2005). L'analyse de l'influence du tabagisme sur le niveau global de m⁵dC n'a montré aucune différence de niveau de m⁵dC (Hillemacher *et al.* 2008 ; Moore *et al.* 2008 ; Choi *et al.* 2009). De plus, le niveau de m⁵dC de séquences répétées comme LINE-1, Alu et AluYb8 ne diffère pas entre fumeurs actif, non-fumeurs ou ex-fumeurs (Kim, K. Y., Kim *et al.* 2010 ; Wilhelm *et al.* 2010 ; Zhu, Z. Z. *et al.* 2010 ; Hsiung *et al.* 2007 ; Rusiecki *et al.* 2008 ; Figueiredo *et al.* 2009). L'analyse de la méthylation globale d'ADN chez les enfants ainsi que chez les adultes a montré que l'exposition prénatale (*in utero*) à la fumée de cigarette était associée à une augmentation du niveau de m⁵dC (Terry *et al.* 2008).

1.4.4.3.5. L'alcool

La consommation d'alcool peut diminuer le niveau de méthylation d'ADN dans le tissu hépatique par une perturbation du métabolisme des folates et/ou la synthèse de la méthionine, qui pourrait diminuer les niveaux du donneur universel de groupements méthyles, la S-adénosylméthionine (SAM) (Hamid *et al.* 2009). Une consommation excessive d'alcool était associée à une altération du niveau de méthylation d'ADN. Chez les patients souffrant d'alcoolisme, les séquences CCGG avait un niveau de méthylation 8–10 % plus élevé par rapport aux témoins (Bonsch *et al.* 2004 ; Bleich *et al.* 2006). Une association inverse a été rapportée entre la consommation d'alcool et le niveau de méthylation d'Alu (Zhu, Z. Z. *et al.* 2010). D'autres études n'ont rapporté aucune association entre la consommation d'alcool et la méthylation de LINE-1 (Kim, K. Y., Kim *et al.* 2010 ; Zhu, Z. Z. *et al.* 2010 ; Hsiung *et al.* 2007).

1.4.4.4. Les folates

Les folates maintiennent la stabilité génomique en régulant la biosynthèse, la réparation et la méthylation de l'ADN (Kim, Y. I. 2007). L'apport en folates ainsi que le niveau plasmatique en folate sont fortement corrélés au niveau de la méthylation d'ADN (Jacob *et al.* 1998 ; Fowler *et al.* 1998 ; Fenech *et al.* 1998). Sous la forme de 5-méthyltétrahydrofolate, les folates participent à reméthylation de l'Hcy en méthionine qui est un précurseur de la SAM, donneur de groupement

méthyle pour la plupart des réactions de méthylation, dont celle de l'ADN (**Figure I.12**). Après le transfert du groupe méthyle, SAM est converti en S-adénosylhomocystéine (SAH), un puissant inhibiteur de la plupart des SAM-méthyltransférases dépendantes. Ainsi, l'atténuation de la reméthylation de la SAH en SAM dans le cycle de la méthionine peut perturber le niveau de méthylation d'ADN. Il est bien documenté, qu'une carence en folates est associée à une hypométhylation d'ADN nouvellement synthétisé, et une surexpression des proto-oncogène (James *et al.* 2003). Et l'ADN hémiméthylé est progressivement remplacé par un ADN double brin non méthylé, même en cas un retour à un régime riche en folates (Rampersaud *et al.* 2000). Une diminution de la concentration en folates (de l'ordre de 118 µg/jour), sur une période de 7 semaines, était associée à une diminution du niveau global de la méthylation d'ADN de l'ordre de 10 % (Rampersaud *et al.* 2000). Au niveau tissulaire ou plasmatique, une diminution des taux de folates est fortement associée à une hypométhylation d'ADN aussi bien dans des tissus normaux que tumoraux (Fowler *et al.* 1998). Aucune corrélation significative n'est obtenue entre les niveaux de méthylation d'ADN, de folates érythrocytaire ainsi que les concentrations plasmatiques d'Hcy chez les sujets avec un statut adéquat en folates (Pufulete *et al.* 2003). Chez des sujets apparemment bien portant, une supplémentation en folates de l'ordre de cinq fois les besoins quotidiens journaliers, normalement suffisant pour réparer les dommages d'ADN, était sans effet sur le niveau de la méthylation d'ADN lymphocytaire (Kim, Y. I. 2004). L'influence du taux de folates sur la méthylation d'ADN génomique peut donc dépendre : (1) du degré de carence (niveau d'épuisement du stock) en folates ; (2) de la supplémentation ou non folates, et (3) du type de tissu (Jost and Jost 1995 ; Weiss, A. *et al.* 1996).

1.5. Le carcinome hépatocellulaire (CHC)

1.5.1. Taux d'incidence et de mortalité du carcinome hépatocellulaire dans le monde

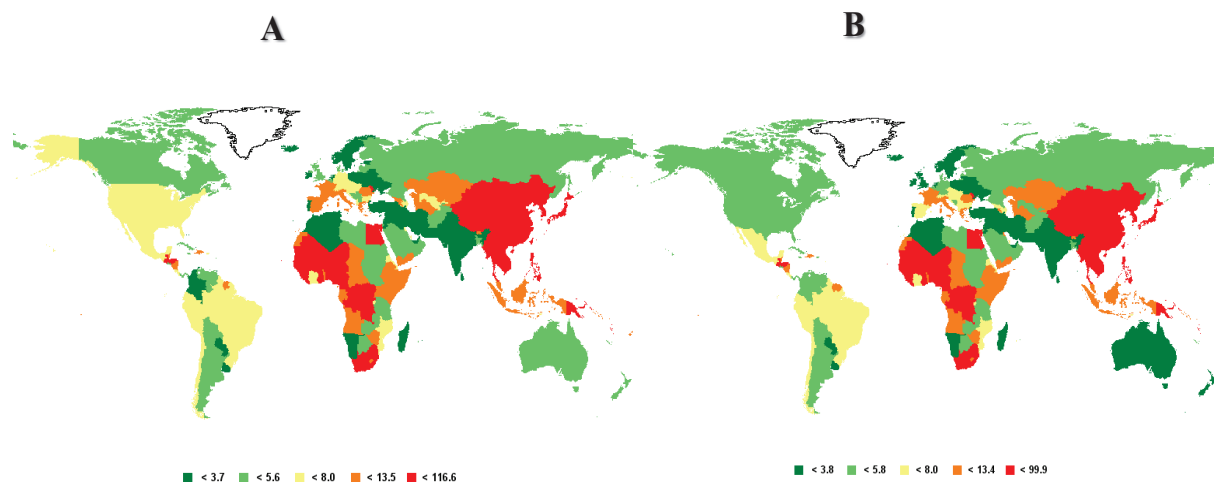


Figure I.21. Taux d'incidence et mortalité liés au carcinome hépatocellulaire ajustés sur l'âge dans le monde en 2008/100.000 habitants (d'après Ferlay *et al.* 2010)

Note. A : taux d'incidence et B : taux de mortalité

Le CHC représente le principal cancer primitif du foie qui se développe le plus souvent dans le cadre d'une cirrhose ou d'une hépatopathie chronique.

Le cancer du foie représentait, en 2008, le cinquième cancer le plus fréquent chez les hommes, avec 522.000 cas (soit 7,9 % du total) et le septième cancer chez les femmes avec 226.000 cas, soit 6,5 % du total (Ferlay *et al.* 2010) (**Figure I.21**). L'incidence la plus forte est rapportée dans les pays en développement, avec une forte prévalence masculine et un sexe ratio homme/femme de 2,4. L'incidence du CHC est très hétérogène suivant les régions du monde : la plus forte incidence était rapportée à l'Est et au Sud-Est d'Asie, en Afrique de l'Ouest, mais aussi en Malaisie (Parkin *et al.* 2001) (**Figure I.21**). Une incidence annuelle supérieure à 30/100.000 habitants, voire 120/100 000 habitants a été rapportée dans les régions les plus touchées (Ferlay *et al.* 2010).

Dans les pays développés, l'incidence du CHC est faible, à l'exception de l'Europe du Sud où l'incidence chez les hommes est nettement plus élevée (9,8/100.000) par rapport à la tendance observée dans d'autres pays développés (**Figure I.21**).

On estimait à 696.000 décès dus au cancer du foie en 2008, avec 478.000 cas chez les hommes, contre 218.000 chez les femmes (Ferlay *et al.* 2010).

Mondialement, en 2008, le cancer du foie était la troisième cause de décès par cancer. La répartition géographique des taux de mortalité est comparable à celle observée pour l'incidence.

En France, on estime à 5000 à 6000 le nombre de nouveaux cas de CHC chaque année (Parkin *et al.* 2001 ; El-Serag and Rudolph 2007 ; Long *et al.* 2009 ; Wild and Montesano 2009), le CHC était en 2000 le deuxième cancer digestif chez l'homme après les cancers colorectaux.

1.5.2. Facteurs aggravants le risque de carcinome hépatocellulaire

Aux fortes disparités géographiques de l'incidence de CHC sont associées une diversité de facteurs étiologiques :

- en Afrique subsaharienne et en Asie du sud-est, le virus de l'hépatite B (VHB) et une exposition à des carcinogènes chimiques alimentaires comme l'aflatoxine B1 (AFB1) constituent les principaux facteurs étiologiques du CHC (Umemura *et al.* 2009 ; Yuen *et al.* 2009) ;
- au Japon, le virus de l'hépatite C (VHC), VHB ainsi que le diabète sont les principaux facteurs associés au CHC (Yuan *et al.* 2004) ;
- dans les pays occidentaux ce sont l'alcool, le tabac, VHC et hémochromatose qui sont indépendamment associés au risque de CHC (Maddrey 2000).

1.5.2.1. Virus de l'hépatite B et C et leur rôle dans la carcinogenèse hépatique

À l'échelle mondiale, on estime à plus de 350 millions le nombre d'individus porteurs chroniques du virus de l'hépatite B (Mindikoglu and Miller 2009), et 170 millions du virus de l'hépatite C (Chen, C. J. *et al.* 2006). Ces données soulignent l'ampleur du nombre d'individus exposés au risque de développement de CHC dans le monde

Le rôle du VHB dans la carcinogenèse hépatique n'est pas encore totalement élucidé. Toutefois, il a été démontré une relation directe entre la charge virale de VHB et la survenue de CHC : l'incidence du CHC augmentant avec le niveau de charge du VHB, quelle que soit la sévérité de la pathologie hépatique sous-jacente (Chisari *et al.* 1989).

Deux mécanismes par lesquels le virus de l'hépatite B promeut le CHC ont été proposés : (1). un mécanisme indirect par l'inflammation, la nécrose hépatocytaire, et la régénération secondaire avec développement d'une hépatite chronique puis d'une cirrhose. La réaction immunitaire prolongée avec l'augmentation du turn-over hépatocytaire du fait de la clairance des cellules infectées ont certainement un rôle dans l'oncogenèse (Weiss, W. 1999). (2) Un mécanisme direct via les propriétés oncogéniques directes du virus de l'hépatite B. L'intégration du virus de l'hépatite B au génome de la cellule infectée, qui se produit aux étapes précoces de l'infection, est à l'origine de mutations insertionnelles, d'instabilité génétique, de réarrangements génomiques, d'altérations chromosomiques, d'activation d'oncogènes cellulaires.

Le virus de l'hépatite C, un autre facteur de risque majeur de CHC, est un virus à ARN dont le cycle intracellulaire est intra cytoplasmique, ce qui plaide pour un rôle oncogénique indirect. Une interaction complexe entre inflammation, stress oxydatif, stéatose, insulino-résistance et leurs conséquences semble jouer un rôle dans le développement du CHC chez les patients infectés par le virus de l'hépatite C.

1.5.2.2. La consommation d'alcool

La consommation d'alcool est le facteur étiologique prédominant dans le développement du CHC dans les pays développés. Il a été estimé que 32 % à 45 % des cas de cancer du foie sont attribuables à la consommation chronique et élevée d'alcool (Donato *et al.* 2002). Par exemple, une consommation supérieure à 80 g d'éthanol/j pendant au moins 5 ans augmente le risque de CHC de près de cinq fois (Donato *et al.* 2002). Le risque semble être proportionnel à la quantité d'alcool consommée.

Une étude prospective cas-témoins a rapporté que les grands buveurs, définis comme ceux consommant plus de 600 L d'alcool au cours de leur vie, ont un risque de CHC multiplié par cinq en comparaison avec les non-buveurs ou ceux qui ont consommé moins de 600 L d'alcool dans leur vie (OR : 5,19, IC 95 % : de 2,53 - 10,64) (Munaka *et al.* 2003).

1.5.2.3. Les mycotoxines

Secrétées par les champignons toxigènes, les mycotoxines contaminent les produits agroalimentaires de base et leurs dérivés dont se nourrissent les populations en Afrique et en Asie. Les aflatoxines, plus particulièrement l'aflatoxine B1 (AFB1) sont impliquées dans la survenue du CHC dans les pays en voie de développement (Chuang *et al.*, 2009). Il a été suggéré qu'un apport important d'AFB1 majorait le risque de CHC chez les patients infectés par le VHB (Groopman *et al.*, 1996; Bruix *et al.*, 2001). Il a été observé que les zones à forte prévalence de CHC avec une ingestion élevée d'aflatoxines correspondent également à des zones où l'infection à VHB est endémique, et que les patients les plus à risque de développer un CHC sont ceux qui sont exposés à la fois au VHB et à l'AFB1 (Groopman *et al.*, 1996). Après son ingestion, l'AFB1 est transformé en un époxyde (AFB-exo-8,9, époxyde) qui se lie à l'ADN pour produire des mutations au sein de plusieurs gènes, comme par exemple le gène suppresseur de tumeur, *p53*. En effet, la mutation de *p53* a été rapportée dans 50 % des tumeurs de CHC en Afrique du Sud, où l'AFB1 est un facteur de risque majeur du CHC (Bressac *et al.*, 1991).

1.5.3. SNPs des gènes de la réparation d'ADN et du MMC avec le risque de CHC

1.5.3.1. Polymorphismes des gènes de la réparation d'ADN et carcinome hépatocellulaire

L'instabilité génomique est un trait caractéristique du CHC et son implication dans la transformation maligne a été suggérée par plusieurs études (Calvisi *et al.* 2004 ; Farazi and DePinho 2006). Les CDBs d'ADN constituent une menace potentielle pour l'intégrité du génome et l'inactivation de leur réparation favorise une croissance cellulaire incontrôlée et un risque accru de cancer (Khanna and Jackson 2001).

Les polymorphismes génétiques au sein des gènes de la réparation d'ADN peuvent influencer les capacités individuelles à réparer les lésions d'ADN, ce qui peut entraîner une augmentation du niveau des lésions d'ADN et par conséquent potentialiser le risque de cancer.

Peu d'études ont évalué l'influence des polymorphismes des gènes candidats à la réparation d'ADN sur le risque de CHC. À ce jour, les systèmes étudiés sont : BER, NER et DSB.

1.5.3.1.1. SNPs des gènes de la voie BER et risque de carcinome hépatocellulaire

Parmi les gènes intervenant dans la voie BER, seuls les polymorphismes de *XRCC1* (*X-ray Repair Cross Complementing group 1*) ont été analysés en lien avec le CHC. *XRCC1* code pour une protéine impliquée dans la réparation des cassures simple brin d'ADN (formées après une exposition aux rayonnements ionisants et agents alkylants). Cette protéine interagit avec l'ADN ligase III, la polymérase bêta et la poly (ADP-ribose) polymérase. Trois SNPs de *XRCC1* ont été examinés en lien avec le CHC (Kiran *et al.* 2009), notamment les codons : *Arg194Trp*, *Arg280His* et *Arg399Gln*. Cette étude a montré que les SNPs *Arg194Trp* et *Arg280His* étaient associés à un risque accru de CHC (OR = 2,27 et 4,95, respectivement). Le risque est d'autant plus grand (OR = 35,96 et 5,28, respectivement) avec la combinaison des génotypes *Arg280His* avec *Arg194Trp* et *Arg399Gln*.

1.5.3.1.2. Gènes de la voie DSB et risque de carcinome hépatocellulaire

XRCC5 est le gène étudié en lien avec le CHC. Ce gène code pour une protéine de 80 kD, une hélicase ATP dépendant. Cette protéine de liaison d'ADN qui fonctionne en collaboration avec le complexe ADN ligase IV/*XRCC4* dans la réparation des cassures double brin d'ADN par le mécanisme NHEJ.

Une récente étude a montré que les sujets porteurs de l'allèle A du polymorphisme de *XRCC5* rs16855458 (c.1477-1985C>A) avaient une diminution du risque de CHC par rapport à ceux portant l'allèle C (OR = 0,59 ; 95 % IC 0,43 – 0,81 ; CA + AA vs CC). En revanche, ceux porteurs de l'allèle muté du polymorphisme de *XRCC5* rs9288516 (1835-1684T>A) ont un

risque accru de CHC, notamment les sujets porteurs du virus de l'hépatite B (OR = 2,02 ; 95 % IC, 1,42 – 2.86 ; TA + AA vs TT) (Li, R., Yang *et al.* 2011).

Long *et al.* ont étudié l'influence du polymorphisme *XRCC3 Thr241Met* chez des sujets provenant d'une région réputée pour l'exposition à l'aflatoxine B1 (AFB1) (Long *et al.* 2008). Ces auteurs ont montré que le risque de CHC était augmenté chez les sujets porteurs du génotype *Met241Met* par rapport aux sujets homozygotes sains (*Thr241Thr*) (Long *et al.* 2008). Le risque de CHC augmentait avec l'augmentation du niveau d'adduits d'AFB1 lié à l'ADN.

Des modèles expérimentaux ont montré que le gène *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*) influence le risque de CHC. En effet, des souris *knock out* pour *ATM* (*ATM*^{-/-}) étaient réfractaires au CHC jusqu'à 15 mois, alors que plus de 80 % des souris hétérozygotes *ATM*^{+/-} et sauvage *ATM*^{+/+} développaient un CHC au bout de 9-12 mois (Teoh *et al.* 2010).

1.5.3.1.3. SNPs des gènes de la voie NER et risque de carcinome hépatocellulaire

L'influence de deux SNPs (*Asp312Asn* et *Lys751Gln*) du gène *XPB* (*Xeroderma Pigmentosum Complementation group D*) a été examinée avec le risque de CHC dans une population chinoise de Guangxi, où la contamination des denrées alimentaires par l'AFB1 est récurrente en raison de mauvaises conditions de leur conservation (Long *et al.* 2009).

Le polymorphisme *Asp312Asn* n'était pas associé au risque de CHC dans cette population de Guangxi. En revanche, les sujets porteurs de l'allèle *751Gln* avaient un risque accru de CHC (OR ajusté de 1,75 chez hétérozygotes *Lys751Gln* ; 2,47 chez les homozygotes mutés *Gln751Gln*). Le risque de CHC variait également en fonction de la durée d'exposition à l'AFB1, suggérant l'existence d'interactions entre le polymorphisme *Lys751Gln* de *XPB* et l'exposition à AFB1.

Il a également été rapporté que l'allèle *939Gln* du polymorphisme *Lys939Gln* de *XPC* (*Xeroderma Pigmentosum Complementation group C*) était associé à un risque accru de CHC (OR = 1,25 et OR = 1,81, respectivement pour les hétérozygotes et homozygotes mutés). De plus, l'expression de *XPC* était corrélée au polymorphisme *Lys939Gln* et à la survie des patients avec CHC, particulièrement en situation d'exposition forte à l'AFB1 (Long, Ma *et al.* 2010).

1.5.3.2. Déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme des monocarbones avec le risque de carcinome hépatocellulaire

1.5.3.2.1. Statut en donneurs de méthyles et risque de carcinome hépatocellulaire

Les niveaux de méthylation et de synthèse d'ADN dépendent de facteurs génétiques (polymorphismes des enzymes du cycle des folates) et nutritionnels (apports en folates, en méthionine, et consommation d'alcool) (Peyrin-Biroulet *et al.* 2004). Une carence en folates

(définie par une concentration en folates érythrocytaires $< 200 \mu\text{g/L}$) et/ou en vitamine B12 (ANR $2,4 \mu\text{g/J}$) entraîne une hypométhylation d'ADN et une accumulation d'uracile dans l'ADN qui sont potentiellement cancérigènes (Pogribny *et al.* 1997).

Des modèles animaux ont montré qu'un régime carencé en donneurs de groupements méthyles (folate, méthionine et choline) favorisait le développement d'un CHC chez des rongeurs, avec une augmentation du niveau de misincorporation d'uracile dans l'ADN et des cassures de brins d'ADN dans le gène p53 des hépatocytes (Kim, Y. I. *et al.* 1997).

Une récente étude cas/témoins a montré des associations inverses entre les taux de folate sérique avec trois paramètres de la progression tumorale : taille de la tumeur ($r = -0,29$), la multiplicité des tumeurs ($r = -0,24$) et la métastase ($r = -0,39$). Une classification de la progression du CHC en stades (I à IV) avait révélé qu'un stade avancé de la pathologie était associée à une diminution significative des taux de folates sériques (stade I : $24,5 \text{ nmol/L}$ vs $10,3 \text{ nmol/L}$ pour le stade IV). Cette étude avait également rapporté que les patients ayant un faible taux de folates circulant (folate sérique $< 14 \text{ nmol/L}$) avaient un risque accru pour la progression tumorale (OR 7,1 ; IC 95 % : 2,27–21,9), la multiplicité tumorale (OR 3,2 ; IC 95 % : 1,07 – 3,51) et la métastase (OR 4,5 ; IC 95 % : 1,11 – 18,4) par rapport à ceux ayant un taux normal en folates (Kuo *et al.* 2008).

Une autre étude de la même équipe, sur des patients CHC, avaient rapporté une association entre de faibles taux de folates sériques et une accumulation de délétions d'ADN mitochondrial significativement corrélées à l'infection par le VHB, aux concentrations de la glutamate-oxaloacétate transaminase, de la glutamate-pyruvate transaminase et de l' α fœtoprotéine (Wu *et al.* 2009).

1.5.3.2.2. Polymorphismes des enzymes du métabolisme des monocarbones et risque de carcinome hépatocellulaire

La MTHFR catalyse la conversion irréversible du 5,10-méthylènetétrahydrofolate en 5-méthyltétrahydrofolate, forme majeure des folates circulants. Une réduction d'activité de MTHFR se traduirait par une plus grande disponibilité de la 5,10-méthylènetétrahydrofolate pour TYMS, favorisant une synthèse et une réparation optimale d'ADN.

Le polymorphisme *MTHFR* rs1801133 (C677T ; Ala>Val,) identifié par Frosst *et al.* est le plus étudié dans la littérature (Frosst *et al.* 1995). Le variant mineur de ce SNP est caractérisé par une diminution d'activité enzymatique de MTHFR de l'ordre 70 %. (Frosst *et al.* 1995). D'autres SNPs influencent également la reméthylation de l'Hcy, notamment, méthionine synthase (MTR) 2756 A>G, méthionine synthase réductase (MTRR) 66A>G, transcobalamine 2 (TCN2) 776 C>G).

La majorité de ces études antérieures ont analysé l'influence du polymorphisme C677T sur le risque de CHC.

Une récente méta analyse des résultats de 10 études a été effectuée en 2009 (Jin, F., Qu et al. 2009). Cette méta analyse réalisée sur 1814 cas de CHC et 2862 témoins avait montré que le polymorphisme C677T était associé à un risque accru de CHC suivant un modèle génétique dominant, indiquant que les sujets hétérozygotes ont un risque moindre de développer un CHC, comparés aux sujets homozygotes CC ou TT (Jin, F., Qu et al. 2009). Les sujets possédant le génotype TT avaient un risque accru de CHC par rapport aux patients hétérozygotes.

Par ailleurs, dans une population coréenne, il a été rapporté que les SNPs *MTHFR* A1298C et *MTRR* 66A>G étaient associés à un risque accru de CHC (Kwak et al. 2008). Les combinaisons de *MTHFR* 1298AA/*MTRR* 66AG+GG et de *MTHFR* 1298AC+CC/*MTRR* 66AG+GG) étaient associées à une augmentation du risque de CHC (OR=2.733 et OR=1.854, respectivement) (Kwak *et al.* 2008). Fabris *et al.* ont, par ailleurs, rapporté que l'âge de la transplantation, le sexe masculin ainsi que le génotype TT de la *MTHFR* C677T étaient associés à un risque accru de CHC chez des patients ayant une cirrhose alcoolique (Fabris *et al.* 2009). Une étude chinoise a également rapporté que les sujets homozygotes mutés TT de *MTHFR* C677T avaient un risque accru de CHC ; comparés aux sujets porteurs de l'allèle C de *MTHFR* 677C>T (Zhu, Z. Z. *et al.* 2006). Dans cette étude, les femmes porteuses du génotype TT avaient un risque beaucoup plus élevé, comparés aux hommes (Zhu, Z. Z. *et al.* 2006).

Une autre étude cas/témoins dans une population chinoise a aussi rapporté que l'allèle T de *MTHFR* 677C>T est associé à un risque accru de CHC (Mu et al. 2007).

Deux études ont démontré que les génotypes de *MTHFR* associés à une réduction de son activité enzymatique et donc à une augmentation de l'activité de la TYMS, sont associés à une réduction significative du risque de CHC (Yuan et al. 2007 ; Yu et al. 2008). *MTHFR* et TYMS sont tous deux impliqués dans la limitation de niveau de misincorporation de l'uracile dans l'ADN.

Saffroy et al. ont analysé 300 malades transplantés pour une cirrhose d'origine alcoolique ou virale, compliquée ou non d'un CHC, ou pour un CHC sur foie sain (Saffroy *et al.* 2004). Chez les malades transplantés pour une cirrhose alcoolique, il a été montré que contrairement aux génotypes CT et TT, la fréquence du génotype CC du polymorphisme *MTHFR* C677T était significativement plus élevée chez les patients avec un CHC que chez les malades sans CHC (Saffroy *et al.* 2004). De plus, lorsque tous les malades transplantés pour un CHC étaient pris en compte, le génotype CC était encore significativement plus fréquent chez les sujets avec une cirrhose alcoolique que chez ceux avec une cirrhose virale ou porteurs d'un CHC sur foie sain.

1.6. Le cancer du poumon (CP)

1.6.1. Épidémiologie du cancer du poumon

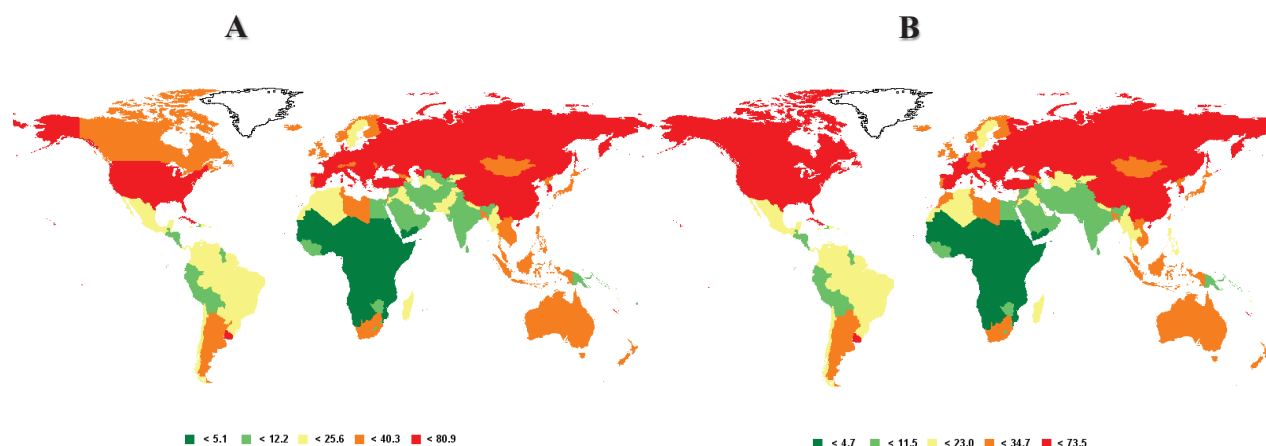


Figure I.22. Taux d'incidence et mortalité liés au cancer du poumon ajustés sur l'âge dans le monde en 2008/100.000 habitants (d'après Ferlay et al. 2010)

Note A : Taux d'incidence, B : Taux de mortalité

En France, le nombre de décès par CP a augmenté de 15,5 % entre 1980 et 2000 (Hill and Doyon, 2007).

On estimait à 320.000 le nombre de nouveaux cas de cancer (180.000 chez les hommes et 140.000 chez les femmes) en 2005 ; avec 149.000 cas de décès (89.000 chez l'homme et 60.000 chez la femme). Chez l'homme, les trois cancers les plus fréquents sont ceux de la prostate, du poumon et le cancer colorectal. Chez la femme, il s'agit des cancers du sein, du colon et du poumon (Hill and Doyon, 2008).

1.6.2. Facteurs aggravant le risque de cancer du poumon

Il est documenté que le tabac est le principal facteur de risque de CP et de sa mortalité. La plupart des données de la littérature rapportent une corrélation entre le cancer de poumon avec de nombreux facteurs tels que l'âge, le tabagisme, la pollution environnementale et les antécédents familiaux.

1.6.2.1. Le tabagisme

Le tabac est le facteur de risque majeur de cancer du poumon. Cependant, une faible proportion de fumeurs (de l'ordre de 10 à 15 %) développe un cancer lié au tabac, suggérant l'implication de facteurs génétiques.

1.6.2.2. L'exposition à l'amiante

L'exposition aux fibres d'amiante est associée à un risque accru :

- (1) d'asbestose, une maladie due à l'accumulation des fibres d'amiante dans les alvéoles des poumons,
- (2) de cancer de poumon,
- (3) d'autres cancers comme ceux du larynx, du système gastro-intestinal, en particulier de l'œsophage, de l'estomac et des intestins ainsi que le cancer du rein
- (4) de mésothélium, forme rare de cancer de la plèvre, de la cavité abdominale et du cœur, dont les principaux symptômes sont l'essoufflement et l'apparition de douleurs abdominales.

L'asbestose était proposé comme un bon marqueur prédictif du risque de cancer de poumon que l'estimation des niveaux d'exposition (Weiss, W. 1999). Une forte corrélation entre le taux d'asbestose et la prévalence du cancer de poumon était observée dans 38 études de cohorte (Zhao, S. *et al.* 2000).

1.6.3. Déterminants génétiques de la réparation d'ADN et risque de cancer du poumon

1.6.3.1. Polymorphismes des gènes de la réparation d'ADN et risque de CP

Plusieurs études de la littérature montrent que les polymorphismes des gènes impliqués dans la réparation d'ADN influencent le risque de CP. Nous avons présenté ci-dessous la revue de ces polymorphismes en se basant sur les différents systèmes de la réparation d'ADN.

1.6.3.1.1. Influences des SNPs des gènes de la voie BER sur le risque de cancer du poumon

Sont fréquemment étudiés les polymorphismes de gènes. *APEX1*, *OGG1* et *XRCC1*.

1.6.3.1.1.1. SNPs d'*APEX1* et risque de cancer du poumon

APEX1 code pour une endonucléase (apurique/apyrimidique) essentielle dans la voie BER. Deux polymorphismes sont fréquemment étudiés dans *APEX1* en lien avec le risque de CP. Ce sont : *APEX1* -141T/G et *APEX1* T1349G. Une récente étude a rapporté que le génotype homozygote muté GG de -141T/G avait un effet protecteur contre le risque de CP (Li, Z., Guan *et al.* 2011). Zhou et collaborateurs ont également rapporté une réduction du risque de glioblastome de 46 % chez les sujets porteurs du génotype -141GG (Zhou, K. *et al.* 2011).

Le polymorphisme -656T> G (identique à *APEX1*-141T/G) était associé à une diminution significative du risque de CP chez les fumeurs actifs portant le génotype -656GG (Lo, Y. L. *et al.* 2009). De plus, cette étude a montré que l'allèle muté de ce polymorphisme était associé à une élévation de l'activité transcriptionnelle d'*APEX1*.

Une méta-analyse regroupant 10 études (2,696 cas de CP et 3,948 témoins) n'avait observé aucune association entre le variant *APEX1 T1349G* (Asp148Glu) et le risque de CP chez les Asiatiques ou Caucasiens. Toutefois, cette étude a rapporté que l'allèle mineur 1349G était associé à un risque accru de CP chez les fumeurs (Ji *et al.* 2010). Ces données sont confortées par une autre méta-analyse de 16 études (4.895 cas et 5.977 témoins) par l'équipe de Hung et collaborateurs (Hung *et al.* 2005). En revanche, une étude chinoise a rapporté que l'allèle muté ¹⁴⁸Glu était associé à une diminution significative du risque de CP (Deng *et al.* 2010). De plus, un risque accru de CP, avec interaction du tabac a été rapporté chez les sujets hétérozygotes *Asp148Glu* ou homozygotes mutés *Glu148Glu*, par rapport aux individus homozygotes sains (*Asp148Asp*) (Ito *et al.* 2004 ; Agachan *et al.* 2009).

1.6.3.1.1.2. Polymorphismes de *XRCC1* et risque de cancer du poumon

Plusieurs polymorphismes de *XRCC1* sont décrits en association avec la carcinogenèse, mais seulement deux sont fréquemment étudiés en lien avec le CP. Il s'agit de : *XRCC1 Arg194Trp* et *XRCC1 Arg399Gln*.

Une méta-analyse de 22 études (7515 cas et 9560 témoins) avait rapporté que le génotype variant *XRCC1 Trp194Trp* était associé à un risque accru de CP (OR = 1,22) par rapport au génotype homozygote sain (Jiang *et al.* 2010). De plus, cette étude avait montré que contrairement au génotype hétérozygote *Arg194Trp*, l'association *Trp194Trp* et *Arg194Arg*, était protecteur contre le CP (OR = 0.91) (Jiang *et al.* 2010). Une autre étude ayant analysé 37 SNPs dans 23 gènes candidats à la réparation d'ADN avait également conclu que le polymorphisme *XRCC1 Arg194Trp* était associé au risque de CP (Tanaka *et al.* 2010).

Le polymorphisme *XRCC1 Arg399Gln* était associé à un risque marginal de CP chez les sujets porteurs de l'allèle Gln (*Arg399Gln*+*Gln399Gln*) (Zheng *et al.* 2009). Chez les Latino-Américains *XRCC1 Arg399Gln* était clairement associé à un risque accru de CP (Chang *et al.* 2009). Dans une population indienne le stade pathologique ainsi que *XRCC1 Arg399Gln* — aussi associé à un risque accru de CP — étaient proposés comme des marqueurs prédictifs de la survie des patients souffrant de CP (Sreeja *et al.* 2008).

Une interaction avec le tabagisme était également rapportée dans l'évaluation du risque de CP avec *Arg399Gln* et *Gln399Gln* (Pachouri *et al.* 2007).

Toutefois, dans une population italienne, Improta et collaborateurs n'ont trouvé aucune association entre les SNPs *XRCC1 Arg399Gln* et *XRCC1 Arg194Trp* avec la survenue du CP (Improta *et al.* 2008).

L'allèle 399Gln de *XRCC1 Arg399Gln* protégeait contre le CP chez des femmes non-fumeurs (OR = 0,4) (Ryk *et al.* 2006). Shen *et al.* ont également rapporté que les sujets porteurs de l'allèle 399Gln avaient une réduction significative du risque de CP (OR = 0,60), et que le risque de CP était significativement plus élevé chez les sujets porteurs des génotypes variants *APEX1 Glu148Glu* et *XRCC1 Arg399Arg* (OR = 3,34) (Shen, M., Berndt, Rothman, Mumford *et al.* 2005).

Une autre étude ayant analysé 22 SNPs dans 16 gènes de la réparation d'ADN a rapporté que *XRCC1 Arg399Gln* était protecteur contre le risque de CP dans un modèle génétique récessif (*XRCC1 Gln399Gln vs XRCC1 Arg399Gln + XRCC1 Arg399Arg*) (Matullo *et al.* 2006).

1.6.3.1.1.3. Polymorphismes d'*OGG1* et risque de cancer du poumon

Le gène *OGG1* joue un rôle majeur dans la réparation des microlésions de 8-oxodG dans l'ADN. L'influence du polymorphisme *OGG1 Ser326Cys* sur le niveau de 8-oxodG a été examinée dans divers types de cancers, dont le CP. Les sujets homozygotes mutés *Cys326Cys* et hétérozygotes *Ser326Cys* ont un niveau significativement élevé de 8-oxodG, comparés aux sujets homozygotes sains (Janik *et al.* 2011).

Une récente méta-analyse de 22 études cas-témoins (8.575 cas de CP et 9.484 témoins Chinois) a rapporté que les individus porteurs du génotype muté *Cys326Cys* avaient un risque accru de CP par rapport aux sujets porteurs du génotype *OGG1 Ser326Ser* (Qian *et al.* 2011). Par ailleurs, une autre méta-analyse de 17 études cas/témoins (6.375 cas de CP et 6.406 témoins) a rapporté que, contrairement au génotype *OGG1 Ser326Ser*, le génotype *OGG1 Cys326Cys* n'était pas associé à une augmentation du risque de CP (Li, H. *et al.* 2008). De plus, aucune augmentation du risque de CP n'était observée dans les modèles génétiques dominant (*Cys326Cys + Ser326Cys vs Ser326Ser*) ou récessif (*Cys326Cys vs Ser326Cys + Ser326Ser*). En revanche, le polymorphisme *OGG1 Ser326Cys* était associé à une augmentation marginale du risque de CP chez les sujets Asiatiques, et ce dans un modèle génétique dominant (Li, H. *et al.* 2008).

Dans les cancers de poumon non à petites cellules, il a été observé une diminution de la fréquence des mutations dans *p53* chez les sujets porteurs du génotype *OGG1 Cys326Cys* (Hu, Y. C. and Ahrendt 2005). Ce génotype *OGG1 Cys326Cys* était sans influence sur le niveau de réparation des lésions de 8-oxodG

Une diminution d'activité d'*OGG1* augmentait le risque de CP (Paz-Elizur *et al.* 2008) avec ou sans interaction du tabagisme (Paz-Elizur *et al.* 2003). Les mêmes auteurs ont suggéré que l'activité d'*OGG1* pourrait servir de marqueur du risque de CP (Paz-Elizur *et al.* 2005).

1.6.3.1.2. Influence des SNPs du système *NER* sur le risque de cancer du poumon

1.6.3.1.2.1. *ERCC1* rs11615 (Asn118Asn) et *ERCC1* rs3212986 et risque de CP

Le polymorphisme *ERCC1* rs11615 était associé à une diminution significative du risque de CP dans une population norvégienne (OR = 0,32) (Zienolddiny *et al.* 2006). En revanche, d'autres études n'ont trouvé aucune association entre ce polymorphisme et le risque de CP dans les populations américaine (Zhou, W. *et al.* 2005) ou chinoise (Yin, J. *et al.* 2006). Signalons que ces deux précédentes études n'ont trouvé aucune interaction significative entre le tabagisme et le polymorphisme *ERCC1* rs11615 (Zhou, W. *et al.* 2005 ; Yin, J. *et al.* 2006).

Aucune association n'a été trouvée entre *ERCC1* rs3212986 et le risque de CP, dans les populations européennes (Zienolddiny *et al.* 2006) ou Américaines (Zhou, W. *et al.* 2005).

1.6.3.1.2.2. SNPs de *ERCC2/XPD* : *ERCC2* rs1799793 et *ERCC2* rs13181 (Lys751Gln)

La protéine *ERCC2* joue un rôle majeur de reconnaissance dans la réparation d'un large éventail de lésions structurellement indépendantes, telles que les adduits volumineux et les dimères de thymidine. Elle fonctionne comme une hélicase (5' → 3') ATP dépendant qui sert à séparer la double hélice.

Plusieurs polymorphismes ont été identifiés dans *ERCC2*. Il en existe qui sont moins fréquents : C'est le cas SNPs des codons 199 ; 201 et 575 ; et d'autres qui sont plus fréquents : SNPs des codons 156 ; 312, 711 et 751.

Deux de ces polymorphismes, *ERCC2* rs1799793 (*Asp312Asn*) et *ERCC2* rs13181 (*Lys751Gln*), sont plus étudiés en liaison avec la cancérogenèse pulmonaire.

ERCC2 rs1799793 était associé à une augmentation du risque de CP dans une étude polonaise (OR = 1,86, 95 % IC = 1,02 - 3,40 ; dans le modèle dominant; Butkiewicz *et al.* 2001) et caucasienne (OR_{ajusté} = 1,47 ; Zhou, W. *et al.* 2002).

Une étude chinoise a montré que les sujets homozygotes mutés *ERCC2 Asn312Asn* et *ERCC2 Gln751Gln* avaient un risque accru de CP (OR = 10,33, et OR = 20,50, respectivement) par rapport aux sujets homozygotes sains (Liang *et al.* 2003). Une méta-analyse de 3725 cas de CP a rapporté des résultats similaires, avec un risque accru de CP dans le modèle récessif pour *ERCC2* rs1799793 et *ERCC2* rs13181 (Hu, Z. *et al.* 2004).

Gln751Gln était associé à un risque accru de CP chez des Norvégiens souffrant d'un CP (OR = 1,60 ; IC 95 % = 1,10 - 2,3 ; Zienolddiny *et al.* 2006). Les Suédois porteurs d'un ou les deux allèles mineurs de *ERCC2 Lys751Gln* avaient un risque accru de CP (Hou *et al.* 2002). Le risque de CP associé à *Gln751Gln* était marginal chez les Allemands (OR = 1,39, IC 95 % = 0,90 - 2,14 ; Popanda *et al.* 2004) ; ce SNP n'était pas associé au risque de CP chez les caucasiens

(Zhou, W. *et al.* 2002). Une autre étude a montré que l'association entre le CP et *ERCC2 Lys751Gln* était modulé par une supplémentation en alpha tocophérol (Misra *et al.* 2003). Aucune association entre *ERCC2 Lys751Gln* et la survenue de CP n'a été rapporté chez les Afro-Américains (David-Beabes *et al.* 2001) ou Coréens (Park, J. Y. *et al.* 2002).

Dans une population chinoise, les sujets porteurs de l'allèle 751Gln étaient protégé contre le CP (réduction du risque de l'ordre de 60 % (OR = 0,40 ; Shen, M., Berndt, Rothman, Demarini *et al.* 2005). Les études ayant analysé l'influence du tabagisme avec *ERCC2 Lys751Gln* dans l'évaluation du risque de CP ont rapporté des résultats discordants (Vogel *et al.* 2004 ; Zienolddiny *et al.* 2006).

1.6.3.1.2.3. SNPs d'*ERCC4/XPF* et risque de cancer du poumon

ERCC4/XPF code pour une protéine majeure impliquée dans la réparation des photo-produits ainsi que les adduits volumineux d'ADN. *ERCC4/XPF* et *ERCC1* sont deux des enzymes impliquées dans la réparation des pontages inter-brins d'ADN.

Plusieurs SNPs sont identifiés dans la région codante d'*ERCC4*. Smith *et al.* ont rapporté que le risque de cancer du sein associé au génotype variant de *ERCC4* rs1800067 (*Arg415Gln*) augmentait, avec une combinaison du nombre d'allèles variants de *ERCC4 Arg415Gln*, *XRCC1 Arg194Trp*, et *XRCC3 Thr241Met* (Smith *et al.* 2003). Aucune association n'a été observée entre le risque de CP et *ERCC4 Arg415Gln* chez les Coréens (Park, J. Y. *et al.* 2002).

1.6.3.1.2.4. SNPs d'*ERCC5/XPG* et risque de cancer du poumon

ERCC5/XPG (17 exons et s'étendant sur 32 kb) code pour une endonucléase qui est essentielle pour deux étapes d'incision dans la voie NER. Plusieurs polymorphismes dans la séquence codante d'*ERCC5* ont été identifiés, mais seulement deux de ces SNPs sont en association avec le CP : ce sont *ERCC5 His46His* (rs1047768), et *ERCC5 Asp1104His* (rs17655). Contrairement aux génotypes *Asp1104His* et *His1104 His*, le génotype *Asp1104Asp* est protecteur contre le risque de CP (OR_{ajusté} = 0,62 ; Cui *et al.* 2006).

1.6.3.1.3. Polymorphismes des gènes de la voie *DSBR* et risque de cancer du poumon

1.6.3.1.3.1. Polymorphismes de *RCQEL* et *RAD52*, *MRE11A* et *NBS1* et risque de cancer du poumon

Une étude ayant examiné 22 gènes impliqués dans la réparation des cassures double brins et ayant analysé les fréquences de blocs haplotypiques a rapporté que *RCQEL* et *RAD52* était associés au risque de CP (Danoy *et al.* 2008).

L'étude de Leng et collaborateurs a examiné 294 SNPs dans 16 gènes candidats intervenant dans la réparation des lésions double brins. Ces auteurs ont rapporté que l'activité du promoteur du gène *MRE11A* (rôle essentiel dans la reconnaissance des dommages dans l'ADN et dans l'activation du gène *ATM*) était réduite les sujets porteurs de l'allèle variant (Leng *et al.* 2008).

Aucune association avec le risque de CP n'a été rapportée dans une étude ayant analysé 102 SNPs dans 34 gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, la voie BER ou de réparation des CDBs (Landi *et al.* 2006). Les sujets homozygotes mutés pour *NBS1 Leu34Leu* et *NBS1 Glu185Glu* avaient un risque accru de CP dans une population chinoise (OR = 2,15, et 2,53, respectivement) (Lan *et al.* 2005).

1.6.3.1.3.2. Polymorphismes de *XRCC3* et risque de cancer du poumon

Seul le polymorphisme *XRCC3 Thr241Met* a été examiné dans *XRCC3* avec le risque de CP. Improta *et al.* ont rapporté dans une étude italienne que l'allèle mineur de *XRCC3 241Met* était associé à un risque accru de CP et de cancer colorectal (Improta *et al.* 2008). En revanche, une étude espagnole n'a trouvé aucune association entre *XRCC3 Thr241Met* et le risque de CP (OR = 0,92 ; 95 %CI = 0,56–1,50 ; Lopez-Cima *et al.* 2007), tandis que le risque associé à ce même SNP est marginal chez les Caucasiens (Popanda *et al.* 2004). L'allèle mineur de *XRCC3 241Met* était associé à une réduction significative du risque de CP chez les femmes fumeurs (OR = 0,30 ; Ryk *et al.* 2006). De plus, *XRCC3 Thr241Met* améliore la survie au CP : la médiane de survie était significativement augmentée chez les patients porteurs *XRCC3 241Met*, par rapport aux sujets hétérozygotes ou homozygotes sains *XRCC3 241Met* (16 mois vs. 10 mois et 14 mois, respectivement ; de las Penas *et al.* 2006).

1.6.3.1.4. Polymorphismes des gènes de la voie *MMR* et risque de cancer du poumon

Des associations entre les SNPs des gènes du système MMR et le risque de CP ont été rapportées dans plusieurs études (*LIG1*, *LIG3*, *MLH1*, et *MSH6* ; Landi *et al.* 2006), (*MSH3*, *MLH3*, *POLK*, *LIG1*, *ERCC5*, *PMS1*, *POLG2* et *RPA3* ; Michiels *et al.* 2007).

Par rapport aux génotypes *hMLH1-93AG* et *hMLH1-93GG*, le génotype variant de *hMLH1-93G>A* était associé à une augmentation du risque de CP (Shih *et al.* 2010; Park, S. H. *et al.* 2004).

Un risque marginal de CP était associé à *MLH1-I219V* (rs1799977) (An *et al.* 2008).

1.7. OBJECTIFS DE LA THESE

Le CHC et CP constituent un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Selon l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC), le CHC et le CP représentent la 5^{ème} et la 1^{ère} cause de décès par cancer, respectivement. L'identification des facteurs prédictifs — nutritionnels ou génétiques — du risque de CHC ou d'un CP permettrait non seulement une meilleure compréhension de la carcinogenèse hépatique et pulmonaire, et donc une meilleure prise en charge des patients, mais aussi de sélectionner les malades chez qui les mesures de surveillance d'apparition du CHC ou de CP doivent être intensifiées.

Les études d'association gène candidat ont montré que les polymorphismes SNPs au sein de plusieurs gènes impliqués dans la réparation d'ADN ou dans les gènes codant pour les enzymes du métabolisme des monocarbones (MMC) modifient le risque de CHC (Saffroy *et al.* 2004 ; Yuan *et al.* 2007 ; Long *et al.* 2009, 2011). Cependant, aucune de ces études n'a analysé, de façon exhaustive, l'influence des variants au sein des gènes du MMC et/ou de la réparation d'ADN sur la susceptibilité au CHC en prenant en compte l'influence des étiologies de la cirrhose (virale ou alcoolique). La plupart des études d'association se sont limitées à l'analyse d'un ou de quelques variants polymorphiques dans un nombre restreint de gènes ne permettant pas de capturer une large part de la variabilité génétique.

Notre projet de thèse structuré autour de trois axes de recherche a pour objectifs :

Axe carcinome hépatocellulaire : Rechercher — à l'aide de deux *SNP-arrays* de 384 marqueurs SNPs — les déterminants génétiques de la réparation d'ADN (systèmes BER, NER, MMR et DSBR) et du MMC (gènes candidats au transport des folates, de la vitamine B12, reméthylation de l'Hcy, transsulfuration, trans méthylation, métabolismes des purines et pyrimidines) qui sont prédictifs du risque de CHC chez des Caucasiens cirrhotiques, en prenant compte le rôle des facteurs aggravants le risque de CHC comme l'âge, le sexe, le tabac ainsi que les étiologies de la cirrhose. L'influence des marqueurs nutritionnels majeurs du cycle des monocarbones (folates, vitamine B12, MMA) sur le risque de CHC était étudiée.

Axe cancer du poumon :

La synthèse bibliographique des déterminants génétiques de la réparation d'ADN en lien avec la susceptibilité au CP illustre bien l'absence de consensus entre les études d'association gène candidat et celles criblant systématiquement le génome, études *GWAS* «*genome wide association study*» (Kazma et al., 2012; Sakoda et al., 2012). De plus, peu d'études ont évalué, de façon

exhaustive, l'influence simultanée des SNPs de plusieurs gènes candidats avec le risque de CP. Notre principal objectif, sur cet axe de notre travail, était de rechercher, à partir d'une étude cas témoins, les déterminants génétiques prédictifs du risque de cancer bronchique à partir du SNP-array 'réparation d'ADN' décrit ci-dessus (couvrant la majorité des gènes candidats connus à ce jour) en prenant en compte : l'âge, le sexe et le rôle du tabac.

Puisque les altérations génétiques et épigénétiques coexistent dans plusieurs types de cancers, nous avons comparé les niveaux de lésions de 8-oxodG, de misincorporation d'uracile et de méthylation globale d'ADN sur tissu sain et lésé, dans une étude ancillaire, par une méthode chromatographique ultra haute performance/masse spectrométrie (LC-MS/MS). Ces analyses nous ont permis d'examiner les inter-relations entre ces lésions d'ADN et les spécificités liées au type tumoral dans la carcinogenèse pulmonaire.

Axe conducteurs de taxi-moto de Cotonou exposés à la pollution de l'air :

Comme la plupart des pays en développement, Cotonou, la capitale économique du Bénin, est caractérisé par une insuffisance des transports collectifs et une croissance anarchique d'autres moyens de transports, tels que les deux-roues communément appelé 'taxi-moto'. Ces deux-roues rejettent une grande quantité de polluants dans l'air, ce qui pose un sérieux problème de santé publique, en particulier pour les conducteurs de taxi-moto (CTM) qui sont les plus exposés.

En l'absence de données scientifiques sur les effets néfastes de cette pollution sur la santé des populations exposées, nous avons initié un projet qui, dans un premier temps, a visé à quantifier les polluants de l'air. Ces premiers travaux ont montré que l'air à Cotonou contenait de fortes concentrations de benzène (en moyenne $76 \mu\text{g}/\text{m}^3$, largement au-dessus de la norme de $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ recommandée par l'OMS), d'HAPs ainsi que les particules ultrafines. Dans une deuxième phase, nous avons analysé les niveaux de biomarqueurs d'exposition, de cassures de brins, de bases modifiées et de fragmentation d'ADN. Nos résultats ont montré que les dommages d'ADN ainsi que le niveau des biomarqueurs d'exposition à certains polluants comme le benzène étaient significativement plus élevés chez les CTM que chez les habitants d'une zone rurale (résultats publiés dans *Carcinogenesis* et *Sci Total Environ.* ; Avogbe *et al.* 2005 ; Ayi-Fanou *et al.* 2006).

Nous avons aussi observé une récurrence des problèmes respiratoires chez les CTM chez qui le nombre de décès ne cesse d'augmenter.

Par ailleurs, dans une récente étude nous avons observé que, par rapport à l'essence vendue en France, les essences vendues à Cotonou ne contenaient pas ou très peu d'ETBE (*éther éthyle tertio-butyle*), — un additif augmentant l'indice d'octane et réduisant les concentrations

de l'essence en aromatiques — et que la concentration en benzène dans les essences de Cotonou était trois à six fois plus élevée que dans l'essence vendue en France (*résultats non encore publiés*).

Nos objectifs actuels sur cet axe de notre projet étaient d'évaluer :

- (1) les changements hématologiques liés à une exposition à l'air ambiant pollué par le benzène en comparant les profils hématologiques des CTM exposés aux sujets non exposés,
- (2) la génotoxicité des polluants de l'air, en analysant les dommages d'ADN tels que les adduits d'ADN, les niveaux de 8-oxodG et dU ainsi que la méthylation globale d'ADN chez des CTM de Cotonou, comparés à des témoins non exposés vivant en zone rurale.

**CHAPITRE II : DONNEES
PHENOTYPIQUES ET METABOLIQUES
SUR CIRCE, PNES ET L'ÉTUDE
TAXI-MOTO**

2. Aspects généraux des protocoles expérimentaux sur le carcinome hépatocellulaire (CHC : étude CiRCE), le cancer du poumon (CP ou étude PNES) et de l'étude sur les conducteurs de taxi-moto de Cotonou (CTM)

2.1. Planification et conduite de l'étude CiRCE : recrutement des patients atteints d'une cirrhose avec CHC (cas) et des témoins (cirrhose sans CHC)

La planification et la conduite de cette étude sont régies par les lois françaises et européennes (notamment la loi n° 88-1138 modifiée dite loi « Huriet » publiée au Journal Officiel du 22 décembre 1988, ses amendements et ses décrets d'application et la Directive européenne 2001-20-CE du 4 avril 2001). Elle a reçu l'autorisation du CPP de Dijon.

La population étudiée était constituée de malades atteints de cirrhose compliquée ou non par un cancer primitif de foie pris en charge dans les services d'hépto-gastroentérologie des CHU de l'interrégion Est (Besançon, Dijon, Metz, Nancy, Reims et Strasbourg).

Les cas atteints d'une cirrhose avec un CHC et les témoins atteints d'une cirrhose sans CHC sont sélectionnés sur les critères de l'étude par les médecins investigateurs parmi les malades vus en consultation ou en hospitalisation.

Au cours de cette visite l'information sur la mise en place et les objectifs de la recherche sont donnés au patient (lecture et remise de la note d'information au sujet). Un consentement libre et éclairé est signé par chaque patient avant son inclusion dans l'étude. Aucun examen spécifique n'était exigé pour l'inclusion dans le protocole.

2.1.1. Critères d'inclusion dans l'étude 'CiRCE'

Les cas et les témoins sont âgés de 35 ans ou plus, et donnent leur consentement éclairé avant de participer à l'étude. Pour éviter les biais méthodologiques, deux témoins cirrhotiques pour un cas CHC sont recrutés, avec un appariement sur : (1) le sexe, (2) l'âge (± 3 ans), (3) étiologie de la cirrhose, (4) ancienneté de diagnostic (± 3 ans) et (5) la présence d'une infection chronique virale B ou C. Tous les cas de CHC évoluant sur cirrhose, quelle qu'en soit l'étiologie, sont inclus. Les patients atteints de cirrhose, sont inclus quelle qu'en soit l'étiologie. Les critères diagnostiques du CHC sont les critères de Barcelone définis par '*European Association for Study of the Liver* (EASL)'. Le diagnostic de la cirrhose repose sur la biopsie hépatique et/ou en absence de biopsie, (1) en cas d'absence de thrombose portale au Doppler chez les patients, sur la présence de signes d'hypertension portale biologiques (tricytopenie), morphologiques (échographie abdominale, scanner ou IRM), hémodynamique (mesure de la pression veineuse sus-hépatique) ou endoscopique, (2) en cas de présence de thrombose portale chez les patients, sur l'association aux signes d'hypertension portale de signes cliniques (hépatomégalie avec signes

cliniques d'insuffisance hépatocellulaire) ou morphologiques (IRM) de cirrhose, et/ou de signes biologiques d'insuffisance hépatocellulaire (TP<70 %, albuminémie basse), et/ou de bloc de type sinusoïdal affirmé par un gradient veineux hépatique >16 mm Hg. Un résultat de fibrotest ou de fibroscan > 12,5 kpa sans autre signe clinique ou biologique de cirrhose n'est pas considéré comme critère diagnostique que pour les hépatites chroniques virales C. L'absence de CHC à l'inclusion des patients cirrhotiques est confirmée par des examens d'imagerie de qualité (échographie abdominale, scanner ou IRM) et une valeur d'alpha fœto-protéine < 100 ng/ml.

2.1.2. Critères de non inclusion dans l'étude 'CiRCE'

Les patients âgés de moins de 35 ans ou ceux souffrant d'un autre cancer autre qu'un CHC ou un CHC sur un foie non cirrhotique ne sont pas inclus dans l'étude. De plus, les sujets présentant une infection au VIH ou une maladie psychiatrique sont non compatibles avec l'inclusion dans l'étude.

2.1.3. Collecte des données cliniques et biologiques sur CiRCE (voir Annexe 1)

La plupart des données démographiques ou concernant l'histoire de la maladie, les modalités diagnostiques, et l'hygiène de vie sont recueillies à l'interrogatoire et directement saisies dans le cahier d'observation par le médecin investigateur.

Les données démographiques collectées étaient : (1) le pays de naissance des parents, (2) niveau d'occupation et dernière profession, (3) données cliniques, biologiques et morphologiques relatives au diagnostic de cirrhose, (4) données relatives à l'étiologie de la cirrhose, (5) au diagnostic de cancer et à son stade, (6) données relatives au traitement et à l'évolution.

2.2. Aspects généraux du Programme National d'Excellence Spécialisé (PNES Cancer du Poumon)

Le programme '*PNES Cancer du Poumon*' a pour objectif de stimuler la mise à disposition d'échantillons de CP dans le cadre de projets de biologie moléculaire. Il s'agit d'un programme multicentrique incluant *Caen, Nancy, Grenoble, Nice* et *Paris*.

Notre présente étude était axée principalement sur les échantillons de Nancy, mais aussi sur quelques échantillons en provenance des centres de Nice et de Caen.

2.2.1. Recrutement des patients souffrant de cancer du poumon et la population témoin

Cette étude a inclus tous les nouveaux cas de CP diagnostiqués dans les services de chirurgie thoracique et de pneumologie du CHU de Nancy entre le 1er Janvier 2000 et le 31

Décembre 2008. Sont inclus, les cas de cancers primitifs de poumon confirmés histologiquement, indépendamment de l'origine de la tumeur : (1) biopsies par fibroscopie bronchique, (2) ponctions sous scanner, (3) biopsies pulmonaires chirurgicales, (4) biopsies de sites métastatiques ou (5) prélèvements chirurgicaux.

L'âge, le sexe ainsi que le stade de la maladie n'étaient pas retenues dans les critères d'exclusion de cette étude. Tous les patients souffrant d'un CP inclus dans cette étude ont une ascendance caucasienne. Les témoins étaient constitués de sujets Caucasiens, recrutés dans les CHU de l'inter région est de la France.

L'étude a été approuvée par le comité d'éthique du CHU Nancy et un consentement libre et éclairé a été obtenu chez tous les participants.

2.2.2. Données relatives à la consommation de tabac

Un questionnaire standardisé a permis de collecter les données relatives à la consommation de tabac chez tous les patients souffrant d'un CP ainsi que les témoins. Les données recueillies ont été classées suivant le statut tabagique : (1) fumeurs, (2) ex-fumeurs et (3) non-fumeurs. Les patients qui ont arrêté de fumer dans les 12 mois précédents leur inclusion dans l'étude sont considérés comme ex-fumeurs.

2.2.3. Expositions professionnelles

Les données d'exposition aux cancérigènes bronchiques ont été recueillies par un médecin expert en pathologies professionnelles. Les données recueillies sont expertisées par le même médecin qui ne connaissait pas les données cliniques et histologiques des différents patients. Tous les participants à l'étude ont répondu à un questionnaire standard sur leurs différentes expositions professionnelles. Un questionnaire spécifique sur les expositions à l'amiante, au chrome, à l'arsenic, au cadmium, à la silice, au nickel et aux HAPs a été renseigné. Sont considérés comme exposés, les seuls patients avec une exposition documentée à un composé cancérigène sur une période d'au moins 1 an (durée d'exposition > 5 % du temps total annuel de travail).

2.2.4. Constitution de la tumorotheque et contrôle qualité

Les échantillons sont dans un premier temps stockés dans les Centres de Ressources Biologiques (CRBs) de chaque centre participant à l'étude.

Dans la plupart des centres, comme à Nancy, le délai de congélation est très court (le bloc et le lieu de stockage sont situés dans le même bâtiment à Nancy). Le prélèvement est congelé dans l'azote liquide puis stocké à - 80 °C au CRB Nancy dans les 15 min suivant le prélèvement.

Des contrôles qualité sont réalisés sur tous les échantillons qui sortent des congélateurs dits « permanents »

Les paramètres définissant la qualité biologique d'un échantillon étaient : (1) la documentation d'une coupe histologique ; (2) la nature de la lésion ainsi que la densité de cellules tumorales, et (3) le repérage topographique des zones tumorales au sein de la lésion.

2.2.5. Diagnostic histologique

Un seul anatomo-pathologiste a examiné les lames. Les types histologiques ont été classés selon la nouvelle classification de l'OMS de 1999, en 5 catégories : (1) carcinome épidermoïde, (2) adénocarcinome, (3) carcinome à petites cellules, (4) carcinome indifférencié à grandes cellules et, (5) autres types.

2.3. Aspects généraux de l'étude d'évaluation des risques environnementaux de pollution de l'air sur l'ADN chez les populations exposées de Cotonou : 'étude taxi-moto'

Il s'agit d'une étude qui a évalué les niveaux des polluants de l'air et analyser les dommages d'ADN (modification des bases dans l'ADN, les fragmentations d'ADN, les adduits d'ADN etc.) chez des populations urbaines, périurbaines et rurales du Sud Bénin. Cette étude s'est réalisée en partenariat entre les Universités d'Abomey-Calavi (Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire), de Copenhague (Danemark) et l'ULP de Strasbourg.

2.3.1. Recrutement des conducteurs de taxi-moto et des sujets témoins

L'étude s'inscrit dans la continuité de nos travaux publiés dans '*Carcinogenesis*' et '*Sci of Total Environ*'. La population cible est constituée de conducteurs de taxi-moto de Cotonou et de sujets résidant en milieu rural, zone supposée non atteinte par la pollution de l'air.

Avant leur inclusion dans l'étude, tous les participants sont examinés par un médecin de travail. Chaque participant à l'étude signe un formulaire de consentement.

L'étude a été approuvée par l'Agence Béninoise de l'Environnement (ABE).

2.3.1.1. Critères d'inclusion dans l'étude 'taxi-moto'

Avant l'inclusion des CTM, nous avons procédé à un recensement des parcs motos dans la ville de Cotonou. Les CTM inclus dans l'étude sont tous de sexe masculin, apparemment sains et ayant une ancienneté d'au moins 5 ans dans l'exercice de cette activité.

2.3.1.2. Critères d'exclusion dans l'étude 'taxi-moto'

— Les femmes sont exclues du fait de l'exposition fréquente dans nos régions aux fumées de cuisine qui pourrait être une source de majoration des effets des fumées dus aux gaz d'échappement.

— Les tabagiques le sont également à cause du risque de majoration des effets étudiés.

2.3.3. Estimation des composés organiques volatils (COVs) chez les conducteurs de taxi-moto

Les prélèvements du benzène, et dérivés dans l'air étaient réalisés à l'aide de badges GABIE (*Gas Adsorbent Badge for Individual Exposure*, ARELCO, France) constitués de charbon actif enfermée. Les CTM portent ce badge pour une durée d'une semaine.

Après le prélèvement ; les badges sont conservés à -20 °C puis envoyés, pour analyse, au 'Centre Commun de Mesure', ULCO, Dunkerque (France). Brièvement, le benzène et ses dérivés sont désorbés du charbon actif à l'aide de 2 ml de carbone disulfure (Sigma, France) sous agitation pendant 15 min. Un microlitre du mélange filtré est analysé par Gaz chromatographie (CP-3800, Varian USA) couplé à un spectromètre de masse (1200 TQ, Varian USA).

2.3.4. Bilan hématologique

Un hémogramme complet est réalisé pour chaque participant de l'étude. Cette analyse a été réalisée sur un automate (SYSMEX 9000).

2.4. Évaluation du niveau plasmatique des marqueurs métaboliques du cycle des monocarbones

2.4.1. Dosage de l'homocystéine, d'acides méthylmalonique et succinique

Les concentrations plasmatiques d'Hcy totale, de MMA et d'acide succinique sont déterminées par chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS, Applied Biosystem).

La méthode a été adaptée à celles utilisée dans deux récentes études (Ducros *et al.* 2006 ; Hempen *et al.* 2008). La méthode détaillée est présentée sur la **Fiche technique 1**

2.4.2. Dosage simultané de la vitamine B12 et des folates par immuno-compétition : Radio Immuno Assay (RIA)

Le principe du dosage de la vitamine B12 et des folates par immuno-compétition repose sur le fait que les cobalamines et les folates présents dans l'échantillon à analyser entrent en

compétition avec la cobalamine et les folates marqués, sur un nombre restreint de sites de fixation d'une protéine de liaison qu'est le facteur intrinsèque de porc purifié. La technique détaillée est présentée sur la **Fiche Technique 2**.

2.5. Extractions d'ADN

L'extraction d'ADN est faite sur divers matériel. Sur les axes CHC et taxi-moto elle est faite à partir du sang. Sur l'axe cancer bronchique elle est faite à partir d'une microdissection du tissu sain et tumoral (la technique est présentée sur la **Fiche technique 3**).

2.5.1. Extraction d'ADN à partir du sang total (Kit BACC3 NUCLEON)

L'extraction d'ADN à partir du sang total avec le kit Bacc3 Nucléon comporte quatre étapes importantes : (1) la lyse des globules rouges ; (2) la destruction des membranes des globules blancs, (3) l'élimination des protéines et, (4) la collecte de l'ADN. La technique détaillée est présentée sur la **Fiche technique 4**

2.5.2. Extraction d'ADN de tissu frais ou congelé (Kit Qiagen)

La procédure utilisée pour l'extraction d'ADN à partir du tissu frais ou congelé est décrite en détail sur la **Fiche Technique 5**.

2.6. RÉSULTATS DES DONNÉES PHÉNOTYPIQUES CHEZ LES PATIENTS DES ÉTUDES *CiRCE*, *PNES* ET *'TAXI-MOTO'*

2.6.1. Étude *CiRCE* : axe carcinome hépatocellulaire (CHC)

2.6.1.1. Caractéristiques phénotypiques chez les patients atteints d'une cirrhose avec CHC, comparées aux patients avec une cirrhose sans CHC

Les caractéristiques de l'ensemble des 489 sujets inclus dans l'étude *CiRCE* sont rassemblées dans le **Tableau II.1**. Cette étude multicentrique a inclus, entre janvier 2008 et décembre 2010, 163 cas de patients atteints de CHC et 322 témoins cirrhotiques.

Tableau II.1. Caractéristiques des 489 sujets inclus dans l'étude CHC

	N	Médiane	IQR, 25 ^e – 75 ^e P	
Age (années)	484	60,3	53,7 – 68,1	
Poids (kg)	484	78,5	66,5 – 90,0	
IMC (kg/m ²)	484	26,6	23,6 – 30,1	
Créatinine (mg/L)	479	80,0	65,0 – 94,0	
	N	n	%	95% IC
Cas^a	485	163	33,6	29,4 – 37,8
Étiologie cirrhose				
Non virale	485	348	71,8	67,7 – 75,8
Infection VHB	485	22	4,54	2,68 – 6,39
Infection VHC	485	112	23,1	19,3 – 26,9
Co-infection VHB+VHC	485	3	0,619	0,0817 – 01,32
Consommation d'alcool				
Oui	483	445	92,1	89,7 – 94,5
Non	483	38	7,87	5,46 – 10,3
Sexe				
Masculin	485	362	74,6	70,8 – 78,5
Féminin	485	123	25,4	21,5 – 29,2
Tabagisme				
Fumeurs actifs	483	185	38,3	34,0 – 42,7
Ex-fumeurs	483	176	36,4	32,1 – 40,7
Non-fumeurs	483	122	25,3	21,4 – 29,1

Note. N: nombre total de patients étudiés, IQR : interquartile range ; n : nombre d'observations ; IMC : indice de masse corporelle ; IC: intervalle de confiance.

a Cirrhose avec carcinome hépatocellulaire (versus cirrhose sans carcinome hépatocellulaire) ; IC : intervalle de confiance, IMC : indice de masse corporelle, VHB et VHC : virus hépatite B et C

L'âge médian de la population CiRCE était de 60,3 ans. Comme on pouvait s'y attendre, environ $\frac{3}{4}$ des patients souffraient d'une cirrhose d'étiologie non virale (c'est-à-dire essentiellement alcoolique) ; le $\frac{1}{4}$ restant ayant une cirrhose d'étiologie virale. La grande majorité des patients CiRCE (92 %) était consommateurs d'alcool et environ $\frac{3}{4}$ des patients étaient des fumeurs actuels ou anciens fumeurs, suggérant une situation d'intoxication éthylo-tabagique dans la population. On observe aussi une prédominance masculine de l'ordre de $\frac{3}{4}$ du total des patients inclus (**Tableau II.1**).

Quand on compare les patients suivant les étiologies de la cirrhose, on constate que :

— dans le sous-groupe des patients souffrant d'une cirrhose d'étiologie virale, les cas CHC étaient significativement plus âgés que les témoins et qu'aucune différence significative n'était obtenue en ce qui concerne les variables binaires (**Tableau II. 2** ci-dessous)

— dans le sous-groupe des patients souffrant d'une cirrhose d'étiologie non virale, les cas CHC étaient toujours statistiquement plus âgés que les témoins. On observe ici une prédominance masculine chez les cas CHC (89 % vs 69,5 ; $P = 0,0001$), avec une proportion de fumeurs anciens qui est significativement plus élevée chez les cas CHC que chez les témoins cirrhotiques (55,6 vs 28,2, respectivement ; $P < 0,0001$; **Tableau II.3** ci-dessous).

Tableau II. 2. Comparaison des cas (cirrhose avec carcinome hépatocellulaire) et des témoins (cirrhose sans carcinome hépatocellulaire) parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie virale

	Cirrhose <u>sans</u> CHC (Témoins)				Cirrhose <u>avec</u> CHC (Cas)				
	N	Médiane	IQR, 25 ^e – 75 ^e P		N	Médiane	IQR, 25 ^e – 75 ^e P		<i>P</i> -value ^a
Age (années)	83	61,6	51,2 – 68,2		54	67,938	55,5 – 73,8		0,0203
Poids (kg)	83	75	67,0 – 85,0		54	71	62,0 – 84,0		0,1172
Taille (cm)	83	170	162,0 – 176,0		54	168	160,0 – 175,0		0,6562
Tour de taille (cm)	83	92	85,2 – 102,5		54	89	79,0 – 102,0		0,154
IMC (kg/m ²)	83	26,1	23,8 – 29,6		54	24,64	21,8 – 28,7		0,0842
Créatinine (μmol/L)	81	81	69,5 – 92,2		53	84	70,5 – 98,2		0,4567
	N	n	%	95% CI	N	n	%	95% CI	<i>P</i> -value ^b
Consommation d'alcool	82	64	78	68,9 – 87,2	54	42	77,8	66,3 – 89,2	0,8618
Sexe masculin	83	62	74,7	65,1 – 84,2	54	37	68,5	55,7 – 81,3	0,5523
Patients originaires d'Europe	83	72	86,7	79,3 – 94,2	54	45	83,3	73,1 – 93,6	0,7601
Fumeurs actifs	83	28	33,7	23,3 – 44,1	54	21	38,9	25,5 – 52,3	0,6653
Ex-fumeurs	83	34	41	30,2 – 51,8	54	15	27,8	15,4 – 40,1	0,1642
Non-fumeurs	83	21	25,3	15,8 – 34,9	54	18	33,3	20,3 – 46,3	0,4097

Note. N: nombre total de patients étudiés ; IQR : interquartile range ; n : nombre d'observations ; IMC : indice de masse corporelle ; IC: intervalle de confiance.

a Mann-Whitney *U* test

b Chi-square test

Tableau II.3. Comparaison des cas (cirrhose avec carcinome hépatocellulaire) et des témoins (cirrhose sans carcinome hépatocellulaire) parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale

	Cirrhose <u>sans</u> CHC (Témoins)				Cirrhose <u>avec</u> CHC (Cas)				
	N	Médiane	IQR, 25 ^e – 75 ^e P		N	Médiane	IQR, 25 ^e – 75 ^e P		<i>P</i> -value ^a
Age (années)	238	58,0	51,6 – 63,2		109	64,2	59,9 – 71,3		< 0,0001
Poids (kg)	238	78	66,0 – 90,0		109	84	73,0 – 96,0		0,0061
Taille (cm)	239	170	165,0 – 176,7		109	172	167,0 – 177,0		0,3554
Tour de taille	239	98	85,0 – 110,0		109	104	86,7 – 115,2		0,0678
IMC (kg/m²)	238	26,36	23,5 – 29,7		109	28,48	24,7 – 31,5		0,003
Créatinine (µmol/L)	237	74	60,0 – 92,2		108	83,5	69,5 – 102,0		0,0039
	N	n	%	95% IC	N	n	%	95% IC	<i>P</i> -value ^b
Consommation d'alcool	238	230	96,6	94,3 – 98,9	109	109	100	100 – 100	0,0606043
Sexe masculin	239	166	69,5	63,6 – 75,3	109	97	89	83,0 – 95,0	0,0001
Patients originaires d'Europe	238	229	96,2	93,8 – 98,7	109	107	98,2	95,6 – 100,7	0,5131404
Fumeurs actifs	238	105	44,1	37,8 – 50,5	108	31	28,7	20,0 – 37,4	0,0064994
Ex-fumeurs	238	67	28,2	22,4 – 33,9	108	60	55,6	46,0 – 65,1	2,089E-06
Non-fumeurs	238	66	27,7	22,0 – 33,5	108	17	15,7	8,7 – 22,7	0,0149449

Note: IQR : interquartile range ; IC : intervalle de confiance ; n : nombre d'observations; IMC : indice de masse corporelle

^aMann-Whitney *U* test

^bChi-square test

2.6.1.2. Comparaison du niveau des marqueurs métaboliques du métabolisme des monocarbones chez les cas CHC et témoins cirrhotiques

Les concentrations de folates ne diffèrent pas significativement entre cas et témoins (valeurs médianes de 12,6 vs 13,3 nM, respectivement ; $P = 0,2304$). Les mêmes tendances sont observées pour la vitamine B12 (valeurs médianes de 512 vs 470,6 pM respectivement entre cas et témoins ; $P = 0,1481$) et les concentrations d'Hcy (valeurs médianes de 17,95 vs 16,3 μM respectivement entre cas et témoins ; $P = 0,6075$) (**Tableau II.4**). Par contre, les résultats montrent que les concentrations de MMA étaient significativement plus élevées chez les patients CHC que chez les témoins (valeurs médianes de 0,20 vs 0,17 μM , respectivement ; $P = 0,0002$).

Tableau II.4. Comparaison des niveaux des marqueurs métaboliques du cycle des monocarbones chez les cas (cirrhose avec carcinome hépatocellulaire) et des témoins (cirrhose sans carcinome hépatocellulaire)

Variables	Cirrhose <u>sans</u> CHC (Témoins)			Cirrhose <u>avec</u> CHC (Cas)			<i>P</i> -value ^a
	Médiane	IQR, 25 ^e – 75 ^e P	N	Médiane	IQR, 25 ^e – 75 ^e P	N	
Age (années)	58	51,2 – 64,3	288	64,3	58,8 – 72,4	144	<0,0001
IMC (kg/m ²)	26,1	23,5 – 29,7	290	27,4	23,2 – 30,4	144	0,2045
Folates (nM)	13,3	9,4 – 18,5	275	12,6	8,9 – 16,5	146	0,2304
Vitamine B12 (pM/L)	470,6	308,6 – 720,6	297	512	318,0 – 765,0	147	0,1481
Homocystéine ($\mu\text{mol/L}$)	16,3	13,3 – 21,4	304	17,95	13,9 – 23,2	150	0,6075
MMA ($\mu\text{mol/L}$)	0,17	0,11 – 0,24	303	0,2	0,14 – 0,31	150	0,0002
Créatinine ($\mu\text{mol/L}$)	77	62,0 – 92,0	286	84	71,0 – 99,0	142	0,005

Note. IMC : Indice de masse corporelle, IQR : interquartile range, MMA : acide méthylmalonique

^aMann–Whitney U test

2.6.1.3. Répartition des facteurs de risque du carcinome hépatocellulaire suivant le sexe

Aucune différence significative n'est observée entre les hommes et les femmes concernant l'âge ($P = 0,438$; **Tableau II.5**).

La répartition des non-fumeurs est identique chez les deux sexes. Par contre, plus de 80 % des hommes sont des fumeurs actifs ou ex-fumeurs. Globalement, une différence significative est notée entre les deux sexes ($P < 0,0001$). Nous avons également noté une différence significative quant à la consommation d'alcool entre l'homme et la femme ($P < 0,0001$; **Tableau II.5**).

Une différence significative est également observée quant à l'étiologie de la cirrhose entre l'homme et la femme. En effet, les proportions de cirrhose liées à l'infection aux VHB et VHC sont respectivement de 90,91 % et 67,65 % chez les hommes (**Tableau II.5**). De plus, la proportion de la cirrhose d'origine non virale est de 75,43 % chez les hommes contre 24,57 % chez les femmes.

Tableau II.5. Comparaison des facteurs de risque du carcinome hépatocellulaire en fonction du sexe

Variables	Hommes		Femmes		
	Médiane	25–75	Médiane	25–75	P-value ^a
Age	60,01	52,9 – 67,6	59,87	54,2 – 70,2	0,438
	%	N	%	N	P-value ^b
Tabagisme					
Non-fumeurs	49,65	70	50,35	71	<0,0001
Fumeurs	80,19	166	19,81	41	
Ex-fumeurs	84,44	190	15,56	35	
Consommation d'alcool					
Non	28,95	11	71,05	27	<0,0001
Oui	77,57	415	22,43	120	
Étiologie cirrhose					
Infection VHB	90,91	20	9,09	2	<0,0001
Infection VHC	67,65	92	32,35	44	
Autres	75,43	307	24,57	100	

Note. N : nombre de sujets ; VHB : virus de l'hépatite B ; VHC : virus de l'hépatite C

^aMann–Whitney U Test

^bChi-square test

2.6.2. Caractéristiques phénotypiques des patients sur l'axe cancer du poumon

2.6.2.1. Facteurs démographiques et tabagisme

Les résultats montrent qu'une majorité de patients témoins étaient plus jeunes que ceux souffrant d'un CP (77 % vs 58 %, respectivement ; $P < 0,0001$). De façon similaire, nous avons observé une différence significative entre les proportions de sujets de sexe masculin dans la population cible (71 % vs 82 %, respectivement, $P = 0,0008$) (**Tableau II.6**).

Une proportion élevée de témoins était non-fumeurs par rapport aux patients avec CP (28 % vs 6 %, respectivement, $P < 0,0001$). Plus de la moitié (i.e., 54 %) des patients souffrant d'un CP étaient d'ex-fumeurs, tandis que 28 % l'étaient dans le groupe des témoins ($P < 0,0001$). La proportion d'ex-fumeurs et fumeurs actifs était significativement plus élevée chez les patients souffrant d'un CP que chez les témoins (93 % vs 72 %, respectivement, $P < 0,0001$). En revanche, aucune différence n'était observée entre cas et témoins concernant la proportion de fumeurs actifs ($P = 0,7148$).

Tableau II.6. Comparaison des données démographiques chez les témoins (patients sans CP) et cas (patients souffrant d'un CP)

Variable	Témoins : patients <u>sans</u> CP			Cas : patients <u>avec</u> CP			P -value ^a
	%	95 % IC	N	%	95 % CI	N	
Age > 65 ans	23	18 – 28	288	42	37 – 47	382	< 0,0001
Hommes	71	65 – 76	290	82	78 – 86	382	0,0008
Tabagisme							
Non fumeurs	28	22 – 33	289	6	4 – 8	380	< 0,0001
Ex-fumeurs	31	26 – 36	289	54	49 – 59	380	< 0,0001
Fumeurs actifs	41	35 – 47	289	39	34 – 44	380	0,7148
Ex-fumeurs ou Fumeurs actifs	72	67 – 77	289	93	91 – 96	380	< 0,0001

Note. CP : cancer du poumon ; IC : intervalle de confiance ; N : nombre de sujets

^aChi-square test

2.6.2.2. Répartition des formes histologiques de cancer du poumon

Au total, nous avons inclus dans cette étude 382 cas de cancer du poumon et 288 témoins. Nos résultats montraient que 82 % des cas de cancer étaient diagnostiqués chez les hommes contre 18 % chez les femmes (**Tableau II.7**).

La moitié des patients inclus dans cette étude (soit 51 %) était porteurs d'un CP à carcinome épidermoïdes. Près de 45 % des patients étaient porteurs d'adénocarcinomes (ADK). Carcinomes épidermoïdes et ADK étaient donc les deux formes histologiques majoritairement représentées chez les hommes, par rapport aux femmes (78,8 % vs 17 %, respectivement). Seulement, 6,3 % des cas de CP sont diagnostiqués chez les sujets non-fumeurs. (**Tableau II.7**).

Plus de la moitié des cancers (54,4 %) étaient diagnostiqués dans les stades précoces de la maladie (stade I, pendant lequel le diamètre de la tumeur ne dépasse généralement pas 3 cm). Environ 32 % des cancers étaient diagnostiqués aux stades IIB et IIIA. Seulement 5,1 % des cas étaient diagnostiqués au stade IV.

On observe une influence significative du tabagisme sur la répartition des formes histologiques de CP ($P < 0,0001$). De façon similaire, une différence significative était notée dans la répartition des formes histologiques en fonction du sexe ($P = 0,001$; *Chi-Square Test* ; **Tableau II.7**).

Tableau II.7. Caractéristiques cliniques et répartition des formes histologiques chez les 382 cas de patients souffrant de cancer du poumon

Paramètres	Types histologiques				Total	P-Value ^a
	Épidermoïde	ADK	GC	Autres		
N (%)	195 (51)	171 (44,8)	13 (3,4)	3 (0,8)	382	
Sexe, N (%)						
Homme	175 (45,8)	126 (33,0)	10(2,6)	2 (0,5)	313 (81,9)	0,001
Femme	20 (5,2)	45 (11,8)	3 (0,8)	1 (0,3)	69 (18,1)	
Tabac, N (%)						
Non-fumeurs	1 (0,3)	21 (5,5)	1 (0,3)	1 (0,3)	24 (6,3)	< 0,0001
Ex-fumeurs	125 (32,9)	75 (19,2)	5 (1,8)	1 (0,3)	206 (54,2)	
Fumeurs	69 (18,2)	73 (19,2)	7 (1,8)	1 (0,3)	150 (39,5)	
Stades						
I	108 (29,1)	88 (23,7)	5 (1,3)	1 (0,3)	202 (54,4)	0,749
IIA	10(2,7)	6 (1,6)	—	—	16 (4,3)	
IIB	32 (8,6)	22 (5,9)	3 (0,8)	1 (0,3)	58 (15,6)	
IIIA	30 (8,1)	28 (7,5)	3 (0,8)	—	61 (16,4)	
IIIB	5 (1,3)	7 (1,9)	1 (0,3)	—	13 (3,5)	
IV	5 (1,3)	14 (3,8)	1 (0,3)	—	11 (5,1)	

Note. ADK : adénocarcinome, CP : cancer du poumon ; N : nombres de participants ;

GC : grandes cellules

^a Chi-Square Test

2.6.2.3. Répartition des cancers du poumon et des données cliniques suivant le sexe.

Nos résultats montraient que les femmes étaient plus jeunes que les hommes au moment du diagnostic (âge moyen de 58,4 ans vs 63,6 ans, respectivement ($P < 0,0001$; **Tableau II.8**).

Il existe une différence significative dans la répartition des types histologiques entre les hommes et les femmes ($P = 0,002$). En effet, 66,2 % des CP féminins sont des adénocarcinomes et 27,9 % des carcinomes épidermoïdes. En revanche, les carcinomes épidermoïdes étaient plus fréquents chez l'homme (57 %) et les adénocarcinomes n'arrivaient qu'en deuxième position avec 39,7 % des cas (**Tableau II.9**). Les répartitions des cas de CP en stades au moment du diagnostic ne montrent pas de différence entre les hommes et les femmes ($P = 0,194$). La consommation de tabac ne diffère pas entre les hommes et les femmes ($P = 0,382$). Nous avons noté une différence significative entre les hommes et les femmes quant à l'exposition à l'amiante (proportion de 24 % vs 2,9 %, respectivement ; $P = 0,002$).

Tableau II.8. Répartition des données démographiques, cliniques, et histologiques en suivant le sexe chez les patients souffrant de cancer du poumon

	Hommes	Femmes	P-value
Age moyen (années $\pm$ SD)	63,6 $\pm$ 9,7	58,4 $\pm$ 10,7	<0,0001 ^a
	N (%)	N (%)	
Histologie			
Adénocarcinomes	122 (39,7)	45 (66,2)	0,002 ^b
Carcinomes épidermoïdes	175 (57,0)	19 (27,9)	
Grandes cellules	10(3,3)	4 (5,8)	
Stades TNM			
I	169 (55,4)	33 (50,0)	0,477 ^b
IIA	13 (4,3)	3 (4,5)	
IIB	50 (16,4)	8 (12,1)	
IIIA	48 (15,7)	13 (19,7)	
IIIB	8 (2,6)	5 (7,6)	
IV	16 (5,2)	4 (6,1)	
Tabac			
Non-fumeurs	9 (2,9)	15 (21,7)	<0,0001 ^b
Ex-fumeurs	186 (59,8)	20 (29,0)	
Fumeurs	116 (37,3)	34 (49,3)	
Exposition amiante			
Non	133 (76,0)	33 (97,1)	0,002 ^b
Oui	42 (24,0)	1 (2,9)	

Note. SD : standard deviation, N : nombre de sujets

^aStudent t test,

^bChi-square test.

2.6.3. Caractéristiques phénotypiques et métaboliques chez les CTM vs témoins

2.6.3.1. Données démographiques et métaboliques dans la population cible

Les données démographiques et métaboliques sont résumées dans le **Tableau II.9**.

Les résultats montrent que les CTM étaient plus âgés que les témoins ($P = 0,002$). Aucune différence n'était observée entre ces deux populations en ce qui concerne l'IMC ou la consommation d'alcool. Par contre, les concentrations de folates étaient significativement plus basses chez les CTM, comparés aux témoins, avec une augmentation significative de la concentration moyenne d'homocystéine chez les CTM (**Tableau II.9**).

Tableau II.9. Caractéristiques démographiques et métaboliques des conducteurs de taxi-moto (sujets exposés à la pollution de l'air) et témoins (sujets non exposés)

Paramètres	Témoins (n=35)	CTM (n=175)	P-value
Age $\pm$ SD (années)	30,85 $\pm$ 14,4	39,25 $\pm$ 7,7	0,002
Consommation d'alcool, n (%)			
Non	19 (54,29)	115(65,7)	0,702
Oui	16 (45,71)	60(34,3)	
Durée conduite/j, heures $\pm$ SD	NA	6,21 $\pm$ 2,06	
Durée d'exposition (années $\pm$ SD)	NA	11,3 $\pm$ 5,96	
IMC (Kg/m ²)	22,35 $\pm$ 1,89	23,79 $\pm$ 3,89	0,035
Folates (nmol/L)	9,6 $\pm$ 3,6	6,6 $\pm$ 1,9	< 0,0001
Vitamine B12 (pmol/L)	475,9 $\pm$ 174,9	425,3 $\pm$ 165,1	0,247
Homocystéine (μ mol/L)	14,9 $\pm$ 8,2	31,2 $\pm$ 19,5	< 0,0001
Acide méthylmalonique (μ mol/L)	0,18 $\pm$ 0,08	0,24 $\pm$ 0,09	0,001

Note. SD : déviation standard, % : pourcentage, IMC : indice de masse corporelle

2.6.3.2. Estimation du niveau des composés organiques volatils (COVs) chez les conducteurs de taxi-moto et à quatre carrefours de Cotonou

Les concentrations des COVs étaient précédemment rapportées en milieu rural (Ayi-Fanou et al. 2006). Dans cette étude le suivi du niveau des COVs est réalisé chez les CTM et dans l'air, à quatre carrefours importants de Cotonou (St Michel, Dédokpo, Marina et Vèdoko). Les résultats montrent que les concentrations de tous les COVs analysés (Benzène, Toluène, Ethylbenzène, p-Xylène et O-Xylène) sont plus élevées chez les CTM qu'aux carrefours identifiés (**Tableau II.10**).

Tableau II.10. Concentrations des composés organiques volatils chez les conducteurs de taxi-moto et au niveau de quatre grands carrefours de Cotonou

COVs ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)		Benzène		Toluène	Éthylbenzène	p-Xylène	O-Xylène
CTM	Médiane	168,3		302,4	93,4	132,3	142,4
	Moyenne $\pm$ SD	429,9 $\pm$ 660,2		309,6 $\pm$ 149,4	93,7 $\pm$ 69,2	175,5 $\pm$ 160	149,3 $\pm$ 105,9
	Étendue	39,2–1754,1		82,2–551,3	8,7–211	35,4–492,5	11,4–296,3
St Michel	Médiane	21,3		95,3	35,8	42,6	42,6
	Moyenne $\pm$ SD	33,3 $\pm$ 36,2		97,2 $\pm$ 11,1	36,9 $\pm$ 3,5	44,9 $\pm$ 5,6	42,8 $\pm$ 2,2
	Étendue	5,66–84,9		85,8–112,4	34,0–40,9	40,9–51,5	40,7–45,1
Dédokpo	Médiane	113,9		110,5	38,3	47,8	59,7
	Moyenne $\pm$ SD	162,5 $\pm$ 134,1		118,3 $\pm$ 37,9	39,9 $\pm$ 26,2	54,7 $\pm$ 41,7	52,0 $\pm$ 27,7
	Étendue	49,6–392,0		84,8–181,3	4,2–77,3	5,9–120,5	4,0–76,4
Marina	Médiane	13,1		13,5	1,6	2,7	2,1
	Moyenne $\pm$ SD	52,0 $\pm$ 68,2		21,8 $\pm$ 19,5	1,8 $\pm$ 0,46	4,1 $\pm$ 3,8	2,8 $\pm$ 1,3
	Étendue	12,2–130,9		8,9–56,1	1,3–2,5	0,9–10,7	1,9–5,1
Vèdoko	Médiane	59,9		65,5	36,9	46,9	45,9
	Moyenne $\pm$ SD	158,2 $\pm$ 176,9		104,0 $\pm$ 101,5	26,2 $\pm$ 22,1	54,3 $\pm$ 56,9	37,0 $\pm$ 34,2
	Étendue	52,1–362,5		11,4–266,2	1,1–49,0	2,6–142,3	1,3–80,3

Note. COVs : composés organiques volatils ; CTM : conducteurs de taxi-moto, SD : standard deviation

Les prélèvements d'air et l'analyse des COVs sont effectués dans la même période de temps. Les badges ayant servi aux prélèvements sont conservés à -20 °C jusqu'à l'analyse

2.6.3.3. Étude comparée des profils hématologiques chez les conducteurs de taxi-moto et témoins non exposés à la pollution de l'air par le benzène (article dans *AJEST*)

Nos résultats ont montré une absence de différence significative entre les CTM et les témoins en ce qui concerne le nombre des globules rouges ainsi que les paramètres comme l'hémoglobine, l'hématocrite et le volume globulaire moyen (**Tableau II.11**). En revanche, nous avons observé une réduction significative du nombre de globules blancs, des lymphocytes et des éosinophiles chez les CTM par rapport aux témoins ($P < 0,001$). Une réduction significative du nombre des plaquettes était observée chez les CTM par rapport aux témoins. Nos résultats montraient aussi une augmentation significative du nombre des neutrophiles et des monocytes chez les CTM par rapport aux témoins.

Tableau II.11. Comparaison des profils hématologiques des conducteurs de taxi-moto à ceux des habitants du village non exposé (témoins)

Paramètres	Témoins (n=30)	CTM (n=144)	<i>P</i> -value
GR ($\times 10^{10}/L$)	531 $\pm$ 67	516 $\pm$ 52	0,126
Hémoglobine (g/dl)	14,26 $\pm$ 1,56	14,12 $\pm$ 1,43	0,051
Hématocrite (%)	43,89 $\pm$ 4,88	44,76 $\pm$ 4,32	0,255
VGM (fl)	86,63 $\pm$ 7,63	86,93 $\pm$ 5,30	0,059
TCMH (pg)	28,25 $\pm$ 3,36	27,43 $\pm$ 2,36	0,03
CCMH	32,54 $\pm$ 1,97	35,39 $\pm$ 3,22	0,001
GB ($\times 10^6/L$)	5,900 $\pm$ 1,213	5,041 $\pm$ 1,209	0,001
Lymphocytes ($\times 10^6/L$)	3,200 $\pm$ 691	1,767 $\pm$ 334	< 0,001
Neutrophiles ($\times 10^6/L$)	2,162 $\pm$ 672	3,078 $\pm$ 346	< 0,001
Monocytes ($\times 10^6/L$)	189,0 $\pm$ 89,0	355,8 $\pm$ 86,7	< 0,001
Eosinophiles ($\times 10^6/L$)	351,7 $\pm$ 88	126,0 $\pm$ 47	< 0,001
Plaquettes ($\times 10^9/L$)	238 $\pm$ 66	198 $\pm$ 50	0,032

Note. GR : globules rouges, VGM : volume globulaire moyen, TCMH : teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine, CCMH : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, GB : globules blancs

2.6.3.4. Synthèse des résultats de l'article parue dans *AJEST*

Cette publication présente les données d'exposition au benzène ambiant chez les CTM avec les changements hématologiques chez ces derniers comparés aux sujets vivant en milieu rural. Nous avons suivi l'évolution du niveau des COVs seulement chez les CTM et en milieu urbain puisque les estimations sont déjà faites en milieu rural.

Comme nous l'avions montré précédemment, les CTM étaient exposés à de fortes concentrations de benzène ambiant (moyenne de 430 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; soit 5,6 fois plus élevée que les mesures effectuées dans la phase pilote de notre étude en 2002). Ces taux sont largement au-dessus de ceux rapportés dans les capitales occidentales : à Grenoble, France (23,5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, Maître et al., 2002) et Copenhague, Danemark (2,5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, Sørensen et al., 2003). Nos résultats ont montré que l'exposition à telles concentrations de benzène était associée une leucopénie, lymphopénie et une éosinopénie et une diminution du nombre des plaquettes, suggérant une toxicité directe des métabolites issus du métabolisme du benzène sur la production de ces cellules dans la moelle osseuse. Ces résultats corroborent les données rapportés par Lan *et al.* chez des travailleurs exposés à des concentrations de benzène < 1ppm, lesquelles concentrations étaient similaires à celles rapportés chez les CTM de Cotonou (Lan et al., 2004). En effet, l'exposition à des concentrations élevées de benzène (par exemple en milieu professionnel) est clairement associée à une hématotoxicité, mais des controverses existent dans la littérature en ce qui concerne l'effet d'une exposition à de faibles doses de benzène (< 1 ppm ; Collins et al., 1997; Khuder et al., 1999).

2.6.4. Discussion des résultats relatifs à la répartition des facteurs phénotypiques sur l'axe carcinome hépatocellulaire et l'axe cancer du poumon

2.6.4.1. Répartition du carcinome hépatocellulaire suivant le sexe

Les résultats de notre étude montraient une forte prédominance masculine dans la répartition du CHC (environ 82 % du total des cas). Les principaux facteurs contribuant à cette prédominance masculine du CHC incluent la forte proportion de patients masculins cirrhotiques (75,43 %), l'infection au VHB et VHC, mais aussi aux différences de mode de vie, particulièrement l'abus d'alcool et le tabagisme comme cela a été suggéré dans plusieurs études antérieures (Lai *et al.* 1987 ; Cong *et al.* 1993 ; Kumar, M. *et al.* 2007). Nos résultats contredisent certaines données de la littérature suggérant que le CHC survient à un âge plus jeune chez la femme que chez l'homme (Cong *et al.* 1993).

L'influence de l'âge, du sexe, le tabagisme et l'infection aux VHB et VHC sur le risque de CHC a été évaluée en association avec les déterminants génétiques du risque de CHC au chapitre IV ci-dessous.

2.6.4.2. Données métaboliques associées au risque du carcinome hépatocellulaire

Bien que le lien entre les apports en folates et les valeurs biologiques mesurées ne soit pas évident, les données disponibles dans la littérature suggèrent qu'un apport suffisant en folates contribue à une réduction significative du risque de nombreux cancers, particulièrement le cancer colorectal (Kim, J., Cho *et al.* 2012) et aussi le cancer de foie (Welzel *et al.* 2007). Il est important de souligner que des études de cohorte (Bao *et al.* 2011) et cas-témoins (Harris, H. R. *et al.* 2012) n'ont observé aucune influence du statut en folates sur le risque de cancer du pancréas et d'ovaire, respectivement.

Des études cas/témoins ont rapporté une diminution de la concentration de folates chez les patients avec CHC, par rapport aux témoins (Wu *et al.* 2009). De faibles taux de folates étaient associés à un sur-risque du CHC (en terme de la progression tumorale, la multiplicité de la tumeur et la métastase) (Kuo *et al.* 2008). Mais, dans notre étude, nous n'avons observé aucune différence significative entre les patients CHC et les témoins cirrhotiques quant aux concentrations de folates et de vitamine B12.

Par ailleurs, aucune différence n'était également observée entre les patients CHC et les témoins quant aux concentrations d'Hcy. Aucune étude n'a encore évalué le risque de CHC en fonction du statut en Hcy. Nos résultats montraient, par ailleurs, que le taux d'acide méthylmalonique

(MMA) était significativement plus élevé chez les patients CHC que chez les témoins, mais n'était pas prédicteur du risque de CHC (MMA n'est pas retenu dans le modèle de régression logistique).

2.6.4.3. Répartition des cancers du poumon

Nos résultats montraient une forte proportion de fumeurs et ex-fumeurs chez les patients atteints d'un CP que chez témoins (93 % vs 72 %, respectivement). Ces résultats sont conformes aux données rapportées dans la littérature (Erazo *et al.* 2008).

Les études antérieures ont montré que les cas de CP sont diagnostiqués à un âge plus jeune chez les femmes que chez les hommes (Bain *et al.* 2004 ; Foucault *et al.* 2007). Nos résultats confirment également cette tendance, avec une différence significative de l'âge moyen au moment du diagnostic.

Nos résultats montrent une prédominance des ADK par rapport aux carcinomes épidermoïdes chez les femmes. En revanche, on note une inversion de cette tendance chez les hommes. Ces résultats sont conformes à ceux de plusieurs études mettant en évidence des particularités histologiques du CP suivant le sexe (Radzikowska *et al.* 2002 ; Ringer *et al.* 2005 ; Gras-Aygon *et al.* 2009). Cette différence, mal élucidée, est attribuée, par certains auteurs, à la durée de tabagisme plutôt qu'au nombre ou paquets de cigarettes fumées (Brownson *et al.* 1995 ; Zang and Wynder 1996).

**CHAPITRE III : MISE AU POINT D'UNE
MÉTHODE CHROMATOGRAPHIQUE DE
DÉTERMINATION SIMULTANÉE DES
NIVEAUX DE M⁵DC, DU ET 8-OXODG**

3. Mise au point et validation de la méthode de quantification simultanée de m⁵dC, dU, et 8-oxodG par LC–MS/MS (Fiche technique 6)

3.1. Pourquoi évaluer les concentrations génomiques de m⁵dC, dU, et 8-oxodG ?

Les folates jouent un rôle majeur dans la synthèse et le maintien de la stabilité de l'ADN. Ils jouent donc un rôle important dans la carcinogenèse, de sorte que la carence en folates est considérée comme un problème majeur de santé publique. Comme décrit ci-dessus (Chapitre I), une carence en folates a plusieurs effets au niveau cellulaire :

- une hypométhylation globale d'ADN,
- un défaut de reméthylation de l'Hcy en méthionine,
- une diminution du niveau des coenzymes foliques, notamment la 5,10-méthylèneTHF, cofacteur de la thymidylate synthase, enzyme convertissant les déoxyuridines monophosphates (dUMP) en thymidylate (dTMP) (**Figure III.1**). Ainsi, un défaut de conversion de dUMP par la TYMS entraîne une diminution de la synthèse des dTMP et une augmentation du rapport dUMP/dTMP se traduisant par une misincorporation d'uracile dans l'ADN par l'ADN polymérase lors de la réplication,
- un défaut de réparations des lésions d'ADN

La 8-oxodG est un marqueur bien validé du stress oxydant. Toutefois, son mode d'action dans la carcinogenèse reste mal élucidé. Puisque, qu'une carence en donneurs de méthyles est associée à l'apparition de lésions oxydatives d'ADN ainsi qu'un défaut de la méthylation d'ADN (intimement liée à l'expression génique), nous présumons qu'il existerait un lien entre les lésions de 8-oxodG et la méthylation d'ADN.

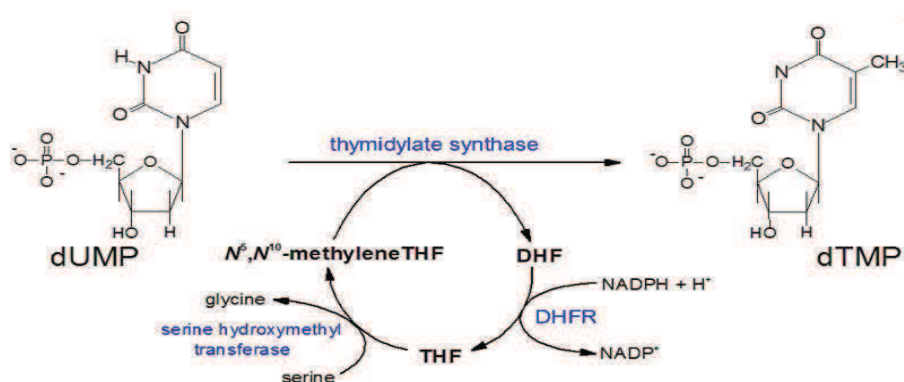


Figure III.1. Réaction de conversion de dUMP en dTMP

3.2. Objectifs et intérêts du développement de la technique de quantification simultanée de m⁵dC, dU, et 8-oxodG

Notre objectif principal était d'examiner, chez nos populations cibles, le niveau global de méthylation d'ADN, de misincorporation d'uracile et de la 8-oxodG sur chacun des axes de recherche et de rechercher les relations entre ces altérations au sein de chaque type de tumeur dans le CP, d'une part, et, les concentrations des acteurs du MMC dans le CHC et chez les CTM, d'autre part.

3.3. Systèmes UPLC et QTrap 4000

Le chromatographe liquide ultra haute performance (UPLC, Waters) nous a permis d'utiliser des phases stationnaires avec des particules de diamètre < 2 µm (3 à 5 µm en HPLC classique), mais aussi de travailler à de haute pression (8000 à 15000 psi).

Le spectromètre de masse raccordé au système UPLC est le modèle 4000 QTrap LC-MS/MS (Applied Biosystem). C'est un triple quadripôle composé de quatre parties : (1) la source d'ionisation, (2) l'analyseur 1, (3) le triple quadripôle (permettant de travailler en tandem (MS/MS)) et (4) la trappe ionique. Le mode d'ionisation utilisé dans notre étude est l'électrospray.

3.3.1. Ionisation en mode Electrospray (ESI)

La source d'ionisation est constituée d'une sonde TIS, de buses chauffantes (ou *heaters*) et d'une *buse exhaust*. Le mode d'ionisation choisi dans notre étude est l'électrospray (ESI, *Electrospray ionisation*). Après passage du mélange analysé dans l'UPLC, celui-ci est introduit dans la source par un capillaire très fin chargé en métal. L'ionisation des molécules a lieu dans des conditions douces (pression atmosphérique et température ambiante). Sous l'effet de l'azote (gaz nébuliseur) et d'un champ électrique de +4kV, les ions sont formés en deux étapes : (1) transformation du mélange en un nuage de gouttelettes chargées (electrospray) sous l'action du champ électrique et, (2) évaporation du solvant grâce à un flux de gaz (**Figure III.2**).

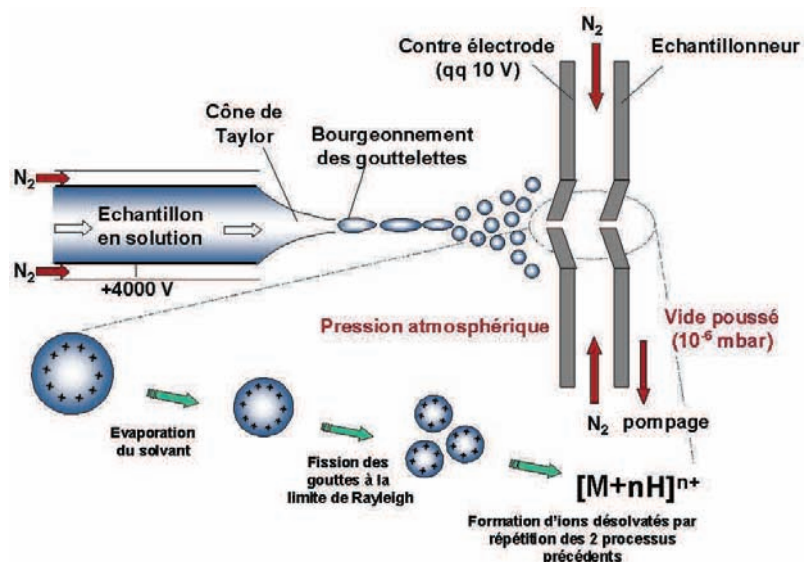


Figure III.2. Ionisation par *Electrospray*

3.4. Optimisation de la méthode d'analyse de m⁵dC, dU et 8-oxodG

3.4.1. Étape d'infusion

L'infusion consiste à injecter en continue une molécule dont on veut optimiser les conditions d'analyse directement dans le spectromètre de masse sans passer par le système chromatographique.

Dans notre étude, l'infusion est réalisée par injection en continu à un débit 10 µL/min des solutions de chaque nucléoside analysé.

Cette étape d'infusion permet de déterminer l'énergie optimale pour obtenir une meilleure sensibilité du spectromètre de masse pour les composés étudiés. Les différents paramètres optimisés lors de l'étape d'infusion sont :

- DP (*Declustering potential*) : potentiel appliqué au niveau de l'orifice,
- EP (*entrance potential*) : potentiel appliqué à l'entrée du spectromètre en Q₀, elle est de 10 V dans notre étude
- CE (*collision energy*) : potentiel appliqué au niveau de la cellule de collision Q₂
- CXP (*cell exit potential*) : potentiel appliqué entre Q₂ et Q₃.

L'optimisation par infusion a été faite par réglage automatique des paramètres de chaque molécule, suivi d'une sélection des trois ions fils majoritaires de chaque analyte.

3.4.2. Étape d'acquisition du signal

La fragmentation de l'ion moléculaire a lieu dans la cellule de collision (Q_2). Un second analyseur (Q_3 ou LIT) sélectionne successivement plusieurs ions fragments issus du même précurseur, mais qui ont différents m/z . Ce mode de fonctionnement présente une double sélectivité par la sélection des ions précurseurs et ions fragments, et présente surtout l'avantage d'une excellente sensibilité de détection des ions fragments : c'est le mode à balayage ou '*full scan*' de plusieurs ions dérivant de la fragmentation (MMR : *multiple reaction monitoring*). Dans le cas du spectromètre 4000 Q-TRAPTM, cette succession d'opérations est réalisée de manière très rapide, puisque plusieurs centaines de MRM peuvent être acquises en un seul *scan* de moins de quatre secondes.

Dans notre étude, l'optimisation du spectromètre de masse est faite avec la méthode d'analyse MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) en mode positif pour chacun des sept nucléosides analysés, et ce sur les trois ions fils majoritaires (**Figure III.3** ci-dessous).

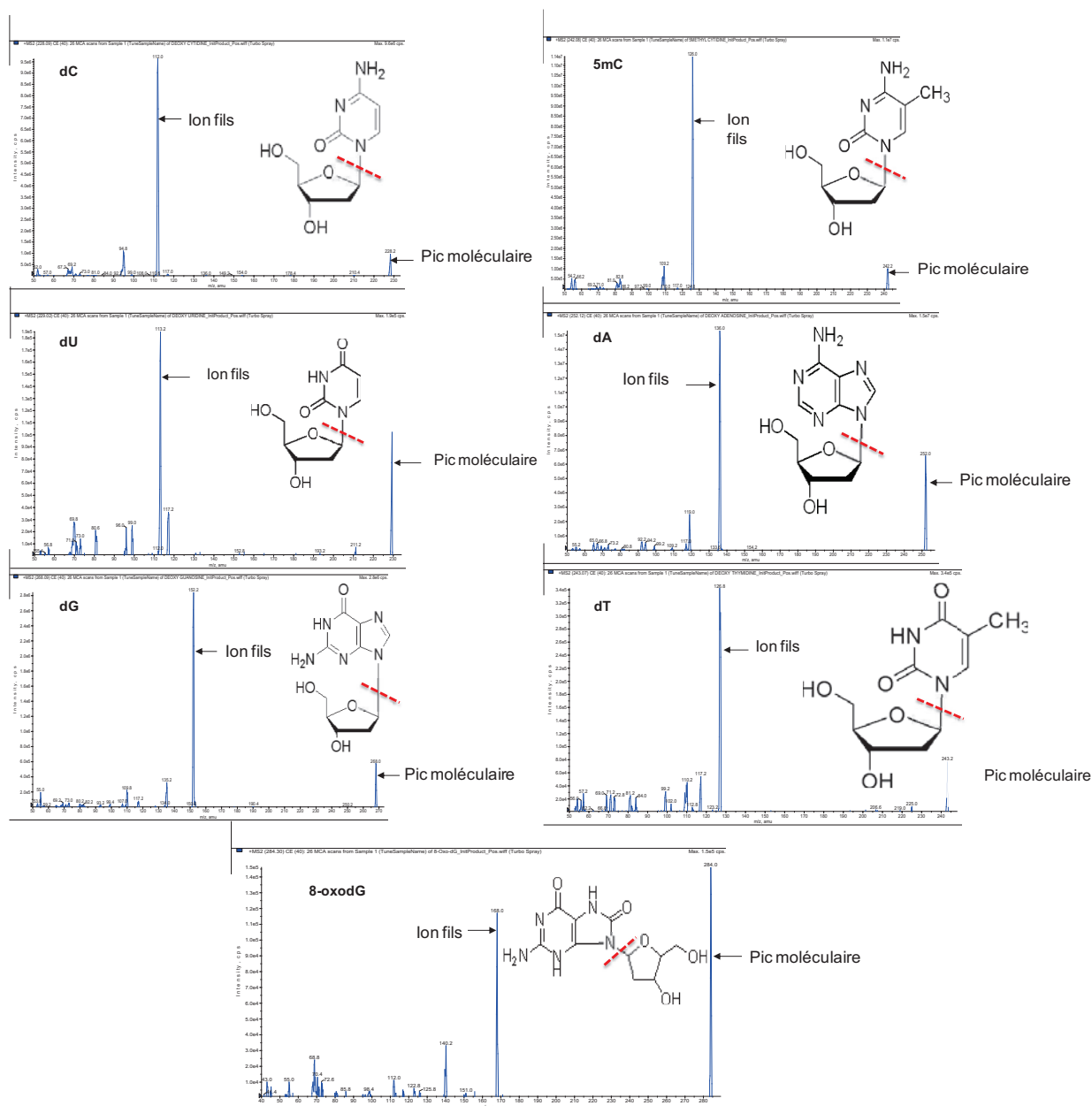


Figure III.3. Ions fragments majoritaires obtenus après l'infusion des sept nucléosides

3.4.3. Étape du FIA (Flow Injection Analysis)

La FIA permet d'optimiser les paramètres de la source d'ionisation du spectromètre de masse. Elle consiste à injecter une solution via le système UPLC sans passer par une colonne. Cette étape suppose que l'on a une idée du débit final et de la nature de la phase mobile à utiliser lors du dosage. Au cours de notre mise au point, les essais d'injection étaient réalisés à des débits compris entre 0,2 et 0,6 ml/min.

Les six paramètres optimisés lors de la FIA, avec les valeurs ayant donné la meilleure sensibilité dans notre étude sont :

- (1) la hauteur de la sonde de l'ordre de 6,5
 - (2) la pression du gaz rideau (curtain gaz) qui sert à casser les liaisons faibles, la meilleure sensibilité était obtenue avec une valeur de 15
 - (3) gaz de désolvatation des molécules de la phase mobile (gaz 1 : 22 ; gaz 2 : 32)
 - (4) le gaz collision : *medium*
 - (5) *Ion Spray voltage* : tension appliquée à l'aiguille métallique pour obtenir l'ionisation des molécules. Celle-ci dépend essentiellement de la phase mobile utilisée. Dans notre étude l'IS est de 5500 V,
 - (6) La température du capillaire qui dépend du débit de travail, mais aussi de la nature du solvant. Plus elle est forte, plus complète est le processus de désolvatation. La meilleure sensibilité du spectromètre de masse est obtenue pour une température de 305 °C.
- Cette optimisation se fait dans un premier temps manuellement puis en automatique. Chaque paramètre à optimiser est pris isolément et sa valeur est modifiée de manière à obtenir une intensité maximale des molécules analysée.

3.5. Conditions chromatographiques

3.5.1. Choix de la colonne et sa température

Nous avons testé la séparation des nucléosides en utilisant deux colonnes (C18 et HSST3). Nos résultats montraient que la séparation des nucléosides était meilleure sur la colonne HSST3 (ACQUITY UPLC, HSST3 2.1x30 mm, 1.8 µm, Waters) que sur la C18. La température de la colonne était maintenue à 35 °C.

3.5.2. Choix de la phase mobile

La phase mobile est très importante, puisqu'elle influence, non seulement la séparation des molécules, mais aussi l'intensité des signaux. Deux phases mobiles différentes sont testées au cours de notre mise au point : (1) Acétonitrile avec eau + acide formique ou acétique 0,1 % ; (2) méthanol + eau + acide formique ou acétique 0,1 %. Ensuite, différentes conditions de gradients étaient testées.

Nous avons observé que l'intensité des signaux et la séparation des nucléosides étaient meilleures avec la phase mobile suivante : Solvant A : eau + 0,1 % acide formique et solvant B : méthanol + 0,1 % acide formique. Cette phase mobile est donc utilisée dans la suite de notre méthode à un débit de 0,27ml/min. Le gradient utilisé est détaillé dans le **Tableau III. 1** ci-dessous.

Tableau III. 1. Détails du gradient utilisé lors de la mise au point

Temps(min)	Débit	%A	%B
Initial	0,27	97	3
2	0,27	96,5	3,5
3	0,27	96	4
4,7	0,27	96	4
4,9	0,27	20	80
6	0,27	20	80
6,5	0,27	97	3
8	0,27	97	3

Note. A : eau + acide formique 0,1 % ; B : méthanol + acide formique 0,1 %

Les injections, réalisées dans un premier temps en partial loop, sont faites en «*full loop*» suivies d'un lavage avec 800 µL de weak (H₂O+AF 0,1 %)/200 µL de strong (MeOH 100 % + 0,1 % AF). La colonne est préalablement équilibrée dans la phase mobile avant chaque série d'analyse, avec un contrôle de la ligne de base.

La pression de la colonne ainsi que sa température sont vérifiées pour s'assurer d'être dans les mêmes conditions avant le début des analyses.

3.6. Limites de détection, de quantification et temps de rétention des nucléosides

Les transitions retenues, les limites de détection et de quantification varient suivant l'analyte considéré (**Tableau III.2**). Le domaine de linéarité de chaque analyte ainsi que leur temps de rétention sont résumés dans le Tableau III.2.

Tableau III.2. Transitions, temps de rétention, limites de détection et de quantification des différents analytes

Analytes	Q1/Q3	LD (cps)	LQ (cps)	LD (nM)	LQ (nM)	Gamme ^a (μmol/l)	TR (min)
dC	228/112	81	270	0,014	0,05	0,024–12,5	0,93
	228/95,2	72	240	0,072	0,24		
m ⁵ dC	242/126	69	230	0,015	0,05	0,0062–1,58	1,43
	242/109	72	240	0,38	1,3		
dU	229/113	96	320	0,36	1,2	0,0015–0,391	1,87
	229/117	93	310	0,8	2,5		
dA	252/136	126	420	0,03	0,11	0,049 – 25	2,29
	252/119	72	240	0,19	0,6		
dG	268/152	57	190	0,05	0,15	0,049 – 25	2,86
	268/135	36	120	0,18	0,6		
dT	243/127	99	330	0,3	1,1	0,195 –50	4,19
	243/110	102	340	2,2	7,4		
8-oxodG	284/168	12	60	0,08	0,28	0,00047–0,12	4,6
	284/140	15	60	0,26	0,85		

Note. ^a la gamme présentée dans le tableau correspond au domaine de linéarité de chacun des nucléosides analysés ; LD : limite de détection ; LQ : limite de quantification, TR : temps de rétention ; dC : cytosine, m⁵dC : 5-méthylcytosine, dU : déoxyuracile ; dA : adénosine, dG : guanosine ; dT : thymidine ; 8-oxodG : 8-oxo-7,8-dihydro-2-désoxyguanosine

3.7. Chromatogramme d'élution des différents nucléosides

La **Figure III.4.** montre le profil la d'élution des différents nucléosides analysés. L'ordre d'élution est dC, m⁵dC, dU, dA, dG, dT et 8-oxodG.

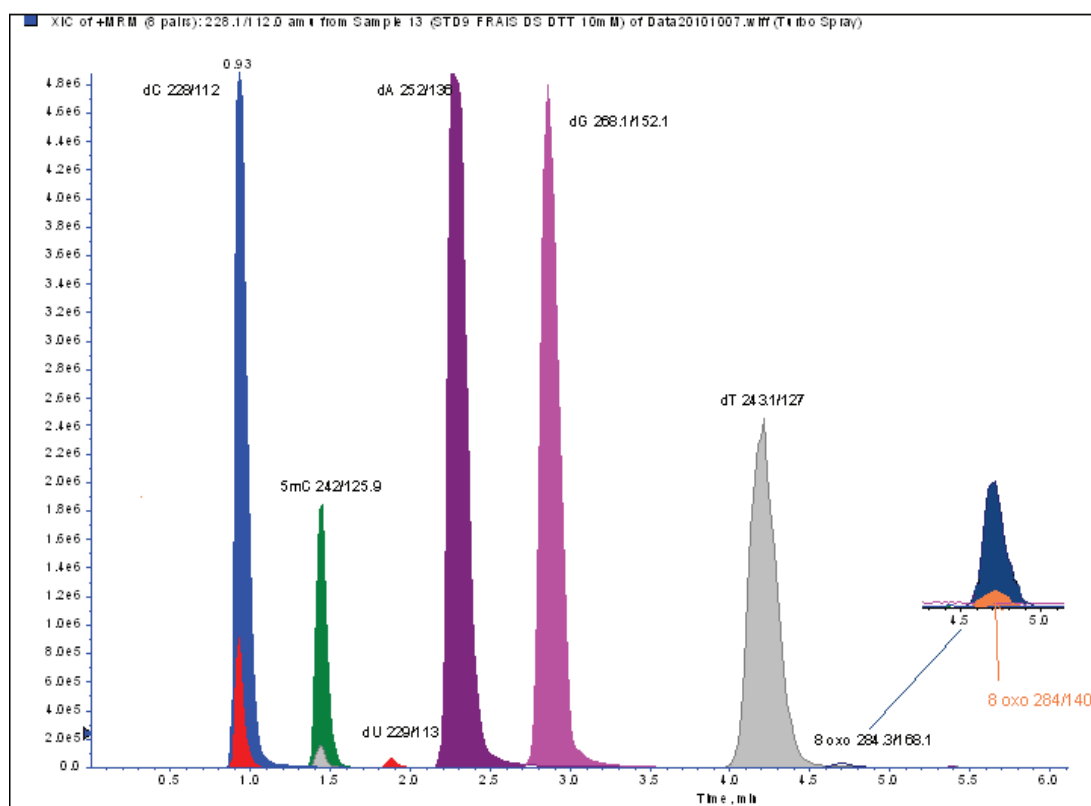


Figure III.4. Chromatogramme montrant le profil d'élution des nucléosides

3.8. Transitions retenues pour la quantification des nucléosides analysés

L'examen du chromatogramme révèle la présence de '*petits ions fragments*' de dU et dT sous les pics de dC et m⁵dC, respectivement (**Figure III.4.**). Ceci est lié au poids moléculaire très proche de ces analytes ou de leurs ions fils. Différents tests ont permis d'exclure toute forme de contamination : (1) l'injection séparée du mélange dU, dG, dA, dT ne montre aucune superposition d'un analyte sur un autre, (2) mais les superpositions décrites ci-dessus réapparaissent avec l'injection des mélanges dC/m⁵dC, m⁵dC/dT et dU/dT

Nous avons par la suite focalisé notre attention sur les différentes transitions et avons choisi les seconds ions fragments majoritaires pour dU et dT pour faciliter la discrimination entre les ions fragments générés par dC et m⁵dC.

Ainsi, plutôt que de garder les transitions 229/113 et 243/127, nous avons retenu les transitions 229/117 et 243/110 pour dU et dT, respectivement (**Tableau III.2.**).

Cette approche de choix des ions fragments ne montre plus les '*petits ions fragments*' de dU et dT, mais s'accompagne d'une perte de sensibilité. Ainsi, nous avons finalement retenu, pour quantifier nos analytes, la première transition, c'est-à-dire celle donnant la meilleure sensibilité sans prendre en compte les '*petits ions fragments*' de dU et dT sous dC et m⁵dC, car ceux-ci ne gênaient nullement la quantification.

3.9. Validation de la méthode d'analyse

La validation de notre méthode d'analyse qui permet de garantir la robustesse des résultats obtenus est faite en plusieurs points :

- (1) la stabilité des nucléosides, (2) la sensibilité et la calibration, (3) l'exactitude et la fidélité, et (4) la reproductibilité et la répétabilité

3.9.1. Test de stabilité des nucléosides

Des essais préliminaires de stabilité ont montré que les solutions stocks de nucléosides préparés dans l'eau milliQ étaient stables, sauf la 8-oxodG dont le signal n'était pas stable dans le temps. Nous sommes donc amenés à faire des tests de stabilité, en comparant l'intensité du signal des standards de 8-oxodG fraîchement préparés, soit dans du DTT 10 mM ou dans de l'eau milliQ à un mélange de solutions de standards congelés dans de l'eau milliQ.

Une stabilité à court terme des mêmes analytes a été également testée par injections répétées du mélange des nucléosides placé dans le gestionnaire d'échantillons. Plusieurs injections sont aussi effectuées après l'ouverture de la plaque de 96 puits.

Les mêmes tests étaient également réalisés sur une dizaine d'échantillons d'ADN hydrolysés.

Nos résultats ont montré que tous les nucléosides sont stables dans l'eau milliQ et le DTT, sauf la 8-oxodG (même préparée fraîchement dans l'eau milliQ) qui avait son signal effondré au bout de 60 heures.

Nous avons donc testé la stabilité de la 8-oxodG dans différentes conditions opératoires en rajoutant au mélange des six autres nucléosides de la 8-oxodG congelée, 8-oxodG fraîchement préparé dans l'eau, dans du DTT 10 mM et congelé dans du DTT 10 mM.

Les résultats de ces tests ont montré que la 8-oxodG est stabilisée lorsqu'elle est préparée dans du DTT 10 mM. Ainsi nous avons décidé de préparer tous nos standards dans du DTT 10 mM.

3.9.2. Linéarité et Sensibilité

Une courbe de calibration — établie en neuf points — à partir de solutions standards préparées dans la même matrice biologique que nos échantillons permet d'apprécier la linéarité de la méthode. Les domaines de linéarité des analytes sont rassemblés dans le **Tableau III.2**.

Les limites de détection (LD : triple du niveau du bruit de fond) et de quantification (LQ : dix fois le niveau du bruit de fond ou plus petite valeur à partir de laquelle il existe un résultat de mesure avec une fidélité suffisante) qui permettent d'apprécier la sensibilité de la méthode sont déterminées sur une série d'échantillons d'ADN analysés en parallèle avec les standards.

3.9.3. L'exactitude et la fidélité

La justesse et la fidélité de la méthode sont appréciées en comparant la déviation standard et le coefficient de variation des intra et inter-essais sur une série de pool d'ADN — considéré comme un CQ — qui est hydrolysé en parallèle avec les échantillons analysés.

3.9.4. La répétabilité et la reproductibilité

Les tests de répétabilité ont été effectués en passant cinq points de la gamme de standards (filtrés et non filtrés) sur une plaque complète de 96 puits ainsi que 40 échantillons d'ADN hydrolysés dans différentes conditions. La répétabilité est appréciée par le calcul de la moyenne, écart type et coefficient de variation intra-essai. La reproductibilité de la méthode a été évaluée à partir d'une série d'injections de standards et d'ADN hydrolysés dans la même matrice à différentes dates, par le calcul de la moyenne ; écart type et coefficient de variation inter-essais.

3.10. ÉVALUATION DES NIVEAUX DE m⁵dC, DE dU ET DE 8-oxodG SUR LES AXES CHC, CP ET CTM

3.10.1. L'axe CHC (carcinome hépatocellulaire)

3.10.1.1. Analyse comparée de m⁵dC, de dU et de 8-oxodG chez les cas et témoins

Nos résultats ne montraient aucune différence significative dans le niveau global de m⁵dC entre cas CHC et témoins cirrhotiques (médianes : 3,75 % vs 3,62 %, respectivement ; $P = 0,169$; **Tableau III.3**).

Aucune différence significative n'était aussi observée concernant le niveau de misincorporation d'uracile (médianes : 83,1 vs 85,98 $\mu\text{mol/mol}$ ADN, respectivement, $P = 0,665$; **Tableau III.3**). Les mêmes tendances sont observées quant aux concentrations de 8-oxodG (médianes : 12,17 vs 13,80 respectivement, $P = 0,331$) ou le ratio dU/dT ($P = 0,100$).

Tableau III.3. Niveaux de m⁵dC, de dU et de 8-oxodG chez les cas (Cirrhose avec CHC) comparés aux témoins (Cirrhose sans CHC)

Variables	Témoins Cirrhose <u>sans</u> CHC			Cas (Cirrhose <u>avec</u> CHC)			P -Value ^a
	Médiane	25 – 75 P	N	Médiane	25 – 75 P	N	
m ⁵ dC (%)	3,62	3,10 – 4,02	282	3,75	3,35 – 4,28	141	0,169
dU ¹	85,98	59,50 – 118,1	242	83,1	44,26 – 101,42	132	0,665
8-oxodG ¹	13,8	7,06 – 20,76	186	12,17	4,69 – 18,76	89	0,331
dU/dT ($\times 10^{-4}$)	3,8	2,7 – 4,8	248	4,2	2,4 – 4,9	132	0,1

Note. m⁵dC : 5-méthylcytosine, dU : déoxyuracile ; 8-oxodG : 8-oxo-7,8-dihydro-2-déoxyguanosine

¹Valeurs exprimées en $\mu\text{mol/mol}$ d'ADN

^aMann–Whitney U test

3.10.1.2. Corrélations entre les marqueurs métaboliques du MMC et les taux de m⁵dC, dU et 8-oxodG

Les résultats montrent une association inverse entre les concentrations de folates et celles d'Hcy ($r = -0,297$; $P < 0,001$). De plus, nous avons aussi observé une relation inverse entre concentrations de vitamine B12 et de MMA ($r = -0,327$; $P < 0,001$) ; et entre l'âge et les concentrations de vitamine B12 ($r = -0,142$; $P < 0,05$) (**Tableau III.4**).

Une corrélation positive était observée entre les concentrations d'Hcy et l'âge ($r = 0,281$, $P < 0,001$) ; et entre les concentrations de MMA et l'âge ($r = 0,345$; $P < 0,001$) (**Tableau III.4**). Les mêmes tendances sont observées entre le tabagisme et l'IMC ($r = 0,118$; $P < 0,05$).

Nous avons aussi obtenue une corrélation positive entre les taux de MMA et le niveau de méthylation d'ADN ($r = 0,142$; $P < 0,05$). La même tendance est obtenue entre 8-oxodG et dU ($r = 0,166$; $P < 0,05$). Une association inverse est obtenue entre la 8-oxodG et le niveau de m⁵dC ($r = -0,273$; $P < 0,001$). La 8-oxodG est négativement corrélée au ratio dU/dT ($r = -0,228$; $P < 0,001$; **Tableau III.4**).

Nos résultats montrent que le niveau global de méthylation d'ADN n'est pas influencé de l'âge, le sexe, le tabac ainsi que l'alcoolisme chez les patients cirrhotiques.

Tableau III.4. Coefficients de corrélations de Spearman entre les acteurs du cycle des monocarbones et les concentrations de m5dC, dU et 8-oxodG chez les cas (cirrhose avec CHC) et témoins (cirrhose sans CHC)

	VitB12	HCY	MMA	Age	IMC	Sexe	Tabac	Alcool	m ⁵ dC	dU	8-oxodG	dU/dT
Folates	-0,029	-0,297**	-0,002	0,081	0,041	-0,082	-0,043	-0,088	-0,013	-0,005	-0,003	-0,031
Vitamine B12		-0,072	-0,327**	-0,142*	-0,088	-0,006	0,000	0,085	-0,058	-0,020	-0,003	0,009
Hcy			0,289**	0,281**	-0,009	0,040	0,089	0,030	0,005	0,041	0,102	0,001
MMA				0,345**	0,059	0,080	0,024	-0,080	0,142*	-0,026	0,008	-0,030
Age					0,137*	-0,032	0,048	-0,091	-0,020	0,077	0,089	0,097
IMC						0,091	0,118*	0,072	-0,036	0,133*	0,050	0,071
Sexe							0,283**	0,277**	0,032	-0,058	-0,117	0,002
Tabac								0,207**	0,023	0,050	0,024	0,110*
Alcool									0,074	0,014	-0,057	0,009
m ⁵ dC										-0,041	-0,273**	-0,118*
dU											0,166*	0,721**
8-oxodG												-0,228**

Note. VitB12 : Vitamine B12 ; HCY : homocystéine ; IMC : Indice de Masse Corporelle ; m⁵dC : 5-méthylcytosine, dU: déoxyuracile, MMA : methylmalonic acid ; 8-oxodG : 8-oxo-7,8-dihydro-2-désoxyguanosine

** P< 0.001 ; * P< 0.05

3.10.2. Évaluation des taux de m⁵dC, dU et de 8-oxodG sur l'axe CP (cas vs. témoins)

Nous avons réalisé une étude comparée des niveaux de m⁵dC, dU et 8-oxodG entre les témoins et patients souffrant d'un CP (analyses effectuées sur l'ADN provenant du tissu sain).

Nos résultats montraient que les concentrations de m⁵dC et de dU étaient significativement plus élevées chez les patients ayant un CP que chez les témoins sains. En effet, on observe une hyperméthylation statistiquement significative entre les cas, comparés aux témoins (médianes : 7,9 % vs 3,6 %, respectivement ; $P < 0,0001$; *Mann-Whitney U test*). De plus, le niveau de misincorporation d'uracile était plus augmenté chez les cas que chez les témoins (médianes : 94,1 vs 78,4 $\mu\text{mol/mol}$ ADN, $P = 0,0136$) (**Tableau III.5**).

Aucune différence significative n'était observée entre cas et témoins concernant les concentrations génomique de 8-oxodG ($P = 0,204$).

Une augmentation significative du ratio dU/dT était également notée chez les cas avec CP, comparés aux témoins ($P < 0,0001$).

Tableau III.5. Comparaison des niveaux de m⁵dC, de dU et de 8-oxodG chez les patients souffrant de cancer du poumon (cas) et chez les témoins (patients sans CP)

Paramètres	Témoins (patients sans CP)			Cas (patients avec CP)			
	Médiane	25 – 75 P	N	Médiane	25 – 75 P	N*	P-value ^a
% m ⁵ dC	3,6	3,1 – 4,2	272	7,6	6,9 – 8,2	153	< 0,0001
dU	78,4	51,1 – 114,5	236	94,1	70,4 – 121,3	134	0,0136
8-oxodG	13,6	7,8 – 18,7	165	11,8	8,1 – 15,8	130	0,204
dU/dTx10–4	3,8	2,5 – 5,1	238	5,5	4,7 – 7,3	137	< 0,0001

Note. m⁵dC : CP : cancer du poumon ; 5-méthylcytosine, dU : déoxyuracile ; 8-oxodG : 8-oxo-7,8-dihydro-2-désoxyguanosine, N* : nombre de sujets ; varie à cause des valeurs manquantes pour certains paramètres

¹Valeurs exprimées en $\mu\text{mol/mol}$ d'ADN

^a Mann–Whitney U test

3.10.2.1. Étude comparée des niveaux de m⁵dC, dU et 8-oxodG sur tissu sain et tumoral

Nous avons réalisé, sur cet axe de notre étude, une étude comparative du niveau des altérations génomiques (m⁵dC, de dU et de 8-oxodG) sur tissu sain et tumoral provenant exclusivement des patients de Nancy disponibles au CRB (*CHU, service du Pr Jean Michel Vignaud*).

3.10.2.1.1. Niveaux de m⁵dC, de dU et 8-oxodG dans la tumeur comparée au tissu sain adjacent

Nos résultats montraient une hyperméthylation significative dans l'ADN tumoral par rapport à l'ADN du tissu sain (valeurs médianes de 7,86 % vs 7,59 %, respectivement ; $P = 0,019$) (**Tableau III.6**).

Nous avons observé que la misincorporation d'uracile était significativement plus élevée dans la tumeur que dans le tissu sain (médianes : 111,44 vs 94,54 $\mu\text{mol/mol}$ d'ADN ; respectivement, $P < 0,001$). De plus, le niveau de 8-oxodG est significativement plus élevé dans la tumeur que dans le tissu sain (médianes : 15,65 vs 11,8 $\mu\text{mol/mol}$ ADN, respectivement ; $P < 0,001$; **Tableau III.6**).

Tableau III.6. Comparaison des niveaux de m⁵dC, de dU et 8-oxodG dans la tumeur et dans le tissu sain adjacent

Paramètres	Tissu sain			Tumeur			
	Médiane	25 – 75 P	N	Médiane	25 – 75 P	N*	P– Value ^a
m ⁵ dC (%)	7,59	6,92 – 8,25	153	7,86	7,23 – 8,44	207	0,019
dU ¹	94,54	71,11 – 121,38	127	111,44	66,06 – 231,48	183	<0,001
8-oxodG ¹	11,84	8,14 – 15,90	130	15,65	8,52 – 32,47	163	<0,001
dU/dT ($\times 10^{-4}$)	5,55	4,73 – 7,30	127	4,93	4,25 – 5,83	183	<0,001

Note. m⁵dC : 5-méthylcytosine, dU : déoxyuracile ; 8-oxodG : 8-oxo-7,8-dihydro-2-désoxyguanosine, N* : nombre de sujets ; varie à cause des valeurs manquantes pour certains paramètres

¹Valeurs exprimées en $\mu\text{mol/mol}$ d'ADN

^aMann–Whitney U test

3.10.2.2. L'histologie influence-t-elle les concentrations de m⁵dC, dU et 8-oxodG ?

3.10.2.2.1. Comparaison des niveaux de m⁵dC, dU et 8-oxodG dans le tissu sain en fonction de l'histologie (adénocarcinomes vs. carcinome épidermoïde)

Nous avons observé que les niveaux de m⁵dC, de misincorporation d'uracile et de 8-oxodG variaient suivant l'histologie du tissu sain (**Tableau III.7**). En effet, nous avons constaté une hyperméthylation significative dans les adénocarcinomes par rapport aux carcinomes épidermoïdes (médianes : 7,79 % vs 7,43 %, respectivement, $P = 0,002$; *Mann-Whitney U test*). La misincorporation d'uracile était significativement plus élevée dans les adénocarcinomes que dans les carcinomes épidermoïdes (médianes : 112,59 vs 80,31 $\mu\text{mol/mol}$ ADN, respectivement, $P = 0,003$). À l'inverse, les concentrations de 8-oxodG étaient significativement plus élevées dans les carcinomes épidermoïdes que dans les adénocarcinomes (médianes : 9,39 vs 12,72 $\mu\text{mol/mol}$ ADN, respectivement, $P = 0,035$; **Tableau III.7**).

Tableau III.7. Comparaison des niveaux de m⁵dC, de dU et 8-oxodG dans le tissu sain suivant l'histologie (carcinomes épidermoïdes vs. adénocarcinomes)

Paramètres	Carcinomes Épidermoïdes			Adénocarcinomes			
	Médiane	25 – 75 P	N	Médiane	25 – 75 P	N	P- Value ^a
m ⁵ dC (%)	7,43	6,88 – 7,96	86	7,79	7,33 – 8,24	57	0,002
dU ¹	80,31	54,89 – 105,99	79	112,59	84,51 – 171,15	48	0,003
8-oxodG ¹	12,72	8,72 – 18,62	81	9,39	7,95 – 16,95	39	0,035
dU/dT ($\times 10^{-4}$)	5,25	4,21 – 6,43	79	5,68	5,06 – 6,85	48	0,238

Note. m⁵dC : 5-méthylcytosine, dU : déoxyuracile ; 8-oxodG : 8-oxo-7,8-dihydro-2-déoxyguanosine ; N* : nombre de sujets ; varie à cause des valeurs manquantes pour certains paramètres

¹Valeurs exprimées en $\mu\text{mol/mol}$ d'ADN

^a Mann-Whitney U test

3.10.2.2.2. Comparaison des niveaux de m⁵dC, dU et 8-oxodG dans la tumeur en fonction de l'histologie: adénocarcinomes vs. carcinomes épidermoïdes

Nous avons observé aussi une variation des concentrations de m⁵dC, dU et 8-oxodG en fonction de l'histologie du tissu tumoral (**Tableau III.8**). Nous avons constaté une hyperméthylation statistiquement significative des adénocarcinomes par rapport aux carcinomes épidermoïdes (médianes : 8,18 % vs 7,60 %, respectivement, $P < 0,001$). De façon similaire, on

observe une misincorporation d'uracile 2,5 fois plus importante dans les adénocarcinomes que dans les carcinomes épidermoïdes (médianes : 231,37 vs 89,79 $\mu\text{mol/mol}$ ADN, respectivement, $P < 0,001$). Une augmentation significative du ratio dU/dT était observée dans les adénocarcinomes par rapport aux carcinomes épidermoïdes ($P < 0,001$).

Tableau III.8. Évaluation des niveaux de m⁵dC, de dU et 8-oxodG dans la tumeur (carcinomes épidermoïdes vs. adénocarcinomes)

Paramètres	Carcinome Épidermoïdes			Adénocarcinomes			P- Value ^a
	Médiane	25 – 75 P	N	Médiane	25 – 75 P	N	
m ⁵ dC (%)	7,60	7,09 – 8,44	113	8,18	7,65 – 8,59	80	<0,001
dU ¹	89,79	54,16 – 163,20	98	231,37	108,13 – 347,76	74	<0,001
8-oxodG ¹	12,76	7,85 – 21,15	88	23,40	14,50 – 38,38	67	<0,001
dU/dT ($\times 10^{-4}$)	4,61	4,07 – 5,41	98	5,21	4,69 – 6,09	74	<0,001

Note. m⁵dC : 5-méthylcytosine, dU : déoxyuracile ; 8-oxodG : 8-oxo-7,8-dihydro-2-déoxyguanosine ; N* : nombre de sujets ; varie à cause des valeurs manquantes pour certains paramètres

¹Valeurs exprimées en $\mu\text{mol/mol}$ d'ADN

^a Mann–Whitney U test

3.10.2.3. Corrélations entre m⁵dC, dU et 8-oxodG dans le tissu sain et la tumeur

Nous avons obtenu une association inverse entre m⁵dC et le ratio dU/dT dans le tissu sain ($r = -0,380$, $P < 0,001$). Des associations inverses sont également observées entre m⁵dC et le tabagisme ($r = -0,171$; $P < 0,005$) ; et entre la 8-oxodG et le tabagisme ($r = -0,179$; $P < 0,005$). Une association positive est obtenue entre le tabagisme et le ratio dU/dT ($r = 0,192$; $P < 0,005$) (**Tableau III.9**).

Dans la tumeur, nous avons obtenu une association positive entre m⁵dC et dU ($r = 0,457$; $P < 0,001$), suggérant qu'une hyperméthylation d'ADN pourrait être associée à une misincorporation accrue d'uracile dans la carcinogenèse pulmonaire. Des associations positives étaient aussi observées entre m⁵dC et 8-oxodG ($r = 0,387$; $P < 0,001$) ; entre dU et 8-oxodG ($r = 0,851$; $P < 0,001$). Contrairement à la tendance observée dans le tissu sain, le ratio dU/dT augmente avec l'augmentation du niveau de la 8-oxodG ($r = 0,165$, $P < 0,05$). Une corrélation inverse est aussi observée dans la tumeur entre la 8-oxodG et le tabagisme ($r = -0,154$; $P < 0,05$) (**Tableau III.10**).

Tableau III.9. Coefficients de corrélations de Spearman entre le tabagisme et les niveaux de m⁵dC, dU et de 8-oxodG dans le tissu sain

	dU	8-oxodG	dU/dT	Tabac
m ⁵ dC	0,056	0,093	-0,380	-0,171
dU		-0,106	0,242	-0,064
8-oxodG			-0,249	-0,179
dU/dT				0,192

Note. m⁵dC : 5-méthylcytosine ; 8-oxodG : 8-oxo-7,8-dihydro-2-désoxyguanosine

En gras sont les coefficients de corrélation avec $P < 0,05$

Tableau III.10. Coefficients de corrélations de Spearman entre le tabagisme et les niveaux de m⁵dC, dU et de 8-oxodG dans la tumeur

	dU	8-oxodG	dU/dT	Tabac
m ⁵ dC	0,457*	0,387*	-0,079	-0,102
dU		0,851*	0,329	-0,129
8-oxodG			0,165	-0,152
dU/dT				-0,002

Note. m⁵dC : 5-méthylcytosine ; 8-oxodG : 8-oxo-7,8-dihydro-2-désoxyguanosine

En gras sont les coefficients de corrélation avec $P < 0,05$

* $P < 0,001$

3.10.3. Évaluation des niveaux de m⁵dC, dU et de 8-oxodG et recherche d'adduits d'ADN chez les conducteurs de taxi-moto exposés à la pollution de l'air

3.10.3.1. Évaluation des niveaux de m⁵dC, dU et 8-oxodG

Nous n'avons pas noté de différence significative chez les CTM et les témoins en ce qui concerne le niveau de méthylation d'ADN. En revanche, les concentrations d'uracile et de 8-oxodG étaient significativement plus élevées chez les CTM que chez les témoins non exposés (Tableau III.11), ce qui évoque un stress oxydant lié à l'exposition.

Tableau III.11. Comparaison des niveaux de m⁵dC, dU et 8-oxodG chez les conducteurs de taxi-moto comparés aux témoins du village

Paramètres	Témoins (n=35)	CTM (n=175)	P-value
% m ⁵ dC	7,2 ± 1,6	7,5 ± 1,8	0,374
dU (μmol/mol ADN)	88,5 ± 32,4	128,7 ± 104,5	< 0,001
8-oxodG (μmol/mol ADN)	8,3 ± 1,4	11,1 ± 10,8	0,005

Note. m⁵dC : 5-méthylcytosine, dU : uracile, 8-oxodG : 7,8-dihydro-2-désoxyguanosine

3.10.3.2 Recherche des adduits d'ADN chez les populations exposées à la pollution de l'air par rapport aux habitants du village (Synthèse article *Environ Toxicol.*)

Cette analyse a été réalisée non seulement chez les conducteurs de taxi-moto, mais aussi chez les vendeurs de carburants aux abords des rues de Cotonou ainsi que les sujets vivant en zones urbaines et péri-urbaines, avec les sujets habitants la zone rurale comme population témoin. Cette approche nous a permis d'appréhender la formation des adduits d'ADN en fonction du degré d'exposition à la pollution. Comme illustré sur la **Figure III.5**, l'autoradiographie révèlent la présence d'un adduit majeur chez les sujets exposés (CTM ou vendeurs dans les rues), mais qui est absent chez les sujets témoins du village. À l'étape actuelle de notre étude la nature de l'adduit majeure est inconnue.

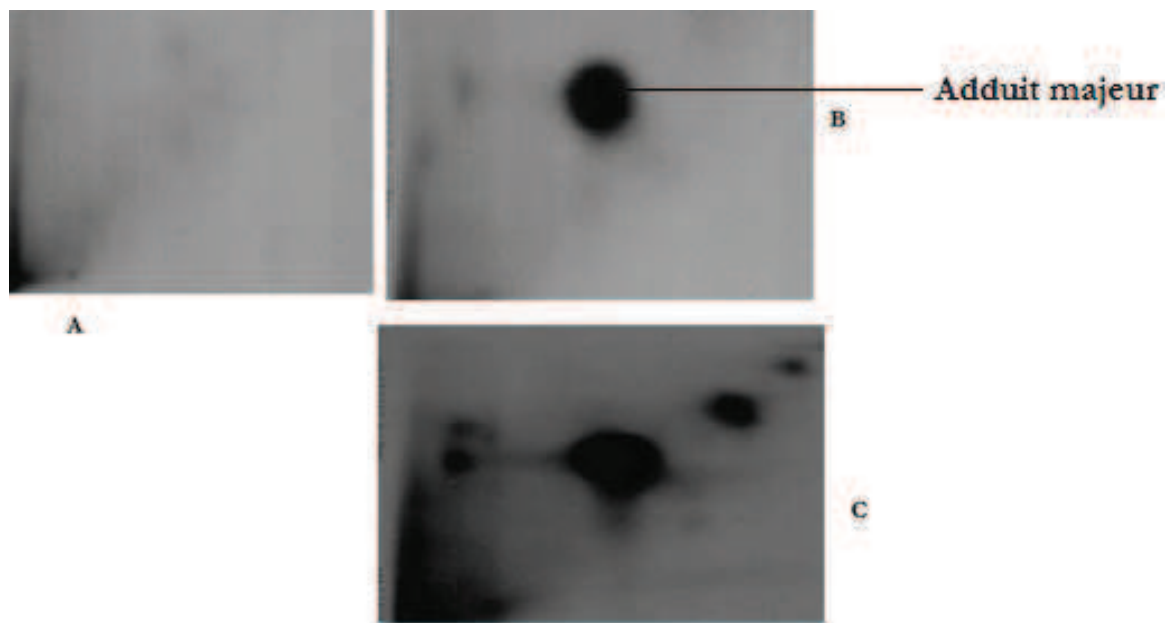


Figure III.5. Autoradiographie des profils d'adduits d'ADN dans la population cible (marquage au ^{32}P)

Note. **A** : sujet habitant le village sans adduit majeur ; **B** : conducteur de taxi-moto avec l'adduit majeur ; **C** : vendeur de rue montrant l'adduit majeur avec d'autres adduits mineurs

L'ADN purifié est hydrolysé en désoxyribonucléosides 3' monophosphate par une endonucléase (nucléase de *Staphylocoque*) et une exonucléase (Phosphodiesterase de rate), ce qui génère ainsi un mélange de nucléotides normaux et modifiés (adduits). On procède ensuite à un "enrichissement des adduits" ou à leur sélection par la nucléase P1, qui hydrolyse les phosphates en 3' des nucléotides normaux. La configuration structurale de l'adduit, protégeant la liaison du phosphate en 3', permet sa conservation dans les adduits. Un marquage enzymatique spécifique des adduits est réalisé avec la polynucléotide kinase T4, qui transfère un phosphate radioactif en position γ de l'ATP sur la position 5' du nucléotide, marquant ainsi les adduits. Les nucléosides normaux ne pouvant pas être phosphorylés n'interfèrent donc pas sur le marquage. La migration sur plaque de couche mince de polyéthylèneimine cellulose, dans des solvants aqueux salins, permet de séparer les nucléosides normaux et l'excès de phosphate inorganique du ou des différents adduits. Les adduits qui sont hydrophobes, restent au point d'origine ou migrent légèrement suivant leur degré d'hydrophobicité. Les adduits sont ensuite séparés par chromatographie bidimensionnelle échangeuse d'anions, sur plaque de couche mince de polyéthylèneimine cellulose, puis visualisés par autoradiographie.

3.11. Discussion des résultats relatifs aux altérations génétiques (dU et 8-oxodG, adduits d'ADN) et épigénétiques (m⁵dC) dans le CHC, le CP et sur l'axe 'pollution de l'air'

3.11.1. Niveaux de m⁵dC, dU et 8-oxodG dans le carcinome hépatocellulaire

Il est bien accepté que les altérations du profil de méthylation d'ADN jouent un rôle majeur dans la carcinogenèse hépatocellulaire (Formeister *et al.* 2010 ; Sceusi *et al.* 2011 ; Shen, L. *et al.* 1998 ; Gao *et al.* 2008). Le niveau de m⁵dC de séquences répétées, telles que *LINE-1* a été suggéré comme un marqueur pour évaluer la méthylation globale d'ADN (Yang, A. S. *et al.* 2004). La plupart des études précédentes sur le CHC ont analysé la méthylation de gènes spécifiques ayant une implication dans la carcinogenèse, et le niveau global de m⁵dC n'est pas bien documenté, plus particulièrement dans un contexte de CHC survenant sur une cirrhose.

Nos résultats ont montré que le niveau de méthylation d'ADN ne diffère pas significativement entre les patients cirrhotiques et les cas de CHC. Une récente étude ayant comparé le niveau de m⁵dC des séquences répétées *LINE-1* dans la tumeur et le tissu sain adjacent a rapporté une hypométhylation globale significative chez les patients souffrant d'un CHC sur un foie non cirrhotique, par rapport au niveau de méthylation de *LINE-1* dans le tissu sain adjacent à la tumeur (Trankenschuh *et al.* 2010). Par ailleurs, cette étude n'a observé aucune différence de niveau de m⁵dC dans le carcinome fibrolamellaire — un variant rare de CHC — et le tissu sain adjacent (Trankenschuh *et al.* 2010). L'hypométhylation de *LINE-1* était associée à un risque accru de CHC (Di *et al.* 2011). L'hypométhylation de *LINE-1* était significativement corrélée au nombre, la taille de la tumeur et le taux d'AFP (Ramzy *et al.* 2011).

Une carence en folates est associée à une misincorporation accrue d'uracile dans l'ADN (Duthie, Grant *et al.* 2000 ; Chango *et al.* 2009). Dans notre étude, nous n'avons pas noté de différence significative entre les taux de folates et de misincorporation d'uracile. De plus, la plupart des sujets inclus dans notre étude ont des taux de folates normaux, ce qui expliquerait, du moins en partie, l'absence d'une association entre les taux de folates et d'uracile.

Nous n'avons obtenue aucune influence du niveau de folates sur le niveau de m⁵dC ou de 8-oxodG. À ce jour, aucune étude n'a examiné le lien entre les taux de folates et ces lésions d'ADN dans le CHC.

3.11.2. Niveaux de m⁵dC, dU et 8-oxodG dans le cancer du poumon

Nos résultats ont montré une hyperméthylation du génome tumoral par rapport au tissu sain adjacent. Ces altérations du profil de m⁵dC observées dans la carcinogenèse pulmonaire sont conformes aux données de la littérature. Toutefois, la plupart des études antérieures ont analysé le niveau de méthylation de séquences répétées d'ADN, rendant difficile la comparaison de nos résultats. L'analyse du niveau de méthylation des séquences *LINE-1* d'ADN obtenu de microdissection de tissus sain et tumoral — une approche expérimentale identique à celle utilisée dans notre étude — a montré une hypométhylation de *LINE-1* dans plusieurs types de tumeurs, et les auteurs de cette étude ont conclu que le profil de méthylation était spécifique au type de tissu analysé (Chalitchagorn *et al.* 2004; Yang, H. H. *et al.* 2010).

Le niveau de m⁵dC varie au sein de la tumeur et dans le tissu sain, et ce, suivant l'histologie : les ADK montrant une hyperméthylation globale significative par rapport aux carcinomes épidermoïdes. Un *pattern* de méthylation similaire était rapporté dans une étude qui a analysé la méthylation de 6458 îlots CpG dans le CHC et le tissu sain adjacent (Gao *et al.* 2008). L'analyse de la méthylation des îlots CpG dans le cancer colorectal a révélé que les altérations du profil de méthylation étaient significativement plus élevées pendant les phases précoces de la carcinogenèse (Kim, Y. H. *et al.* 2006). Ces données pourraient expliquer l'hyperméthylation observée dans la tumeur, compte tenu du fait que plus de la moitié des cancers (55 %) ont été diagnostiqués pendant la phase I, phase au cours de laquelle la taille de la tumeur était < 3 cm.

Le niveau de m⁵dC était significativement plus élevé dans la tumeur que dans les cellules normales proliférantes de l'endomètre (3,48 % vs 2,94 %, respectivement) (Postawski *et al.* 2009). Une hyperméthylation d'ADN tumoral a été également observée dans une étude ayant comparé la méthylation du tissu sain et tumoral de l'endomètre (Popiela *et al.* 2002).

La misincorporation d'uracile était significativement plus importante dans la tumeur que dans le tissu sain, d'une part, et dans les ADK comparés aux carcinomes épidermoïdes aussi bien dans le tissu sain que tumoral, d'autre part. Une misincorporation accrue d'uracile a été rapportée dans les cellules cultivées dans un milieu carencé en folates (Duthie and Hawdon 1998 ; Duthie, Narayanan *et al.* 2000 ; Duthie, Grant *et al.* 2000).

Les concentrations de la 8-oxodG étaient plus élevées dans la tumeur que dans le tissu sain, corroborant les données indiquant une diminution de la capacité de réparation de la 8-oxodG chez les patients souffrant d'un cancer (Cooke *et al.* 2006). Nos observations sont aussi en accord avec ceux rapportés dans les cancer du côlon, de l'estomac, de l'ovaire, du cerveau et du poumon sur tissu tumoral ou non (Olinski *et al.* 1992). Des concentrations élevées de 8-oxodG ont été

également observées dans les tumeurs de foie et de poumon par rapport aux tissus sains correspondants (Toyokuni *et al.* 1994).

3.11.3. Corrélations entre m⁵dC, dU et 8-oxodG dans le carcinome hépatocellulaire et le cancer du poumon

Dans le CHC, nous avons observé une corrélation négative significative entre le niveau de m⁵dC et les concentrations de 8-oxodG. Une tendance inverse était observée dans le cancer du poumon sur les analyses effectuées dans le tissu tumoral, mais pas dans le tissu sain. Ceci suggère une synergie entre un processus non régulant impliquant la 8-oxodG et un processus régulant (méthylation d'ADN) dans la carcinogenèse pulmonaire. Une récente étude cas témoins sur le cancer du côlon avait également rapporté une corrélation négative entre m⁵dC et 8-oxodG (Guz *et al.* 2008).

Dans la carcinogenèse pulmonaire, nous avons observé que l'hyperméthylation tumorale était corrélée à une misincorporation accrue d'uracile. L'accumulation des groupements méthyles sur l'ADN pourrait engendrer un encombrement stérique, et par conséquent rendre l'ADN inaccessible à la machinerie de la réparation des lésions de dU, un probable mécanisme qui expliquerait, du moins en partie, l'accumulation de dU. La misincorporation accrue d'uracile dans l'ADN peut également provenir d'une hypométhylation d'ADN induite par une carence en folates (Jacob *et al.* 1998 ; Linhart *et al.* 2009).

3.11.4. Niveaux de m⁵dC, dU et 8-oxodG sur l'axe 'pollution de l'air' à Cotonou

Nos résultats ne montraient aucune différence entre les niveaux de méthylation d'ADN chez les CTM et les témoins. En revanche, les concentrations de dU et 8-oxodG étaient significativement plus élevées chez les CTM par rapport aux témoins non exposés. Ces observations confirment nos premiers résultats indiquant que les sujets vivant en zones urbaines ou périurbaines avaient des niveaux élevés de lésions de type 8-oxodG par rapport aux témoins du village (Ayi-Fanou *et al.* 2006). Une augmentation significative de 8-oxodG était aussi observée chez les conducteurs de bus de Prague exposés à des niveaux élevés d'HAPs par rapport aux témoins (Rossner *et al.*, 2008). Le niveau urinaire de 8-oxodG était plus élevé chez les égoutiers exposés à des taux élevés d'HAPs par rapport aux témoins non exposés (Al Zabadi *et al.*, 2011). Une augmentation de 8-oxodG était rapportée chez des non-fumeurs exposés à la pollution de l'air par rapport aux fumeurs non exposés. Ces données suggèrent que la 8-oxodG pourrait être utilisée comme biomarqueur pour évaluer l'effet pro-oxydant des polluants de l'air sur l'ADN chez les sujets exposés (Barbato *et al.*, 2010).

**CHAPITRE IV : DÉTERMINANTS
GÉNÉTIQUES DU RISQUE DE
CARCINOME HÉPATOCELLULAIRE ET
DE CANCER DU POUMON**

4. Déterminants génétiques de la réparation d'ADN et du métabolisme des monocarbones avec le risque de carcinome hépatocellulaire et de cancer du poumon

4.1. Approche de sélection des gènes candidats à la réparation d'ADN

Les gènes candidats à la réparation d'ADN proviennent, en partie, d'une liste de gènes candidats d'une récente étude (menée par l'équipe du Dr. Abalo Chango) qui avait montré que plusieurs gènes du système BER avaient un niveau d'expression altéré dans les cellules HepG2 cultivées dans un milieu carencé en donneurs de méthyles. Une autre partie des gènes candidats provient d'une revue exhaustive des données de la littérature.

Au total, 94 gènes ont été examinés sur un total de 104 retenus au départ. Ces 94 gènes candidats impliqués dans la réparation et la stabilité d'ADN couvrent plusieurs systèmes, en particulier, la réparation :

- par excision de bases (BER : *base excision repair*),
- par excision de nucléotides (NER : *nucleotide excision repair*),
- des mésappariements (MMR : *mismatch repair*),
- des cassures double brin (DSBR : *double strand break repair*).

La liste des gènes examinés est présentée dans le **Tableau IV.1**.

4.2. Approche de sélection des gènes candidats au métabolisme des monocarbones

Nous avons choisi les gènes candidats du MMC à partir d'une revue exhaustive de la littérature et avons retenu 87 gènes qui couvrent l'ensemble des acteurs du MMC, notamment :

- le cycle des folates, de la choline, de la vitamine B12 et de la vitamine B6 (enzymes de transports et métabolisme),
- la voie reméthylation, de la méthionine et de la S-adénosylméthionine,
- la voie de transsulfuration,
- les réactions de trans méthylations d'ADN, des ARN, des protéines, coenzymes et métabolites de ces mêmes réactions,
- les voies d'élimination avec les métabolismes des purines, pyrimidine et des xénobiotiques.

La liste des gènes candidats examinés est présentée dans les **Tableau IV.2**

Tableau IV.1. Gènes candidats à la réparation d'ADN

Pathways	Gene	Name	Gene Product Activity	Chromosome	Accession
Base excision repair (BER)	UNG		DNA glycosylases: major altered base released	12q24.11	NM_080911
	SMUG1		Removes misincorporated U or deaminated cytosine residues	12q13.13	NM_014311
	MBD4(MED1)		Removes U and 5-hmeU	3q21.3	NM_003925
	TDG		U or T opposite G at CpG sequences	12q23.3	NM_003211
	OGG1		Removes U, T opposite G and 5-hmeU	3p25.3	NM_016821
	MUTYH		8-oxoG opposite C	1p34.1	NM_012222
	NTHL1		A opposite 8-oxoG	16p13.3	NM_002528
	MPG		Ring-saturated or fragmented pyrimidines	16p13.3	NM_002434
	NEIL1		3-meA, ethenoA, hypoxanthine	15q24.2	NM_024608
	NEIL2		Removes thymine glycol	8p23.1	NM_145043
Other BER factors	APEX1		Removes oxidative products of pyrimidines	14q11.2	NM_001641
	APEX2		AP endonuclease	Xp11.21	NM_014481
	LIG3		DNA Ligase	17q12	NM_013975
	XRCC1		Ligase accessory factor	19q13.31	NM_006297
	PARP1		Protects strand interruptions	1q42.12	NM_001618
	PARP2		PARP-like enzyme	14q11.2	NM_005484
Mismatch excision repair (MMR)	MGMT		O ⁶ -meG alkyltransferase	10q26.3	NM_002412
	MSH2		Mismatch and loop recognition MSH2, MSH3, MSH6	2p21	NM_000251
	MSH3			5q14.1	NM_002439
	MSH6			2p16.3	NM_000179
	MSH4		MutS homologs specialized for meiosis	1p31.1	NM_002440
	MSH5		MSH4, MSH5	6p21.33	NM_002441
	PMS1		MutL homolog	2q32.2	NM_000534
	MLH1		MutL homologs, forming heterodimer MLH1, PMS2	3p22.3	NM_000249
	PMS2			7p22.1	NM_000535
	MLH3		MutL homologs of unknown function MLH3, PMS2L3, PMS2L4	14q24.3	NM_014381
	PMS2L3			7q11.23	NM_005395
Nucleotide excision repair (NER)	XPC		Binds damaged DNA as complex XPC, RAD23B, CETN2	3p25.1	NM_004628
	RAD23B			9q31.2	NM_002874
	RAD23A		Substitutes for HR23B	19p13.13	NM_005053
	XPA		Binds damaged DNA in preincision complex	9q22.33	NM_000380

	RPA1	Binds DNA in preincision complex RPA1, RPA2, RPA3	17p13.3	NM_002945
	ERCC3 (XPB)	3' to 5' DNA helicase	2q14.3	NM_000122
	ERCC2 (XPD)	5' to 3' DNA helicase	19q13.32	NM_000400
	GTF2H1	Core TFIIH subunit p62	11p15.1	NM_005316
	GTF2H4	Core TFIIH subunit p52	6p21.33	NM_001517
	CCNH	Kinase subunits of TFIIH	5q14.3	NM_001239
	MNAT1	CDK7, CCNH, MNAT1	14q23.1	NM_002431
	ERCC5 (XPG)	3' incision	13q33.1	NM_000123
	ERCC1	5' incision subunit	19q13.32	NM_001983
	ERCC4 (XPF)	5' incision subunit	16p13.12	NM_005236
	LIG1	DNA joining	19q13.32	NM_000234
	CKN1 (CSA)	Cockayne syndrome ; Needed for transcription–coupled	5q12.1	NM_000082
	ERCC6 (CSB)		10q11.23	NM_000124
	XAB2 (HCNP)	NER CKN1, ERCC6, XAB2	19p13.2	NM_020196
Homologous recombination	DDB2	Complex defective in XP group E DDB1 DDB2	11p11.2	NM_000107
	MMS19L	Transcription and NER	10q24.1	NM_022362
	RAD51	Homologous pairing	15q15.1	NM_002875
	XRCC2	DNA break and crosslink repair	7q36.1	NM_005431
	XRCC3	XRCC2, XRCC3	14q32.33	NM_005432
	RAD52	Accessory factors for recombination	12p13.33	NM_002879
		RAD52, RAD54L, RAD54B		
	BRCA1	Accessory factor for transcription and recombination, E3 Ubiquitin	17q21.31	NM_007295
	BRCA2	Cooperation with RAD51, essential function	13q13.1	NM_000059
	NBS1	Mutated in Nijmegen breakage syndrome	8q21.3	NM_002485
Non–homologous end–joining	MUS81	A structure–specific DNA nuclease MUS81, EME1, EME2	11q13.1	NM_025128
	EME1		17q21.33	NM_152463
	GEN1	Nuclease cleaving Holiday junctions	2p24.2	NM_182625
	XRCC5 (Ku80)	DNA end binding Ku70, Ku80	2q35	NM_021141
	PRKDC	DNA–dependent protein kinase catalytic subunit	8q11.21	NM_006904
DNA polymerases (catalytic subunits)	LIG4	Ligase	13q33.3	NM_002312
	XRCC4	Ligase accessory factor	5q14.2	NM_003401
	POLB	BER in nuclear DNA	8p11.21	NM_002690
	POLG	BER in mitochondrial DNA	15q26.1	NM_002693
	POLD1	NER and MMR	19q13.33	NM_002691
	POLE	POLD1, POLE1	12q24.33	NM_006231

	PCNA	Sliding clamp for pol delta and pol epsilon	20p12.3	NM_002592
	REV3L (POLZ)	DNA pol zeta catalytic subunit, essential function	6q21	NM_002912
	REV1L (REV1)	dCMP transferase	2q11.2	NM_016316
	POLH	XP variant	6p21.1	NM_006502
	POLI	Lesion bypass	18q21.2	NM_007195
	POLQ	DNA crosslink repair	3q13.33	NM_006596
	POLL	Gap-filling during non-homologous end-joining	10q24.32	NM_013274
	POLN (POL4P)	DNA crosslink repair?	4p16.3	NM_181808
Editing and processing	EXO1 (HEX1)	5' exonuclease	1q43	NM_003686
Chromatin Structure	BLM	Bloom syndrome helicase	15q26.1	NM_000057
Genes defective in diseases associated with sensitivity to DNA damaging agents	WRN	Werner syndrome helicase / 3' - exonuclease	8p12	NM_000553
	RECQL4	Rothmund-Thompson syndrome	8q24.3	NM_004260
	ATM	ataxia telangiectasia	11q22.3	NM_000051
	FANCA	Involved in tolerance or repair of DNA crosslinks FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCM	16q24.3	NM_000135
	FANCB		Xp22.31	NM_152633
	FANCC		9q22.32	NM_000136
	FANCD2		3p25.3	NM_033084
	FANCE		6p21.31	NM_021922
	FANCF		11p14.3	NM_022725
	FANCG		9p13.3	NM_004629
	FANCM		14q21.3	NM_020937
Other identified genes with a suspected DNA	NEIL3	Resembles NEIL1 and NEIL2	4q34.3	NM_018248
	RAD52B	Similar to RAD52	17q12	NM_145654
Other conserved DNA damage response genes	ATR	ATM- and PI-3K-like essential kinase	3q23	NM_001184
	MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint	6p21.3	NM_014641
	RAD17	RFC-like DNA damage sensor	5q13.2	NM_002873
	CHEK1	Effector kinases	11q24.2	NM_001274
	CHEK2	CHEK1, CHEK2	22q12.1	NM_007194
	TP53	Regulation of the cell cycle	17p13.1	NM_000546

Tableau IV.2. Liste des gènes candidats au métabolisme des monocarbones

Pathways	Name of gene product	chromosomes	Name of gene (old names)	GeneID
B12 transport and metabolism	Intrinsic factor	chr11q13	GIF (IF ; INF ; IFMH ; TCN3)	2694
	Intrinsic factor – cobalamin receptor (cubilin)	10p12.31	CUBN (IFCR ; MGA1 ; gp280 ; FLJ90055)	8029
	Low density lipoprotein–related protein 2	= 2q24-q31	LRP2 (DBS ; gp330 ; LRP2) 2q24-q31	4036
	ATP–binding cassette, sub–family C	16p13.1	ABCC1 (ABC29, ABCC, DKFZp781G125,	4363
	Amnionless homolog (mouse)	14q32.3	AMN (PRO1028)	81693
	Fucosyltransferase 2	19q13.3	FUT2 (SE ; Se2 ; sej ; SEC2 ; B12QTL1)	2524
	Galectin, galactoside–binding, soluble, 3	14q21-q22	LGALS3 (GAL3 ; MAC2 ; LGALS2 ; CBP35)	3958
	CD320	19p13.3-p13.2	CD320 (8D6 ; 8D6A, TCbIR)	51293
	LMBR1 domain containing 1	6q13	LMBRD1	55788
	Methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency)	1p34.1	MMACHC (DKFZp564I122, FLJ25671, CblC)	25974
	Methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency)	2q23.2	MMADHC (cblD ; C2orf25 ; CL25022 ;	27249
	methylmalonyl Coenzyme A mutase	6p12.3	MUT	4594
	centromere protein Q	6p12.3	CENPQ (CENP-Q ; C6orf139 ; FLJ10545)	55166
Cholin Metabolism	Transcobalamin 1	11q11-q12	TCN1 (TC1, TCI)	6947
	Transcobalamin 2	chr22q12.2	TCN2 (TC2 ; D22S676 ; D22S750)	6948
	Choline dehydrogenase	3p21.1	CHDH	55349
	choline kinase alpha	11q13.2	CHKA	1119
	Betaine homocysteine methyltransferase	5q13.1-q15	BHMT	635
B6 metabolism	Betaine homocysteine methyltransferase 2	5q13	BHMT2 (FLJ20001)	23743
	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	17p11.2	PEMT (MGC2483, PEAMT, PEMPT, PNMT)	10400
Folate transport and metabolism	phosphate cytidylyltransferase 1	3q29	PCYT1A (CCTA, CT, CTA, CTPCT)	5130
	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	1p36.12	ALPL	249
Folate transport and metabolism	neuroblastoma breakpoint family, member 3	1p36.12	NBPF3	84224
	Folate receptor alpha	11q13.3-q14.1	FOLR1 (FBP ; FOLR ; MOv18 ; FR-alpha)	2348
	Folate receptor beta	11q13.3-q13.5	FOLR2 (FR-P3 ; FR-BETA ; FBP/PL-1)	2350
	Reduced folate carrier 1	21q22.3	SLC19A1 (CHMD ; FOLT ; IFC1 ; REFC)	6573
	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP),	7q21.12	ABCB1 (ABC20, CD243, CLCS, GP170,	5243
	Solute carrier family 46 (folate transporter),	17q11.2	SLC46A1 (HCP1 ; PCFT ; MGC9564)	113235
	Folate-binding protein 3	chr11q13	FOLR3 (FR-G ; FR-gamma ; gamma–hFR)	2352
	Dihydrofolate reductase	5q11.2-q13.	DHFR	1719
	Folypolyglutamate synthase	9q34.1	FPGS	2356
	Serine hydroxymethyltransferase 1	17p11.2	SHMT1 (SHMT ; CSHMT ; MGC15229)	6470

	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	12q12-q14	SHMT2 (GLYA ; SHMT)	6472
	neurexophilin 4	12q13.3	NXPH4 (intron regulateur de SHMT2)	11247
	Mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase	15q22.31	MTFMT (FMT1)	123263
	Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide	2q35	ATIC (PURH ; AICAR ; AICARFT ;	471
	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	3q21.2	ALDH1L1 (FTHFD ; DKFZp781N0997)	10840
	Gamma-glutamyl hydrolase	8q12.3	GGH (GH)	8836
	Formimino-transferase-cyclodeaminase	21q22.3	FTCD (LCHC1)	10841
	NAD-dependent methylene-tetrahydrofolate	14q24	MTHFD1 (MTHFC ; MTHFD, FTHFS)	4522
	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	6q25.1	MTHFD1L (RP1-292B18.2,	25902
	NAD-dependent methylenetetrahydrofolate	2p13.1	MTHFD2 (NMDMC)	10797
	5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase	15q25.1	MTHFS (FLJ 30410 ; HsT 19268)	10588
	Folate hydrolase	11p11.2	FOLH1 (FGCP, FOLH, GCP2, GCPII)	2346
	carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial	2q35	CPS1 (CPSase I)	1373
	NADPH oxidase 4	11q14.2-q21	NOX4	50507
	synaptotagmin IX	11p15.4	SYT9	143425
	prickle homolog 2	3p14.1	PRICKLE 2 (DKFZp686D143)	166336
	chloride channel 6	1p36	CLCN6	1185
	5,10-methylene-tetrahydrofolate reductase	1p36.3	MTHFR	4524
Remethylation and S-adenosyl methionine metabolism	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine S-	1q43	MTR (FLJ33168, FLJ43216, FLJ45386, MS,	4548
	5-methyl-tetrahydrofolate-homocysteine methyl-	5p15.3-p15.2	MTRR (MGC129643, MSR, cblE)	4552
	Betaine homocysteine methyltransferase	5q13.1-q15	BHMT	635
	Betaine homocysteine methyltransferase 2	5q13	BHMT2 (FLJ20001)	23743
	Aminomethyl-transferase	3p21.2-p21.1	AMT (GCE ; NKH ; GCST)	275
	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	17p11.2	PEMT (MGC2483, PEAMT, PEMPT,	10400
	Choline dehydrogenase	3p21.1	CHDH	55349
	S-adenosyl homocysteine hydrolase	chr20cen-q13.1	AHCY (SAHH)	191
	Methionine adenosyl-transferase 1 alpha	10q22	MAT1A (RP11-36D19.2, MAT, MATA1)	4143
	Methionine adenosyltransferase 2 alpha	2p11.2	MAT2A (MATA2, MATII, SAMS2)	4144
Transsulfuration pathway	Methionine adenosyltransferase II, beta	5q34-q35	MAT2B (MAT-II, MATIIbeta, MGC12237)	27430
	Cystathionine gamma-lyase	1p31.1	CTH	1491
	Cystathionine beta-synthase	21q22.3	CBS (HIP4)	875
Trans methylations	DNA N-methyltransferase 1	19p13.2	DNMT1 (AIM ; DNMT ; MCMT ; CXXC9)	1786
	DNA N-methyltransferase 3A	2p23	DNMT3A (M.HsaIIIA)	1788
	DNA N-methyltransferase 3B	20q11.2	DNMT3B (ICF, M.HsaIIIB)	1789

DNA, protein, coenzymes, metabolites....	RNA,	DNA N-methyltransferase 3L	21q22.3	DNMT3L	29947
		RNA (guanine-7-) methyltransferase	18p11.22-p11.23	RNMT (DKFZp686H1252, KIAA0398, MET)	8731
		O-6 methylguanine-DNA methyltransferase	10q26	MGMT	4255
		Protein arginine N-methyltransferase	19q13.3	PRMT1 (ANM1, HCP1, HRMT1L2, IR1B4)	3276
		Protein arginine N-methyltransferase	21q22.3	PRMT2 (HRMT1L1, MGC111373)	3275
		Protein carboxyl methyltransferase 1 = L-	6q24-q25	PCMT1	5110
		Guanidinoacetate N-methyltransferase	19p13.3	GAMT (PIG2, TP53I2)	2593
		tRNA aspartic acid methyltransferase 1	10p15.1	TRDMT1 (DNMT2 ; PuMet ; RNMT1)	1787
		Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase	1p36.21	ICMT (PCMT ; PPMT ; PCCMT ; HSTE14)	23463
		RNA, U5E small nuclear	1p36.22	RNU5E (Regulation ICMT ?)	26829
		Methyltransferase COQ3	6q16.3	COQ3 (DHHBMT ; bA9819.1 ; UG0215E05)	51805
		Coactivator-associated arginine methyltransferase	19p13.2	CARM1 (PRMT4)	10498
		Nicotinamide N-methyltransferase	chr11q23.1	NNMT	4837
Polyamine	bio	S-adenosyl-methionine decarboxylase 3	6q21-q22	AMD1	262
Pyrimidine metabolism and xenobiotics	purine	N-acetyltransferase 1 (arylamine N-	8p23.1-p21.3	NAT1 (AAC1 ; NAT)	9
		N-acetyltransferase 2	8p22	NAT2 (AAC2, PNAT)	10
		Dimethylglycine dehydrogenase	5q14.1	DMGDH (dimethylglycine dehydrogenase)	29958
		Thymidylate synthase	chr18p11.32	TYMS (HST422, MGC88736, TMS, TS)	7298
		chromosome 18 open reading frame 56,	18p11.32	C18orf56 (regulateur de TYMS ?)	494514
		Thiopurine methyltransferase	6p22.3	TPMT	7172
		Sarcosine dehydrogenase	9q33-q34	SARDH (SAR ; SDH ; SARD ; DMGDHL1)	1757
		Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	21q22.11	GART (AIRS, GARS, GARTF, PGFT, PRGS)	2618
		Catechol-O-methyltransferases	22q11.21	COMT	1312

4.3. Approche utilisée dans la sélection des SNPs candidats sur les deux plex (réparation d'ADN et métabolisme des monocarbones)

Les SNPs sont choisis à partir d'une revue exhaustive des données disponibles dans la littérature sur le CHC et le CP, et ce suivant une double approche :

— *in silico* sur banques de données publiques (dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) <http://snp500cancer.nci.nih.gov>, le projet Hapmap (<http://www.hapmap.org> et <http://snpinfo.niehs.nih.gov/>) en prenant en compte les SNPs dont la fréquence de l'allèle mineure est supérieure ou égale à 0,1. Toutefois, nous avons inclus certains SNPs pour lesquels la fréquence n'était pas encore documentée, prenant le risque d'inclure des variants rares, mais qui ont des chances raisonnables de modifier la fonction de la protéine.

— les conséquences phénotypiques : les polymorphismes sont pris en compte en fonction des données existantes sur leurs influences phénotypiques. Toutefois, pour bien couvrir l'ensemble des gènes candidats, nous avons inclus des SNPs qui n'ont pas été précédemment associés au CHC ou CP. Les SNP prioritairement inclus étaient ceux modifiant la fonction des gènes (SNPs exoniques non synonymes), situés en régions introniques ou dans les zones non codantes 3' UTR et 5' UTR susceptibles d'altérer la stabilité des ARNm.

Les limites technologiques au 01-11-2009 nous ont imposé une restriction aux polymorphismes dialléliques, les polymorphismes trialléliques ou les insertions/délétions n'étant pas encore accessibles avec la technologie Illumina® GoldenGate® au moment de l'élaboration des *SNP-array*.

4.3.1. Validation *in silico* des SNPs retenus

Tous les SNPs identifiés au sein des gènes candidats sont analysés par le logiciel '*Assay Design Tool*' (ADT) conçus par Illumina® qui est accessible en ligne (<http://www.illumina.com/>). Cette analyse associe à chaque SNP un score de '*qualité*' prédit par l'ADT. Les scores des SNPs varient de 0 à 1. Un score minimal de 0,6 était utilisé pour déterminer les SNPs qui pourront être inclus dans le panel final. Tous les SNPs dont le score était < à 0,6 étaient supprimés du panel. De plus, l'espace d'hybridation des oligonucléotides requiert un espacement minimum de 40 bases entre les polymorphismes nous obligeant à un choix lors de la contiguïté de ces derniers et à supprimer des SNPs situés à – 60 pb.

Après cette première sélection, les SNPs sont réanalysés dans l'ADT et les 384 SNPs finalement retenus sont envoyés à Illumina® pour la synthèse du plex (*voir l'annexe 2 pour le détail des SNPs analysés sur le versant réparation d'ADN*).

4.4. La technologie de génotypage Illumina® GoldenGate® assay®

La technologie de génotypage d'Illumina GoldenGate® (ou technologie *Beadarray*) permet d'effectuer l'analyse à grande échelle, et à haut débit des variations du génome, tels que les polymorphismes bi-alléliques ou SNP. Il permet un degré élevé de multiplexage inégalé. Les niveaux de multiplexage peuvent être de l'ordre de 384–1536 SNP en une seule réaction. Des multiples de 96 échantillons sont utilisés dans le génotypage GoldenGate. L'échelle de synthèse minimale des oligonucléotides est de 480 échantillons pour ce qui concerne les panels personnalisés. L'essai GoldenGate® consiste en une réaction d'extension allèle-spécifique suivie d'une amplification par PCR. Dans cette technique les produits PCR sont hybridés sur un réseau de billes sur lesquelles sont attachées un certain type d'amorces (jusqu'à 1536 différents). Chacune est représentée de nombreuses fois (en moyenne 25 fois) afin d'augmenter la précision.

4.4.1. Procédure standard de génotypage avec la technologie GoldenGate®

La procédure standard de génotypage avec la technologie GoldenGate® est décrite en détails sur la **Fiche technique 7** et la **Figure IV.1** ci-dessous.

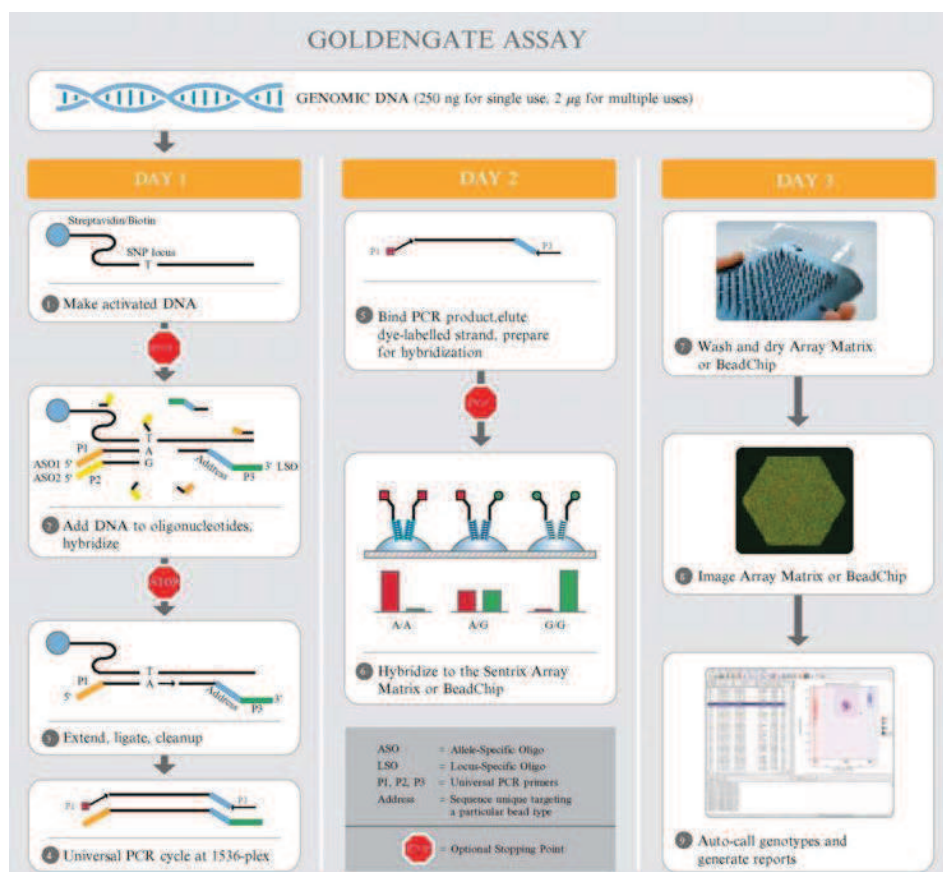


Figure IV.1. Technologie de génotypage GoldenGate® (Adapté de Fan et al., 2006)

La technique comporte neuf étapes : (1) biotinylation de l'ADN génomique, (2) hybridation des oligonucléotides à l'ADN génomique, (3) extension et ligation des oligonucléotides, (4) amplification par PCR, (5) préparation de PCR, (6) hybridation Vera Code, (7) lavage, (8) lecture et (9) identification des génotypes.

4.4.1.1. Biotinylation de l'ADN génomique (étape 1).

L'ADN génomique (5 µL à 50 ng/µL) est mélangé avec 5 µl de réactif de biotinylation (MS1 ; Illumina®) et incubé à 95 °C pendant 30 min. Le réactif de précipitation (PS1 ; Illumina® ; 5 µl) ainsi que du propan-2-ol (15 µL) sont ensuite ajoutés.

Les échantillons sont bien agités et centrifugés à grande vitesse (3000g). Le culot obtenu est remis en suspension dans un tampon (RS1 ; Illumina® ; 10 µl) et utilisé dans l'étape d'hybridation (**étape 2**). De façon optionnelle, on peut laisser la plaque pendant 24 h à 4 °C ou à -20 °C pendant un mois.

4.4.1.2. Hybridation des oligonucléotides à l'ADN génomique (étape 2)

Au cours de cette étape, les oligonucléotides synthétisés (correspondant à 384 SNPs spécifiques) et les particules paramagnétiques sont ajoutés à l'ADN génomique activé permettant ainsi leur hybridation à l'ADN génomique.

Deux allèles oligonucléotidiques spécifiques (ASO) et un oligonucléotide spécifique du locus (LSO) sont conçus pour chaque SNP (**Figure IV.1.**). Toutes les trois séquences d'oligonucléotides contiennent des régions d'homologie avec l'ADN génomique et une partie servant d'amorces pour la PCR universelle ; le LSO contient également une séquence unique IllumiCode complémentaire d'un type particulier de billes. Les LSOs sont synthétisés avec un phosphate en 5' pour permettre la ligation. Lors de la réaction d'hybridation, 30 µl du réactif d'hybridation (OB1 ; Illumina®) et 10 µL d'oligonucléotides spécifiques des SNP étudiés (OPA : Oligo Pool All ; Illumina®) sont combinés avec l'ADN activé afin d'atteindre un volume réactionnel final de 50 µl. L'hybridation est conduite avec un gradient de température allant de 70 à 30 °C pendant 2h puis la température est maintenue à 30 °C jusqu'à la prochaine étape.

4.4.1.3. Extension et ligation des oligonucléotides (étape 3).

Plusieurs étapes de lavage sont effectuées, suite à l'hybridation d'oligonucléotides, pour éliminer l'excès d'oligonucléotides ainsi que les mésappariements d'oligonucléotides. En une seule réaction, une ADN polymérase dépourvue d'activité exonucléase est utilisée pour l'extension de l'ASO qui s'apparie parfaitement à la séquence cible au niveau du SNP et combler l'écart entre les ASO et le LSO. La jonction entre les ASO et les LSO est faite grâce à une ADN ligase, formant

ainsi un ADN matrice pouvant être amplifié avec des amorces de PCR universelle (**étape 4**). Le mélange pour l'extension et la ligation (MEL ; Illumina® ; 37 µl) est ajouté aux billes suivi d'une incubation à 45 °C pendant 15 minutes. Une spécificité du locus n'est réalisée que lorsque les ASOs et les LSOs s'hybrident sur la même cible.

4.4.1.4. Amplification par PCR (étape 4)

Après l'extension et la ligation, les billes sont lavées avec du tampon universelle 1 (UB1 ; Illumina) pour réduire le bruit de fond et éliminer les mésappariements et excès d'oligonucléotides. Les billes sont ensuite remises en suspension dans 35 µL de tampon d'élution (IP1 ; Illumina®) et chauffées à 95 °C pendant 1min pour libérer les produits ligaturés. Le surnageant est ensuite utilisé dans un volume réactionnel de 60 µL lors de la PCR.

Les réactions de PCR sont conduites comme suit : 10 min à 37, 34 cycles (35 s à 95 °C, 35 s à 56 °C, 2 min à 72 °C) ; 10 min à 72 °C et refroidi à 4 °C pendant 5 min. Les trois amorces de la PCR universelle (P1, P2 et P3) sont marquées avec la Cy3, Cy5, et la biotine, respectivement.

L'uracile ADN glycosylase (UDG) est ajouté au mélange de la PCR pour prévenir la contamination du produit PCR.

4.4.1.5. Préparation du produit de PCR (étape 5).

Au cours de cette étape, le réactif MPB (20 µl) est ajouté à la plaque PCR et la solution est transférée sur une plaque à filtre. La plaque à filtre est incubée à température ambiante pendant au moins 60 min pour fixer le brin biotinylé aux particules paramagnétiques, et ainsi immobiliser le produit PCR double brin.

Les produits de PCR sont lavés avec le tampon universelle 2 (UB2 ; Illumina®) et dénaturée en rajoutant 30 µl de NaOH 0,1 N. Après 1min à température ambiante, les ADN simple brins libérés sont neutralisés avec 30 µl de réactifs d'hybridation (MH2 ; Illumina®).

4.4.1.6. Hybridation Vera Code (étape 6), lavage (étape 7), et lecture (étape 8).

Les ADN simple brin marqués s'hybrident à leur bille complémentaire à travers leurs séquences IllumiCode unique (**étape 6**) suivi de lavage (**étape 7**) et de la lecture (**étape 8**).

Brièvement, les billes sont hydratées dans UB2 pendant 3 min à température ambiante puis pré conditionnés dans NaOH 0,1 N pendant 30 s. Les billes sont à nouveau retournées dans du tampon UB2 pendant 1 min au moins pour neutraliser le NaOH.

L'hybridation est réalisée avec un gradient de température de 60 à 45 °C pendant 3 h.

Après l'hybridation, billes sont lavées deux fois dans du réactif VW1 à température ambiante sous agitation douce (**étape 7**).

Le BeadXpress Reader (**étape 8**) utilise une lumière laser pour exciter les fluorophores Cy3 et Cy5 présent sur les produits PCR simple brin fixés aux billes Vera Code. Après excitation, Cy3 et Cy5 émettent à 550 et 630 nm, respectivement. Suivant le cas, la plaque peut être laissée à température ambiante pendant 24 h ou à 4 °C pendant une semaine.

4.4.1.7. Identification des génotypes (étape 9).

Sur la base des intensités détectées dans les deux canaux pour les deux allèles respectifs de chacun des SNP, les génotypes des échantillons analysés sont déterminés automatiquement en utilisant le logiciel d'Illumina (Genome studio).

4.4.1.8. Analyse des clusters des différents SNPs étudiés

Les échantillons sont répartis en clusters suivant leurs génotypes (**Figure IV.2.**). Chaque SNP est analysé indépendamment des clusters et permet d'identifier un génotype pour chaque sujet. Il arrive des fois que des SNPs soient en dehors du cluster ; ceux-ci sont non analysables. Toutefois, il est possible de redéfinir les clusters pour rendre la détermination des génotypes possible.

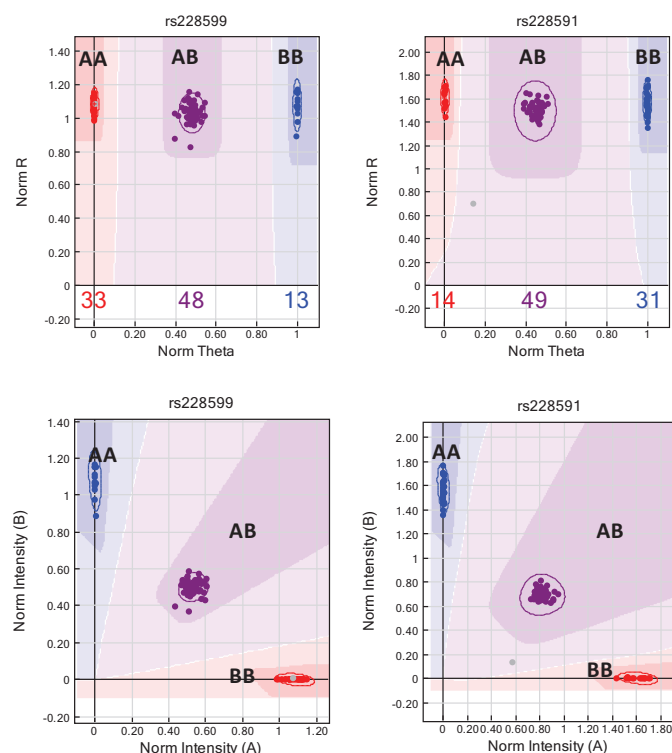


Figure IV.2. Représentation polaire et cartésienne des clusters (SNP d'ATM rs228599)

4.5. Validation des géotypages de la plateforme Illumina® par séquençage

Tous les SNPs associés au risque de CHC ou de CP ont été validés par séquençage.

4.5.1. Principe du séquençage

La technique employée pour le séquençage des produits PCR est celle de Sanger utilisant des didésoxyribonucléotides (ddNTPs). Elle est basée sur la synthèse d'un brin d'ADN par une polymérase et par l'incorporation aléatoire de ddNTPs, chacun marqué par des fluorophores de 4 couleurs différentes. L'incorporation de ddNTPs entraînera l'arrêt de l'extension de la chaîne nouvellement synthétisée par leur manque du groupement OH en 3'.

Dans notre étude, nous avons utilisé le séquenceur automatique de chez Applied Biosystems (3100 Avant DNA Sequencer).

Le choix des amorces est crucial pour l'amplification de l'ADN par PCR. C'est pourquoi les couples d'amorces doivent être bien choisis pour pouvoir amplifier les parties d'intérêt.

4.5.2. Procédure standard de séquençage

4.5.2.1. Choix et caractéristiques des amorces

Leur taille est comprise entre 18–30 pb. Le choix des amorces est crucial pour l'obtention de résultats satisfaisants. Les amorces ne doivent pas :

- être complémentaires pour éviter la formation d'hybrides entre amorces et leurs séquences ne doivent pas permettre la formation d'épingle à cheveux,
- être spécifiques de la séquence à amplifier, ceci nécessite une connaissance préalable de la séquence en acides nucléiques de l'ADN cible,
- correspondre à des séquences génomiques répétées afin d'augmenter leur spécificité,
- contenir plus de 50 % de liaisons GC afin de permettre une dénaturation plus aisée.

Le dessin des amorces a été effectué en utilisant le logiciel Primer3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

4.5.2.2. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Mise au point par Mullis et Erlich en 1985, l'amplification par PCR permet d'amplifier *in vitro* une séquence particulière d'ADN à partir de très faibles quantités de ce dernier. Cette méthode est fondée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase qui copie en grande quantité une séquence spécifique d'ADN. Des amorces oligonucléotidiques de synthèse, de longueur d'environ une vingtaine de nucléotides, s'hybrident à l'extrémité 3' de part et d'autre de la séquence à copier. Une ADN polymérase thermostable vient alors synthétiser, en présence de

désoxyribonucléosides triphosphates (dNTPs), un brin complémentaire pour chaque brin d'ADN dans le sens 5' vers 3'.

La technique de PCR se déroule en trois étapes :

(1) **dénaturation** : cette étape correspond à la rupture, à haute température, des liaisons hydrogènes qui maintiennent les deux brins complémentaires de la double hélice d'ADN. Cette étape se déroule généralement à 94 °C.

(2) **hybridation** : en se mettant dans les conditions de renaturation de l'ADN, par diminution progressive de la température, les amorces oligonucléotidiques spécifiques viennent s'hybrider sur leurs séquences complémentaires. Cette étape est cruciale pour la spécificité de la PCR et se déroule entre 40 et 65 °C.

(3) **polymérisation** : les oligonucléotides hybridés sur la séquence cible servent d'amorce à l'ADN polymérase, qui va recopier, au cours du premier cycle, chacun des deux brins initiaux. À partir de cette amorce des dNTPs présents dans le milieu réactionnel sont ajoutés successivement au brin d'ADN en extension à une température comprise entre 72 et 74 °C.

4.5.2.3. Purification des produits PCR

4.5.2.3.1. Principe

Cette étape permet de purifier les produits de PCR pour effectuer ensuite la réaction de séquençage. Le détail de la procédure est décrit à la **Fiche technique 9**. Le kit Qiaquick (Qiagen) constitué de micro colonne avec les propriétés spécifiques de liaison d'une membrane de silice était utilisé.

Les tampons livrés avec chaque kit sont optimisés pour obtenir un bon rendement d'ADN et permet d'éliminer les contaminants.

Le produit PCR se fixe sur la membrane de silice en présence d'une forte concentration saline tandis que les contaminants (amorces en excès, nucléotides libres, ADN polymérase) passent au travers de la colonne et sont donc éliminés par les lavages alcooliques. Le produit PCR est ensuite élué avec de l'eau ultra pure.

4.5.2.3.2. Réaction de séquençage

La réaction de séquence consiste en une synthèse in vitro d'ADN avec une incorporation aléatoire de didéoxynucléotides (ddNTP).

La matrice (ici un fragment d'ADN purifié) doit être présente en grande quantité (> 100 millions de copies dans le tube de réaction). Elle est mise en contact avec un mélange réactionnel comprenant une ADN polymérase (Taq polymérase), une amorce s'hybridant en 3' du fragment à

séquencer, un tampon et un mélange de dNTPs et ddNTP contenu dans le Big-Dye Terminator. Chaque ddNTP porte un fluorochrome spécifique (**Tableau IV.3** ci-dessous).

Tableau IV.3. Fluorochromes spécifiques aux ddNTP

Didéoxyribonucléotide triphosphate	fluorochrome	couleur
ddGTP	R110	Noir
ddTTP*	TAMRA	Rouge
ddATP	R6G	Vert
ddCTP	ROX	Bleu

Le ratio ddNTP/dNTP est de l'ordre de 1/100. Il existe donc 100 fois plus de chance d'incorporer un dNTP qu'un ddNTP. L'incorporation d'un ddNTP stoppe la réaction d'élongation (formation d'un fragment plus court que le fragment d'origine).

4.5.2.3.3. Purification sur plaque G50

Cette étape a pour but de purifier, par gel filtration, les produits de la réaction de séquençage. Le principe est détaillé sur la Fiche technique 8. La résine Sephadex® G50 utilisée permet de dessaler les échantillons, d'éliminer les nucléotides non incorporés (les ddNTP marqués par un fluorochrome) et l'amorce utilisée pour la PCR de séquence présente en excès. La limite d'exclusion de la résine G50 correspond à un oligonucléotide d'environ 20 bases.

4.6. Analyse statistique

Toutes les variables quantitatives sont décrites en médiane et en intervalle interquartile (25^{ème} et 75^{ème} percentiles). Toutes les proportions et les fréquences génotypiques sont exprimées en pourcentages avec un IC 95 %. Nous avons réalisé un contrôle qualité de nos données avant l'analyse statistique. En effet, tous les SNP avec un *call rate* — ou pourcentage de SNPs analysables par individu — inférieur à 0,95 et tous les SNPs en déviation par rapport à l'équilibre de Hardy–Weinberg ont été éliminés de l'analyse. Les modèles génétiques additifs, dominant et récessif ont été appliqués à l'analyse génétique des données. Pour chaque modèle génétique, les SNPs significatifs en analyse univariée sont intégrés dans un modèle de régression multiple en utilisant la méthode '*stepwise*'. Toutes les variables avec un $P < 0,1$ étaient intégrées dans le modèle et les variables avec un $P < 0,05$ étaient retenues dans le modèle. La force de l'association SNPs/CHC ou CP a été évaluée par le calcul des odds ratios ainsi que l'intervalle de confiance à 95 %. Tous les SNPs indépendamment associés à la variable dépendante étaient testés à la recherche d'une interaction épistatique dans un modèle de régression. L'étude des corrélations était réalisée en utilisant le coefficient de corrélation de Spearman. Tous les tests statistiques rapportés sont bilatéraux et les valeurs de $P < 0,05$ étaient considérées comme statistiquement significatives. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Golden Helix' SNP & Variation Suite v7.5.2 (Bozeman, MT, USA) et MedCalc, version 11.4.4 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgique).

4.7. RÉSULTATS DES DÉTERMINANTS GÉNÉTIQUES DE LA RÉPARATION D'ADN ET DU MÉTABOLISME DES MONOCARBONES AVEC LE RISQUE DU CARCINOME HÉPATOCELLULAIRE ET DE CANCER DU POU MON

Le modèle génétique sous-jacent l'association entre les SNPs et le risque de CHC n'est pas connu *à priori*. Cette incertitude nous amène à utiliser une famille de modèles génétiques plausibles — additif, dominant, récessif, etc. —, comme c'est le cas pour de nombreuses pathologies dont les modèles génétiques sous-jacents sont souvent inconnus. Utiliser un modèle génétique unique, notamment en phase exploratoire, peut souffrir d'une perte de puissance lorsque celui-ci n'est pas adapté. C'est donc pour cette raison que nous avons analysé nos résultats suivant trois modèles génétiques différents (additif, dominant et récessif) et avons présenté les résultats du modèle génétique le plus pertinent.

4.7.1. Déterminants génétiques de la réparation d'ADN associés au risque de carcinome hépatocellulaire

Les analyses statistiques sont réalisées suivant l'étiologie de la cirrhose. La population totale d'étude est subdivisée en deux sous-groupes : les patients souffrant d'une cirrhose d'étiologie virale et ceux porteurs d'une cirrhose d'étiologie non virale.

4.7.1.1. SNPs de la réparation d'ADN associés au risque de CHC parmi les patients ayant une cirrhose d'étiologie virale

Les analyses statistiques ont montré que seul le modèle génétique additif donnait des résultats significatifs. Nous ne présenterons dans la suite que les résultats de ce modèle génétique.

4.7.1.1.1. SNPs de la réparation d'ADN associés au risque de carcinome hépatocellulaire selon le modèle génétique additif

Six SNPs localisés sur le gène *BRIP1* (*BRCA1 interacting protein C-terminal helicase*) étaient significativement associés au risque de CHC chez les patients avec une cirrhose d'étiologie virale en analyse univariée (**Tableau IV.4**). Ce sont : rs4986763, rs4986764, rs1557720, rs11871785, rs4986765, rs2191248

Trois SNPs sont situés en région exonique. Deux SNPs — rs4986763 et rs4986765 — codent pour des acides aminés synonymes (*Tyr1137Tyr* et *Glu879Glu* respectivement) et *BRIP1* rs4986764 code pour un acide aminé non synonyme (*Ser919Pro*). Les trois autres SNPs — rs1557720, rs11871785, rs2191248 — sont situés en région intronique.

Après correction au test multiple (*False Discovery Rate*), deux SNPs de *BRIP1*, rs4986764 et rs1557720, étaient significativement associés au risque de CHC.

Le gène *BRIP1* comporte 13 Tag SNPs (**Figure IV.3**). Parmi les 6 SNPs associés au CHC, 4 font partie du même bloc haplotypique dont le tagSNP est : *BRIP1* rs7213430 (non étudié dans le plex). Les deux SNPs restants sont eux-mêmes des tagSNPs (rs11871785 et rs2191248), comme on peut le voir sur le graphique ci-dessous.

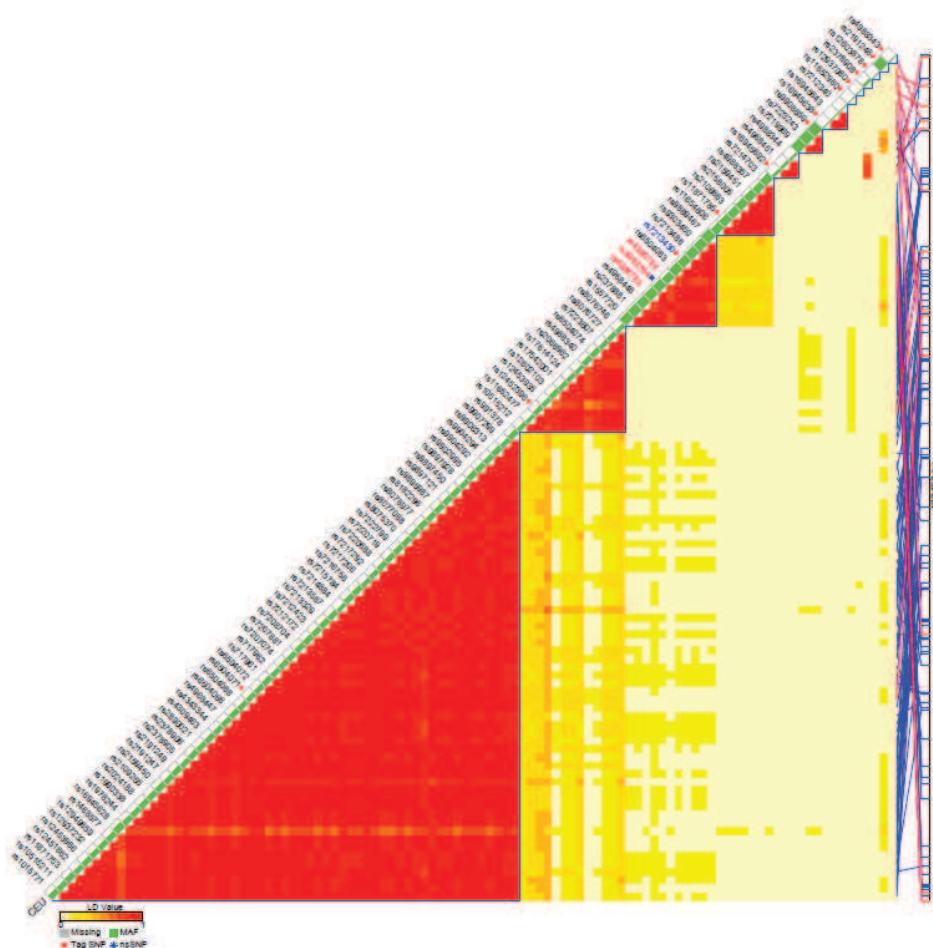


Figure IV.3. TagSNPs sur le gène *BRIP1* (Source : <http://snpinfo.niehs.nih.gov/cgi-bin/snpinfo/snptag.cgi>).

Les contrôles qualités ainsi que les caractéristiques des six SNPs de *BRIP1* sont rassemblés dans le **Tableau IV.5**. Tous ces SNPs respectent l'équilibre de Hardy Weinberg, avec des 'call rate' très satisfaisant.

Tableau IV.4. SNPs de la réparation d'ADN significativement associés au risque de CHC chez les patients ayant une cirrhose d'étiologie virale selon le modèle génétique additif (83 témoins et 54 cas)

SNPs	Chr.	Position	Gène	d	D	Nomenclature HGVS	Fonction	Substitution d'acide-amino	<i>P</i> -value ^a	FDR ^b	Bonferroni ^c
rs4986763	17	57115777	BRIP1	G	A	c.3411T>C	Synonyme	Tyr1137Tyr	0,00043	0,05895	0,05895
rs4986764	17	57118128	BRIP1	G	A	c.2755T>C	Non-synonyme	Ser919Pro	0,00094	0,04236	0,12709
rs1557720	17	57141155	BRIP1	A	T	c.2492+6938A>T	Intron	–	0,00094	0,04236	0,12709
rs11871785	17	57116487	BRIP1	A	G	c.2906-205T>C	Intron	–	0,00177	0,05948	0,23794
rs4986765	17	57118246	BRIP1	G	A	c.2637A>G	Synonyme	Glu879Glu	0,00723	0,19386	0,96930
rs2191248	17	57231133	BRIP1	G	A	c.1340+109G>A	Intron	–	0,03664	0,81837	1

Note. Chr: chromosome; *BRIP1*: *BRC*A1 interacting protein C-terminal helicase 1; d: allèle majeur; D: allèle mineur;

HGVS: *Human Genome Variation Society*

a Exact Armitage test, *P*-value

b False discovery rate, *P*-value

c Bonferroni, *P*-value

Tableau IV.5. Contrôles qualités et caractéristiques des SNPs de la réparation d'ADN significativement associés au CHC chez les patients avec une cirrhose d'étiologie virale (modèle génétique additif^a)

					Cas et témoins				Cas : Cirrhose <u>avec</u> CHC						Témoins : Cirrhose <u>sans</u> CHC					
					Compte génotypique				Compte génotypique			Compte allélique			Compte génotypique			Compte allélique		
SNP	Gène s	Call rate	HWE <i>P</i> - value	d/D	dd	dD	DD	MAF	dd	dD	DD	d	D	MAF	dd	dD	DD	d	D	MAF
rs4986763	<i>BRIP1</i>	0,99	0,49	G/A	23	71	42	0,43	9	30	15	48	60	0,56	33	41	8	107	57	0,35
rs4986764	<i>BRIP1</i>	1	0,38	G/A	22	73	42	0,43	9	31	14	49	59	0,55	33	42	8	108	58	0,35
rs1557720	<i>BRIP1</i>	1	0,38	A/T	22	73	42	0,43	9	31	14	49	59	0,55	33	42	8	108	58	0,35
rs11871785	<i>BRIP1</i>	0,99	0,18	A/G	19	54	63	0,34	33	18	3	84	24	0,22	30	36	16	96	68	0,41
rs4986765	<i>BRIP1</i>	1	1,00	G/A	12	58	67	0,30	21	24	9	66	42	0,39	46	34	3	126	40	0,24
rs2191248	<i>BRIP1</i>	1	1,00	G/A	16	61	60	0,34	19	25	10	63	45	0,42	41	36	6	118	48	0,29

Note. Chr: chromosome; *BRIP1* : *BRC A1 interacting protein C-terminal helicase* ; d: allèle majeur; D: allèle mineur; HWE : Hardy–Weinberg Equilibrium

a Modèle génétique additif : DD versus Dd versus dd

4.7.1.1.2. Associations entre SNPs de la réparation d'ADN et risque de carcinome hépatocellulaire chez les patients avec une cirrhose d'étiologie virale

Nous avons quantifié la force de l'association entre les SNPs de *BRIP1* et le risque de CHC dans un modèle de régression logistique (méthode *stepwise*), avec une estimation des odds ratios (ORs) ainsi que l'intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %).

Les résultats montraient que cinq SNPs (rs4986763, rs4986764, rs1557720, rs4986765, et rs2191248) étaient associés à un risque accru de CHC, tandis que le 6^{ème} SNP, *BRIP1* rs11871785 était protecteur contre le CHC dans le modèle génétique additif pour ce qui concerne le sous-groupe des cirrhoses d'étiologie virale (**Tableau IV.6**).

De façon intéressante, la proportion de cas chez qui le risque de CHC augmente est fonction du nombre d'allèles mineurs — variant de 0 à 2 — portés par ces derniers, sauf le polymorphisme *BRIP1* rs11871785 qui exerce un effet inverse (diminution du risque de CHC chez les sujets porteurs d'un ou deux allèles mineurs) (**Figure IV.4** ci-dessous).

Nos résultats montrent que, l'âge au-delà de 68 ans expose à un risque accru de CHC en ce qui concerne le sous-groupe des cirrhoses d'étiologie virale (OR = 2,95 ; 95 % IC : 1,42 – 6,11 ; $P = 0,0035$)

Tableau IV.6. Association entre les SNPs de *BRIP1* et le risque de carcinome hépatocellulaire parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie virale selon le modèle génétique additif^a (83 témoins et 54 cas)

SNPs	Chr.	Position	Gène	d	D	OR ((Dd) vs. (dd))	95% IC	OR ((DD) vs. Dd))	95% IC
rs4986763	17	57115777	<i>BRIP1</i>	G	A	2,68	1,11 – 6,43	2,56	0,96 – 6,81
rs4986764	17	57118128	<i>BRIP1</i>	G	A	2,71	1,13 – 6,46	2,37	0,88 – 6,34
rs1557720	17	57141155	<i>BRIP1</i>	A	T	2,71	1,13 – 6,46	2,37	0,88 – 6,34
rs11871785	17	57116487	<i>BRIP1</i>	A	G	0,45	0,21 – 0,96	0,38	0,09 – 1,45
rs4986765	17	57118246	<i>BRIP1</i>	G	A	1,55	0,74 – 3,22	4,25	1,04 – 17,36
rs2191248	17	57231133	<i>BRIP1</i>	G	A	1,50	0,71 – 3,15	2,40	0,77 – 7,45

Note. Chr: chromosome; *BRIP1* : *BRCA1 interacting protein C-terminal helicase* ; d: allèle majeur; D: allèle mineur; OR: odd ratio; IC: intervalle de confiance

a Modèle génétique additif : DD versus Dd versus dd

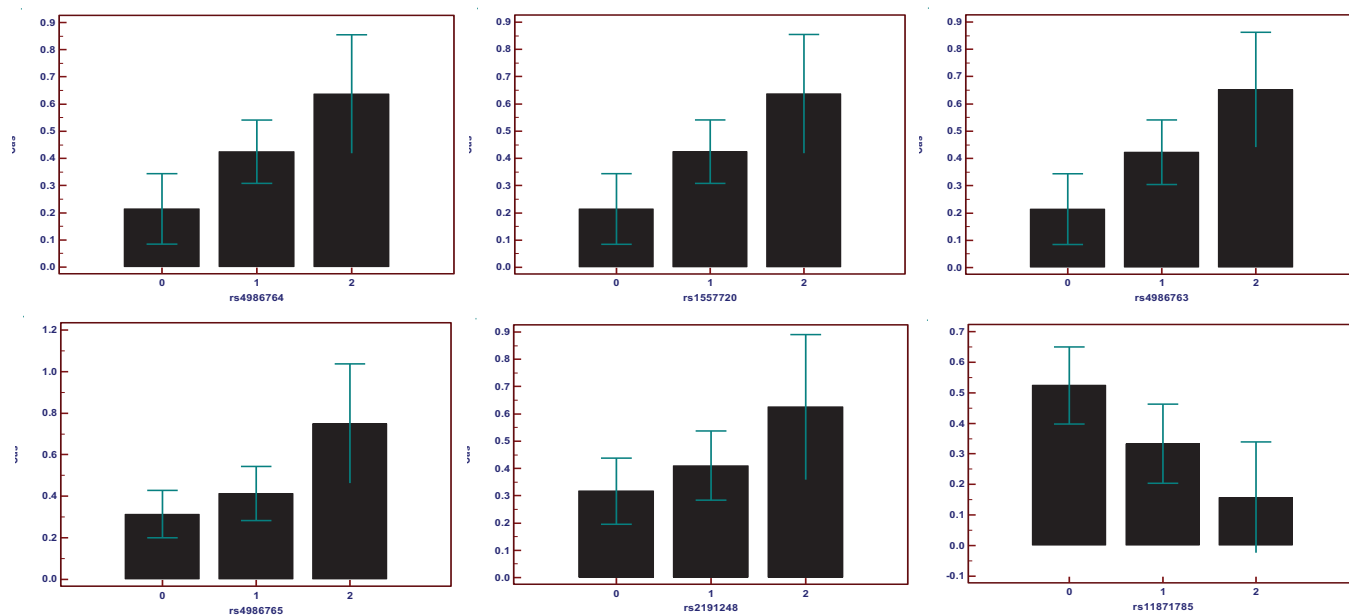


Figure IV.4. Risque de carcinome hépatocellulaire associés aux allèles variants des six SNPs identifiés sur le gène *BRIP1*

Légende : 0 : pas d'allèle mineur ; 1 : sujets possédant un allèle mineur ; 2 : sujets porteurs des deux allèles variants du SNP correspondant

4.7.1.2. SNPs de la réparation d'ADN associés au risque de CHC parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale

Les analyses statistiques montraient également que seul le modèle génétique additif donnait des résultats significatifs.

4.7.1.2.1. SNPs de la réparation d'ADN associés au risque de CHC parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale dans le modèle génétique additif

En analyse univariée, les résultats montraient que huit polymorphismes étaient significativement associés au risque de CHC dans le modèle additif (**Tableau IV.7**). Trois SNPs étaient situés sur le gène *BRCA2* (*breast cancer 2, early onset*) : ce sont rs9534174, rs1012129, et rs144848. Un SNP était localisé sur le gène *ERCC5* (*Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5*; rs17655) ; un était aussi sur le gène *CHEK2* (*checkpoint kinase 2* ; rs5762764), un autre sur le gène *EME1* (*essential meiotic endonuclease 1 homolog 1 (S. pombe)*, rs12450550).

Aucun des huit SNPs n'était significatif après correction de Bonferroni ou *False Discovery Rate*.

Les résultats des contrôles qualités des huit SNPs sont résumés dans le **Tableau IV.8**

Tableau IV.7. SNPs de la réparation d'ADN significativement associés au risque de carcinome hépatocellulaire chez les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale selon le modèle génétique additif (238 témoins et 109 cas)

SNPs	Chr.	Position	Gènes	d	D	Nomenclature HGVS	Fonction	Substitution d'acide-amino	P-value ^a	FDR ^b	Bonferroni ^c
rs5762764	22	27462989	CHEK2	A	G	c.-6-2275T>C	Intron	–	0,0036	0,4923	0,4923
rs9534174	13	31791790	BRCA2	G	A	c.316+329A>G	Intron	–	0,0105	0,7091	1
rs12450550	17	45811191	EME1	A	G	c.1049T>C	Non synonyme	Ile350Thr	0,0152	0,6814	1
rs2516740	16	2037110	NTHL1	A	C	c.139+600G>A	Intron	–	0,0166	0,5582	1
rs1051740	1	224086255	EPHX1	A	G	c.337T>C	Non synonyme	Tyr113His	0,0254	0,6829	1
rs17655	13	102326002	ERCC5	G	C	c.3310G>C	Non synonyme	Asp1104His	0,0273	0,6100	1
rs1012129	13	31868735	BRCA2	C	G	c.9502-299G>C	Intron	–	0,0278	0,5339	1
rs144848	13	31804728	BRCA2	A	C	c.1114A>C	Non synonyme	Asn372His	0,0471	0,7889	1

Note. Chr.: chromosome; d: allele majeur; D: allèle mineur; HGVS: *Human Genome Variation Society*;

CHEK2: checkpoint kinase 2; BRCA2: breast cancer 2, early onset; EME1: essential meiotic endonuclease 1 homolog 1 (S. pombe); EPHX1: epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic); ERCC5: Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5; BRCA2: breast cancer 2, early onset

a Exact Armitage P-value

b False discovery rate, P-value

c Bonferroni, P-value

Tableau IV.8. Contrôles qualités et caractéristiques des SNPs de la réparation d'ADN significativement associés au CHC chez les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale selon le modèle génétique additif

				Cas et témoins					Cas : Cirrhose <u>avec</u> CHC						Témoins : Cirrhose <u>sans</u> CHC					
				Compte génomique					Compte génomique			Compte allélique			Compte génomique			Compte allélique		
SNPs	Gènes	Call rate	HWE <i>P</i> -value	d/D	dd	dD	DD	MAF	dd	dD	DD	d	D	MAF	dd	dD	DD	d	D	MAF
rs5762764	<i>CHEK2</i>	0,99	0,6602	A/G	119	165	63	0,42	46	51	11	143	73	0,34	73	114	52	260	218	0,46
rs9534174	<i>BRCA2</i>	1	0,4488	G/A	108	165	75	0,45	42	51	16	135	83	0,38	66	114	59	246	232	0,49
rs12450550	<i>EME1</i>	1	0,1328	A/G	193	125	30	0,27	70	34	5	174	44	0,2	123	91	25	337	141	0,29
rs2516740	<i>NTHL1</i>	1	0,89	A/C	188	137	23	0,26	48	52	9	148	70	0,32	140	85	14	365	113	0,24
rs1051740	<i>EPHX1</i>	0,99	0,6965	A/G	176	140	31	0,29	64	38	6	166	50	0,23	112	102	25	326	152	0,32
rs17655	<i>ERCC5</i>	0,99	0,6456	G/C	209	118	19	0,23	74	29	4	177	37	0,17	135	89	15	359	119	0,25
rs1012129	<i>BRCA2</i>	1	0,3306	C/G	100	182	66	0,45	38	57	14	133	85	0,39	62	125	52	249	229	0,48
rs144848	<i>BRCA2</i>	1	0,1803	A/C	187	129	32	0,28	66	37	6	169	49	0,22	121	92	26	334	144	0,3

Note. Chr.: chromosome; d: allele majeur; D: allèle mineur; HWE: Hardy–Weinberg Equilibrium

CHEK2: checkpoint kinase 2; BRCA2: breast cancer 2, early onset; EME1: essential meiotic endonuclease 1 homolog 1 (*S. pombe*); EPHX1: epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic); ERCC5: Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5; BRCA2: breast cancer 2, early onset, NTHL1: Endonuclease III-like1, NTHL1

4.7.1.2.2. SNPs de la réparation d'ADN associés au risque de CHC chez les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale en analyse de régression logistique

Aucun des huit SNPs précédemment décrits n'était associé au risque de CHC dans le groupe des cirrhoses d'étiologie non virale (**Tableau IV.9**). Cependant, l'âge au-delà de 59 ans et le genre masculin étaient associés à un risque accru de CHC (OR = 4,69 ; 95 % IC : 2,62 – 8,17 et OR = 2,86 ; 95 % IC : 1,42 – 5,78 ; respectivement. De façon similaire le risque de CHC est augmenté chez les ex-fumeurs (OR = 2,11 95 % IC : 1,26 – 3,53).

Tableau IV.9. Association entre les SNPs de *CHK2*, *BRCA2*, *EME1*, *EPHX1*, *ERCC5* et *NTHL1* avec le risque de carcinome hépatocellulaire parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale selon le modèle génétique additif^a

SNPs	Chr.	Position	Gène	d	D	OR (Dd) vs. (dd)	95% IC	OR (DD) vs. Dd)	95% IC
rs5762764	22	27462989	<i>CHEK2</i>	A	G	0,71	0,43 – 1,16	0,47	0,22 – 0,98
rs9534174	13	31791790	<i>BRCA2</i>	G	A	0,70	0,42 – 1,16	0,61	0,31 – 1,15
rs12450550	17	45811191	<i>EME1</i>	A	G	0,66	0,4 – 1,07	0,54	0,18 – 1,51
rs2516740	16	2037110	<i>NTHL1</i>	A	C	1,78	1,1 – 2,87	1,05	0,42 – 2,59
rs1051740	1	224086255	<i>EPHX1</i>	A	G	0,65	0,4 – 1,05	0,64	0,24 – 1,69
rs17655	13	102326002	<i>ERCC5</i>	G	C	0,59	0,35 – 0,98	0,82	0,25 – 2,66
rs1012129	13	31868735	<i>BRCA2</i>	C	G	0,74	0,44 – 1,24	0,59	0,3 – 1,15
rs144848	13	31804728	<i>BRCA2</i>	A	C	0,74	0,45 – 1,19	0,57	0,21 – 1,50

Note. Chr.: chromosome; d: allèle majeur; D: allèle mineur ; HGVS: *Human Genome Variation Society*; OR: odd ratio; IC: intervalle de confiance

CHEK2: *checkpoint kinase 2*; *BRCA2*: *breast cancer 2, early onset*; *EME1*: *essential meiotic endonuclease 1 homolog 1 (S. pombe)*; *EPHX1*: *epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)*; *ERCC5*: *Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5*; *NTHL1*: *Endonuclease III-like1, NTHL1*

a Modèle génétique additif : DD versus Dd versus dd

4.7.2. Déterminants génétiques du métabolisme des monocarbones associés au risque de carcinome hépatocellulaire

4.7.2.1. SNPs du métabolisme des monocarbones associés au risque de CHC parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie virale dans le modèle génétique additif

Quatre SNPs du MMC étaient significativement associés au risque de CHC en analyse univariée dans le sous-groupe des cirrhoses d'étiologie virale (**Tableau IV.10**). Ces SNPs sont localisés sur les gènes *ALDH1L1* (*aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1* ; rs4646750), *CTH* (*cystathionase (cystathionine gamma-lyase)* ; rs1021737), *CUBN* (*cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)* ; rs1801224) et *TCN2* (*transcobalamin II* ; rs1801198).

Tous ces SNPs sont situés en région exonique et code pour des acides aminés non synonymes.

Aucun d'eux n'était significatif après correction de Bonferroni ou *False Discovery Rate*.

Les contrôles qualités ainsi que les caractéristiques de ces SNPs sont résumés dans le **Tableau IV.11** ci-dessous.

Tableau IV.10. SNPs du métabolisme des monocarbones significativement associés au risque de CHC chez les patients avec une cirrhose d'étiologie virale selon le modèle génétique additif (83 témoins et 54 cas)

SNPs	Chr.	Position	Gènes	d	D	Nomenclature HGVS	Fonction	Substitution d'acide-amino	P-value ^a	FDR ^b	Bonferroni ^c
rs4646750	3	127308692	<i>ALDH1L1</i>	A	G	c.2434A>G	Non synonyme	Ile812Val	0,0067	0,7519	0,7519
rs1021737	1	70677387	<i>CTH</i>	C	A	c.1208G>T	Non synonyme	Ser359Ile	0,0136	0,7579	1
rs1801224	10	17187527	<i>CUBN</i>	A	C	c.1165C>A	Non synonyme	Pro389Thr	0,0287	1	1
rs1801198	22	29341609	<i>TCN2</i>	G	C	c.776G>C	Non synonyme	Arg232Pro	0,0414	1	1

Note. Chr: chromosome, d: allèle majeur, D: allèle mineur, HGVS: *Human Genome Variation Society*

ALDH1L1: *aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1*, *CTH*: *cystathionase (cystathionine gamma-lyase)*, *CUBN*: *cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)*, *TCN2*: *transcobalamin II*

a *Exact Armitage P-value*

b False discovery rate, *P-value*

c Bonferroni, *P-value*

Tableau IV.11. Contrôles qualités et caractéristiques des SNPs du métabolisme des monocarbones significativement associés au CHC chez les patients avec une cirrhose d'étiologie virale (modèle additif)

					Cas et témoins				Cas : Cirrhose <u>avec</u> CHC						Témoins : Cirrhose <u>sans</u> CHC					
					Compte génotypique				Compte génotypique			Compte allélique			Compte génotypique			Compte allélique		
SNPs	Gènes	Call rate	HWE P-value	d/D	dd	dD	DD	MAF	dd	dD	DD	d	D	MAF	dd	dD	DD	d	D	MAF
rs4646750	<i>ALDH1L1</i>	1	0,53	A/G	10 6	17	1	0,08	35	11	1	81	13	0,4	71	6	0	148	6	0,46
rs1021737	<i>CTH</i>	0,99	0,8	C/A	73	43	7	0,23	20	23	3	63	29	0,3	53	20	4	126	28	0,42
rs1801224	<i>CUBN</i>	1	0,09	A/C	51	50	23	0,39	16	17	14	49	45	0,67	35	33	9	103	51	0,39
rs1801198	<i>TCN2</i>	1	0,09	G/C	38	70	16	0,41	11	26	10	48	46	0,42	27	44	6	98	56	0,27

Note. Chr : chromosome, d : allèle majeur, D : allèle mineur, HWE : Hardy–Weinberg Equilibrium

ALDH1L1: aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1, *CTH*: cystathionase (cystathionine gamma-lyase), *CUBN*: cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor), *TCN2*: transcobalamin II

4.7.2.2. SNPs du métabolisme des monocarbones associés au risque de carcinome hépatocellulaire chez les patients avec une cirrhose d'étiologie virale (analyse en régression logistique)

Aucun des quatre SNPs décrits ci-dessus n'était significativement associé au risque de CHC dans le sous-groupe de la cirrhose virale (**Tableau IV.12**)

Tableau IV.12. Association entre les SNPs d'*ALDH1L1*, *CTH*, *CUBN*, *TCN2* avec le risque de carcinome hépatocellulaire parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie virale selon le modèle génétique additif^a

SNPs	Chr.	Position	Gène	d	D	OR ((Dd) vs. (dd))	95% IC	OR ((DD) vs. Dd))	95% IC
rs4646750	3	127308692	<i>ALDH1L1</i>	A	G	3,72	1,27 – 10,88		
rs1021737	1	70677387	<i>CTH</i>	C	A	3,05	1,38 – 6,71	0,65	0,13 – 3,27
rs1801224	10	17187527	<i>CUBN</i>	A	C	1,13	0,49 – 2,58	3,02	1,08 – 8,33
rs1801198	22	29341609	<i>TCN2</i>	G	C	1,45	0,61 – 3,40	2,82	0,91 – 8,66

Note. Chr : chromosome, d : allèle majeur, D : allèle mineur, OR: odd ratio; IC: intervalle de confiance

ALDH1L1: aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1, *CTH*: cystathionase (cystathionine gamma-lyase),

CUBN: cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor), *TCN2*: transcobalamin II

a Modèle génétique additif : DD versus Dd versus dd

4.7.2.3. SNPs du métabolisme des monocarbones associés au risque de carcinome hépatocellulaire chez les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale selon le modèle génétique additif

Sept SNPs du MMC étaient associés au risque de CHC dans le sous-groupe des patients souffrant d'une cirrhose d'étiologie non virale (**Tableau IV.13**). Trois de ces SNPs étaient localisés sur les gènes *GGH* (*gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolyglutamyl hydrolase)* ; rs11545077, rs11545076 et rs719235), deux étaient situés sur le gène *DMGDH* (*dimethylglycine dehydrogenase*, rs542721 et rs532964) et deux autres étaient localisés sur le gène *FOLH1* (*folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1* ; rs202700 et rs10839236).

Les caractéristiques des sept SNPs ainsi que les contrôles qualités sont rassemblés dans le **Tableau IV.14** ci-dessous

Tableau IV.13. SNPs du métabolisme des monocarbones significativement associés au risque de CHC chez les patients souffrant d'une cirrhose d'étiologie non virale selon le modèle additif (238 témoins et 109 cas)

SNPs	Chr.	Position	Gènes	d	D	Nomenclature HGVS	Fonction	Substitution d'acide-amino	<i>P</i> -value ^a	FDR ^b	Bonferroni ^c
rs11545077	8	64113791	<i>GGH</i>	G	A	<i>c.91G>A</i>	Non synonyme	Ala31Thr	0,0016	0,1914	0,1914
rs11545076	8	64114004	<i>GGH</i>	A	C	<i>c.-124T>G</i>	Intron	—	0,0034	0,1976	0,3952
rs542721	5	78394187	<i>DMGDH</i>	C	G	<i>c.276+1004G>C</i>	Intron		0,0087	0,3282	0,9845
rs719235	8	64114234	<i>GGH</i>	C	A	-	Intron	-	0,0138	0,3923	1
rs202700	11	49173274	<i>FOLH1</i>	G	A	<i>c.367-2253G>A</i>	Intron	—	0,0184	0,4159	1
rs10839236	11	49149242	<i>FOLH1</i>	A	G	<i>c.1263+80G>A</i>	Intron	—		0,3469	1
rs532964	5	78376041	<i>DMGDH</i>	G	A	<i>c.835T>C</i>	Non synonyme	Ser279Pro	0,0481	0,7777	1

Note. Chr. : chromosome ; d : allèle majeur, D : allèle mineur ; HGVS : Human Genome Variation Society

GGH : gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolyglutamyl hydrolase) ; *DMGDH* : dimethylglycine dehydrogenase ; *FOLH1* : folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1

a Exact Armitage *P*-value

b False discovery rate, *P*-value

c Bonferroni, *P*-value

Tableau IV.14. Contrôles qualités et caractéristiques des SNPs du métabolisme des monocarbones significativement associés au CHC chez les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale (modèle additif)

				Cas et témoins					Cas : Cirrhose <u>avec</u> CHC					Témoins : Cirrhose <u>sans</u> CHC						
				Compte génotypique					Compte génotypique			Compte allélique		Compte génotypique			Compte allélique			
SNPs	Gènes	Call rate	HWE <i>P</i> -value	d/D	dd	dD	DD	MAF	dd	dD	DD	d	D	MAF	dd	dD	DD	d	D	MAF
rs11545077	<i>GGH</i>	1	0,39	G/A	163	128	19	0,27	61	34	1	156	36	0,19	101	94	18	296	130	0,35
rs11545076	<i>GGH</i>	1	0,49	A/C	154	133	23	0,29	58	35	3	151	41	0,22	95	98	20	288	138	0,35
rs542721	<i>DMGDH</i>	1	0,47	C/G	119	141	50	0,39	27	48	21	102	90	0,6	91	93	29	275	151	0,4
rs719235	<i>GGH</i>	1	0,89	C/A	164	122	24	0,27	42	43	11	127	65	0,38	122	79	12	323	103	0,36
rs202700	<i>FOLH1</i>	1	0,45	G/A	177	111	22	0,25	63	30	3	156	36	0,19	113	81	19	307	119	0,39
rs10839236	<i>FOLH1</i>	1	0,91	A/G	115	147	48	0,39	45	40	11	130	62	0,36	70	106	37	246	180	0,41
rs532964	<i>DMGDH</i>	0,99	0,65	G/A	83	150	76	0,49	21	44	31	86	106	0,82	61	106	45	228	196	0,45

Note. Note. Chr. : chromosome ; d : allèle majeur, D : allèle mineur ; HWE : Hardy–Weinberg Equilibrium

GGH : gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolyglutamyl hydrolase) ; *DMGDH* : dimethylglycine dehydrogenase ; *FOLH1* : folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1

4.7.2.4. SNPs du métabolisme des monocarbones associés au risque de carcinome hépatocellulaire parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale (analyse en régression logistique)

Aucun des sept SNPs précédemment décrits n'était significativement associé au risque de CHC (**Tableau IV.15**).

Tableau IV.15. Association entre les SNPs de *GGH*, *DMGDH*, et *FOLH1* avec le risque de carcinome hépatocellulaire parmi les patients avec une cirrhose d'étiologie non virale selon le modèle génétique additif^a

SNPs	Chr.	Position	Gènes	d	D	OR ((Dd) vs. (dd))	95% IC	OR ((DD) vs. Dd))	95% IC
rs11545077	8	64113791	<i>GGH</i>	G	A	0,60	0,36 – 0,99	0,15	0,01 – 1,19
rs11545076	8	64114004	<i>GGH</i>	A	C	0,58	0,35 – 0,96	0,42	0,11 – 1,50
rs542721	5	78394187	<i>DMGDH</i>	C	G	1,74	1 – 3,02	1,40	0,72 – 2,71
rs719235	8	64114234	<i>GGH</i>	C	A	1,58	0,94 – 2,63	1,68	0,68 – 4,13
rs202700	11	49173274	<i>FOLH1</i>	G	A	0,66	0,39 – 1,11	0,43	0,11 – 1,54
rs10839236	11	49149242	<i>FOLH1</i>	A	G	0,59	0,34 – 0,98	0,79	0,36 – 1,69
rs532964	5	78376041	<i>DMGDH</i>	G	A	1,21	0,65 – 2,21	1,66	0,93 – 2,95

Note. Note. Chr. : chromosome ; d : allèle majeur, D : allèle mineur ; OR: odd ratio; IC: intervalle de confiance

GGH : gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolyglutamyl hydrolase) ; *DMGDH* : dimethylglycine dehydrogenase ; *FOLH1* : folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1

a Modèle génétique additif : DD versus Dd versus dd

4.7.2.5. Association entre SNPs du ‘cluster’ « transport et métabolisme des folates » et risque de carcinome hépatocellulaire

Quatre SNPs étaient significativement associés au risque de carcinome hépatocellulaire lorsque l’analyse statistique est restreinte au cluster « transport et métabolisme des folates ». Deux de ces SNPs sont situés sur le gène *GGH*, et les deux autres étaient situés sur le gène *FOLH1*. Il s’agit de *GGH* (rs11545077 et rs11545076) et *FOLH1* (rs202700 et rs10839236) (**Tableau IV.16**).

De façon intéressante, les deux SNPs situés sur le gène *GGH* étaient significatifs après corrections au test multiple *False Discovery Rate*.

4.7.2.6. Analyse de l’influence des 3 SNPs de *GGH* sur les concentrations plasmatiques de folates et d’homocystéine dans le sous-groupe des patients souffrant d’une cirrhose d’étiologie non virale

Nous n’avons noté aucune influence des trois SNPs de *GGH* sur les concentrations de folates et d’homocystéine dans le sous-groupe des patients souffrant d’une cirrhose d’étiologie non virale (**Tableau IV.17** et **Tableau IV.18**).

Tableau IV.16. SNPs du cluster « transport et métabolisme des monocarbones » associés au risque de carcinome hépatocellulaire dans le sous-groupe des patients souffrant d'une cirrhose d'étiologie non virale (238 témoins et 109 cas)

Marker	Chr.	Position	Gene Name	d	D	Nomenclature HGVS	Fonction	Substitution d'acide-amino	P-value ^a	FDR ^b	Bonferroni ^c
rs11545077	8	64113791	GGH	G	A	c.91G>A	Non synonyme	Ala31Thr	0,002	0,046	0,046
rs11545076	8	64114004	GGH	A	C	c.-124T>G	Intron	–	0,003	0,047	0,094
rs202700	11	49173274	FOLH1	G	A	c.367-2253G>A	Intron	–	0,018	0,166	0,497
rs10839236	11	49149242	FOLH1	A	G	c.1263+80G>A	Intron	–	0,018	0,124	0,497

Note. Chr. : chromosome ; d : allèle majeur, D : allèle mineur ; HGVS : Human Genome Variation Society ; GGH : gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolyglutamyl hydrolase) ; FOLH1 : folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1

a Exact Armitage P-value; **b** False discovery rate, P-value; **c** Bonferroni, P-value

Tableau IV.17. Analyse de l'influence des 3 SNPs de *GGH* sur les concentrations plasmatiques de folates dans le sous-groupe des patients souffrant d'une cirrhose d'étiologie non virale

SNPs	Chr	Position	Gène	dd				Dd				DD				P-value ^a	P-value ^b
				n	Médiane	25 th	– 75 th	n	Médiane	25 th	– 75 th	n	Médiane	25 th	– 75 th		
rs11545077	8	64113791	GGH	153	17,2	13,1	– 23,3	121	17,0	14,6	– 22,6	16	17,7	14,3	– 23,2	0,864	0,598
rs11545076	8	64114004	GGH	145	17,9	13,1	– 23,6	126	17,0	14,5	– 22,5	19	16,6	13,9	– 22,7	0,903	0,951
rs719235	8	64114234	GGH	150	16,6	13,7	– 22,2	117	19,2	14,4	– 24,2	23	14,400	10,5	– 22,0	0,020	0,980

Note: dd : génotype homozygote sain ; dD : génotype hétérozygote ; DD : génotype homozygote muté.

^aKruskal-Wallis test; ^bP for trend test

Tableau IV.18. Analyse de l'influence des 3 SNPs de *GGH* sur les concentrations plasmatiques d'homocystéine dans le sous-groupe des patients souffrant d'une cirrhose d'étiologie non virale

SNPs	Chr	Position	Gène	dd			Dd			DD			P-value ^a	P-value ^b
				n	Médiane	25 th – 75 th	n	Médiane	25 th – 75 th	n	Médiane	25 th – 75 th		
rs11545077	8	64113791	<i>GGH</i>	142	12,4	8,9 - 17,8	106	13,3	9,0 - 19,8	15	9,7	5,9 - 13,6	0,103	0,898
rs11545076	8	64114004	<i>GGH</i>	134	12,4	8,9 - 18,2	111	13,3	8,9 - 19,3	18	10,7	6,2 - 13,7	0,276	0,958
rs719235	8	64114234	<i>GGH</i>	130	12,9	7,7 - 18,2	110	12,4	8,9 - 18,5	23	14,5	11,06- 20,7	0,268	0,376

Note: dd : génotype homozygote sain ; dD : génotype hétérozygote ; DD : génotype homozygote muté.

^aKruskal-Wallis test; ^bP for trend test

4.7.3. Facteurs phénotypiques associés significativement au risque de carcinome hépatocellulaire

Nos résultats ont montré que l'âge > 68 ans était associé à un risque accru de carcinome hépatocellulaire chez les patients ayant une cirrhose d'étiologie virale (OR = 2,95 ; 95 % IC : 1,42 – 6,11 ; $P = 0,0035$).

De plus, nous avons constaté que chez les patients souffrant d'une cirrhose d'étiologie non virale l'âge > 59 ans, le sexe masculin ainsi que le tabagisme ancien étaient significativement associés à une augmentation du risque de carcinome hépatocellulaire (**Tableau IV. 19**).

Tableau IV. 19. Facteurs phénotypiques indépendamment associés au risque de carcinome hépatocellulaire chez les patients avec une cirrhose d'étiologie virale et non virale

	<i>P</i> -value ^a	Odds ratio	IC 95%
Cirrhose d'étiologie virale			
Age > 68 ans	0,0035	2,95	1,42 – 6,11
Cirrhose d'étiologie non virale			
Age > 59 ans	< 0,0001	4,63	2,62 – 8,17
Sexe masculin	0,0032	2,86	1,42 – 5,78
Ex-fumeurs	0,0045	2,11	1,26 – 3,53

Note. a Analyse multivariée en régression logistique selon la méthode 'Stepwise'

En résumé, nos travaux sur l'axe carcinome hépatocellulaire ont montré :

- une forte association entre six variants polymorphiques du gène *BRIP1* et la susceptibilité au CHC et chez les patients souffrant d'une cirrhose d'étiologie virale,
- que deux variants polymorphiques situés sur le gène *GGH* étaient significativement associés au risque de CHC chez les patients porteurs d'une cirrhose d'étiologie non virale.
- que le risque de CHC était augmenté chez les patients avec une cirrhose d'étiologie virale âgés de plus de 68 ans. L'âge > 59 ans était aussi associé à un risque accru de CHC chez les patients avec une cirrhose à étiologie non virale. Enfin, le genre masculin et le tabagisme ancien étaient associés à un sur risque de CHC.

4.8. RÉSULTATS DES DÉTERMINANTS GÉNÉTIQUES DE LA RÉPARATION D'ADN ASSOCIÉS AU RISQUE DE CANCER DE POUMON

4.8.1. Déterminants génétiques de la réparation d'ADN associés au risque de CP

4.8.1.1. Analyse univariée

Ne sont présentés ici que les résultats du modèle récessif qui sont plus pertinents que ceux des deux autres modèles (additif et dominant).

4.8.1.1.1. SNPs associés au risque de cancer du poumon dans le modèle récessif

Seul le polymorphisme *POLL* rs3730477 était significativement associé au risque de CP en analyse univariée (**Tableau IV.20**). Il est important de signaler que ce SNP reste significatif après correction aux tests multiples de Bonferroni et *False Discovery Rate*. Les caractéristiques de *POLL* rs3730477 ainsi que les contrôles qualités effectués sont rassemblés dans le **Tableau IV.21**.

Le gène *POLL* comporte trois SNPs tag (**Figure IV.5**). *POLL* rs3730477 associé au risque de CP dans notre étude est un tagSNP non synonyme. Les deux autres tagSNPs n'étaient pas étudiés dans notre 'plex réparation'.

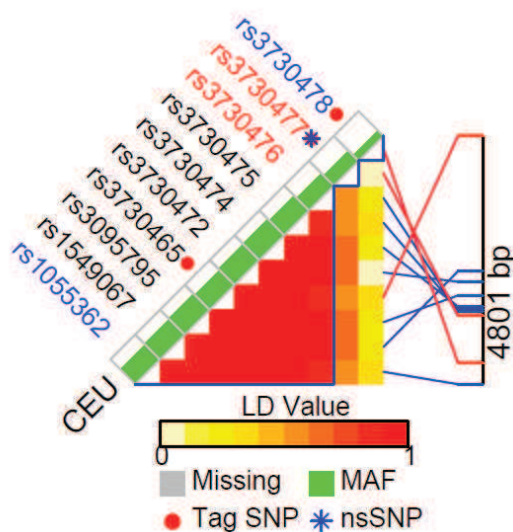


Figure IV.5. Tag SNPs sur le gène *POLL* (source : <http://snpinf.niehs.nih.gov/cgi-bin/snpinfo/snptag.cgi>)

4.8.1.1.2. SNPs de la réparation d'ADN associés au risque de cancer bronchique en analyse multivariée

Nos résultats ont montré que *POLL* rs3730477 était associé à un risque accru de cancer bronchique dans le modèle génétique récessif (OR = 2,81 ; 95 % IC 1,51-5,24 ; **Tableau IV.22**).

Tableau IV.20. SNPs de la réparation d'ADN significativement associés au risque de cancer du poumon selon le modèle génétique récessif^a

SNPs	Chr.	Position	Gène	d	D	Nomenclature HGVS	Substitution d'acide-amino	Fonction	P-value ^b	FDR ^c	Bonferroni ^d
rs3730477	10	103330045	POLL	G	A	c.1312C>T	Arg438Trp	Non synonyme	0,00059	0,0235259	0,01955000

Note. d: allèle majeur, D: allèle mineur; HGVS: Human Genome Variation Society; *POLL*: *Polymerase (DNA directed), lambda*

^a Modèle génétique récessif : DD versus (Dd ou dd)

^b False discovery rate, P-value

^c Fisher's Exact test;

^d Bonferroni, P-value

Tableau IV.21. Contrôles qualités et caractéristiques des SNPs de la réparation d'ADN associés au risque de cancer du poumon selon le modèle génétique récessif^a

SNPs	Gène	Cas et témoins							Patients avec CP						Témoins					
		Call rate	HWE P-value	d/D	dd	dD	DD	MAF	Compte génotypique			Compte allélique			Compte génotypique			Compte allélique		
rs3730477	POLL	0,92	0,5565	G/A	364	195	60	0,25	209	92	46	184	510	0,27	155	103	14	413	131	0,24

Note. d : allèle majeur, D : allèle mineur ; *POLL* : *Polymerase (DNA directed), lambda*

^a Modèle génétique récessif : DD versus (Dd ou dd)

Tableau IV.22. Association entre le polymorphisme *POLL* rs3730477, l'âge et le tabagisme avec le risque de cancer du poumon selon le modèle génétique récessif^a

SNP	Chr.	Position	Gène	d	D	OR ((DD) vs. (Dd, dd))	95 % IC
3730477	10	103330045	<i>POLL</i>	G	A	2,81	1,51 – 5,24

Note. Chr. : chromosome, d : allèle majeur, D : allèle mineur, OR : Odds ratio, IC : intervalle de confiance

POLL : *Polymerase (DNA directed), lambda*

^aModèle génétique récessif : DD versus (Dd ou dd)

4.8.1.1.3. Facteurs phénotypiques associés au risque de cancer du poumon

L'analyse en régression logistique montre que l'âge > 65 ans ainsi que le tabagisme actif ou passif étaient associés à une augmentation du risque de cancer du poumon (OR = 3,09 et OR = 7,57, respectivement ; **Tableau IV.23.**

Tableau IV.23. Facteurs phénotypiques associés au risque de cancer du poumon

Facteurs	Odd Ratio	95 % IC	P-value ^a
Age > 65 ans	3,09	2,08 - 4,60	<0.0001
Fumeur actifs et ex-fumeurs	7,57	4,34 - 13,17	<0.0001

Note. **a** Analyse multivariée en régression logistique selon la méthode 'Stepwise'

En résumé nos résultats sur l'axe cancer du poumon ont démontré que le gène *POLL* était associé à la susceptibilité au cancer du poumon, et que l'âge > 65 ans et le tabagisme étaient associés à un risque accru de cancer bronchique.

4.10. Discussion des résultats sur le recherche des déterminants génétiques associés au risque de carcinome hépatocellulaire et de cancer du poumon

Cette partie de notre thèse a recherché, par une approche gène candidat, les déterminants génétiques de la réparation d'ADN et du MMC associés au risque de développement du CHC chez des Caucasiens cirrhotiques. Nous avons aussi évalué les déterminants génétiques de la réparation d'ADN associés au risque de CP.

4.10.1. Polymorphismes de la réparation d'ADN associés au risque de CHC

Cette étude est la première à évaluer, de manière exhaustive, l'influence des polymorphismes de la réparation d'ADN avec le risque de développement du CHC en prenant en compte les étiologies de la cirrhose. Nos résultats ont montré que six SNPs localisés sur le gène *BRIP1* (*BRCA1 interacting protein C-terminal helicase*) étaient significativement associés au risque de CHC dans un modèle génétique additif chez les patients porteurs d'une cirrhose d'étiologie virale. Les polymorphismes rs4986763, rs4986764, rs1557720, rs4986765, et rs2191248 de *BRIP1* étaient associés à un risque accru de CHC tandis que *BRIP1* rs11871785 confère une protection contre le CHC, avec une réduction du risque de l'ordre de 55 %.

Le gène *BRIP1* code pour une ADN hélicase qui interagit avec le domaine BRCT de *BRCA1*, formant ainsi un complexe régulateur qui participe, en synergie avec *BRCA1* ou indépendamment de celui-ci, au maintien de l'intégrité du génome. En effet, *BRIP1* est indispensable pour la recombinaison homologue, et par conséquent à la réparation des cassures double brin d'ADN (Litman et al. 2005). *BRIP1* joue un rôle majeur dans le contrôle du cycle cellulaire, en particulier au cours de la transition G2/M (Yu et al., 2003). Une répression transcriptionnelle de *BRIP1* est rapportée au cours de la phase G1 du cycle cellulaire, mais il est réactivé lorsque les cellules entrent en phase S, suggérant non seulement son implication dans la progression du cycle cellulaire, mais aussi dans le maintien de la stabilité génomique (Kumaraswamy & Shiekhattar 2007). Par ailleurs, une diminution d'expression de *BRIP1* — et donc une diminution de son activité hélicase — était associée à une augmentation des aberrations chromosomiques, un phénotype caractéristique des cellules provenant d'individus atteints de l'anémie de Fanconi — une anémie à forte composante génétique caractérisée par une diminution de l'hématopoïèse (Bridge et al. 2005). À ce jour, aucun modèle de souris *Knock out* pour le gène *BRIP1* n'a été étudié. Toutefois, il est connu que protéine défectueuse, associée à un risque accru de l'anémie de Fanconi, dans les cellules de patients atteints de l'anémie de Fanconi était celle codée par le gène *BRIP1* (Levran et al., 2005). De façon consistante, un risque accru de cancer était rapporté dans neuf modèles de souris mutants pour 9 gènes associés à l'anémie de Fanconi

(*FANCA*, *FANCC*, *FANCD1*, *FANCD2*, *FANCG*, *FANCL*, *FANCM*, *FANCN*, *FANCP*) (Tischkowitz and Winqvist, 2011). Par exemple, une délétion de l'exon 2 du gène *FANCM* (*FANCM*^{Δ2/Δ2}) était associé à un risque accru de tumeur hépatique chez les souris (Bakker et al., 2009)

Chez l'homme, des études cas témoins (Alter, 2003; Abbondanzo et al., 1986; Moldvay et al., 1991; LeBrun et al., 1991; Linares et al., 1991; Altay et al., 1997) et même de cohortes (Masserot-Lureau et al., 2012) ont rapporté un risque accru de carcinome hépatocellulaire chez les patients atteints de l'anémie de Fanconi.

Les données de la littérature suggérant l'association *BRIP1*/Anémie de Fanconie/risque de carcinome hépatocellulaire renforce la solidité de nos résultats CiRCE indiquant que les variants polymorphiques de *BRIP1* étaient des prédicteurs significatifs du risque de carcinome hépatocellulaire chez les patients souffrant d'une cirrhose d'étiologie virale.

Des mutations sur le gène *BRIP1* étaient associées à un risque accru de cancer de sein (Seal et al., 2006). Des délétions d'allèles sur *BRIP1* étaient rapportées dans des tumeurs d'ovaire (Rafnar et al., 2011). *BRIP1* était également associé à la susceptibilité au cancer de la prostate (Kote-Jarai et al., 2009).

Nos résultats ont montré que *BRIP1* rs4986764 (*Ser919Pro*) était associé à un risque accru de CHC chez les patients avec une cirrhose d'étiologie virale. Ce SNP situé en région codante modifie la structure de la séquence protéique de *BRIP1* et pourrait donc réduire la capacité de *BRIP1* à se lier aux substrats d'ADN, perturbant ainsi la voie de réparation des CDBs, avec une accumulation de lésions d'ADN. Par ailleurs, il est aussi probable que la substitution de la sérine en proline déstabilise le domaine hélicase indispensable à l'interaction avec le gène *BRCA1*, augmentant ainsi le risque de CHC. Une augmentation du risque de cancer du sein était associée à *BRIP1* rs4986764 (Sigurdson et al., 2004), bien que d'autres études n'ont pu répliquer un tel résultat (Song et al., 2007).

Nous avons aussi montré que *BRIP1* rs4986765 et *BRIP1* rs4986763 étaient associés à une augmentation significative du risque de carcinome hépatocellulaire. Ces deux SNPs ne modifient pas la séquence protéique, puisqu'ils codent pour des acides aminés synonymes (*Glu879Glu* et *Tyr1137Tyr*, respectivement). Il est possible qu'ils soient en déséquilibre de liaison avec d'autres variants responsables de l'association observée avec le CHC. Toutefois, de récentes études ont montré que les mutations synonymes peuvent jouer un rôle majeur dans l'étiologie du cancer, puisqu'elles peuvent affecter la conformation des protéines et leur fonction en altérant la stabilité des ARNm (Sauna and Kimchi-Sarfaty 2011 ; Sauna *et al.* 2007). Le variant *BRIP1* rs4986765 a été aussi décrit dans une cohorte italienne de cancer du sein masculin (Silvestri *et al.* 2011).

Collectivement, ces données suggèrent que le gène *BRIP1* pourrait jouer un rôle majeur dans la carcinogenèse hépatocellulaire.

Les données de la littérature suggèrent que les facteurs de risque, comme l'âge, le sexe et l'infection par le VHB ou VHC étaient associés à une augmentation du risque de CHC (Kato et al. 2005). Nos résultats corroborent ces précédentes observations, montrant que l'âge au-delà de 59 ans, le genre masculin et le tabagisme augmentaient le risque de CHC.

4.10.2. Polymorphismes du métabolisme des monocarbones et risque de carcinome hépatocellulaire

Dans cette étude, nous avons mis en évidence une association entre deux SNPs du gène *GGH* (rs11545076 et rs11545077) et le risque de carcinome hépatocellulaire chez les patients porteurs d'une cirrhose d'étiologie non virale. Aucune étude précédente n'a rapporté une telle association.

Toutefois, pour ce qui concerne l'association entre CHC et variants polymorphiques des gènes du MMC, il est rapporté dans la littérature que les sujets de sexe masculin souffrant d'une cirrhose d'étiologie alcoolique et porteurs du génotype TT du polymorphisme *MTHFR C677T* avaient un risque accru de carcinome hépatocellulaire (Fabris et al. 2009). À l'inverse, Saffroy et collaborateurs ont rapporté que le génotype CC du polymorphisme *MTHFR C677T* était associé à une augmentation du risque de CHC chez les patients ayant une cirrhose alcoolique (Saffroy et al. 2004). Par ailleurs, les polymorphismes *MTHFR 1298A>C* et *MTRR 66A>G* étaient également associés au risque de CHC dans la population coréenne (Kwak et al. 2008). Nous n'avons pu répliquer ces précédentes observations dans notre étude.

4.10.3. Polymorphismes de la réparation d'ADN significativement associés au risque de cancer du poumon

Nos résultats sur le cancer bronchique montraient que *POLL* rs3730477 était associé à un risque accru de CP selon le modèle génétique récessif (OR=2,81 ; 95 % IC : 1,51-5,24). Les ADN polymérases participent à deux processus majeurs au niveau cellulaire : la réplication et la réparation d'ADN.

L'ADN polymérase lambda intervient dans la réparation d'ADN par mécanisme BER (Braithwaite et al., 2010), mais aussi par recombinaison non homologue (mécanisme NHEJ). Des expériences de co-immunoprécipitation d'extraits cellulaires ont montré que l'interaction entre les polymérases lambda et beta et les ADN glycosylases était essentielle pour la réparation des bases alkylées et oxydées (Braithwaite et al., 2010).

Des analyses d'immunohistochimie révèlent que le gène *POLL* est exprimé dans le système respiratoire, en particulier dans les cellules épithéliales bronchiques, bronchioles et alvéoles de patients atteints d'un cancer du poumon (Ohba et al., 2009). De plus, il y a une forte association de l'expression de *POLL* avec le tabagisme en termes de quantité de cigarettes fumées : l'expression étant significativement plus élevée chez les gros fumeurs que chez les fumeurs modérés (Ohba et al., 2009).

Le polymorphisme *POLL* rs3730477 code pour un acide aminé non synonyme (Arg438Trp) qui pourrait altérer les fonctions de la polymérase lambda. En effet, une récente étude a montré que *POLL* Arg438Trp code pour une protéine dont l'activité de correction des erreurs est réduite, ce qui peut induire spontanément ou non une instabilité chromosomique altérant, par exemple, la recombinaison homologue et les échanges de chromatides sœurs (Terrados et al., 2009; Capp et al., 2010). Ces mêmes auteurs ont montré que le défaut de réparation d'ADN associé à *POLL* Arg438Trp augmentait la sensibilité cellulaire à la camptothécine (un agent anticancéreux), suggérant que la sensibilité à la camptothécine pourrait résulter d'un cancer lié à une mutation dans les ADN polymérases spécialisées de la réparation d'ADN.

Une étude antérieure menée par l'équipe de Kobayashi et collaborateurs a analysé les conséquences d'une invalidation du gène de l'ADN polymérase lambda chez les souris. Cette étude a rapporté une augmentation de la mortalité, ainsi qu'une hydrocéphalie, une infertilité et même un retard de croissance chez les souris *knock out POLL* (*POLL*^{-/-}) (Kobayashi et al., 2002). L'augmentation du risque de cancer bronchique associée à *POLL* rs3730477 dans cette présente étude était obtenue dans le modèle génétique récessif (comparaison génotypes variants versus génotypes hétérozygotes et homozygotes sains). Même si *POLL* rs3730477 n'entraîne pas une altération complète de la protéine *POLL*, les résultats de cette étude corrélaient avec les données issues de modèles expérimentaux et apportent des preuves que *POLL* pourrait jouer un rôle majeur dans la carcinogenèse pulmonaire.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Nous avons recherché — à l'aide de deux *SNP-arrays* par une technologie Illumina® GoldenGate® — les déterminants génétiques de la réparation d'ADN et du métabolisme des monocarbones prédicteur du risque de CHC chez des Caucasiens cirrhotiques, en prenant en compte l'influence des étiologies de la cirrhose. L'originalité de cette étude vient du fait qu'elle prend en compte l'ensemble des gènes candidats à la réparation d'ADN et du métabolisme des monocarbones connus à ce jour.

De façon originale, nos résultats ont montré que six variants polymorphiques situés sur le gène *BRIP1* (*BRCA1 interacting protein C-terminal helicase*; rs4986763, rs4986764, rs1557720, rs4986765, rs2191248, et rs11871785) étaient significativement associés au risque de CHC chez les patients porteurs d'une cirrhose d'étiologie virale. Après correction au test multiple (*False Discovery Rate*), seuls *BRIP1* rs4986764 et rs1557720 étaient significativement associés au risque de CHC. Aucun des SNPs de la réparation d'ADN n'était significativement associé au risque de CHC dans le sous-groupe des patients porteurs d'une cirrhose d'étiologie non virale.

Par ailleurs, deux SNPs du métabolisme des monocarbones situés sur le gène *GGH* (rs11545076 et rs11545077) étaient significativement associés au risque de CHC chez les patients souffrant d'une cirrhose d'étiologie non virale.

Aucune association n'était observée entre les concentrations plasmatiques des marqueurs du métabolisme des monocarbones (vitamines B9 et B12, homocystéine et MMA) et les SNPs du MMC associés au risque de carcinome hépatocellulaire.

Nous avons initié, en fin de projet, une étude de réplication des six polymorphismes de *BRIP1* dans une population caucasienne indépendante en vue d'une validation de nos résultats de la cohorte initiale qui sont rapportés dans ce manuscrit. À l'étape actuelle des travaux nous ne pouvons rapporter les résultats de l'étude de réplication puisque les analyses ne sont pas encore finalisées. Nous avons aussi envisagé une étude de réplication des mêmes résultats dans des cohortes africaines, en particulier du Bénin et du Togo. Une étude de réplication des deux variants de *GGH* est également envisagée.

Il serait intéressant de compléter notre étude par des analyses de *western blot* et d'immunohistochimie et d'activité enzymatique de *BRIP1*. L'analyse de l'association entre le risque de CHC et les 11 autres Tag SNPs de *BRIP1* non examinés dans cette étude apporterait des arguments supplémentaires quant à l'implication de *BRIP1* dans la carcinogenèse hépatocellulaire.

Sur l'axe cancer bronchique, nos résultats montraient que le polymorphisme *POLL* rs3730477 du gène *POLL* (*Polymerase (DNA directed), lambda*) était significativement associé à une

augmentation du risque de cancer bronchique chez les Caucasiens. L'âge et le tabagisme étaient aussi associés à un risque accru de CP.

Une étude ancillaire sur tissu sain et tumoral a évalué les niveaux de m⁵dC, dU et 8-oxodG. Nos résultats montraient que m⁵dC, dU et 8-oxodG étaient significativement plus élevés dans la tumeur que dans le tissu sain adjacent, avec des variations importantes suivant l'histologie de la tumeur. Cette étude met en évidence une forte association entre m⁵dC et 8-oxodG, ce qui confirme une implication des altérations génétiques et épigénétiques dans la carcinogenèse pulmonaire.

Le dernier axe de notre projet était consacré à l'étude des changements hématologiques et la génotoxicité associée à une exposition à la pollution de l'air par le benzène et les HAPs chez les CTM exposés par rapport aux témoins non exposés vivant en zone rurale.

Les résultats montraient une réduction du nombre des globules blancs, lymphocytes, neutrophiles et plaquettes chez les CTM par rapport aux témoins non exposés. Nous avons observé la présence d'un adduit d'ADN volumineux chez les populations exposées, avec d'autres petits adduits, notamment chez les vendeurs d'essence dans les rues de Cotonou. Les niveaux de dU et de 8-oxodG étaient plus élevés chez les CTM que chez les témoins.

Sur cet axe de notre étude, nous envisageons identifier l'adduit majeur observé chez les sujets exposés; poursuivre le recrutement des témoins et évaluer l'influence des variants polymorphiques des gènes candidats à la réparation d'ADN sur les lésions de dU et 8-oxodG

En conclusion, nous avons identifié six variants situés sur *BRIP1* et deux variants sur *GGH* significativement associés au risque de carcinogenèse hépatocellulaire chez les Caucasiens porteurs d'une cirrhose d'étiologie virale et non virale, respectivement. Aucune interaction épistatique n'était observée. Par ailleurs, nos résultats ont montré que le variant *POLL* rs3730477 était associé à un risque accru de cancer bronchique. Enfin, nous avons démontré que l'exposition à la pollution de l'air par le benzène et les HAPs était associée à une augmentation des lésions d'ADN, en particulier les adduits volumineux.

Une réplication de nos résultats sur *BRIP1*, *GGH* et *POLL* dans des cohortes indépendantes plus larges s'avère indispensable.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbondanzo, S. L., Manz, H. J., Klappenbach, R. S., and Gootenberg, J. E. (1986). Hepatocellular carcinoma in an 11-year-old girl with Fanconi's anemia. Report of a case and review of the literature. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 8, 334–337.
- Agachan B., Kucukhuseyin O., Aksoy P., Turna A., Yaylim I., Gormus U., *et al.* (2009). "Apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) gene polymorphisms and lung cancer risk in relation to tobacco smoking." *Anticancer Res* 29(6): 2417-20.
- Al Zabadi, H., Ferrari, L., Sari-Minodier, I., Kerautret, M.-A., Tiberghien, A., Paris, C., and Zmirou-Navier, D. (2011). Integrated exposure assessment of sewage workers to genotoxins: an urinary biomarker approach and oxidative stress evaluation. *Environ Health* 10, 23.
- Altay, C., Alikasifoglu, M., Kara, A., Tunçbilek, E., Ozbek, N., and Schroeder-Kurth, T. M. (1997). Analysis of 65 Turkish patients with congenital aplastic anemia (Fanconi anemia and non-Fanconi anemia): Hacettepe experience. *Clin. Genet.* 51, 296–302.
- Alter, B. P. (2003). Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001. *Cancer* 97, 425–440.
- An Y., Jin G., Wang H., Wang Y., Liu H., Li R., *et al.* (2008). "Polymorphisms in hMLH1 and risk of early-onset lung cancer in a southeast Chinese population." *Lung Cancer* 59(2): 164-70.
- Andres E., Loukili N. H., Noel E., Kaltenbach G., Abdelgheni M. B., Perrin A. E., *et al.* (2004). "Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients." *Cmaj* 171(3): 251-9.
- Asami S., Hirano T., Yamaguchi R., Tomioka Y., Itoh H. and Kasai H. (1996). "Increase of a type of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine, and its repair activity in human leukocytes by cigarette smoking." *Cancer Res* 56(11): 2546-9.
- Avogbe P. H., Ayi-Fanou L., Autrup H., Loft S., Fayomi B., Sanni A., Vinzents P. and Moller P. (2005). "Ultrafine particulate matter and high-level benzene urban air pollution in relation to oxidative DNA damage." *Carcinogenesis* 26(3): 613-20.
- Ayi-Fanou L., Avogbe P. H., Fayomi B., Keith G., Hountondji C., Creppy E. E., Autrup H., Rihn B. H. and Sanni A. "DNA-adducts in subjects exposed to urban air pollution by benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Cotonou, Benin." *Environ Toxicol* 26(1): 93-102.
- Ayi Fanou L., Mobio T. A., Creppy E. E., Fayomi B., Fustoni S., Moller P., *et al.* (2006). "Survey of air pollution in Cotonou, Benin--air monitoring and biomarkers." *Sci Total Environ* 358(1-3): 85-96.
- Bain C., Feskanich D., Speizer F. E., Thun M., Hertzmark E., Rosner B. A. and Colditz G. A. (2004). "Lung cancer rates in men and women with comparable histories of smoking." *J Natl Cancer Inst* 96(11): 826-34.
- Bakker, S. T., Van de Vrugt, H. J., Rooimans, M. A., Oostra, A. B., Steltenpool, J., Delzenne-Goette, E., Van der Wal, A., Van der Valk, M., Joenje, H., Te Riele, H., *et al.* (2009). Fancm-deficient mice reveal unique features of Fanconi anemia complementation group M. *Hum. Mol. Genet.* 18, 3484–3495.

- Bao Y., Michaud D. S., Spiegelman D., Albanes D., Anderson K. E., Bernstein L., *et al.* "Folate intake and risk of pancreatic cancer: pooled analysis of prospective cohort studies." J Natl Cancer Inst 103(24): 1840-50.
- Balamurugan, K., and Said, H. M. (2006). Role of reduced folate carrier in intestinal folate uptake. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 291, C189–193.
- Barbato, D. L., Tomei, G., Tomei, F., and Sancini, A. (2010). Traffic air pollution and oxidatively generated DNA damage: can urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxiguanosine be considered a good biomarker? A meta-analysis. *Biomarkers* 15, 538–545.
- Braithwaite, E. K., Kedar, P. S., Stumpo, D. J., Bertocci, B., Freedman, J. H., Samson, L. D., and Wilson, S. H. (2010). DNA polymerases beta and lambda mediate overlapping and independent roles in base excision repair in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS ONE* 5, e12229.
- Barnes D. E. and Lindahl T. (2004). "Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells." Annu Rev Genet 38: 445-76.
- Basten G. P., Duthie S. J., Pirie L., Vaughan N., Hill M. H. and Powers H. J. (2006). "Sensitivity of markers of DNA stability and DNA repair activity to folate supplementation in healthy volunteers." Br J Cancer 94(12): 1942-7.
- Baylin S. B. and Herman J. G. (2000). "DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics." Trends Genet 16(4): 168-74.
- Bellacosa A. (2001). "Role of MED1 (MBD4) Gene in DNA repair and human cancer." J Cell Physiol 187(2): 137-44.
- Berger S. H., Pittman D. L. and Wyatt M. D. (2008). "Uracil in DNA: consequences for carcinogenesis and chemotherapy." Biochem Pharmacol 76(6): 697-706.
- Bird A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." Genes Dev 16(1): 6-21.
- Bjornsson H. T., Sigurdsson M. I., Fallin M. D., Irizarry R. A., Aspelund T., Cui H., *et al.* (2008). "Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering." Jama 299(24): 2877-83.
- Bleich S., Lenz B., Ziegenbein M., Beutler S., Frieling H., Kornhuber J. and Bonsch D. (2006). "Epigenetic DNA hypermethylation of the HEP gene promoter induces down-regulation of its mRNA expression in patients with alcohol dependence." Alcohol Clin Exp Res 30(4): 587-91.
- Blount B. C. and Ames B. N. (1995). "DNA damage in folate deficiency." Baillieres Clin Haematol 8(3): 461-78.
- Blount B. C., Mack M. M., Wehr C. M., MacGregor J. T., Hiatt R. A., Wang G., Wickramasinghe S. N., Everson R. B. and Ames B. N. (1997). "Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage." Proc Natl Acad Sci U S A 94(7): 3290-5.

- Bollati V., Baccarelli A., Hou L., Bonzini M., Fustinoni S., Cavallo D., *et al.* (2007). "Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene." Cancer Res 67(3): 876-80.
- Bollati V., Schwartz J., Wright R., Litonjua A., Tarantini L., Suh H., Sparrow D., Vokonas P. and Baccarelli A. (2009). "Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects." Mech Ageing Dev 130(4): 234-9.
- Bonsch D., Lenz B., Reulbach U., Kornhuber J. and Bleich S. (2004). "Homocysteine associated genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism." J Neural Transm 111(12): 1611-6.
- Bridge, W.L., Vandenberg, C.J., Franklin, R.J. & Hiom, K. (2005). The BRIP1 helicase functions independently of BRCA1 in the Fanconi anemia pathway for DNA crosslink repair. *Nat. Genet.* 37, 953–957.
- Brownson R. C., Loy T. S., Ingram E., Myers J. L., Alavanja M. C., Sharp D. J. and Chang J. C. (1995). "Lung cancer in nonsmoking women. Histology and survival patterns." Cancer 75(1): 29-33.
- Butkiewicz D., Rusin M., Enewold L., Shields P. G., Chorazy M. and Harris C. C. (2001). "Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer." Carcinogenesis 22(4): 593-7.
- Bressac, B., Kew, M., Wands, J., and Ozturk, M. (1991). Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 350, 429–431.
- Bruix, J., Sherman, M., Llovet, J. M., Beaugrand, M., Lencioni, R., Burroughs, A. K., Christensen, E., Pagliaro, L., Colombo, M., and Rodés, J. (2001). Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J. Hepatol.* 35, 421–430.
- Calvisi D. F., Factor V. M., Ladu S., Conner E. A. and Thorgeirsson S. S. (2004). "Disruption of beta-catenin pathway or genomic instability define two distinct categories of liver cancer in transgenic mice." Gastroenterology 126(5): 1374-86.
- Campayo M., Vinolas N., Navarro A., Carcereny E., Casas F., Gel B., *et al.* "Single nucleotide polymorphisms in tobacco metabolism and DNA repair genes and prognosis in resected non-small-cell lung cancer." J Surg Res 167(1): e5-12.
- Capp, J.-P., Boudsocq, F., Bergoglio, V., Trouche, D., Cazaux, C., Blanco, L., Hoffmann, J.-S., and Canitrot, Y. (2010). The R438W polymorphism of human DNA polymerase lambda triggers cellular sensitivity to camptothecin by compromising the homologous recombination repair pathway. *Carcinogenesis* 31, 1742–1747.
- Carrillo-Carrasco N., Chandler R. J. and Venditti C. P. "Combined methylmalonic acidemia and homocystinuria, cblC type. I. Clinical presentations, diagnosis and management." J Inherit Metab Dis.

- Casper M., Grunhage F. and Lammert F. "Cancer risk in chronic hepatitis B: Do genome-wide association studies hit the mark?" Hepatology 53(4): 1390-2.
- Chalitchagorn K., Shuangshoti S., Hourpai N., Kongruttanachok N., Tangkijvanich P., Thong-ngam D., Voravud N., Sriuranpong V. and Mutirangura A. (2004). "Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis." Oncogene 23(54): 8841-6.
- Chan K. Y., Wong C. M., Kwan J. S., Lee J. M., Cheung K. W., Yuen M. F., *et al.* "Genome-wide association study of hepatocellular carcinoma in southern chinese patients with chronic hepatitis B virus infection." PLoS One 6(12): e28798.
- Chanarin I. and Metz J. (1997). "Diagnosis of cobalamin deficiency: the old and the new." Br J Haematol 97(4): 695-700.
- Chang J. S., Wrensch M. R., Hansen H. M., Sison J. D., Aldrich M. C., Quesenberry C. P., Jr., Seldin M. F., Kelsey K. T. and Wiencke J. K. (2009). "Base excision repair genes and risk of lung cancer among San Francisco Bay Area Latinos and African-Americans." Carcinogenesis 30(1): 78-87.
- Chango A., Abdel Nour A. M., Niquet C. and Tessier F. J. (2009). "Simultaneous determination of genomic DNA methylation and uracil misincorporation." Med Princ Pract 18(2): 81-4.
- Chen C. J., Yang H. I., Su J., Jen C. L., You S. L., Lu S. N., Huang G. T. and Iloeje U. H. (2006). "Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level." Jama 295(1): 65-73.
- Chen Q., Marsh J., Ames B. and Mossman B. (1996). "Detection of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage, in culture medium from human mesothelial cells exposed to crocidolite asbestos." Carcinogenesis 17(11): 2525-7.
- Chisari F. V., Klopchin K., Moriyama T., Pasquinelli C., Dunsford H. A., Sell S., Pinkert C. A., Brinster R. L. and Palmiter R. D. (1989). "Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice." Cell 59(6): 1145-56.
- Choi J. Y., James S. R., Link P. A., McCann S. E., Hong C. C., Davis W., Nesline M. K., Ambrosone C. B. and Karpf A. R. (2009). "Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer." Carcinogenesis 30(11): 1889-97.
- Chuang, S.-C., La Vecchia, C., and Boffetta, P. (2009). Liver cancer: descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection. *Cancer Lett.* 286, 9–14.
- Cleaver J. E. (2005). "Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair." Nat Rev Cancer 5(7): 564-73.
- Collins, J. J., Ireland, B. K., Easterday, P. A., Nair, R. S., and Braun, J. (1997). Evaluation of lymphopenia among workers with low-level benzene exposure and the utility of routine data collection. *J. Occup. Environ. Med.* 39, 232–237.

- Cong W. M., Wu M. C., Zhang X. H., Chen H. and Yuan J. Y. (1993). "Primary hepatocellular carcinoma in women of mainland China. A clinicopathologic analysis of 104 patients." Cancer 71(10): 2941-5.
- Cooke M. S., Rozalski R., Dove R., Gackowski D., Siomek A., Evans M. D. and Olinski R. (2006). "Evidence for attenuated cellular 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine removal in cancer patients." Biol Chem 387(4): 393-400.
- Cui Y., Morgenstern H., Greenland S., Tashkin D. P., Mao J., Cao W., Cozen W., Mack T. M. and Zhang Z. F. (2006). "Polymorphism of Xeroderma Pigmentosum group G and the risk of lung cancer and squamous cell carcinomas of the oropharynx, larynx and esophagus." Int J Cancer 118(3): 714-20.
- Danoy P., Michiels S., Dessen P., Pignat C., Boulet T., Monet M., *et al.* (2008). "Variants in DNA double-strand break repair and DNA damage-response genes and susceptibility to lung and head and neck cancers." Int J Cancer 123(2): 457-63.
- David-Beabes G. L., Lunn R. M. and London S. J. (2001). "No association between the XPD (Lys751Gln) polymorphism or the XRCC3 (Thr241Met) polymorphism and lung cancer risk." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 10(8): 911-2.
- Daya-Grosjean L. and Sarasin A. (2005). "The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors." Mutat Res 571(1-2): 43-56.
- de las Penas R., Sanchez-Ronco M., Alberola V., Taron M., Camps C., Garcia-Carbonero R., *et al.* (2006). "Polymorphisms in DNA repair genes modulate survival in cisplatin/gemcitabine-treated non-small-cell lung cancer patients." Ann Oncol 17(4): 668-75.
- DeMarini D. M. (2004). "Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review." Mutat Res 567(2-3): 447-74.
- Deng Q., Sheng L., Su D., Zhang L., Liu P., Lu K. and Ma S. "Genetic polymorphisms in ATM, ERCC1, APE1 and iASPP genes and lung cancer risk in a population of southeast China." Med Oncol 28(3): 667-72.
- DeVos L., Chanson A., Liu Z., Ciappio E. D., Parnell L. D., Mason J. B., Tucker K. L. and Crott J. W. (2008). "Associations between single nucleotide polymorphisms in folate uptake and metabolizing genes with blood folate, homocysteine, and DNA uracil concentrations." Am J Clin Nutr 88(4): 1149-58.
- Di Benedetto M., Pineau P., Nouet S., Berhouet S., Seitz I., Louis S., *et al.* (2006). "Mutation analysis of the 8p22 candidate tumor suppressor gene ATIP/MTUS1 in hepatocellular carcinoma." Mol Cell Endocrinol 252(1-2): 207-15.
- Di J. Z., Han X. D., Gu W. Y., Wang Y., Zheng Q., Zhang P., Wu H. M. and Zhu Z. Z. "Association of hypomethylation of LINE-1 repetitive element in blood leukocyte DNA with an increased risk of hepatocellular carcinoma." J Zhejiang Univ Sci B 12(10): 805-11.

- Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, Decarli A, Trevisi P et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol*. 2002 Feb 15;155(4):323-31.
- Ducros V., Belva-Besnet H., Casetta B. and Favier A. (2006). "A robust liquid chromatography tandem mass spectrometry method for total plasma homocysteine determination in clinical practice." *Clin Chem Lab Med* 44(8): 987-90.
- Durackova Z. "Some current insights into oxidative stress." *Physiol Res* 59(4): 459-69.
- Duthie S. J. "Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis." *J Inherit Metab Dis* 34(1): 101-9.
- Duthie S. J., Grant G. and Narayanan S. (2000). "Increased uracil misincorporation in lymphocytes from folate-deficient rats." *Br J Cancer* 83(11): 1532-7.
- Duthie S. J. and Hawdon A. (1998). "DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro." *Faseb J* 12(14): 1491-7.
- Duthie S. J., Mavrommatis Y., Rucklidge G., Reid M., Duncan G., Moyer M. P., Pirie L. P. and Bestwick C. S. (2008). "The response of human colonocytes to folate deficiency in vitro: functional and proteomic analyses." *J Proteome Res* 7(8): 3254-66.
- Duthie S. J., Narayanan S., Blum S., Pirie L. and Brand G. M. (2000). "Folate deficiency in vitro induces uracil misincorporation and DNA hypomethylation and inhibits DNA excision repair in immortalized normal human colon epithelial cells." *Nutr Cancer* 37(2): 245-51.
- Duthie S. J., Narayanan S., Brand G. M., Pirie L. and Grant G. (2002). "Impact of folate deficiency on DNA stability." *J Nutr* 132(8 Suppl): 2444S-2449S.
- Duthie S. J., Narayanan S., Sharp L., Little J., Basten G. and Powers H. (2004). "Folate, DNA stability and colo-rectal neoplasia." *Proc Nutr Soc* 63(4): 571-8.
- Dziaman T., Huzarski T., Gackowski D., Rozalski R., Siomek A., Szpila A., Guz J., Lubinski J. and Olinski R. (2009). "Elevated level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in leukocytes of BRCA1 mutation carriers compared to healthy controls." *Int J Cancer* 125(9): 2209-13.
- Eichholzer M., Luthy J., Moser U. and Fowler B. (2001). "Folate and the risk of colorectal, breast and cervix cancer: the epidemiological evidence." *Swiss Med Wkly* 131(37-38): 539-49.
- El-Maarri O., Becker T., Junen J., Manzoor S. S., Diaz-Lacava A., Schwaab R., Wienker T. and Oldenburg J. (2007). "Gender specific differences in levels of DNA methylation at selected loci from human total blood: a tendency toward higher methylation levels in males." *Hum Genet* 122(5): 505-14.
- El-Serag H. B. and Rudolph K. L. (2007). "Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis." *Gastroenterology* 132(7): 2557-76.
- Elledge S. J. (1996). "Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis." *Science* 274(5293): 1664-72.

- Erazo B. M., Amigo C. H., Oyarzun G. M. and Peruga U. A. (2008). "[Smoking and lung cancer: attributable risks according to gender]." Rev Med Chil 136(10): 1272-80.
- Fabris C., Toniutto P., Falleti E., Fontanini E., Cussigh A., Bitetto D., *et al.* (2009). "MTHFR C677T polymorphism and risk of HCC in patients with liver cirrhosis: role of male gender and alcohol consumption." Alcohol Clin Exp Res 33(1): 102-7.
- Farazi P. A. and DePinho R. A. (2006). "Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment." Nat Rev Cancer 6(9): 674-87.
- Fenech M., Aitken C. and Rinaldi J. (1998). "Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults." Carcinogenesis 19(7): 1163-71.
- Ferlay J., Shin H. R., Bray F., Forman D., Mathers C. and Parkin D. M. 2010. "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." Int J Cancer 127(12): 2893-917.
- Figueiredo J. C., Grau M. V., Wallace K., Levine A. J., Shen L., Hamdan R., *et al.* (2009). "Global DNA hypomethylation (LINE-1) in the normal colon and lifestyle characteristics and dietary and genetic factors." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 18(4): 1041-9.
- Formeister E. J., Tsuchiya M., Fujii H., Shpyleva S., Pogribny I. P. and Rusyn I. "Comparative analysis of promoter methylation and gene expression endpoints between tumorous and non-tumorous tissues from HCV-positive patients with hepatocellular carcinoma." Mutat Res 692(1-2): 26-33.
- Fortini P., Pascucci B., Parlanti E., D'Errico M., Simonelli V. and Dogliotti E. (2003). "8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways." Mutat Res 531(1-2): 127-39.
- Foucault C., Berna P., Bagan P., Mostapha A., Das Neves-Pereira J. C. and Riquet M. (2007). "[Lung cancer before 40 years and after 80 years: surgical aspects]." Rev Pneumol Clin 63(5 Pt 1): 305-11.
- Fowler B. M., Giuliano A. R., Piyathilake C., Nour M. and Hatch K. (1998). "Hypomethylation in cervical tissue: is there a correlation with folate status?" Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 7(10): 901-6.
- Friedberg E. C. (2003). "DNA damage and repair." Nature 421(6921): 436-40.
- Friedberg EC W. G., Siede W (1995). "DNA repair and mutagenesis." Washington, DC: ASM
- Frosst P., Blom H. J., Milos R., Goyette P., Sheppard C. A., Matthews R. G., *et al.* (1995). "A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase." Nat Genet 10(1): 111-3.
- Fuke C., Shimabukuro M., Petronis A., Sugimoto J., Oda T., Miura K., *et al.* (2004). "Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study." Ann Hum Genet 68(Pt 3): 196-204.
- Fuks F. DNA methyltransferases: from chromatin remodeling to cancer. *Med Sci (Paris)*. 2003 Apr;19(4):477-80.

- Gao W., Kondo Y., Shen L., Shimizu Y., Sano T., Yamao K., *et al.* (2008). "Variable DNA methylation patterns associated with progression of disease in hepatocellular carcinomas." Carcinogenesis 29(10): 1901-10.
- Gillet L. C. and Scharer O. D. (2006). "Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair." Chem Rev 106(2): 253-76.
- Groopman, J. D., Scholl, P., and Wang, J. S. (1996). Epidemiology of human aflatoxin exposures and their relationship to liver cancer. *Prog. Clin. Biol. Res.* 395, 211–222.
- Gras-Aygon C., Daures J. P., Bessaoud F. and Tretarre B. (2009). "[Female lung cancer trends, staging and histology in Hérault, France]." Rev Epidemiol Sante Publique 57(4): 275-84.
- Guz J., Foksinski M., Siomek A., Gackowski D., Rozalski R., Dziaman T., Szpila A. and Olinski R. (2008). "The relationship between 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine level and extent of cytosine methylation in leukocytes DNA of healthy subjects and in patients with colon adenomas and carcinomas." Mutat Res 640(1-2): 170-3.
- Halliwell B. (2000). "Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come?" Am J Clin Nutr 72(5): 1082-7.
- Hamid A., Wani N. A. and Kaur J. (2009). "New perspectives on folate transport in relation to alcoholism-induced folate malabsorption--association with epigenome stability and cancer development." Febs J 276(8): 2175-91.
- Hardeland U., Bentele M., Lettieri T., Steinacher R., Jiricny J. and Schar P. (2001). "Thymine DNA glycosylase." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 68: 235-53.
- Harris H. R., Cramer D. W., Vitonis A. F., Depari M. and Terry K. L. "Folate, vitamin B(6) , vitamin B(12) , methionine and alcohol intake in relation to ovarian cancer risk." Int J Cancer.
- Harris R. S., Petersen-Mahrt S. K. and Neuberger M. S. (2002). "RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators." Mol Cell 10(5): 1247-53.
- Hatt L., Loft S., Risom L., Moller P., Sorensen M., Raaschou-Nielsen O., Overvad K., Tjønneland A. and Vogel U. (2008). "OGG1 expression and OGG1 Ser326Cys polymorphism and risk of lung cancer in a prospective study." Mutat Res 639(1-2): 45-54.
- Hempfen C., Wanschers H. and van der Sluijs Veer G. (2008). "A fast liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of total homocysteine and methylmalonic acid." Anal Bioanal Chem 391(1): 263-70.
- Hill, C., and Doyon, F. (2008). [The frequency of cancer in France: mortality trends since 1950 and summary of the report on the causes of cancer]. *Bull Cancer* 95, 5–10.
- Hillemacher T., Frieling H., Moskau S., Muschler M. A., Semmler A., Kornhuber J., Klockgether T., Bleich S. and Linnebank M. (2008). "Global DNA methylation is influenced by smoking behaviour." Eur Neuropsychopharmacol 18(4): 295-8.
- Hoeijmakers J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature 411(6835): 366-74.

- Holleland G., Schneede J., Ueland P. M., Lund P. K., Refsum H. and Sandberg S. (1999). "Cobalamin deficiency in general practice. Assessment of the diagnostic utility and cost-benefit analysis of methylmalonic acid determination in relation to current diagnostic strategies." Clin Chem 45(2): 189-98.
- Hou S. M., Falt S., Angelini S., Yang K., Nyberg F., Lambert B. and Hemminki K. (2002). "The XPD variant alleles are associated with increased aromatic DNA adduct level and lung cancer risk." Carcinogenesis 23(4): 599-603.
- Howard D. J., Ota R. B., Briggs L. A., Hampton M. and Pritsos C. A. (1998). "Environmental tobacco smoke in the workplace induces oxidative stress in employees, including increased production of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 7(2): 141-6.
- Hsiung D. T., Marsit C. J., Houseman E. A., Eddy K., Furniss C. S., McClean M. D. and Kelsey K. T. (2007). "Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16(1): 108-14.
- Hu Y. C. and Ahrendt S. A. (2005). "hOGG1 Ser326Cys polymorphism and G:C-to-T:A mutations: no evidence for a role in tobacco-related non small cell lung cancer." Int J Cancer 114(3): 387-93.
- Hu Z., Liu H., Wang H., Miao R., Sun W., Jin G., *et al.* (2008). "Tagging single nucleotide polymorphisms in phosphoinositide-3-kinase-related protein kinase genes involved in DNA damage "checkpoints" and lung cancer susceptibility." Clin Cancer Res 14(9): 2887-91.
- Hu Z., Wei Q., Wang X. and Shen H. (2004). "DNA repair gene XPD polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis." Lung Cancer 46(1): 1-10.
- Hung R. J., Hall J., Brennan P. and Boffetta P. (2005). "Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review." Am J Epidemiol 162(10): 925-42.
- Improta G., Sgambato A., Bianchino G., Zupa A., Grieco V., La Torre G., Traficante A. and Cittadini A. (2008). "Polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 and risk of lung and colorectal cancer: a case-control study in a Southern Italian population." Anticancer Res 28(5B): 2941-6.
- Itin P. H., Sarasin A. and Pittelkow M. R. (2001). "Trichothiodystrophy: update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes." J Am Acad Dermatol 44(6): 891-920; quiz 921-4.
- Ito H., Matsuo K., Hamajima N., Mitsudomi T., Sugiura T., Saito T., *et al.* (2004). "Gene-environment interactions between the smoking habit and polymorphisms in the DNA repair genes, APE1 Asp148Glu and XRCC1 Arg399Gln, in Japanese lung cancer risk." Carcinogenesis 25(8): 1395-401.
- Jacob R. A., Gretz D. M., Taylor P. C., James S. J., Pogribny I. P., Miller B. J., Henning S. M. and Swendseid M. E. (1998). "Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women." J Nutr 128(7): 1204-12.

- James S. J., Pogribny I. P., Pogribna M., Miller B. J., Jernigan S. and Melnyk S. (2003). "Mechanisms of DNA damage, DNA hypomethylation, and tumor progression in the folate/methyl-deficient rat model of hepatocarcinogenesis." J Nutr 133(11 Suppl 1): 3740S-3747S.
- Janik J., Swoboda M., Janowska B., Ciesla J. M., Gackowski D., Kowalewski J., Olinski R., Tudek B. and Speina E. "8-Oxoguanine incision activity is impaired in lung tissues of NSCLC patients with the polymorphism of OGG1 and XRCC1 genes." Mutat Res 709-710: 21-31.
- Ji Y. N., Zhan P., Wang J., Qiu L. X. and Yu L. K. "APE1 Asp148Glu gene polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis." Mol Biol Rep 38(7): 4537-43.
- Jiang J., Liang X., Zhou X., Huang R., Chu Z., Zhan Q. and Lin H. "DNA repair gene X-ray repair cross complementing group 1 Arg194Trp polymorphism on the risk of lung cancer: a meta-analysis on 22 studies." J Thorac Oncol 5(11): 1741-7.
- Jin F., Qu L. S. and Shen X. Z. (2009). "Association between the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis." Diagn Pathol 4: 39.
- Jin G., Huang J., Hu Z., Dai J., Tang R., Chen Y., *et al.* "Genetic variants in one-carbon metabolism-related genes contribute to NSCLC prognosis in a Chinese population." Cancer 116(24): 5700-9.
- Jiricny J. (2006). "The multifaceted mismatch-repair system." Nat Rev Mol Cell Biol 7(5): 335-46.
- Jost J. P. and Jost Y. C. (1995). "Mechanism of active DNA demethylation during embryonic development and cellular differentiation in vertebrates." Gene 157(1-2): 265-6.
- Kapiszewska M., Kalembe M., Wojciech U. and Milewicz T. (2005). "Uracil misincorporation into DNA of leukocytes of young women with positive folate balance depends on plasma vitamin B12 concentrations and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. A pilot study." J Nutr Biochem 16(8): 467-78.
- Kastan M. B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B. and Craig R. W. (1991). "Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage." Cancer Res 51(23 Pt 1): 6304-11.
- Kastan M. B., Zhan Q., el-Deiry W. S., Carrier F., Jacks T., Walsh W. V., Plunkett B. S., Vogelstein B. and Fornace A. J., Jr. (1992). "A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia." Cell 71(4): 587-97.
- Kato N., Ji G., Wang Y., Baba M., Hoshida Y., Otsuka M., *et al.* (2005). "Large-scale search of single nucleotide polymorphisms for hepatocellular carcinoma susceptibility genes in patients with hepatitis C." Hepatology 42(4): 846-53.
- Kavli B., Otterlei M., Slupphaug G. and Krokan H. E. (2007). "Uracil in DNA--general mutagen, but normal intermediate in acquired immunity." DNA Repair (Amst) 6(4): 505-16.
- Kazma, R., Babron, M.-C., Gaborieau, V., Génin, E., Brennan, P., Hung, R. J., McLaughlin, J. R., Krokan, H. E., Elvestad, M. B., Skorpen, F., *et al.* (2012). Lung cancer and DNA repair

- genes: multilevel association analysis from the International Lung Cancer Consortium. *Carcinogenesis* 33, 1059–1064.
- Khanna K. K. and Jackson S. P. (2001). "DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection." *Nat Genet* 27(3): 247-54.
- Khuder, S. A., Youngdale, M. C., Bisesi, M. S., and Schaub, E. A. (1999). Assessment of complete blood count variations among workers exposed to low levels of benzene. *J. Occup. Environ. Med.* 41, 821–826.
- Kim J., Cho Y. A., Kim D. H., Lee B. H., Hwang D. Y., Jeong J., *et al.* "Dietary intake of folate and alcohol, MTHFR C677T polymorphism, and colorectal cancer risk in Korea." *Am J Clin Nutr.*
- Kim K. Y., Kim D. S., Lee S. K., Lee I. K., Kang J. H., Chang Y. S., Jacobs D. R., Steffes M. and Lee D. H. "Association of low-dose exposure to persistent organic pollutants with global DNA hypomethylation in healthy Koreans." *Environ Health Perspect* 118(3): 370-4.
- Kim Y. H., Petko Z., Dzieciatkowski S., Lin L., Ghiassi M., Stain S., *et al.* (2006). "CpG island methylation of genes accumulates during the adenoma progression step of the multistep pathogenesis of colorectal cancer." *Genes Chromosomes Cancer* 45(8): 781-9.
- Kim Y. I. (2004). "Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer?" *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13(4): 511-9.
- Kim Y. I. (2007). "Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review." *Mol Nutr Food Res* 51(3): 267-92.
- Kim Y. I., Pogribny I. P., Basnakian A. G., Miller J. W., Selhub J., James S. J. and Mason J. B. (1997). "Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene." *Am J Clin Nutr* 65(1): 46-52.
- Kim Y. I., Shirwadkar S., Choi S. W., Puchyr M., Wang Y. and Mason J. B. (2000). "Effects of dietary folate on DNA strand breaks within mutation-prone exons of the p53 gene in rat colon." *Gastroenterology* 119(1): 151-61.
- Kiran M., Saxena R., Chawla Y. K. and Kaur J. (2009). "Polymorphism of DNA repair gene XRCC1 and hepatitis-related hepatocellular carcinoma risk in Indian population." *Mol Cell Biochem* 327(1-2): 7-13.
- Klungland A. and Lindahl T. (1997). "Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1)." *Embo J* 16(11): 3341-8.
- Kobayashi, Y., Watanabe, M., Okada, Y., Sawa, H., Takai, H., Nakanishi, M., Kawase, Y., Suzuki, H., Nagashima, K., Ikeda, K., *et al.* (2002). Hydrocephalus, situs inversus, chronic sinusitis, and male infertility in DNA polymerase lambda-deficient mice: possible implication for the pathogenesis of immotile cilia syndrome. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2769–2776.
- Kote-Jarai, Z., Jugurnauth, S., Mulholland, S., Leongamornlert, D. A., Guy, M., Edwards, S., Tymrakiewicz, M., O'Brien, L., Hall, A., Wilkinson, R., *et al.* (2009). A recurrent truncating

- germline mutation in the BRIP1/FANCDJ gene and susceptibility to prostate cancer. *Br. J. Cancer* 100, 426–430.
- Krokan H. E., Drablos F. and Slupphaug G. (2002). "Uracil in DNA--occurrence, consequences and repair." *Oncogene* 21(58): 8935-48.
- Krokan H. E., Standal R. and Slupphaug G. (1997). "DNA glycosylases in the base excision repair of DNA." *Biochem J* 325 (Pt 1): 1-16.
- Kumar M., Kumar R., Hissar S. S., Saraswat M. K., Sharma B. C., Sakhuja P. and Sarin S. K. (2007). "Risk factors analysis for hepatocellular carcinoma in patients with and without cirrhosis: a case-control study of 213 hepatocellular carcinoma patients from India." *J Gastroenterol Hepatol* 22(7): 1104-11.
- Kumar V., Kato N., Urabe Y., Takahashi A., Muroyama R., Hosono N., *et al.* "Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma." *Nat Genet* 43(5): 455-8.
- Kumaraswamy, E. & Shiekhataar, R. (2007). Activation of BRCA1/BRCA2-associated helicase BACH1 is required for timely progression through S phase. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6733–6741.
- Kuo C. S., Lin C. Y., Wu M. Y., Lu C. L. and Huang R. F. (2008). "Relationship between folate status and tumour progression in patients with hepatocellular carcinoma." *Br J Nutr* 100(3): 596-602.
- Kurz E. U. and Lees-Miller S. P. (2004). "DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways." *DNA Repair (Amst)* 3(8-9): 889-900.
- Kwak S. Y., Kim U. K., Cho H. J., Lee H. K., Kim H. J., Kim N. K. and Hwang S. G. (2008). "Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) gene polymorphisms as risk factors for hepatocellular carcinoma in a Korean population." *Anticancer Res* 28(5A): 2807-11.
- Lai C. L., Gregory P. B., Wu P. C., Lok A. S., Wong K. P. and Ng M. M. (1987). "Hepatocellular carcinoma in Chinese males and females. Possible causes for the male predominance." *Cancer* 60(5): 1107-10.
- Laird P. W. (2003). "The power and the promise of DNA methylation markers." *Nat Rev Cancer* 3(4): 253-66.
- Lan Q., Shen M., Berndt S. I., Bonner M. R., He X., Yeager M., *et al.* (2005). "Smoky coal exposure, NBS1 polymorphisms, p53 protein accumulation, and lung cancer risk in Xuan Wei, China." *Lung Cancer* 49(3): 317-23.
- Lan, Q., Zhang, L., Li, G., Vermeulen, R., Weinberg, R. S., Dosemeci, M., Rappaport, S. M., Shen, M., Alter, B. P., Wu, Y., *et al.* (2004). Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science* 306, 1774–1776.
- Landi S., Gemignani F., Canzian F., Gaborieau V., Barale R., Landi D., *et al.* (2006). "DNA repair and cell cycle control genes and the risk of young-onset lung cancer." *Cancer Res* 66(22): 11062-9.

- Larijani M., Zaheen A., Frieder D., Wang Y., Wu G. E., Edelmann W. and Martin A. (2005). "Lack of MSH2 involvement differentiates V(D)J recombination from other non-homologous end joining events." Nucleic Acids Res 33(21): 6733-42.
- LeBrun, D. P., Silver, M. M., Freedman, M. H., and Phillips, M. J. (1991). Fibrolamellar carcinoma of the liver in a patient with Fanconi anemia. *Hum. Pathol.* 22, 396–398.
- Lehmann A. R. (2003). "DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy." Biochimie 85(11): 1101-11.
- Leng S., Stidley C. A., Willink R., Bernauer A., Do K., Picchi M. A., *et al.* (2008). "Double-strand break damage and associated DNA repair genes predispose smokers to gene methylation." Cancer Res 68(8): 3049-56.
- Levrn, O., Attwooll, C., Henry, R. T., Milton, K. L., Neveling, K., Rio, P., Batish, S. D., Kalb, R., Velleuer, E., Barral, S., *et al.* (2005). The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat. Genet.* 37, 931–933.
- Li G. M. and Modrich P. (1995). "Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs." Proc Natl Acad Sci U S A 92(6): 1950-4.
- Li H., Hao X., Zhang W., Wei Q. and Chen K. (2008). "The hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 17(7): 1739-45.
- Li R., Yang Y., An Y., Zhou Y., Liu Y., Yu Q., *et al.* "Genetic polymorphisms in DNA double-strand break repair genes XRCC5, XRCC6 and susceptibility to hepatocellular carcinoma." Carcinogenesis 32(4): 530-6.
- Li Z., Guan W., Li M. X., Zhong Z. Y., Qian C. Y., Yang X. Q., Liao L., Li Z. P. and Wang D. "Genetic polymorphism of DNA base-excision repair genes (APE1, OGG1 and XRCC1) and their correlation with risk of lung cancer in a Chinese population." Arch Med Res 42(3): 226-34.
- Liang G., Xing D., Miao X., Tan W., Yu C., Lu W. and Lin D. (2003). "Sequence variations in the DNA repair gene XPD and risk of lung cancer in a Chinese population." Int J Cancer 105(5): 669-73.
- Lim D. S., Kim S. T., Xu B., Maser R. S., Lin J., Petrini J. H. and Kastan M. B. (2000). "ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway." Nature 404(6778): 613-7.
- Linares, M., Pastor, E., Gomez, A., and Grau, E. (1991). Hepatocellular carcinoma and squamous cell carcinoma in a patient with Fanconi's anemia. *Ann. Hematol.* 63, 54–55.
- Lindahl T. (1993). "Instability and decay of the primary structure of DNA." Nature 362(6422): 709-15.
- Lindahl T. and Nyberg B. (1974). "Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid." Biochemistry 13(16): 3405-10.
- Lindahl T. and Wood R. D. (1999). "Quality control by DNA repair." Science 286(5446): 1897-905.

- Linhart H. G., Troen A., Bell G. W., Cantu E., Chao W. H., Moran E., Steine E., He T. and Jaenisch R. (2009). "Folate deficiency induces genomic uracil misincorporation and hypomethylation but does not increase DNA point mutations." Gastroenterology 136(1): 227-235 e3.
- Litman, R. Litman R, Peng M, Jin Z, Zhang F, Zhang J, Powell S, Andreassen PR, Cantor SB. (2005). BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCF. *Cancer Cell* 8, 255–265.
- Loft S. and Poulsen H. E. (1996). "Cancer risk and oxidative DNA damage in man." J Mol Med (Berl) 74(6): 297-312.
- Long X. D., Ma Y., Deng Z. L., Huang Y. Z. and Wei N. B. (2008). "[Association of the Thr241Met polymorphism of DNA repair gene XRCC3 with genetic susceptibility to AFB1-related hepatocellular carcinoma in Guangxi population]." Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 25(3): 268-71.
- Long X. D., Ma Y., Zhou Y. F., Ma A. M. and Fu G. H. "Polymorphism in xeroderma pigmentosum complementation group C codon 939 and aflatoxin B1-related hepatocellular carcinoma in the Guangxi population." Hepatology 52(4): 1301-9.
- Long X. D., Ma Y., Zhou Y. F., Yao J. G., Ban F. Z., Huang Y. Z. and Huang B. C. (2009). "XPD codon 312 and 751 polymorphisms, and AFB1 exposure, and hepatocellular carcinoma risk." BMC Cancer 9: 400.
- Long X. D., Yao J. G., Huang Y. Z., Huang X. Y., Ban F. Z., Yao L. M. and Fan L. D. "DNA repair gene XRCC7 polymorphisms (rs#7003908 and rs#10109984) and hepatocellular carcinoma related to AFB1 exposure among Guangxi population, China." Hepatol Res 41(11): 1085-93.
- Lopez-Cima M. F., Gonzalez-Arriaga P., Garcia-Castro L., Pascual T., Marron M. G., Puente X. S. and Tardon A. (2007). "Polymorphisms in XPC, XPD, XRCC1, and XRCC3 DNA repair genes and lung cancer risk in a population of northern Spain." BMC Cancer 7: 162.
- Lu A. L., Li X., Gu Y., Wright P. M. and Chang D. Y. (2001). "Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions." Cell Biochem Biophys 35(2): 141-70.
- Maciag A., Bialkowska A., Espiritu I., Powell D., Alvord W. G., Kasprzak K. S., Anderson L. M. and Witschi H. R. (2003). "Gestation stage-specific oxidative deoxyribonucleic acid damage from sidestream smoke in pregnant rats and their fetuses." Arch Environ Health 58(4): 238-44.
- Maddrey W. C. (2000). "Hepatitis B: an important public health issue." J Med Virol 61(3): 362-6.
- Madrigano J., Baccarelli A., Mittleman M. A., Wright R. O., Sparrow D., Vokonas P. S., Tarantini L. and Schwartz J. "Prolonged exposure to particulate pollution, genes associated with glutathione pathways, and DNA methylation in a cohort of older men." Environ Health Perspect 119(7): 977-82.

- Maître, A., Soulat, J.-M., Masclet, P., Stoklov, M., Marquès, M., and De Gaudemaris, R. (2002). Exposure to carcinogenic air pollutants among policemen working close to traffic in an urban area. *Scand J Work Environ Health* 28, 402–410.
- Marczynski B., Preuss R., Mensing T., Angerer J., Seidel A., El Mourabit A., Wilhelm M. and Bruning T. (2005). "Genotoxic risk assessment in white blood cells of occupationally exposed workers before and after alteration of the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) profile in the production material: comparison with PAH air and urinary metabolite levels." *Int Arch Occup Environ Health* 78(2): 97-108.
- Marczynski B., Rihs H. P., Rossbach B., Holzer J., Angerer J., Scherenberg M., Hoffmann G., Bruning T. and Wilhelm M. (2002). "Analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and DNA strand breaks in white blood cells of occupationally exposed workers: comparison with ambient monitoring, urinary metabolites and enzyme polymorphisms." *Carcinogenesis* 23(2): 273-81.
- Marczynski B., Rozynek P., Kraus T., Schlosser S., Raithel H. J. and Baur X. (2000). "Levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA of white blood cells from workers highly exposed to asbestos in Germany." *Mutat Res* 468(2): 195-202.
- Martin A. Apports nutritionnels conseillés pour la population française. Tec et Doc Lavoisier; Édition : 3e éd. (29 octobre 2000).
- Masserot-Lureau, C., Adoui, N., Degos, F., De Bazelaire, C., Soulier, J., Chevret, S., Socié, G., and Leblanc, T. (2012). Incidence of liver abnormalities in Fanconi anemia patients. *Am. J. Hematol.* 87, 547–549.
- Matullo G., Dunning A. M., Guarrera S., Baynes C., Polidoro S., Garte S., *et al.* (2006). "DNA repair polymorphisms and cancer risk in non-smokers in a cohort study." *Carcinogenesis* 27(5): 997-1007.
- Melnyk S., Pogribna M., Miller B. J., Basnakian A. G., Pogribny I. P. and James S. J. (1999). "Uracil misincorporation, DNA strand breaks, and gene amplification are associated with tumorigenic cell transformation in folate deficient/repleted Chinese hamster ovary cells." *Cancer Lett* 146(1): 35-44.
- Michiels S., Danoy P., Dessen P., Bera A., Boulet T., Bouchardy C., Lathrop M., Sarasin A. and Benhamou S. (2007). "Polymorphism discovery in 62 DNA repair genes and haplotype associations with risks for lung and head and neck cancers." *Carcinogenesis* 28(8): 1731-9.
- Min S. H., Oh S. Y., Karp G. I., Poncz M., Zhao R. and Goldman I. D. (2008). "The clinical course and genetic defect in the PCFT gene in a 27-year-old woman with hereditary folate malabsorption." *J Pediatr* 153(3): 435-7.
- Mindikoglu A. L. and Miller R. R. (2009). "Hepatitis C in the elderly: epidemiology, natural history, and treatment." *Clin Gastroenterol Hepatol* 7(2): 128-34; quiz 124.
- Misra R. R., Ratnasinghe D., Tangrea J. A., Virtamo J., Andersen M. R., Barrett M., Taylor P. R. and Albanes D. (2003). "Polymorphisms in the DNA repair genes XPD, XRCC1, XRCC3,

- and APE/ref-1, and the risk of lung cancer among male smokers in Finland." Cancer Lett 191(2): 171-8.
- Moldvay, J., Schaff, Z., and Lapis, K. (1991). Hepatocellular carcinoma in Fanconi's anemia treated with androgen and corticosteroid. *Zentralbl. Pathol.* 137, 167–170.
- Moore L. E., Pfeiffer R. M., Poscablo C., Real F. X., Kogevinas M., Silverman D., *et al.* (2008). "Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study." Lancet Oncol 9(4): 359-66.
- Mortusewicz O., Schermelleh L., Walter J., Cardoso M. C. and Leonhardt H. (2005). "Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites." Proc Natl Acad Sci U S A 102(25): 8905-9.
- Mosbaugh D. W. and Bennett S. E. (1994). "Uracil-excision DNA repair." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 48: 315-70.
- Mu L. N., Cao W., Zhang Z. F., Cai L., Jiang Q. W., You N. C., *et al.* (2007). "Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms and the risk of primary hepatocellular carcinoma (HCC) in a Chinese population." Cancer Causes Control 18(6): 665-75.
- Munaka M, Kohshi K, Kawamoto T, Takasawa S, Nagata N, Itoh H, Oda S, Katoh T. Genetic polymorphisms of tobacco- and alcohol-related metabolizing enzymes and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003 Jun;129(6):355-60.
- Nance M. A. and Berry S. A. (1992). "Cockayne syndrome: review of 140 cases." Am J Med Genet 42(1): 68-84.
- Nilsen H., Haushalter K. A., Robins P., Barnes D. E., Verdine G. L. and Lindahl T. (2001). "Excision of deaminated cytosine from the vertebrate genome: role of the SMUG1 uracil-DNA glycosylase." Embo J 20(15): 4278-86.
- Nilsen H., Rosewell I., Robins P., Skjelbred C. F., Andersen S., Slupphaug G., *et al.* (2000). "Uracil-DNA glycosylase (UNG)-deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication." Mol Cell 5(6): 1059-65.
- Ohba, T., Kometani, T., Shoji, F., Yano, T., Yoshino, I., Ichiro, Y., Taguchi, K., Kuraoka, I., Oda, S., and Maehara, Y. (2009). Expression of an X-family DNA polymerase, pol lambda, in the respiratory epithelium of non-small cell lung cancer patients with habitual smoking. *Mutat. Res.* 677, 66–71.
- Olinski R., Jurgowiak M. and Zaremba T. "Uracil in DNA--its biological significance." Mutat Res 705(3): 239-45.
- Olinski R., Zastawny T., Budzbon J., Skokowski J., Zegarski W. and Dizdaroglu M. (1992). "DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues." FEBS Lett 309(2): 193-8.
- Pachouri S. S., Sobti R. C., Kaur P. and Singh J. (2007). "Contrasting impact of DNA repair gene XRCC1 polymorphisms Arg399Gln and Arg194Trp on the risk of lung cancer in the north-Indian population." DNA Cell Biol 26(3): 186-91.

- Park J. Y., Lee S. Y., Jeon H. S., Park S. H., Bae N. C., Lee E. B., *et al.* (2002). "Lys751Gln polymorphism in the DNA repair gene XPD and risk of primary lung cancer." Lung Cancer 36(1): 15-6.
- Park S. H., Lee G. Y., Jeon H. S., Lee S. J., Kim K. M., Jang S. S., *et al.* (2004). "-93G-->A polymorphism of hMLH1 and risk of primary lung cancer." Int J Cancer 112(4): 678-82.
- Park S. W., Durkin M. E., Thorgeirsson S. S. and Popescu N. C. (2003). "DNA variants of DLC-1, a candidate tumor suppressor gene in human hepatocellular carcinoma." Int J Oncol 23(1): 133-7.
- Parkin D. M., Bray F., Ferlay J. and Pisani P. (2001). "Estimating the world cancer burden: Globocan 2000." Int J Cancer 94(2): 153-6.
- Paz-Elizur T., Krupsky M., Blumenstein S., Elinger D., Schechtman E. and Livneh Z. (2003). "DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer." J Natl Cancer Inst 95(17): 1312-9.
- Paz-Elizur T., Krupsky M., Elinger D., Schechtman E. and Livneh Z. (2005). "Repair of the oxidative DNA damage 8-oxoguanine as a biomarker for lung cancer risk." Cancer Biomark 1(2-3): 201-5.
- Paz-Elizur T., Sevilya Z., Leitner-Dagan Y., Elinger D., Roisman L. C. and Livneh Z. (2008). "DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential application for cancer risk assessment and prevention." Cancer Lett 266(1): 60-72.
- Peyrin-Biroulet L., Barraud H., Ancel D., Petit-Laurent F., Bigard M. A., Gueant J. L. and Bronowicki J. P. (2004). "[Folate metabolism and colorectal carcinogenesis]." Gastroenterol Clin Biol 28(6-7 Pt 1): 582-92.
- Pilsner J. R., Hu H., Ettinger A., Sanchez B. N., Wright R. O., Cantonwine D., *et al.* (2009). "Influence of prenatal lead exposure on genomic methylation of cord blood DNA." Environ Health Perspect 117(9): 1466-71.
- Pogribny I. P., Muskhelishvili L., Miller B. J. and James S. J. (1997). "Presence and consequence of uracil in preneoplastic DNA from folate/methyl-deficient rats." Carcinogenesis 18(11): 2071-6.
- Popanda O., Schattenberg T., Phong C. T., Butkiewicz D., Risch A., Edler L., *et al.* (2004). "Specific combinations of DNA repair gene variants and increased risk for non-small cell lung cancer." Carcinogenesis 25(12): 2433-41.
- Popiela A., Gabrys M. S., Rabczynski J., Panszczyk M., Keith G. and Baranowski W. (2002). "[Estimation of DNA methylation level in endometrial cancer tissues]." Ginekol Pol 73(11): 966-9.
- Postawski K., Galecka-Josse M. and Baranowski W. (2009). "Is global DNA methylation in sporadic uterine adenocarcinomas in women a result of histological and clinical tumor advancement?" Ginekol Pol 80(11): 824-7.

- Pourquier P. (2006) La réparation de l'ADN, cible potentielle d'un développement thérapeutique en cancérologie. *Bull Cancer*; hors série: 124-44
- Prasad R., Dianov G. L., Bohr V. A. and Wilson S. H. (2000). "FEN1 stimulation of DNA polymerase beta mediates an excision step in mammalian long patch base excision repair." *J Biol Chem* 275(6): 4460-6.
- Pufulete M., Al-Ghnam R., Leather A. J., Appleby P., Gout S., Terry C., Emery P. W. and Sanders T. A. (2003). "Folate status, genomic DNA hypomethylation, and risk of colorectal adenoma and cancer: a case control study." *Gastroenterology* 124(5): 1240-8.
- Qian Q., Liu R., Lei Z., You J., Zhou Q. and Zhang H. T. "[Meta analysis of association between Ser326Cys polymorphism of hOGG1 gene and risk of lung cancer]." *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 14(3): 205-10.
- Qiu A., Jansen M., Sakaris A., Min S. H., Chattopadhyay S., Tsai E., *et al.* (2006). "Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption." *Cell* 127(5): 917-28.
- Radzikowska E., Glaz P. and Roszkowski K. (2002). "Lung cancer in women: age, smoking, histology, performance status, stage, initial treatment and survival. Population-based study of 20 561 cases." *Ann Oncol* 13(7): 1087-93.
- Rafnar, T., Gudbjartsson, D. F., Sulem, P., Jonasdottir, A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Besenbacher, S., Lundin, P., Stacey, S. N., Gudmundsson, J., *et al.* (2011). Mutations in BRIP1 confer high risk of ovarian cancer. *Nat. Genet.* 43, 1104–1107.
- Rampersaud G. C., Kauwell G. P., Hutson A. D., Cerda J. J. and Bailey L. B. (2000). "Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women." *Am J Clin Nutr* 72(4): 998-1003.
- Ramzy, II, Omran D. A., Hamad O., Shaker O. and Abboud A. "Evaluation of serum LINE-1 hypomethylation as a prognostic marker for hepatocellular carcinoma." *Arab J Gastroenterol* 12(3): 139-42.
- Ren J., Ulvik A., Refsum H. and Ueland P. M. (2002). "Uracil in human DNA from subjects with normal and impaired folate status as determined by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Anal Chem* 74(1): 295-9.
- Ringer G., Smith J. M., Engel A. M., Hendy M. P. and Lang J. (2005). "Influence of sex on lung cancer histology, stage, and survival in a midwestern United States tumor registry." *Clin Lung Cancer* 7(3): 180-2.
- Rosenquist T. A., Zharkov D. O. and Grollman A. P. (1997). "Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(14): 7429-34.
- Rossner, P., Jr, Svecova, V., Milcova, A., Lnenickova, Z., Solansky, I., and Sram, R. J. (2008). Seasonal variability of oxidative stress markers in city bus drivers. Part I. Oxidative damage to DNA. *Mutat. Res.* 642, 14–20.

- Rusiecki J. A., Baccarelli A., Bollati V., Tarantini L., Moore L. E. and Bonefeld-Jorgensen E. C. (2008). "Global DNA hypomethylation is associated with high serum-persistent organic pollutants in Greenlandic Inuit." Environ Health Perspect 116(11): 1547-52.
- Ryk C., Kumar R., Thirumaran R. K. and Hou S. M. (2006). "Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, APEX1, XRCC3 and NBS1, and the risk for lung cancer in never- and ever-smokers." Lung Cancer 54(3): 285-92.
- Saffroy R., Pham P., Chiappini F., Gross-Goupil M., Castera L., Azoulay D., *et al.* (2004). "The MTHFR 677C > T polymorphism is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis." Carcinogenesis 25(8): 1443-8.
- Sakoda, L. C., Loomis, M. M., Doherty, J. A., Julianto, L., Barnett, M. J., Neuhausser, M. L., Thornquist, M. D., Weiss, N. S., Goodman, G. E., and Chen, C. (2012). Germ line variation in nucleotide excision repair genes and lung cancer risk in smokers. *Int J Mol Epidemiol Genet* 3, 1–17.
- Sarter B., Long T. I., Tsong W. H., Koh W. P., Yu M. C. and Laird P. W. (2005). "Sex differential in methylation patterns of selected genes in Singapore Chinese." Hum Genet 117(4): 402-3.
- Sauna Z. E. and Kimchi-Sarfaty C. "Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease." Nat Rev Genet 12(10): 683-91.
- Sauna Z. E., Kimchi-Sarfaty C., Ambudkar S. V. and Gottesman M. M. (2007). "Silent polymorphisms speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer." Cancer Res 67(20): 9609-12.
- Sceusi E. L., Loose D. S. and Wray C. J. "Clinical implications of DNA methylation in hepatocellular carcinoma." HPB (Oxford) 13(6): 369-76.
- Scharer O. D. and Jiricny J. (2001). "Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases." Bioessays 23(3): 270-81.
- Seal, S., Thompson, D., Renwick, A., Elliott, A., Kelly, P., Barfoot, R., Chagtai, T., Jayatilake, H., Ahmed, M., Spanova, K., *et al.* (2006). Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat. Genet.* 38, 1239–1241.
- Shen L., Fang J., Qiu D., Zhang T., Yang J., Chen S. and Xiao S. (1998). "Correlation between DNA methylation and pathological changes in human hepatocellular carcinoma." Hepatogastroenterology 45(23): 1753-9.
- Shen M., Berndt S. I., Rothman N., Demarini D. M., Mumford J. L., He X., *et al.* (2005). "Polymorphisms in the DNA nucleotide excision repair genes and lung cancer risk in Xuan Wei, China." Int J Cancer 116(5): 768-73.
- Shen M., Berndt S. I., Rothman N., Mumford J. L., He X., Yeager M., *et al.* (2005). "Polymorphisms in the DNA base excision repair genes APEX1 and XRCC1 and lung cancer risk in Xuan Wei, China." Anticancer Res 25(1B): 537-42.
- Shervington A. and Patel R. (2008). "Silencing DNA methyltransferase (DNMT) enhances glioma chemosensitivity." Oligonucleotides 18(4): 365-74.

- Shih C. M., Chen C. Y., Lee I. H., Kao W. T. and Wang Y. C. "A polymorphism in the hMLH1 gene (-93G-->A) associated with lung cancer susceptibility and prognosis." Int J Mol Med 25(1): 165-70.
- Shiloh Y. (2003). "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." Nat Rev Cancer 3(3): 155-68.
- Sigurdson, A. J., Hauptmann, M., Chatterjee, N., Alexander, B. H., Doody, M. M., Rutter, J. L., and Struewing, J. P. (2004). Kin-cohort estimates for familial breast cancer risk in relation to variants in DNA base excision repair, BRCA1 interacting and growth factor genes. *BMC Cancer* 4, 9.
- Silvestri V., Rizzolo P., Falchetti M., Zanna I., Masala G., Bianchi S., Palli D. and Ottini L. "Mutation analysis of BRIP1 in male breast cancer cases: a population-based study in Central Italy." Breast Cancer Res Treat 126(2): 539-43.
- Smith T. R., Levine E. A., Perrier N. D., Miller M. S., Freimanis R. I., Lohman K., *et al.* (2003). "DNA-repair genetic polymorphisms and breast cancer risk." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 12(11 Pt 1): 1200-4.
- Sobol R. W., Horton J. K., Kuhn R., Gu H., Singhal R. K., Prasad R., Rajewsky K. and Wilson S. H. (1996). "Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair." Nature 379(6561): 183-6.
- Song, H., Ramus, S. J., Kjaer, S. K., Hogdall, E., Dicioccio, R. A., Whittemore, A. S., McGuire, V., Hogdall, C., Jacobs, I. J., Easton, D. F., *et al.* (2007). Tagging single nucleotide polymorphisms in the BRIP1 gene and susceptibility to breast and ovarian cancer. *PLoS ONE* 2, e268.
- Sørensen, M., Autrup, H., Møller, P., Hertel, O., Jensen, S. S., Vinzents, P., Knudsen, L. E., and Loft, S. (2003). Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat. Res.* 544, 255–271.
- Sreeja L., Syamala V. S., Syamala V., Hariharan S., Raveendran P. B., Vijayalekshmi R. V., Madhavan J. and Ankathil R. (2008). "Prognostic importance of DNA repair gene polymorphisms of XRCC1 Arg399Gln and XPD Lys751Gln in lung cancer patients from India." J Cancer Res Clin Oncol 134(6): 645-52.
- Stojic L., Brun R. and Jiricny J. (2004). "Mismatch repair and DNA damage signalling." DNA Repair (Amst) 3(8-9): 1091-101.
- Tanaka Y., Maniwa Y., Bermudez V. P., Doi T., Nishio W., Ohbayashi C., *et al.* "Nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in DNA damage repair pathways and lung cancer risk." Cancer 116(4): 896-902.
- Tarantini L., Bonzini M., Apostoli P., Pegoraro V., Bollati V., Marinelli B., *et al.* (2009). "Effects of particulate matter on genomic DNA methylation content and iNOS promoter methylation." Environ Health Perspect 117(2): 217-22.

- Teoh N., Pyakurel P., Dan Y. Y., Swisshelm K., Hou J., Mitchell C., Fausto N., Gu Y. and Farrell G. "Induction of p53 renders ATM-deficient mice refractory to hepatocarcinogenesis." Gastroenterology 138(3): 1155-65 e1-2.
- Terrados, G., Capp, J.-P., Canitrot, Y., García-Díaz, M., Bebenek, K., Kirchhoff, T., Villanueva, A., Boudsocq, F., Bergoglio, V., Cazaux, C., et al. (2009). Characterization of a natural mutator variant of human DNA polymerase lambda which promotes chromosomal instability by compromising NHEJ. *PLoS ONE* 4, e7290.
- Terry M. B., Ferris J. S., Pilsner R., Flom J. D., Tehranifar P., Santella R. M., Gamble M. V. and Susser E. (2008). "Genomic DNA methylation among women in a multiethnic New York City birth cohort." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 17(9): 2306-10.
- Tischkowitz, M., and Winqvist, R. (2011). Using mouse models to investigate the biological and physiological consequences of defects in the Fanconi anaemia/breast cancer DNA repair signalling pathway. *J. Pathol.* 224, 301–305.
- Toyokuni S., Mori T. and Dizdaroglu M. (1994). "DNA base modifications in renal chromatin of Wistar rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate." Int J Cancer 57(1): 123-8.
- Trankenschuh W., Puls F., Christgen M., Albat C., Heim A., Poczkaj J., Fleming P., Kreipe H. and Lehmann U. "Frequent and distinct aberrations of DNA methylation patterns in fibrolamellar carcinoma of the liver." PLoS One 5(10): e13688.
- Traut T. W. (1994). "Physiological concentrations of purines and pyrimidines." Mol Cell Biochem 140(1): 1-22.
- Tudek B, Winczura A, Janik J, Siomek A, Foksinski M, Oliński R. Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging. *Am J Transl Res.* 2010 May 15;2(3):254-84.
- Umemura T., Ichijo T., Yoshizawa K., Tanaka E. and Kiyosawa K. (2009). "Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Japan." J Gastroenterol 44 Suppl 19: 102-7.
- Unfried K., Schurkes C. and Abel J. (2002). "Distinct spectrum of mutations induced by crocidolite asbestos: clue for 8-hydroxydeoxyguanosine-dependent mutagenesis in vivo." Cancer Res 62(1): 99-104.
- van den Bosch M., Bree R. T. and Lowndes N. F. (2003). "The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes." EMBO Rep 4(9): 844-9.
- van den Donk M., Pellis L., Crott J. W., van Engeland M., Friederich P., Nagengast F. M., et al. (2007). "Folic acid and vitamin B-12 supplementation does not favorably influence uracil incorporation and promoter methylation in rectal mucosa DNA of subjects with previous colorectal adenomas." J Nutr 137(9): 2114-20.
- van Oosten M., Rebel H., Friedberg E. C., van Steeg H., van der Horst G. T., van Kranen H. J., et al. (2000). "Differential role of transcription-coupled repair in UVB-induced G2 arrest and apoptosis in mouse epidermis." Proc Natl Acad Sci U S A 97(21): 11268-73.

- Vogel U., Laros I., Jacobsen N. R., Thomsen B. L., Bak H., Olsen A., *et al.* (2004). "Two regions in chromosome 19q13.2-3 are associated with risk of lung cancer." Mutat Res 546(1-2): 65-74.
- Wagner J., Kamiya H. and Fuchs R. P. (1997). "Leading versus lagging strand mutagenesis induced by 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in *Escherichia coli*." J Mol Biol 265(3): 302-9.
- Walworth N. C. and Bernards R. (1996). "rad-dependent response of the chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint." Science 271(5247): 353-6.
- Weber M. (2008). "[Profiles of DNA methylation in normal and cancer cells]." Med Sci (Paris) 24(8-9): 731-4.
- Weiss A., Keshet I., Razin A. and Cedar H. (1996). "DNA demethylation in vitro: involvement of RNA." Cell 86(5): 709-18.
- Weiss W. (1999). "Asbestosis: a marker for the increased risk of lung cancer among workers exposed to asbestos." Chest 115(2): 536-49.
- Welzel T. M., Katki H. A., Sakoda L. C., Evans A. A., London W. T., Chen G., *et al.* (2007). "Blood folate levels and risk of liver damage and hepatocellular carcinoma in a prospective high-risk cohort." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16(6): 1279-82.
- Wen J., Fu J. H., Zhang W. and Guo M. "Lung carcinoma signaling pathways activated by smoking." Chin J Cancer 30(8): 551-8.
- Whitehouse C. J., Taylor R. M., Thistlethwaite A., Zhang H., Karimi-Busheri F., Lasko D. D., Weinfeld M. and Caldecott K. W. (2001). "XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair." Cell 104(1): 107-17.
- Wild C. P. and Montesano R. (2009). "A model of interaction: aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention." Cancer Lett 286(1): 22-8.
- Wilhelm C. S., Kelsey K. T., Butler R., Plaza S., Gagne L., Zens M. S., *et al.* "Implications of LINE1 methylation for bladder cancer risk in women." Clin Cancer Res 16(5): 1682-9.
- Wills L. (1978). "Nutrition Classics. British Medical Journal 1:1059-64, 1931. Treatment of "pernicious anaemia of pregnancy" and "tropical anaemia" with special reference to yeast extract as a curative agent. By Lucy Wills." Nutr Rev 36(5): 149-51.
- Wilson D. M., 3rd and Bohr V. A. (2007). "The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease." DNA Repair (Amst) 6(4): 544-59.
- Wu M. Y., Kuo C. S., Lin C. Y., Lu C. L. and Syu Huang R. F. (2009). "Lymphocytic mitochondrial DNA deletions, biochemical folate status and hepatocellular carcinoma susceptibility in a case-control study." Br J Nutr 102(5): 715-21.
- Xing C., Wang Q. F., Li B., Tian H., Ni Y., Yin S. and Li G. "Methylation and expression analysis of tumor suppressor genes p15 and p16 in benzene poisoning." Chem Biol Interact 184(1-2): 306-9.
- Xu B., Kim S. and Kastan M. B. (2001). "Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation." Mol Cell Biol 21(10): 3445-50.

- Xu B., O'Donnell A. H., Kim S. T. and Kastan M. B. (2002). "Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation." Cancer Res 62(16): 4588-91.
- Yang A. S., Estecio M. R., Doshi K., Kondo Y., Tajara E. H. and Issa J. P. (2004). "A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements." Nucleic Acids Res 32(3): e38.
- Yang H. H., Hu N., Wang C., Ding T., Dunn B. K., Goldstein A. M., Taylor P. R. and Lee M. P. "Influence of genetic background and tissue types on global DNA methylation patterns." PLoS One 5(2): e9355.
- Yin J., Vogel U., Guo L., Ma Y. and Wang H. (2006). "Lack of association between DNA repair gene ERCC1 polymorphism and risk of lung cancer in a Chinese population." Cancer Genet Cytogenet 164(1): 66-70.
- Yin J., Vogel U., Ma Y., Qi R. and Wang H. (2009). "HapMap-based study of the DNA repair gene ERCC2 and lung cancer susceptibility in a Chinese population." Carcinogenesis 30(7): 1181-5.
- Yu H, Zhao H, Wang LE, Han Y, Chen WV, Amos CI, Rafnar T et al. (2011)An analysis of single nucleotide polymorphisms of 125 DNA repair genes in the Texas genome-wide association study of lung cancer with a replication for the XRCC4 SNPs. *DNA Repair (Amst)*. Apr 3;10(4):398-407.
- Yu, X., Chini, C. C. S., He, M., Mer, G., and Chen, J. (2003). The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science* 302, 639–642.
- Yu M. C., Yuan J. M. and Lu S. C. (2008). "Alcohol, cofactors and the genetics of hepatocellular carcinoma." J Gastroenterol Hepatol 23 Suppl 1: S92-7.
- Yuan J. M., Govindarajan S., Arakawa K. and Yu M. C. (2004). "Synergism of alcohol, diabetes, and viral hepatitis on the risk of hepatocellular carcinoma in blacks and whites in the U.S." Cancer 101(5): 1009-17.
- Yuan J. M., Lu S. C., Van Den Berg D., Govindarajan S., Zhang Z. Q., Mato J. M. and Yu M. C. (2007). "Genetic polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genes and risk of hepatocellular carcinoma." Hepatology 46(3): 749-58.
- Yuen M. F., Hou J. L. and Chutaputti A. (2009). "Hepatocellular carcinoma in the Asia pacific region." J Gastroenterol Hepatol 24(3): 346-53.
- Zang E. A. and Wynder E. L. (1996). "Differences in lung cancer risk between men and women: examination of the evidence." J Natl Cancer Inst 88(3-4): 183-92.
- Zhang H., Zhai Y., Hu Z., Wu C., Qian J., Jia W., *et al*. "Genome-wide association study identifies 1p36.22 as a new susceptibility locus for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers." Nat Genet 42(9): 755-8.

- Zhang M., Hu L., Shen H., Dong J., Shu Y., Xu L., *et al.* "Candidate variants at 6p21.33 and 6p22.1 and risk of non-small cell lung cancer in a Chinese population." Int J Mol Epidemiol Genet 1(1): 11-8.
- Zhang X. J., Chinkes D. L. and Herndon D. N. (2008). "Folate stimulation of wound DNA synthesis." J Surg Res 147(1): 15-22.
- Zhang L., Gao J., Li Z., Gong Y. (2012). Neuronal pentraxin II (NPTX2) Is Frequently Down-Regulated by Promoter Hypermethylation in Pancreatic Cancers. Dig Dis Sci. 57: 2608-14.
- Zhao R. and Goldman I. D. (2007). "The molecular identity and characterization of a Proton-coupled Folate Transporter--PCFT; biological ramifications and impact on the activity of pemetrexed." Cancer Metastasis Rev 26(1): 129-39.
- Zhao R., Matherly L. H. and Goldman I. D. (2009). "Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues." Expert Rev Mol Med 11: e4.
- Zhao S., Weng Y. C., Yuan S. S., Lin Y. T., Hsu H. C., Lin S. C., *et al.* (2000). "Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products." Nature 405(6785): 473-7.
- Zheng H., Wang Z., Shi X. and Wang Z. (2009). "XRCC1 polymorphisms and lung cancer risk in Chinese populations: a meta-analysis." Lung Cancer 65(3): 268-73.
- Zhou K., Hu D., Lu J., Fan W., Liu H., Chen H., *et al.* "A genetic variant in the APE1/Ref-1 gene promoter -141T/G may modulate risk of glioblastoma in a Chinese Han population." BMC Cancer 11: 104.
- Zhou W., Liu G., Miller D. P., Thurston S. W., Xu L. L., Wain J. C., Lynch T. J., Su L. and Christiani D. C. (2002). "Gene-environment interaction for the ERCC2 polymorphisms and cumulative cigarette smoking exposure in lung cancer." Cancer Res 62(5): 1377-81.
- Zhou W., Liu G., Park S., Wang Z., Wain J. C., Lynch T. J., Su L. and Christiani D. C. (2005). "Gene-smoking interaction associations for the ERCC1 polymorphisms in the risk of lung cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 14(2): 491-6.
- Zhu Z. Z., Cong W. M., Liu S. F., Xian Z. H. and Wu W. Q. (2006). "[A study on the association of MTHFR C677T polymorphism with genetic susceptibility to hepatocellular carcinoma]." Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi 14(3): 196-8.
- Zhu Z. Z., Hou L., Bollati V., Tarantini L., Marinelli B., Cantone L., *et al.* "Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: a combined analysis." Int J Epidemiol.
- Zienolddiny S., Campa D., Lind H., Ryberg D., Skaug V., Stangeland L., Phillips D. H., Canzian F. and Haugen A. (2006). "Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer." Carcinogenesis 27(3): 560-7.

FICHES TECHNIQUES

Fiche technique 1. Quantification de l'Hcy, de l'acide méthylmalonique et succinique par LC-MS/MS

L'homocystéine (HCY), l'acide méthylmalonique (MMA) et l'acide succinique plasmatiques sont quantifiés par une technique de chromatographie liquide ultra haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS) à partir de 50 µL de plasma. Pour des conditions optimales, le sang est prélevé sur tube EDTA (voire hépariné), transporté dans l'heure au laboratoire dans la glace et le plasma isolé rapidement. La méthode a été adaptée d'articles précédemment publiés (Ducros V et al, 2006; Hempen C et al, 2008).

Brièvement, les protéines sont précipitées au méthanol puis l'homocystine et l'Hcy liée aux protéines sont réduites en Hcy par du dithiothréitol (DTT). Les standards internes marqués sont ajoutés (Homocystéine d4, acide méthylmalonique d3 et acide succinique d4), et 10 µL sont injectés dans le système UPLC Acquity (Waters). La séparation chromatographique de l'HCY, du MMA et de son isomère, l'acide succinique (même masse moléculaire mais polarité différente), est réalisée en isocratique sur une colonne Acquity UPLC HSST3 (1.8 µm, 2.1x50 mm) avec un débit de 0,2 ml/min. La phase mobile est un mélange d'eau/méthanol 95/5 à 0,1 % d'acide formique. Le spectromètre de masse triple quadripôle (4000 QTRAP, AB Sciex) opère en mode MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) positif puis négatif et cible les transitions suivantes : m/z 136,1 → m/z 90,1 (HCY) et m/z 140,1 → m/z 94,1 (HCY-d4) en mode positif et m/z 116,9 → m/z 72,8 (MMA et acide succinique), m/z 120 → m/z 75,9 (MMA-d3) et m/z 120,9 → m/z 76,9 (Acide succinique-d6) en mode négatif. La température de la source d'ionisation est de 600 °C. Les analytes sortent en moins de 3 minutes, et la durée d'une analyse est de 6 minutes si l'on inclut le temps de rééquilibration.

La quantification est faite grâce à une gamme d'étalonnage en plasma. Les limites de quantification sont respectivement de 0.09 µmol/L ; 0.05 µmol/L et 0.20 µmol/L pour l'Hcy, le MMA et l'acide succinique.

D'après notre expérience, l'Hcy semble stable dans le temps, le MMA stable 2 années et l'acide succinique moins de 6 mois après prélèvement.

Les valeurs usuelles sont pour l'Hcy < à 10 µmol/L pour les femmes enceintes et les moins de 15 ans ; < à 15 µmol/L pour les 15 - 65 ans et < à 20 µmol/L pour les plus de 65 ans. Pour le MMA et l'acide succinique les valeurs considérées comme normales sont respectivement < 0.50 µmol/L et < 7.0 µmol/L. Enfin, des taux de créatinine élevés surestiment les taux d'Hcy et de MMA.

Une hyperhomocystéinémie modérée (15-30 µmol/L) sera généralement indicative d'un déficit en vitamines du groupe B (B6, B9 ou B12); d'une mutation MTHFR ou d'une dysfonction rénale. Un taux élevé de MMA sera lui plus spécifique d'une déficience en B12 même si le taux de B12 est dans

les valeurs normales. L'hyperhomocystéinémie intermédiaire (30-100 µmol/L) pourra indiquer une mutation à l'état hétérozygote (ex CBS), un déficit sévère en vitamines ou une insuffisance rénale. Enfin, l'hyperhomocystéinémie sévère (>100 µmol/L) sera due à une mutation homozygote (CBS, MTHFR, MS ou MSR) (Hermann 07).

Principe : La concentration plasmatique en Hcy est mesurée par une technique de chromatographie liquide ultra haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en mode MRM positif.

L'Hcy liée aux protéines est libérée par ajout d'un réducteur. Les protéines sont précipitées au méthanol. Les standards internes deutérés sont ajoutés et quelques µL sont injectés dans l'UPLC. La quantification est faite grâce à une gamme d'étalonnage en plasma et à ajustement inter-échantillon grâce aux standards deutérés ajoutés en concentration connue et constante.

Préparation des réactifs

Préparation d'aliquots de solutions mères de standards non deutérés et deutérés à 1 mmol/L.

	Hcy (MM 268,4)	Hcy, d8 98 %	MMA (118.09 ; >99 %)	MMA d3 (98 %)	Ac.suc (118.09 ; >99 %)	Acide suc d6 (MM 124.13; 98 %)
Poudre (mg) *	13,27	13,8	11,809	12,356	11,806	12,666
HCl 0.1 N	50 ml	50 ml				
	Vortexer, soniquer					
NaOH 10 M (+ 4 °C)	1 ml	1 ml				
DTT	132,7 mg	132,7 mg				
HCl 0,1 N	Qsp 100 ml					
H2O Milli Q			100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
	Vortexer, soniquer		Vortexer, soniquer			
Concentration sol. mère	1 mM (d'Hcy)	1 mM (d'Hcy d4)	1mM	1mM	1mM	1mM
	Aliquoter par fraction de 0,7 mL Congeler à - 20 °C.					

* NB : Vérifier les quantités à peser pour chaque nouveau flacon en fonction de la masse et de la pureté du produit

Préparation de la gamme d'étalonnage

diluer S8 au 1/2 jusque S1 dans le pool de plasma :

Concentration finale (μM)	S8	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1
HCY	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.781
Acide Succinique	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.781
MMA	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.156	0.078

Préparer le mélange de standards internes : 150 μL de HCYd4 à 1 mmol/L

150 μL d'ac succinique d6 à 1 mmol/L

10 μL de MMA d3 à 2 mmol/L

4,5 ml de DTT2200 mmol/L

Préparation des contrôles d'Hcy : Plasma Control Level I (n°0072) + II (n°0073) lyophilisé

Reconstituer chaque flacon avec 2 mL d'eau distillée HPLC grade ; laisser reposer 10 à 15 minutes et agiter jusqu'à dissolution totale. Faire des aliquots de 200 μL à conserver à -20 °C

Préparation de la solution d'extraction MeOH 0,1 % (v/v) d'acide formique

Préparation des échantillons

Préparation des extraits protéiques selon la procédure décrite ci-dessus

Ultra soniquer pour dilution complète ; conserver à -80 °C

Décongeler les plasmas, les vortexer et les centrifuger (10 min, 3500 tours par minutes)

Allumer la thermo soudeuse Waters (30 min de préchauffe)

Dans un tube de 1,5 mL en polypropylène :

	Double blanc	Standards S0	Standards S1 à S8	Contrôles (pool, levels 1 & 2)	Patients
Échantillon	50 μL pool	50 μL pool	50 μL	50 μL	50 μL
Solution de SI	0	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
DTT 200 mM	50 μL	0	0	0	0
Vortexer ATTENDRE 15' à température ambiante (remettre les tubes patients au congélateur)					
MeOH + 0,1 % Ac formique	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL

NB : Travail possible à partir de 25 μL de plasma. Dans ce cas, diviser tous les volumes par 2

Vortexer et incubé 30 min à + 4 °C

Vortexer et centrifuger à 16000 rpm, 10 min, puis reprendre 100 µL de surnageant dans un godet de 1,5 ml (congeler éventuellement si nécessaire de faire ultérieurement l'étape LCMSMS) par 400 µL d'H₂O 0,1 % (v/v) ac formique (dilution au 1/5^{ème})

Vortexer et centrifuger à 16000 rpm pendant 10 min

Transférer sur microplaque Waters 350 µL ou 1 mL (ne pas remplir les puits à plus d'1/3)

Sceller les plaques avec un film plastique à l'aide de la thermo soudeuse Waters (30 min de préchauffe)

Passer sur LC-MS/MS selon la technique comme suit : MRM + pour HCY puis MRM - pour MMA & acide succinique et présence d'une valve pour permettre un switch vers la poubelle).

Fiche technique 2. Dosage quantitatif et simultané de la vitamine B₁₂ et des folates

Vitamine B12 [⁵⁷Co] Folates [¹²⁵I]¹ (MP Biomedicals, New York, États-Unis)

Principe du test

Ce dosage se fait par compétition et le réactif de liaison doit avoir une affinité égale pour l'étalon et pour les folates et/ou la vitamine B12 présente dans l'échantillon. La vitamine B12 ou les folates non marqués entrent en compétition avec leurs homologues marqués sur le nombre restreint de sites de fixation disponibles sur l'agent de fixation, ce qui réduit la quantité de vitamine B12 ou de folates marqués liés au réactif. Par conséquent, le taux de radioactivité liée est inversement proportionnel à la concentration de vitamine B12 ou de folates présents dans l'échantillon du patient ou de l'étalon.

Dans le cas du test radio-immunologique SimulTrac-SNB de MP Biomedicals, les taux de vitamine B12 et de folates sont simultanément déterminés dans un seul tube.

Les dosages ont été effectués sur des échantillons de plasma à l'aide du coffret commercial SimulTrac-SNB (ICN Pharmaceuticals)

Préparation des échantillons avant l'analyse

Prélèvement des échantillons : les échantillons doivent être prélevés chez des individus à jeun.

Sérum ou plasma : prélever le sang dans un tube sec sous vide de 5 ou 10 ml. Si on prélève du sérum, laisser le sang former un caillot à température ambiante pendant 30 à 60 min. Utiliser de l'EDTA si l'on veut faire une analyse sur le plasma. Centrifuger pendant 10 min et prélever le sérum ou le plasma.

Hémolysat de sang total (pour dosage des folates érythrocytaires) : Prélever le sang dans un tube en verre sous vide de 7 ml contenant de l'EDTA (bouchon lavande). Mesurer et noter la valeur de

l'hématocrite. Ajouter 100 µl de sang en suspension à 2 ml de solution récente d'acide ascorbique à 0,2 %.

Agiter par retournement plusieurs fois pour bien mélanger ; éviter la formation de mousse; Laisser reposer l'hémolysât entre 20 et 25 °C pendant 60 à 90 min avant analyse. Tenir à l'abri de la lumière pendant ce laps de temps.

Transport des échantillons : le sérum et le plasma soigneusement emballés doivent être transportés congelés du départ à l'arrivée.

Conservation des échantillons : Avant analyse, conserver les échantillons entre 2 et 8 °C. Si l'on doit garder un échantillon plus de 4 heures, il faut le congeler à -20 °C. Ne pas stocker les échantillons dans des congélateurs à dégivrage automatique pour éviter des cycles de congélation - décongélation.

Préparation des réactifs

Premier cas : si l'on doit utiliser un flacon de marqueur dans les 30 jours.

Verser le contenu d'un flacon de DTT dans un flacon de marqueur (conserver à 4 °C à l'abri de la lumière)

Deuxième cas : si l'on doit utiliser un flacon de marqueur dans plus de 30 jours→ ajouter la même quantité de marqueur et de DTT (100 µl de chaque)

Procédure de dosage

Numéroter 16 tubes pour l'établissement de la courbe d'étalonnage. À partir du numéro 17, numéroter 2 tubes supplémentaires pour chaque échantillon

Ajouter les étalons (A à F) et les échantillons conformément aux indications données par le tableau suivant :

Tubes	1,2	3,4	5,6	7,8	9,10	11,12	13,14	15,16	échantillons
Étalons ou éch. (µl)		200A	200A	200B	200C	200D	200E	200F	200

Ajouter 200 µl de solution active de marquage/DTT dans chaque tube y compris les tubes 1 et

Agiter les tubes au vortex

Incuber à température ambiante (≈ 21 °C) pendant 15 minutes

Ajouter 100 µl de réactif d'extraction aux tubes 3 à 16 et aux tubes contenant les échantillons. Agiter les tubes au vortex

Incuber à température ambiante pendant 10 minutes

Bien agiter le flacon de réactif neutre et ajouter 1ml de ce réactif dans les tubes 3 et 4.

Bien agiter le flacon de réactif de liaison et ajouter 1ml de ce réactif dans les tubes de 5 à 16 et dans les tubes contenant les échantillons. Agiter les tubes au vortex.

Incuber les tubes 3 à 16 et tous les tubes échantillons à T°C pendant 1 heure à partir du dernier ajout de réactif de liaison. Recouvrir les portoir de papier aluminium pour protéger de la lumière

Centrifuger les tubes 3 à 16 et les échantillons à 1000g pendant 10 minutes (4 °C)

Décanter avec précaution et jeter le surnageant. Retirer la dernière goutte en posant les tubes sur du papier absorbant

Si le compteur possède 2 canaux (cas du compteur gamma utilisé dans notre étude est de type COBRA-IITM auto gamma (Packard) ou plus, il convient de l'étalonner pour compter l'Iode 125 dans un canal et le Cobalt 57 dans un autre. Par contre, si le compteur n'a qu'un seul canal, il faut l'étalonner de façon à ce que les différents réglages du compteur permettent de compter un seul isotope à la fois; dans ce cas, il faudra passer les tubes 2 fois : la première fois, le compteur étant réglé pour l'Iode 125, on obtiendra les résultats des folates de l'échantillon, et la seconde fois, le compteur étant réglé pour le Cobalt 57, on obtiendra les résultats des cobalamines de l'échantillon

Compter la radioactivité dans les culots des tubes et dans les tubes 1 et 2, l'un après l'autre à l'aide d'un compteur gamma (le nombre de coups total par minutes pour les tubes 1 et 2 doit se situer entre 10000 et 25000 pour le Cobalt 57 et entre 15000 et 35000 pour l'iode 125, en fonction de l'appareil et de l'âge du marqueur.

Calcul des résultats

La courbe et les résultats pour la vitamine B₁₂ sont calculés à partir des résultats obtenus par comptage du Cobalt 57 et pour les folates, ils sont calculés à partir des résultats obtenus par comptage de l'Iode 125

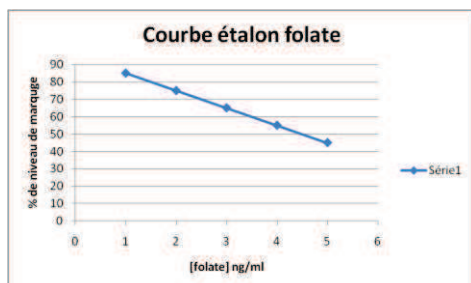
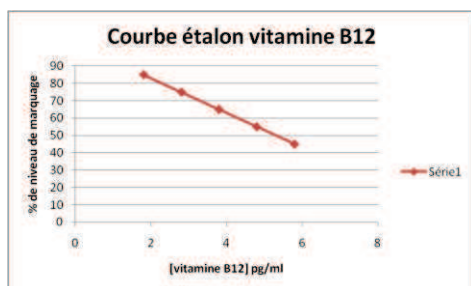
Faire la moyenne des mesures des tubes 3 et 4 (tubes «neutres») et soustraire cette valeur de toutes les autres mesures pour obtenir des valeurs corrigées

Faire la moyenne des mesures corrigées des tubes 1 et 2 pour obtenir le nombre de coups total corrigé pour chaque dosage

Diviser la moyenne des mesures corrigées des tubes 5 et 6 par le nombre de coups total corrigé de façon à obtenir le coefficient de niveau de marquage B₀ (ce coefficient ne doit pas dépasser 36 %)

Diviser les mesures corrigées de chaque tube par la moyenne corrigée des tubes 5 et 6 pour obtenir le pourcentage de niveau de marquage de chaque tube.

Tracer une courbe d'étalonnage : en abscisse la concentration des étalons de vitamine B₁₂ en pg/ml et la concentration des étalons de folates en ng/ml et en ordonnée le pourcentage de niveau de marquage (B₁₂ ou folates)/B₀



La concentration de la vitamine B₁₂ ou en folates dans la plasma est déterminée par extrapolation à partir de la courbe étalon donnant le pourcentage de niveau de marquage par rapport à la valeur en pg/ml de vitamine B₁₂ ou la valeur en ng/ml de folates.

Marqueur Vitamine B₁₂/Folates SimulTrac-SNB : contient moins de 1,5 µCi (55,5kBq) de complexe Cobalt 57/vitamine B₁₂ et moins de 3 µCi (111kBq) de complexe Iode 125/folates (conserver à 4 °C à l'abri de la lumière)

Solution de Dithiothréitol SimulTrac-SNB (conserver à 4 °C)

Étalons A-F de vitamine B₁₂/folates SimulTrac-SNB : la vitamine B₁₂ et les folates sont dilués dans de la sérumalbumine humaine, du chlorure de sodium et des agents stabilisateur et de conservation

Étalon	Concentration Vitamine B ₁₂		Concentration folates	
	pg/ml	pmol/l	ng/ml	Nmol/l
A	0	0	0	0
B	100	74	1	2.3
C	200	148	2	4.5
D	400	296	4	9.1
E	1000	740	10	23
F	2000	1480	20	45

Fiche technique 3. Microdissection de la tumeur au cryostat et coloration des lames

Toutes les microdissections ont été réalisées au Centre des Ressources Biologiques (CRB) du Professeur Jean-Michel Vignaud à l'hôpital central de Nancy

Préparer eau, alcool, tube Eppendorff et lames

Sortir l'échantillon à couper du congélateur et le déposer dans le cryostat réglé à -30 °C

Désinfecter lames et pinces avec de l'éthanol pur et sortir le tissu à l'aide d'une pince

Déposer de l'eau sur les plots et y mettre l'échantillon à couper avant que l'eau ne gèle complètement

Placer le plot avec l'échantillon sur le microtome et le régler à 5 microns

Jeter les premières coupes puis recouper doucement la partie blanche correspondant à la tumeur

Récupérer l'échantillon sur une lame et la plonger directement dans de l'éthanol pendant 1 min pour fixer celui-ci et le rincer ensuite à l'eau

Colorer la lame avec de l'hématoxyline (violet) pendant 1 min, puis rincer à l'eau

Colorer à nouveau la lame avec l'éosine (orange) pendant 30 sec à 1 min, puis la déshydrater dans l'éthanol 95° et la passer dans le toluène

Montage de l'Eukitt et recouvrement par une lamelle

Observation de la lame au microscope

Élimination si possible des zones nécrosées, suivie d'un réglage du microtome sur 10 µm puis coupure définitive dans la tumeur (environ 100 coups de manivelle)

Récupérer le reste du tissu sur le plot. Attention : avant de retirer l'échantillon il faut impérativement bloquer la manivelle !!!

Congélations des tubes pour extraction ultérieure d'ADN

Fiche technique 4. Extraction d'ADN génomique du sang avec le kit Bacc Nucleon®

Protocole pour 1 à 5 ml de sang total

Faire la dilution du réactif A au 1/4 : 300ml d'H₂O milliQ + 100ml de réactif A

Mettre dans un falcon → de 50 ml (si 2 à 5 ml de sang) → de 15 ml (si 1 à 2 ml de sang)

LYSE DES GLOBULES ROUGES

Ajouter 4 volumes de réactif A dilué ¼

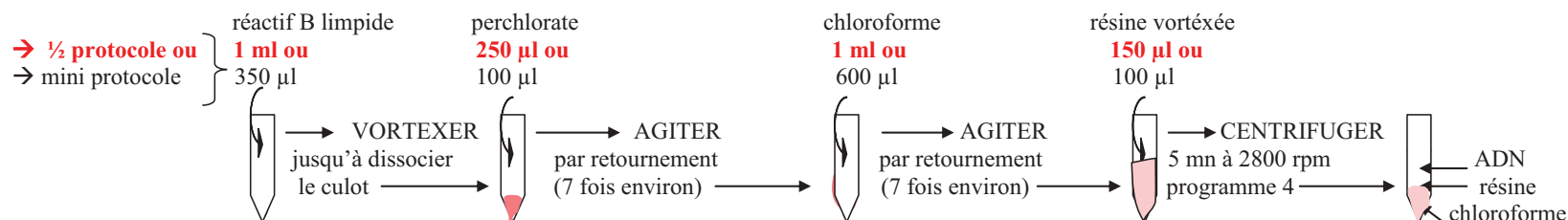
ajouter 1 ml de réactif A



DESTRUCTION DES MEMBRANES DES GLOBULES BLANCS

ELIMINATION DES PROTEINES

en fonction du culot faire un ½ protocole (quantité de sang total entre 1ml et 7ml) ou un mini protocole (quantité de sang total inférieure 1ml)



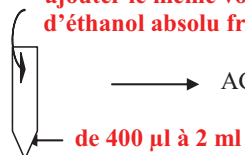
RECUPERATION DE L'ADN

SOLUBILISATION DE L'ADN EXTRAIT

Dans un autre falcon de 15 ml

→ RECUPERATION de la phase supérieure à la résine (ADN)

ajouter le même volume d'éthanol absolu froid (à -20°C)



AGITER

RECUPERATION du filament avec une tige en plastic

filament d'ADN

dans un gros eppendorf

ajouter du TE Buffer 1X (de 50 µl à 600µl selon la pelote d'ADN)

AGITER 2H sur la plaque tournante

La lyse des globules rouges est faite par addition à 1 volume de sang de 4 volumes de réactif A. Le mélange est laissé pendant 4 min à température ambiante suivi d'une étape de centrifugation à 2800 rpm pendant 5 min. Le surnageant est jeté. 1 ml de réactif A est ajouté au culot et les tubes sont placés dans un bain de glace pendant 5 min suivi d'une nouvelle centrifugation de 5 min à 2800 rpm. Le surnageant est à nouveau jeté et le culot est gardé.

En fonction du volume de sang de départ, ajouter 1 ml ou 350 µl de réactif B (sert à détruire la membrane des globules blancs) et vortexer jusqu'à dissolution totale du culot. Rajouter 250 µl ou 100 µL de perchlorate et agiter par retournement au moins 7 fois.

L'élimination des protéines est réalisée par ajout de 600 µl à 1 mL de chloroforme au mélange, puis 150 µL de résine suivi d'une centrifugation pendant 3 min à 2800 rpm.

La phase supérieure à la résine contenant l'ADN est récupérée. Ensuite, 2,5 volumes d'éthanol absolu froid sont ajoutés au volume de la phase aqueuse recueillie. Après précipitation de l'ADN, le filament est récupéré dans un tube Eppendorf®, lorsque celui-ci est visible. Dans le cas échéant, une centrifugation du mélange est faite. L'ADN obtenu est dissout dans du tampon TE1X.

Fiche technique 5. Protocole d'extraction d'ADN à partir de tissus frais ou congelés

(Protocole Qiagen - Réf. kit 51306)

Remarques :

- Amener l'échantillon à température ambiante (15 à 25 °C)
- Préchauffer deux bain-marie ou blocs chauffants : l'un à 56 °C pour l'étape 2, l'autre à 70 °C pour l'étape 3
- Amener le tampon AE ou l'eau à température ambiante pour l'élution à l'étape 8
- S'assurer que le tampon AW1, le tampon AW2, et la protéase Qiagen ont bien été préparés selon les instructions du kit Qiagen
- Si nécessaire, dissoudre les précipités présents dans le tampon AL en l'incubant à 56 °C
- Les centrifugations seront réalisées à température ambiante
- Éviter les cycles de congélation/décongélation successifs des échantillons qui risquent de dégrader l'ADN.

Pour la procédure QIAmp il n'est pas obligatoire de broyer mécaniquement les échantillons de tissus. Cependant le temps de lyse sera réduit si l'échantillon est préalablement broyé dans l'azote liquide ou homogénéisé mécaniquement.

Azote liquide :

Transférer la poudre provenant de 25 mg de tissu dans un microtube de 1,5 ml et y rajouter 180 µL de tampon ATL. Poursuivre par l'étape 2 de ce protocole.

Homogénéisateur mécanique (par exemple Ultra Turrax®, Polytron®) :

Mettre 25 mg de tissu dans un tube de 1,5 ml contenant tout au plus 80 µL de PBS. Homogénéiser l'échantillon, ajouter 100 µL de tampon ATL et poursuivre par l'étape 2 de ce protocole. Dans ce cas, il est recommandé de broyer dans l'azote liquide. Les échantillons ne peuvent pas être homogénéisés directement dans le tampon ATL, celui-ci contenant des détergents.

- 1- Couper 25 mg maximum de tissu en petits morceaux, les transférer dans un microtube de 1,5 ml et y rajouter 180 µL de tampon ATL.

Il est important de couper le tissu en petits morceaux afin de réduire le temps de lyse. Les rendements en ADN dépendent du volume de tampon et du type de tissu traité. 1 mg de tissu donnera généralement 0,2 à 1,2 µg d'ADN. L'utilisation de microtubes de 2 ml pour cette étape accélérera la lyse.

Pour l'ADN, si possible, travailler à partir de coupes congelées (on vérifie plus facilement ainsi la cellularité de la tumeur que l'on extrait) : 4x40 µm pour la tumeur, 6x40 µm pour le tissu sain avec des concentrations finales de 25 – 150 ng/µL

- 2- Ajouter 20 µL de Protéinase K, mélanger en vortexant puis incubé à 56 °C jusqu'à ce que tout le tissu soit légèrement lysé. Vortexer de temps à autre pendant l'incubation afin de dissoudre les agrégats dans l'échantillon ou le placer dans un bain-marie à agitation ou sur un système équivalent.

Remarque : Il est indispensable d'utiliser la Protéinase K. La Protéase Qiagen a une activité réduite en présence du tampon ATL.

La durée de la lyse varie selon le type de tissu traité. Elle est généralement complète après 1 à 3 h. Il est possible de la prolonger toute une nuit sans que la préparation en soit affectée. Afin d'assurer une lyse efficace, il est préférable d'utiliser un bain-marie à agitation ou un système équivalent. Si cela n'est pas possible, il est recommandé de vortexer 2 à 3 fois par heure pendant le temps d'incubation.

- 3- Centrifuger brièvement le tube de 1,5 ml pour récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon. Continuer à l'étape 3a, ou si vous souhaitez de l'ADN génomique exempt d'ARN à l'étape 3b.

- 3a- Ajouter 200 µL de tampon AL à l'échantillon, mélanger 15 secs en vortexant puis incubé 10 min à 70 °C. Centrifuger brièvement le tube de 1,5 ml pour récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon.

Il est important de mélanger vigoureusement l'échantillon et le tampon AL afin d'obtenir une solution homogène.

Un précipité blanc peut se former après addition du tampon AL. Il se dissout la plupart du temps pendant l'incubation à 70 °C. Ce précipité n'affecte pas la procédure QIAmp ou les applications en aval.

OU

3b- Ajouter d'abord 4 µL de RNase A (100 mg/ml) à l'échantillon, mélanger 15sec en vortexant puis incuber 2min à température ambiante. Centrifuger brièvement le tube de 1,5 ml pour récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon avant d'ajouter 200 µL de tampon AL à l'échantillon. Mélanger de nouveau 15sec en vortexant puis incuber 10min à 70 °C. Centrifuger brièvement le tube de 1,5 ml pour récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon.

Il est important de mélanger vigoureusement l'échantillon et le tampon AL afin d'obtenir une solution homogène.

Un précipité blanc peut se former après addition du tampon AL. Il se dissout la plupart du temps pendant l'incubation à 70 °C. Ce précipité n'affecte pas la procédure QIAmp ou les applications en aval.

- 4- Ajouter 200 µL d'éthanol (96 à 100 %) à l'échantillon et mélanger 15sec en vortexant. Après homogénéisation, centrifuger brièvement le tube de 1.5 ml afin de récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon.

Il est important de mélanger vigoureusement l'échantillon et le tampon AL afin d'obtenir une solution homogène.

Un précipité blanc peut se former après addition de l'éthanol. Il est important de déposer tout le précipité sur la colonne QIAmp. Le précipité n'affecte pas la procédure QIAmp ou les applications en aval.

Ne pas utiliser d'autres alcools que de l'éthanol car le rendement en ADN risque d'être réduit.

- 5- Déposer le mélange obtenu à l'étape 4 (y compris le précipité) dans la colonne QIAmp (placée dans un tube collecteur de 2 ml) sans en mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger 1 min à 6000 g (8000 rpm). Transférer la colonne QIAmp dans un tube collecteur de 2 ml (fourni) et jeter le tube contenant l'effluent.

Fermer chaque colonne afin d'éviter que des aérosols se forment pendant la centrifugation.

Il est important de transférer la totalité du précipité sur la colonne QIAmp.

Si la solution n'est pas complètement passée à travers la membrane, centrifuger à vitesse élevée jusqu'à ce que la totalité de la solution soit passée.

- 6- Ouvrir la colonne QIAmp avec précaution et déposer 500 µL de tampon AW1 sans mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger 1 min à 6000 g (8000 rpm). Transférer

la colonne QIAmp dans un nouveau tube collecteur de 2 ml (fourni) et jeter le tube contenant l'effluent.

Il n'est pas nécessaire d'ajuster la quantité du tampon AW1 même si le volume d'origine de l'échantillon est supérieur à 25 mg (180 µL).

- 7- Ouvrir la colonne QIAmp et ajouter 500 µL de tampon AW2 sans en mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger 3min à vitesse maximale (20000 g ; 14000 rpm). Continuer directement à l'étape 8 ou, afin d'éliminer tout risque de récupération du tampon AW2, suivre l'étape 7a, puis l'étape 8.
- 7a- Transférer la colonne QIAmp dans un nouveau tube collecteur de 2 ml (non fourni), et jeter l'ancien tube collecteur contenant l'effluent. Centrifuger 1min à 20000 g (14000 rpm).
- 8- Transférer la colonne QIAmp dans un microtube de 1,5 ml (non fourni). Jeter l'ancien tube collecteur contenant l'effluent. Ouvrir délicatement la colonne QIAmp et déposer 200 µL de tampon AE ou d'eau distillée. Incuber 5 min à température ambiante et centrifuger ensuite 1min à 6000 g (8000 rpm).
- 9- Répéter l'étape 8.

Une incubation de 5min après avoir déposé le tampon AE sur la colonne QIAmp et avant la prochaine étape de centrifugation permet en général d'accroître le rendement en ADN.

Une deuxième étape d'élution avec à nouveau 200 µL de tampon AE accroît le rendement de 15 %.

Il est déconseillé d'éluer avec plus de 200 µL dans un tube de 1,5 ml car l'éluât peut toucher la colonne. Ceci pourrait entraîner la formation d'aérosols au cours de la centrifugation.

L'élution avec des volumes inférieurs à 200 µL augmente la concentration finale d'ADN dans l'éluât de façon significative, mais réduit légèrement le rendement total. Une élution avec 4 x 100 µL au lieu de 2 x 200 µL n'améliore pas l'efficacité de cette étape.

Pour une conservation de l'ADN sur une longue durée, il est recommandé de l'éluer dans du tampon AE et de le conserver à -20 °C. L'ADN conservé dans de l'eau est sujet à une hydrolyse acide.

Fiche technique 6 Détermination simultanée du niveau global de m⁵dC, de l'uracile et de la 8-oxodG dans l'ADN génomique par LC-MS/MS

6.1. Principe

Séparation par polarité, dans un premier temps, des bases A, T, C, G, U, 5mC et de la 8-oxodG sur une colonne de chromatographie (ACQUITY UPLC, HSST3 1.8 µm, Waters) suivie de leur détection par spectrométrie de masse en tandem en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring).

La quantification des bases se fait au moyen d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations bien connues de chacune des bases pures (Sigma Aldrich).

6.2. Réactifs

6.2.1. Nucléosides (standards)

2'-Déoxyadénosine monohydrate (Sigma-Aldrich, 30920)

2'-Déoxycytidine hydrate (Sigma-Aldrich, 31007)

2-déoxyguanosine monohydrate (Sigma-Aldrich, 31070)

Thymidine (Sigma-Aldrich, 89270)

2-déoxyuridine (Sigma-Aldrich, D5412)

5-méthylcytosine (TCI Europe, D3610)

6.2.2. Enzymes

RNase A (Sigma-Aldrich, R6513)

Nucléase P1 (Sigma-Aldrich, N8630)

Phosphodiesterase I (Sigma-Aldrich, P3134)

Phosphatase alcaline (Sigma-Aldrich, P4978)

6.2.3. Préparation des standards

Des solutions stocks de 1 mM de chaque standard sont préparés dans du DTT 10 mM et des aliquots de 100 µL sont faits et congelés à -20 °C. Un aliquot de chaque analyte est utilisé lors de la préparation de la gamme.

6.2.3. Préparation des enzymes

La nucléase P1 est préparée dans une solution d'acétate d'ammonium 0,3M, pH 5 à 2 U/µL

La phosphodiesterase I est préparée dans de l'eau pure à 0,002 U/µL

La phosphatase alcaline est diluée à 0.1 U/µL dans du tampon CIP1x (fourni par SIGMA sous forme concentrée 10X)

6.3. Mode opératoire

6.3.1. Hydrolyse enzymatique de l'ADN purifié

Dénaturation de 2 µg d'ADN par chauffage à 100 °C pendant 3 min.

NB : La solution mère d'ADN correspondant aux 2 µg est reprise dans l'eau ultra pure.

Refroidissement brutal des tubes dans de la glace

Ajouter 2 unités de nucléase P1

Vortexer et centrifuger brièvement le mélange et l'incubé pendant 2H à 45 °C

Ajouter 0.002 Unités de phosphodiesterase I

Vortexer et centrifuger brièvement puis poursuivre l'incubation pendant 2H à 37 °C

Ajouter 0.5 unités de phosphatase alcaline et poursuivre l'incubation à 37 °C pendant 1H.

Ajouter du DTT à une concentration finale de 10 mM à l'hydrolysate

Filtration, avant analyse, du milieu de digestion à l'aide de plaques de filtration (Pall Corporation, PN 5034, AcroPrep 96-well Filter Plates, 350 µL, 10K).

Congeler à -20 °C les plaques jusqu'à l'analyse

6.3.2. Étapes UPLC et MS/MS

6.3.2.1. Conditions UPLC Acquity Waters

Le débit de la phase mobile est 0.27ml/min

Solvant A : eau + 0.1 % acide formique et solvant B : méthanol + 0.1 % acide formique

L'élution est faite avec un gradient contenant 79 % A et 21 % B sur 6.5 min

Injection de 3 µL en « partiel loop » dans une boucle de 10 µL

Le lavage se fait avec 800 µL de weak (H₂O+AF 0.1 %)/200 µL strong (MeOH 100 % + 0.1 % AF). La température de la colonne est maintenue à 35 °C

6.3.2.2. Conditions MS/MS

Température de la source : 305 °C

Curtain gaz : 15

GS1 : 22 ; GS2 : 32

Mode : Positif ;

Scan : Multiple Reaction Monitoring (MRM)

6.3.3. Transitions retenues, temps de rétention et limites de détection par analyte

Analytes	Q1/Q3	LD en CPS	LQ en CPS	LD en pM	LQ en pM	RT
dC	228/112	72	240	57	190	0.93
m ⁵ dC	242/126	33	110	13.6	45	1.43
dU	229/113	78	260	370	1250	1.87
dA	252/136	840	2700	1800	6100	2.29
dG	268/152	144	480	340	1130	2.86
dT	243/127	222	740	2060	6900	4.19
8-oxodG	284/168	16.2	54	46	150	4.70

Note. LD : limite de détection ; RT : temps de rétention ; LQ : limite de quantification

6.4. Exploitation des résultats

Détermination des concentrations des différents analytes des échantillons analysés par rapport à la gamme de standards de concentrations connues à partir d'une courbe d'étalonnage pour chaque analyte.

Le rapport $m^5dC/(m^5dC + dC) \times 100$ permet d'apprécier le % de cytosine méthylé dans le DNA

Le rapport dU/dT permet d'apprécier l'erreur d'incorporation de U au lieu de T

6.5. Validation des résultats

Un pool d'ADN hydrolysés en parallèle (dans chaque série d'analyse) avec les échantillons analysés sert de contrôle pour la validation des résultats. Les valeurs de chaque analyte sont calculés afin d'apprécier la répétabilité et la reproductibilité.

Fiche technique 7. Génotypage avec la technologie GoldenGate

7.1. Étape 1 : Dosage d'ADN au Picogreen

La détection et la quantification de faibles quantités d'ADN est d'une importance capitale pour de nombreuses applications en biologie.

La technique la plus couramment utilisée pour mesurer la concentration des acides nucléiques repose sur la détermination de l'absorbance à 260 nm (A₂₆₀). Les principaux inconvénients de cette méthode sont la forte contribution relative des nucléotides et des acides nucléiques simples brins à l'intensité du signal, l'interférence causée par des contaminants couramment trouvés dans les solutions d'acides nucléiques, l'incapacité à distinguer l'ADN de l'ARN.

La plupart de ces difficultés peuvent être contournées en utilisant le kit Quanti-iT™ PicoGreen dsDNA reagent, qui est un colorant fluorescent ultrasensible ne permettant qu'une quantification d'ADN double brin en solution. Cette méthode de dosage n'entraîne pas une élévation de la fluorescence en présence de protéines, et permet une détection et quantification de faibles quantités d'ADN (de l'ordre de 25 pg/mL).

Dans notre étude, tout ADN dosé par une méthode d'absorbance est à nouveau dosé par fluorimétrie au niveau de la plateforme Illumina.

Tous les échantillons d'ADN sont normalisés à une concentration de 50 ng/μL.

Protocole expérimental

-Dilution des solutions d'ADN au 1/40ème dans du TE 1x

-Diluer le PicoGreen au 1/200ème avec du tampon TE

-2μL d'ADN au 1/40ème dans 195μL de picogreen au 1/200ème

-La gamme est réalisé avec de l'ADN lambda, dont les concentrations sont:

75 ng/μL; 50 ng/μL; 25 ng/μL; 12,5 ng/μL; 6,25 ng/μL; 3,125 ng/μL; 1,562 ng/μL et 0 ng/μL

-agitation puis centrifugation de la plaque puis lecture sur le VICTOR

7.2. Étape 2 : Préparation des plaques de dilution

7.3. Étape 3 : Préparation SUD Plaque

But : Fixation de la biotine à l'ADNg :

L'ADNg est ajouté au réactif de biotinylation (MS1) et incubé 30 min à 95 °C.

Temps de la manipulation : ~ 15 min

Temps d'incubation : 30 min

Mode opératoire :

Mettre 5 μL de réactif MS1 dans chacun des puits de la plaque SUD.

Utiliser une pipette 8 canaux pour transférer 5 µl des ADNg normalisés dans chacun des puits de la plaque SUD.  Changer de pointes à chaque colonne.

Appliquer une feuille «Thermo Seal» sur la plaque SUD et procéder au scellage.

Centrifuger la plaque SUD à Vmax (Beckmann +Rotor S2096) - pulse -

Vortexer à 2300 rpm pendant 20 secs (Microplate Shaker)

Centrifuger la plaque SUD à Vmax (Beckmann +Rotor S2096) - pulse -

Placer la plaque SUD sur le block préchauffé - incubation 30 min à 95 °C-

Incuber la plaque SUD à 95 °C pour exactement 30 min

Centrifuger la plaque SUD à Vmax (Beckmann +Rotor S2096) - pulse -

Si l'étape de préparation de la plaque ASE (étape 6) est prévue le même jour, préchauffer le block à 70 °C.

Passer à l'étape de précipitation de la plaque SUD (étape 4)



Vérifier après incubation les volumes dans les puits.

7.4. Étape 4- Précipitation de la plaque SUD

But : Précipitation de l'ADNg biotinylé par ajout de réactif PS1 et de 2-propanol. Permet d'éliminer l'excès de réactif MS1.

Temps de la manipulation : ~ 40 min

Séchage de la plaque : 15 min

Mode opératoire :

Enlever le thermo film de la plaque SUD

Ajouter 5 µL de réactif PS1 dans chacun des puits de la plaque SUD

Recouvrir la plaque d'un film adhésif transparent

Centrifuger la plaque SUD à Vmax 10 °C (Beckmann +Rotor S2096) - pulse -

Vortexer à 2300 rpm pendant 20 secs (Microplate Shaker)

Enlever le film adhésif et ajouter 15 µL de 2-propanol chacun des puits de la plaque SUD

Recouvrir la plaque d'un film adhésif transparent

Vortexer à 1600 rpm pendant 20 sec (Microplate Shaker) ou jusqu'à obtenir une coloration uniformément bleue

Centrifuger la plaque à 3000 g 30 min 10 °C. Un culot bleu doit être présent dans chaque puits.



Il est important de procéder rapidement à l'étape suivante pour éviter la dissolution du culot. Si un problème de temps se produit pour réaliser l'étape suivante ; centrifuger à nouveau 10 min à 3000 g.

Élever le film transparent et retourner la plaque sur un papier absorbant, placer l'ensemble sur le rotor.



Régler la vitesse sur 8g, lancer la centrifugeuse, STOPPER la centrifugation dès que les 8 g sont atteints.

Remettre la plaque à l'endroit et sécher la plaque 15 min à température ambiante ou sous une hotte.--> Pendant cette étape préparer la plaque ASE (étape 6)

À cette étape il est possible :

de procéder à la remise en suspension des culots de la plaque SUD

de recouvrir la plaque d'un film adhésif et stocker à -20 °C jusqu'à 24 h.

7.5. Étape 5 : Remise en suspension de la plaque sud

But : Remise en suspension de l'ADN biotinylé dans réactif RS1. Le temps de la manipulation environ 15 min

Mode opératoire :

Ajouter 10 µL de réactif RS1 dans chacun des puits de la plaque SUD

Recouvrir la plaque d'un film adhésif transparent

Centrifuger la plaque SUD à Vmax (Beckmann + Rotor S2096) - pulse -

Vortexer à 2300 rpm pendant 1 min (Microplate Shaker) ou jusqu'à dissolution complète du culot bleu. À cette étape il est possible : (1) de procéder à l'étape 6 ou (2) de stocker la plaque SUD à 4 °C pour une nuit ou à -20 °C pour 1 mois.

7.6. Étape 6 : Préparation de la plaque ASE

But : Lors de cette étape, sont mis en présence dans la plaque ASE (Allele Specific Extension) : L'ADNg biotinylé (provenant de la plaque SUD), les oligos correspondant spécifiquement aux SNPs et les particules paramagnétiques.

La plaque ASE est placée sur le block à 70 °C qui est progressivement refroidi à 30 °C (environ 2 heures). Pendant cette période, les logos vont s'hybrider avec l'échantillon d'ADN bitonale. Dans le même temps, l'ADN sera capturé par les particules paramagnétiques.

Lieu : Salle PCR n° 272. Le temps de la manipulation : ~ 20 min

Incubation : 2-16 heures.

Mode opératoire :

Centrifuger la plaque SUD à Vmax (Beckmann +Rotor S2096) - pulse -

Ajouter 10 μ L de réactif OPA dans chacun des puits de la plaque ASE

Ajouter 30 μ L de réactif OB1 dans chacun des puits de la plaque ASE

Retirer doucement la feuille la feuille d'aluminium de la plaque SUD

Transférer 10 μ L (volume totale) de chacun des échantillons biotinylé de la plaque SUD vers la plaque ASE

Appliquer une feuille «Thermo Seal» sur la plaque ASE et procéder au scellage (3 sec)

Centrifuger la plaque ASE à Vmax (Beckmann +Rotor S2096) - pulse -

Vortexer à 1600 rpm pendant 1 min (Microplate Shaker) ou jusqu'à remettre complètement en suspension t les billes.

Placer la plaque ASE sur le block chauffant à 70 °C et fermer le couvercle

Régler immédiatement la température du block chauffant à 30 °C

Laisser la plaque ASE refroidir jusqu'à 30 °C (environ 2 heures). La plaque peut rester sur le block jusqu'à 16 heures. Passer à l'étape 7

7.7. Étape 7 : Ajout du réactif MEL (mélange permettant l'élongation)

But : A cette étape, les réactifs AM1 et UB1 sont ajoutés à la plaque ASE pour éliminer, par lavages, les oligos non spécifiquement hybridé ainsi que l'excès de ces oligos. Un mélange enzymatique permettant l'extension et la ligature (MEL) est ajouté à chaque échantillon d'ADN. La réaction a lieu à 45 °C.



Pour éviter que les billes ne sèchent, il est nécessaire de travailler rapidement.

Temps de la manipulation : ~ 30 min. Incubation : 15 min

Mode opératoire :

Centrifuger la plaque ASE à Vmax (Beckmann +Rotor S2096) - pulse -

Placer la plaque ASE sur système à barreaux magnétiques jusqu'à complète capture des billes magnétiques (environ 2 min)

Retirer doucement la feuille d'aluminium de la plaque ASE

Retirer et éliminer tout le liquide (50 μ L) de chacun des puits de la plaque en utilisant une pipette multicanaux (changer de pointes entre chaque colonne)



Prendre soin de vérifier avant de rejeter le liquide qu'aucune bille n'a été entraînée par aspiration dans une ou des pointes. Si des billes sont visibles, rejeter le liquide dans les puits d'origines, attendre que les billes soient à nouveau capturées par le barreau magnétique, changer de pointes avant de renouveler l'opération de pipetage

La plaque ASE étant toujours placer sur le système magnétique, ajouter 50 μ L de réactif AM1 dans chacun des puits en utilisant la pipette multicanaux (changer de pointes entre chaque colonne)

Recouvrir la plaque ASE d'un film adhésif transparent

Vortexer la plaque ASE à 1600 rpm pendant 20 sec (Microplate Shaker) ou jusqu'à mise en suspension complète des billes

Placer la plaque ASE sur système à barreaux magnétiques jusqu'à complète capture des billes magnétiques (environ 2 min)

Retirer doucement la feuille transparente de la plaque ASE

Éliminer le réactif AM1 de chacun des puits en utilisant la pipette multicanaux.



Vérifier l'absence de bille dans les pointes après aspiration

Répéter les étapes 6 à 11 une fois

Retirer la plaque ASE du système à barreaux magnétiques

Ajouter 50 μ L de réactif UB1 dans chacun des puits en utilisant la pipette multicanaux

Placer la plaque ASE sur système à barreaux magnétiques jusqu'à complète capture des billes magnétiques (environ 2 min)

Retirer et éliminer tout le liquide (50 μ L) de chacun des puits de la plaque en utilisant une pipette multicanaux (changer de pointes entre chaque colonne)



Vérifier l'absence de bille dans les pointes après aspiration

Répéter les étapes 13 à 16 une fois

Ajouter 37 μ L de réactif MEL dans chacun des puits en utilisant la pipette multicanaux

Recouvrir la plaque ASE d'un film adhésif transparent

Vortexer la plaque ASE à 1600 rpm pendant 1 min (Microplate Shaker) ou jusqu'à mise en suspension complète des billes

Placer la plaque sur le block préchauffé à 45 °C pendant 15 min exactement

Pendant le temps d'incubation préparer la plaque PCR (étape 8)

Procéder à l'étape 9 (Inoc PCR Plate). Laisser la plaque à température ambiante si vous poursuivez immédiatement la réaction ou stocker à 4 °C pour environ 1 heure

7.8. Étape 8 : Préparation de la plaque PCR

But : Ajout des trois réactifs nécessaires à la réaction PCR dans chacun des puits de la plaque PCR :

(1) Master mix, (2) Uracile DNA Glycosylase (optionnel), (3) DNA polymérase

Temps de la manipulation : ~ 15 min

Mode opératoire :

Ajouter 64 μ L d'ADN polymérase au tube MMP

Ajouter 50 μ L d'Uracile DNA Glycosylase au tube MMP

Mélanger le tube par inversion et placer son contenu dans un réservoir

Ajouter 30 μ L du mélange dans chacun des puits de la plaque PCR en utilisant la pipette multicanaux

Recouvrir la plaque PCR d'un film adhésif transparent et la centrifuger à Vmax (Beckmann + Rotor S2096) - pulse -

Procéder à l'étape Inoc PCR Plate (9)

7.9. Étape 9 : Préparation Inoc PCR Plate

Temps de la manipulation : ~ 30 min

Mode opératoire :

Placer la plaque ASE sur système à barreaux magnétiques jusqu'à complète capture des billes magnétiques (environ 2 min)

Retirer doucement la feuille transparente de la plaque ASE

Retirer et éliminer tout le liquide (50 μ L) de chacun des puits de la plaque en utilisant une pipette multicanaux (changer de pointes entre chaque colonne)



Vérifier l'absence de bille dans les pointes après aspiration

Laisser la plaque sur le système magnétique et ajouter 50 μ L de réactif UB1 dans chaque puits de la plaque ASE

Laisser la plaque ASE sur le système magnétique pour environ 2 min

Retirer et éliminer le surnageant (~ 50 μ L) de chacun des puits de la plaque ASE

Retirer la plaque ASE du système magnétique

Ajouter 35 μ L de réactif IP1 dans chacun des puits de la plaque ASE

Recouvrir la plaque PCR d'un film adhésif transparent

Vortexer la plaque ASE à 1800 rpm pendant 1 min (Microplate Shaker) ou jusqu'à mise en suspension complète des billes

Placer la plaque sur le block préchauffé à 95 °C pendant 1 min

Placer la plaque ASE sur système à barreaux magnétiques jusqu'à complète capture des billes magnétiques (environ 2 min)

Utiliser la pipette 8canaux pour transférer 30 µL de surnageant de chacun des puits de la première colonne de la plaque ASE vers la première colonne de la plaque PCR

Répéter l'opération pour chacune des colonnes de la plaque ASE



Changer de pointes entre chaque colonne

Recouvrir la plaque PCR d'un film adhésif transparent

Centrifuger la plaque PCR à Vmax (Beckmann +Rotor S2096) - pulse -

Immédiatement, transférer la plaque PCR sur thermocycleur PCR (iCycler Biorad)

7.10. Étape 10 : Cycle PCR

Durée du cycle PCR : ~ 2 heures 45 minutes

Matériel utilisé : Thermocycleur iCycler Biorad

Mode opératoire :

Placer la plaque PCR recouverte d'un film sur le block PCR, démarrer le programme PCR indiqué dans le tableau suivant.

	Température	Temps
	37 °C	10 min (activation UDG)
	95 °C	3 min
X34	95 °C	35 sec
	56 °C	35 sec
	72 °C	2 min
	72 °C	10 min
	4 °C	5 min

Selon le cas :

Procédez immédiatement à l'étape suivante (étape 11). Conserver la plaque PCR à température ambiante (22 °C) à l'abri de la lumière. La plaque PCR peut être conservée une nuit à -20 °C

7.11. Étape 11 : ajout du réactif MPB à la plaque PCR

BUT : Dans cette étape, le réactif MPB est ajouté à la plaque PCR et la solution est transférée sur une plaque à filtre. La plaque à filtre est incubée à température ambiante pour fixer le brin biotinylé aux particules paramagnétiques, et ainsi immobiliser le produit PCR double brin.

Temps de la manipulation : ~ 30 min. Incubation : 1 heure

Mode opératoire :

Centrifuger la plaque PCR à Vmax (Beckmann +Rotor S2096) - pulse -

Placer de nouveaux embouts sur la pipette 8-canaux

Ajouter 20 μ L de réactif MPB dans chacun des puits de la plaque PCR

Régler la pipette 8 canaux sur 85 μ L (pour laisser de l'espace pour les bulles), mettre de nouveaux embouts.

Mélanger les billes avec les produits PCR sur la plaque en aspirant et refoulant la solution plusieurs fois

Transférer la solution dans la première colonne de la plaque à filtre. Il doit y avoir environ 70 μ L de fluide dans chaque puits

Répéter les étapes 5-6 pour chaque colonne de la plaque PCR. Changer de pointes entre chaque colonne

Recouvrir la plaque à filtre de son couvercle et placer la plaque à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 60 min

Procéder à l'étape 12

7.12. Étape 12 : Préparation de la plaque INT

BUT : Dans cette étape, le produit PCR est lavé sur la plaque à filtre avec le réactif UB2 et le NaOH. Le simple brin, marqué par le fluorophore est ensuite élué dans la plaque INT contenant le réactif MH2.

Temps de la manipulation : ~ 30 min

Mode opératoire :

Placer l'adaptateur à plaque sur une plaque 96 puits à fond en V vide et non marquée (plaque poubelle)

Placer la plaque à filtre contenant le produit PCR fixé sur l'adaptateur

Centrifuger à 1000 g pendant 5 min à 25 °C (Centrifugeuse grande vitesse Beckmann Avanti™ J-25 + Rotor JS-5.9 (Vmax 5900 rpm)

Retirer le couvercle de la plaque à filtre

À l'aide de la pipette 8 canaux + embouts propres, ajouter 50 μ L de réactif UB2 dans chacun des puits de la plaque à filtre. Replacer le couvercle sur la plaque.

Centrifuger à 1000 g pendant 5 min à 25 °C (Centrifugeuse grande vitesse Beckmann Avanti™ J-25 + Rotor JS-5.9 (Vmax 5900 rpm) Salle n° 279)

À l'aide de la pipette 8 canaux + embouts propres, ajouter 30 μ L de réactif MH2 dans chacun des puits de la plaque INT

Remplacer la plaque poubelle par la plaque INT.



Bien orienter les deux plaques : A1 de la plaque à filtre au-dessus de la position A1 de la plaque INT. Mettre de nouveaux embouts sur la 8 canaux

Mettre 30 μ L de NaOH 0,1 N dans chacun des puits de la plaque à filtre

Remettre le couvercle sur la plaque à filtre

Immédiatement, centrifuger à 1000 g pendant 5 min à 25 °C (Centrifugeuse grande vitesse Beckmann AvantiTM J-25 + Rotor JS-5.9 (Vmax 5900 rpm) Salle n° 279)



En fin de centrifugation, aucune bille ne doit être visible dans les puits de la plaque INT

Mélanger doucement le contenu de la plaque INT par un mouvement de vas et vient, sans provoquer de débordement

Couvrir la plaque INT avec son «cap mat» et selon le cas :

procéder à l'étape suivante (étape n°13) ou conserver la plaque INT à -20 °C (pas plus de 1 à 2 jrs)

7.13. Étape 13 : Préparation de la plaque d'hybridation Vera Code

BUT : Cette étape nécessite l'utilisation du «Vera Code Vortex Incubator»

Temps de la manipulation : ~ 20 min. Incubation : 3 heures

Mode opératoire :

Ajouter le réactif de neutralisation MH2 à la plaque INT

Utiliser une pipette sérologique pour transférer 3 mL de réactif MH2 dans un tube conique de 15 mL

Utiliser une pipette sérologique pour transférer 3 mL d' NaOH dans le tube de 15 mL

Mélanger le tube au vortex

Placer le contenu du tube dans un réservoir stérile

À l'aide de la pipette multicanaux, ajouter 50 μ L de réactif MH2+NaOH dans chacun des puits de la plaque INT (agiter la plaque à la main est centrifuger-pulse 100 g Beckmann +Rotor S2096)

Hybridation de la plaque VBP

Retirer la plaque VBP du réfrigérateur et centrifuger la plaque (pulse 100 g Beckmann +Rotor S2096). Si les billes ne se trouvent pas au fond du puits ; centrifuger à nouveau

Retirer très délicatement le «cap mat» de la plaque «Vera Code Bead Plate»

Utiliser la pipette 8 canaux avec de nouvelles pointes, «pipetter» 4-5 fois le contenu de chacune des colonnes de la plaque INT

En utilisant les même pointes, transférer 100 μ L de chaque échantillon de la plaque INT vers les puits correspondant de la plaque «VeraCode Bead Plate»

Recouvrir la plaque du «cap mat»

Placer la plaque «VeraCode Bead Plate» sur le «VeraCode Vortex Incubator». Vous pouvez placer jusqu'à deux plaques sur le vortex

Fermer le couvercle et procéder au démarrage de l'appareil

Poussez le bouton Encoder jusqu'à sélectionner RPM, régler sur 85 (850 rpm)

Poussez le bouton Encoder jusqu'à sélectionner Time. Tourner le bouton au-delà des positions 0,30 ou 99,5 jusqu'à l'apparition de HLD (position à laquelle l'incubateur fonctionne en continu)

Poussez le bouton Encoder jusqu'à sélectionner Température, régler sur 45 (45 °C)

Appuyer sur Start/Stop et incuber pendant 3 heures. Procéder à l'étape 14

7.14. Étape 14 : Lavage de la plaque VBP

But : Dans cette étape, la «VeraCode Bead Plate» est retirée de l'incubateur et lavée deux fois avec le réactif VW1. Temps de la manipulation : ~ 15 min

Mode opératoire :

Arrêter le VeraCode Vortex Incubator. Lorsque l'indicateur de vitesse indique 0, ouvrir le couvercle et retirer la «VeraCode Bead Plate».

Centrifuger la plaque -pulse-(Centrifugeuse de microplaques Beckmann +Rotor S2096)

Retirer le couvercle de la plaque

Utiliser la pipette 8 canaux pour ajouter 200 µl de réactif VW1 dans chacun des puits. S'assurer de bien mélanger le culot de billes.

Doucement, agiter la plaque d'un mouvement circulaire sur la paillasse.

Attendre 2 min que les billes se déposent au fond du puits

Aspirer le surnageant avec la pompe à vide, équipé du manomètre, régler sur 50 mbar

Répéter les étapes 4 à 7 une fois et selon le cas : procéder à l'étape 15 ou recouvrir la plaque d'un film adhésif et stocker la plaque à l'abri de la lumière à température ambiante pour jusqu'à 24h.

7.15. Étape 15 : Lecture de la plaque VBP

But : Le BeadXpress Reader utilise une lumière laser pour exciter les fluorophores Cy3 et Cy5 présent sur les produits PCR simple brin fixés aux billes VeraCode. La lumière émise par les fluorophores est mesurée et enregistrée par le système. Lieu : Salle post-PCR n° 276

Temps de lecture : 80 échantillons/heure pour un plex de 96 SNP

27 échantillons/heure pour un plex de 384 SNP

Préparation des fichiers informatiques :

Préparer les fichiers contenant les informations concernant les échantillons (sample sheets)

Fiche technique 8. Purification des produits PCR

L'amplification des échantillons à purifier a été réalisée sur un volume final de 50 µl

Les produits PCR sont contrôlés sur agarose (10 µl de produit PCR sur un gel d'agarose à 1,5 % (voir procédure «électrophorèse sur gel d'agarose»).

Placer une colonne Qiaquick portant le numéro de l'échantillon sur un tube collecteur propre de 2 ml.

Prélever dans un micro-tube de 0,65 ml, 25 µl de produit PCR

Ajouter 125 µl de buffer PB (soit 5 volumes de PB pour un volume de produit PCR). Avec la pipette, mélanger délicatement le mélange

Déposer l'échantillon au sommet de la colonne. Centrifuger 60 sec. à 13.000 rpm ; l'ADN est fixé sur la colonne.

Jeter l'éluat du tube collecteur. Replacer la colonne sur le même tube collecteur.

Ajouter 750 µl de tampon PE au sommet de la colonne. Centrifuger 1 min 45 à 13.000 rpm

Jeter l'éluat. Replacer la colonne sur le même tube collecteur.

Centrifuger 2 min 15 à 13.000 rpm pour éliminer tout le tampon d'élution résiduel l'ADN est lavé et fixé sur la colonne

Placer la colonne Qiaquick sur un micro-tube de 1,5 ml propre et portant le numéro de l'échantillon

Ajouter 35 µl d'eau stérile MilliQ au centre de la colonne pour éluer l'ADN. Attendre 1min et Centrifuger 30sec à 13.000 rpm

Remarques : On peut augmenter le volume d'ADN purifié en ajoutant 30 µl stérile au centre de la colonne. Attendre 1 min. Centrifuger 1 min. à 13.000 rpm. On peut utiliser le tampon EB ou l'eau stérile MilliQ. Jeter la colonne

Garder 10 µl d'ADN élué pour la quantification et congeler le restant pour la réaction de séquençage.

Fiche technique 9. Réaction de séquençage

La préparation de la réaction de séquençage se fait dans de la glace pillée comme suit :

Prendre un bac à glace et le remplir de glace pillée ; poser le portoir réfrigéré sur la glace

Sur un portoir réfrigéré, placer des micro-tubes de 0,2 ml. Faire un tube pour l'amorce sens, un autre tube pour l'amorce anti sens

Dans des micro-tubes de 0,2 ml, aliquoter le Ready reaction Mix

Préparer le mix de la réaction comme indiqué dans le tableau ci-dessous

Mettre dans chaque tube 3 µl du mélange suivant :

		X (nb tubes + 1)	Conc. finale
Ready reaction Mix (Big Dye Seq RR-100) (µl)	2		
Buffer(Big Dye Seq Buffer) (µl)	1		

Ajouter dans chaque tube :

		Conc. finale
Amorce à 3,2 pmol/µl Sens ou Anti-sens (µl)	1	1,6 pmol
Produit purifié (µl)	1 à 6 (selon la quantification)	3 à 20 ng
H2O mQ (µl)	De 5 µl si pté produit purifié = 1 µl à 0 µl si pté produit purifié = 6 µl	

Volume total : 10 µL

Vortexer doucement les micro-tubes et les centrifuger brièvement

Placer les micro-tubes dans le thermocycleur et démarrer la réaction de séquençage suivant le programme dans le tableau ci-dessous

Condition de la PCR

Dénaturation initiale	96 °C	1 min

PCR : 25 cycles de :

Dénaturation	96 °C	10 sec
Hybridation	50 °C	5 sec
Élongation	60 °C	4 min

NB : La réaction terminée, démarrer immédiatement la purification par précipitation des sels des produits de séquençage

Fiche technique 10. Préparation de la plaque G 50

Retourner la plaque MultiScreen HV. Coller un film aluminium autocollant en dessous de la plaque Multiscreen de façon à bien protéger la membrane de chaque puits.

Déposer de la résine Sephadex® G 50 dans chaque puits du chargeur de colonne,

Retirer l'excès de résine sur le chargeur de colonne avec la raclette et récupérer l'excès de résine dans le pot stock,

Placer la plaque MultiScreen HV à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir et retourner l'ensemble,

Taper légèrement sur le chargeur pour évacuer la résine vers la plaque.

Ajouter 300 µl d'eau mQ dans chaque puits contenant de la résine.

Coller un film aluminium autocollant au-dessus de la plaque Multiscreen.

Fermer la plaque MultiScreen HV avec son couvercle et laisser incuber 3 heures à 4 °C.

Les plaques MultiScreen HV contenant de la résine Sephadex® G 50 imbibée d'eau peuvent être stockées à 4 °C pendant 2 semaines.

Tassement de la colonne avant la première utilisation de la plaque G50

Les puits qui ne vont pas être utilisés restent masqués avec le film aluminium.

Enlever le film aluminium au-dessus des puits qui vont être utilisés, puis sans retourner la plaque Multiscreen, enlever le film aluminium sous les puits qui vont être utilisés.

Placer la plaque de filtration Multiscreen HV sur la plaque de récupération de 350 µL.

Équilibrer avec une plaque usagée et une plaque de récupération et centrifuger le montage à 910 g pendant 5 min (prog 2).

Vider la plaque de récupération et la conserver pour les prochaines plaques.

Liste des publications

1. Oussalah A, Besseau C, Chery C, Jeannesson E, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Bosco P, Elia M, Romano A, Bronowicki JP, Gerard P, Paoli J, **Avogbe PH.**, Chabi N, Sanni A, Amouzou E, Peyrin-Biroulet L and Guéant JL Helicobacter pylori serological status has no influence on the association between fucosyltransferase (FUT2 461G>A polymorphism) and vitamin B12 in Europe and West Africa. *Am J Clin Nutr.* 2012. 95(2):514-21.
2. **Avogbe P H.**, Ayi-Fanou L, Cachon B, Chabi N, Debende A Dewaele D, Aissi F, Cazier F and Sanni A. Hematological changes among Beninese motor-bike taxi drivers exposed to benzene by urban air pollution. *Afri. J Environ. Science & Technology.* 2011. 5(7), 464 - 472.
3. Yotova V, Lefebvre JF, Moreau C, Gbeha E, Hovhannesian K, Bourgeois S, Bédarida S, Azevedo L, Amorim A, Sarkisian T, **Avogbe PH**, Chabi N, Dicko MH, Santa Amouzou ES, Sanni A, Roberts-Thomson J, Boettcher B, Scott RJ, Labuda D. An X-linked haplotype of Neandertal origin is present among all non-African populations. *Mol Biol Evol.* 2011. Jul; 28(7):1957-62
4. Ayi-Fanou L, **Avogbe PH**, Fayomi B, Keith G, Hountondji C, Creppy EE, Autrup H, Rihn BH, Sanni A. DNA-adducts in subjects exposed to urban air pollution by benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Cotonou, Benin. *Environ Toxicol.* 2011 Feb; 26(1):93-102
5. Ahoyo AT., Baba-Moussa L., Anago, E. **Avogbe P.**, T.D. Missihoun, F. Loko, G. Prévost, Sanni A., K. Dramane. Incidence d'infection liées à Escherichia Coli producteur de bêta lactamase à spectre élargi au centre hospitalier départemental du Zou et Collines au Bénin. *Med Mal Infect.* 2007; 37:746-752
6. **Avogbe PH**, Ayi-Fanou L, Autrup H, Loft S, Fayomi B, Sanni A, Vinzents P and Møller P. Ultrafine particulate matter and high-level benzene air pollution in relation to oxidative DNA damage. *Carcinogenesis.* 2005, 26(3):613-620.

PUBLICATIONS

Identification of potential interesting DNA repair gene variants associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma risk in cirrhotic Caucasians:

Results from the CiRCE study

Patrice Hodonou Avogbe¹, Abderrahim Oussalah¹, Laetitia Goffinet¹, Céline Chery¹, Pierre Rouyer¹, Jean-Louis Jouve², Anne Minello², Claire Bonithon-Kopp², Hélène Barraud¹, Gérard Thieffin³, Vincent Di Martino⁴, Michel Doffoël⁵, Carine Richou⁴, Jean-Jacques Raab⁵, Laurent Peyrin-Biroulet¹, Patrick Hillon², Jean-Pierre Bronowicki^{1,2} and Jean-Louis Guéant^{1,2},
†, for the CiRCE Study Group

***CiRCE Study Group includes:** **1) CiRCE Coordination France:** Bronowicki JP^{1,2}, Di Martino V⁴, Doffoël M⁵, Hillon P² (CiRCE coordinator), Thieffin G³; **2) CiRCE Scientific Board:** Faivre J² (President), Cercueil JP², Cottet V², Delmas D², Ducoroy P², Duvillard L², Guenneugues M², Guéant JL¹, Guiu B², Habersetzer F⁵, Jaeck D⁵, Latruffe N², Manfait M³, Manton G⁴; Oudet P^{5,8}, Sgro C², Sockalingum G³; **3) CiRCE investigators:** Housseau E⁵; Kantelip JP⁴; Pessaix P⁵; Tebachere-Alt M⁵; Trechot P⁹; Trenque T².

¹ Inserm U954 “Nutrition-Genetics and Exposure to Environmental Risks” and Department of Hepato-Gastroenterology, Nancy University and University Hospital of Nancy, Nancy, France.

² Inserm U 866 and Inserm CIE 01, university Hospital of Dijon and University of Burgundy, Dijon, France,

³ University Hospital of Reims, Reims, France.

⁴ University Hospital of Besançon, Besançon, France.

⁵ University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.

⁶ Regional Hospital of Metz, Metz, France.

⁷ Burgundy-Franche Comte Proteomic platform CLIPP, Dijon, France, ⁸ Canceropole Grand Est, Strasbourg, France and ⁷Department of Pharmacology, University hospital of Nancy, Nancy, France.

Correspondence: †Jean-Louis Guéant, MD, DSc, AGAF, Inserm U-954, “Nutrition-Genetics and Exposure to Environmental Risks”, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, B.P. 184, 54500, Nancy-Vandœuvre, France; Phone: +33 3 83 68 39 92; Fax: +33 3 83 68 32 79; E-mail: jean-louis.gueant@medecine.uhp-nancy.fr

Number of Figures: 0

Number of tables: 3

List of abbreviations: BRIP1, BRCA1 Interacting protein C-terminal helicase 1; DSB, Double-strand breaks repair; HBV, Hepatitis B virus; HCC, Hepatocellular carcinoma; HCV, Hepatitis C virus; NER, Nucleotide excision repair; OR, Odds ratio

Conflict of interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial support: This study was supported by Institut National du Cancer (INCA), the Region Lorraine and the Ligue Nationale contre le Cancer (CiRCE-Nutrigenex).

Abstract

Background & Aims: Single nucleotide polymorphisms within DNA repair genes are expected to modify hepatocellular carcinoma (HCC) risk in cirrhotic patients. Previous studies have been limited to a small number of genes and were inconclusive. We aimed to identify potential interesting DNA repair gene variants associated with HCC risk in cirrhotic Caucasian patients, using a comprehensive SNP-array fine mapping approach on 384 SNPs within 94 DNA repair genes.

Methods: Our multicenter case-control CiRCE study was conducted in 489 cirrhotic patients, including 163 cases with HCC and 326 paired cirrhotic controls recruited prospectively in six major hospitals of the North-East of France. Genotyping analysis was performed using an Illumina® Goldengate® platform. Gene variants were evaluated for their association with HCC using additive, dominant and recessive genetic models. All significant variants retained in univariate analyses were integrated into a logistic regression model for multivariate analysis using a stepwise method. Only results from the most relevant genetic model were reported.

Results: Six SNPs on *BRIP1* gene (rs4986763, rs4986764, rs1557720, rs4986765, rs2191248, and rs11871785) were significantly associated with HCC risk under an additive genetic model in patients with cirrhosis of viral etiology. After false discovery rate (FDR) correction for multiple testing, *BRIP1* rs4986764 and rs1557720 displayed statistically significant associations with HCC risk. There was no statistically significant association of DNA repair gene variants with HCC risk among patients carrying non-viral cirrhosis after FDR correction.

Conclusions: We reported significant associations between *BRIP1* gene variants and susceptibility to HCC. These findings should be replicated in independent cohorts.

Key words: DNA repair genes; hepatocellular carcinoma; SNP-array; BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1 (*BRIP1*) gene, viral hepatitis.

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a major health problem which ranks as the fifth most common malignancy, and the third most common cause of cancer-related death worldwide (Parkin, 2001; Ferlay et al., 2010). Liver cirrhosis is the strongest predisposing factor for HCC (Llovet, 2005). Common causes of cirrhosis include hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), alcohol consumption, and nonalcoholic steatohepatitis. The highest incidence of HCC (>20 per 100,000) occurs in developing countries (Gomaa et al., 2008), with about 80% of the 700,000 estimated annual cases of HCC occurring in areas such as South-East Asia and Sub-Saharan Africa, where the prevalence of viral hepatitis and dietary aflatoxin B1 (AFB1) exposures are high, respectively (Sherman, 2005). Since, only a small proportion of all exposed individuals to these risk factors eventually develop HCC, other risk factors including genetic variants have been proposed to affect HCC risk (Chen and Chen, 2002). Both candidate-gene and genome-wide association (GWA) approaches have been used to identify common genetic variants associated with HCC risk, such as single nucleotide polymorphism (SNP) (Li et al., 2011b; Long et al., 2006, 2010, 2011; Kato et al., 2005; Kumar et al., 2011).

Several case-control studies or meta-analyses evaluated the association between polymorphisms in DNA repair genes and HCC risk and results have been contradictory and have not been robustly replicated (Manuguerra et al., 2006; Wang et al., 2009; Long et al., 2010; Gulnaz et al., 2012; Li et al., 2012; Zhang and Ma, 2012; Yuan et al., 2012; Liu et al., 2011). Notably, the majority of these studies have been limited to a single or a small number of genes and focused only on three DNA repair gene pathways, namely, base excision repair (BER; Yuan et al., 2012; Li et al., 2012; Han et al., 2012), nucleotide excision repair (NER), and double-strand breaks repair (DSBR; Li et al., 2011a; Long et al., 2011; Zeng et al., 2012) pathways.

The CiRCE study (Clinical Research Hospital Program, N°PHRC10_07-03) is a multicenter case-control referral center-based study conducted in the North-East of France which aimed to evaluate the influence of environmental, nutritional, and metabolic factors on the risk of cirrhosis-related HCC. Using data from the CiRCE study and a SNP-array approach, we performed a comprehensive investigation of 384 SNPs on 94 candidate genes and identify the potential interesting genetic variants associated with HCC risk according to the etiologies of liver cirrhosis.

Materials and methods

Study cohort and data collection

The CiRCE study is a multicenter hospital-based case-control study of cirrhosis related HCC risk which was conducted between January 1st, 2008 and December 31st 2010 in six major hospitals in the North-East of France (Besançon, Dijon, Metz, Nancy, Reims and Strasbourg). Each study center followed the same protocol and recruited patients with newly diagnosed HCC and controls. Cases were defined as patients with cirrhosis-related HCC. Controls were defined as cirrhosis patients without HCC.

Age, sex, etiology of cirrhosis, and tobacco consumption, were obtained through standardized questionnaires. Blood samples collected from both cases and controls were processed at each study center. Aliquots of frozen white blood cells were shipped on dry ice to the Inserm U954 laboratory 'NGERE, *Nutrition, Génétique et Exposition aux Risques Environnementaux*' (Nancy, France) for DNA extraction and genetic analyses.

HCC diagnosis was made according to the American Association for the study of Liver Diseases (Bruix and Sherman, 2011). Exclusion criteria included: (i) age under 35 years, (ii) liver cancer other than HCC, (iii) HCC in non-cirrhotic liver, and (iv) HIV infection. All participants gave their informed consent and the protocol of the study was approved by the ethic committee of Dijon.

Candidate genes and SNPs selection for the Illumina® GoldenGate® oligonucleotide pool assay

A total of 94 DNA repair and genomic stability genes were examined in this study. The SNP-array designed for this study includes eight DNA repair and genome stability gene pathways: **(1)** direct reversal of damage (*MGMT*); **(2)** base excision repair (*APEX1*, *MBD2*, *MBD4*, *NEIL3*, *NTHL1*, *MUTYH*, *MPG*, *OGG1*, *PARP1*, *PARP2*, *PARP3*, *SMUG1*, *TDG*,

UNG, XRCC1); **(3)** nucleotide excision repair (*ATXN3, CCNH, CDK7, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERCC8, GTF2H1, GTF2H4, MNAT1, LIG1, XAB2, DDB2, MMS19L, RAD23B, RPA1, RRM1; SLK, XBA2, XPC*); **(4)** double-strand breaks repair pathway (*BRCA1, BRCA2, BRIP1, DCLRE1A, EME1, FANCA, FANCE, FANCI, FANCM, GEN1, LIG4, MUS81, NBS1, PRKDC, RAD18, RAD51, RAD52, XRCC2, XRCC3, XRCC4, XRCC5*); **(5)** mismatch repair (*CAF1, MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH4, MSH6, N4BP2, PMS1, PMS2*); **(6)** DNA polymerases, nucleases and helicases (*BLM, EXO1, PCNA, POLB, POLD1, POLE, POLH, POLI, POLL, POLN, POLQ, RECQL4, REV1, REV3L, WRN*); **(7)** telomere maintenance (*TEP1, TNKS1BP1*), and **(8)** genes involved in DNA damage recognition and response (*ATM, ATR, CHEK1, CHEK2, MDC1, RAD17, TP53*).

SNPs within the aforementioned genes were selected from available databases (NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide>), HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>), and Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) based on evidence for their relationship with several malignancies, including HCC. When possible, we included SNPs encoding non-synonymous amino acid substitutions that were suggested to alter function or located within the 5' or 3' untranslated region of the gene that could potentially alter mRNA stability. Additionally, we systematically included intronic SNPs in some instances to allow good coverage of candidate genes.

We conducted a preliminary step of *in silico* validation of all identified SNPs to determine their suitability for genotyping with the GoldenGate assay using the Illumina Assay Design Tool (ADT) at <http://www.Illumina.com>. The assessment was conducted based on Illumina's in-house criteria where SNPs were assigned a designability score of 1 (highly designable), 0.5 (moderately designable) or zero (low designability) and the 60-bp limitation (a SNP cannot be closer than 60-bp to another SNP on the OPA). SNPs with zero designability scores were discarded and the final selection of the 384 SNPs was sent to

Illumina for the synthesis of the OPA (oligonucleotide pool assay, also referred to as GoldenGate genotyping assay). Details of the final version of the SNP-array are summarized in **supplemental Table 1 online**.

DNA isolation and genotyping analysis

Genomic DNA was extracted from frozen white blood cells using the Nucleon BACC3 kit (GE Healthcare, France) according to the manufacturer's instructions. Extracted DNA was dissolved in 200 μ L Tris-HCl buffer (10 mmol/L, pH 8.0) containing 1 mmol/L EDTA and stored at -20°C until use. DNA concentrations were measured by using PicoGreen dSDNA quantification kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Genotyping of all samples was performed with a total of 250 ng of genomic DNA using the Illumina BeadArray platform and GoldenGate Assay (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) following the manufacturer's protocol (Fan et al., 2006). This system uses a high-density BeadArray technology in combination with an allele-specific oligonucleotide extension, adapter ligation and amplification assay protocol. Briefly, biotinylated DNA was immobilized on paramagnetic beads and the pooled SNP-specific oligonucleotides in the OPA were annealed on the DNA. This hybridization step is followed by an extension and ligation step, connecting one of the allele-specific oligo with the locus-specific oligo to generate DNA templates which were amplified using universal fluorescently-labelled primers. PCR products are annealed to an array composed of beads carrying oligonucleotides complementary to the IllumiCode sequences in the locus-specific oligos that are used for recognition of each SNP site. The fluorescence of an array matrix carrying Cy3- and Cy5- labeled beads were generated with the two-channel scanner. Hybridization data intensity processing, clustering and genotype calling were performed using the genotyping module in the BeadStudio 2 software (Illumina, USA).

Statistical analysis

All quantitative variables are described as medians and percentiles [Interquartile range (IQR), 25–75th percentile]. All proportions and genotype frequencies are expressed as percentages with 95% confidence intervals (95% CI). When considering continuous variables for dichotomous analysis, optimal cut-off values were determined by receiver operating characteristic (ROC) analysis (DeLong et al., 1988), using ‘HCC’ as classification variable. SNPs quality controls were performed before statistical analysis. All SNPs with a call-rate < 0.95 and those with a deviation from Hardy-Weinberg equilibrium were removed from the analysis. All analyses were performed according to additive, dominant, and recessive genetic models. We calculated pair-wise linkage disequilibrium (LD) for all SNPs and used the widely accepted measures r and D' (Lewontin, 1964) to quantify LD. SNPs were considered to be in LD if D' was greater than 0.75. The comparison of continuous variables between the HCC group and controls was performed with the Mann-Whitney U test. The comparison of SNP allelic frequencies between the HCC group and controls was carried out using the Chi-square test or Fisher’s exact test as appropriate for both dominant and recessive genetic models or using the exact Armitage test for the additive genetic model. All significant SNPs retained in univariate analyses were integrated into a logistic regression model for multivariate analysis using a stepwise method. All variables with P -value < 0.1 were included in the model, and the variables with P -value < 0.05 were retained in the model. Logistic regression models were adjusted for age, sex, and the etiology of cirrhosis. All SNPs independently associated with HCC risk were tested for SNP-SNP interaction according to additive, dominant, and recessive genetic models. All the reported P -values were two-sided, and P -values < 0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using Golden Helix’ SNP & Variation Suite v7.5.2 (Bozeman, MT, USA) and MedCalc software, version 11.4.4 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

Results

Demographic and risk factors distribution in the study population

Distributions of demographic and risk factors in the population study are summarized in **Table 1**. Almost thirty-four percent of patients with liver cirrhosis had HCC. At the time of diagnosis, the median age was 60.3 years. Alcohol consumption was frequently reported in the study participants (92.1%). About three quarters of patients were current smokers or former smokers. Overall, the male to female ratio was 3:1. The etiologies of cirrhosis were 4.54% HBV infections, 23.1% HCV infections, 0.62% co-infection with HCV and HBV, and 71.8% non-viral.

Whatever the etiology, HCC patients were significantly older than cirrhotic controls (**Supplemental Table 2 Online**). Binary variables were similar in cirrhotic controls and HCC patients in the subgroup of patients with cirrhosis related to viral hepatitis (**Supplemental Table 2 Online**). Alcohol abuse was reported in nearly all of the patients with non-viral associated HCC. Among patients in this subgroup, the proportion of former smokers was notably higher in HCC than in cirrhotic controls (55.6 vs. 28.2%, respectively, $P<0.0001$). Conversely, the proportion of current smokers was higher in cirrhotic controls than in HCC patients (44.1 vs. 28.7%, respectively, $P=0.006$; **Supplemental Table 2 Online**). Male gender was more prevalent in HCC patients than in cirrhotic controls (89% vs. 69.5, respectively, $P=0.0001$).

Phenotypic factors associated with HCC risk

In multivariate logistic regression analysis, age >68 years was independently associated with an increased HCC risk among patients with cirrhosis related to viral hepatitis. In addition, age >59 years, male gender, and former cigarette smoking were independently associated with an increased HCC risk among patients carrying non-viral cirrhosis (**Table 2**).

SNPs associated with HCC risk in patients with cirrhosis related to virus hepatitis in univariate analysis

Additive genetic model

In the additive genetic model, six SNPs were associated with HCC risk in patients with hepatitis virus-associated cirrhosis (**Supplemental Tables 3 and 4 online**). All these SNPs were located on the *BRIP1* gene (*BRCA1 interacting protein C-terminal helicase*: rs4986763, rs4986764, rs1557720, rs4986765, rs2191248, and rs11871785). Two SNPs, rs4986763 and rs4986765, encode for synonymous amino acids (Tyr1137Tyr and Glu879Glu, respectively). *BRIP1* (rs4986764) encodes for a non-synonymous amino acid (Ser919Pro). Other SNPs (rs1557720, rs11871785, and rs2191248) are located within intronic region.

Statistically significant false discovery rate (FDR) adjusted P values were obtained for *BRIP1* (rs4986764 and rs1557720).

SNPs associated with HCC risk in patients with non viral cirrhosis in univariate analysis

Additive genetic model

In the additive genetic model, eight SNPs were associated with HCC risk in patients carrying non-viral cirrhosis (**Supplemental Tables 5 and 6 online**). These SNPs were located on the following genes: *BRCA2* (*breast cancer 2, early onset*: rs9534174, rs1012129, and rs144848); *ERCC5* (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5*: rs17655); *CHEK2* (*checkpoint kinase 2*: rs5762764), *EME1* (*essential meiotic endonuclease 1 homolog 1 (S. pombe)*, rs12450550), and *EPHX1* (*epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)*: rs1051740).

Four SNPs (rs12450550, rs1051740, rs17655, and rs144848) encode for non-synonymous amino acids, whereas other four SNPs are located in intronic regions.

None of these SNPs was significant after Bonferroni correction.

SNPs associated with HCC risk in logistic regression analysis

Viral cirrhosis

In binary logistic regression analysis five SNPs located on *BRIP1* gene (rs4986763, rs4986764, rs1557720, rs4986765, and rs2191248) were associated with an increased HCC risk among patients carrying cirrhosis related to viral hepatitis in the additive genetic model. In contrast, *BRIP1* rs11871785 was associated with a reduced HCC risk (**Table 3**).

Non-viral cirrhosis

There was no statistically significant association of DNA repair gene variants with HCC risk among patients carrying non-viral cirrhosis after FDR correction (**Table 3**).

Discussion

This is the first study that performed a comprehensive evaluation of DNA repair genes variants for identifying those potentially associated with the development of HCC in cirrhotic Caucasian patients.

The most striking result obtained in our present study was that *BRIP1* gene variants are strong predictor of susceptibility to HCC in cirrhotic patients. Notably, we found, after false discovery rate (FDR) correction for multiple testing, that *BRIP1* (rs4986764 and rs1557720) variants were associated with an increased HCC risk in patients with cirrhosis of viral etiology under an additive genetic model. However, there was no significant association between any single SNP and HCC risk among patients carrying non-viral cirrhosis.

The *BRIP1* gene (also known as *FANCI/BACH1*) encodes a helicase which interacts with the BRCT domain of BRCA1 and function as a regulator of DNA double-strand break repair pathways. (Cantor et al., 2001; Levitus et al., 2006; Litman et al., 2005). *BRIP1* belongs to the family of RecQ helicase that has been shown to be important in genome maintenance (Cobb et al., 2002). Further, some investigators have posited that defects in some of RecQ homologs, such as *BLM*, *WRN*, and *RECQL4* were associated with chromosomal instability and cancer predisposition (Risinger and Groden, 2004). *BRIP1* is also essential for the cell cycle control, particularly the execution of the G2/M transition (Yu et al., 2003). By unwinding non-Watson-Crick DNA structures, such as Holliday junctions, formed during homologous recombination, the BRIP1 protein allows other proteins (e.g., BRCA1) to reach damaged areas and fix them, thereby maintaining the stability of genetic information.

Notably, previous findings showed that defects in the *BRIP1* gene are associated with genome instability disorders, such as breast cancer, ovarian cancer as well as with the rare cancer prone syndrome Fanconi anemia (FA) within the FANCI patient complementation group (FA-J) (Rafnar et al., 2011; Rebbeck et al., 2011; Levrin et al., 2005). At least 12 genetic

subtypes of FA (FA-A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M) have been described, most of which are associated with an increased risk of cancer (Tischkowitz and Winqvist, 2011). Consistently, both case-control studies as well as cohort studies reported an increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with Fanconi anemia (Abbondanzo et al., 1986; Moldvay et al., 1991; LeBrun et al., 1991; Linares et al., 1991; Altay et al., 1997; Alter, 2003; Masserot-Lureau et al., 2012).

In our study, *BRIP1* rs4986764 (Ser919Pro) was associated with an increased HCC risk in patients carrying cirrhosis related to viral hepatitis. This SNP is located in the coding region and could alter the protein function. One can assume that these SNPs may reduce the ability of *BRIP1* to bind to DNA substrates and thereby blocking the relevant pathway. Another explanation is that the substitution of a serine to proline residue may destabilize the helicase domain required for BRCA1 interaction, which is crucial for the proper functioning of *BRIP1*. Although some of previous studies found evidence that *BRIP1* rs4986764 was associated with an increased risk of breast cancer (Sigurdson et al., 2004), other investigators failed to replicate such a result (Song et al., 2007).

Our results showed that *BRIP1* rs4986765 (Glu879Glu) and rs4986763 (Tyr1137Tyr) were associated with increased HCC risk, though they do not alter the protein sequence. One possible explanation is that they may be in linkage disequilibrium with other variants responsible for the observed association. Recent molecular genetic studies have, however, shown that synonymous mutations may play an essential role in the etiology of cancer, since these mutations can affect protein conformation and function by altering mRNA stability (Sauna et al., 2007; Sauna and Kimchi-Sarfaty, 2011).

Taken together, these data suggest that genetic variants on *BRIP1* gene may play a major role in susceptibility to hepatocellular carcinogenesis, particularly in patients carrying hepatitis-related cirrhosis.

Consistently with previous studies, our findings showed that several risk factors, such as age, male gender and cigarette smoking were associated with an increased HCC risk (Kato et al., 2005).

This study has several strengths, including the use of a comprehensive and systematic genotyping of DNA repair genes polymorphisms through a SNP-array approach. Furthermore, this is the first study showing association between genetic variants on *BRIP1* gene and HCC risk.

We must acknowledge several limitations in this study. The GoldenGate Assay applies stringent requirements to the quality of SNPs and may generate missing data. It is the reason why we applied stringent quality control procedure by removing samples and SNPs with call rates under 0.95. Finally, it should be noted that genotypes determined with the Illumina® GoldenGate® platform were highly concordant with those determined with the standard Sanger sequencing approach for all SNPs found in association with HCC, in our study.

In conclusion, our findings revealed that variants on *BRIP1* gene are associated with susceptibility to HCC among patients carrying cirrhosis related to viral hepatitis. Therefore, further larger studies are warranted to validate these findings.

References

- Abbondanzo, S. L., Manz, H. J., Klappenbach, R. S., and Gootenberg, J. E. (1986). Hepatocellular carcinoma in an 11-year-old girl with Fanconi's anemia. Report of a case and review of the literature. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 8, 334–337.
- Altay, C., Alikasıfıoglu, M., Kara, A., Tunçbilek, E., Ozbek, N., and Schroeder-Kurth, T. M. (1997). Analysis of 65 Turkish patients with congenital aplastic anemia (Fanconi anemia and non-Fanconi anemia): Hacettepe experience. *Clin. Genet.* 51, 296–302.
- Alter, B. P. (2003). Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001. *Cancer* 97, 425–440.
- Bruix, J., and Sherman, M. (2011). Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 53, 1020–1022.
- Cantor, S. B., Bell, D. W., Ganesan, S., Kass, E. M., Drapkin, R., Grossman, S., Wahrer, D. C., Sgroi, D. C., Lane, W. S., Haber, D. A., et al. (2001). BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* 105, 149–160.
- Chen, C.-J., and Chen, D.-S. (2002). Interaction of hepatitis B virus, chemical carcinogen, and genetic susceptibility: multistage hepatocarcinogenesis with multifactorial etiology. *Hepatology* 36, 1046–1049.
- Cobb JA, Bjergbaek L, Gasser SM (2002). RecQ helicases: at the heart of genetic stability. *FEBS Lett.* 529(1):43-8.
- DeLong, E. R., DeLong, D. M., and Clarke-Pearson, D. L. (1988). Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 44, 837–845.
- Fan, J.-B., Gunderson, K. L., Bibikova, M., Yeakley, J. M., Chen, J., Wickham Garcia, E., Lebruska, L. L., Laurent, M., Shen, R., and Barker, D. (2006). Illumina universal bead arrays. *Meth. Enzymol.* 410, 57–73.

- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* 127, 2893–2917.
- Gomaa, A.-I., Khan, S.-A., Toledano, M.-B., Waked, I., and Taylor-Robinson, S.-D. (2008). Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* 14, 4300–4308.
- Gulnaz, A., Sayyed, A. H., Amin, F., Khan, A. U. H., Aslam, M. A., Shaikh, R. S., and Ali, M. (2012). Association of XRCC1, XRCC3, and XPD genetic polymorphism with an increased risk of hepatocellular carcinoma because of the hepatitis B and C virus. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*
- Han, X., Xing, Q., Li, Y., Sun, J., Ji, H., Huazheng, P., and Jun, L. (2012). Study on the DNA Repair Gene XRCC1 and XRCC3 Polymorphism in Prediction and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma Risk. *Hepatogastroenterology* 59.
- Kato, N., Ji, G., Wang, Y., Baba, M., Hoshida, Y., Otsuka, M., Taniguchi, H., Moriyama, M., Dharel, N., Goto, T., et al. (2005). Large-scale search of single nucleotide polymorphisms for hepatocellular carcinoma susceptibility genes in patients with hepatitis C. *Hepatology* 42, 846–853.
- Kumar, V., Kato, N., Urabe, Y., Takahashi, A., Muroyama, R., Hosono, N., Otsuka, M., Tateishi, R., Omata, M., Nakagawa, H., et al. (2011). Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet.* 43, 455–458.
- LeBrun, D. P., Silver, M. M., Freedman, M. H., and Phillips, M. J. (1991). Fibrolamellar carcinoma of the liver in a patient with Fanconi anemia. *Hum. Pathol.* 22, 396–398.
- Levitus, M., Joenje, H., and De Winter, J. P. (2006). The Fanconi anemia pathway of genomic maintenance. *Cell. Oncol.* 28, 3–29.

- Levrn, O., Attwooll, C., Henry, R. T., Milton, K. L., Neveling, K., Rio, P., Batish, S. D., Kalb, R., Velleuer, E., Barral, S., et al. (2005). The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat. Genet.* 37, 931–933.
- Lewontin, R. C. (1964). The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. *Genetics* 49, 49–67.
- Li, J., Li, Z., Feng, L., Guo, W., and Zhang, S. (2012). Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 and hepatocellular carcinoma risk among East Asians: a meta-analysis. *Tumour Biol.*
- Li, R., Yang, Y., An, Y., Zhou, Y., Liu, Y., Yu, Q., Lu, D., Wang, H., Jin, L., Zhou, W., et al. (2011a). Genetic polymorphisms in DNA double-strand break repair genes XRCC5, XRCC6 and susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 32, 530–536.
- Li, Z., Guan, W., Li, M., Zhong, Z., Qian, C., Yang, X., Liao, L., Li, Z., and Wang, D. (2011b). Genetic polymorphism of DNA base-excision repair genes (APE1, OGG1 and XRCC1) and their correlation with risk of lung cancer in a Chinese population. *Arch. Med. Res.* 42, 226–234.
- Linares, M., Pastor, E., Gomez, A., and Grau, E. (1991). Hepatocellular carcinoma and squamous cell carcinoma in a patient with Fanconi's anemia. *Ann. Hematol.* 63, 54–55.
- Litman, R., Peng, M., Jin, Z., Zhang, F., Zhang, J., Powell, S., Andreassen, P. R., and Cantor, S. B. (2005). BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCI. *Cancer Cell* 8, 255–265.
- Liu, F., Li, B., Wei, Y., Yan, L., Wen, T., Zhao, J., and Xu, M. (2011). XRCC1 genetic polymorphism Arg399Gln and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Liver Int.* 31, 802–809.

- Llovet, J. M. (2005). Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol.* 40, 225–235.
- Long, X. D., Ma, Y., Wei, Y. P., and Deng, Z. L. (2006). The polymorphisms of GSTM1, GSTT1, HYL1*2, and XRCC1, and aflatoxin B1-related hepatocellular carcinoma in Guangxi population, China. *Hepatol. Res.* 36, 48–55.
- Long, X.-D., Ma, Y., Zhou, Y.-F., Ma, A.-M., and Fu, G.-H. (2010). Polymorphism in xeroderma pigmentosum complementation group C codon 939 and aflatoxin B1-related hepatocellular carcinoma in the Guangxi population. *Hepatology* 52, 1301–1309.
- Long, X.-D., Yao, J.-G., Huang, Y.-Z., Huang, X.-Y., Ban, F.-Z., Yao, L.-M., and Fan, L.-D. (2011). DNA repair gene XRCC7 polymorphisms (rs#7003908 and rs#10109984) and hepatocellular carcinoma related to AFB1 exposure among Guangxi population, China. *Hepatol. Res.* 41, 1085–1093.
- Manuguerra, M., Saletta, F., Karagas, M. R., Berwick, M., Veglia, F., Vineis, P., and Matullo, G. (2006). XRCC3 and XPD/ERCC2 single nucleotide polymorphisms and the risk of cancer: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 164, 297–302.
- Masserot-Lureau, C., Adoui, N., Degos, F., De Bazelaire, C., Soulier, J., Chevret, S., Socié, G., and Leblanc, T. (2012). Incidence of liver abnormalities in Fanconi anemia patients. *Am. J. Hematol.* 87, 547–549.
- Moldvay, J., Schaff, Z., and Lapis, K. (1991). Hepatocellular carcinoma in Fanconi's anemia treated with androgen and corticosteroid. *Zentralbl. Pathol.* 137, 167–170.
- Parkin, D. M. (2001). Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2, 533–543.
- Rafnar, T., Gudbjartsson, D. F., Sulem, P., Jonasdottir, A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Besenbacher, S., Lundin, P., Stacey, S. N., Gudmundsson, J., et al. (2011). Mutations in BRIP1 confer high risk of ovarian cancer. *Nat. Genet.* 43, 1104–1107.

- Rebbeck, T. R., Mitra, N., Domchek, S. M., Wan, F., Friebel, T. M., Tran, T. V., Singer, C. F., Tea, M.-K. M., Blum, J. L., Tung, N., et al. (2011). Modification of BRCA1-Associated Breast and Ovarian Cancer Risk by BRCA1-Interacting Genes. *Cancer Res.* 71, 5792–5805.
- Risinger MA, Groden J.(2004). Crosslinks and crosstalk: human cancer syndromes and DNA repair defects. *Cancer Cell*; 6, 539-45.
- Sauna, Z. E., and Kimchi-Sarfaty, C. (2011). Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat. Rev. Genet.* 12, 683–691.
- Sauna, Z. E., Kimchi-Sarfaty, C., Ambudkar, S. V., and Gottesman, M. M. (2007). Silent polymorphisms speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. *Cancer Res.* 67, 9609–9612.
- Sherman, M. (2005). Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening. *Semin. Liver Dis.* 25, 143–154.
- Sigurdson, A. J., Hauptmann, M., Chatterjee, N., Alexander, B. H., Doody, M. M., Rutter, J. L., and Struwing, J. P. (2004). Kin-cohort estimates for familial breast cancer risk in relation to variants in DNA base excision repair, BRCA1 interacting and growth factor genes. *BMC Cancer* 4, 9.
- Song, H., Ramus, S. J., Kjaer, S. K., Hogdall, E., Dicioccio, R. A., Whittemore, A. S., McGuire, V., Hogdall, C., Jacobs, I. J., Easton, D. F., et al. (2007). Tagging single nucleotide polymorphisms in the BRIP1 gene and susceptibility to breast and ovarian cancer. *PLoS ONE* 2, e268.
- Tischkowitz, M., and Winqvist, R. (2011). Using mouse models to investigate the biological and physiological consequences of defects in the Fanconi anaemia/breast cancer DNA repair signalling pathway. *J. Pathol.* 224, 301–305.

- Wang, Y., Yang, H., Li, H., Li, L., Wang, H., Liu, C., and Zheng, Y. (2009). Association between X-ray repair cross complementing group 1 codon 399 and 194 polymorphisms and lung cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Lett.* 285, 134–140.
- Yu, X., Chini, C. C. S., He, M., Mer, G., and Chen, J. (2003). The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science* 302, 639–642.
- Yuan, T., Deng, S., Liu, H., Liu, M., and Chen, P. (2012). Relationship between XRCC1 and XPD polymorphisms and the risk of the development of hepatocellular carcinoma: A case-control study. *Exp Ther Med* 4, 285–290.
- Zeng, X., Liu, S., Yu, H., Ji, L., Li, L., Huang, J., Bai, H., and Qiu, X. (2012). DNA repair capacity, DNA-strand break repair gene polymorphisms, and the incidence of hepatocellular carcinoma in southwestern Guangxi of China. *DNA Cell Biol.* 31, 1384–1391.
- Zhang, J.-J., and Ma, J.-Z. (2012). [Association of the xeroderma pigmentosum group D DNA repair gene with hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 20, 683–687.

Table 1. Baseline characteristics of hepatocellular carcinoma patients and controls

	N	Median	IQR, 25 th – 75 th	
Age (years)	484	60.3	53.7 – 68.1	
BMI (kg/m ²)	484	26.6	23.6 – 30.1	
Creatinine (μmol/L)	479	80.0	65.0 – 94.0	
	N	n	%	95% CI
Cases	485	163	33.6	29.4 – 37.8
Etiology of cirrhosis				
VHB	485	22	4.54	2.68 – 6.39
VHC	485	112	23.1	19.3 – 26.9
Other etiologies	485	348	71.8	67.7 – 75.8
Co-infection VHB + VHC	485	3	0.62	0.0817 – 01.32
Alcohol use	483	445	92.1	89.7 – 94.5
Male gender	485	362	74.6	70.8 – 78.5
Smoking status				
Current	483	185	38.3	34.0 – 42.7
Former	483	176	36.4	32.1 – 40.7
Never	483	122	25.3	21.4 – 29.1

Note. 95% CI: 95% confidence interval; BMI: Body mass index; HBV: hepatitis B virus;

Supplemental Table 2. Comparison of demographics and risk factors characteristics between HCC patients and controls according to cirrhosis etiologies

Etiology of cirrhosis	Controls					HCC patients						
	N	Median	IQR, 25th – 75th			N	Median	IQR, 25th – 75th		<i>P</i> –value ^a		
Viral hepatitis	Age (years)	83	61,6	51,2 – 68,2			54	67,938	55,5 – 73,8		0,0203	
	BMI (kg/m²)	83	26,1	23,8 – 29,6			54	24,64	21,8 – 28,7		0,0842	
	Creatinine (mg/L)	81	81	69,5 – 92,2			53	84	70,5 – 98,2		0,4567	
		N	n	%	95% CI		N	n	%	95% CI		<i>P</i> –value ^b
	Alcohol	82	64	78	68,9 – 87,2		54	42	77,8	66,3 – 89,2		0,8618
	Male gender	83	62	74,7	65,1 – 84,2		54	37	68,5	55,7 – 81,3		0,5523
	Current smokers	83	28	33,7	23,3 – 44,1		54	21	38,9	25,5 – 52,3		0,6653
	Former smokers	83	34	41	30,2 – 51,8		54	15	27,8	15,4 – 40,1		0,1642
	Non-smokers	83	21	25,3	15,8 – 34,9		54	18	33,3	20,3 – 46,3		0,4097
	Non-viral	Age (years)	238	58	51,6 – 63,2			109	64,2	59,9 – 71,3		< 0,0001
BMI (kg/m²)		238	26,36	23,5 – 29,7			109	28,48	24,7 – 31,5		0,003	
Creatinine (mg/L)		237	74	60,0 – 92,2			108	83,5	69,5 – 102,0		0,0039	
		N	n	%	95% IC		N	n	%	95% IC		<i>P</i> –value ^b
Alcohol		238	230	96,6	94,3 – 98,9		109	109	100	100 – 100		0,0606
Male gender		239	166	69,5	63,6 – 75,3		109	97	89	83,0 – 95,0		0,0001
Current smokers		238	105	44,1	37,8 – 50,5		108	31	28,7	20,0 – 37,4		0,0064
Former smokers		238	67	28,2	22,4 – 33,9		108	60	55,6	46,0 – 65,1		< 0,0001
Non-smokers	238	66	27,7	22,0 – 33,5		108	17	15,7	8,7 – 22,7		0,0149	

Note. IQR: interquartile range; CI: confidence interval; BMI: Body index mass

^aMann-Whitney *U* test; ^bChi-square test

Table 2. Phenotypic factors associated with hepatocellular carcinoma risk among patients with viral and non-viral cirrhosis

	<i>P</i> -value ^a	Odds ratio	C I 95%
Hepatitis virus-associated cirrhosis			
Age > 68 ans	0.0035	2.95	1.42 – 6.11
Non-viral cirrhosis			
Age > 59 ans	<0.0001	4.63	2.62 – 8.17
Male gender	0.0032	2.86	1.42 – 5.78
Former smokers	0.0045	2.11	1.26 – 3.53

Note. a multivariate analysis using a stepwise method

Supplemental Table 3. SNPs associated with hepatocellular carcinoma risk in univariate analysis among patients carrying cirrhosis related to viral hepatitis (additive model)

SNPs	Chr.	Position	Gene name	d	D	HGVS	Function	amino-acid change	<i>P</i> -value ^a	FDR ^b	Bonferroni ^c
rs4986763	17	57115777	<i>BRIP1</i>	G	A	<i>c.3411T>C</i>	Synonyme	Tyr1137Tyr	0.0004	0.0589	0.0589
rs4986764	17	57118128	<i>BRIP1</i>	G	A	<i>c.2755T>C</i>	Non-synonyme	Ser919Pro	0.0009	0.0423	0.1270
rs1557720	17	57141155	<i>BRIP1</i>	A	T	<i>c.2492+6938A>T</i>	Intron	–	0.0009	0.0423	0.1270
rs11871785	17	57116487	<i>BRIP1</i>	A	G	<i>c.2906-205T>C</i>	Intron	–	0.0017	0.0594	0.2379
rs4986765	17	57118246	<i>BRIP1</i>	G	A	<i>c.2637A>G</i>	Synonyme	Glu879Glu	0.0072	0.1938	0.9693
rs2191248	17	57231133	<i>BRIP1</i>	G	A	<i>c.1340+109G>A</i>	Intron	–	0.0366	0.8183	1

Note. Chr: chromosome; *BRIP1*: *BRCAl* interacting protein C-terminal helicase 1; d: Major allele, D: Minor allele, HGVS: *Human Genome*

Variation Society

a Exact Armitage test, *P*-value

b False discovery rate, *P*-value

c Bonferroni, *P*-value

Supplemental Table 4. Allelic, genotypic frequencies, call rate and Hardy-Weinberg Equilibrium of SNPs associated with hepatocellular carcinoma risk in patients carrying cirrhosis related to viral hepatitis (additive model)

					All participants				HCC patients						Controls					
					Genotypic counts			MAF	Genotypic counts			Allelic counts		MA F	Genotypic counts			Allelic counts		MAF
SNP	Gene	Call rate	HWEP -value	d/D	dd	dD	DD		dd	dD	DD	d	D		dd	dD	DD	d	D	
rs4986763	BRIP1	0.99	0.49	G/A	23	71	42	0.43	9	30	15	48	60	0.56	33	41	8	107	57	0.35
rs4986764	BRIP1	1	0.38	G/A	22	73	42	0.43	9	31	14	49	59	0.55	33	42	8	108	58	0.35
rs1557720	BRIP1	1	0.38	A/T	22	73	42	0.43	9	31	14	49	59	0.55	33	42	8	108	58	0.35
rs11871785	BRIP1	0.99	0.18	A/G	19	54	63	0.34	33	18	3	84	24	0.22	30	36	16	96	68	0.41
rs4986765	BRIP1	1	1.00	G/A	12	58	67	0.30	21	24	9	66	42	0.39	46	34	3	126	40	0.24
rs2191248	BRIP1	1	1.00	G/A	16	61	60	0.34	19	25	10	63	45	0.42	41	36	6	118	48	0.29

Note. Chr: chromosome; *BRIP1*: *BRCA1 interacting protein C-terminal helicase*; d: Major allele, D: Minor allele; HWE: Hardy-Weinberg

Equilibrium

Supplemental Table 5. SNPs associated with hepatocellular carcinoma risk among patients carrying non-viral cirrhosis (genetic additive model)

SNPs	Chr.	Position	Genes	d	D	HGVS	Function	amino-acid change	P-value ^a	FDR ^b	Bonferroni ^c
rs5762764	22	27462989	CHEK2	A	G	c.-6-2275T>C	Intron	–	0.0036	0.4923	0.4923
rs9534174	13	31791790	BRCA2	G	A	c.316+329A>G	Intron	–	0.0105	0.7091	1
rs12450550	17	45811191	EME1	A	G	c.1049T>C	Non synonyme	Ile350Thr	0.0152	0.6814	1
rs2516740	16	20371110	NTHL1	A	C	c.139+600G>A	Intron	–	0.0166	0.5582	1
rs1051740	1	224086255	EPHX1	A	G	c.337T>C	Non synonyme	Tyr113His	0.0254	0.6829	1
rs17655	13	102326002	ERCC5	G	C	c.3310G>C	Non synonyme	Asp1104His	0.0273	0.6100	1
rs1012129	13	31868735	BRCA2	C	G	c.9502-299G>C	Intron	–	0.0278	0.5339	1
rs144848	13	31804728	BRCA2	A	C	c.1114A>C	Non synonyme	Asn372His	0.0471	0.7889	1

Note. Chr.: chromosome; d: major allele; D: minor allele; HGVS: *Human Genome Variation Society*;

CHEK2: checkpoint kinase 2; BRCA2: breast cancer 2, early onset; EME1: essential meiotic endonuclease 1 homolog 1 (S. pombe); EPHX1: epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic); ERCC5: Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5; BRCA2: breast cancer 2, early onset

a Exact Armitage P-value

b False discovery rate, P-value

c Bonferroni, P-value

Supplemental Table 6. Allelic, genotypic frequencies, call rate and Hardy-Weinberg Equilibrium of SNPs associated with hepatocellular carcinoma risk in patients carrying non-viral cirrhosis (additive model)

				All participants					HCC patients					Controls							
				Genotypic counts					MAF	Genotypic counts			Allelic count		MAF	Genotypic counts			Allelic count		MAF
SNPs	Gènes	Call rate	HWE <i>P</i> -value	d/D	dd	dD	DD		dd	dD	DD	d	D		dd	dD	DD	d	D		
rs5762764	<i>CHEK2</i>	0.99	0.6602	A/G	119	165	63	0.42	46	51	11	143	73	0.34	73	114	52	260	218	0.46	
rs9534174	<i>BRCA2</i>	1	0.4488	G/A	108	165	75	0.45	42	51	16	135	83	0.38	66	114	59	246	232	0.49	
rs12450550	<i>EME1</i>	1	0.1328	A/G	193	125	30	0.27	70	34	5	174	44	0.2	123	91	25	337	141	0.29	
rs2516740	<i>NTHL1</i>	1	0.89	A/C	188	137	23	0.26	48	52	9	148	70	0.32	140	85	14	365	113	0.24	
rs1051740	<i>EPHX1</i>	0.99	0.6965	A/G	176	140	31	0.29	64	38	6	166	50	0.23	112	102	25	326	152	0.32	
rs17655	<i>ERCC5</i>	0.99	0.6456	G/C	209	118	19	0.23	74	29	4	177	37	0.17	135	89	15	359	119	0.25	
rs1012129	<i>BRCA2</i>	1	0.3306	C/G	100	182	66	0.45	38	57	14	133	85	0.39	62	125	52	249	229	0.48	
rs144848	<i>BRCA2</i>	1	0.1803	A/C	187	129	32	0.28	66	37	6	169	49	0.22	121	92	26	334	144	0.3	

Note: Chr.: chromosome; d: major allele; D: minor allele; HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium

CHEK2: checkpoint kinase 2; *BRCA2*: breast cancer 2, early onset; *EME1*: essential meiotic endonuclease 1 homolog 1 (*S. pombe*); *EPHX1*: epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic); *ERCC5*: Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5; *BRCA2*: breast cancer 2, early onset, *NTHL1*: Endonuclease III-like1, *NTHL1*

Table 3. SNPs associated with hepatocellular carcinoma risk according to cirrhosis etiologies in genetic additive model

Etiology of cirrhosis	SNPs	Chr.	Position	Gene	d	D	OR ((Dd) vs. (dd))	95% IC	OR ((DD) vs. Dd))	95% IC
Viral hepatitis	rs4986763	17	57115777	<i>BRIP1</i>	G	A	2.68	1.11 – 6.43	2.56	0.96 – 6.81
	rs4986764	17	57118128	<i>BRIP1</i>	G	A	2.71	1.13 – 6.46	2.37	0.88 – 6.34
	rs1557720	17	57141155	<i>BRIP1</i>	A	T	2.71	1.13 – 6.46	2.37	0.88 – 6.34
	rs11871785	17	57116487	<i>BRIP1</i>	A	G	0.45	0.21 – 0.96	0.38	0.09 – 1.45
	rs4986765	17	57118246	<i>BRIP1</i>	G	A	1.55	0.74 – 3.22	4.25	1.04 – 17.36
	rs2191248	17	57231133	<i>BRIP1</i>	G	A	1.5	0.71 – 3.15	2.4	0.77 – 7.45
Non-viral	rs5762764	22	27462989	<i>CHEK2</i>	A	G	0.71	0.43 – 1.16	0.47	0.22 – 0.98
	rs9534174	13	31791790	<i>BRCA2</i>	G	A	0.7	0.42 – 1.16	0.61	0.31 – 1.15
	rs12450550	17	45811191	<i>EME1</i>	A	G	0.66	0.4 – 1.07	0.54	0.18 – 1.51
	rs2516740	16	2037110	<i>NTHL1</i>	A	C	1.78	1.1 – 2.87	1.05	0.42 – 2.59
	rs1051740	1	224086255	<i>EPHX1</i>	A	G	0.65	0.4 – 1.05	0.64	0.24 – 1.69
	rs17655	13	102326002	<i>ERCC5</i>	G	C	0.59	0.35 – 0.98	0.82	0.25 – 2.66
	rs1012129	13	31868735	<i>BRCA2</i>	C	G	0.74	0.44 – 1.24	0.59	0.3 – 1.15
	rs144848	13	31804728	<i>BRCA2</i>	A	C	0.74	0.45 – 1.19	0.57	0.21 – 1.50

Note. Chr: chromosome; *BRIP1*: *BRCA1* interacting protein C-terminal helicase; d: Major allele, D: Minor allele; OR: odd ratio; CI: confidence interval

CHEK2: checkpoint kinase 2; *BRCA2*: breast cancer 2, early onset; *EME1*: essential meiotic endonuclease 1 homolog 1 (*S. pombe*); *EPHX1*: epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic); *ERCC5*: Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5; *NTHL1*: Endonuclease III-like1, *NTHL1*

a Additive model : DD versus Dd versus dd

Ultrafine particulate matter and high-level benzene urban air pollution in relation to oxidative DNA damage

Patrice H. Avogbe^{1,2}, Lucie Ayi-Fanou¹,
Herman Autrup³, Steffen Loft², Benjamin Fayomi⁴,
Ambaliou Sanni¹, Peter Vinzents² and Peter Møller^{2,5}

¹Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin, ²Institute of Public Health, University of Copenhagen, Denmark, ³Department of Environmental and Occupational Medicine, Aarhus University, Denmark and ⁴Unité d'enseignement et de recherche au travail et environnement, Faculté des Sciences de la Santé, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin

⁵To whom correspondence should be addressed
Email: p.moller@pubhealth.ku.dk

Air pollution, containing high-level of ultrafine particles (UFP) and benzene, is a prominent environmental health problem in many cities of the World. We investigated the level of oxidative DNA damage in mononuclear blood cells (MNBC) by the comet assay as DNA strand breaks (SB) and formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) sensitive sites in residents from three urban locations in Cotonou, Benin (taxi-moto drivers, subjects living near roads with intense traffic and suburban residents) and rural residents. Exposure was characterized by urinary excretion of S-phenylmercapturic acid (S-PMA), a biomarker of benzene exposure, and by ambient UFP. There were clear stepwise gradients with respect to ambient UFP, S-PMA excretion and oxidative DNA damage with rural subjects < suburban subjects < residents living near highly trafficked roads < taxi-moto drivers. Polymorphisms in glutathione peroxidase (GPX), NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and glutathione S-transferase (GST) genes were assessed for effect modification. Subjects with GSTT1 null genotype had lower urinary S-PMA excretion than subjects carrying the plus genotype. Urinary S-PMA excretion correlated with SB ($R = 0.17$) and FPG sites ($R = 0.25$) in MNBC. The correlation between S-PMA and SB was strongest in subjects with NQO1*1/*2 and *2/*2 genotypes ($R = 0.37$), and between S-PMA and FPG sensitive sites in subjects with the GSTP1*B/*B genotype ($R = 0.39$). In conclusion, this study shows that urban air with high levels of benzene and UFP is associated with elevated levels of SB and FPG sites in MNBC, and that NQO1 and GST genes may modulate the effect.

Introduction

Traffic-generated urban air pollution rich in benzene and particulate matter (PM) is a major health problem in many

large cities of developing countries because of widespread use of motorbikes and old automobiles for transportation. Vehicles with two-stroke engines are bound to emit large amounts of volatile organic compounds, polyaromatic hydrocarbons (PAH) and ultrafine particles (UFP), especially when using gasoline of poor quality. For example motorcycles with two-stroke engines emitted five times more benzene than four-stroke motorcycles did, depending on both the quality of fuel, type of engine and engine maintenance (1). Also, poorly maintained petrol powered cars emit blue smoke with high content of volatile organic compounds, including benzene (2).

High-dose exposure of benzene has been associated with a number of adverse health effects, including bone marrow depression and myelogenous leukemia in both rodents and humans (3), although epidemiologic evidence does not permit reliable conclusions following human exposure to the low level of benzene that typically is observed in environmental settings. Benzene undergoes hepatic metabolism, generating hydroquinone, phenol and other compounds with the ability of redox cycling, which may cause excess generation of reactive oxygen species (ROS) (4).

In most large cities, PM is an important constituent of urban air pollution, associated with increased mortality and morbidity of a number of prevalent diseases, including cancer (5). Especially the ultrafine fraction of PM of engine exhaust has received increased focus because of toxicological relevance and because it mainly is generated by local traffic whereas long-range transport is a major contributor to particles of larger size. The toxicological mechanism by which PM contributes to an excess risk is thought to be due to both the ability to directly cause generation of ROS and indirectly by causing inflammation (6). There is compelling evidence from animal experimental models that diesel exhaust particles generate oxidative DNA damage in the lung following pulmonary exposure (7–11).

Oxidative stress is typically assessed as elevated levels of oxidized biomolecules, e.g. oxidative DNA damage, which is relevant for carcinogenesis (12). Especially pre-mutagenic base oxidation products such as 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) have been extensively investigated in various humans tissues (13). For biomonitoring purposes, enzymic detection of DNA oxidation products by, e.g. the single cell gel electrophoresis (comet) assay or similar assays is an easier and more feasible approach (14,15). Oxidative DNA damage can be analyzed by the comet assay in mononuclear blood cells (MNBC) as strand breaks (SB) and formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) sensitive sites. The FPG protein, purified from *Escherichia coli*, recognizes a broad range of oxidized lesions of adenine and guanine, encompassing 8-oxodG, 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine. These lesions are excised from the DNA strand by the FPG protein, and the level of FPG sensitive sites thus are measured as additional SB. A recent study conducted in Copenhagen found that 8-oxodG was a suitable marker for assessing individual

Abbreviations: FPG, formamidopyrimidine DNA glycosylase; GPX, glutathione peroxidase; GLM, general linear model; GST, glutathione S-transferase; LSD, least statistical difference; MNBC, mononuclear blood cells; NQO1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1; 8-oxodG, 8-oxo-7,8 dihydro-2'-deoxyguanosine; PAH, polyaromatic hydrocarbons; PM, particulate matter; ROS, reactive oxygen species; S-PMA, S-phenylmercapturic acid; SB, strand breaks; UFP, ultrafine particles.

exposure to PM_{2.5} (16). Similarly, earlier studies have shown correlation between 8-oxodG and urinary excretion of S-phenylmercapturic acid (S-PMA), a metabolite and biomarker of internal dose of benzene (17–20). This effect was modulated by the NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) genotype, which can prevent redox cycling of benzene metabolites.

Previously, we have documented that the urban air in Cotonou city, the capital of the Republic of Benin, contained high levels of benzene (in excess of 70 µg/m³), which is markedly higher than 5 µg/m³ recommended by WHO (Ayi-Fanou *et al.*, unpublished). In a rural village, there were detectable concentrations of benzene in ambient air, and urine samples contained low, albeit detectable, concentrations of S-PMA. The aim of this study was to investigate the effect of high concentration of benzene and UFP in the urban air on the level of oxidative DNA damage in MNBC. To this end, we recruited three groups of subjects living and working in different areas of Cotonou with high ambient air pollution and a rural reference population, thus enabling a large exposure gradient. The widespread local behavior of self-administrated mixing of poor quality oil in gasoline, containing volatile hydrocarbons for two-stroke motorbikes, causes generation of excessive amounts of both UFP and volatile organic compounds, including benzene. Oxidative DNA damage in terms of SB and FPG sensitive sites was analyzed in MNBC. We measured the number of UFP at different locations in order to assess the contribution of these air pollution relevant constituents. Internal dose of benzene was assessed as urinary excretion of S-PMA. In comparison with earlier biomonitoring studies, we anticipated that the benzene exposure would be sufficiently high to allow reliable determination of the interactions between benzene exposure and genetic polymorphisms in relevant antioxidant and metabolism genes on the level of oxidative DNA damage. Effect modulation of air pollution or benzene exposure was investigated as polymorphisms that are associated with altered enzyme activity in glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPX) and NQO1 genes. The gene–environment interaction of polymorphisms in these metabolism and antioxidant defense genes has been investigated in many molecular epidemiology studies with cancer as the primary endpoint (21). These biomarkers of susceptibility also have proved to be of value as effect modifiers of exposure biomarkers in biomonitoring studies of air pollution (22).

Materials and methods

Subjects and sample collection

Healthy male non-smokers were recruited by announcement at a public meeting initiated to communicate the findings of a previous investigation of air pollution in Cotonou. The subjects were recruited into four groups based on residence and occupational setting. One group of subjects was recruited in a small village (Sohon) ~80 km from Cotonou. In Cotonou, three groups of residents were selected to give a wide range of exposure. The three groups are designated: taxi-moto drivers, roadside (consists of subjects living near roads with high intensity of traffic and occupation in Cotonou) and suburban [subjects living and working in a suburb (Godomey) of Cotonou]. The mean age ± SD (number of subjects) were: taxi-moto drivers (36 ± 6, *n* = 29), roadside residents (27 ± 8, *n* = 37), suburban (36 ± 13, *n* = 42) and rural (40 ± 12, *n* = 27). The sampling was carried out at each location and the samples were transported to the laboratory on ice. The sampling took place in January 2003, which is in the middle of the dry season. Subjects also answered a questionnaire related to variables that might influence biomarkers level, e.g. recent illnesses, job type, age and use of medication. The study was evaluated

and approved by the Benin Environmental Agency. All subjects signed an informed consent before entering the study.

Each subject delivered a 50 ml spot urine sample that was stored at –20°C until analysis, and 1 ml heparinized venous blood for isolation of MNBC. The venous blood was diluted with 1 ml PBS, and 200 µl Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway) was added underneath the diluted blood. MNBC were obtained by collection of the cell layer after centrifugation at 1650 *g* for 20 min (4°C), washed twice with cold PBS and centrifuged at 400 *g* for 15 min at 4°C. Most of the supernatant was removed and the pellet was re-suspended in 1 ml cold RPMI1640 (Gibco, Grand Island, NY) media supplemented with 50% fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY) and 10% dimethylsulfoxide (AppliChem, Darmstadt, Germany). The MNBC samples were stored at –80°C until analysis.

Ambient UFP

The number concentration of ambient UFP was measured continuously in six locations representing the four exposure groups on separate days by a portable condensation particle counter (TSI 3007; St Paul, MN). The apparatus has continuous measurement of the number of particles with 10–1000 nm in diameter (as number of particles per cubic centimeter). At the University of Copenhagen, we have found that the counting efficiency of the TSI 3007 instrument for particles with 40–200 nm in diameter was within ±10% of the efficiency of a reference instrument (TSI 3010; St Paul, MN). The counting efficiency has been reported as linear from 10³ counts/cm³ to 3 × 10⁵ counts/cm³ (23). The measurements were intended to span the period from early morning (before the first rush hour) to late evening (after the last rush hour). Because isopropanol needed to be loaded to the particle counter approximately every 4 h, the datasets consist of interrupted measurements of the length of ~4 h. The measurements in the suburb and the village were shorter because of time of transport to the locations. The particle counter was set to record UFP counts in 10-s periods. For presentation, the data are presented as average over 1 h.

Oxidative DNA damage

The level of SB and FPG sensitive sites in MNBC were analyzed by single cell gel electrophoresis (comet) assay as described previously (24). Briefly, cells were embedded in 0.75% low-melting point agarose (Sigma) on Gelbond films (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME), and lysed for a minimum of 1 h at 4°C (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris base, pH = 10, 1% Triton X-100). FPG sensitive sites were detected by incubation of the agarose-embedded nuclei with 1 µg/ml of FPG protein (kindly provided by Dr Andrew Collins, University of Oslo) for 45 min at 37°C. The nuclei were subsequently treated in alkaline solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH >13) for 40 min, and electrophoresed in the same solution at 4°C for 20 min, 25 V and 300 mA. The level of DNA damage was expressed as the mean percent fluorescence in the tail (%DNA in the tail) by the Komet 4.0 software system (Kinetic Imaging) in 50 cells. The net level of FPG sensitive sites was obtained as the difference in score between samples incubated with FPG protein and buffer. The level of DNA damage from each subject was analysed in duplicate. In each experiment (corresponding to one electrophoresis) one aliquot of control MNBC sample was included as assay control.

Urinary S-PMA

Determination of urinary S-PMA was carried out as described previously (18). In brief, the samples were thawed and adjusted to pH = 2. S-Benzylmercapturic acid (100 ng/ml) was added to the sample as an internal standard. The organic fraction of the urine was extracted with ethylacetate. After centrifugation at 2500 r.p.m. for 10 min, the ethylacetate layer (supernatant) was collected and dried by vacuum. The residue was dissolved in 1.25 M HCl (in methanol) and incubated for 30 min at 40°C. Subsequently the samples were evaporated under a gentle stream of nitrogen at 45°C. The residue was dissolved in dichloromethane and analyzed on a HP 6890 Series Gas Chromatography (GC) system coupled to a HP 5973 Mass Selective Detector. The results are expressed as ratio concentrations of S-PMA and creatinine determined by the Jaffé reaction in urine (µg S-PMA/g creatinine).

GSTM1, GSTP1, GSTT1, GPX and NQO1 genotypes

Genotypes of GPX (Pro¹⁹⁸Leu), GSTM1 (gene deletion), GSTP1 (Ile¹⁰⁵Val), GSTT1 (gene deletion) and NQO1 (Pro¹⁸⁷Ser) were determined as reported previously (18,25).

Statistics

All data were tested for normal distribution using the Shapiro–Wilks test. The groups were also tested for homogeneity of variance with Levene's test (*P* < 0.05). To fulfill the criteria for normality and homogeneity of variance, data on urinary S-PMA excretion was transformed by the natural logarithm with the base of 2.72 (denoted LogS-PMA below). Urine from five subjects did not contain detectable S-PMA and were given the value of 0.05 µg S-PMA/l,

which corresponds to half the detection limit ($0.1 \mu\text{g S-PMA/l}$). Differences in the distribution of gene polymorphisms between the groups were tested by χ^2 -test with $\alpha < 5\%$ as the significance level. Exposure–gene polymorphism relationships were analyzed by two different models, with group (model 1) and benzene (model 2) as exposure variables. In the statistical analysis, the NQO1*1/*2 and *2/*2 genotypes were combined, and the GPX*1/*2 and *2/*2 genotypes were combined, because of the small number of subjects with homozygous (*2/*2) genotypes in these genes. Statistical analysis of interactions between polymorphisms was not investigated because of insufficient power (i.e. lack of interactions would be due to type II statistical errors).

It is not possible from this study to discriminate directly between the effect of UFP and benzene because the UFP data were obtained on the group level. However, comparisons of the correlation coefficients provide a feasible estimate of the strength of the associations between different exposures and effects in terms of oxidative DNA damage. The correlation coefficients of models encompassing the group as categorical variables represent the contribution of air pollution as a complex mixture of UFP, benzene and other components, whereas statistical models with benzene and polymorphisms as variables represent the contribution of benzene exposure. The difference between these models may be viewed as follows: $R_{\text{group}} > R_{\text{LogS-PMA}}$ represents a description of the data where air pollution as a complex mixture provides a better explanation of the results than benzene. The magnitude of contribution of individual components in air pollution or interactions between components cannot be assessed by this approach.

Model 1. Group differences of urinary LogS-PMA excretion, and SB and FPG sensitive sites in MNBC were analyzed by general linear model (GLM) analysis with differences considered statistically significant at $\alpha < 5\%$ level, and post-hoc analysis as least significant difference (LSD) at $\alpha < 5\%$ level. We used GLM analysis on categorized data in order to obtain correlation coefficients (R) for comparison between different statistical models. The gene–environment interaction effect on the SB, FPG and LogS-PMA was investigated by GLM analysis with polymorphisms and group as categorical variables. The models were considered statistically significant at $\alpha < 1.67\%$ because data of polymorphism were evaluated on LogS-PMA, SB and FPG datasets (Bonferroni correction).

Model 2. The relationship between benzene exposure (LogS-PMA) and the level of DNA damage was investigated by GLM analysis with oxidative DNA damage as the dependent variable and LogS-PMA and polymorphisms as continuous and categorical variables, respectively. *P*-values of the GLM analysis were considered statistically significant at $\alpha < 2.5\%$ level, because data on polymorphisms were used for both SB and FPG sites (Bonferroni correction). Post-hoc analysis of the GLM models included linear regression analysis of LogS-PMA and DNA damage in stratified datasets of single genotypes.

The statistical analysis was performed in Statistica 5.5 for Windows, StatSoft (1997), Tulsa, OK.

Results

Ambient UFP

Measurements of the number concentration of UFP were carried out on five different locations in Cotonou and in a rural village (Figure 1). There was a large gradient in the concentration of UFP measured in the village, suburb, city background and near highly polluted streets. Moreover gradients in the exposure to UFP can also be discerned from the three measurements at the highly polluted streets. The intersection (street) measurement was obtained from a police stand in the middle of the intersection, whereas intersection (balcony) was obtained in first floor level near the intersection. A gradual decrease occurred during the morning of the day, and an increase in the late afternoon/evening, which most probably are due to complex meteorological explanations that include temperature (increasing during the day; increased UFP formation by condensation of aerosols in exhaust pipes) and wind speed (mainly greater wind speed in the late afternoon and evening; less sedimentation of UFP). However, alterations during the day are most pronounced at the most polluted sites, i.e. three small peaks in the measurement at the intersection (08.00–09.00, 13.00–14.00 and 19.00–20.00) coincide with rush hour.

Gene polymorphisms in GSTM1, GSTP1, GSTT1, GPX and NQO1

The distribution of genotypes of the metabolizing enzyme genes is outlined in Table I. There was a slight inhomogeneous distribution of most of the genes, although this was not statistically significant at $\alpha = 5\%$ level. The inhomogeneous distribution differed between the genotypes, e.g. it appears that taxi-moto drivers as a group contained slightly more subjects with the GSTP1*B/*B polymorphism. The GSTT1 genotype was almost equally distributed between the minus and plus genotype in three of the groups, whereas subjects in the suburban group had a 30 (minus) and 70% (plus) distribution. For the NQO1 polymorphism there is not a clear deviation in the

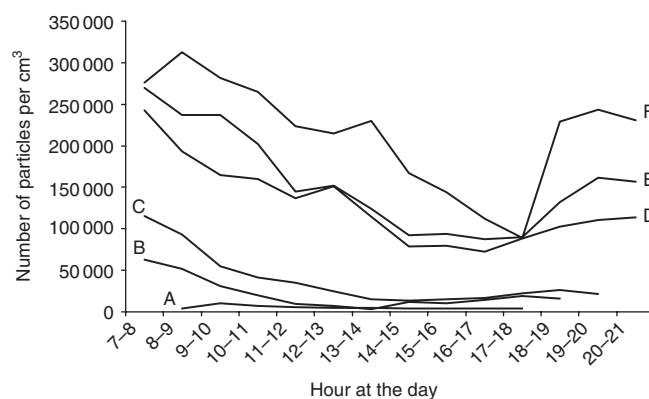


Fig. 1. Concentration of UFP at different locations (as numbers/cm³). Lines are rural (A), suburban (B), city background (C), intersection at balcony (D), traffic circle (E) and intersection in the street (F). The mean $\pm$ SD for a midday hourly sampling with $n = 360$ in each group was: rural, 6961 ± 3223 ; suburban, $19\,980 \pm 10\,798$; city background, $41\,230 \pm 5822$; intersection at balcony, $160\,194 \pm 56\,908$; traffic circle, $201\,691 \pm 49\,083$; and intersection in the street, $265\,145 \pm 76\,111$.

Table I. Distribution of polymorphisms in groups of subjects

Polymorphism	Taxi-moto drivers	Roadside	Suburban	Rural	Total	χ^2 -test
GSTT1						5.42
Minus	10	18	12	14	54 (45%)	
Plus	11	15	28	13	67 (55%)	
Missing	8	4	2	0	14	
GSTM1						5.78
Minus	9	5	12	10	36 (30%)	
Plus	12	28	28	17	85 (70%)	
Missing	8	4	2	1	14	
GSTP1						4.6
*A/*A	4	8	8	9	29 (22%)	
*A/*B	11	20	23	12	66 (50%)	
*B/*B	14	5	11	6	36 (27%)	
Missing	0	4	0	0	4	
GPX						0.25
*1/*1	14	16	21	12	63 (49%)	
*1/*2	13	15	17	12	57 (44%)	
*2/*2	2	2	4	1	9 (7%)	
Missing	0	4	0	2	6	
NQO1						5.95
*1/*1	19	22	33	12	86 (65%)	
*1/*2	9	12	8	11	40 (30%)	
*2/*2	1	0	1	4	6 (5%)	
Missing	0	3	0	0	3	

χ^2 -tests are not significant at 5% level.

distribution of subjects in one of the groups, except possibly for the distribution between the suburban and rural subjects.

Group effect and gene polymorphism modulation on urinary excretion of S-PMA (Model 1)

The results of urinary LogS-PMA excretion indicated that each of the four groups were statistically significantly different from the others (Figure 2; $P < 0.05$, post-hoc LSD). There was an obvious gradient in LogS-PMA excretion from the village to the most exposed subjects (taxi-moto drivers).

The effect of air pollution on LogS-PMA was investigated by GLM analysis with the group and polymorphisms as categorical variables. This showed single factor effects of the group and GSTT1 genotype (Table II). Stratification of the GSTT1 phenotype indicated that the GSTT1 null genotype was associated with lower (mean = 0.08 μg PMA/g creatinine, $n = 54$) urinary S-PMA excretion as compared with the GSTT1 plus phenotype (mean = 0.15 μg PMA/g creatinine, $n = 67$). Similar analysis of GSTM1, GSTP1, GPX or NQO1 genotypes revealed statistically non-significant interactions and non-significant single factor effects of the polymorphisms, whereas urinary LogS-PMA excretion showed statistically significant single-factor effect ($P < 0.001$, GLM).

Group effect and gene polymorphism on oxidative DNA damage in MNBC (Model 1)

The results of SB and FPG sensitive sites in MNBC are outlined in Figure 3. The mean $\pm$ SD of control MNBC

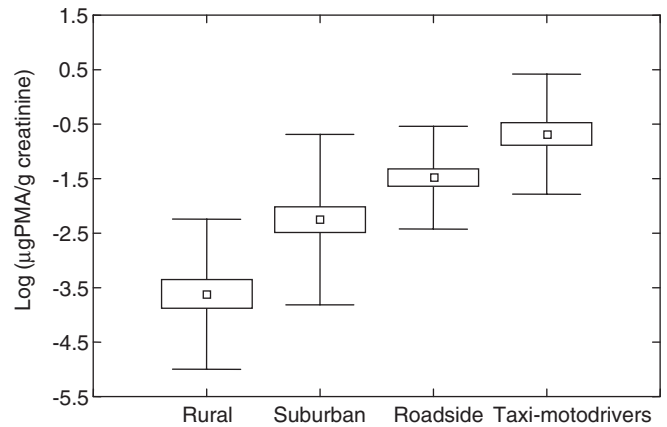


Fig. 2. Urinary S-PMA excretion per creatinine measured by GC-MS. GLM test is statistically significant ($P < 0.001$), and each group is different from the others (post-hoc LSD). Data are expressed as the mean (point) with SEM (boxes) and SD (whiskers).

Table II. Urinary S-PMA excretion stratified by group and GSTT1 polymorphism

Group	GSTT1 polymorphism	
	Minus	Plus
Taxi-moto drivers	0.55 $\pm$ 0.45	0.65 $\pm$ 0.48
Roadside	0.30 $\pm$ 0.38	0.45 $\pm$ 0.57
Suburban	0.10 $\pm$ 0.11	0.55 $\pm$ 1.87
Rural	0.04 $\pm$ 0.17	0.16 $\pm$ 0.42

GLM analysis for interaction between the group and polymorphism indicate single factor effects of the group ($P < 0.001$) and GSTT1 polymorphism ($P < 0.05$). Data are expressed as the mean $\pm$ SD S-PMA excretion (μg S-PMA/g creatinine).

samples was 1.35 ± 0.30 and 2.23 ± 0.98 for SB and FPG sensitive sites, respectively ($n = 14$). Simple comparison of differences between the groups revealed a weaker effect on SB ($R = 0.27$, $P < 0.05$, GLM) than on FPG sensitive sites ($R = 0.54$, $P < 0.01$, GLM). The rural population had a lower level of SB than the taxi-moto drivers ($P < 0.05$, post-hoc LSD) and roadside subjects ($P < 0.01$, post-hoc LSD). The taxi-moto drivers had a higher level of FPG sensitive sites than the other groups: roadside ($P < 0.01$, post-hoc LSD), suburban ($P < 0.001$, post-hoc LSD) and rural subjects ($P < 0.001$, post-hoc LSD). There was no significant difference in FPG sites between the roadside and suburban group, whereas both groups had higher levels of FPG sensitive sites than the rural subjects ($P < 0.001$ for both groups, post-hoc LSD).

The effect of air pollution on the SB and FPG was investigated by GLM analysis with polymorphisms and group as categorical variables. This statistical analysis indicated no interaction between single polymorphisms and the group. For the FPG sites, there were single factor effects of the group, whereas polymorphisms had no effect. This indicates that the variation in FPG sites was only explained by difference in exposure between the groups, which could be air pollution. No effect was observed for SB when the analysis included both polymorphism and the group; this is possible due to the lower statistical power when polymorphisms and the group are included as categorical variables.

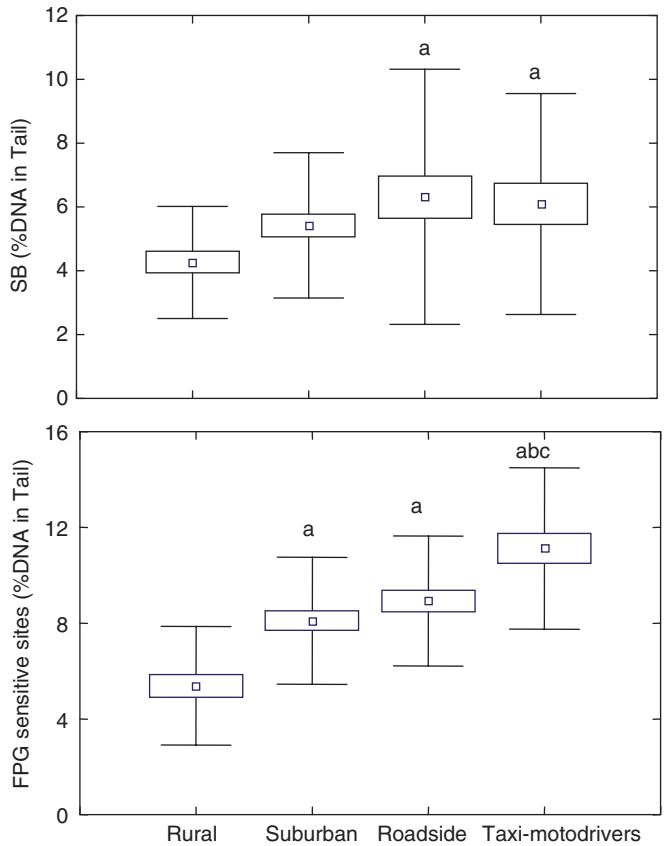


Fig. 3. SB and FPG sensitive sites in MNBC detected by the alkaline comet assay. GLM tests are statistically significant for SB ($P < 0.05$) and FPG sensitive sites ($P < 0.001$). Letters denote post-hoc LSD compared with the rural (a), roadside (b) and suburban (c) group. Data are expressed as the mean (point) with SEM (boxes) and SD (whiskers).

Table III. Correlation coefficients of models describing benzene-induced oxidative DNA damage and effect modification of polymorphism^a

Polymorphism	<i>n</i>	SB	FPG
LogS-PMA	135	0.17	0.25
LogS-PMA*GSTT1	121	0.27	0.27
LogS-PMA*GSTM1	121	0.28	0.25
LogS-PMA*GSTP1	131	0.21	0.37 ^b
*A/*A	29		0.15
*A/*B	66		0.18
*B/*B	36		0.39
LogS-PMA*GPX	129	0.21	0.24
LogS-PMA*NQO1	132	0.32 ^c	0.25
*1/*1	86	0.04	
*1/*2 and *2/*2	46	0.37	

^aAnalyzed by full factorial GLM test with LogS-PMA as continuous variable and polymorphism as categorical variable (Model 2). Values in the table refer to the correlation coefficient for the models. Models were considered statistically significant at $\alpha = 0.025$ value (Bonferroni correction).

^bSingle factor effect of LogS-PMA and GSTP1 polymorphism

($P < 0.01$). Post-hoc stratification indicates correlation between LogS-PMA and FPG sites in subjects with GSTP1*B/*B genotype.

^cInteraction between LogS-PMA and NQO1 polymorphism ($P < 0.01$).

Post-hoc stratification indicates correlation between LogS-PMA and SB in subjects with NQO1*1/*1 and *2/*2 heterozygote or mutation genotype.

Benzene-exposure and gene polymorphism modulation on oxidative DNA damage in MNBC (Model 2)

Linear regression of SB on LogS-PMA ($R = 0.17$, $P < 0.05$, linear regression) and of FPG on LogS-PMA ($R = 0.25$, $P < 0.01$, linear regression) indicated positive associations between benzene exposure and DNA damage. The correlation coefficients are lower than the corresponding values obtained when using the group in the analysis (0.27 and 0.54 for the SB and FPG sites, respectively), indicating that the group better predicts DNA damage in MNBC than benzene.

The statistical analysis of the interaction between benzene exposure and polymorphism on DNA damage is outlined in Table III. Stratification of the dataset according to genotypes showed an effect of NQO1 polymorphism on the benzene-induced SB, where the effect was entirely due to the *1/*2 and *2/*2 genotype showing a positive correlation ($R = 0.32$, $P < 0.01$, linear regression). For the GSTP1 genotype, there was single factor effect of both LogS-PMA and the polymorphism on the level of FPG sites in MNBC ($P < 0.01$, GLM). However, although non-significant by χ^2 -test, there appears to be an over-representation of subjects with the GSTP1*B/*B genotype among the taxi-moto drivers (49 vs 15–26% in the other groups), which may hamper direct comparison of differences in FPG sites related to the GSTP1 genotype because of differences in exposure. Stratification of the polymorphism indicated that subjects with GSTP1*B/*B genotype showed a positive correlation ($R = 0.39$, $P < 0.05$, linear regression), whereas correlations were non-significant in the other genotype-based subgroups.

Discussion

This study showed clear-cut elevated levels of SB and oxidative DNA base damage in MNBC of non-smoking subjects with an apparent dose-response relationship according to the gradient of exposure to air pollution from rural to urban areas. The level of oxidative DNA damage correlated with the benzene exposure gradient assessed by urinary S-PMA excretion. The level of ambient UFP also showed an exposure gradient

similar to that of benzene exposure. The levels of SB and oxidative DNA base damage in terms of FPG sensitive sites may be caused by different mechanisms, with the NQO1 polymorphism modifying induction of SB, and the GSTP1 polymorphism linked to FPG sensitive sites.

Traffic emission is the most important source of air pollution in Cotonou, Benin, both in terms of polyaromatic hydrocarbons and volatile organic compounds (Ayi-Fanou *et al.*, unpublished). There exist no objective measurements of the traffic density in Benin. Compared with Europe and North America, there are many motorbikes and many old cars, and congested traffic is normal in the rush hours. A previous investigation showed that the ambient concentrations of benzene, measured by personal monitors, were 3 and 76 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ for rural referents and taxi-moto drivers, respectively (Ayi-Fanou *et al.*, unpublished). Two groups of subjects living near traffic-dense roads were exposed to benzene at concentrations of 48 and 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Ayi-Fanou *et al.*, unpublished). We did not measure the ambient concentration of benzene in the present study, but this can be estimated by the S-PMA excretion because there is a strong correlation between ambient benzene concentration and S-PMA excreted in urine. Using the relationship reported by Ghittori *et al.* (17), the ambient benzene concentration estimated from the urinary S-PMA excretion (mean and 95% confidence intervals) is: 2 (0.9–4), 13 (7–27), 40 (26–62) and 121 (67–219) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ for rural, suburban, cityroad and taxi-moto drivers, respectively. The estimated ambient benzene concentrations are remarkably similar to the levels reported previously. It was not feasible in this study to analyze personal exposure of UFP because the apparatus used for personal sampling of UFP is vulnerable to shakes; this would interfere with the free motion of the subjects because the vehicles are heavily shaken due to the poor condition of many roads in Benin. The ambient concentration of UFP, measured as stationary locations was dependent on the traffic intensity, discerned as increases during rush hours and differences in UFP concentration between different locations. It should be noted that the particle measurements provide no information of the size distribution or toxicity of the UFP measured.

We found a positive correlation between urinary excretion of LogS-PMA and SB in subjects with the *1/*2 and *2/*2 NQO1 genotype, whereas the correlation between LogS-PMA and FPG sites did not depend on the NQO1 genotype. There was no difference in SB between taxi-moto drivers and residents living near polluted roads, although both of these groups had elevated SB compared with the rural subjects. This lack of dose-response relationship at the highest ambient benzene exposure cannot be explained by saturation of the comet assay or different distribution of NQO1 polymorphism. Previously, low-dose urban benzene exposure has indicated a positive correlation between urinary S-PMA excretion and 8-oxodG in lymphocytes of subjects living in Copenhagen, Denmark, whereas no correlation was observed with SB (16). Considering that the level of SB was only slightly elevated in the present study despite the wide benzene exposure gradient, the lack of effect seen in Copenhagen could be due to the exposure being below the detection limit for this biomarker. Similar results have been reported from subjects in Rome, Italy where urban benzene and particle exposure was not associated with differences in SB in MNBC (26). However, gasoline station attendants had higher levels of SB in MNBC than non-benzene exposed referents (27). Correlations have been reported

between *trans, trans*-muconic acid (benzene exposure biomarker) and SB, and urinary 1-hydroxypyrene (PAH exposure biomarker) and SB in subjects from areas polluted by lead smelter and waste incinerator plants (28). It is worthwhile to consider that these exposure situations differ from urban air settings and the effect may be due to co-exposure of other air pollution constituents, i.e. benzene may be a proxy-measure of other active components in the environment. Occupational benzene exposure was associated with increased SB in Chinese subjects (29,30). The effect may be more apparent in the Asian population because the susceptibility-associated allele of NQO1 (corresponding to the *2 allele) is more prevalent than among Caucasians. The statistical analysis in this study showed that the elevated level of SB could in part be related to the gene-environment interaction involving the NQO1 since the correlation coefficient increased by incorporation of both benzene and NQO1 in the model ($R_{\text{LogS-PMA}} = 0.17$, $R_{\text{group}} = 0.27$, $R_{\text{LogS-PMA/NQO1}} = 0.32$). NQO1 is a phase II enzyme responsible for the detoxification of quinones, which otherwise may produce ROS by redox cycling. Subjects with the *2/*2 genotype of the NQO1 gene are devoid of hydroquinone-induced enzyme activity, whereas subjects with the *1/*2 genotype have less enzyme activity compared with subjects with the *1/*1 genotype, indicating an inability of subjects with the *2 allele to detoxify benzene metabolites (31). It is probable that excessive amounts of quinone metabolites of benzene generate ROS that ultimately damage DNA by forming SB. The biologic implication of the NQO1 polymorphism can be inferred from observations that subjects with the NQO1*1/*2 genotype appear to be significantly over represented among patients with adult leukemia (32). Also, studies from China have shown that subjects with the NQO1*2/*2 genotype had higher risk of occupationally caused benzene poisoning, although this also depended on concomitant genetic constitution of other metabolic genes such as GSTT1 and CYP2E1 (33,34).

Animal experimental models have shown elevated FPG sites and 8-oxodG in MNBC and bone marrow cells of mice exposed to high dose of benzene (35–37). The present study showed a positive correlation between benzene exposure and FPG sites in MNBC of subjects with GSTP1*B/*B genotype. This is possible through a mechanism of GSTP1-mediated glutathione conjugation of benzene, which could alter the toxicity of some of the DNA damaging reactive intermediates generated from benzene metabolism. However, the highest correlation coefficient was achieved for the model with the group as the only variable, whereas models with LogS-PMA or LogS-PMA/GSTP1 produced lower correlation coefficients ($R_{\text{group}} = 0.54$, $R_{\text{LogS-PMA}} = 0.25$, $R_{\text{LogS-PMA/GSTP1}} = 0.37$). It is probable that other components than benzene in air pollution contribute to the elevated level of FPG sites in the exposed subjects; UFP exposure is a probable variable explaining the variation in FPG sensitive sites. Alternatively, the low correlation coefficient could be because of non-linear genotype-exposure interactions, as has been observed for, e.g. the effect modification of GSTM1 and *N*-acetyltransferase 2 polymorphisms on the level of DNA adducts in PAH-exposed subjects (21). The GSTP1 enzyme is a phase II metabolism protein that is involved in the detoxification of PAH compounds, and most studies of the GSTP1 polymorphisms have concentrated on PAH exposures. Topical application of PAH (7,12-dimethylbenzanthracene) has been associated with markedly higher skin cancer incidence in GSTP1 null mice

compared with wild-type mice (38), indicating a significant role of GSTP1 in PAH-induced carcinogenesis. In humans, a meta-analysis of eight case-control studies has shown increased odds ratio for lung cancer among subjects having the GSTP1*B/*B phenotype (39). Although associations between GSTP1 polymorphism with other cancer sites have been investigated, the results are conflicting and warrant formal meta-analysis before conclusions should be made. The effect of the polymorphism is not easily interpreted because it appears to cause opposite catalytic efficiency toward planar and non-planar PAH compounds, and this is to some extent dependent on other polymorphisms in the GSTP1 gene (40). To the best of our knowledge, there are no studies published from experimental animal models of PAH-induced FPG sites or 8-oxodG. A recent biomonitoring study showed that subjects with GSTP1*B/*B genotype who smoked had about twice the level of FPG sites in MNBC compared with non-smokers with that genotype, whereas there were no effects of smoking among subjects with GSTP1*A/*A or *A/*B genotype (41). Human PAH-rich exposure circumstances are typically complex with co-exposure from UFP or other constituents that induce oxidative DNA damage.

GSTT1 is normally involved in the detoxification of small molecules. Thus, the association of GSTT1 polymorphism with LogS-PMA excretion indicates that this polymorphism is involved in the glutathione conjugation of benzene. The results support recent results of benzene-exposed Estonian oil shale mine workers where subjects carrying GSTT1 plus genotype had higher urinary S-PMA excretion compared with subjects with the minus genotype (20). Studies of Italian bus drivers and Copenhagen residents, who had lower benzene exposure than observed in the present study, showed no effect of GSTT1 genotype on urinary S-PMA excretion (18,42). Collectively, we can conclude from these data: that GSTT1-mediated glutathione conjugation of benzene with subsequent urinary S-PMA excretion is important across ethnic groups; that the effect is dose-dependent with only effect observed above a moderate ambient benzene concentration. The biological consequence of the GSTT1 polymorphism is difficult to predict because it is involved both in activation and detoxification of environmental carcinogens, and there has been no consistent associations between the GSTT1 genotype and cancer risk (21).

By means of X-ray calibration curves as done by, e.g. the European Standards Committee on Oxidative DNA Damage, the mean $\pm$ SD level of FPG modifications per diploid cell with 4×10^{12} dalton DNA can be calculated to 650 ± 160 , 1110 ± 188 , 1250 ± 198 and 1620 ± 310 for the subjects in the rural, suburb, roadside and taxi-moto driver groups, respectively. These values are similar to other estimations of FPG modifications in lymphocytes, i.e. 870 lesions/cell (43), 1100 lesions/cell (0.28 lesions/ 10^9 dalton) (44), 1375 lesions/cell (0.23 lesions/ 10^6 bp) (45), 1440 lesions/cell (0.24 lesions/ 10^6 bp) (46) and 3500 lesions/cell (1.33 lesions/ 10^6 bp) (47). Our estimation of FPG lesions also are similar to the consensus of baseline FPG modifications in lymphocytes, i.e. 790–1100 lesions per diploid cell (assuming consensus of 0.3–4.2 modifications/ 10^6 dG) (48). These data indicate that the level of oxidative DNA damage in this study are within the range that many laboratories in recent years have reported as the basal level of oxidative DNA damage in MNBC.

Polymorphisms in metabolism or antioxidant enzymes are sparsely investigated in African populations. Presently, it is

difficult to draw firm conclusions of the distribution of most of the genotypes in the African population as has been done for Caucasians, because too few studies have been published to establish reliable meta-analysis. The GSTM1 genotype probably is the most studied polymorphism; the distribution of GSTM1 genotypes in this study was similar to that observed in an African control population, i.e. the frequencies are 27 and 73% for the null and plus genotypes, respectively (49). Also, the predominance of subjects with the homozygous NQO1*1/*1 genotype is similar to that observed (61%) among African-Americans (50). The distribution of GSTP1 genotypes was consistent with distribution among American-Africans [19% (*B/*B), 46% (*A/*B) and 35% (*A/*A) (51)], and east African (Gambia) subjects [21% (*B/*B), 66% (*A/*B) and 13% (*A/*A) (52)] whereas the distribution differed from South and East African populations who had frequencies of 7% (*B/*B), 25% (*A/*B) and 68% (*A/*A) (53).

In conclusion this study showed that subjects living in an urban setting heavily polluted by traffic emissions had high levels of oxidative DNA damage in MNBC. The effect of air pollution clearly was more pronounced on FPG sensitive sites than SB, and the magnitude of effect on these endpoints appeared to be influenced by gene polymorphisms in GSTP1 and NQO1, respectively.

Acknowledgements

The authors thank all the volunteers who agreed to participate in this study. The study was partially supported by a grant of the Beninese Agency for Environment of the Ministry of Environment, Housing and Town Planning, Republic of Benin. The Danish Embassy in Benin Republic provided the major financial support for this study, through its program on Health Research and Environmental Pollution in Benin Republic. Mr Patrice Avogbe is a recipient of a fellowship of the Danish Embassy in Benin Republic. Analysis performed in Benin Republic was carried out in the Institut de Sciences Biomedicales Appliquees (ISBA). We thank Annie Jensen and Anna Hansen for excellent technical support.

References

- Leong, S.T., Muttamara, S. and Laortanakul, P. (2002) Influence of benzene emission from motorcycles on Bangkok air quality. *Atmospheric Environ.*, **36**, 651–661.
- Baumbach, G., Vogt, U., Hein, K.R.G., Oluwole, A.F., Ogunsola, O.J., Olaniyi, H.B. and Akeredolu, F.A. (1995) Air pollution in a large tropical city with a high traffic density—results of measurements in Lagos, Nigeria. *Sci. Total Environ.*, **169**, 25–31.
- Hayes, R.B., Songnian, Y., Dosemeci, M. and Linet, M. (2001) Benzene and lymphohematopoietic malignancies in humans. *Am. J. Ind. Med.*, **40**, 117–126.
- Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G. and Monks, T.J. (2000) Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 135–160.
- Borm, P.J., Schins, R.P. and Albrecht, C. (2004) Inhaled particles and lung cancer, part B: paradigms and risk assessment. *Int. J. Cancer*, **110**, 3–14.
- Knaapen, A.M., Borm, P.J., Albrecht, C. and Schins, R.P. (2004) Inhaled particles and lung cancer. Part A: mechanisms. *Int. J. Cancer*, **109**, 799–809.
- Nagashima, M., Kasai, H., Yokota, J., Nagamachi, Y., Ichinose, T. and Sagai, M. (1995) Formation of an oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in mouse lung DNA after intratracheal instillation of diesel exhaust particles and effects of high dietary fat and beta-carotene on this process. *Carcinogenesis*, **16**, 1441–1445.
- Ichinose, T., Yajima, Y., Nagashima, M., Takeshita, S., Nagamachi, Y. and Sagai, M. (1997) Lung carcinogenesis and formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in mice by diesel exhaust particles. *Carcinogenesis*, **18**, 185–192.
- Sato, H., Sone, H., Sagai, M., Suzuki, K.T. and Aoki, Y. (2000) Increase in mutation frequency in lung of Big Blue rat by exposure to diesel exhaust. *Carcinogenesis*, **21**, 653–661.
- Møller, P., Daneshvar, B., Loft, S., Wallin, H., Poulsen, H.E., Autrup, H., Ravn-Haren, G. and Dragsted, L.O. (2003) Oxidative DNA damage in vitamin C supplemented guinea pigs after intratracheal instillation of diesel exhaust particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **189**, 39–44.
- Risom, L., Dybdahl, M., Bornholdt, J., Vogel, U., Wallin, H., Møller, P. and Loft, S. (2003) Oxidative DNA damage and defence gene expression in the mouse lung after short-term exposure to diesel exhaust particles by inhalation. *Carcinogenesis*, **24**, 1847–1852.
- Jackson, A.L. and Loeb, L.A. (2001) The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat. Res.*, **477**, 7–21.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M. and Lunec, J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.*, **17**, 1195–1214.
- ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage) (2003) Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus. *Carcinogenesis*, **23**, 2129–2133.
- ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage) (2003) Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods. *Free Radic. Biol. Med.*, **34**, 1089–1099.
- Sørensen, M., Autrup, H., Hertel, O., Wallin, H., Knudsen, L.E. and Loft, S. (2003) Personal exposure to PM_{2.5} and biomarkers of DNA damage. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **12**, 191–196.
- Ghittori, S., Imbriani, M., Maestri, L., Capodaglio, E. and Cavalleri, A. (1999) Determination of S-phenylmercapturic acid in urine as an indicator of exposure to benzene. *Toxicol. Lett.*, **108**, 329–334.
- Sørensen, M., Skov, H., Autrup, H., Hertel, O. and Loft, S. (2003) Urban benzene exposure and oxidative DNA damage: influence of genetic polymorphisms in metabolic genes. *Sci. Total Environ.*, **309**, 69–80.
- Melikian, A.A., Qu, Q., Shore, R. et al. (2002) Personal exposure to different levels of benzene and its relationships to the urinary metabolites S-phenylmercapturic acid and trans,trans-muconic acid. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **778**, 211–221.
- Sørensen, M., Poole, J., Autrup, H., Muzyka, V., Jensen, A., Loft, S. and Knudsen, L.E. (2004) Benzene exposure assessed by metabolite excretion in Estonian oil shale mine workers: influence of GST polymorphisms. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **13**, 1729–1735.
- Autrup, H. (2004) Gene–environment interaction in environmental carcinogenesis. In Nicolopoulou-Stamati, P., Hens, L., Howard, V.C. et al. (ed.) *Cancer as an Environmental Disease*. Kluwer, Dordrecht, NL.
- Sørensen, M., Autrup, H., Møller, P., Hertel, O., Jensen, S.S., Vinzents, P., Knudsen, L.E. and Loft, S. (2003) Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat. Res.*, **544**, 255–271.
- Hämeri, K., Koponen, I.K., Aalto, P.P. and Kulmala, M. (2002) The particle detection efficiency of the TSI-3007 condensation particle counter. *J. Aerosol Sci.*, **33**, 1463–1469.
- Møller, P., Vogel, U., Pedersen, A., Dragsted, L.O., Sandström, B. and Loft, S. (2003) No effect of 600 g fruit and vegetables per day on oxidative DNA damage and repair in healthy human non-smokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **12**, 1016–1022.
- Vogel, U., Olsen, A., Wallin, H., Overvad, K., Tjønneland, A. and Nexø, B.A. (2004) No association between GPX Pro198Leu and risk of basal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **13**, 1412–1413.
- Carere, A., Andreoli, C., Galati, R. et al. (2002) Biomonitoring of exposure to urban pollutants: analysis of sister chromatid exchanges and DNA lesions in peripheral lymphocytes of traffic policemen. *Mutat. Res.*, **518**, 215–224.
- Andreoli, C., Leopardi, P. and Crebelli, R. (1997) Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites. *Mutat. Res.*, **377**, 95–1044.
- Staessen, J.A., Nawrot, T., Hond, E.D. et al. (2001) Renal function, cytogenetic measurements, and sexual development in adolescents in relation to environmental pollutants: a feasibility study of biomarkers. *Lancet*, **357**, 1660–1669.
- Lam, T.H., Zhu, C.Q. and Jiang, C.Q. (2002) Lymphocyte DNA damage in elevator manufacturing workers in Guangzhou, China. *Mutat. Res.*, **515**, 147–157.
- Sul, D., Lee, D., Im, H., Oh, E., Kim, J. and Lee, E. (2002) Single strand DNA breaks in T- and B-lymphocytes and granulocytes in workers exposed to benzene. *Toxicol. Lett.*, **134**, 87–95.
- Moran, J.L., Siegel, D. and Ross, D. (1999) A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 8150–8155.

32. Larson, R.A., Wang, Y., Banerjee, M., Wiemels, J., Hartford, C., Le Beau, M.M. and Smith, M.T. (1999) Prevalence of the inactivating 609C→T polymorphism in the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia. *Blood*, **94**, 803–807.
33. Rothman, N., Smith, M.T., Hayes, R.B. *et al.* (1997) Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1 609C→T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone. *Cancer Res.*, **57**, 2839–2842.
34. Wan, J., Shi, J., Hui, L., Wu, D., Jin, X., Zhao, N., Huang, W., Xia, Z. and Hu, G. (2002) Association of genetic polymorphisms in CYP2E1, MPO, NQO1, GSTM1, and GSTT1 genes with benzene poisoning. *Environ. Health Perspect.*, **110**, 1213–1218.
35. Tuo, J., Loft, S. and Poulsen, H.E. (1999) Enhanced benzene-induced DNA damage in PMA-stimulated cells *in vitro* and in LPS-treated animals. *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 801–808.
36. Tuo, J., Deng, T., Loft, S. and Poulsen, H.E. (1999) Dexamethasone ameliorates oxidative DNA damage induced by benzene and LPS in mouse bone marrow. *Free Radic. Res.*, **30**, 29–36.
37. Vestergaard, S., Loft, S. and Møller, P. (2002) Role of inducible nitrogen synthase in benzene-induced oxidative DNA damage in the bone marrow of mice. *Free Radic. Biol. Med.*, **32**, 481–484.
38. Henderson, C.J., Smith, A.G., Ure, J., Brown, K., Bacon, E.J. and Wolf, C.R. (1998) Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 5275–5280.
39. Stucker, I., Hirvonen, A., de, W., I., Cabelguenne, A., Mitrunen, K., Cene, S., Koum-Besson, E., Hemon, D., Beaune, P. and Lorient, M.A. (2002) Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases as modulators of lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, **23**, 1475–1481.
40. Hu, X., Xia, H., Srivastava, S.K., Pal, A., Awasthi, Y.C., Zimniak, P. and Singh, S.V. (1998) Catalytic efficiencies of allelic variants of human glutathione S-transferase P1-1 toward carcinogenic anti-diol epoxides of benzo[c]phenanthrene and benzo[g]chrysene. *Cancer Res.*, **58**, 5340–5343.
41. Dusinska, M., Ficek, A., Horska, A. *et al.* (2001) Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. *Mutat. Res.*, **482**, 47–55.
42. Rossi, A.M., Guarnieri, C., Rovesti, S., Gobba, F., Ghittori, S., Vivoli, G. and Barale, R. (1999) Genetic polymorphisms influence variability in benzene metabolism in humans. *Pharmacogenetics*, **9**, 445–451.
43. Collins, A.R., Duthie, S.J., Fillon, L., Gedik, C.M., Vaughan, N. and Wood, S.G. (1997) Oxidative DNA damage in human cells: the influence of antioxidants and DNA repair. *Biochem. Soc. Trans.*, **25**, 326–331.
44. Collins, A.R., Dusinska, M., Gedik, C.M. and Stetina, R. (1996) Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ. Health Perspect.*, **104** (suppl. 3), 465–469.
45. Merzenich, H., Hartwig, A., Ahrens, W., Beyersmann, D., Schlepegrell, R., Scholze, M., Timm, J. and Jöckel, K.-H. (2001) Biomonitoring on carcinogenic metals and oxidative DNA damage in a cross-sectional study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **10**, 515–522.
46. Pflaum, M., Will, O. and Epe, B. (1997) Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis*, **18**, 2225–2231.
47. Gedik, C.M., Boyle, S.P., Wood, S.G., Vaughan, N.J. and Collins, A.R. (2002) Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage. *Carcinogenesis*, **23**, 1441–1446.
48. Collins, A.R., Cadet, J., Moller, L., Poulsen, H.E. and Vina, J. (2004) Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch. Biochem. Biophys.*, **423**, 57–65.
49. Garte, S., Gaspari, L., Alexandrie, A.K. *et al.* (2001) Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **10**, 1239–1248.
50. Wiencke, J.K., Spitz, M.R., McMillan, A. and Kelsey, K.T. (1997) Lung cancer in Mexican-Americans and African-Americans is associated with the wild-type genotype of the NAD(P)H: quinone oxidoreductase polymorphism. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **6**, 87–92.
51. Watson, M.A., Stewart, R.K., Smith, G.B., Massey, T.E. and Bell, D.A. (1998) Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*, **19**, 275–280.
52. Wild, C.P., Yin, F., Turner, P.C., Chemin, I., Chapot, B., Mendy, M., Whittle, H., Kirk, G.D. and Hall, A.J. (2000) Environmental and genetic determinants of aflatoxin-albumin adducts in the Gambia. *Int. J. Cancer*, **86**, 1–7.
53. Dandara, C., Sayi, J., Masimirembwa, C.M., Magimba, A., Kaaya, S., De Sommers, K., Snyman, J.R. and Hasler, J.A. (2002) Genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1 (Cyp1A1) and glutathione transferases (M1, T1 and P1) among Africans. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **40**, 952–957.

Received September 1, 2004; revised November 15, 2004;
accepted November 23, 2004

DNA-Adducts in Subjects Exposed to Urban Air Pollution by Benzene and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Cotonou, Benin

Lucie Ayi-Fanou,¹ Patrice H. Avogbe,¹ Benjamin Fayomi,² Gerard Keith,³ Codjo Hountondji,⁴ Edmond E. Creppy,^{5*} Herman Autrup,⁶ Bertrand Henri Rihn,⁷ Ambaliou Sanni¹

¹Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, FAST/UAC, Bénin

²Unité d'Enseignement et de Recherche au Travail et Environnement, FSS/UAC, Bénin

³Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France

⁴Laboratoire de Photobiologie Moléculaire, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

⁵Laboratory of Toxicology and Applied Hygiene, University of Bordeaux2 Victor segalen, Bordeaux

⁶Department of Environmental and Occupational Medicine, Institut of Public Health, University of Aarhus, Denmark

⁷EA 3452, Nancy-University, Nancy, France

Received 6 April 2009; revised 19 July 2009; accepted 21 July 2009

ABSTRACT: Air pollution effect on humans represents a major public health problem. Exposure to genotoxic compounds in the ambient air is evaluated using different biomarkers. In the present study we assessed DNA-adducts levels in apparently healthy people living and working in the city of Cotonou (Benin) in which exposure to air pollutants such as benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) mainly benzo(a)pyrene has been evidenced. Rural inhabitants were enrolled as control group. Taxi-motorbike drivers, street food vendors, and gasoline salesmen were recruited in Cotonou whereas suburban residents were recruited in Godomey, 12 km from Cotonou. We found that taxi-motorbike drivers, road-side residents, street vendors, taxi-motor-bike drivers and gasoline sellers had significantly higher levels of DNA-adducts than suburban and village inhabitants ($P < 0.001$; *post hoc*, LSD). Means values were 24.6 ± 6.4 , 23.78 ± 6.9 , 34.7 ± 9.8 , and 37.2 ± 8.1 in the exposed groups *versus* 2.1 ± 0.6 and 3.1 ± 0.8 adducts/ 10^8 nucleotides, in the two control groups, respectively. We did not find any significant difference within the high exposure groups and inside low exposure subgroups (namely suburban residents and villagers) because the mean individual exposure values to both PAHs and benzene were similar among subjects exposed in the city of Cotonou and those in suburban and village areas. However, there is significant interindividual variations in adducts levels that may reflect variation of genetic susceptibility factors.

*Correspondence to: Prof. E. E. Creppy; e-mail: edmond.creppy@tox.u-bordeaux2.fr

Contract grant sponsors: Denmark Republic (DANIDA Institution), Benin Republic (Ministère de l'environnement, de l'Habitat et de l'Urbanisme, MEHU), and France Republic (IBMC Strasbourg)

Published online 15 December 2009 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/tox.20533

© 2009 Wiley Periodicals, Inc.

Ranges of adduct level/ 10^8 nucleotides were: 1–69, 1–76, 3–169, 4–124, 0–9, 0–8 adducts/ 10^8 for taxi-motorbike drivers, roadside residents, street vendors, gasoline sellers, suburban and village inhabitants, respectively. Our study demonstrated a clear-cut elevated level of DNA adducts in city residents than in none exposed people (or very low exposure levels people) and designate these city residents groups as people at risks for the chronic diseases possibly caused by benzene and PAHs. © 2009 Wiley Periodicals, Inc. *Environ Toxicol* 26: 93–102, 2011.

Keywords: air pollution; PAHs; benzene; exposed and none exposed subjects; DNA-adducts; ^{32}P postlabelling

INTRODUCTION

Epidemiologic studies published over the past years reported that exposure to ambient air pollution may be associated with increased risk of developing several chronic diseases including cancer in the general population. Human exposure occurs through inhalation of environmental cancer-causing pollutants such as, fossil fuel incomplete combustion products, benzene and PAHs.

Due to an absence of reliable public transportation, more than 80,000 motorbikes circulate in Cotonou (Ayi-Fanou et al., 2006). In the year 2000, the Ministry of Environment, House and Town Planning, estimated the number of all types of vehicles to be about 250,000 in the city of Cotonou, most of them were very often in bad mechanical state.

It has been demonstrated recently that ambient air in Cotonou, the economical capital of Benin, is heavily contaminated with various air pollutants (Ayi-Fanou et al., 2006). The main pollutants were benzene at concentrations of $76.0 \pm 26.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in Cotonou, compared with $3.4 \pm 3.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in villages located far from Cotonou. This benzene concentration in the air largely exceeded the $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ recommended by World Health Organization (WHO IARC 1983) and polycyclic aromatic hydrocarbons (total PAHs) at concentrations of $103 \text{ ng}/\text{m}^3$ in Cotonou *versus* $1.6 \text{ ng}/\text{m}^3$ in villages. It is well known that prolonged exposure to benzene causes a serious damage to hematopoiesis resulting in aplastic anemia and sometimes in blood cancers (Rinsky et al., 1987).

PAHs are among the major carcinogenic agents which have been associated to an increased risk of respiratory and

neoplastic diseases since 1983 (WHO, 1983). PAHs in general and benzene at a lesser extend are capable of forming DNA-adducts following metabolic activation. The capacity of DNA-adducts formation by benzene is evidenced by its covalent binding index of 10 (Arfellini et al., 1985). The DNA-adduct are predominantly formed with guanine or adenine (Nielsen et al., 1996a; Ayi-Fanou et al., 2006). In addition PAHs as well as volatile organic compounds (VOCs), such as benzene are capable of inducing oxidized bases in the DNA through reactive oxygen species production. These oxidized DNA bases are known to be highly mutagenic, (Collins, 1999).

Exposure to those genotoxic compounds is currently assessed using the DNA ATP- γ ^{32}P -postlabeling method of Randerath or personal monitoring of ambient air pollution (Keith and Dirheimer, 1995; Randerath et al., 1999; Ayi-Fanou et al., 2006; Avogbe et al., 2005), both methods qualified for risk assessment. A dose–response relationship between the amounts of bulky DNA-adducts and the levels of PAHs in both occupational conditions and in the general environment have been reported (Schoket et al., 1998). Moreover a study carried out in Copenhagen bus drivers, occupationally exposed to high ambient air pollution by PAHs, revealed significant DNA adducts levels in drivers working in central Copenhagen compared with those driving in the suburbs (Nielsen et al., 1996b).

The objective of the present study was to investigate the relationship between the levels of DNA-adducts as biomarkers of the exposure to PAHs using the ATP- γ ^{32}P postlabeling method in order to evaluate the risk for those exposed to these toxicants in the ambient air. In this purpose four target populations have been selected inside the city of Cotonou, namely taxi-motorbike drivers, roadside subjects, street vendors, gasoline salesmen who were compared with suburban residents and rural inhabitants.

MATERIALS AND METHODS

Subjects Recruitment

The study group consisted of 94 healthy consenting volunteers. Except the village participants all others subjects were recruited in the city of Cotonou, e.g., of taxi-motorbike drivers who use to drive daily for at least 8 h in

Abbreviations

ABE	Benin Environmental Agency
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	adenosine triphosphate labelled on phosphate γ
B(a)P	benzo(a)pyrene
EDTA	ethylen diamine tetraacetic
DNA	Deoxy ribonucleic acid
GST	glutathion-S-transferase
1-(HOP)	1-hydroxypyrene (1-HOP)
LSD	least standard deviation
LsD	least significant difference
PAHs	polycyclic aromatic hydrocarbons
PEI	polyethyleneimine
SB DNA	strand break
TLC	thin layer chromatography
UFP	ultrafine particulate
VOCs	volatil organic compounds
WHO	World Health Organization

Cotonou, subjects living near polluted crossroads, such as Marina called "roadside residents," street food vendors, and people selling gasoline for the whole day nearby crossroads with high traffic intensity according to the previously published data (Ayi-Fanou et al., 2006). Some suburb residents of Godomey have been selected as representing an intermediate exposure condition. Each participant completed a consent form and answered questionnaire that provides the following information, age, and sex, history of tobacco use, and health status. Participants were divided into putative two groups, based on the level of exposure following the data obtained by Ayi-Fanou et al. (2006) before the individual exposure evaluation. The low exposure group consisted of suburban subjects and the village residents and the other four were considered as high exposure group. The study was approved by the Benin Environmental Agency (ABE).

Samples Collection

Venous blood samples were collected in Vacutainer EDTA[®] tubes during a period of 1 week in 2003. For comparison purpose of DNA-adduct levels in the general population, we sampled subjects from the village of Sohon that lies about 80 km far from Cotonou, as a control group. Samples were transported to the laboratory on ice. Upon arrival at the laboratory of Biochemistry and Molecular Biology in Cotonou, lymphocytes were isolated within 3 h using Ficoll-plaque Plus[™] procedure (Eurobio) and were stored frozen at -20°C until DNA extraction.

Air Sampling

Air sampling has been performed during at least 6 h per day using a glass fiber filter and a Chromosorb 102 solid sorbent tube. The samples have been analyzed for total PAHs and Benzo(a)pyrene, by high performance liquid chromatography (HPLC), and spectrofluorometric detection (SFD).

Urine Samples

Collection of spot urine samples was performed between 4 and 6 p.m. (i.e., after at least 8 h in the polluted air). Then 1-hydroxypyrene was separated by HPLC and quantified using a Spectrofluorometric detector.

PAHs and (B(a)P Analysis in Ambient Air

Attempts were made to measure 13 PAHs (naphthalene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benz(a)anthracene, chrysene, benzo(e)pyrene, perylene, benzo(a) pyrene, dibenz(a,h)anthracene, and benzo(g,h,i)perylene) following separation by high performance liquid chromatography and fluorescence detection (Jasco 821-FP spectrofluorometer, Japan Spectroscopic). A ChromSpher PAH column (200 mm length, 3 mm internal diameter)

from Chrompack was used. Elution was performed at a flow rate of 0–5 mL/min using a gradient of water/acetonitrile from two pumps (Bischoff Chromatography, Germany) according to the following program: 50/50 mixture from 0 to 15 min, then 0/100 for 12 min then 50/50 again for 8 min. One cycle lasting 35 min. Samples were injected with an autosampler (Bischoff, Germany). The detection of PAHs was performed by fluorimetry (821-FPJasco spectrofluorometer); for naphthalene, fluorene, and phenanthrene the excitation and emission wavelengths were 280 and 350 nm; for the other compounds, 305 and 430 nm. However conditions for benzo(a)pyrene (BaP) quantification were firstly applied, excitation 263 nm, emission 410 nm. Other conditions were applied for confirmation. Six standard PAH mixtures (Alltech Associates, Deerfield, IL) were used as reference materials. Results are reported as the sum of all PAHs measured (total PAHs concentration).

Hydroxypyrene and Phenol Analysis in Urine

For metabolites measurement in urines the technique included a prior enzymatic hydrolysis of the conjugates with a mixture of glucuronidase and sulfatase from *Helix pomatia* (Sigma Aldrich); followed by sample purification on octadecyl silica cartridges (Bond-Elut 100 mg, Analytichem, CA). Chromatography was carried out with a model of ET 250/8/4 Nucleosil 10, C18 column (VWR, Chromosorb, France); using two pumps (Bischoff Chromatography, Germany) delivering, either pure acetonitrile (solvent A) or 10% acetonitrile in water containing 0–5 mL glacial acetic acid/L (solvent B) at a flow rate of 1 mL/min to make the elution gradient: from 100 to 20% solvent B in 25 min, from 20 to 0% solvent B in 2 min, isocratic (pure solvent A) elution during 3 min, 100% solvent B in 2 min and re-equilibration of the column for 8 min before a new analysis cycle. Hydroxypyrene was detected by fluorimetry (excitation: 240 nm; emission: 390 nm; 821-FP Jasco spectrofluorometer). The calibration was made with a control urine sample spiked with 10 μg hydroxypyrene/l (Sigma-Aldrich); the detection limit was 0–2 $\mu\text{g/L}$.

In the same urine samples, phenol was measured by HPLC with UV detection as described previously by Weaver et al. (1996).

Results were standardized to 1 g urinary creatinine.

Enzymes and Chemicals

Proteinase K (EC 3.4.21.64), ribonuclease A (EC 3.1.4.22, micrococcal nuclease (EC 3.1.4.7), spleen alkaline 5'phosphodiesterase (EC 3.1.4.1), and T4 polynucleotide kinase (EC 2.7.1.78) were purchased from Amersham Bioscience and nuclease P1 (EC 3.1.30.1) from Sigma. Ficoll-plaque Plus[™], [γ - ^{32}P] ATP were also from Amersham Bioscience and phenol (CAS Number 108-95-2), chloroform (CAS Number 67-66-3), isoamyl alcohol (CAS

TABLE I. Some data on individual exposure values to total PAHs and benzene by urinary excretion of phenol and 1-hydroxypyrene as biomarkers, expressed as mean $\pm$ SEM

PAHs in Outdoor Air ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Benzene in Outdoor Air (mg/m^3)*	Urinary Excretion of Phenol Adjusted to Creatinine (mg/g)	1-Hydroxypyrene Adjusted to Creatinine ($\mu\text{g}/\text{g}$)
$1.6 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$	$3.4 \pm 3.0 \text{ mg}/\text{m}^3$	Village ($n = 17$) 9.1 ± 1.7^a	Village ($n = 17$) 3.07 ± 2.1 (d)
$2.5 \pm 1.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$	$4.3 \pm 2.5 \text{ mg}/\text{m}^3$	Suburban ($n = 20$) 13.5 ± 1.4^b	Suburban ($n = 20$) 4.8 ± 2.5 (d)
$103 \pm 13 \mu\text{g}/\text{m}^3$	$76.0 \pm 26.8 \text{ mg}/\text{m}^3$	TMD ($n = 13$) 155.5 ± 15.6 (c)	TMD ($n = 13$) 254.3 ± 27.6 (c)
$103 \pm 13 \mu\text{g}/\text{m}^3$	$76.0 \pm 26.8 \text{ mg}/\text{m}^3$	RR ($n = 11$) 155.5 ± 15.6^c	RR ($n = 11$) 254.3 ± 27.6^c
$103 \pm 13 \mu\text{g}/\text{m}^3$	$76.0 \pm 26.8 \text{ mg}/\text{m}^3$	SV ($n = 16$) 155.5 ± 15.6^c	SV ($n = 16$) 254.3 ± 27.6^c
$103 \pm 13 \mu\text{g}/\text{m}^3$	$76.0 \pm 26.8 \text{ mg}/\text{m}^3$	GS ($n = 17$) 155.5 ± 15.6^c	GS ($n = 17$) 214.3 ± 27.6^c

1 ppm = $3.2 \text{ mg}/\text{m}^3$ Those bearing the same letter ^c or ^d are not significantly different.^aDifferent from ^b at $P = 0.05$.^cDifferent from ^a and ^b at $P = 0.001$.^dDifferent from ^d at $P = 0.001$.

Number 123-51-3), and the other chemical compounds from Sigma.

DNA Extraction and ^{32}P Postlabeling of DNA Adducts

DNA was extracted from lymphocytes using standard phenol/chloroform/isoamylalcohol extraction method. All DNA samples were stored frozen at -20°C and were shipped on dry ice to *Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire* at Strasbourg (France) for DNA-adducts determination using the ^{32}P -postlabeling method as previously described (Randerath et al., 1985; Reddy and Randerath, 1986; Binkova et al., 1998) with minor modifications. Briefly, $7 \mu\text{g}$ of DNA was digested by micrococcal nuclease and spleen phosphodiesterase for 4 h at 37°C . Adducts were then enriched by nuclease P1 treatment, afterward a postlabeling reaction was carried out and adduct purification was performed by thin layer chromatography (TLC) on polyethyleneimine (PEI, CAS 26913-06-4) cellulose. The labeled adducts were detected by autoradiography following 24 or 48 h exposure, and quantified with Bio-Imager Bas2000 phosphoranalyser (Fuji, Tokyo, Japan). DNA adduct levels were expressed as mean of DNA adducts per 10^8 nucleotides of two independent assays calculated from the amount of DNA hydrolyzed and the specific radioactivity of the used $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (Phillips and Castegnaro, 1999).

A mixture of adducts from a heavily exposed individual and a less exposed individual (1/2 of the amounts loaded above for single chromatography) was comigrated in identical conditions and quantified similarly. This has been done taking randomly three different couples of individuals. The results are reported in Figure 3.

Statistical Analysis

Values are given as mean $\pm$ SEM, of number of DNA-adducts per 10^8 nucleotides. Data were transformed by the natural logarithm before analysis to satisfy the distribu-

tional assumptions of conditional normality and homogeneity of variance. Differences between group were analyzed by ANOVA with differences being statistically significant at a P value $< 5\%$ and a *post hoc* analysis as least significant difference (LSD) at $\alpha < 5\%$. All statistical analyses were performed using SPSS version 11.0 for Windows 2001.

RESULTS

Ninety four subjects were recruited in the present study following the withdrawal of smokers (Tables I and II). The ages and respective numbers of individuals per group are given in Table II. The overall average age is 29 ± 7 , with a sexes ratio (M/F) of 0.88 (44/50).

Exposure Assessment

The exposure has been assessed, the following values were found: benzene in the outdoor ambient air was quantified at concentrations of $76.0 \pm 26.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in Cotonou, compared with $3.4 \pm 3.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in villages located far from Cotonou (Table I). This benzene concentration is a mean value of ($n = 9$) determinations performed on three consecutive days in three urban polluted areas ($101\text{--}170 \mu\text{g}/\text{m}^3$) where people were recruited. These benzene concentrations largely exceeded the $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ recommended by World Health Organization (WHO IARC, 1983).

AS for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) they were found to be at concentrations of $103 \pm 13 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in Cotonou versus $1.6 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in villages and $2.5 \pm 1.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in the suburban areas (Table I). The specific values from the polluted areas ranged from 87 ± 16 to 118 ± 11 .

Characterization of the airborne concentration of 13 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) was performed once per day (6 h) at each location on 3 consecutive days.

Validation of the urinary excretion of 1-hydroxypyrene (hydroxypyrene) as a biological marker of exposure to PAH was also performed once per individual either on day

TABLE II. Information on different groups and levels of DNA-adducts, as determined by ^{32}P -postlabelling method

	Low Exposure Groups		High Exposure Groups			
	Village	Suburban	TMD	RR	SV	GS
Number	17	20	13	11	16	17
Age $\pm$ SD	40 $\pm$ 12	36 $\pm$ 13	36 $\pm$ 6	37 $\pm$ 9	30 $\pm$ 8	32 $\pm$ 9
Mean $\pm$ SEM of DNA adducts ⁵	3.1 $\pm$ 0.8	2.1 $\pm$ 0.6	24.6 $\pm$ 6.4	23.7 $\pm$ 6.9	34.7 $\pm$ 9.8	37.2 $\pm$ 8.1
DNA adduct ranges	0–8	0–9	1–69	1–76	3–169	4–124
<i>P</i> value in comparison of DNA adducts between high and low exposure groups		NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

No declared smoker is included in the study. However, some suburban subjects and village residents may have not declare the use of wood fire for meal preparation or smoked fish in their diet.

TMD, Taxi-motor bike drivers; RR, roadside residents; SV, street vendors; GS, gasoline sellers, $\times 10^8$ nucleotides; NS: not significantly different from the "village" value.

1, 2, or 3 since they show-up every day and are exposed all day long, the half life for the urinary excretion of hydroxypyrene being around 18–22 h. The valued were adjusted to creatinine (Table I).

These measurement showed urinary phenol values from 9.1 ± 1.7 mg/g of creatinine for the village, 13.5 ± 1.4 mg/g for the suburban area, and 155.5 ± 15.6 for the more polluted areas in Cotonou (Table I). The difference was highly significant between exposed people in the city of Cotonou ($P = 0.001$) and those in suburban areas and village. These two groups are also different for phenol excretion ($P = 0.05$).

Concerning hydroxypyrene urinary excretion the values ranged from 3.07 ± 2.1 $\mu\text{g/g}$ in village subjects, 4.8 ± 2.5 $\mu\text{g/g}$ and 254.3 ± 27.6 $\mu\text{g/g}$ in heavily exposed individuals (Table I). No difference could be seen between individuals from village and suburban areas while those exposed in the city of Cotonou showed clear-cut difference as compared to village and suburban people ($P = 0.001$).

Benzene has not been measured in the air this time because the air samples have not been stored in appropriate manner, so they were not useable for the purpose of quantifying this volatile compound.

Mean levels of DNA adduct are summarized on Table II. Taxi-motorbike drivers, roadside subjects, street vendors, and gasoline salesmen have significantly higher DNA adduct levels than suburban subjects and rural inhabitants ($P < 0.001$, *post hoc* LSD), Figure 1.

DNA-adduct levels were not significantly different between suburban subjects and village residents ($P > 0.05$, *post hoc* LSD). Furthermore no statistically significant difference was observed in high exposure subgroups, namely taxi-motorbike drivers, crossroad subjects, street vendors, and gasoline salesmen ($P > 0.05$, *post hoc* LSD). Instead a large inter individual variation in DNA-adducts levels was observed. Ranges of adducts per 10^8 nucleotide were for motorbike taxi-drivers, (1–69), roadside subjects, (1–76), street vendors, (3–169), gasoline

salesmen, (4–124), suburban inhabitants (0–9), and rural inhabitants, (0–8).

Autoradiographic Maps of the ^{32}P -Postlabeled Bulky DNA Adducts

Typical autoradiographic maps of the ^{32}P -postlabeled bulky DNA adducts from different groups of habitants living in town and village are shown in Figure 2. In all cases where DNA adducts were present, the major spot was quantified by means of the Mac Bas software. In some cases,

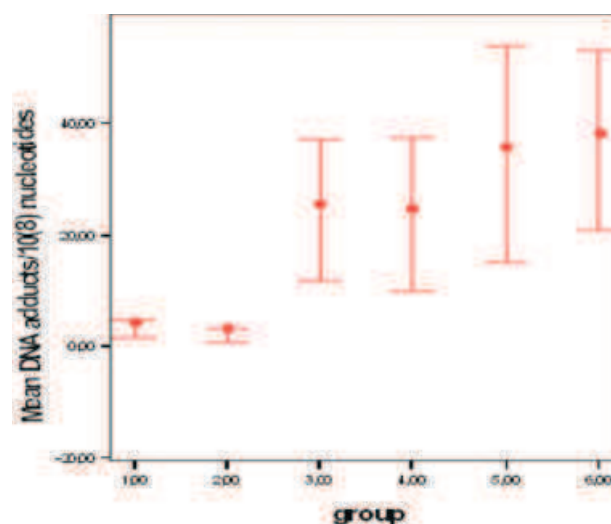


Fig. 1. DNA adducts levels as detected by ^{32}P -postlabeling assay. Anova is statistically significant ($P < 0.001$), and high exposure group is different from the low exposure group ($P < 0.001$, *post hoc* LSD). Data are expressed as mean (point), with SEM (error bar) (1 = village 2 = suburban; 3 = taxi-motor-bike; 4 = roadside; 5 = street vendors; 6 = gasoline sellers). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

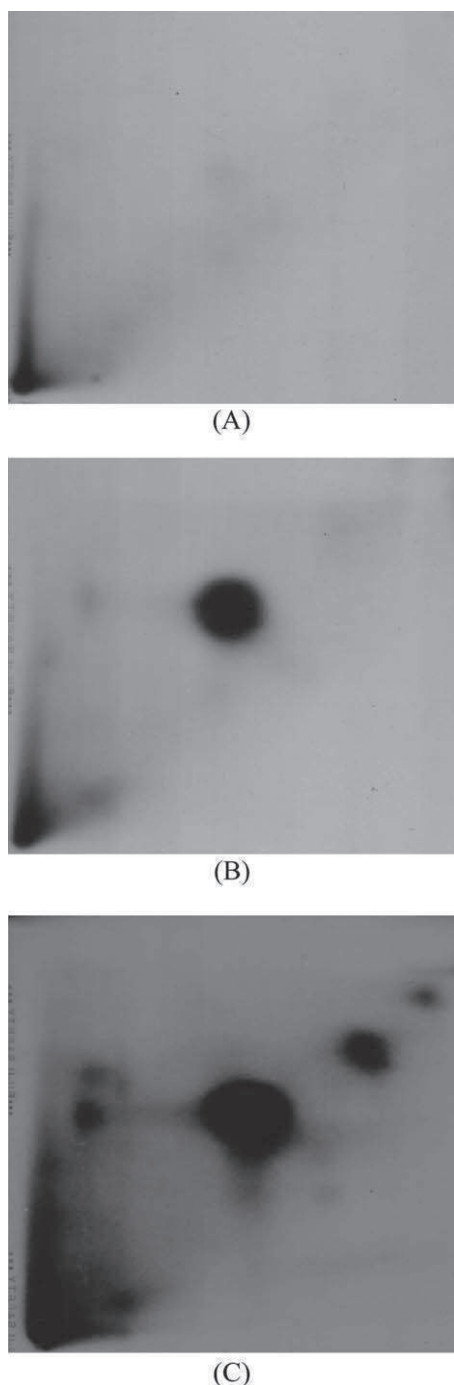


Fig. 2. Typical two-dimensional autoradiographs of ^{32}P -postlabeled DNA-adducts chromatographed on PEI-cellulose TLC plates from circulating white blood lymphocytes. A: No adduct (village resident); B: major adduct ('taxi-motorbike' driver); C: major and additional adducts (street vendor).

additional less intense spots even well resolved on TLC were not taken into account (data not shown). Co migration of DNA-adducts found in exposed groups has shown interestingly that one main spot could be seen indicating a likely

identity of adducts that have migrated to this place (data not shown). This is confirmed by the measurement of the distances of migration from the origin in the two dimensions in three different studies (Fig. 3) indicating possible identity.

A mixture of adducts from a heavily exposed individual and a less exposed individual (1/2 of the amounts loaded above for single chromatography) was comigrated in identical conditions and quantified similarly. This has been done taking randomly three different couples of individuals. The results are reported in Figure 3.

Finally, these DNA-adducts have been compared to adducts formed in WBC of rats exposed to a mixture of benzene and PAHs found to be identical for the main spot, (data not shown) indicating that mainly adducts with PAHs are detected herein. Very interestingly some minor adducts spots have migrated similarly to those found in heavily exposed people (Figs. 2 and 3).

DISCUSSION

In the present study we investigated the formation of bulky DNA-adducts as biomarkers of biologically effective dose of PAHs and some volatile compounds mainly benzene in outdoor air in the center of Cotonou in Benin. Individuals enrolled in this study were 94 adults Beninese, some of which were occupationally exposed to varying levels of genotoxic compounds through ambient air pollution, namely, benzene and PAHs. While village residents are exposed to lower levels of the same pollutants, city residents such as taxi-motorbike drivers and roadside residents are exposed to significantly higher levels of such cancer-causing agents in traffic-jammed areas of Cotonou (Ayi-Fanou et al., 2006).

Individual exposure to PAHs and benzene has been determined; it appeared that the values of PHAs exposure (mainly benzo(a)pyrene) in the urban areas are not

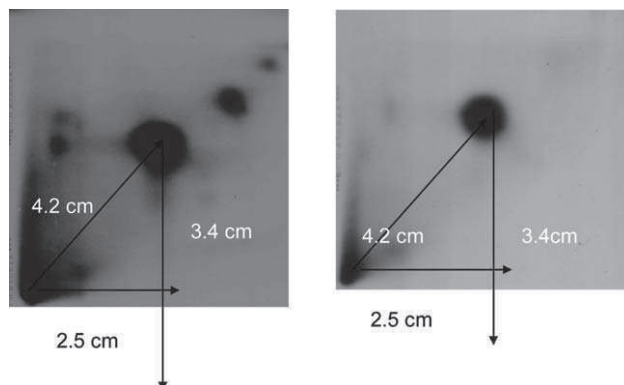


Fig. 3. Super imposition of the spots of the main DNA-adducts and migration distance from the origin.

different. Motorbike taxi-drivers, roadside subjects, street vendors, and gasoline salesmen are apparently equally exposed as indicated by the ambient air concentrations and urinary metabolites. So, it is accordingly normal that the DNA-adducts rates are not different. Our results demonstrated that DNA-adduct levels were significantly higher in city residents i.e., taxi-motorbike drivers, crossroad subjects, street vendors, and gasoline salesmen when compared to rural inhabitants, confirming the significantly higher exposure levels to genotoxic pollutants observed in ambient air in Cotonou. This may be explained by the fact that exposure to pollutants (PAH compounds including B[a]-P) generated from gasoline vapors increased the formation of DNA-adducts in exposed population. These findings are in agreement with those reported by (Ruchirawat et al., 2005) while measuring exposure to PAHs in grilled-meat vendors and clothe vendors in similar areas in Bangkok. Overall, our results are in agreement with a number of studies which reported that populations exposed to environmental air pollution show increased levels of DNA-adducts (Farmer et al., 2003; Singh et al., 2007). However, this is the first study evidencing DNA adduction in an African exposed population as a function of PAH, B[a]-P and benzene outdoor concentrations. Although not yet identified, the major adducts observed may be those generated by PAHs, the major air pollutants found in the ambient air. They could also be similar to the main adducts obtained in bitumen exposed rodents (Micillino et al., 2002; Bottin et al., 2006). Investigations on rat exposed by inhalation (namely whole body and inhalation chamber system) to B[a]-P show that the DNA-adducts found are identical to those found in heavily exposed people (data not shown). The most interesting is that the main spot is absolutely similar while some smaller spots of DNA-adducts migrate more or less to the same distances which are not significantly different following statistical comparison but show some very small differences by superimposition. So, some of the DNA-adducts in WBC of subjects enrolled in the survey may be assigned to B[a]-P in heavily exposed people.

Since DNA damage is believed to be a first step in development of cancer, an increased level of DNA-adducts in city residents may suggest that city residents are of elevated risk for development of chronic lung diseases and cancer related to, benzene and B[a]-P and other PAHs. Similar results have been reported in Thailand, where roadside residents exposed to PAHs (at concentrations about 2.5-fold lower than that found in Cotonou), bear DNA-adducts levels of 0.45 adducts per 10^8 nucleotides, higher than those of rural ones (0.09 adducts/ 10^8 nucleotides) Ruchirawat et al. (2007). As a matter of fact the levels of DNA adducts in the study of Ruchirawat et al. (2007) are lower than those in our study, probably because of the lower concentrations in the outdoor air in Bangkok and likely because of the

improved method of DNA-adducts detection applied in our study.

Likewise, B(a)P-induced DNA-adducts were found significantly higher in policemen working in the streets in Prague compared with nonexposed control (Binkova et al., 2007).

A study carried out in Denmark by (Autrup et al., 1999) found a significantly higher level of carcinogen-DNA adducts in Copenhagen bus drivers than suburban and semi-rural drivers. But levels of DNA-adducts reported in Danish bus drivers (75.4 adducts/ 10^8 nucleotides) are threefold higher than that we are reporting in taxi-motorbike drivers circulating in Cotonou city (24.6 adducts/ 10^8 nucleotides).

In this study, we failed to find differences in DNA adducts levels between taxi-motorbike drivers, crossroad subjects, street food vendors and gasoline salesmen, suggesting nonlinearity in adducts formation under high exposure circumstances to PAHs and also to B[a]-P. This absence of dose-response relationship in adducts formation in high exposure circumstances may be explained by several reasons. The main reason is that even though highly exposed, they show comparable urinary metabolites levels in response to similar ambient outdoor air concentrations of B(a)P and benzene. These results are in agreement with those reported by Binkova et al., (1998) in coke oven workers. In contrast, linear dose-response relationship has been found for both 1-HOP and DNA-adduct formation in nonsmoking Royal Thai trafficked policemen as compared with the reference group (Ruchirawat et al., 2002). We acknowledge here that only few people among taxi-motorbike drivers, crossroad subjects, street vendors and gasoline salesmen do smoke. They (all spontaneously declared and those bearing gray teeth induced by tobacco smoking) were discarded from the group of analyzed persons.

So, no declared smoker is included in the study. However some suburban subjects and village residents may have not declared the use of wood fire for meal preparation or smoked fish in their diet. This could have increased their exposure to PAHs and mainly to B[a]-P thus increasing their DNA-adducts levels in such an extent we cannot determine without assessing PAHs in their food intake. This was not the purpose of the present study and should be of concern in further investigations.

Depending on the extent of bioactivation and DNA damage, DNA-adducts can be repaired or lead to apoptosis or eventually to mutation if not repaired. Therefore, genetic polymorphisms in gene involved in detoxication may modulate the amounts of bulky DNA-adducts. Some studies have reported conflicting results regarding the influence of genetic polymorphism, in DNA adducts formation. For example (Garte et al., 2007) found association between glutathione S-transferase (GSTs)-genes inactivation and DNA-adducts formation by PAHs, but other studies did not find any relation (Peluso et al., 2004; Ruchirawat et al., 2007). It

is being suggested that polymorphisms in DNA repair genes involved in nucleotide excision repair may modify aromatic DNA-adduct levels and may be useful biomarkers to identify individuals susceptible to DNA damage following exposure to PAHs (Binkova et al., 2007).

We have previously investigated the level of oxidative DNA damage in mononuclear blood cells (MNBC) by the comet assay, DNA strand breaks (SB), and formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) sensitive sites in residents from three urban locations in Cotonou, Benin (taxi-motor bike drivers, subjects living near roads with intense traffic and suburban residents) and rural residents. The conclusion reached was that urban air with high levels of benzene and UFP is associated with elevated levels of SB and FPG sites in MNBC, and that NQO1 and GST genes may modulate the effect (Avogbe et al., 2005).

Wood burning particles and volatile wood compound could also be a source of DNA-adducts forming products to which some of the individuals enrolled in this study are maybe additionally exposed rendering the dose–effect relationship difficult to be established in a very accurate way. An illustration of this fact could be found in the study of Avogbe et al. (2005). These authors reported a large gradient in the concentration of ultrafine particulate (UFP) matter, with the highest levels in the center of Cotonou that decrease toward the periphery (Avogbe et al., 2005). UFP are mainly generated by poor combustion of fossil fuels in vehicles and by wood-burning fires. These particles are now receiving an increasing attention worldwide, due to their potential impact on morbidity and mortality (Dochery and Pope, 1994; Pope et al., 2002) with an excess risk of pulmonary and cardiovascular diseases and cancer (Katsouyanni and Pershagen, 1997; Pope et al., 2002). Indeed Each 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ elevation in fine particulate air pollution was associated with approximately a 4%, 6%, and 8% increased risk of all-cause, cardiopulmonary, and lung cancer mortality, respectively (Pope et al., 2002).

To draw attention on the ongoing situation of the outdoor pollution in Cotonou some examples were taken from the literature. Robinson and Paxman (1992) have analyzed the role of threshold limit values (TLVs) in national air pollution policy during the 1980s in U.S. These authors focused on 20 carcinogens and 11 substances with nongenotoxic health effects that were regulated by local air toxics programs using TLVs. Data from EPA's National Air Toxics Information Clearinghouse indicate that maximum TLV-based Ambient Air Level guidelines (AALs) frequently exceed minimum TLV-based AALs by a factor of greater than 1000. Cancer potency data from EPA's Integrated Risk Information System suggest significant risks remain at TLV-based AALs. Cancer risks at the median TLV-based AAL exceed 1000 cases per million exposed persons for coke oven emissions (1860) and benzene (2500) for example.

We found that the public health implications of outdoor concentrations of PAHs and benzene are also of concern in industrialized countries such as the USA and Norway or Denmark. A modeled outdoor HAP concentration estimate from the U.S. Environmental Protection Agency's Cumulative Exposure Project was used by Morrello-Frosch et al. (2000) to characterize the extent of the air toxics problem in California for the base year of 1990. These air toxics concentration estimates were used with chronic toxicity data to estimate cancer and non-cancer hazards for individual HAPs and the risks posed by multiple pollutants. Although hazardous air pollutants are ubiquitous in the environment, potential cancer, and noncancer health hazards posed by ambient exposures are geographically concentrated in three urbanized areas and in a few rural counties. This analysis estimated a median excess individual cancer risk of $2.7\text{E-}4$ for all air toxics concentrations and 8600 excess lifetime cancer cases, 70% of which were attributable to four pollutants: polycyclic organic matter, 1,3 butadiene, formaldehyde, and benzene.

In conclusion, the data from our study indicate that DNA-adducts levels are correlated with the levels of environmental carcinogenic compounds found in the outdoor air in the center of Cotonou. It seems that at high exposure conditions to benzene and PAHs (mainly B(a)P, DNA-adducts levels are not directly proportional, reflecting either saturation in adducts formation or stimulation of their repair because of chronic exposure and genetic polymorphism. However, the DNA-adducts levels could be correlated with individual exposure values as determined by urinary excretion of hydroxypyrene and phenol.

The highly exposed individuals bearing the higher DNA-adducts levels are being followed in a cohort study to find out those who will develop cancers in the coming times and implement prevention means to protect residents not exposed professionally.

The authors thank Professor Jean Cognet for fruitful discussions, Doctors Latifou Lagnika, Michael Missihoun, and Nicodème Chabi for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Arfellini G, Grilli S, Colacci A, Mazzullo M, Prodi G. 1985. In vivo and in vitro binding of benzene to nucleic acids and proteins of various rat and mouse organs. *Cancer Lett* 28:159–168.
- Autrup H, Daneshvar B, Dragsted LO, Gamborg M, Hansen AM, Loft S, Okkels H, Nielsen F, Nielsen PS, Raffn E, Wallin H, and Knudsen LE. 1999. Biomarkers for exposure to ambient air pollution—Comparison of carcinogen–DNA-adduct levels

- with other exposure markers and markers for oxidative stress. *Environ Health Perspect* 107:3.
- Avogbe PH, Ayi-Fanou L, Autrup H, Loft S, Fayomi B, Sanni A, Vinzents P, Moller P. 2005. Ultrafine particulate matter and high-level benzene urban air pollution in relation to oxidative DNA damage. *Carcinogenesis* 26:613–620.
- Ayi-Fanou L, Théophile AM, Creppy EE, Fayomi B, Fustoni S, Møller P, Kyrtopoulos S, Loft S, Sanni A, Skov H, Øvrebo S, Autrup H. 2006. Survey of air pollution in Cotonou-Benin- personal monitoring and biomarkers. *Sci Total Environ* 358:85–96.
- Begbee WL, Vincze I. 1999. Biomonitoring of human genotoxicity induced by complex occupational exposures. *Mutat Res* 445:193–203.
- Binet S, Bonnet P, Brandt H, Castegnaro M, Delsaut P, Fabries JF, Huynh CK, Lafontaine M, Morel G, Nunge H, Rihn B, Vu Duc T, Wrobel R. 2002. Development and validation of a new bitumen fume generation system which generates polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations proportional to fume concentrations. *Ann Occup Hyg* 46: 617–628.
- Binkova B, Chvatalova I, Lnenickova Z, Milcova A, Tulupova E, Peter B, Farmer PB, Sram RJ. 2007. PAH-DNA adducts in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair gene polymorphisms. *Mutat Res* 620:49–61.
- Bottin MC, Gate L, Rihn B, Micillino JC, Nathalie M, Martin A, Nunge H, Morel G, Wrobel R, Ayi-Fanou L, Champmartin C, Keith G, Binet S. 2006. Genotoxic effects of bitumen fumes in Big Blue transgenic rat lung. *Mutat Res* 596:91–105.
- Collins AR. 1999. Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* 21:238–246.
- Farmer PB, Singh R, Kaur B, Sram RJ, Binkova B, Kalina I, Popov TA, Garte S, Taioli E, Gabelova A, Cebulska-Wasilewska A. 2003. Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage. *Mutat Res* 544:397–402.
- Garte S, Taioli E, Raimondi S, Paracchini V, Binkova B, Sram RJ, Kalina I, Popov TA, Singh R, Farmer PB. 2007. Effects of metabolic genotypes on intermediary biomarkers in subjects exposed to PAHs: Results from the EXPAH study. *Mutat Res* 620:7–15.
- Georgiadis P, Topinka J, Stoikidou M, Kaila S, Gioka M, Katsouyanni K, Sram RG, Autrup H, Kyrtopoulos SA. 2001. Biomarkers of genotoxicity of air pollution (the AULIS project): Bulky DNA adducts in subjects with moderate to low exposures to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and their relationship to environmental tobacco smoke and other parameters. *Carcinogenesis* 22:1447–1457.
- Katsouyanni K, Pershagen G. 1997. Ambient air pollution exposure and cancer. *Cancer Causes Control* 8:289–291.
- Keith G, Dirheimer G. 1995. Postlabeling: A sensitive method for studying DNA adducts and their role in carcinogenesis. *Curr Opin Biotechnol* 6:3–11.
- Kuljucka-Rabb T, Nylund L, Vaaranrinta R, Savela K, Mutanen P, Veidebaum T, Sorsa M, Rannug A, Peltonen K. 2002. The effect of relevant genotypes on PAH exposure-related biomarkers. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 12:81–91.
- Micillino JC, Coulais C, Binet S, Bottin MC, Keith G, Moulin D, Rihn BH. 2002. Lack of genotoxicity of bitumen fumes in transgenic mouse lung. *Toxicology* 170:11–20.
- Morello-Frosch RA, Woodruff TJ, Axelrad DA, Caldwell JC. 2000. Air toxics and health risks in California: The public health implications of outdoor concentrations. *Risk Anal* 20:273–291.
- Nielsen PS, Andreassen A, Moller P, Farmer B, Overbo S, Autrup H. Biomonitoring of diesel exhaust exposed workers. 1996a. DNA and haemoglobin adducts and urinary 1-hydroxypyrene as markers of exposure. *Toxicol Lett* 86:27–37.
- Nielsen PS, de Pater N, Okkels H, Autrup H. 1996b. Environmental air pollution and DNA adducts in Copenhagen bus drivers—Effects of GSTM1 and NAT2 genotypes on adducts levels. *Carcinogenesis* 17:1021–1027.
- Peluso M, Neri M, Margarino G, Mereu C, Munnia A, Ceppi M, Buratti M, Felletti R, Stea F, Quaglia R, Puntoni R, Taioli E, Garte S, Bonassi S. 2004. Comparison of DNA adduct levels in nasal mucosa, lymphocytes and bronchial mucosa of cigarette smokers and interaction with metabolic gene polymorphisms. *Carcinogenesis* 25:2459–2465.
- Phillips DH, Castegnaro M. 1999. Standardization and validation of DNA-adduct postlabelling methods: Report on interlaboratory trials and production of recommended protocols. *Mutagenesis* 14:301–315.
- Pope III CA, Burett RT, Thun MJ, Cale EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. 2002. Lung cancer cardiopulmonary mortality and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287:1132–1141.
- Randerath K, Randerath E, Agrawal HP, Gupta RC, Schuradak ME, Reddy MV. 1985. Postlabeling methods for carcinogen-DNA adduct analysis. *Environ Health Perspect* 62:57–65.
- Randerath K, Randerath E, Zhou GD, Li D. 1999. Bulky endogenous DNA modifications (I-compounds) -possible structural origins and functional implications. *Mutat Res* 424:183–194.
- Reddy MV, Randerath K. 1986. Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of 32P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis* 7:1543–1551.
- Rinsky RA, Smith AB, Hornung R, Filloon TG, Young RJ, Okun AH, Landrigan PJ. 1987. Benzene and leukemia. An epidemiologic risk assessment. *N Engl J Med* 23; 316:1044–1050.
- Robinson JC, Paxman DG. 1992. The role of threshold limit values in U.S. air pollution policy. *Am J Ind Med* 21:383–396.
- Ruchirawat M, Mahidol C, Tangjarukij C, Pui-ock S, Jensen O, Kampeerawipakorn O, Tuntaviroon J, Aramphongphan A, Autrup H. 2002. Exposure to genotoxins present in ambient air in Bangkok, Thailand—Particle associated polycyclic aromatic hydrocarbons and biomarkers. *Sci Total Environ* 287:121–132.
- Ruchirawat M, Navasumrit P, Settachan D, Tuntawiroon J, Buthumrun N, Sharma S. 2005. Measurement of genotoxic air pollutants exposures in street vendors and school children in and near Bangkok. *Toxicol Appl Pharmacol* 206:207–214.
- Ruchirawat M, Settachan D, Navasumrit P, Tuntawiroon J, Autrup H. 2007. Assessment of potential cancer risk in children

- exposed to urban air pollution in Bangkok, Thailand. *Toxicol Lett* 168:200–209.
- Schoket B, Poirier MC, Mayoer G, Torok G, Kolozsi-Ringelhann A, Bognar G, Topinka G, Mrackova D, Gajdosova P, Vidova Z, Stavkova V, Peterka T, Pilcik V, Rimar L, Dobias L, Farmer PB, Sram RJ. 1998. Coke oven workers study: The effect of exposure and GSTM1 and NAT2 genotypes on DNA adducts in white blood cells and lymphocytes as determined by ^{32}P -post-labelling. *Mutat Res* 416:67–84.
- Weaver VM, Davoli CT, Heller P, Fitzwilliam A, Peters H, Sunyer J, Murphy SE, Goldstein GW, Groopman JD. 1996. Benzene exposure, assessed by urinary trans, trans-muconic acid, in urban children with elevated blood lead levels. *Environ Health Perspect* 104:318–323.
- WHO. 1983. Polycyclic aromatic compounds. 1. Chemicals, environmental and experimental data. In evaluation of carcinogenic risk of chemical to humans. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Man 32:1–477.

Full Length Research Paper

Hematological changes among Beninese motor-bike taxi drivers exposed to benzene by urban air pollution

Patrice H. Avogbe^{1,2}, Lucie Ayi-Fanou¹, Boris Cachon¹, Nicodème Chabi¹, Agnes Debende^{3,5},
Dorothee Dewaele^{3,5}, Faustin Aissi^{4,5}, Fabrice Cazier^{3,5} and Ambaliou Sanni^{1*}

¹Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Technical Sciences, University of Abomey-Calavi, Republic of Benin.

²INSERM U954, Nutrition Genetic and Exposure to Environmental Risks, Nancy University, Medical Faculty of Nancy, France.

³Littoral-Côte d'Opale University, Dunkerque, France.

⁴Environmental Chemistry Unit, Littoral-Côte d'Opale University, Dunkerque, France.

⁵Lille North University, France.

Accepted 4 May, 2011

Exposure to high-concentration of benzene in polluted air has been associated with bone marrow deficiency, aplastic anemia and leukemia. However, epidemiological studies have reported conflicting data following human exposure to benzene levels below 1 ppm (that is, 3.2 mg/m³). Therefore we investigated the influence of outdoor air benzene on peripheral blood cells among exposed motor-bike-taxi drivers (MBTD) in which specific IgG antibodies against reactive benzene metabolites, such as hydroquinone (HQ) and para-benzoquinone (p-BQ) are identified and quantified for further use as biomarker of exposure. We compared 144 MBTD with 30 unexposed age and sex-matched controls. The mean age $\pm$ SD (95% CI) were: MBTD 39.5 $\pm$ 7.82 (38.2 - 40.7) and village residents 40.3 $\pm$ 10.56 (39.1-43.0). Personal benzene exposure was assessed using GABIE diffusive samplers. The levels of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ were determined by ELISA. The peripheral blood cells were counted by an automated analyzer. Benzene, Toluene and Xylene levels were much higher in MBTD in comparison to the control group. Benzene exposure levels ranged from 0.012 to 0.550 ppm in MBTD. Their average exposure level per one week was 0.126 $\pm$ 0.206 ppm. Accordingly, MBTD had significantly higher levels of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ compared to the controls ($p < 0.001$). WBC, lymphocytes, eosinophils and platelets were significantly decreased in MBTD, whereas RBC and other blood cell numbers remained unchanged. Total WBC, lymphocytes and eosinophils counts were decreased among exposed MBTD compared to unexposed controls. We suggest the use of these blood parameters together with specific IgG antibodies to HQ and p-BQ as biomarkers in biological monitoring of low level benzene exposure. Larger studies are however required to validate this new approach of health survey in workers exposed to benzene.

Key words: Benzene, motor-bike-taxi drivers, specific immune responses, peripheral blood cell count.

INTRODUCTION

Urban air pollution is a major health hazard worldwide. In urban areas, air pollutants mainly originate from incomplete combustion of fossil fuels, e.g. automobile exhaust, residential heating and industrial emissions (Nielsen et al., 1996). The composition of ambient air is complex and depends on the quality of fuel, the type of

engine and engine maintenance (Leong et al., 2002). Vehicle exhaust generally contains polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), particles and volatile organic compounds (VOC), e.g. carbon monoxide, benzene and also nitrogen oxides. Diesel-powered engines are the major source of particles whereas two-stroke motorbikes and petrol powered cars emitted high level of VOC, including benzene.

Cotonou, the largest town and the economic capital of Benin has more than 1 million inhabitants, about 15% of

*Corresponding author. E-mail: ambaliou.sanni@fast.uac.bj.

the country's population (INSAE, 2008). Over the past decade the air quality has worsened in the city due to the widespread use of motorbikes and old second-hand cars. According to the data from the National Agency of Land and Transport, there were more than 94,000 motorbikes and more than 350,000 old second-hand cars in the city of Cotonou (Kèlome et al., 2006). Also, gasoline is of poor quality because of illegal import of sub-standard products from the neighboring Nigeria.

In a previous study carried out in Cotonou by our laboratory, we found that motorbike-taxi drivers (MBTD) driving all day were exposed to benzene at a mean level of $76.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$, while those living in the rural areas were exposed at a mean level of $3.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Ayi-Fanou et al., 2006). It is noteworthy to mention that benzene level in the ambient air in Cotonou is markedly higher than the $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ recommended by WHO. However, the level of benzene in Cotonou city is much lower than that reported in occupationally exposed workers from other countries (Zhang et al., 1996; Rothman et al., 1996a; Qu et al., 2002; Dimitrova et al., 2005).

Benzene has been classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as human carcinogen (IARC, 1987). In the body, benzene is metabolized in several steps, starting in the liver by cytochrome P450 2E1, where a variety of ring-opened metabolites and ring-hydroxylated metabolites (e.g. phenols and catechols) are generated (Snyder and Hedli, 1996) (Figure 1).

These circulating phenolic compounds can be transported to other organs, e.g. the bone marrow, where they are further oxidized via reactions mediated by peroxidases into their highly reactive quinones (Subrahmanyam et al., 1991). Quinones such as hydroquinone (HQ) and para benzoquinone (p-BQ) are potent hematotoxic and genotoxic compounds that can be converted by NAD(P)H quinone oxidoreductase (NQO1) back to less toxic hydroxylated metabolites (Smith et al., 2000). Biological monitoring of benzene exposure is based on well-validated urinary metabolites, e.g. trans, trans-muconic acid and S-phenylmercapturic acid (Ducos et al., 1990; Avogbe et al., 2005; Fustinoni et al., 2005; Wiwanitkit et al., 2007).

Exposure to benzene has been associated with adverse health effects, including haematopoietic disorders such as bone marrow deficiency and acute myelogenous leukemia in both rodents and humans (Hayes et al., 2001). However, the mechanisms of benzene-induced hematotoxicity are not totally understood. Numerous studies have reported conflicting results in occupationally exposed workers to benzene levels below 1 ppm (Collins et al., 1997; Lan et al., 2004; Tsai et al., 2004).

There is also evidence suggesting that the immune system can be affected by benzene exposure (Macedo et al., 2007). It has been established that reactive metabolites of benzene, such as HQ, are ultimately responsible for the immunotoxicity associated with benzene

exposure, including suppression of B lymphocytes (Pyatt et al., 1998).

Lange et al. (1973) reported decreased IgG and IgA levels and increased IgM levels in the workers exposed to benzene concentrations of 34 to 49 ppm. In contrast, the levels of IgG and IgM types of antibodies remained unchanged in workers exposed to benzene concentrations of 1.9 to 14.8 ppm (Bogadi-Sare et al., 2000).

At present, only few studies have investigated and characterized hematological changes in humans exposed to benzene levels below 1 ppm (Lan et al., 2004; Tsai et al., 2004). Furthermore, most of the studies have been conducted in different countries, e.g. western Europe and the USA so that there is not much data available on hematological changes in workers (motorbike-taxi drivers) exposed to urban air pollution, such as that occurring in Cotonou (Ayi-Fanou et al., 2006).

Therefore, the aim of this study was to evaluate the hematological changes in MBTD exposed to urban air pollution by benzene in Cotonou, where levels ranging from 0.012 and 0.550 ppm. Moreover, we investigated the influence of benzene on the immune system, showing data on the *in vivo* production levels of specific IgG antibodies against two endogenous metabolites of benzene (HQ and p-BQ). Associations between benzene exposure, consequent immune response and hematological changes in motorbike-taxi drivers working in Cotonou are herein reported.

MATERIALS AND METHODS

Subject selection and blood sample collection

The study design and recruitment methods have been described previously (Avogbe et al., 2005; Ayi-Fanou et al., 2006). Briefly, the study group consisted of 144 exposed MBTD working in Cotonou and 30 healthy unexposed subjects living and working in a small village located 80 Km from Cotonou. All participants were males. MBTD with at least 5-years job histories, which had no known disease and were not currently taking medication during the sampling period were recruited.

A questionnaire requesting information about the lifestyle and health status of each participant; including tobacco use, an important source of non-occupational benzene exposure, alcohol consumption, eating habits, residence, employment history, previous occupational exposure to other chemicals, height, weight, medication use, existing disease and activities involving exposure to combustion product was completed.

Each participant provided an EDTA blood sample for determination of the levels of the specific antibodies against HQ and p-BQ and blood cell counting. Ambient air measurements were carried out during the working day.

All participants gave their informed consent and the study was approved by the Beninese Environmental Agency (ABE).

Sampling and analysis of benzene, toluene and xylene

Exposure to airborne benzene, toluene and xylene (BTX) was assessed by using GABIE (Gas Adsorbent Badge for Individual Exposure) diffusive samplers (ARELCO, ARC20001UP, France) containing activated charcoal cartridge. A random selection of

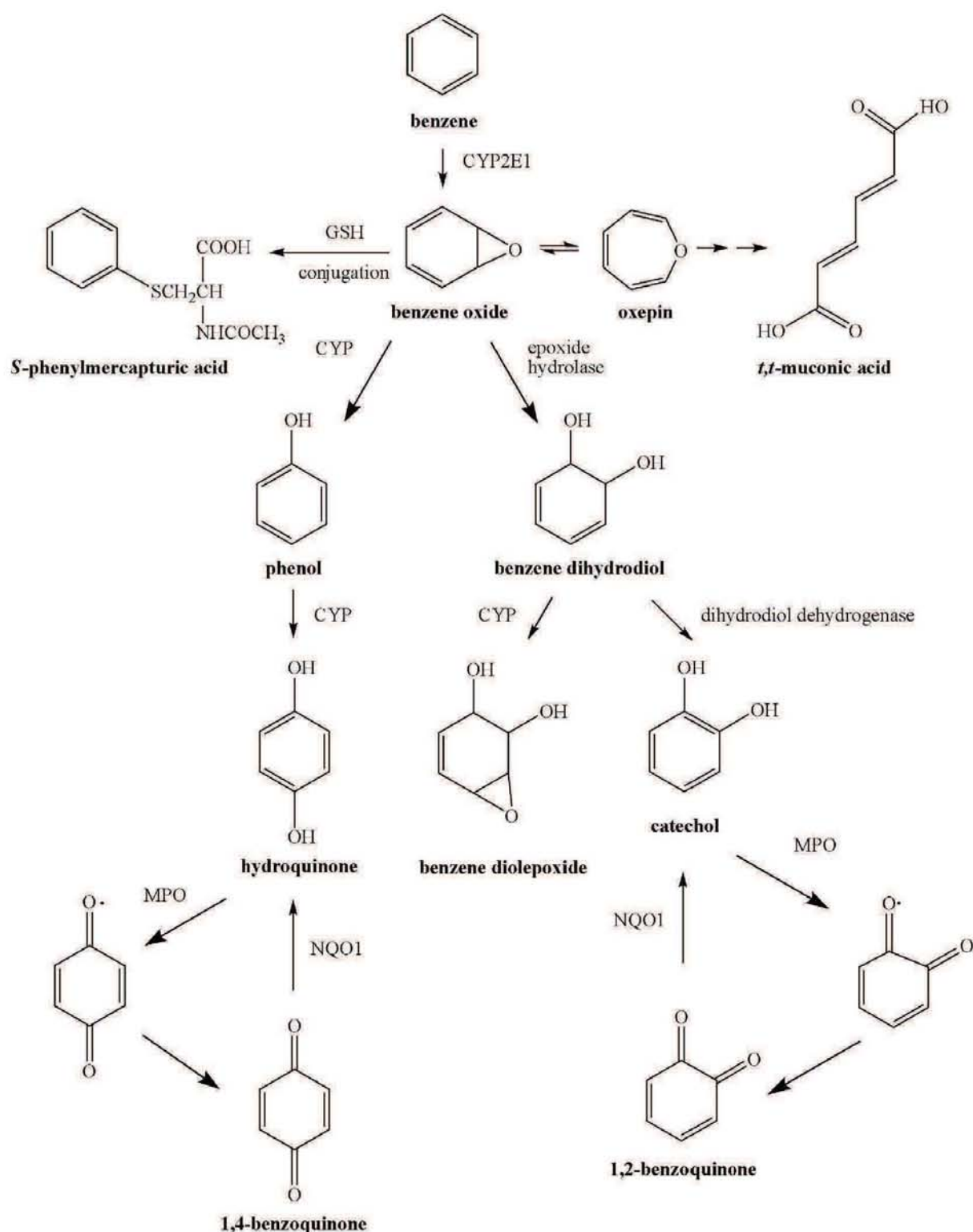


Figure 1. Major metabolic pathways of benzene (legend: CYP, cytochrome P450; GSH, glutathione; MPO, myeloperoxidase; NQO1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase).

MBTD was performed to obtain individual-level measurements of BTX. Selected MBTD wore GABIE badges while driving all over the city for about sixty-three hours for one-week (that is, 9 h/day).

After sampling, the badges were sealed, preserved at -20°C and

sent for analysis to the "Centre Commun de Mesure", ULCO, Dunkerque (France). Briefly, BTX were desorbed from the activated charcoal by using 2 ml of benzene-free carbon disulfide (Sigma, France) under agitation for 15 min. The mixture was filtered and 1 µl

Table 1. Characteristic of the study groups.

Characteristic	Control (n=30)	MBTD (n=144)	P-value
Age, mean years $\pm$ SD	40.3 $\pm$ 10.56	39.5 $\pm$ 7.82	0.607 ^a
Current alcohol use, n (%)			
No	19 (63.3)	86(59.72)	0.702 ^b
Yes	11 (36.7)	58(40.28)	
Current smoking, n (%)			
No	28 (93.3)	133 (93)	0.969 ^c
Yes	2 (6.7)	10 (7)	
Driving hour/day, mean hour $\pm$ SD	NA	6.21 $\pm$ 2.06	
Duration of exposure, mean years $\pm$ SD	NA	11.3 $\pm$ 5.96	
BMI, mean $\pm$ SD; Kg/m ²	22.35 $\pm$ 1.89	23.54 $\pm$ 3.86	0.08

NA, not applicable. MBTD, motorbike-taxi drivers. ^aStudent's t test; ^b χ^2 test; ^cFisher's Exact Test.

of the filtrate was analysed on a Gas Chromatograph (CP-3800, Varian USA) coupled to a Mass Spectrometer (1200 TQ, Varian USA) using Factor four VF-5 ms column (0.25 mm internal diameter, 30 m, film thickness 0.25 μ m). The carrier gas was helium, and the flow rate was set at 1 ml/min. The GC oven was held at 40°C for 5 min and then increased to 310°C at the rate of 5°C/min. The recovery rate of extraction of benzene was 99%.

Peripheral blood cell count

Twelve blood parameters derived from a complete blood cell count (CBC) were used in this study. These blood parameters were selected based on data from previous studies on benzene. The parameters were: total white blood cells (WBC) with four WBC subtypes (neutrophils, eosinophils, monocytes, and lymphocytes), total red blood cells (RBC) with five red cell-related measures (hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and mean corpuscular hemoglobin (MCH)) and platelets.

The samples were analyzed using the same analyzer (Sysmex SE 9000), which was calibrated daily.

Determination of specific IgG antibodies against benzene metabolites, HQ and p-BQ

The levels of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ were determined as previously described (Dimitrova et al., 2005). Briefly, 100 μ l of Bovine Serum Albumin 2% (SIGMA) were applied as a carrier to fix the haptens on the flat-bottom microtiter plates. After 2 h of incubation at 37°C, plates were washed 4 times with PBS-Tween 0.05% and 100 μ l of pure chemicals HQ and pBQ (SIGMA, kindly provided by Prof. Herman Autrup, Aarhus University, Denmark) at 5.10⁻⁵ mg/ml in NaCl 0.9% were added. The plates were incubated for additional 2 h at 37°C followed by a shock-cold fixation at 4°C overnight to allow the formation of covalent bound with BSA. The plates were washed 4 times and 100 μ l of plasma (1/1000) were added.

After 2 h of incubation at 37°C, plates were washed 4 times and anti-human IgG peroxidase conjugate (1/5000) was added. After 1.5 h incubation at 37°C, the plates were washed again and 100 μ l substrate solution of ortho-phenyl-enediamine 2.2 mg/ml (o-PDA,

SIGMA) in 0.05 M phosphate-citrate buffer (pH 5.0), containing 0.01% hydrogen peroxide was added. After 30 min of incubation in the dark at room temperature the reaction was stopped with 50 μ l of 4 M HCl (MERCK), and optical density (OD) was measured at 492 nm using Universal Microplate Reader Bio-tek Instruments ELx800. Each plasma sample was analyzed in triplicate to assure the reproducibility of the data. To check the quality of the results obtained, plasma pools containing a low (from village residents) and high (from MBTD) concentration of specific IgG antibodies were analyzed in each series of assays. The results from within-day and between-day quality controls samples demonstrated high reproducibility (RSD < 10%, data not shown).

Statistical analysis

All data were tested for normal distribution using the test of Kolmogorov-Smirnov. Most blood parameters were normally distributed except for eosinophils and WBC, which were skewed right necessitating a logarithmic transformation to obtain an adequate fit with the regression models. Correlation analysis was performed with Spearman rank order correlation. Linear regression analysis was used to estimate the influence of airborne benzene levels on blood cell parameters. We used general linear model (GLM) analysis to evaluate several covariates as potential confounders, including, age, alcohol consumption, BMI, current smoking and length of occupation. A level of $P < 0.05$ was considered statistically significant. All analyses were conducted using SPSS version 11.0 for Windows software.

RESULTS

Demographic characteristics and exposure assessment

The main characteristics of the participating subjects recruited are described in Table 1. There was no statistically significant difference concerning age, body mass index (BMI), current smoking and alcohol consumption between MBTD and the control group. All

Table 2. Summary of personal exposure monitoring for one-week.

Parameter	Control ^a (n = 5)		Mean $\pm$ SD	MBTD (n = 6)		Mean $\pm$ SD	P
	Median	Range		Median	Range		
Benzene (ppm)	0.001	0 - 0.002	0.001 $\pm$ 0.001	0.053	0.012-0.550	0.126 $\pm$ 0.206	0.0005
Toluene (ppm)	0.001	0 - 0.004	0.001 $\pm$ 0.002	0.093	0.026-0.172	0.083 $\pm$ 0.057	0.0004
p-Xylene (ppm)	0.001	0 - 0.001	0.001 $\pm$ 0.001	0.040	0.01 - 0.151	0.050 $\pm$ 0.051	0.008
o-Xylene (ppm)	0.001	0 - 0.001	0.001 $\pm$ 0.0001	0.034	0 - 0.091	0.041 $\pm$ 0.035	0.002

OD, optical density; MBTD, motorbike- taxi drivers ^aoutdoor benzene levels, in previous years as described in Ayi-Fanou et al., 2006.

Table 3. Levels of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ in study population.

Parameter	Control (n=30)		Mean $\pm$ SD	MBTD (n=144)		Mean $\pm$ SD	P value
	Median	Range		Median	Range		
Specific IgG antibodies (OD)	0.086	0.07 - 0.10	0.085 $\pm$ 0.011	0.241	0.10 - 0.630	0.262 $\pm$ 0.117	<0.0001

OD, optical density; MBTD, motorbike- taxi drivers.

participants were of the same social class. Within MBTD, the length of employment was 11.3 ± 5.96 years (mean $\pm$ SD).

The results of personal exposure monitoring are presented in Table 2. The levels of BTX over one-week average exposure were much higher in exposed MBTD than in the rural population. MBTD were currently exposed to a wide range of benzene levels, with a median of 0.053 ppm, range: 0.012- 0.550 ppm, as average exposure over one-week.

Determination of specific IgG antibodies against HQ and p-BQ

The levels of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ are summarized in Table 3. As shown in Table 3, motorbike-taxi drivers had a higher level of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ than the rural population ($p < 0.001$, Student's t test).

As evidenced by the range, there were large inter-individual variations in the levels of specific IgG antibodies. In addition, MBTD driving more than five hour daily had a significantly higher level of specific IgG antibodies compared to those spending fewer time per day ($p < 0.001$, Student's t test, Figure 2).

The benzene concentration in the working atmosphere was significantly correlated with the levels of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ ($r = 0.522$; $p < 0.01$). Furthermore, there was a strong correlation between the levels of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ and the daily driving hour ($r = 0.850$; $p < 0.001$). In addition, we found a weaker but statistically significant correlation between the levels of specific antibodies to HQ and p-BQ and the duration of exposure i.e., duration of employment ($r = 0.393$; $p < 0.01$). Alcohol consumption had a significant impact on the levels of circulating IgG

antibodies to HQ and p-BQ ($r = -0.230$; $p < 0.01$), whereas other confounding factors, such as age, smoking habit had no effect.

Haematological changes

Exposed MBTD had lower total WBC, lymphocytes and eosinophils counts than controls (Table 4). Among WBC subtypes, the most significant difference was found for lymphocytes. Surprisingly, monocytes and neutrophils were significantly elevated in MBTD, even after adjustment for confounding factors. Correlations were significant between specific IgG antibodies to HQ and p-BQ and monocytes ($r = 0.309$; $p = 0.001$) and neutrophils ($r = 0.277$; $p = 0.001$). Red blood cell counts, haemoglobin, hematocrit and MCV were similar between MBTD and controls. The MCHC was significantly elevated in MBTD ($P = 0.001$) and platelets were significantly decreased in MBTD compared to the rural population ($P = 0.032$).

A further analysis of confounding variables with regard to white blood cells suggested that smoking status may have masked the association between benzene and WBC in the unadjusted analyses (not shown).

The analysis showed inverse correlations of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ with lymphocytes ($r = -0.35$, $p < 0.01$) and eosinophils ($r = -0.29$, $p < 0.01$). Significant positive correlations were found between specific IgG antibodies levels and neutrophils ($r = 0.28$, $p < 0.01$) and monocytes ($r = 0.31$, $p < 0.01$).

DISCUSSION

This study investigated haematological changes in MBTD exposed to benzene at the levels between 0.012 and

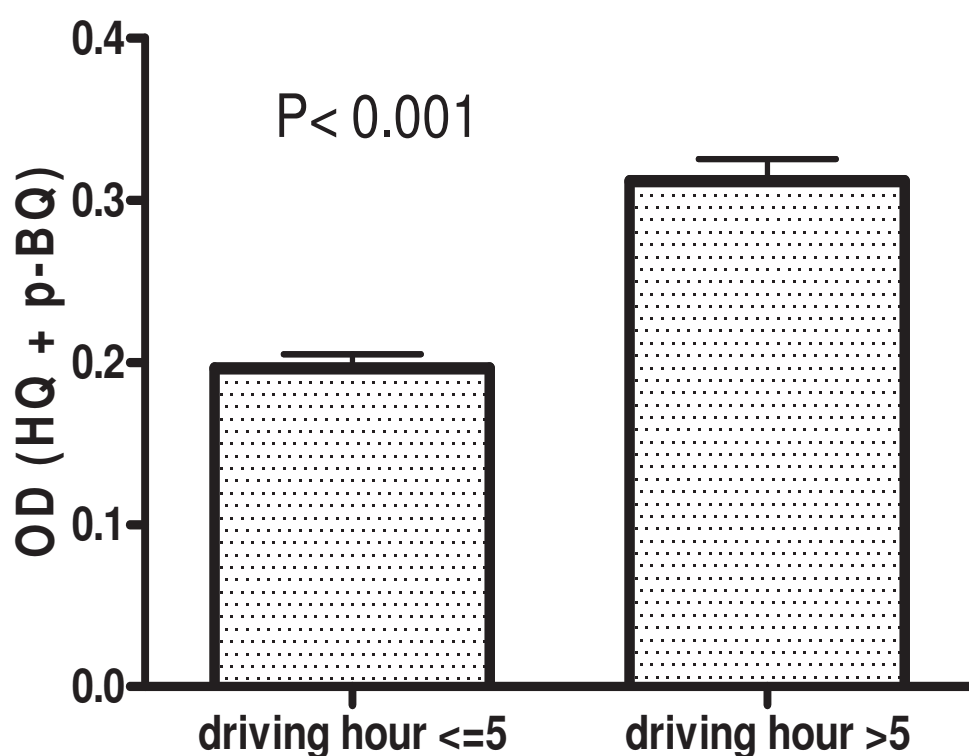


Figure 2. Mean level of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ according to daily driving hours. Legend: OD, optical density; HQ, hydroquinone; p-BQ, p-benzoquinone. The error bars depict the standard errors on the means

Table 4. Blood cell counts in relation to benzene exposure in the study population.

Variable*	Control (n=30)	MBTD (n=144)	P- value ^a
RBC ($\times 10^{10}/L$)	531 ± 67	516 ± 52	0.126
Hemoglobin (g/dl)	14.26 ± 1.56	14.12 ± 1.43	0.515
Hematocrit (%)	43.89 ± 4.88	44.76 ± 4.32	0.255
MCV (fl)	86.63 ± 7.63	86.93 ± 5.30	0.321
MCH (pg)	28.25 ± 3.36	27.43 ± 2.36	0.030
MCHC	32.54 ± 1.97	35.39 ± 3.22	0.001
WBC ($\times 10^6/L$)	5,900 ± 1,213	5,041 ± 1,209	0.001
Lymphocytes ($\times 10^6/L$)	3,200 ± 691	1,767 ± 334	< 0.001
Neutrophils ($\times 10^6/L$)	2,162 ± 672	3,078 ± 346	< 0.001
Monocytes ($\times 10^6/L$)	189.0 ± 89.0	355.8 ± 86.7	< 0.001
Eosinophils ($\times 10^6/L$)	351.7 ± 88	126.0 ± 47	< 0.001
Platelets ($\times 10^9/L$)	238 ± 66	198 ± 50	0.032

Definition of abbreviations: MBTD, motorbike-taxi drivers; RBC, red blood cell; MCV, mean corpuscular volume; fl, femtoliter; MCH, mean corpuscular hemoglobin; pg, picograms; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; WBC, white blood cell. * Means ± standard deviation on raw data, but for WBC and eosinophils, the statistical tests were performed on the log transformed data. ^a P-value was estimated in GLM analyses, adjusting for age, alcohol drinking, BMI, current smoking, recent infection and duration of exposure.

0.550 ppm. The validity of specific IgG antibodies against HQ and p-BQ as an internal biomarker of benzene exposure was also assessed.

We found that exposed MBTD had elevated levels of specific IgG antibodies, as compared to the rural inhabitants. This exposure-dependent increase in the

levels of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ is consistent with the findings of an earlier study conducted by Dimitrova et al. (2005). These authors have studied three groups of professionals heavily exposed to benzene (0.05 to 14.73 ppm). They found that percentages of people bearing specific IgG antibody increased with benzene concentration (Dimitrova et al., 2005).

In the present study, we found that the level of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ showed stronger association with daily driving hour than with the duration of employment, suggesting that the length of real exposure to benzene is what drives the antibody response.

We found an inter-individual variation in the levels of circulating IgG antibodies to HQ and p-BQ. This variation could be related to differences in benzene metabolism. Furthermore, some of village residents might not declare the domestic use of wood. This may explain increased benzene exposure in some villagers, and hence, at least in part, individual variations seen in the levels of IgG antibodies. Domestic wood burning was previously shown to be an important source of benzene (Gustafson et al., 2007).

At present, the main role of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ remains to be determined. Nevertheless, it has been suggested that they could have protective functions, facilitating elimination from the body of reactive metabolites or could be harmful for the immune reactions in the organism (Dimitrova et al., 2005).

Benzene metabolites such as HQ and p-BQ are haptenes, which form antigens in professionally exposed individuals leading to specific antibody generation. The specific phenotype of people for benzene metabolism and the concentration to which they are exposed may induce inter-individual variations. This hypothesis has also been suggested elsewhere (Dimitrova et al., 2005). Exposure to benzene at concentrations, for which no significant toxicity to bone marrow is expected, may lead to first, the haptenes, HQ and p-BQ, forming antigens and second, subsequent antibody production. We do not know if antibody induction also occurs however, with higher benzene concentrations that show toxicity to blood cells progenitors.

In the present study, individuals were all exposed to benzene levels lower than 1 ppm. There was no toxicity at that low concentration of benzene. This makes the difference with the study of Dimitrova et al. (2005). Nevertheless, in both studies the levels of specific antibodies against HQ and p-BQ were about 25 to 30% of that found in exposed individuals. Further studies are therefore needed for fine specificity testing of these antibodies. At present, we hypothesized that the antibody reactivity found in controls may result from cross-reactivity to the carrier protein used to measure antibodies to HQ and p-BQ. These antibodies found in controls might be specific to common recall antigens or simply as a result of minimal exposure to benzene in

controls. Benzene exposure will naturally lead to 3 different types of antibodies: the one type reacts with the haptenes alone, the second type reacts with the carrier protein alone and the 3rd reacts with the hapten-carrier conjugates presented to the immune system. Exploring these futures of a hapten-induced immune response with regard to the background responses found in controls, should be targets of subsequent studies. Our results cannot exclude contributions from hapten-like substances in human diet with impact on parameters used in this study. The control participants of the study may equally be exposed to very low levels of benzene deriving from gasoline usage for instance.

We found lower total WBC, lymphocyte, eosinophils and platelet counts in MBTD in comparison to controls. These findings are consistent with many recent studies in which leucopenia has been invariably shown to be the most sensitive effect on blood cells associated with benzene exposure (Qu et al., 2002; Rothman et al., 1996a; Lan et al., 2004; Bogadi-Sare et al., 2000; Rothman et al., 1996b). In one study, however, no decrease was found in WBC number among workers exposed to low levels of benzene (0.14 to 2.08 ppm) (Khuder et al., 1999).

The present data clearly showed reduction of the number of lymphocytes (about 40-55%) with no significant influence of confounding factors. This result is also in agreement with the findings from Lan et al. (2004), that reported decreased absolute lymphocyte counts in shoe workers exposed to < 1 ppm benzene in comparison to unexposed controls (Lan et al., 2004). However, Collins et al. (1997) found no increase in the prevalence of lymphopenia and other measures of hematotoxicity, including MCV and counts of total WBC, RBC, haemoglobin, and platelets which produced similar results among workers with daily 8-hour time-weighted exposures averaging 0.55 ppm. Similar conclusion was reported in a large study on 1,200 employees exposed to a mean average concentration of 0.60 ppm (Tsai et al., 2004).

The mechanism underlying reduction in lymphocytes and eosinophils (reduced by 30-40%) is probably the same, i.e. direct cytotoxicity of benzene metabolites on production of WBC in the bone marrow. Benzene is known as immunotoxic and blood cell carcinogen, inducing anaemia, and blood formula modification (Snyder et al., 1993; Smith et al., 1999).

We found significantly elevated neutrophils counts in exposed MBTD compared to the rural residents. These findings are inconsistent with some previous studies, which reported decreased neutrophil counts as the most sensitive blood parameter in benzene-exposed workers (Qu et al., 2002; Robert et al., 2010). Previous reports suggest that human exposure to benzene concentration of 1 ppm or below does not produce depression of neutrophils and monocytes (Lan et al., 2004; Kang et al., 2005). Increased neutrophil counts have been associated

with cancer (Waugh and Wilson, 2008) and bacterial infections.

In our present study, RBC counts remained unchanged between village inhabitant and exposed MBTD. This result is consistent with many studies, which reported the same at benzene exposure levels ranging from 1.9-14.8 ppm (Bogadi-Sare et al., 2003) and 0.005-5.3 ppm (Kang et al., 2005). However, others reported decreased RBC counts at benzene levels ranging from 0.14-2.08 ppm (Khuder et al., 1999) or found declined RBC in heavily benzene-exposed workers (maximum level of 34 ppm) (Ward et al., 1996).

Considering data from these previous studies, the absence of differences in RBC counts in our study may be due to the low levels of benzene in the ambient air in Cotonou.

Our data corroborated and extended the results of previous studies conducted in people living and working in the city of Cotonou. These studies found an increased in the level of leukaemia (Zinsou et al., 1990), blood neoplasm, neutropeny and lymphopeny (Adjagba, 2000).

In conclusion, exposure to benzene at the levels between 0.012 and 0.550 ppm is associated with decreased WBC, lymphocyte and eosinophil counts in MBTD. These MBTD developed antigens containing HQ and p-BQ haptens and antibodies of IgG type. The present data allows to conclude that antibodies against p-BQ and HQ are very promising tools and should be further validated for assessment of human exposure to low concentrations of benzene at the working places.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank all the volunteers who agreed to participate in this study. Special thanks are due to Professor Herman Autrup, Aarhus University, Denmark for fruitful cooperation. This work was partially supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Republic of Benin.

REFERENCES

- Adjagba MPD (2000). Study contribution epidemiological cancer in the Republic of Benin. PhD in Medicine at the National University of Benin. No. 868.
- Avogbe PH, Ayi-Fanou L, Autrup H, Loft S, Fayomi B, Sanni A, Vinzents P, and Møller P (2005). Ultrafine particulate matter and high-level benzene urban air pollution in relation to oxidative DNA damage. *Carcinogenesis*, 26: 613-620.
- Ayi Fanou L, Mobio TA, Creppy EE, Fayomi B, Fustoni S, Møller P, Kyrtopoulos S, Georgiades P, Loft S, Sanni A, Skov H, Ovrebø S, Autrup H (2006). Survey of air pollution in Cotonou, Benin - air monitoring and biomarkers. *Sci. Total Environ.*, 358: 85-96.
- Bogadi-Sare A, Zavalic M, Turk R (2003). Utility of a routine medical surveillance program with benzene exposed workers. *Am. J. Ind. Med.*, 44: 467-473.
- Bogadi-Sare A, Zavalic M, Trosic I, Turk R, Kontosic I, Jelcic I (2000). Study of some immunological parameters in workers occupationally exposed to benzene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 73: 397-400.
- Collins JJ, Ireland BK, Easterday PA, Nair RS, Braun J (1997). Evaluation of lymphopenia among workers with low-level benzene exposure and the utility of routine data collection. *J. Occup. Environ. Med.*, 39: 232-237.
- Dimitrova ND, Kostadinova RY, Marinova SN, Popov TA, Panev TI (2005). Specific immune responses in workers exposed to benzene. *Int. Immunopharmacol.*, 5: 1554-1559.
- Ducos P, Gaudin R, Robert A, Francin JM, Maire C (1990). Improvement in HPLC analysis of urinary trans trans-muconic acid, a promising substitute for phenol in the assessment of benzene exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 62: 529-534.
- Fustinoni S, Buratti M, Campo L, Colombi A, Consonni D, Pesatori AC, Bonzini M, Farmer P, Garte S, Valerio F, Merlo DF, Bertazzi PA (2005). Urinary t,t-muconic acid, S-phenylmercapturic acid and benzene as biomarkers of low benzene exposure. *Chem. Biol. Interact.*, 153-154: 253-256.
- Gustafson P, Barregard L, Strandberg B, Sallsten G (2007). The impact of domestic wood burning on personal, indoor and outdoor levels of 1,3-butadiene, benzene, formaldehyde and acetaldehyde. *J. Environ. Monit.*, 9: 23-32.
- Hayes RB, Songnian Y, Dosemeci M, Linet M (2001). Benzene and lymphohematopoietic malignancies in humans. *Am. J. Ind. Med.*, 40: 117-126.
- INSAE, National Institute of Statistics and Economic Analysis (2008). Dashboard. Economic and Social Council of 4th Quarter, 2002 to 2030, <http://www.insae-bj.org>.
- IARC (1987). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs, Lyon, France. 1- 42: 120-122.
- Kang SK, Lee MY, Kim TK, Lee JO, Ahn YS (2005). Occupational exposure to benzene in South Korea. *Chem. Biol. Interact.*, 153-154: 65-74.
- Kèlomé NC, Lévêque J, Andreux F, Milloux MJ, Oyédé LM (2006). 14C plant isotopic composition ($\delta^{13}C$) evidence for urban CO₂ pollution in the city of Cotonou, Benin (West Africa). *Sci. Total Environ.*, 366: 439-447.
- Khuder SA, Youngdale MC, Bisesi MS, Schaub EA (1999). Assessment of complete blood count variations among workers exposed to low levels of benzene. *J. Occup. Environ. Med.*, 41: 821-826.
- Lan Q, Zhang L, Li G, Vermeulen R, Weinberg RS, Dosemeci M, Rappaport SM, Shen M, Alter BP, Wu Y, Kopp W, Waidyanatha S, Rabkin C, Guo W, Chanock S, Hayes RB, Linet M, Kim S, Yin S, Rothman N, Smith MT (2004). Hematototoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Sci.*, 306: 1774-1776.
- Lange A, Smolik R, Zatoński W, Szymańska J (1973). Serum immunoglobulin levels in workers exposed to benzene, toluene and xylene. *Int. Arch. Arbeitsmed.*, 31: 37-44.
- Leong ST, Muttamara S, Laortanakul P (2002). Influence of benzene emission from motorcycles on Bangkok air quality. *Atmos. Environ.*, 36: 651-661.
- Macedo SM, Vaz SC, Lourenço EL, de Sousa Mda G, Ligeiro-Oliveira AP, Ferreira JM Jr, Almeida SR, de Lima WT, Farsky SH (2007). In vivo hydroquinone exposure impairs allergic lung inflammation in rats. *Toxicol.*, 241: 47-57.
- Nielsen PS, Andreassen A, Farmer B, Overbo S, Autrup H (1996). Biomonitoring of diesel exhaust exposed workers DNA and hemoglobin adducts and urinary 1-hydroxypyrene as markers of exposure. *Toxicol. Lett.*, 86: 27-37.
- Pyatt DW, Stillman WS, Irons RD (1998). Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, inhibits NF- κ B in primary human CD4+ T lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 149: 178-184.
- Qu Q, Shore R, Li G, Jin X, Chen LC, Cohen B, Melikian AA, Eastmond D, Rappaport SM, Yin S, Li H, Waidyanatha S, Li Y, Mu R, Zhang X, Li K (2002). Hematological changes among Chinese workers with a broad range of benzene exposures. *Am. J. Ind. Med.*, 42: 275-285.
- Robert SA, Kerzic PJ, Zhou Y, Chen M, Nicolich MJ, Lavelle K, Armstrong TW, Bird MG, Lin L, Fu H, Irons RD (2010). Peripheral blood effects in benzene-exposed workers. *Chem. Biol. Interact.*, 184: 174-181.
- Rothman N, Li GL, Dosemeci M, Bechtold WE, Marti GE, Wang YZ, Linet M, Xi LQ, Lu W, Smith MT, Titenko-Holland N, Zhang LP, Blot W, Yin SN, Hayes RB (1996a). Hematototoxicity among Chinese workers heavily exposed to benzene. *Am. J. Ind. Med.*, 29: 236-246.

- Rothman N, Smith MT, Hayes RB, Li GL, Irons RD, Dosemeci M, Haas R, Stillman WS, Linet M, Xi LQ, Bechtold WE, Wiemels J, Campleman S, Zhang L, Quintana PJ, Titenko-Holland N, Wang YZ, Lu W, Kolachana P, Meyer KB, Yin S (1996b). An epidemiologic study of early biologic effects of benzene in Chinese workers. *Environ. Health Perspect.*, 104: 1365-1370.
- Smith MT (1999). Benzene, NQO1, and genetic susceptibility to cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 7624 -7626.
- Smith MT, Zhang L, Jeng M, Wang Y, Guo W, Duramad P, Hubbard AE, Hofstadler G, Holland NT (2000). Hydroquinone, a benzene metabolite, increases the level of aneuploidy of chromosomes 7 and 8 in human CD34-positive blood progenitor cells. *Carcinogenesis*, 21: 1485-1490.
- Snyder R, Hedli CC (1996). An overview of benzene metabolism. *Environ. Health Perspect.*, 104: 1165-1171.
- Snyder R, Witz G, Goldstein BD (1993). The toxicology of benzene. *Environ Health Perspect.*, 100: 293-306.
- Subrahmanyam VV, Kolachana P, Smith MT (1991). Hydroxylation of phenol to hydroquinone catalyzed by a human myeloperoxidase-superoxide complex: possible implications in benzene-induced myelotoxicity. *Free Radic. Res. Commun.*, 15: 285-296.
- Tsai SP, Fox EE, Ransdell JD, Wendt JK, Waddell LC, Donnelly RP (2004). A hematology surveillance study of petrochemical workers exposed to benzene. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 40: 67-73.
- Ward E, Hornung R, Morris J, Rinsky R, Wild D, Halperin W, Guthrie W (1996). Risk of low red or white blood cell count related to estimated benzene exposure in a rubberworker cohort (1940-1975). *Am. J. Ind. Med.*, 29: 247-257.
- Waugh DJ, Wilson C (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.*, 14: 6735-6741.
- Wiwanitkit V, Soogarun S, Suwansaksri J (2007). A correlative study on red blood cell parameters and urine trans, trans-muconic acid in subjects with occupational benzene exposure. *Toxicol. Pathol.*, 35: 268-269.
- Zhang L, Rothman N, Wang Y, Hayes RB, Bechtold W, Venkatesh P, Yin SN, Wang YZ, Dosemeci M, Li GL, Lu W, Smith MT (1996). Benzene induces aneuploidy of chromosome 9 in the lymphocytes of exposed workers. *Environ. Health Perspect.*, 104: 1325-1329.
- Zinsou CP, Fourn L, Zohoun T (1990). Epidemiological aspects of cancer at the National Centre University Hospital of Cotonou. *Med. Black Afr.*, 37: 230-236.

ANNEXES

**ANNEXE 1 : FORMULAIRE DE RECUEIL DES DONNÉES DE
L'ÉTUDE CİRCE**

N° Identification		Initiales		Etude
Centre	N°inclusion	Nom	Prénom	CiRCE

Formulaire de Recueil des Données

Initiales du patient : |_|_|_|_| / |_|_|_|_|
 (Trois premières lettres du nom) (Deux premières lettres du prénom)

N° Identification : |_|_| |_|_|_|_|_|
 Centre N° Inclusion

Date de naissance : |_|_|_|_|/|_|_|_|/|_|_|_|_|_|_|_|_|
 (jj/mm/aaaa)

Sexe : ☐ Masculin ⁽¹⁾ ☐ Féminin ⁽²⁾

Pays de naissance du patient : _____
 (Ecrire en majuscules)

Codage INSEE : |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|
Ne pas remplir, cadre réservé au CIC-EC

Pays de naissance des parents :
 (Ecrire en majuscules)

- Père : _____
- Mère : _____

Codage INSEE : |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|
 Codage INSEE : |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|
Ne pas remplir, cadre réservé au CIC-EC

Date d'inclusion : |_|_|_|_|/|_|_|_|/|_|_|_|_|_|_|_|_|
 (jj/mm/aaaa)

Médecin hépatologue : _____
 (Ecrire en majuscules)

N° Identification	Initiales	Etude
Centre N°inclusion	Nom Prénom	CiRCE

VERIFICATION DES CRITERES D'INCLUSION ET DE NON INCLUSION

CRITERES D'INCLUSION (Si 1 ou plusieurs réponses NON ⇒ Ne pas inclure le patient)

	Oui	Non
Age supérieur ou égal à 35 ans.....	☐ (1)	☐ (0)
Affiliation à un régime de sécurité sociale.....	☐ (1)	☐ (0)
Atteint par une cirrhose compliquée ou non de CHC.....	☐ (1)	☐ (0)

CRITERES DE NON INCLUSION (Si 1 ou plusieurs réponses OUI ⇒ Ne pas inclure le patient)

	Oui	Non
Age inférieur à 35 ans.....	☐ (1)	☐ (0)
Atteint par un cancer extra hépatique en évolution ou en cours de traitement.....	☐ (1)	☐ (0)
Atteint par un cancer du foie autre qu'un CHC.....	☐ (1)	☐ (0)
Atteint par un CHC sur foie non cirrhotique.....	☐ (1)	☐ (0)
Infecté par le VIH.....	☐ (1)	☐ (0)
Maladie somatique* ou psychiatrique grave.....	☐ (1)	☐ (0)
Sous tutelle ou sauvegarde de justice.....	☐ (1)	☐ (0)

Consentement éclairé signé..... ☐ Oui (1) ☐ Non (0)

Si oui, date de recueil du consentement du patient (jj/mm/aaaa) : |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|

PATIENT ELIGIBLE

Tous les critères d'inclusion doivent être cochés OUI et tous les critères de non inclusion doivent être cochés NON

Oui	Non
☐ (1)	☐ (0)

✎ * En cas d'hépatite alcoolique aigue sur cirrhose, le patient pourra être inclus après guérison biologique de l'hépatite (il faut attendre au moins 6 à 8 semaines avant de faire les prélèvements sanguins) !

N° Identification	Initiales	Etude
Centre N°inclusion	Nom Prénom	CiRCE

Date de l'examen initial dans le cadre de l'étude (jj/mm/aaaa) : |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|

DIAGNOSTIC INITIAL

➤ CIRRHOSE

Année du diagnostic : |_|_|_|_|

Etiologie de la cirrhose : ☐ Virus B ⁽¹⁾ ☐ Virus C ⁽²⁾ ☐ Pas de virus ⁽⁰⁾

Examen(s) ayant permis de poser le diagnostic de cirrhose :

- Biopsie	☐ Oui ⁽¹⁾	☐ Non ⁽⁰⁾
Si oui, préciser la date de la biopsie (mm/aaaa): _ _ / _ _ _ _		
- Hémodynamique sus-hépatique	☐ Oui ⁽¹⁾	☐ Non ⁽⁰⁾
Si oui, préciser le gradient : _ _ mmHg		
- Test biologique de fibrose	☐ Oui ⁽¹⁾	☐ Non ⁽⁰⁾
Si oui, préciser : Fibrose : _ _ (score) Activité : _ _ (score)		
- Fibroscan	☐ Oui ⁽¹⁾	☐ Non ⁽⁰⁾
Si oui, préciser le score : _ _ , _ kPa IQR : _ _ , _		
- Diagnostic clinico-biologique	☐ Oui ⁽¹⁾	☐ Non ⁽⁰⁾

➤ CHC

☐ Oui ⁽¹⁾

☐ Non ⁽⁰⁾

Si non, passer à l'item « Examens réalisés pour affirmer ou exclure le CHC » page 4

- **Si oui :**

✓ Date du diagnostic (mm/aaaa) : |_|_|_|_| / |_|_|_|_|

✓ Caractéristiques du CHC :

- Uninodulaire : ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

Si oui, taille du nodule : |_|_| cm

- Multinodulaire : ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

Si oui, nombre de nodules : ☐ ≤ 3 ⁽¹⁾ ☐ > 3 ⁽²⁾

- Infiltrant diffus : ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

- Métastases : ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

N° Identification		Initiales		Etude
 Centre	 N°inclusion	 Nom	 Prénom	CiRCE

- **Examens réalisés pour affirmer ou exclure le CHC :**

✓ Diagnostic histologique du CHC: ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

Si oui :

Date de la biopsie (mm/aaaa) : /

CHC mis en évidence : ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

✓ Echographie ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

Si oui, CHC suspecté ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

✓ Echographie de contraste ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

Si oui, CHC suspecté ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

✓ Scanner ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

Si oui, CHC suspecté ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

✓ IRM ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

Si oui, CHC suspecté ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

✓ AFP (Alfa Foeto Protéine) : UI/ml

- **Spectro-IRM demandée dans le cadre de l'étude :** ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

Uniquement dans les centres de Dijon et Strasbourg

N° Identification		Initiales		Etude
				CiRCE
Centre	N°inclusion	Nom	Prénom	

EXAMEN CLINIQUE DU PATIENT

- Taille : cm - Tour de taille : cm
- Poids actuel : kg - Poids à 20 ans : kg
- Ancienneté de la surcharge pondérale éventuelle* : années ☐ NA ⁽⁸⁾
 (*Indice de masse corporelle, IMC ≥ 25)
- Perte de poids dans les 6 derniers mois : ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾ ☐ Inconnu ⁽⁹⁾
- Si oui, préciser le poids antérieur à la perte de poids : kg
- Ménopause : ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾ ☐ NA ⁽⁸⁾
- Hypertension artérielle diagnostiquée antérieurement : ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾ ☐ Inconnu ⁽⁹⁾
- Si oui, est-elle traitée : ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾ ☐ Inconnu ⁽⁹⁾

ANTECEDENTS / TERRAIN

☞ **Antécédents de cancer extra hépatique** : ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

Si oui, année du diagnostic :

Merci de préciser la localisation : _____
 (Ecrire en majuscules)

Codage CIM10 :

**A ne pas remplir, cadre
réservé au CIC-EC**

☞ **Antécédents athéromateux** :

- Accident Vasculaire Cérébral : ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾ ☐ Inconnu ⁽⁹⁾
- Infarctus / Angor: ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾ ☐ Inconnu ⁽⁹⁾
- Artérite : ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾ ☐ Inconnu ⁽⁹⁾

☞ **Autres antécédents** :

- ATCD familial de diabète : ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾ ☐ Inconnu ⁽⁹⁾
- Si oui, préciser: ☐ Type I ⁽¹⁾ ☐ Type II ⁽²⁾ ☐ Inconnu ⁽⁹⁾

N° Identification	Initiales	Etude
Centre N°inclusion	Nom Prénom	
		CiRCE

MODE DE VIE

Etudes

- Diplôme le plus élevé obtenu :
- ☐ Pas de diplôme ou certificat d'étude ⁽¹⁾
☐ BAC ⁽³⁾

☐ BEPC, CAP, BEP ⁽²⁾
☐ BAC +2 ⁽⁴⁾

☐ > BAC +2 ⁽⁵⁾

Activité physique

- Activité physique professionnelle au cours de la dernière année:

- ☐ Aucune ou Faible ⁽⁰⁾
Travail sédentaire ± quelques déplacements quotidiens
(Ex : Travail de bureau, Secrétaire si pas de port de charge, Caissière de supermarché, Conducteur d'engins, ...)

☐ Modérée ⁽¹⁾
Déplacements fréquents, port de charge de temps à autre
(Ex : Instituteur, Infirmière, Routier, Travail à la chaîne selon activité, ...)

☐ Importante ⁽²⁾
Travail physique avec port de charge
(Ex : Maçon, Travail manutentionnaire, Travail à la chaîne selon activité, ...)

Profession en clair : _____
(Ecrire en majuscules)

- Activité physique de loisir au cours de la dernière année (incluant marche rapide, sports, jardinage, travaux de maçonnerie...):

- ☐ Aucune ou Faible ⁽⁰⁾
<1h/semaine

☐ Modérée ⁽¹⁾
1h à 3h30/semaine

☐ Importante ⁽²⁾
>3h30/semaine

Activité dominante en clair : _____
(Ecrire en majuscules)

Tabac

Consommation de tabac : ☐ Non (n'a jamais fumé) ⁽⁰⁾ ☐ Actuelle ⁽¹⁾ ☐ Ancienne ⁽²⁾
Si Non, passer à l'item « Alcool » (Arrêt > 6mois)

Si consommation actuelle ou ancienne, préciser :

- ✓ Quantités: - cigarettes = ____ (nb/jour)
 - cigares = ____ (nb/jour)
 - pipes = ____ (nb/jour)
- ✓ Age de début : ____ ans
- ✓ Age de fin si ex fumeur : ____ ans
- ✓ Période(s) d'interruption(s) : ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾
- Si oui, durée cumulée d'interruption(s) : ____ mois

N° Identification	Initiales	Etude
Centre N°inclusion	Nom Prénom	CiRCE

Alcool

Consommation d'alcool : ☐ Non (n'a jamais bu d'alcool)⁽⁰⁾ ☐ Oui⁽¹⁾ ☐ Inconnu⁽⁹⁾
Si non ou inconnu, passer à l'item « Cannabis »

Si oui :

✓ Consommation quotidienne : ☐ Non⁽⁰⁾ ☐ Actuelle⁽¹⁾ ☐ Ancienne⁽²⁾
 (Arrêt > 6 mois)

Si consommation quotidienne actuelle ou passée, durée de la consommation quotidienne (années) :

✓ Consommation par semaine la plus élevée : verres

✓ Type de boissons alcoolisées consommées : ☐ Vin⁽¹⁾ ☐ Bière⁽²⁾ ☐ Spiritueux⁽³⁾

✓ Consommation excessive d'alcool : ☐ Oui⁽¹⁾ ☐ Non⁽⁰⁾

Une consommation excessive de boissons alcoolisées correspond plus de 21 verres/semaine (ou >3 verres/jour) pour un homme et à plus de 14 verres/semaines (ou >2 verres/jour) pour une femme. Pour référence, un verre d'alcool correspond à 10g d'alcool consommé au bar (souvent plus élevée à la maison).

Si oui, préciser :

- Durée cumulée de la consommation excessive : années
- Consommation excessive interrompue : ☐ Oui⁽¹⁾ ☐ Non⁽⁰⁾

Si oui, depuis années

Cannabis

Consommation de cannabis : ☐ Inconnu⁽⁹⁾ ☐ Non (n'en a jamais consommé)⁽⁰⁾ ☐ Oui⁽¹⁾
Si non ou inconnu, passer à la page suivante

Si oui, préciser :

✓ Consommation ancienne interrompue: ☐ Oui⁽¹⁾ ☐ Non⁽⁰⁾
 Fréquence de consommation : ☐ Régulière⁽¹⁾ ☐ Exceptionnelle⁽²⁾

✓ Consommation actuelle : ☐ Oui⁽¹⁾ ☐ Non⁽⁰⁾
 Fréquence de consommation : ☐ Régulière⁽¹⁾ ☐ Exceptionnelle⁽²⁾

✓ Nombre moyen de joints par semaine de consommation : joints

✓ Durée totale de la consommation : années
 (Durée cumulée en cas d'interruptions répétées)

N° Identification	Initiales	Etude
Centre N°inclusion	Nom Prénom	CiRCE

TRAITEMENTS / ANTIVIRAUX

➤ **Patient atteint d'hépatite B :** ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

Si oui, précisez :

- Hépatite B :	☐ Active ⁽¹⁾	☐ Inactive ⁽²⁾	☐ Sans Objet ⁽⁸⁾
- Interféron	☐ Oui ⁽¹⁾	☐ Non ⁽⁰⁾	☐ Inconnu ⁽⁹⁾
Arrêt réplication	☐ Oui ⁽¹⁾	☐ Non ⁽⁰⁾	☐ Inconnu ⁽⁹⁾
- Analogues nucléo(s/t)idiques	☐ Oui ⁽¹⁾	☐ Non ⁽⁰⁾	☐ Inconnu ⁽⁹⁾
Arrêt réplication	☐ Oui ⁽¹⁾	☐ Non ⁽⁰⁾	☐ Inconnu ⁽⁹⁾
- Séroconversion HBe due au traitement	☐ Oui ⁽¹⁾	☐ Non ⁽⁰⁾	☐ Inconnu ⁽⁹⁾

➤ **Patient atteint d'hépatite C :** ☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

Si oui, précisez :

- Interféron	☐ Oui ⁽¹⁾	☐ Non ⁽⁰⁾	☐ Inconnu ⁽⁹⁾
Si oui, préciser :			
☐ Monothérapie ⁽¹⁾	☐ Standard + ribavirine ⁽²⁾	☐ Pegylé + ribavirine ⁽³⁾	
Réponse soutenue :	☐ Oui ⁽¹⁾	☐ Non ⁽⁰⁾	☐ Inconnue ⁽⁹⁾

➤ **TRAITEMENTS HORMONAUX, ANTIDIABETIQUES & HYPOLIPEMIANTS**

☐ Oui ⁽¹⁾ ☐ Non ⁽⁰⁾

Si oui, prévenir le correspondant pharmacovigilant et compléter le listing médicament avec les éléments disponibles

Classe de Médicament		Noms (DCI et/ou spécialité) <i>(Ecrire en majuscules)</i>	Durée <i>(années)</i>	- Si arrêt, préciser l' <u>année</u> - Si traitement en cours, noter « <u>NA</u> »
Traitements hormonaux (hormones sexuelles)	Contraceptifs (toutes voies d'administration)		_ _	_ _ _ _
	Traitement hormonal substitutif		_ _	_ _ _ _
	Progestatif seul		_ _	_ _ _ _
	Anti androgènes		_ _	_ _ _ _
	Androgènes		_ _	_ _ _ _

N° Identification		Initiales		Etude	
				CiRCE	
Centre	N°inclusion	Nom	Prénom		

Hypolipémiants	Fibrates			
	Statines			
Antidiabétiques	Sulfamides			
	Biguanides			
	Thiazolinediones			
	Autres			
	Insulines			
Colchicine (Traitement au long cours)				
Médicaments amaigrissants				

☞ **MÉDICAMENTS PRIS A L'INCLUSION** : photocopier l'ordonnance du traitement habituel et remplir le tableau ci-dessous (interrogatoire nécessaire pour déterminer la durée).

	Noms (DCI ou spécialité) (Ecrire en majuscules)	Durée (années)
1		
2		
3		
4		
5		

Commentaires sur les traitements :

N° Identification		Initiales		Etude
				CiRCE
Centre	N°inclusion	Nom	Prénom	

BILAN SANGUIN
dans les 2 mois précédant l'inclusion

BIOLOGIE STANDARD

- Plaquettes :		/mm ³	- Bilirubine totale:		μmol/L
- TP :		%	- Cholestérol total:		g/L
- INR :			- LDL :		g/L
- Ferritinémie :		μg/L	- HDL :		g/L
- Albuminémie:		g/L	- Triglycérides :		g/L
- Créatininémie :		μmol/L	- Ig G:		g/L
- Glycémie:		μmol/L	- Ig A :		g/L
- CRP:		mg/L	- Ig M:		g/L
- Transaminases:		UI/L	- CHILD-PUGH:		(Score) (Lettre)
- Gamma GT:		UI/L	- MELD:	Ne pas remplir: calcul automatique	

VIROLOGIE

	Présent	Absent	Non recherché
- Antigène HBs :	☐ ⁽¹⁾	☐ ⁽⁰⁾	☐ ⁽⁸⁾
- Anticorps anti HBc :	☐ ⁽¹⁾	☐ ⁽⁰⁾	☐ ⁽⁸⁾
- Antigène HBe:	☐ ⁽¹⁾	☐ ⁽⁰⁾	☐ ⁽⁸⁾
- Anticorps anti HBe:	☐ ⁽¹⁾	☐ ⁽⁰⁾	☐ ⁽⁸⁾
- Anticorps anti delta :	☐ ⁽¹⁾	☐ ⁽⁰⁾	☐ ⁽⁸⁾
- Anticorps anti VHC :	☐ ⁽¹⁾	☐ ⁽⁰⁾	☐ ⁽⁸⁾
- Charge virale B :	☐ Recherché ⁽¹⁾	☐ Non recherché ⁽⁰⁾	
Si recherché, valeur de la charge virale :			10 ³ UI / mL
- Génotype viral B :	☐ Recherché ⁽¹⁾	☐ Non recherché ⁽⁰⁾	
Si recherché, nom du génotype :			
- Charge virale Delta :	☐ Recherché ⁽¹⁾	☐ Non recherché ⁽⁰⁾	
Si recherché, valeur de la charge virale :			10 ³ UI / mL
- Charge virale C :	☐ Recherché ⁽¹⁾	☐ Non recherché ⁽⁰⁾	
Si recherché, valeur de la charge virale :			10 ³ UI / mL
- Génotype viral C :	☐ Recherché ⁽¹⁾	☐ Non recherché ⁽⁰⁾	
Si recherché, nom du génotype :			

J'atteste que les informations recueillies des pages 1 à 10 de ce cahier d'observation sont complètes et exactes.

Fait le : / /

Signature de l'investigateur :

PROJET CIRCE - ENQUÊTE MEDICAMENTS

Correspondants des Centres de Pharmacovigilance :

- Besançon : Mme Marie Blanche VALNET	Tél. : 03.81.21.83.99	Mail : mbvalnet-rabier@chu-besancon.fr Mail : jpkantelip@chu-besancon.fr
- Dijon : Dr Catherine SGRO	Tél. : 03.80.29.37.42	Mail: catherine.sgro@chu-dijon.fr
- Nancy : Dr Philippe TRECHOT	Tél. : 03.83.85.27.60	Mail: p.trechot@chu-nancy.fr
- Reims : Dr Thierry TRENQUE	Tél. : 03.26.78.77.80	Mail: ttrenque@chu-reims.fr
- Strasbourg : Dr Martine ALT	Tél. : 03.88.11.64.80	Mail: Martine.ALT@chru-strasbourg.fr

N° Centre : N° inclusion :

CLASSE	Si OUI : cocher la case et aller à « DCI » Si NON : passer à la classe suivante	DCI	NOMS DE SPECIALITE LES PLUS COURANTS A TITRE INDICATIF	Durée en années	Cocher la case si encore en cours
HYPOLIPEMIANTS Oui ☐ Non ☐	☐	BEZAFIBRATE	BEFIZAL®		☐
	☐	CIPROFIBRATE	LIPANOR®		☐
	☐	FENOFIBRATE	FENOFIBRATE ® FEGENOR® LIPANTHYL® SECALIP®		☐
	☐	GEMFIBROZIL	LIPUR®		☐
	☐	ATORVASTATINE	TAHOR® CADUET® (+AMLODIPINE)		☐
	☐	FLUVASTATINE	FRACTAL® LESCOL®		☐
	☐	PRAVASTATINE	PRAVASTATINE® PRAVADUAL® (+ASPIRINE) ELISOR® VASTEN®		☐
	☐	ROSUVASTATINE	CRESTOR®		☐
	☐	SIMVASTATINE	LODALES SIMVASTATINE® ZOCOR® INEGY ® (+EZETIMIBE)		☐
	☐	EZETIMIBE	EZETROL® INEGY ® (+SIMVASTATINE)		☐
	☐	ACIDE NICOTINIQUE	NIASPAN®		☐
	☐	ACIDES GRAS	MAXEPA® OMACOR® TRIGLISTAB® YSOMEGA®		☐ ☐ ☐ ☐
Hypolipémiant en complément d'un régime dans les hypertriglycéridémies et le	☐	BENFLUOREX	MEDIATOR®		☐

diabète asymptomatique Oui ☐ Non ☐					
ANTIDIABETIQUES Oui ☐ Non ☐	☐	INSULINES (toujours par voie injectable)			☐
	☐	ACARBOSE	GLUCOR®		☐
	☐	CARBUTAMIDE	GLUCIDORAL®		☐
	☐	GLIBENCLAMIDE	DAONIL®, HEMIDAONIL ® EUGLUCAN® MIGLUCAN® GLUCOVANCE ® (+METFORMINE)		☐
	☐	GLIBORNURIL	GLUTRIL®		☐
	☐	GLICLAZIDE	DIAMICRON®		☐
	☐	GLIMEPIRIDE	AMAREL®		☐
	☐	GLIPIZIDE	GLIBENEZE® MINIDIAB® OZIDIA®		☐
	☐	METFORMINE METFORMINE ASSOCIEE	METFORMINE® STAGID® DIABAMYL® GLUCOPHAGE® AVANDAMET® (+ROSIGLITAZONE) COMPETACT® (+PIOGLITAZONE) GLUCOVANCE ® (+GLIBENCLAMIDE) NOVONORM® (+ REPAGLINIDE)		☐
	☐	MIGLITOL	DIASTABOL®		☐
	☐	PIOGLITAZONE	ACTOS® COMPETACT® (+METFORMINE)		☐
	☐	REPAGLINIDE	NOVONORM® (+ METFORMINE)		☐
	☐	ROSIGLITAZONE	AVANDIA® AVANDAMET ® (+METFORMINE)		☐
	MEDICAMENTS DE L'OBESE Oui ☐ Non ☐	☐	ORLISTAT	XENICAL®	
☐		RIMONABANT	ACOMPLIA®		☐
☐		SIBUTRAMINE	SIBUTRAL® REDUCTYL®		☐
COLCHICINE Oui ☐ Non ☐	☐	COLCHICINE	COLCHICINE COLCHIMAX (+ OPIUM)		☐
TRAITEMENT MENOPAUSE Oui ☐ Non ☐	☐	OESTROGENES COMPRIMES (VOIE ORALE OU VAGINALE)	ESTREVA® ESTROFEM® ETHYNIL®		☐

			ESTRADIOLOROMONE PHYSIOGINE® PROGYNOVA® PROVAMES®		
	☐	OESTROGENES PATCHES	CLIMARA® DERMESTRIL® ESTRADERM® ESTRAPATCH® FEMSEPT® MENORESTOESCLIM® SYSTEM® THAIS® VIVELLEDOT®		☐
	☐	OETROGENES GELS	DELIDOSE® ESTREVA® OESTRODOSE® OESTROGEL®		☐
	☐	PROGESTATIFS COMPRIMES (VOIE ORALE OU VAGINALE°	COLPRONE® DUPHASTON® ESTIMA® MENAELLE® UTROGESTAN® GESTORAL® LUTERAN® LUTENYL® PRIMOLUT® SURGESTONE®		☐
	☐	PROGESTATIFS GELS	PROGESTOGEL®		☐
	☐	ESTROPROGESTATIFS	ACTIVEVLE® ANGELIC® AVADENE® CLIMENE® CLIMASTON® DIVINA® DUOVA® KLIOGEST® SYNERGON® SUCCESSIA® TRISEQUENS® CLIMODIENE® NAEMIS®		☐
	☐	TIBOLONE	LIVIAL®		☐
CONTRACEPTIFS Oui ☐ Non ☐	☐	ESTROPROGESTATIFS	ORAUX		☐
			PATCHES		
			ANNEAU NUVARING		
			IMPLANT IMPLANON		

	☐	PROGESTATIFS PURS MICRODOSES	CERAZETTE EXLUTON MICROVAL MILLIGYNON OGYLINE	☐
ANDROGENES Oui ☐ Non ☐	☐	ANDROGENES	ANDRACTIM® ANDROTARDYL® HALOTESTIN® INTRINSA® (dispositif transdermique) NEBIDO PANTESTONE®	☐
ANTIANDROGENES Oui ☐ Non ☐	☐	ANTIANDROGENES	ANANDRON® ANDROCUR® CASODEX® CYPROTERONE® EULEXINE® FLUTAMIDE® KALIALE® PROSTADIREX®	☐

**ANNEXE 2 : GENES CANDIDATS ET SNPs DE LA RÉPARATION
D'ADN ÉTUDIÉS**

Tableau S1. Gènes candidats et SNPs de la réparation d'ADN examinés

SNPs	Nom du gène	Chr.	Position	Location	Fonction	Substitution d'acide-amino
rs1130409	<i>APEX1</i>	14	19994993	Exonique	Non Synonymeyme	D148E (NP_001632.2)
rs3136814	<i>APEX1</i>	14	19993136	5UTR	–	–
rs1760944	<i>APEX1</i>	14	19992988	5UTR	–	–
rs1801516	<i>ATM</i>	11	107680671	Exonique	Non Synonymeyme	D1853N (NP_000042.3)
rs1800056	<i>ATM</i>	11	107643212	Exonique	Non Synonymeyme	F858L (NP_000042.3)
rs35813135	<i>ATM</i>	11	107644510	Exonique	Non Synonymeyme	T935A (NP_000042.3)
rs1800058	<i>ATM</i>	11	107665559	Exonique	Non Synonymeyme	L1420F (NP_000042.3)
rs28904920	<i>ATM</i>	11	107707894	Exonique	Non Synonymeyme	E2570G (NP_000042.3)
rs228591	<i>ATM</i>	11	107602542	Intronique	–	–
rs641605	<i>ATM</i>	11	107607128	Intronique	–	–
rs2234997	<i>ATM</i>	11	107611652	Exonique	Non Synonymeyme	D126E (NP_000042.3)
rs228599	<i>ATM</i>	11	107612869	Intronique	–	–
rs3218707	<i>ATM</i>	11	107619936	Exonique	Non Synonymeyme	V182L (NP_000042.3)
rs2235000	<i>ATM</i>	11	107626942	Exonique	Non Synonymeyme	G514D (NP_000042.3)
rs3092857	<i>ATM</i>	11	107648508	Exonique	Non Synonymeyme	M1040V (NP_000042.3)
rs3092856	<i>ATM</i>	11	107664941	Exonique	Non Synonymeyme	H1380Y (NP_000042.3)
rs227060	<i>ATM</i>	11	107710090	Intronique	–	–
rs227074	<i>ATM</i>	11	107720304	Intronique	–	–
rs2227928	<i>ATR</i>	3	143764301	Exonique	Non Synonymeyme	M211T (NP_001175.1)
rs9816736	<i>ATR</i>	3	143655469	Intronique	–	–
rs6805118	<i>ATR</i>	3	143699605	Intronique	–	–
rs11916455	<i>ATR</i>	3	143704763	Intronique	–	–
rs10804682	<i>ATR</i>	3	143717223	Intronique	–	–
rs11920625	<i>ATR</i>	3	143744028	Intronique	–	–
rs6782400	<i>ATR</i>	3	143778057	Intronique	–	–
rs9855919	<i>ATR</i>	3	143717278	Intronique	–	–
rs9869842	<i>ATR</i>	3	142272314	Intronique	–	–
rs1048755	<i>ATXN3</i>	14	91618537	Exonique	–	–
rs7167216	<i>BLM</i>	15	89155524	Exonique	Non Synonymeyme	V1321I (NP_000048.1)
rs2380165	<i>BLM</i>	15	89141998	Intronique	–	–
rs1063147	<i>BLM</i>	15	89155508	Exonique	Synonyme	L1315L (NP_000048.1)
rs1799966	<i>BRCA1</i>	17	38476619	Exonique	Non Synonymeyme	S1613G (NP_009225.1)
rs16942	<i>BRCA1</i>	17	38497525	Exonique	Non Synonymeyme	K1183R (NP_009225.1)
rs16941	<i>BRCA1</i>	17	38497960	Exonique	Non Synonymeyme	E1038G (NP_009225.1)
rs799917	<i>BRCA1</i>	17	38498461	Exonique	Non Synonymeyme	P871L (NP_009225.1)
rs28897674	<i>BRCA1</i>	17	38505407	Exonique	Non Synonymeyme	S153R (NP_009225.1)
rs28897687	<i>BRCA1</i>	17	38497365	Exonique	Non Synonymeyme	N1236K (NP_009225.1)
rs8176318	<i>BRCA1</i>	17	38450799	3UTR	–	–
rs3092988	<i>BRCA1</i>	17	38455227	Intronique	–	–
rs8176265	<i>BRCA1</i>	17	38467521	Intronique	–	–
rs3092994	<i>BRCA1</i>	17	38469350	Intronique	–	–
rs8176242	<i>BRCA1</i>	17	38471399	Intronique	–	–

SNPs	Nom du gène	Chr.	Position	Location	Fonction	Substitution d'acide-amino
rs8176199	<i>BRCA1</i>	17	38484049	Intronique	—	—
rs799916	<i>BRCA1</i>	17	38496715	Intronique	—	—
rs144848	<i>BRCA2</i>	13	31804728	Exonique	Non Synonyme	N372H (NP_000050.2)
rs28897708	<i>BRCA2</i>	13	31805128	Exonique	Non Synonyme	I505T (NP_000050.2)
rs28897727	<i>BRCA2</i>	13	31810749	Exonique	Non Synonyme	D1420Y (NP_000050.2)
rs28897758	<i>BRCA2</i>	13	31866870	Exonique	Non Synonyme	L3101R (NP_000050.2)
rs1799943	<i>BRCA2</i>	13	31788571	UTR	—	—
rs15869	<i>BRCA2</i>	13	31871011	3'UTR	—	—
rs206119	<i>BRCA2</i>	13	31787967	Intronique	—	—
rs9567552	<i>BRCA2</i>	13	31788226	Intronique	—	—
rs9534174	<i>BRCA2</i>	13	31791790	Intronique	—	—
rs542551	<i>BRCA2</i>	13	31857533	Intronique	—	—
rs1012129	<i>BRCA2</i>	13	31868735	Intronique	—	—
rs4986764	<i>BRIP1</i>	17	57118128	Exonique	Non Synonyme	S919P (NP_114432.1)
rs28997572	<i>BRIP1</i>	17	57212439	Exonique	Non Synonyme	I633M (NP_114432.1)
rs4986765	<i>BRIP1</i>	17	57118246	Exonique	Synonyme	E879E (NP_114432.1)
rs4986763	<i>BRIP1</i>	17	57115777	Exonique	Synonyme	Y1137Y (NP_114432.1)
rs11871785	<i>BRIP1</i>	17	57116487	Intronique	—	—
rs1557720	<i>BRIP1</i>	17	57141155	Intronique	—	—
rs2191249	<i>BRIP1</i>	17	57190645	Intronique	—	—
rs16945628	<i>BRIP1</i>	17	57222010	Intronique	—	—
rs2191248	<i>BRIP1</i>	17	57231133	Intronique	—	—
rs9352	<i>CAF1</i>	19	4393335	Exonique	Non Synonyme	A923V (NP_005474.2)
rs2266691	<i>CCNH</i>	5	86739660	Exonique	Non Synonyme	K138R (NP_001230.1)
rs3093785	<i>CCNH</i>	5	86742876	Exonique	Non Synonyme	M54V (NP_001230.1)
rs2234942	<i>CCNH</i>	5	86744284	Exonique	Non Synonyme	R28L (NP_001230.1)
rs34584424	<i>CDK7</i>	5	68604613	Exonique	Non Synonyme	T285M (NP_001790.1)
rs4423955	<i>CDK7</i>	5	68603730	Intronique	—	—
rs506504	<i>CHEK1</i>	11	125030404	Exonique	Non Synonyme	I471V (NP_001265.1)
rs738722	<i>CHEK2</i>	22	27460011	Intronique	—	—
rs2017309	<i>CHEK2</i>	22	27461425	Intronique	—	—
rs5762764	<i>CHEK2</i>	22	27462989	Intronique	—	—
rs9608698	<i>CHEK2</i>	22	27464558	Intronique	—	—
rs2073327	<i>CHEK2</i>	22	27435557	Intronique	—	—
rs743185	<i>CHEK2</i>	22	27433216	Intronique	—	—
rs5762749	<i>CHEK2</i>	22	27421036	Intronique	—	—
rs4035540	<i>CHEK2</i>	22	27417040	Intronique	—	—
rs5762765	<i>CHEK2</i>	22	27463032	Intronique	—	—
rs3750898	<i>DCLRE1A</i>	10	115599904	Exonique	Non Synonyme	D317H (NP_055696.2)
rs2291120	<i>DDB2</i>	11	47194255	Intronique	—	—
rs1685404	<i>DDB2</i>	11	47200240	Intronique	—	—
rs7395581	<i>DDB2</i>	11	47202972	Intronique	—	—
rs2957873	<i>DDB2</i>	11	47205869	Intronique	—	—
rs4647750	<i>DDB2</i>	11	47212740	Exonique	Non Synonyme	M215T (NP_000098.1)
rs12450550	<i>EME1</i>	17	45811191	Exonique	Non Synonyme	I350T (NP_689676.1)
rs3212981	<i>ERCC1</i>	19	45915038	Intronique	—	—

SNPs	Nom du gène	Chr.	Position	Location	Fonction	Substitution d'acide-amino
rs1007616	ERCC1	19	50604932	3UTR	–	–
rs3212977	ERCC1	19	50608821	Exonique	Non Synonyme	A266T (NP_001974.1)
rs3212961	ERCC1	19	50614162	Intronique	–	–
rs3212948	ERCC1	19	50616201	Intronique	–	–
rs11615	ERCC1	19	50615492	Exonique	Synonyme	N118N (NP_001974.1)
rs13181	ERCC2	19	50546758	Exonique	Non Synonyme	K751Q (NP_000391.1)
rs238406	ERCC2	19	50560148	Exonique	Synonyme	R156R (NP_000391.1)
rs1799787	ERCC2	19	50547983	Intronique	–	–
rs3916874	ERCC2	19	50548765	Intronique	–	–
rs238415	ERCC2	19	50549074	Intronique	–	–
rs50871	ERCC2	19	50554354	Intronique	–	–
rs171140	ERCC2	19	50556841	Intronique	–	–
rs34295337	ERCC3	2	127766801	Exonique	Non Synonyme	R109* (NP_000113.1)
rs4150522	ERCC3	2	127733355	Exonique	Non Synonyme	S735P (NP_000113.1)
rs4150521	ERCC3	2	127733447	Exonique	Non Synonyme	S704L (NP_000113.1)
rs4150456	ERCC3	2	127754534	Exonique	Synonyme	E495E (NP_000113.1)
rs2020955	ERCC4	16	13946159	Exonique	Non Synonyme	S662P (NP_005227.1)
rs744154	ERCC4	16	13922581	Intronique	–	–
rs3136079	ERCC4	16	13926737	Intronique	–	–
rs1800067	ERCC4	16	13936533	Exonique	Non Synonyme	R415Q (NP_005227.1)
rs17655	ERCC5	13	102326002	Exonique	Non Synonyme	D1104H (NP_000114.2)
rs2227869	ERCC5	13	102313085	Exonique	Non Synonyme	C529S (NP_000114.2)
rs4150313	ERCC5	13	102311951	Exonique	Non Synonyme	Q256R (NP_000114.2)
rs1047768	ERCC5	13	102302517	Exonique	Synonyme	H46H (NP_000114.2)
rs4987063	ERCC5	13	102304690	Exonique	Non Synonyme	V145I (NP_000114.2)
rs1047769	ERCC5	13	102311944	Exonique	Non Synonyme	M254V (NP_000114.2)
rs9514067	ERCC5	13	102325930	Exonique	Non Synonyme	G1080R (NP_000114.2)
rs2228529	ERCC6	10	50337110	Exonique	Non Synonyme	Q1413R (NP_000115.1)
rs2228527	ERCC6	10	50348374	Exonique	Non Synonyme	R1213G (NP_000115.1)
rs2228526	ERCC6	10	50348722	Exonique	Non Synonyme	M1097V (NP_000115.1)
rs4253160	ERCC6	10	50363971	Intronique	–	–
rs4253230	ERCC6	10	50337026	Exonique	Non Synonyme	T1441I (NP_000115.1)
rs4253211	ERCC6	10	50348322	Exonique	Non Synonyme	R1230P (NP_000115.1)
rs4253047	ERCC6	10	50402144	5UTR	Non Synonyme	G446D (NP_000115.1)
rs4647105	ERCC8	5	60234043	Exonique	Non Synonyme	Y200C (NP_000073.1)
rs1644460	ERCC8	5	60236389	Exonique	Non Synonyme	H 156R (NP_000073.1)
rs735943	EXO1	1	240096773	Exonique	Non Synonyme	H354R (NP_003677.3)
rs1047840	EXO1	1	240108923	Exonique	Non Synonyme	E589K (NP_003677.3)
rs1776148	EXO1	1	240109167	Exonique	Non Synonyme	E670G (NP_003677.3)
rs1635498	EXO1	1	240111897	Exonique	Non Synonyme	R723C (NP_003677.3)
rs9350	EXO1	1	240115296	Exonique	Non Synonyme	P757L (NP_003677.3)
rs4149965	EXO1	1	240102060	Exonique	Non Synonyme	V458M (NP_003677.3)
rs2526698	EXO1	1	240095723	Intronique	–	–
rs851797	EXO1	1	240119664	3UTR	–	–
rs4149963	EXO1	1	240102004	Exonique	Non Synonyme	T439M (NP_003677.3)
rs7190823	FANCA	16	88393543	Exonique	Non Synonyme	T266A (NP_000126.2)

SNPs	Nom du gène	Chr.	Position	Location	Fonction	Substitution d'acide-amino
rs11646374	<i>FANCA</i>	16	88385435	Exonique	Non Synonyme	A412V (NP_000126.2)
rs2239359	<i>FANCA</i>	16	88376980	Exonique	Non Synonyme	G501S (NP_000126.2)
rs7195066	<i>FANCA</i>	16	88363823	Exonique	Non Synonyme	G809D (NP_000126.2)
rs9282681	<i>FANCA</i>	16	88333414	Exonique	Non Synonyme	T1328A (NP_000126.2)
rs1061646	<i>FANCA</i>	16	88333477	UTR	–	–
rs9462088	<i>FANCE</i>	6	35538663	Exonique	Non Synonyme	A502T (NP_068741.1)
rs17803620	<i>FANCI</i>	15	87605046	Exonique	Non Synonyme	A86V (NP_060663.2)
rs2283432	<i>FANCI</i>	15	87637231	Exonique	Non Synonyme	C742S (NP_060663.2)
rs1138465	<i>FANCI</i>	15	87659605	Exonique	–	–
rs3736772	<i>FANCM</i>	14	44735217	Exonique	Non Synonyme	P1812A (NP_065988.1)
rs1367580	<i>FANCM</i>	14	44714338	Exonique	Non Synonyme	V878L (NP_065988.1)
rs10138997	<i>FANCM</i>	14	44676036	Exonique	Non Synonyme	S175F (NP_065988.1)
rs1812152	<i>GEN1</i>	2	17806255	Exonique	Non Synonyme	S92T (NP_872431.2)
rs16981869	<i>GEN1</i>	2	17809723	Exonique	Non Synonyme	N143S (NP_872431.2)
rs300169	<i>GEN1</i>	2	17825998	Exonique	Non Synonyme	T680I (NP_872431.2)
rs35618575	<i>GTF2H1</i>	11	18343912	Exonique	Non Synonyme	S523N (NP_005307.1)
rs4150636	<i>GTF2H1</i>	11	18325726	Exonique	Non Synonyme	S285F (NP_005307.1)
rs4150667	<i>GTF2H1</i>	11	18339486	Intronique	–	–
rs3218820	<i>GTF2H4</i>	6	30988134	Exonique	Non Synonyme	R337Q (NP_001508.1)
rs3730980	<i>LIG1</i>	19	53330833	Exonique	Non Synonyme	M480V (NP_000225.1)
rs3730947	<i>LIG1</i>	19	53335081	Exonique	Non Synonyme	V349M (NP_000225.1)
rs156641	<i>LIG1</i>	19	53323219	Intronique	–	–
rs3730931	<i>LIG1</i>	19	53339052	Intronique	–	–
rs12981963	<i>LIG1</i>	19	53352096	Exonique	Non Synonyme	P119L (NP_000225.1)
rs4987068	<i>LIG1</i>	19	53332618	Exonique	Non Synonyme	R409H (NP_000225.1)
rs11668325	<i>LIG1</i>	19	53312773	Exonique	Non Synonyme	S839N (NP_000225.1)
rs11666150	<i>LIG1</i>	19	53310941	Exonique	Non Synonyme	Q892H (NP_000225.1)
rs41549918	<i>LIG1</i>	19	53352171	Exonique	Non Synonyme	R94H (NP_000225.1)
rs1805388	<i>LIG4</i>	13	107661591	Exonique	Non Synonyme	T9I (NP_002303.2)
rs2232642	<i>LIG4</i>	13	107659048	Exonique	Non Synonyme	A857T (NP_002303.2)
rs2232641	<i>LIG4</i>	13	107659645	Exonique	Non Synonyme	I658V (NP_002303.2)
rs1805386	<i>LIG4</i>	13	107659913	Exonique	Synonyme	D568D (NP_002303.2)
rs35874133	<i>LIG4</i>	13	107659809	Exonique	Non Synonyme	R603M (NP_002303.2)
rs35469724	<i>LIG4</i>	13	107660448	Exonique	Non Synonyme	S390N (NP_002303.2)
rs1145315	<i>MBD2</i>	18	49942952	Intronique	–	–
rs603097	<i>MBD2</i>	18	50007103	5UTR	–	–
rs140693	<i>MBD4</i>	3	130638140	Exonique	Non Synonyme	E346K (NP_003916.1)
rs2005618	<i>MBD4</i>	3	130634356	Intronique	–	–
rs2307289	<i>MBD4</i>	3	130638152	Exonique	Non Synonyme	S342P (NP_003916.1)
rs9262152	<i>MDC1</i>	6	30788894	Exonique	Non Synonyme	R268K (NP_055456.2)
rs2075015	<i>MDC1</i>	6	30788586	Exonique	Non Synonyme	E371K (NP_055456.2)
rs3130645	<i>MDC1</i>	6	30780320	Exonique	Non Synonyme	S1540P (NP_055456.2)
rs28994876	<i>MDC1</i>	6	30779013	Exonique	Non Synonyme	R1904Q (NP_055456.2)
rs12917	<i>MGMT</i>	10	131396272	Exonique	Non Synonyme	L84F (NP_002403.1)
rs2308321	<i>MGMT</i>	10	131455053	Exonique	Non Synonyme	I143V (NP_002403.1)
rs3750826	<i>MGMT</i>	10	131457199	3UTR	–	–

SNPs	Nom du gène	Chr.	Position	Location	Fonction	Substitution d'acide-amino
rs7094495	<i>MGMT</i>	10	131458735	UTR	—	—
rs7091540	<i>MGMT</i>	10	131310265	Intronique	—	—
rs558764	<i>MGMT</i>	10	131316946	Intronique	—	—
rs10829618	<i>MGMT</i>	10	131380409	Intronique	—	—
rs7898151	<i>MGMT</i>	10	131419425	Intronique	—	—
rs35338630	<i>MLH1</i>	3	37031038	Exonique	Non Synonyme	R264G (NP_000240.1)
rs2286940	<i>MLH1</i>	3	37045109	Intronique	—	—
rs34285587	<i>MLH1</i>	3	37042446	Exonique	Non Synonyme	T452S (NP_000240.1)
rs175080	<i>MLH3</i>	14	74583580	Exonique	Non Synonyme	P844L (NP_001035197.1)
rs28756993	<i>MLH3</i>	14	74582894	Exonique	Non Synonyme	D1073N (NP_001035197.1)
rs28756991	<i>MLH3</i>	14	74583721	Exonique	Non Synonyme	R797H (NP_001035197.1)
rs28756990	<i>MLH3</i>	14	74583890	Exonique	Non Synonyme	V741F (NP_001035197.1)
rs28756982	<i>MLH3</i>	14	74584853	Exonique	Non Synonyme	V420I (NP_001035197.1)
rs28756992	<i>MLH3</i>	14	74583578	Exonique	Non Synonyme	S845G (NP_001035197.1)
rs175081	<i>MLH3</i>	14	74583635	Exonique	Non Synonyme	N826D (NP_001035197.1)
rs3740526	<i>MMS19</i>	10	99210696	Exonique	Non Synonyme	G790D (NP_071757.2)
rs35188899	<i>MNAT1</i>	14	60504734	Exonique	Non Synonyme	D282A (NP_002422.1)
rs3176383	<i>MPG</i>	16	69447	Exonique	Non Synonyme	K17Q (NP_001015052.1)
rs35784190	<i>MSH2</i>	2	47559047	Exonique	Non Synonyme	T782A (NP_000242.1)
rs4987188	<i>MSH2</i>	2	47496960	Exonique	Non Synonyme	G322D (NP_000242.1)
rs2059520	<i>MSH2</i>	2	47556744	Intronique	—	—
rs2303428	<i>MSH2</i>	2	47557003	Intronique	—	—
rs35107951	<i>MSH2</i>	2	47543747	Exonique	Non Synonyme	D487E (NP_000242.1)
rs35717997	<i>MSH2</i>	2	47510550	Exonique	Non Synonyme	P415S (NP_000242.1)
rs26279	<i>MSH3</i>	5	80204692	Exonique	Non Synonyme	A1045T (NP_002430.2)
rs1650697	<i>MSH3</i>	5	79986536	Exonique	—	—
rs863221	<i>MSH3</i>	5	80078030	Intronique	—	—
rs5745325	<i>MSH4</i>	1	76042047	Exonique	Non Synonyme	A97T (NP_002431.2)
rs5745459	<i>MSH4</i>	1	76118410	Exonique	Non Synonyme	Y589C (NP_002431.2)
rs5745549	<i>MSH4</i>	1	76151089	Exonique	Non Synonyme	S914N (NP_002431.2)
rs5745449	<i>MSH4</i>	1	76117298	Exonique	Synonyme	L525L (NP_002431.2)
rs5745448	<i>MSH4</i>	1		Exonique	Synonyme	Y523Y (NP_002431.2)
rs3136245	<i>MSH6</i>	2	47866349	Intronique	—	—
rs2020911	<i>MSH6</i>	2	47884341	Intronique	—	—
rs3136367	<i>MSH6</i>	2	47887054	Intronique	—	—
rs34625968	<i>MSH6</i>	2	47887203	Exonique	Non Synonyme	R1304K (NP_000170.1)
rs34938432	<i>MSH6</i>	2	47880557	Exonique	Non Synonyme	R644S (NP_000170.1)
rs41557217	<i>MSH6</i>	2	47879288	Exonique	Non Synonyme	E221D (NP_000170.1)
rs13817	<i>MUS81</i>	11	65384909	Exonique	Non Synonyme	R37H (NP_079404.2)
rs545500	<i>MUS81</i>	11	65386509	Exonique	Non Synonyme	R180P (NP_079404.2)
rs3219489	<i>MUTYH</i>	1	45570091	Exonique	Non Synonyme	Q335H (NP_036354.1)
rs3219484	<i>MUTYH</i>	1	45572742	Exonique	Non Synonyme	V22M (NP_036354.1)
rs794001	<i>N4BP2</i>	4	39797956	Exonique	Non Synonyme	D611N (NP_060647.2)
rs17511668	<i>N4BP2</i>	4	39780161	Exonique	Non Synonyme	S101I (NP_060647.2)
rs2252352	<i>N4BP2</i>	4	39804484	Intronique	—	—
rs1805841	<i>NBS1</i>	8	91061845	Intronique	—	—

SNPs	Nom du gène	Chr.	Position	Location	Fonction	Substitution d'acide-amino
rs709816	<i>NBS1</i>	8	91036886	Exonique	Synonyme	D317D (NP_001019859.1)
rs1805794	<i>NBS1</i>	8	91059654	Exonique	Non Synonyme	E103Q (NP_001019859.1)
rs13112390	<i>NEIL3</i>	4	178511828	Exonique	Non Synonyme	Q471H (NP_060718.1)
rs1876268	<i>NEIL3</i>	4	178518747	Exonique	Non Synonyme	G520R (NP_060718.1)
rs34193982	<i>NEIL3</i>	4	178499777	Exonique	Non Synonyme	H286R (NP_060718.1)
rs7689099	<i>NEIL3</i>	4	178493906	Exonique	Non Synonyme	P117R (NP_060718.1)
rs1043673	<i>NLRP2</i>	19	60204043	Exonique	Non Synonyme	A1052E (NP_060322.1)
rs3087468	<i>NTHL1</i>	16	2030234	Exonique	Non Synonyme	D239Y (NP_002519.1)
rs3211977	<i>NTHL1</i>	16	2033576	Exonique	Non Synonyme	S234L (NP_002519.1)
rs2233522	<i>NTHL1</i>	16	2030159	Exonique	Non Synonyme	A264T (NP_002519.1)
rs3087469	<i>NTHL1</i>	16	2037788	Exonique	Non Synonyme	R21W (NP_002519.1)
rs2516740	<i>NTHL1</i>	16	2037110	Intronique	–	–
rs1805373	<i>OGG1</i>	3	9771507	Exonique	Non Synonyme	R229Q (NP_002533.1)
rs3219012	<i>OGG1</i>	3	9773269	Exonique	Non Synonyme	A288V (NP_002533.1)
rs1052133	<i>OGG1</i>	3	9773772	Exonique	Non Synonyme	P326C (NP_002533.1)
rs2472037	<i>OGG1</i>	3	9770371	Intronique	–	–
rs3219008	<i>OGG1</i>	3	9770542	Intronique	–	–
rs2072668	<i>OGG1</i>	3	9773139	Intronique	–	–
rs3219014	<i>OGG1</i>	3	9773759	Exonique	Non Synonyme	P322N (NP_002533.1)
rs1136410	<i>PARP1</i>	1	224621924	Exonique	Non Synonyme	V762A (NP_001609.1)
rs3219145	<i>PARP1</i>	1	224617451	Exonique	Non Synonyme	K940R (NP_001609.1)
rs3219062	<i>PARP1</i>	1	224637370	Exonique	Non Synonyme	S383Y (NP_001609.1)
rs3219057	<i>PARP1</i>	1	224639838	Exonique	Non Synonyme	V334I (NP_001609.1)
rs1805409	<i>PARP1</i>	1	224644788	Exonique	Non Synonyme	A188T (NP_001609.1)
rs3738708	<i>PARP1</i>	1	224656661	Exonique	Non Synonyme	F54L (NP_001609.1)
rs907187	<i>PARP1</i>	1	224662269	5'UTR	–	–
rs1805404	<i>PARP1</i>	1	224656580	Exonique	Synonyme	D81D (NP_001609.1)
rs3093905	<i>PARP2</i>	14	19889066	Exonique	Non Synonyme	S112N (NP_005475.2)
rs3093921	<i>PARP2</i>	14	19892147	Exonique	Non Synonyme	D186G (NP_005475.2)
rs3093926	<i>PARP2</i>	14	19892891	Exonique	Non Synonyme	R247Q (NP_005475.2)
rs2275010	<i>PARP2</i>	14	19893800	Exonique	Non Synonyme	I282T (NP_005475.2)
rs2297616	<i>PARP2</i>	14	19883128	Intronique	–	–
rs1760912	<i>PARP2</i>	14	19893373	Intronique	–	–
rs28547534	<i>PARP3</i>	3	51953259	Exonique	Non Synonyme	H107R (NP_001003931.1)
rs323870	<i>PARP3</i>	3	51954224	Exonique	Non Synonyme	Q276R (NP_001003931.1)
rs25406	<i>PCNA</i>	20	5047635	Intronique	–	–
rs17352	<i>PCNA</i>	20	5045975	Intronique	–	–
rs2066459	<i>PMS1</i>	2	190416956	Exonique	Non Synonyme	R202K (NP_000525.1)
rs5743030	<i>PMS1</i>	2	190386789	Intronique	–	–
rs1059060	<i>PMS2</i>	7	5983865	Exonique	Non Synonyme	N775S (NP_000526.1)
rs1805319	<i>PMS2</i>	7	6003505	Exonique		
rs3136717	<i>POLB</i>	8	42315597	Intronique	–	–
rs2953983	<i>POLB</i>	8	42332412	Intronique	–	–
rs3136797	<i>POLB</i>	8	42345961	Exonique	Non Synonyme	P242R (NP_002681.1)
rs1726803	<i>POLD1</i>	19	55597121	Exonique	Non Synonyme	S173N (NP_002682.1)
rs5744751	<i>POLE</i>	12	131764067	Exonique	Non Synonyme	A252V (NP_006222.2)

SNPs	Nom du gène	Chr.	Position	Location	Fonction	Substitution d'acide-amino
rs5744934	<i>POLE</i>	12	131730598	Exonique	Non Synonyme	N1396S (NP_006222.2)
rs6941583	<i>POLH</i>	6	43690068	Exonique	Non Synonyme	M647L (NP_006493.1)
rs8305	<i>POLI</i>	18	50074802	Exonique	Non Synonyme	A706T (NP_009126.1)
rs3730477	<i>POLL</i>	10	103330045	Exonique	Non Synonyme	R438W (NP_037406.1)
rs3730463	<i>POLL</i>	10	103334578	Exonique	Non Synonyme	T221P (NP_037406.1)
rs2353552	<i>POLN</i>	4	2179862	Exonique	Non Synonyme	Q121H (NP_861524.2)
rs10018786	<i>POLN</i>	4	2164821	Exonique	Non Synonyme	M310L (NP_861524.2)
rs10011549	<i>POLN</i>	4	2164743	Exonique	Non Synonyme	G336S (NP_861524.2)
rs9328764	<i>POLN</i>	4	2146251	Exonique	Non Synonyme	R425C (NP_861524.2)
rs487848	<i>POLQ</i>	3	122711649	Exonique	Non Synonyme	A581V (NP_955452.3)
rs3218649	<i>POLQ</i>	3	122691522	Exonique	Non Synonyme	T982R (NP_955452.3)
rs3218651	<i>POLQ</i>	3	122690865	Exonique	Non Synonyme	H1201R (NP_955452.3)
rs532411	<i>POLQ</i>	3	122669111	Exonique	Non Synonyme	A2304V (NP_955452.3)
rs1381057	<i>POLQ</i>	3	122637663	Exonique	Non Synonyme	Q2513R (NP_955452.3)
rs3218634	<i>POLQ</i>	3	122634501	Exonique	Non Synonyme	L2538V (NP_955452.3)
rs8178097	<i>PRKDC</i>	8	48801040	Intronique	–	–
rs7830743	<i>PRKDC</i>	8	48873507	Exonique	Synonyme	L3434L (NP_008835.5)
rs4278157	<i>PRKDC</i>	8	48901857	Exonique	Synonyme	S2898S (NP_008835.5)
rs8178070	<i>PRKDC</i>	8	48977738	Exonique	Non Synonyme	N1071S (NP_008835.5)
rs8178033	<i>PRKDC</i>	8	49005862	Exonique	Non Synonyme	T605S (NP_008835.5)
rs10109984	<i>PRKDC</i>	8	48966227	Intronique	–	–
rs1231202	<i>PRKDC</i>	8	49009071	Intronique	–	–
rs7003908	<i>PRKDC</i>	8	48933254	Intronique	–	–
rs1045051	<i>RAD17</i>	5	68731695	Exonique	Non Synonyme	L546R (NP_002864.1)
rs373572	<i>RAD18</i>	3	8930388	Exonique	Non Synonyme	R302Q (NP_064550.2)
rs1805329	<i>RAD23B</i>	9	109124148	Exonique	Non Synonyme	A249V (NP_002865.1)
rs1805334	<i>RAD23B</i>	9	109125969	Intronique	–	–
rs4924496	<i>RAD51</i>	15	38782626	Intronique	–	–
rs7174493	<i>RAD51</i>	15	38785765	Exonique	Non Synonyme	L109V (NP_002866.2)
rs45623838	<i>RAD51</i>	15	38780631	Exonique	Non Synonyme	P56S (NP_002866.2)
rs4987208	<i>RAD52</i>	12	892829	3UTR	–	–
rs4987206	<i>RAD52</i>	12	896129	Exonique	Non Synonyme	Q221E (NP_602296.2)
rs4244612	<i>RECQL4</i>	8	145712509	Exonique	Non Synonyme	E267D (NP_004251.2)
rs3087403	<i>REV1</i>	2	99425301	Exonique	Non Synonyme	V138M (NP_001032961.1)
rs3087386	<i>REV1</i>	2	99421937	Exonique	Non Synonyme	F257S (NP_001032961.1)
rs3087399	<i>REV1</i>	2	99421589	Exonique	Non Synonyme	N373S (NP_001032961.1)
rs1989574	<i>REV3L</i>	6	111835225	Intronique	–	–
rs462779	<i>REV3L</i>	6	111802579	Exonique	Non Synonyme	T1146I (NP_002903.2)
rs3204953	<i>REV3L</i>	6	111735318	Exonique	Non Synonyme	V2986I (NP_002903.2)
rs5030755	<i>RPA1</i>	17	1729701	Exonique	Non Synonyme	T351A (NP_002936.1)
rs232045	<i>RRM1</i>	11	4100267	Intronique	–	–
rs2584879	<i>RRM1</i>	11	4072834	Exonique	Non Synonyme	R6Q (NP_001024.1)
rs12808005	<i>RRM1</i>	11	4089753	Exonique	Non Synonyme	H179P (NP_001024.1)
rs805657	<i>SLK</i>	10	105752580	Exonique	Non Synonyme	C552Y (NP_055535.2)
rs3740469	<i>SLK</i>	10	105753015	Exonique	Non Synonyme	T697I (NP_055535.2)
rs2279400	<i>SMUG1</i>	12	52867580	Intronique	–	–

SNPs	Nom du gène	Chr.	Position	Location	Fonction	Substitution d'acide-amino
rs2233919	<i>SMUG1</i>	12	52863984	Exonique	Non Synonyme	Q3* (NP_055126.1)
rs3751209	<i>TDG</i>	12	102897729	Intronique	–	–
rs4135113	<i>TDG</i>	12	102900822	Exonique	Non Synonyme	G199S (NP_003202.3)
rs3953597	<i>TDG</i>	12	102904906	Exonique	Non Synonyme	G381E (NP_003202.3)
rs1760897	<i>TEP1</i>	14	19946092	Exonique	Non Synonyme	S116P (NP_009041.2)
rs1760898	<i>TEP1</i>	14	19942720	Exonique	Non Synonyme	N307K (NP_009041.2)
rs1760903	<i>TEP1</i>	14	19922656	Exonique	Non Synonyme	R1055C (NP_009041.2)
rs1760904	<i>TEP1</i>	14	19921868	Exonique	Non Synonyme	S1195P (NP_009041.2)
rs1713456	<i>TEP1</i>	14	19919932	Exonique	Non Synonyme	C1468Y (NP_009041.2)
rs1713449	<i>TEP1</i>	14	19911546	Exonique	Non Synonyme	V2214I (NP_009041.2)
rs938886	<i>TEP1</i>	14	19907540	Exonique	Non Synonyme	I2486M (NP_009041.2)
rs1713434	<i>TEP1</i>	14	19951366	Intronique	–	–
rs34203865	<i>TNKS1BP1</i>	11	56836596	Exonique	Non Synonyme	S714N (NP_203754.2)
rs1042522	<i>TP53</i>	17	7520196	Exonique	Non Synonyme	P72R (NP_000537.3)
rs2541886	<i>UNG</i>	12	108021946	Intronique	–	–
rs3219243	<i>UNG</i>	12	108026774	Intronique	–	–
rs1346044	<i>WRN</i>	8	31144195	Exonique	Non Synonyme	C1367R (NP_000544.2)
rs1800392	<i>WRN</i>	8	31093498	Exonique	Synonyme	L787L (NP_000544.2)
rs2230009	<i>WRN</i>	8	31041476	Exonique	Non Synonyme	V114I (NP_000544.2)
rs35275272	<i>XAB2</i>	19	7593729	Exonique	Non Synonyme	D430G (NP_064581.2)
rs2228000	<i>XPC</i>	3	14174888	Exonique	Non Synonyme	R500W (NP_004619.2)
rs2228001	<i>XPC</i>	3	14162449	Exonique	Non Synonyme	Q940K (NP_004619.2)
rs2607775	<i>XPC</i>	3	14195098	5UTR	–	–
rs3729587	<i>XPC</i>	3	14183628	Intronique	–	–
rs35629274	<i>XPC</i>	3	14181356	Exonique	Non Synonyme	F287C (NP_004619.2)
rs3731062	<i>XPC</i>	3	14189527	Exonique	Non Synonyme	L48F (NP_004619.2)
rs1870134	<i>XPC</i>	3	14195026	Exonique	Non Synonyme	L16V (NP_004619.2)
rs2227999	<i>XPC</i>	3	14174909	Exonique	Non Synonyme	V493I (NP_004619.2)
rs25487	<i>XRCC1</i>	19	48747565	Exonique	Non Synonyme	Q399R (NP_006288.1)
rs1799782	<i>XRCC1</i>	19	48749413	Exonique	Non Synonyme	R194W (NP_006288.1)
rs25489	<i>XRCC1</i>	19	48748251	Exonique	Non Synonyme	R280H (NP_006288.1)
rs25496	<i>XRCC1</i>	19	48756941	Exonique	Non Synonyme	V72A (NP_006288.1)
rs25490	<i>XRCC1</i>	19	48748180	Exonique	Non Synonyme	T304A (NP_006288.1)
rs3547	<i>XRCC1</i>	19	48739389	Exonique	Synonyme	Q632Q (NP_006288.1)
rs25478	<i>XRCC1</i>	19	48741700	Intronique	–	–
rs3218536	<i>XRCC2</i>	7	151976939	Exonique	Non Synonyme	R188H (NP_005422.1)
rs3218499	<i>XRCC2</i>	7	151983071	Intronique	–	–
rs3212090	<i>XRCC3</i>	14	103238615	3UTR	–	–
rs861539	<i>XRCC3</i>	14	103235505	Exonique	–	–
rs1799796	<i>XRCC3</i>	14	103235679	5UTR	–	–
rs861530	<i>XRCC3</i>	14	103243875	Intronique	–	–
rs1799794	<i>XRCC3</i>	14	103249019	UTR	–	–
rs3212038	<i>XRCC3</i>	14	103247938	Intronique	–	–
rs1805377	<i>XRCC4</i>	5	82684698	Intronique	–	–
rs2891980	<i>XRCC4</i>	5	82678418	Intronique	–	–
rs2386275	<i>XRCC4</i>	5	82678295	Intronique	–	–

SNPs	Nom du gène	Chr.	Position	Location	Fonction	Substitution d'acide-amino
rs301289	<i>XRCC4</i>	5	82641990	Intronique	—	—
rs35268	<i>XRCC4</i>	5	82624251	Intronique	—	—
rs963248	<i>XRCC4</i>	5	82569649	Intronique	—	—
rs3734091	<i>XRCC4</i>	5	82536489	Exonique	Non Synonyme	A247S (NP_003392.1)
rs1039786	<i>XRCC4</i>	5	82535796	Intronique	—	—
rs28360135	<i>XRCC4</i>	5	82527429	Exonique	Non Synonyme	I134T (NP_003392.1)
rs965674	<i>XRCC4</i>	5	82518339	Intronique	—	—
rs1382368	<i>XRCC4</i>	5	82486830	Intronique	—	—
rs1382367	<i>XRCC4</i>	5	82486967	Intronique	—	—
rs1382369	<i>XRCC4</i>	5	82477184	Intronique	—	—
rs10045104	<i>XRCC4</i>	5	82448117	Intronique	—	—
rs28383151	<i>XRCC4</i>	5	82442628	Exonique	Non Synonyme	A56T (NP_003392.1)
rs28383138	<i>XRCC4</i>	5	82436528	Exonique	Non Synonyme	S12C (NP_003392.1)
rs11951257	<i>XRCC4</i>	5	82439066	Intronique	—	—
rs3835	<i>XRCC5</i>	2	216774881	Intronique	—	—
rs9288518	<i>XRCC5</i>	2	216769964	Intronique	—	—
rs9288516	<i>XRCC5</i>	2	216761508	Intronique	—	—
rs35408277	<i>XRCC5</i>	2	216721221	Exonique	Non Synonyme	A550S (NP_066964.1)
rs828704	<i>XRCC5</i>	2	216701855	Intronique	—	—
rs11575909	<i>XRCC5</i>	2	216698966	Exonique	Non Synonyme	N256H (NP_066964.1)