

2m11.2831.2

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DANS LES GÈNES DE RÉPARATION DE
L'ADN : RÔLE DANS LA SUSCEPTIBILITÉ À LA LEUCÉMIE
LYMPHOBLASTIQUE AIGÜE

par

Géraldine Mathonnet

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès science (M.Sc.)
en Biologie Moléculaire

Juillet 2000

© Géraldine Mathonnet, 2000



QH

506

154

2001

N. 001

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DANS LES GÈNES DE RÉPARATION DE
L'ADN : RÔLE DANS LA SUSCEPTIBILITÉ À LA LEUCÉMIE
LYMPHOBLASTIQUE AIGUË**

Présenté par :

Géraldine Mathonnet

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Abdellah Belmaaza, président-rapporteur

Dr Daniel Sinnett, directeur

Dr Dindial Ramotar, membre du jury

Mémoire accepté le :

SOMMAIRE

Il existe une grande variabilité interindividuelle dans la susceptibilité au cancer et la génétique semble jouer ici un rôle important. A cause de leur rôle clé dans le maintien de l'intégrité du matériel génétique, nous avons choisi d'étudier la variabilité au niveau des gènes de réparation des mésappariements (hMLH1, hMSH3), de réparation par excision de bases (XRCC1, APE) et par excision de nucléotides (XPD, XPF) dans la susceptibilité à la Leucémie Lymphoblastique aiguë de l'enfant. Ces gènes furent sélectionnés à cause de la présence de polymorphismes *bona fide* fonctionnels. Le génotypage des variants affectant ces gènes fût effectué à l'aide de l'approche PCR/hybridation oligonucléotides spécifiques.

Premièrement, nous avons déterminé la distribution des polymorphismes sélectionnés dans différentes populations continentales. Les variants dans les gènes XPF (G1256A) et APE (T2197G) se retrouvent dans toutes les populations avec une fréquence semblable. Cependant, les polymorphismes dans les gènes hMLH1 (A676G), hMSH3 (G2825A et A3124G), XRCC1 (C26304T) et XPD (A35931C), sont présents à des fréquences significativement différentes dans ces populations. Une telle distribution géographique pourrait suggérer une pression sélective, supportant ainsi la fonctionnalité de ces variants.

Deuxièmement, dans une étude d'épidémiologie génétique de type cas-contrôles, nous avons évalué le rôle de ces variants dans la susceptibilité à la leucémie lymphoblastique aiguë de l'enfant. On observe que le variant A35931C du gène XPD modifie le risque de leucémie chez les porteurs (O.R.=1.4). Cet effet est amplifié (O.R.=9.2), et apparaît pour les homozygotes pour le polymorphisme A676G de hMLH1 (O.R.=9.1), lorsqu'on combine ces

résultats avec ceux obtenus pour les gènes du métabolisme des carcinogènes CYP1A1 et GSTM1.

Enfin, nous avons voulu savoir si le fait de porter ou non l'un de ces variants pouvait influencer la réponse au traitement des patients atteints de leucémie lymphoblastique aiguë. Nous avons observé que les homozygotes pour le variant A676G du gène hMLH1 ont plus de chance de rechute ou de décès suggérant ainsi un rôle important de cet allèle dans la réponse au traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë. Il sera donc intéressant d'évaluer l'impact de ces variants sur l'incidence du cancer en fonction des facteurs environnementaux qui augmentent le risque d'accumulation des mutations somatiques chez les individus exposés.

Mots Clés : Réparation de l'ADN, Leucémie Lymphoblastique aiguë, polymorphisme, diversité génétique, population.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
SIGLES ET ABBRÉVIATIONS.....	IX
INTRODUCTION	1
1.Réparation de l'ADN	2
1.1 Réparation par excision de bases (BER).....	2
1.2 Réparation par excision de nucléotides (NER)	4
1.3 Réparation des mésappariements (MMR).....	5
1.4. Maladies associées à une déficience en réparation de l'ADN.....	6
1.4.1 <i>Vieillessement</i>	6
1.4.2 <i>Maladies neurologiques</i>	6
1.4.3 <i>Syndromes d'instabilité</i>	7
1.4.4 <i>Cancer</i>	8
1.5 Conséquences thérapeutiques d'une altération de la réparation de l'ADN.	8
2.Leucémies	9
2.1 Leucémie de l'enfant	9
2.1.1 <i>leucémie lymphoblastique aiguë</i>	10
2.1.2 <i>Défaut en réparation de l'ADN et leucémie</i>	10
2.2 Traitement de la LLA.....	11
3. Le cancer: modèle d'une maladie complexe.....	15
3.1 Variabilité interindividuelle	16
3.2 Polymorphismes dans les gènes de réparation de l'ADN.	16
3.3 Inter-relation entre la réparation de l'ADN et le métabolisme des xénobiotiques	17

4. La population d'origine Canadienne-Française : un modèle de choix pour des études d'épidémiologie génétique.....	21
5. Hypothèses.....	21
6. Objectifs du projet	22
MATÉRIEL ET MÉTHODES	23
1. Sujets étudiés.....	24
1.1 Le groupe « cas ».....	24
1.2 Le groupe « contrôle »	24
1.3 Autres populations étudiées	25
2. Méthode.....	27
2.1 Extraction de l'ADN	27
2.1.1 Amplification de l'ADN génomique par PCR	27
2.2.2 Transfert des produits de PCR sur membrane (Dot Blot)	30
2.2.3 Hybridation des membranes par la méthode ASO	30
2.2.4 Analyses statistiques	33
RÉSULTATS	34
1.Outils de génotypage.....	35
2 Détermination de la fréquence des variants dans différentes populations	35
2.1 Fréquence des variants dans la population Canadienne-Française.....	35
2.2 Fréquence des variants chez les chimpanzés.....	36
2.3 Fréquence des variants dans d'autres groupes continentaux.....	36
3. Étude d'épidémiologie génétique de type cas-contrôle	50
3.1 Fréquence des variants chez les enfants atteints de LLA (cas) ainsi que chez des individus sains (contrôles), tous d'origine Canadienne-Française..	50
3.2 Étude de l'effet combiné avec les variants dans les enzymes du métabolisme de carcinogènes.....	50
4. Impact des génotypes pour les gènes de réparation de l'ADN sur la réponse thérapeutique.	57
DISCUSSION.....	61

CONCLUSION.....	70
BIBLIOGRAPHIE.....	72
REMERCIEMENTS.....	84
LISTE DES PUBLICATIONS.....	85

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Translocations communes chez les enfants atteints de LLA....	13
Tableau 2: Polymorphismes connus dans les gènes de réparation de l'ADN	19
Tableau 3: Composition des groupes continentaux étudiés.....	26
Tableau 4: Amorces et caractéristiques des PCR pour les loci hMLH1, hMSH2, hMSH3, XRCC1, XPD, XPF et APE.	29
Tableau 5: Séquence des ASO et conditions d'hybridation.	32
Tableau 6: Fréquence des variants dans la population Canadienne- Française.....	39
Tableau 7: Fréquence des génotypes dans la population Canadienne- Française.....	40
Tableau 8: Séquence des variants étudiés chez les chimpanzées et les souris	49
Tableau 9: Distribution des allèles chez les cas et les contrôles.....	52
Tableau 10: Distribution des génotypes chez les cas et les contrôles	53
Tableau 11: Effets combinés des génotypes de hMLH1, CYP1A1 et GSTM1 sur le risque de LLA.....	54
Tableau 12: Effets combinés des génotypes de XPD, CYP1A1 et GSTM1 sur le risque de LLA.....	54
Tableau 13: Effets combinés des génotypes de hMSH3, CYP1A1 et GSTM1 sur le risque de LLA.....	55
Tableau 14: Effets combinés des génotypes de XRCC1, CYP1A1 et GSTM1 sur le risque de LLA.....	55
Tableau 15: Effets combinés des génotypes de APE, CYP1A1 et GSTM1 sur le risque de LLA.....	56
Tableau 16: Effets combinés des génotypes de XPF, CYP1A1 et GSTM1 sur le risque de LLA.....	56
Tableau 17: Valeur prédictive des facteurs de pronostique.	58

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Voies de réparation de l'ADN.....	3
Figure 2: Carcinogénèse initiée par les xénobiotiques.....	20
Figure 3 : Génotypage par l'approche PCR-ASO	28
Figure 4 : Résultats des hybridations par la méthode PCR-ASO	38
Figure 5: Locus hMLH1	41
Figure 6: Locus XRCC1	41
Figure 7: Locus hMSH3.....	42
Figure 8: Locus XPD	43
Figure 9: Locus APE.....	43
Figure 10: Locus XPF	44
Figure 11 : Distribution des allèles de hMLH1.....	45
Figure 12 : Distribution des allèles de hMSH3	45
Figure 13 : Distribution des allèles de XRCC1	46
Figure 14 : Distribution des allèles de XPD	46
Figure 15 : Distribution des allèles de XPF.....	47
Figure 16 : Distribution des allèles de APE	47
Figure 17 :Distribution des variants dans les gènes de réparation de l'ADN	48
Figure 18: Courbe de survie des patients LLA selon leur génotype pour hMLH1.....	59
Figure 19 : Courbe de survie des patients LLA ayant un indice d'ADN <1.16 selon leur génotype pour hMLH1	60
Figure 20 : Distribution des allèles de hMLH1 dans le monde	63
Figure 21 : Distribution des allèles de hMSH3 dans le monde.....	63
Figure 22 : Distribution des allèles de XRCC1 dans le monde.....	64
Figure 23: Distribution des allèles de XPD dans le monde.....	64
Figure 24 : Distribution des allèles de XPF dans le monde	65
Figure 25: Distribution des allèles de APE dans le monde	65

SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ala : Alanine

Arg : Arginine

Asn : Asparagine

ASO : *Allele specific oligonucleotide*

Asp : Aspartate

AT : *Ataxia Telangiectasia*

BER : *Base excision repair*

BS : *Bloom's Syndrome*

°C : degré Celsius

CGB : compte de globules blancs

CI : *confidence interval*

Ci : Curie

cpm : coups par minute

CS : *Cockayne's Syndrome*

cm² : centimètre carré

dNTP : désoxynucléotide triphosphate

EDTA : *Ethylenediamine-tetraacetic acid*

EFS : *event-free survival*

FA : *Fanconi's anemia*

Gln : Glutamine

Glu : Glutamate

Gly : Glycine

His : Histidine

hMLH1 : *human MutL homologue 1*

hMSH2 : *human MutS homologue 2*

hMSH3 : *human MutS homologue 3*

Ile : Isoleucine

LLA : Leucémie lymphoblastique aiguë

Lys : Lysine

M : Molaire

m² : mètre carré

mer : oligomère

Met : Méthionine

mg : milligramme

μJ : microjoule

μl : microlitre

mM : millimolaire

μM : micromolaire

mmol : millimole

ml : millilitre

MMR : *mismatch repair*

MNNG : N-methyl-N'-nitroso-N-nitrosoguanidine

NER : *nucleotide excision repair*

ng: nanogramme

OR : *Odds ratio*

p : probabilité

pb : paire de bases

PCNA : *proliferating-cell nuclear antigen*

PCR : *polymerase chain reaction*

pM : picomolaire

pmol : picomole

PolB : Polymérase B

Pro : Proline

s : seconde

Ser : Sérine

SDS : Sodium dodecyl sulfate

Thr : Thréonine

Trp : Tryptophane

Tyr : Tyrosine

U : unité enzymatique

UV : Ultraviolet

Val : Valine

XP : Xeroderma pigmentosum

XRCC1 : *X-Ray Cross-Complementing 1*

XRCC3 : *X-Ray Cross-Complementing 3*

6-MP : 6-mercaptopurine

INTRODUCTION

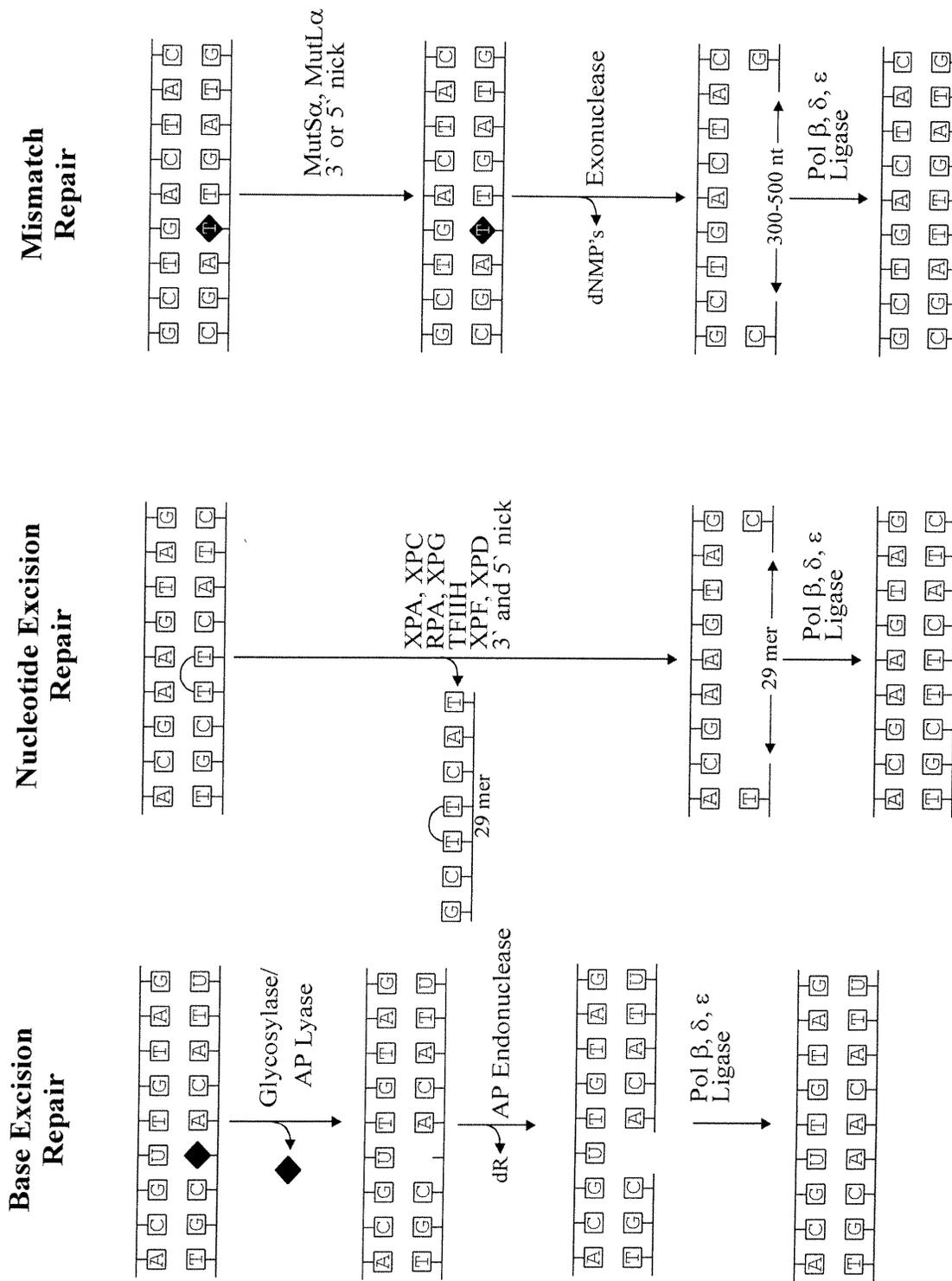
1. Réparation de l'ADN

Le taux de mutations spontanées dans les cellules normales ($\sim 1.4 \times 10^{-10}$ mutation/pb/division) est insuffisant pour expliquer la haute fréquence de mutations observées dans les cellules cancéreuses chez l'homme (Jackson et Loeb, 1998). Cette incapacité de maintenir l'intégrité génétique pourrait résulter de mutations dans des gènes de réparation de l'ADN. En effet, la réparation des lésions d'ADN est cruciale pour la protection du génome contre l'apparition de mutations menant au cancer. Les dommages à l'ADN peuvent être causés par les réactions ionisantes, les rayons UV ainsi que les composés chimiques endogènes et/ou exogènes. Ces lésions incluent des bris simple- et double-brin de l'ADN, l'altération de bases, la formation d'adduits, des liaisons inter- et intra-brins et autres dommages. De plus, des erreurs au cours de la synthèse de l'ADN (réplication) peuvent causer l'insertion ou la délétion de nucléotides. Il existe plusieurs voies de réparation de l'ADN dont : (1) la réparation par excision de bases, (2) par excision de nucléotides et (3) la réparation des mésappariements (figure 1).

1.1 Réparation par excision de bases (BER)

Les lésions réparées par le système BER regroupent des dépurinations spontanées de l'ADN, des désaminations de cytosine et méthylcytosine, des produits de réaction avec les radicaux libres (bases oxydées), des méthylation de l'ADN (Seeberg *et al.*, 1995; Wood, 1996). Les principales étapes de ce mécanisme de réparation ont été déterminées grâce à la reconstitution *in vitro* de ce système avec les protéines purifiées (figure 1). La liaison N-glycosylique reliant la base endommagée à la chaîne de désoxyribose-phosphate est

Figure 1: Voies de réparation de l'ADN



hydrolysée par une ADN-glycosylase créant ainsi un site AP (apurique ou apyrimidique). L'endonucléase AP (HAP-1 chez l'homme) catalyse ensuite une coupure à l'extrémité 5' de la lésion engendrant ainsi des résidus 3'OH et 5'désoxyribose phosphate. Les données actuelles suggèrent alors deux voies de synthèse réparatrice (Frosina *et al.*, 1996). Lorsqu'un seul nucléotide est excisé, la voie de « réparation par brèche courte » est activée. Cette voie fait intervenir le complexe ADN polymérase β /XRCC1/ADN ligase III/PARP (poly ADP-ribose polymérase) dans lequel XRCC1 joue un rôle d'adaptateur capable de stabiliser les trois autres partenaires, et la PARP joue un rôle à la fois de détecteur de sites AP incisés et de recrutement des autres protéines (Caldecott *et al.*, 1996; Masson *et al.*, 1998). Par ailleurs, en interagissant avec l'ADN polymérase β , XRCC1 permet d'éviter une synthèse d'ADN excédentaire par cette polymérase lors de la réparation (Kubota *et al.*, 1996). Lorsque plusieurs nucléotides sont excisés, la voie de « réparation par brèche longue » est activée. Ces brèches de 6 à 13 nucléotides résultent d'un déplacement de brin dans le sens 5'-3' ensuite excisé par la DNase IV (5'-3' exonucléase). Il n'est pas clairement établi quels dommages activent spécifiquement l'une ou l'autre de ces deux voies bien que la première semble être plus importante. De plus, on ne connaît pas exactement la nature de l'ADN ligase qui intervient spécifiquement dans chacune des deux voies, mais l'interaction de XRCC1 avec l'ADN ligase III suggère que cette dernière serait responsable de l'étape de ligation dans la voie de réparation par brèche courte (Caldecott *et al.*, 1996).

1.2 Réparation par excision de nucléotides (NER)

La réparation par excision de nucléotides intervient sur les lésions encombrantes ou provoquant une distorsion importante de l'hélice d'ADN. Elle élimine les adduits formés par l'action des carcinogènes chimiques comme le cisplatine et des photoproduits de l'ADN engendrés par les rayons ultra-violet

de type C (UV-C) (Wood, 1996; Lindhal *et al.*, 1997). Chez l'homme, le système NER est le mécanisme principal impliqué dans la réparation des dommages produits par les UV. Le complexe RPA/XPA reconnaît la lésion sur l'ADN, l'activité hélicase portée par le facteur de transcription TFIIH permet la formation d'une structure ouverte au niveau du site de dommage (figure 1) . L'ADN est d'abord incisé en 3' par l'endonucléase XPG puis en 5' par le complexe XPF/ERCC1. Un oligonucléotide d'environ 30 nucléotides contenant la lésion est alors excisé. La brèche D'ADN doit ensuite être remplie par une ADN polymérase (δ et/ou ϵ) (Aboussekhra *et al.*, 1995, Zeng *et al.*, 1994) .

1.3 Réparation des mésappariements (MMR)

Les cellules eucaryotes disposent d'un système de réparation similaire à celui d'*E.Coli* pour corriger les mésappariements d'un seul nucléotide ainsi que les petites boucles (jusqu'à 4 nucléotides mésappariés) qui surviennent lors de la réplication, de la recombinaison et de la désamination des cytosines (Modrich et Lahue, 1996; Kolodner, 1996). L'hétérodimère hMSH2/hMSH6 (hMutS α) reconnaît un mésappariement d'un nucléotide ou une boucle de un à deux nucléotides et l'hétérodimère hMSH2/hMSH3 (hMutS β) reconnaît une boucle de plus de deux nucléotides. Le complexe ADN-hMutS est reconnu à son tour par l'hétérodimère hMutL α composé de protéines homologues de MutL de *E.Coli* : hMLH1/hPMS2. L'étape de resynthèse/ligation est similaire à celle de la réparation par excision de nucléotides. Des études récentes démontrent un rôle important de PCNA, le facteur accessoire des ADN polymérases δ et ϵ , dans le système de réparation des mésappariements (Umar *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1996) .

1.4. Maladies associées à une déficience en réparation de l'ADN

1.4.1 Vieillessement

La réparation des dommages à l'ADN joue un rôle très important dans le processus de vieillissement des organismes. En effet, la durée de vie d'un organisme semble être inversement corrélée avec le taux de dommages oxydatifs qui entraînent une accumulation graduelle d'altérations génétiques délétères. Par conséquent, on peut s'attendre à une accumulation, avec l'âge, de certaines formes de dommages à l'ADN non réparés (Lindahl, 1993).

1.4.2 Maladies neurologiques

L'Ataxia Telangiectasia (AT) est une maladie génétique transmise sous le mode autosomique récessif, affectant particulièrement le système nerveux. Il a été suggéré que le défaut fondamental dans cette maladie serait une déficience en recombinaison, résultant en une incapacité de réarranger et de réparer normalement les gènes (Kojis *et al.*, 1991). Ces hypothèses pourraient expliquer les défauts immunologiques observés, les nombreuses anomalies karyotypiques, et la sensibilité aux radiations des cellules AT (Meyn, 1993). Certaines lignées de cellules AT montrent une diminution du taux de réparation de l'ADN après une exposition à des radiations ionisantes (Paterson, 1979) suggérant un défaut dans la voie de réparation par excision de nucléotides. Une hypersensibilité aux radiations ionisantes a aussi été rapportée chez des patients atteints de neurofibromatose (Hannan *et al.*, 1993) de la maladie de Huntington ou de l'ataxie de Friedreich (Scuderio *et al.*, 1981). De plus, les patients atteints de xeroderma pigmentosum (XP), une maladie héréditaire caractérisée par des mutations dans les gènes de la famille XP dont les produits sont impliqués dans la réparation par excision de nucléotides, ont un risque élevé de développer des

cancers de la peau (Schaeffer *et al.*,1994) et montrent un grand nombre d'anormalités neurologiques. Ces complications neurologiques sont certainement dues au fait que le cerveau est le site d'un métabolisme oxydatif important (Cleaver, 1990) .

1.4.3 Syndromes d'instabilité

Les individus atteints du syndrome de Cockayne (CS) sont de petite taille et hypersensibles aux rayons UV. Les cellules CS montrent une déficience en réparation par excision de nucléotides (Barrett *et al.*, 1991). L'anémie de Fanconi (FA) est caractérisée par une pancytopénie et diverses anomalies congénitales dont une hyperpigmentation (Woods, 1998).

Le syndrome de Bloom (BS) est caractérisé, comme l'ataxia telangiectasia, par une déficience dans la réponse aux agents causant des dommages à l'ADN. Les cellules BS semblent être déficientes dans l'élimination des espèces oxygénées réactives créant des dommages à l'ADN. Les patients atteints de BS ont un faible poids de naissance et une croissance retardée (Gretzula *et al*, 1987).

Les cellules de ces individus ont une fréquence élevée de cassures chromosomiques spontanées et sont hypersensibles à certains agents mutagènes et carcinogènes dont la mitomycine, suggérant une déficience dans les mécanismes de réparation des pontages inter-brins.

1.4.4 Cancer

L'implication du système de réparation des mésappariements dans l'étiologie du cancer a clairement été démontrée chez l'homme. En effet, certains gènes codants pour des composantes du système MMR, lorsque mutés, sont responsables du syndrome HNPCC (*hereditary non polyposis colon cancer*) caractérisé par un risque élevé de développer des tumeurs, plus particulièrement au niveau du côlon (Thomas, 1995). L'altération du système MMR dans ces tumeurs s'exprime par une instabilité génétique (Aaltonen *et al.*, 1993; Ionov *et al.*, 1993; Thibodeau *et al.*, 1993; Krajinovic *et al.*, 1996). L'accroissement des erreurs de réplication (phénotype mutateur) associé, entre autres, à des mutations au niveau des gènes hMSH2 (Fishel *et al.*, 1993), hMLH1 (Bronner *et al.*, 1994), hMSH6 (Papadopoulos *et al.*, 1995), hMSH3 (Risinger *et al.*, 1996), hPMS1 et hPMS2 (Nicolaidis *et al.*, 1994), est aussi retrouvé, à des fréquences variables, dans la forme sporadique des cancer du côlon, sein, foie, estomac, pancréas, utérus, ovaire, vessie, cerveau et poumon (Speicher, 1995). L'altération des gènes de MMR est aussi responsable d'une élévation du taux global de mutations spontanées (Bhattacharyya *et al.*, 1994; Parsons *et al.*, 1993). De plus, les protéines du système MMR participent à d'autres processus cellulaires vitaux, incluant la recombinaison homologue (de Wind *et al.*, 1995), la médiation de l'entrée en phase G2 (Kat *et al.*, 1993), ainsi que dans le couplage transcriptionnel (Mellon *et al.*, 1996).

1.5 Conséquences thérapeutiques d'une altération de la réparation de l'ADN.

L'altération du système MMR confère une résistance à plusieurs composés cytotoxiques comme l'agent méthylant MNNG (Goldmacher *et al.*, 1986; Kat

et al., 1993; Branch *et al.*, 1993), le cisplatine (Aebi *et al.*, 1996), la 6-thioguanine (Aquilina *et al.*, 1993; Griffin *et al.*, 1994; Glaab *et al.*, 1998; Fink *et al.*, 1998), la doxorubicine (Anthoney *et al.*, 1996, Fink *et al.*, 1998) et plusieurs autres agents alkylants (Duckett *et al.*, 1996; Godfrey *et al.*, 1992) . Le système MMR jouerait un rôle central dans la reconnaissance des adduits d'ADN et dans la signalisation qui éventuellement déclencherait la mort cellulaire (Hawn *et al.*, 1995). La conséquence thérapeutique de la déficience en MMR est illustrée par la présence d'un phénotype mutateur chez un enfant atteint de la *T-cell* LLA qui a résisté aux traitements (Baccichet *et al.*, 1997a), ainsi que chez des individus qui ont développé une leucémie suite aux traitements de chimiothérapie (Ben-Yehuda *et al.*, 1996) . La détermination des capacités que possède un individu à métaboliser certaines drogues pourrait amener l'administration de protocoles thérapeutiques plus adéquats et moins toxiques.

2.Leucémies

2.1 Leucémie de l'enfant

En Amérique du Nord, un individu sur trois sera atteint d'un cancer au cours de sa vie. Chez les enfants, le cancer est une des maladies les plus fréquentes avec une prévalence d'environ 1/400, et la première cause de décès par maladie chez les individus de moins de 14 ans. La leucémie est la principale forme de cancer constituant le tiers de l'ensemble des tumeurs pédiatriques. Selon le type de cellule affectée et la nature des mutations, différents types de leucémies peuvent se développer : myéloïde aiguë ou chronique, ou lymphoblastique aiguë ou chronique. Dans le cadre de notre étude, notre attention a porté sur la leucémie lymphoblastique aiguë.

2.1.1 leucémie lymphoblastique aiguë

La leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) est causée par la prolifération maligne des lymphoblastes, les cellules progénitrices des lymphocytes T et B, qui se retrouvent dans la moelle osseuse, le sang périphérique et d'autres organes. La LLA peut se développer à partir de n'importe quelle cellule lymphoïde, incluant les cellules primitives. La LLA à cellules pré-B constitue environ 80% des LLA et est considérée comme la plus curable de toutes les formes de leucémies. Néanmoins, les conséquences de ce succès thérapeutique sont nombreuses : troubles de croissance, difficultés d'apprentissage, stérilité et risque élevé de développer un second cancer.

Des anomalies génétiques spécifiques (e.g., pertes ou gains de chromosomes, menant à une hyperdiploïdie ou à une hypodiploïdie, respectivement; des translocations chromosomiques, entraînant la formation de gènes de fusion transformants ou une dérégulation de l'expression des gènes; et la délétion ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs) sont retrouvées dans les cellules de plus de la moitié des patients atteints de LLA. La découverte de ces anomalies a contribué grandement à notre compréhension de la pathogenèse et du pronostic de la maladie. Néanmoins, on connaît encore peu de chose sur les causes et les facteurs de risque de la LLA.

2.1.2 Défaut en réparation de l'ADN et leucémie

Très peu de choses sont connues sur l'implication d'une déficience en réparation de l'ADN dans l'étiologie de la LLA. Néanmoins, les individus atteints de l'anémie de Fanconi, le syndrome de Bloom et l'Ataxia Telangiectasia, maladies dues à des déficiences en réparation, ont un risque élevé de développer des leucémies. De plus, notre laboratoire a documenté le premier cas de cancer pédiatrique, une leucémie, exprimant un phénotype mutateur (Baccichet *et al.*, 1997a).

2.2 Traitement de la LLA

1) Facteurs de pronostique

En 1993, des représentants du groupe du cancer chez les enfants (CCG), l'institut du cancer Dana Farber (DFCI), le groupe d'oncologie pédiatrique (POG), ainsi que l'hôpital St Jude (SJCRH), ont regroupé les données de leurs études et développé une liste simplifiée des critères de risque de la LLA basée principalement sur l'âge et le compte de globules blancs au diagnostique. D'autres facteurs de risque, la ploïdie, les anomalies cytogénétiques, le sexe et l'immunophénotype, ont été ajoutés permettant de déterminer si le patient se situe dans le groupe de risque standard, intermédiaire ou élevé de rechute afin d'ajuster son traitement.

a) Age au diagnostique

Selon l'âge de leur diagnostique, les patients sont classés dans l'une de trois catégories suivantes : inférieur à un an, de un à dix ans et supérieur à dix ans. Les enfants se situant dans le premier ou le troisième groupe sont à risque plus élevé de rechute.

b) Taux de globules blancs

Les patients ayant un compte de globules blancs au diagnostique supérieur ou égal à 50000/ μ l, sont plus à risque de rechute.

c) Anomalies structurales

Les translocations sont les anomalies structurales les plus fréquentes chez les enfants atteints de LLA. Les enfants dont les cellules leucémiques contiennent des translocations spécifiques ont généralement un mauvais pronostic (tableau 1). Cependant, les translocations impliquant le gène ETV6 sembleraient être associées avec un meilleur pronostic.

d) Sexe

Les garçons semblent avoir un risque plus élevé de rechute que les filles. Néanmoins, la cause de cette observation est toujours inconnue.

e) Immunophénotype

Il existe quatre types d'immunophénotypes chez les enfants atteints de LLA. L'immunophénotype pré-B est généralement associé à un meilleur pronostic alors que les patients possédant l'immunophénotype pré-T ont un risque plus élevé de rechute.

f) Anomalies numériques

La ploïdie peut être estimée en calculant l'indice d'ADN correspondant à la quantité d'ADN dans les cellules leucémiques divisée par la quantité d'ADN dans les cellules normales en phase G₀/G₁. Un indice supérieur à 1.16 correspond à un nombre de chromosomes supérieur ou égal à 53 et donc à une hyperploïdie et à un meilleur pronostic. L'hypodiploïdie est retrouvée chez 1 à 7% des enfants avec LLA et leur survie sans évènement (event-free survival, EFS) est très faible.

Tableau 1: Translocations communes chez les enfants atteints de LLA.

Translocation	Gènes fusionnés	Fréquence (%)	Commentaires
(12;21)(p13;q22)	ETV6-AML I	24-26	pronostique favorable
(1;19)(q23;p13)	E2A-PBX I	5-6	pronostique défavorable
(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL	3-5	pronostique défavorable
(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4	2	pronostique défavorable
(8;14)(q24;q32)	MYC-IGH	1-2	pronostique défavorable

2) Principe et types de traitements

Dans notre étude, les patients atteints de LLA sont traités principalement selon 3 protocoles : le Dana-Farber Cancer Institute (DFCI) ALL Consortium protocol 87001, le 91001 et le 95001. Ces protocoles comportent trois phases :

- L'induction, destinée à obtenir une rémission complète, est une combinaison de multiples agents dont le méthotrexate ($4\text{mg}/\text{m}^2$).
- L'intensification, une autre phase de chimiothérapie lourde où plusieurs composés sont administrés, dont le méthotrexate ($30\text{mg}/\text{m}^2$ hebdomadairement) et des doses élevées de 6-mercaptopurine (6-MP $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{jour}$ durant les quatorze premiers jours du cycle de 21 jours).
- L'entretien, qui a pour but d'éradiquer toute maladie résiduelle. Ce traitement doit être permanent jusqu'à la rémission complète continue de deux ans, et repose sur l'association de 6-MP et de méthotrexate.

On parle de guérison lorsque la rémission complète atteint cinq ans. Actuellement, environ 70% des enfants guérissent avec un traitement de première ligne. Le taux de guérison peut atteindre 90% pour les groupes à risque standard. Les formes LLA à cellules T, ont une survie, selon le protocole, entre 50 et 75%.

3. Le cancer: modèle d'une maladie complexe

Le cancer sporadique, tel que la LLA, est une maladie génétique complexe, où l'effet d'une série de gènes à « faible pénétrance » est modulée par des facteurs externes. Par conséquent, le risque de chaque individu face au cancer est variable et sous-entend une interaction complexe entre des facteurs génétiques et environnementaux. Au cours de sa vie, un être humain est exposé à divers xénobiotiques incluant les médicaments et les polluants que l'on retrouve dans la diète, l'air et l'environnement en général. Deux grandes classes de facteurs environnementaux peuvent causer le cancer chez l'homme :

- Les substances chimiques, incluant les organochlorés (pesticides), les solvants organiques comme le benzène et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) produits lors de la combustion de matières organiques (fumée de cigarette, cuisson des aliments, etc).
- Les facteurs physiques tels que les UV et les radiations ionisantes.

Le pic d'incidence de la LLA se situant entre 2 et 5 ans, l'initiation s'effectuerait *in utero* ou très tôt dans la petite enfance (Smith *et al.*, 1997). L'exposition des enfants à ces agents peut se faire de différentes manières : avant la conception, par l'exposition des cellules germinales de leurs parents; au cours de la grossesse, par des substances transmises de la mère au fœtus via le placenta; et après la naissance par un contact environnemental direct. L'impact de cette exposition n'est pas négligeable à cause du caractère immature des voies métaboliques responsables de la biotransformation des xénobiotiques, l'exposition relative plus grande que l'adulte, ainsi que le grand nombre de divisions cellulaires chez ces organismes en pleine croissance (Ecobichon et Stevens, 1973).

3.1 Variabilité interindividuelle

Dans la population générale, on observe une variabilité inter-individuelle de la susceptibilité au cancer, mais peu de choses sont connues sur les facteurs innés contribuant à cette variabilité. Les mécanismes biochimiques et génétiques contribuant à la susceptibilité au cancer sont nombreux : croissance cellulaire et différenciation, réplication et réparation de l'ADN, et métabolisme de xénobiotiques. La variabilité inter-individuelle dans la réponse de l'hôte à son environnement dépend donc notamment de polymorphismes génétiques qui influenceraient la capacité de réparer l'ADN.

3.2 Polymorphismes dans les gènes de réparation de l'ADN.

Le produit des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN jouent un rôle crucial pour le maintien de l'intégrité du génome et la protection contre l'apparition des mutations. Dans la population générale, il existe une grande variabilité dans la capacité de réparer l'ADN qui constituerait un facteur de risque de développer un cancer. Un grand nombre de variants dans les gènes de réparation de l'ADN ont été identifiés (Tableau 2). Les variants communs (caractères gras, Tableau 2), identifiés au niveau de la séquence codante des gènes APE, XRCC1, XPF et XPD (Shen *et al.*, 1998), hMLH1 et hMSH3 (Benachenhou *et al.*, 1998a), permettent maintenant d'explorer cette hypothèse. APE code pour une endonucléase apurinique (Demple *et al.*, 1991); XRCC1 est impliqué dans la recombinaison et la réparation des bris double-brin du DNA (Zdzienika, 1995), ainsi que dans le système BER (Lindhal *et al.*, 1997); XPF (ERCC4) est une nucléase qui agit en 5' des dommages (Bessho *et al.*, 1997); XPD (ERCC2) possède une activité 5'-3' hélicase ATP-dépendante (Sung *et al.*, 1993) à l'intérieur de complexe TFIIH qui est requis autant pour la transcription que pour la réparation de l'ADN (Lehmann, 1995).

La signification fonctionnelle de ces variants est encore inconnue. Néanmoins, des associations entre les polymorphismes liés à XRCC1 et XPD, et le risque de cancer ont récemment été démontrées (Price *et al.*, 1997; Sturgis *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1999, Escobar *et al.*, 1999). La présence de substitutions non conservatives d'acides aminés impliquant des résidus conservés dans l'évolution (Tableau 2) suggère que ces acides aminés sont importants pour l'activité des protéines et que ces variants pourraient modifier la fonction de celles-ci. Comme les enzymes de réparation agissent souvent dans un complexe multiprotéique où la stoechiométrie peut être importante, un effet de dosage pourrait avoir une répercussion au niveau de ces divers mécanismes (De Weese *et al.*, 1997, Benachenhou *et al.*, 1998a; 1999). Ainsi, une modification dans le système de réparation de l'ADN pourrait débalancer l'équilibre existant entre les altérations de l'ADN contribuant à un avantage sélectif de croissance vs un fardeau mutationnel trop lourd qui sera éventuellement létal pour la cellule. Il nous a donc semblé important d'évaluer l'impact de ces variants dans la susceptibilité au cancer.

3.3 Inter-relation entre la réparation de l'ADN et le métabolisme des xénobiotiques

Les carcinogènes chimiques nécessitent une activation métabolique avant d'interagir avec l'ADN et causer l'apparition de mutations qui, si elles ne sont pas réparées, pourront mener à l'apparition du cancer (figure 2). La biotransformation des carcinogènes fait intervenir des enzymes de phase I (par exemple cytochromes P-450), qui catalysent des réactions d'hydrolyse, de réduction et d'oxydation et des enzymes de phase II (par exemple Glutathion S-transférases); responsables des réactions de glucoronidation, sulfatation, acétylation, méthylation, conjugaison avec le glutathion ou les acides aminés qui contribuent à l'élimination des métabolites activés lors de la phase I. Certaines de ces enzymes de phase I ou II sont codées par des gènes

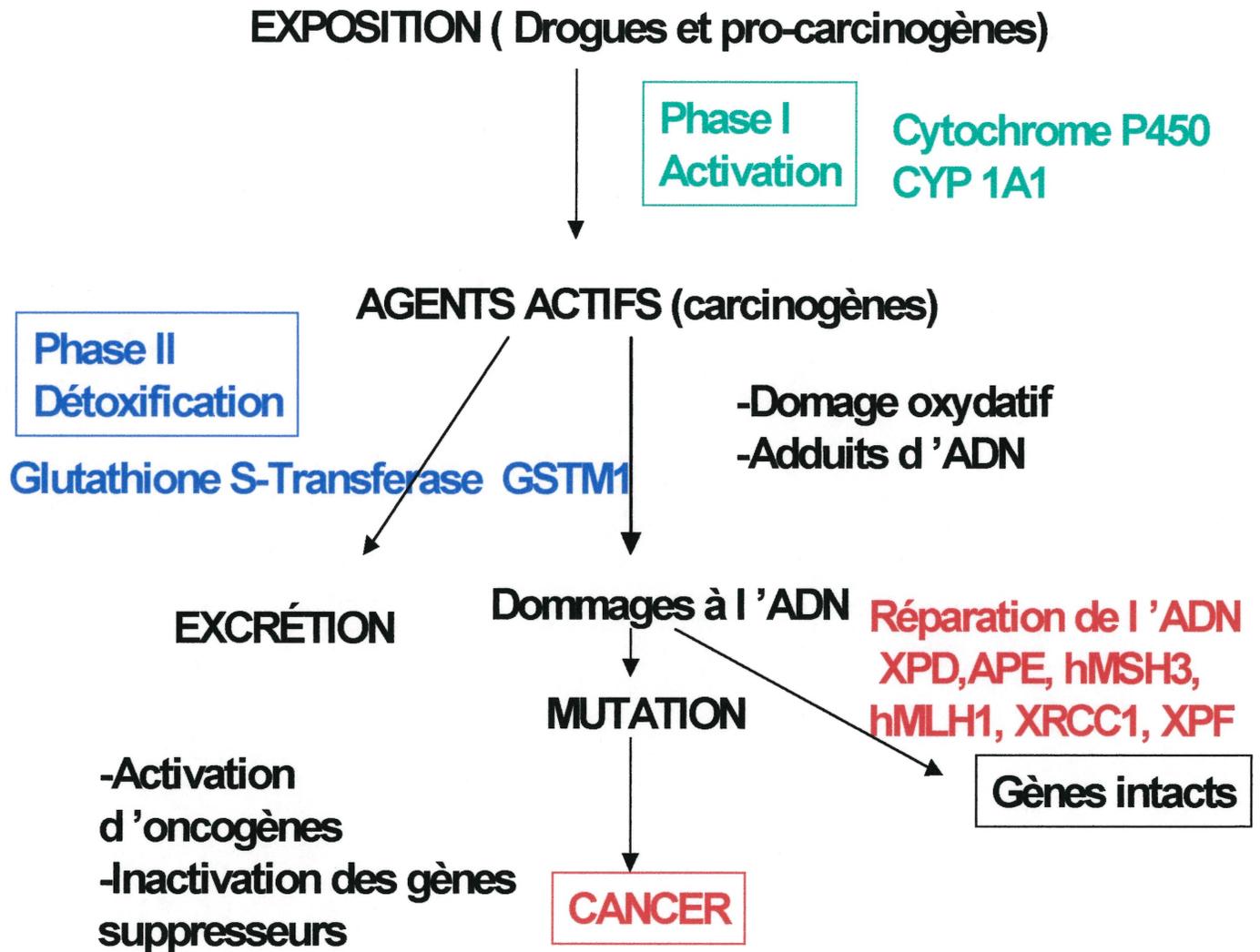
polymorphiques qui sont associés à des phénotypes biochimiques connus et à une modification du risque de LLA (revue dans Sinnett *et al*, 2000). Les carcinogènes ont la capacité d'initier le processus tumoral en provoquant l'apparition de mutations via l'interaction avec l'ADN et les protéines. Une augmentation de l'activité d'une ou plusieurs enzymes de phase I (e.g. due à un polymorphisme dans CYP1A1) entraîne une accumulation de carcinogènes actifs. Si le processus de détoxification est moins efficace chez un individu (e.g. absence de GSTM), ces carcinogènes ne seront pas éliminés d'où une augmentation du fardeau mutationnel et conséquemment une plus grande probabilité d'acquérir une mutation dans un gène de cancer (oncogène ou gène suppresseur de tumeur). L'altération de certaines composantes du système de réparation de l'ADN pourrait modifier l'efficacité de la correction de ces erreurs. C'est pourquoi il est important d'étudier les modifications du système de réparation de l'ADN dans un cadre plus large comme le métabolisme des carcinogènes afin de mieux comprendre l'étiologie du cancer, dans notre cas la LLA de l'enfant.

Tableau 2: Polymorphismes connus dans les gènes de réparation de l'ADN

Gène	Exon	Voie de réparation	Changement d'acide-aminé
XRCC1	6	BER	Arg194Trp
XRCC1	9	BER	Arg280His
XRCC1	10	BER	Arg399Gln
POLB	1	BER	Gln8Arg
POLB	12	BER	Pro242Arg
APE	3	BER	Asp148Glu
APE	5	BER	Asp148Glu
XRCC3	7	BER	Thr241Met
XPD	8	NER	Ile199Met
XPD	8	NER	His201Tyr
XPD	10	NER	Asp312Asn
XPD	20	NER	Arg616Pro
XPD	23	NER	Lys751Gln
XPA	5	NER	Met256Ile
XPF	7	NER	Pro379Ser
XPF	8	NER	Arg415Gln
hMLH1	8	MMR	Ile219Val
hMSH2	6	MMR	Gly322Asp
hMSH3	21	MMR	Arg940Gln
hMSH3	23	MMR	Thr1036Ala

Les variants sélectionnés pour notre étude sont indiqués en caractères gras

Figure 2: Carcinogène initiée par les xénobiotiques



4. La population d'origine Canadienne-Française : un modèle de choix pour des études d'épidémiologie génétique

Dans le design d'une étude d'épidémiologie génétique, il est essentiel de minimiser l'impact de l'hétérogénéité génétique. Pour contourner ce problème, il faut donc se tourner vers des populations dites homogènes. Les populations issues de l'effet fondateur (ou isolats) sont considérées comme des modèles génétiques idéaux pour ce genre de projet (Enserink, 1998).

Chez les Canadiens-Français, la présence d'un effet fondateur est bien documentée, notamment dans la région du Saguenay (Labuda *et al.*, 1996, 1997), et à moindre fréquence chez les acadiens, les gaspésiens et la population générale du Québec. La population du Québec est reconnue comme étant relativement homogène en termes génétiques, socio-démographique et historique. Ces caractéristiques devraient faciliter les études d'épidémiologie génétique en diminuant la diversité inter-individuelle présente dans la population générale. C'est pour ces raisons que nous avons choisi la population Canadienne-Française comme référence pour toutes nos études.

5. Hypothèses

Nos hypothèses sont les suivantes :

- Des facteurs génétiques modulent la susceptibilité individuelle à la LLA.
- Cette susceptibilité génétique est associée à des variants alléliques communs de gènes codant pour des composantes du système de réparation de l'ADN.
- Certains de ces variants pourraient influencer la réponse thérapeutique.

6. Objectifs du projet

Dans le but de vérifier ces hypothèses nous avons :

- 1) Élaboré des outils de génotypage pour les loci : hMLH1, hMSH3, XRCC1, XPD, XPF et APE
- 2) Déterminé la fréquence de ces variants dans différents groupes ethniques dont la population Canadienne-Française (contrôle).
- 3) Estimé la fréquence et la distribution des allèles (et/ou génotypes) identifiés en 2, chez les enfants atteints de LLA (cas) afin de démontrer la présence d'association entre les génotypes et la maladie.
- 4) Combiné ces résultats avec ceux obtenus pour le génotypage des loci impliqués dans le métabolisme des carcinogènes (CYP1A1 et GSTM1) afin d'évaluer l'effet combinatoire de ces loci sur le risque de LLA.
- 5) Évalué l'interaction entre les génotypes et étudier l'impact sur la réponse thérapeutique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Sujets étudiés

1.1 Le groupe « cas »

Le groupe de patients est constitué de 180 cas incidents de LLA diagnostiqués à la clinique d'hémato-oncologie de l'hôpital Ste-Justine de Montréal. Les critères d'inclusion pour participer à l'étude sont :

- Être d'origine Canadienne-Française résidant au Québec en se basant sur le nom, la langue parlée et le lieu de naissance,
- Avoir un historique clinique complet,
- La disponibilité du matériel biologique.

Ces patients ont été diagnostiqués et traités au cours de la période 1989-1999 selon les normes des protocoles 87-001, 91-001 et 95-001 du groupe de Boston (Dana Farber Cancer Institute, Boston). Les données démographiques, cliniques et histo-pathologiques sont tirées des dossiers médicaux de ces patients et documentées dans notre base de données. Le matériel biologique de ces patients provient du sang périphérique, de la moelle osseuse et/ou de frottis buccaux. Les patients et/ou leurs parents ont signé un formulaire de consentement éclairé où ils acceptent de donner un échantillon de sang périphérique pour le génotypage

1.2 Le groupe « contrôle »

Le groupe contrôle est composé de 323 individus non reliés qui ont accepté de donner un échantillon de sang et certaines données démographiques (sexe, âge et origine ethnique) sur une base anonyme (non-nominatif). Les critères d'inclusion sont identiques à ceux du groupe cas. La distribution géographique du groupe témoin est similaire à celle des patients de la clinique d'hémato-oncologie afin de former un groupe témoin se rapprochant le plus des cas.

Ce groupe contrôle est composé de trois sous-groupes :

1. l'ADN extrait du sang du cordon ombilical prélevé dans la salle d'accouchement de l'hôpital (sous-groupe A, n=103),
2. l'ADN extrait du sang d'individus venus au centre de prélèvement de l'hôpital Ste-Justine pour des conditions non-cancéreuses (sous-groupe CP, n=93),
3. l'ADN extrait du sang des employés de l'hôpital (sous-groupe MQF, n=127).

1.3 Autres populations étudiées

Nous avons génotypé un total de 460 chromosomes d'individus non reliés appartenant à 11 groupes continentaux : Moyen-Orient (n=52), Asie du sud-est (n=46), Algonquins (n=48), Africains (n=46), Mayas (n=32), Karitianas (n=38), Na-dene (n=48), juifs Ashkenazes (n=42), Polonais (n=42), Sibériens (n=48) et Mongoles (n=48). Les caractéristiques de chaque groupe sont regroupées dans le tableau 3.

Tableau 3: Composition des groupes continentaux étudiés

Groupe continental	Origine	Nombre d'individus
Moyen-Orient	Égypte	11
	Liban	9
	Syrie	1
	Maroc	2
	Algérie	1
Asie Sud-Est	Vietnam	8
	Cambodge	6
	Chine	7
	Laos	3
Algonquins	Ojibwae	12
	Atikamek	12
Africains	Zaïre	6
	Africains-Américains	13
	Ghana	1
	Ouganda	1
	Rwanda	1
	Région indéterminée	2
Mayas	Mayas	16
Karitianas	Karitianas	19
Na-Dene	Na-Dene	24
Ashkenazes	Ashkenazes	21
Polonais	Polonais	21
Sibériens	Sibériens	24
Mongoles	Mongoles	24

2. Méthode

2.1 Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait des cellules mononucléées du sang périphérique, de la moelle osseuse ou de frottis buccaux à l'aide de protocoles standards (Baccichet *et al.* 1997b, Sinnott *et al.* 1988).

2.1.1 Amplification de l'ADN génomique par PCR

Comme la plupart des polymorphismes sélectionnés ne modifient pas un site de restriction et étant donné le nombre d'individus à génotyper, nous avons choisi, pour notre étude, l'approche PCR-Hybridation Allèle-spécifique oligonucléotide (ASO) que nous avons développée dans notre laboratoire (Labuda *et al.*, 1999), comme méthode de génotypage (figure 3).

La région de l'ADN de chaque individu contenant le site polymorphique d'intérêt est amplifiée par la méthode PCR: 35 cycles de dénaturation de 30s à 94°C, appariement de 30 à 45s entre 50 et 60°C selon le locus, et élongation de 30s à 72°C, sont effectués. Les réactions sont effectuées dans un volume de 20 µl contenant 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 100 µM dNTPs, 0,1 µM de chaque amorce, 0,5 u AmpliTaq (Hoffman-LaRoche) et 5 ng ADN. Les amorces utilisées, les températures d'appariement ainsi que la taille des produits sont indiquées dans le tableau 4. Ces réactions sont effectuées dans l'appareil thermocycler « TouchDown » de Hybaid.

Figure 3 : Génotypage par l'approche PCR-ASO

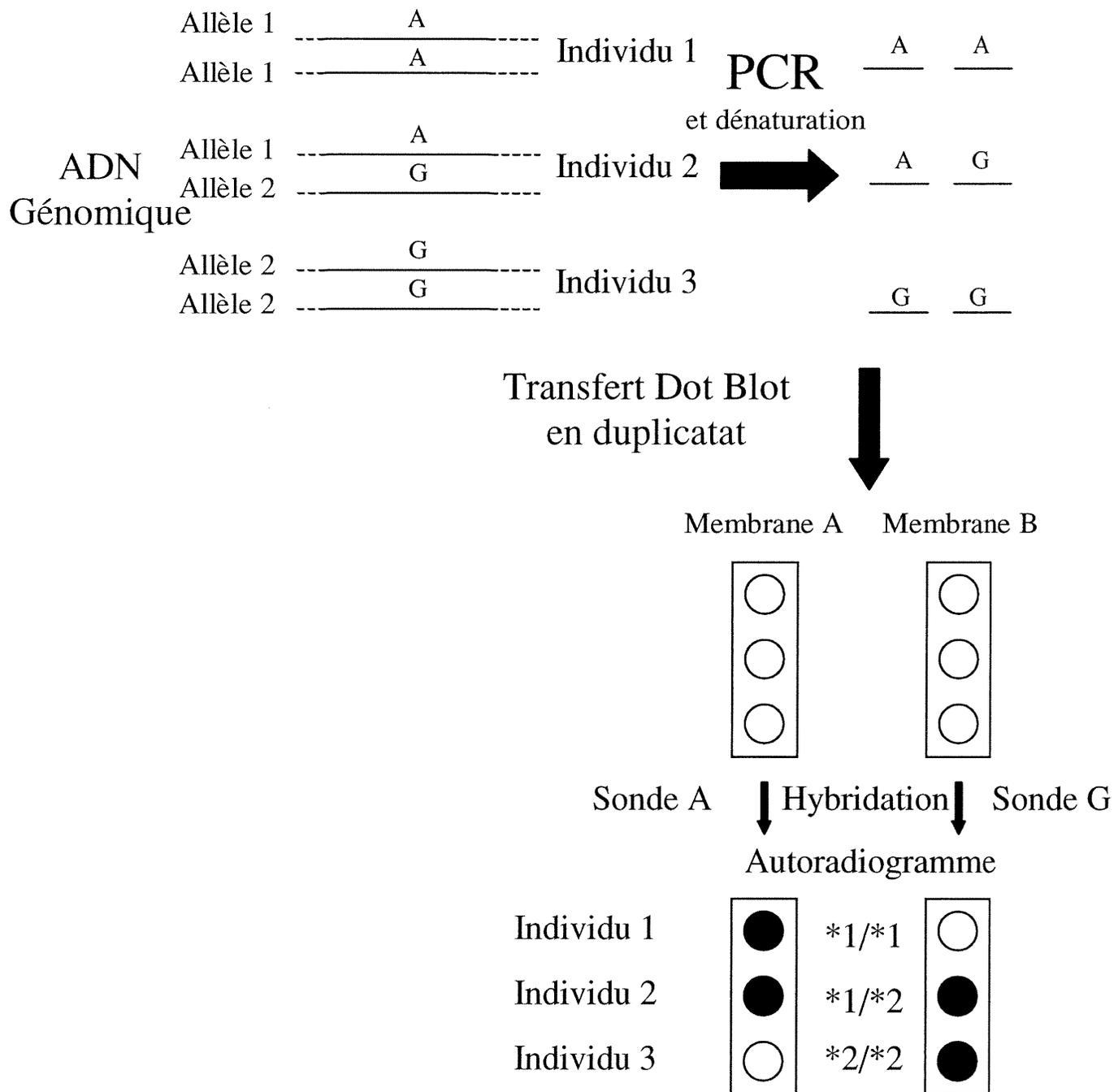


Tableau 4: Amorces et caractéristiques des PCR pour les loci hMLH1, hMSH2, hMSH3, XRCC1, XPD, XPF et APE.

Locus	Variant	Séquence des amorces de PCR	Température D'appariement (°C)	Concentration Amorce (µM)	Taille produit (pb)
HMLH1	A676G	PFE8/501, 5'CCTTGTGTCTTCTGCTGTTTG3'	52	0.1	146
		PRE8/502,5'GATTTTTTTTATATAGGTTATGGAC3'			
HMSH3	G2835A	PRE21/2084, 5'GTGAAGAGGAAAATCAAGG3'	55	0.1	248
		PFE21/2085, 5'ATACAGTTTACCGGATACTTA3'			
	A3124G	PFE23/2088, 5'TCAGGCACAGTTTTGATC3'	55	0.1	276
		PRE23/2089, 5'CCTCTCTTTCTTGGACAA3'			
XRCC1	C26304T	Fex5.6a-Xn1, 5'TACCCTCAGACCCACGAGT3'	60	0.1	485
		Rex5.6s-Xn1, 5'GCCAGGGCCCCTCCTTCA3'			
XPD	A35931C	Fex23s-En2,5'TCAAACATCCTGTCCCTAGT3'	52	0.2	344
		Rex23a-En2,5'CTGCGATTAAAGGCTGTGCA3'			
XPF	G1244A	Fex8a-XPF, 5'AAGGGGGCACAGGGAAACT3'	55	0.1	275
		Rex8a-XPF, 5'TTTGGGGTCTTTAGGTC3'			
APE	T2197G	Fex5-APE, 5'CTTACGGCATAGGTGAGAC3'	50	0.8	395
		Rex5-APE, 5'CCAGCATTCTTTTTGTTCC3'			

2.2.2 Transfert des produits de PCR sur membrane (Dot Blot)

Vingt μl du produit de PCR est ramené à 100 μl avec de l'eau, incubé à 94°C pendant 2 minutes puis refroidi sur glace et additionné de 100 μl de SSC 20X (1X SSC correspond à 1,5 M NaCl, 150 mM citrate de sodium, pH7). Des aliquots de 100 μl sont ensuite transférés en duplicata sur des membranes de nylon (Hybond N+, Amersham) par aspiration avec l'appareil à Dot Blot (Minifold 1, Schleicher et Schuell). Les puits sont rincés avec 100 μl de SSC 10X et les membranes sont immergées dans une solution dénaturante à 1,5M NaCl et 0,5 M NaOH pendant 10 minutes puis dans une solution de neutralisation à 1,5 M NaCl, 0,5M Tris-HCl, pH7,2 pendant 15 minutes. Pour une meilleure fixation de l'ADN, les membranes sont alors exposées à une irradiation aux UV (254 nm) à une énergie de 120000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ (Stratalinker 1800, Stratagene).

2.2.3 Hybridation des membranes par la méthode ASO

Des oligonucléotides de 15 mer, de séquence complémentaire à celle de chaque variant (forme mutante et normale ou sonde A et G dans la figure 3), ont été synthétisés afin de servir de sonde pour l'hybridation des produits de PCR transférés sur membrane. Les séquences des sondes pour chaque site polymorphique sont indiquées dans le tableau 5. Les membranes sont préhybridées pendant 15 minutes dans un four à hybridation (Modèle 400, Robbins Scientific) dans 20 ml de solution d'hybridation contenant 1X SSPE (150mM NaCl, 10mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH7,4), 0,75 M NaCl, 70 mM Tris-HCl, pH7,4, 1% de SDS et 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'héparine à la température

d'hybridation spécifique à chaque site (voir tableau 5). Les sondes ASO (50 pmol) sont marquées en 5' avec du [γ^{32}]ATP (6000Ci/mmol) et la T4 Kinase (Gibco BRL) à une activité spécifique de 1 à 3×10^6 cpm/pmol (250000 à 750000 cpm/ng). L'hybridation avec les sondes ASO sauvages ou mutantes (0.8 à 2 pM, environ 2000000 cpm) est effectuée pendant environ 30 minutes. Les membranes sont ensuite lavées avec une solution de SSPE 2X contenant 0,1% de SDS pendant 15 minutes à la température de lavage spécifique du locus (voir tableau 5) et exposées à -80°C en présence d'écrans intensificateurs et un film Rayons X (Kodak, Biomax). Les membranes en duplicata ont ainsi été hybridées l'une avec l'ASO sauvage et l'autre avec l'ASO mutant et sont lues en parallèle (figure 3). Les échantillons d'ADN de génotype connu servent de contrôle positif pour les amorces alléliques. Les membranes peuvent être réutilisées si nécessaire après décrochage des sondes dans une solution bouillante de SDS 0,5%.

Tableau 5: Séquence des ASO et conditions d'hybridation.

Locus	Variante	ASO	Hybridation(°C)	Lavage(°C)
HMLH1	G676	Mut, 5' tccaaagaCggagcg 3'	37	40
	A676	Wt, 5' cgctccAtcttggga3'	37	40
HMSH3	A2835	Mut, 5' aaaggacAgagtaca3'	37	37
	G2835	Wt, 5' tgtactcCgtcctt3'	37	37
	G3124	Mut, 5' gttctgctgCgcctg3'	37	55
	A3124	Wt, 5' caggcAcagcagaac3'	37	45
XRCC1	C26304	Wt, 5' cttcagcCggatcaa3'	37	37
	T26304	Mut, 5' ttgatccAgctgaag3'	37	37
XPD	A35931	Wt, 5' gacgctgAagaggat3'	35	35
	C35931	Mut, 5' gacgctgCagaggat3'	35	37
XPF	A1244	Mut, 5' gatgaccaaacatgt3'	37	37
	G1244	Wt, 5' acatgttcggtcatc3'	37	37
APE	T2197	Wt, 5' taggcgaTgaggagc3'	37	44
	G2197	Mut, 5' taggcgaGgaggagc3'	37	40

Wt, sonde sauvage; Mut, sonde mutante; les caractères en majuscule indiquent les sites de mutation.

2.2.4 Analyses statistiques

L'analyse univariée permettra d'estimer les risques relatifs (odds ratio, OR) mesurant la force des associations causales avec des intervalles de confiance (CI) à 95% (un OR supérieur à 1 indique une augmentation du risque alors qu'un OR inférieur à 1 indique une protection). Le test de Fisher (*two-sided*), permettra aussi de vérifier si l'association est significative. Le seuil de signification est fixé à 5%.

Pour démontrer la présence d'association entre les génotypes des gènes codant pour les enzymes du métabolisme des carcinogènes et ceux des gènes de réparation de l'ADN sur le risque de LLA, les individus sont regroupés en fonction de la distribution des génotypes qui sera comparée entre les cas et les contrôles. Un risque relatif de 1 est attribué aux groupes ne possédant aucun génotype à risque.

Une analyse multivariée (régression de Cox) a été effectuée pour évaluer l'effet de l'interaction entre les génotypes des gènes de réparation de l'ADN et certains phénotypes cliniques présentés dans le tableau 17, sur la survie des patients. Les risques relatifs sont ajustés pour les facteurs potentiels de confusion ou pouvant modifier l'effet observé (sexe, âge, immunophénotype, indice d'ADN et compte de globules blancs).

Ces analyses sont effectuées avec les logiciels SPSS version 7.5 pour Windows et GraphPad InStat version 2.05.

RÉSULTATS

1. Outils de génotypage

L'approche PCR/ASO s'est avérée très efficace pour le génotypage de plusieurs variants chez un grand nombre d'individus. Des résultats représentatifs pour les polymorphismes étudiés sont montrés dans la figure 4. Cette approche a été utilisée pour le reste du projet.

2 Détermination de la fréquence des variants dans différentes populations

2.1 Fréquence des variants dans la population Canadienne-Française

La fréquence des variants des gènes de réparation de l'ADN hMLH1, hMSH3, XRCC1, XPD, XPF et APE dans la population Canadienne-Française est représentée dans le tableau 6 et la fréquence des génotypes est indiquée dans le tableau 7. Certains variants sont relativement rares comme celui dans XRCC1 présent à seulement 5%, alors que d'autres sont plus fréquents comme le variant dans APE présent chez 40% des individus testés. Dans l'ensemble, la distribution des génotypes obéit à la loi de Hardy Weinberg telle qu'illustrée par la comparaison des fréquences observées et attendues (tableau 7). Le locus hMSH3 fait exception à cette loi.

Afin de déterminer si les variants G2835A et A3124G du gène hMSH3 sont liés, nous avons effectué un test de déséquilibre de liaison, à l'aide du logiciel Genepop version 3.1 (CNRS URA 5554, Montpellier, France). Ce test a donné une valeur p très proche de 0 (χ^2 infini) indiquant que les variants dans les exons 21 et 23 sont liés c'est à dire que les porteurs du variant dans l'exon 21 sont généralement aussi porteurs de celui situé dans l'exon 23. Ces observations nous ont permis de distinguer les différents allèles pour le gène hMSH3 (figure 7) ainsi que pour les autres loci (figures 5 à 10).

Dans la littérature, la notion d'allèle sauvage est souvent utilisée pour désigner arbitrairement le premier allèle identifié, ou le plus fréquent. Chez l'humain, on

devrait plutôt parler de séquence de référence. Afin de diminuer ce caractère arbitraire, nous suggérons que la séquence de référence devrait correspondre à l'allèle « ancestral », c'est à dire la forme non-polymorphique existant chez les primates non-humains .

2.2 Fréquence des variants chez les chimpanzés

Pour déterminer la nature de l'allèle ancestral des loci étudiés, nous avons génotypé trois chimpanzés. Les résultats sont regroupés dans le tableau 8. Les sites informatifs sont tous monomorphiques chez les chimpanzés. L'allèle 1 de hMLH1 et XRCC1 qui est retrouvé chez les chimpanzés serait l'allèle ancestral. En revanche, c'est l'allèle 3 de hMSH3 ainsi que les allèles 2 de XPD et XPF qui sont retrouvées chez les chimpanzés. L'allèle ancestral, ou séquence de référence (ref), est indiqué(e) sur les figures 5 à 10. La séquence retrouvée chez les chimpanzés est généralement la même que celle de la souris, suggérant l'importance de ces acides aminés dans l'évolution. Le locus APE n'a pas pu être amplifié chez le chimpanzé.

2.3 Fréquence des variants dans d'autres groupes continentaux.

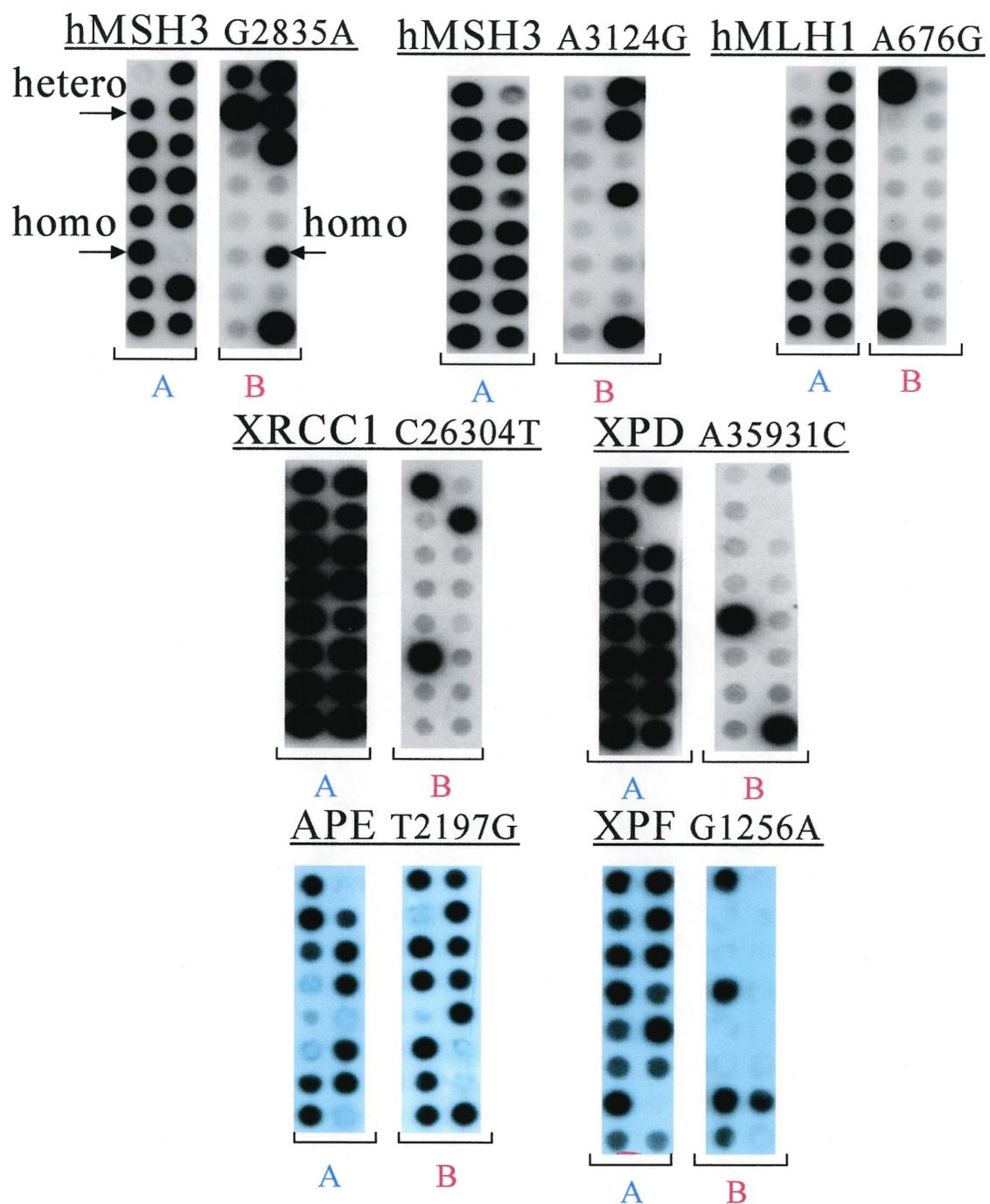
Afin de savoir si la fréquence de ces variants est différente dans d'autres groupes continentaux, nous avons génotypé des individus de différentes origines dont les caractéristiques sont regroupées dans le tableau 3. Afin de voir si les Canadiens-Français se comportent comme d'autres populations européenne, nous avons génotypé un groupe d'origine polonaise.

Les fréquences des variants dans les gènes de réparation de l'ADN dans ces différents groupes continentaux sont illustrées dans les figures 11 à 16. Pour chaque locus on observe une grande variation dans la fréquence des variants entre les différentes populations. Certaines populations n'ont pas été génotypées pour tous les loci à cause de l'accès limité au matériel génétique. La

population Canadienne-Française a des fréquences semblables à la population polonaise indiquant que celle-ci se comporte comme une population européenne et donc que les conclusions que l'on peut tirer sur cette population s'applique aussi aux autres populations européennes.

Le variant dans le gène hMLH1 est plus fréquent dans les populations situées au nord de l'équateur par rapport aux populations du sud où le variant est très rare, voire absent chez les Karitianas, une population isolée d'Amérique du sud (figure 11). L'allèle 2 de hMSH3 n'est observé que chez les Canadiens-Français, contrairement à l'allèle 3 qui est présent partout et est plus fréquent que l'allèle 4 sauf pour les individus du Moyen-Orient, les Ashkenazes et les Canadiens-Français (figure 12). L'allèle 4 est très rare en Asie et est absent chez les populations Amérindiennes sauf chez les mayas (13%) (figure 12). Le variant dans l'exon 23 de XPD est absent du continent asiatique et est présent partout ailleurs (figure 14). La fréquence du variant dans XRCC1 est très faible en Amérique du sud et en Afrique alors qu'elle atteint presque celle de l'allèle sauvage chez les Amérindiens parlant Algonquin (figure 13). Ce variant est absent chez les Karitianas indiquant qu'il n'existe pas dans ce groupe ou que le nombre d'individus étudié est trop faible pour le détecter. Les variants dans l'exon 8 de XPF et dans l'exon 5 de APE est présent dans tous les groupes étudiés sans montrer de variations extrêmes (figures 15 et 16). Afin d'illustrer la très grande variabilité dans la fréquence des variants entre les populations, nous avons regroupé les résultats dans la figure 17.

Figure 4 : Résultats des hybridations par la méthode PCR-ASO



A, B : Membrane A, Membrane B

Tableau 6: Fréquence des variants dans la population Canadienne-Française

Locus	Variant	Nombre total de Chromosomes analysés	Fréquence (%)
hMLH1	A676	186	68,3
	G676	186	31,7
hMSH3	G2835	160	83
	A2835	160	17
	A3124	160	70
	G3124	160	30
XRCC1	C26304	164	95
	T26304	164	5
XPD	A35931	188	74,5
	C35931	188	25,5
XPF	G1244	164	91
	A1244	164	9
APE	T2197	180	60,3
	G2197	180	39,7

Tableau 7: Fréquence des génotypes dans la population Canadienne-Française

Locus	Génotype	Nombre total d'individus génotypés	Fréquence des génotypes (%)	
			attendue	observée
hMLH1	A676/ A676	93	49	48
	A676/ G676	93	42	40,5
	G676/ G676	93	9	11,5
hMSH3	G2835/ G2835	80	85	71
	G2835/ A2835	80	14	24
	A2835/ A2835	80	1	5
	A3124/ A3124	80	63	51,4
	A3124/ G3124	80	33	37,2
	G3124/ G3124	80	4	11,4
XRCC1	C26304/ C26304	82	76	90
	C26304/ T26304	82	22	10
	T26304/ T26304	82	1	0
XPD	A35931/ A35931	94	50	58,2
	A35931/ C35931	94	41	32,7
	C35931/ C35931	94	9	9,1
XPF	G1244/ G1244	82	90	83,1
	G1244/ A1244	82	9	15,8
	A1244/ A1244	82	1	1,1
APE	T2197/ T2197	90	31	42,6
	T2197/ G2197	90	49	35,3
	G2197/ G2197	90	20	22,1

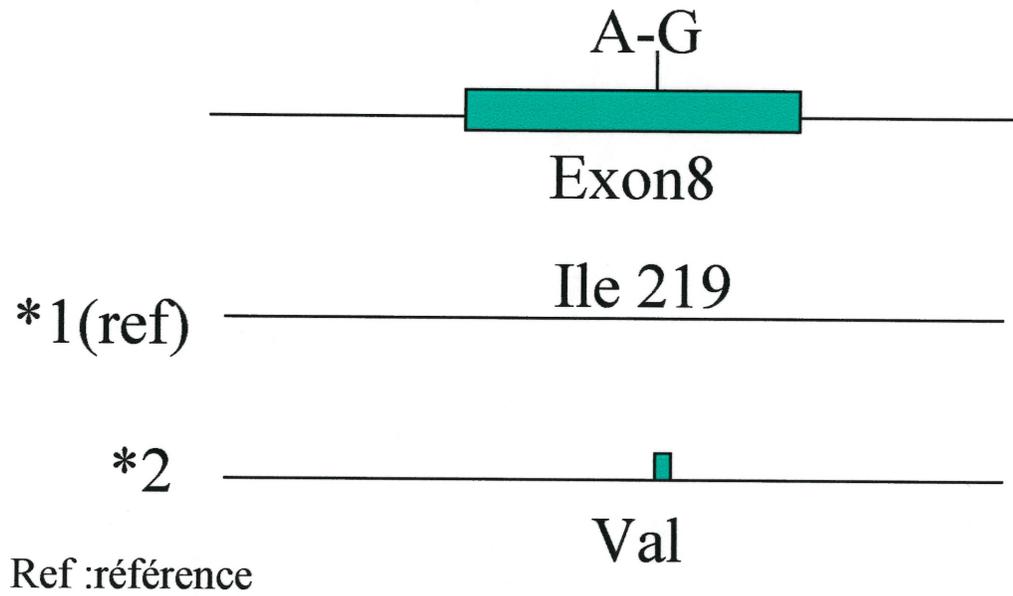
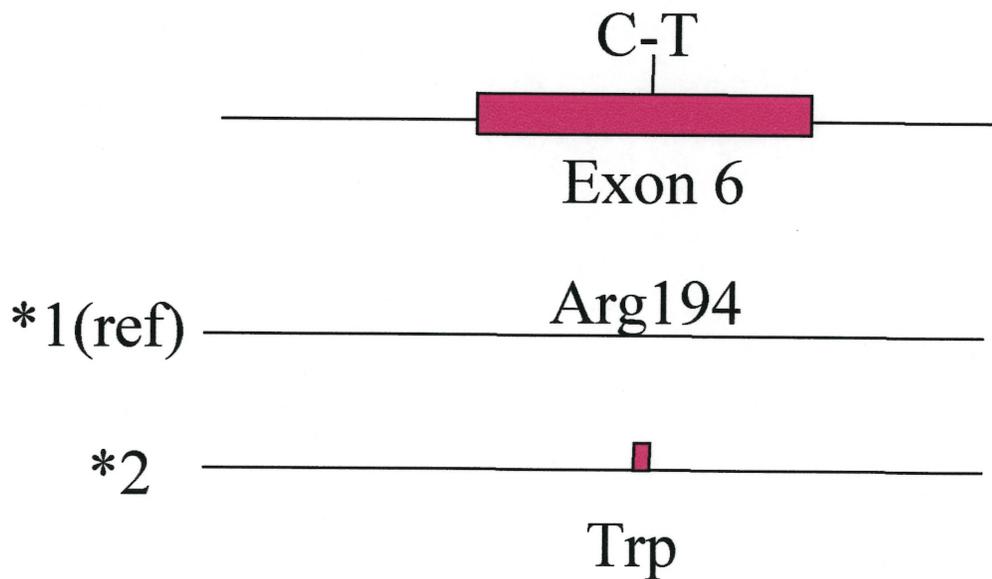
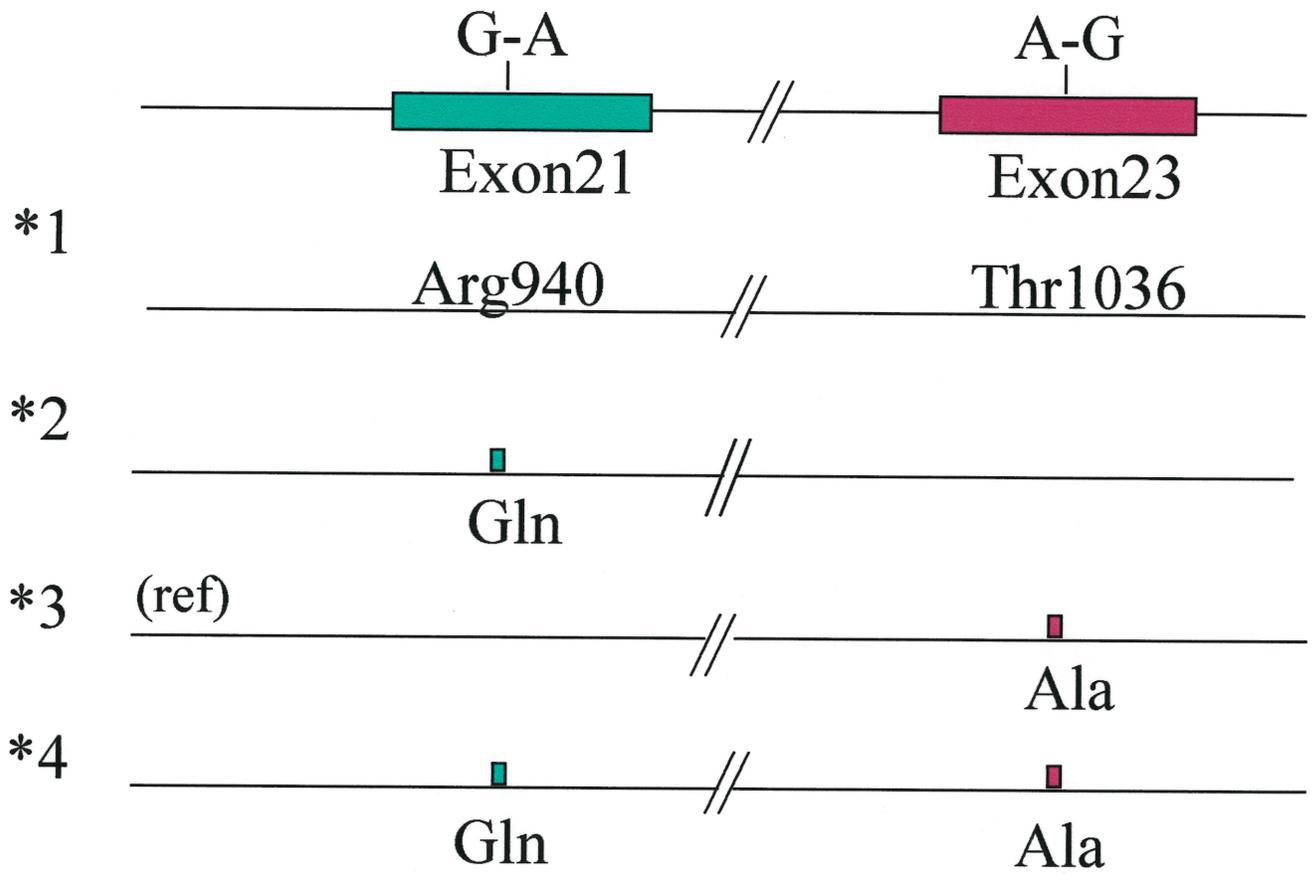
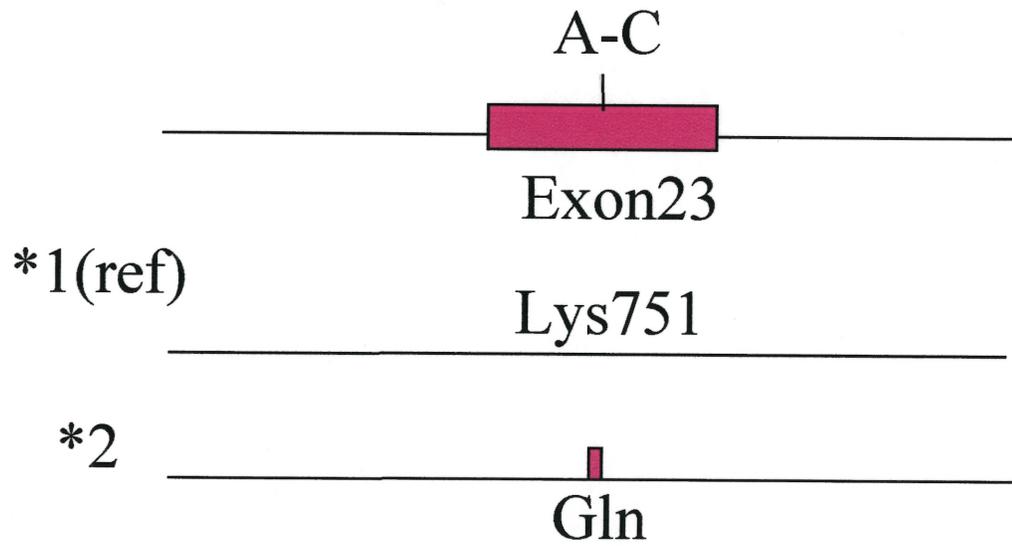
Figure 5: Locus hMLH1**Figure 6: Locus XRCC1**

Figure 7: Locus hMSH3

Ref : référence

Figure 8: Locus XPD

Ref : référence

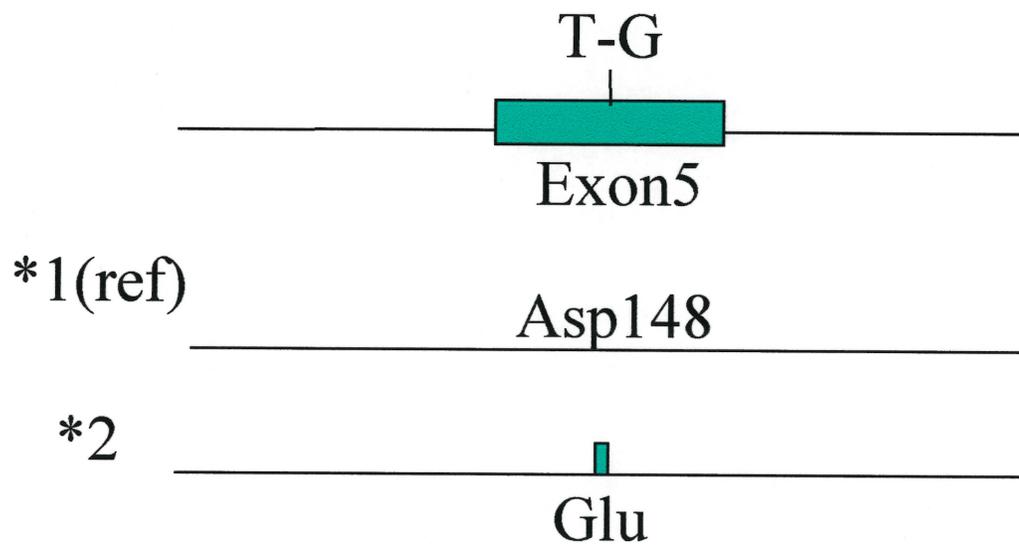
Figure 9: Locus APE

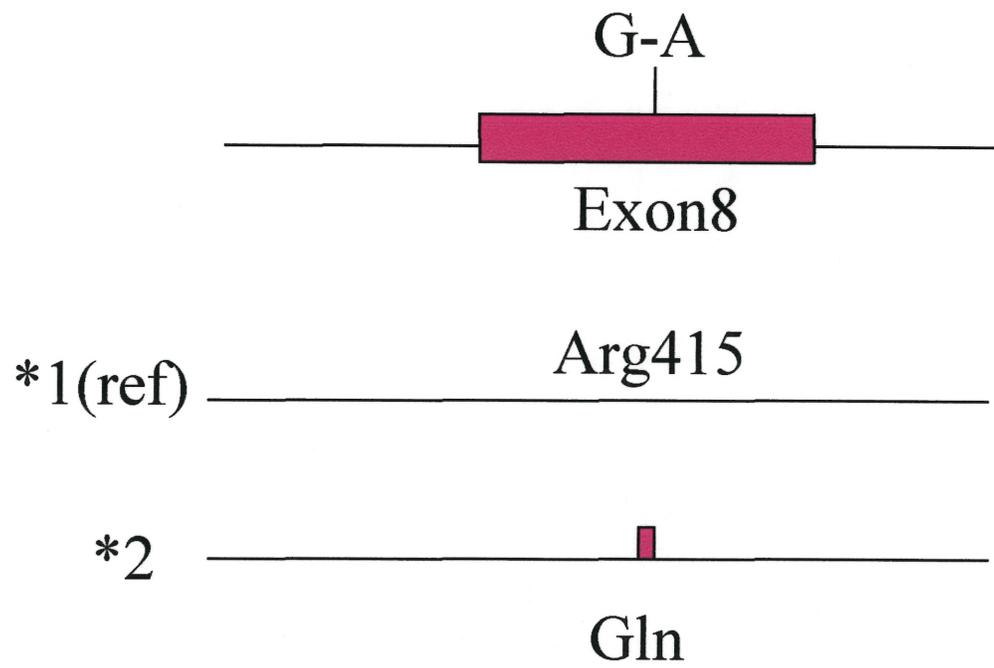
Figure 10: Locus XPF

Figure 11 : Distribution des allèles de hMLH1

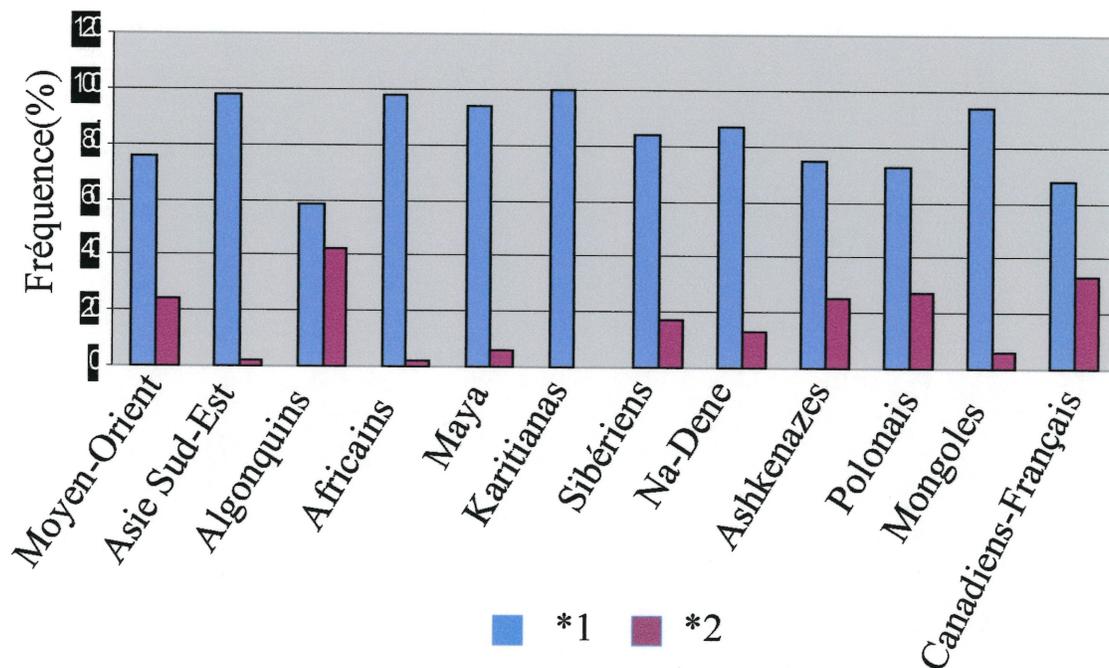


Figure 12 : Distribution des allèles de hMSH3

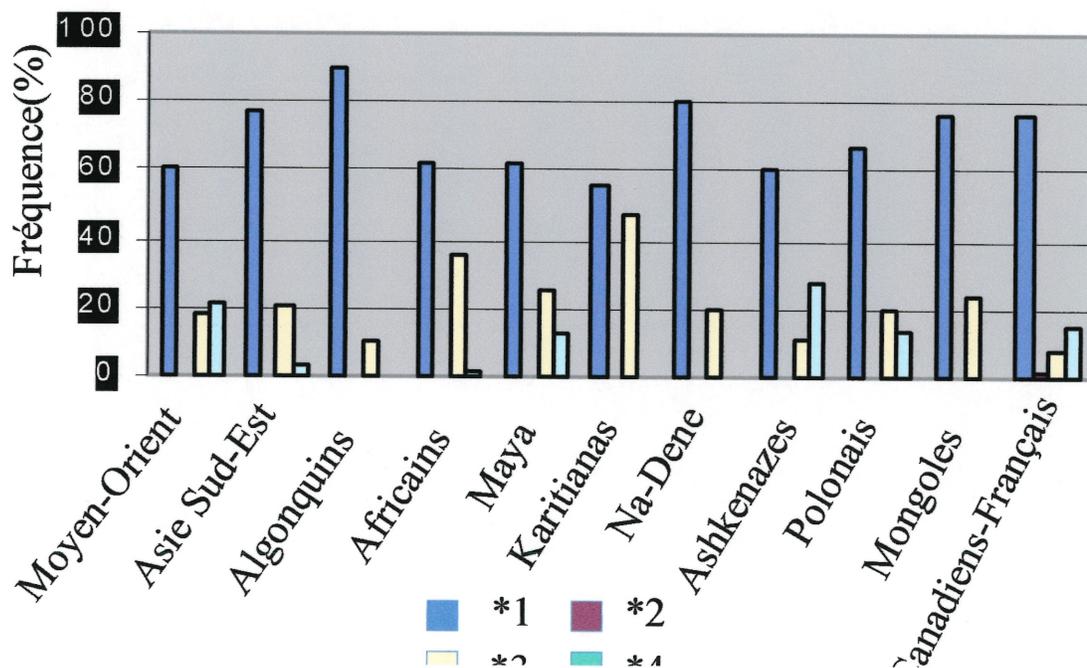


Figure 13 : Distribution des allèles de XRCC1

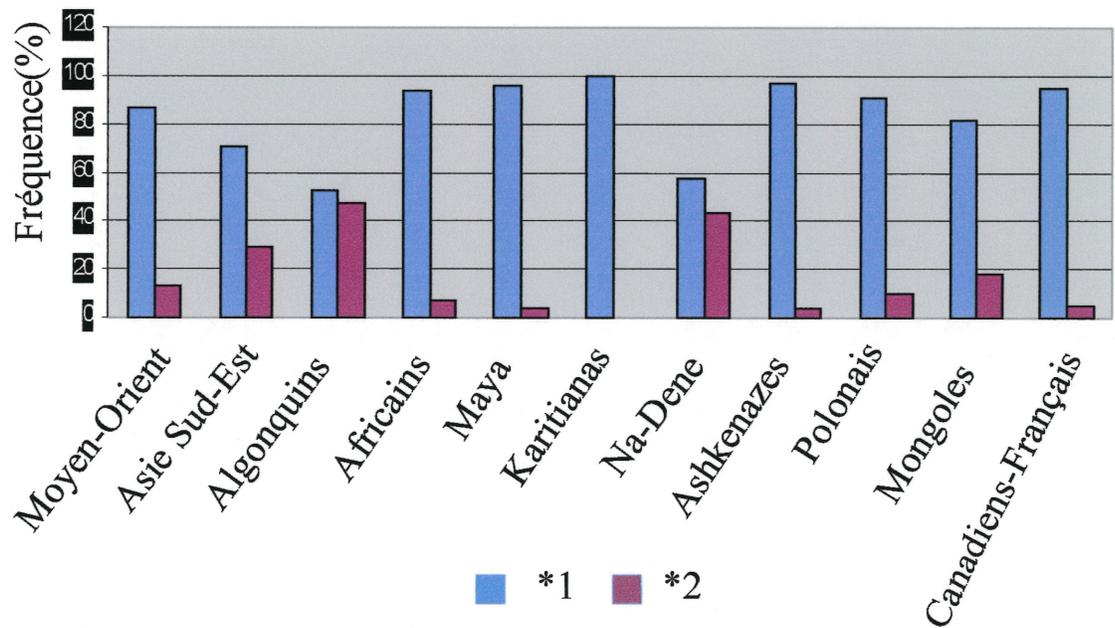


Figure 14 : Distribution des allèles de XPD

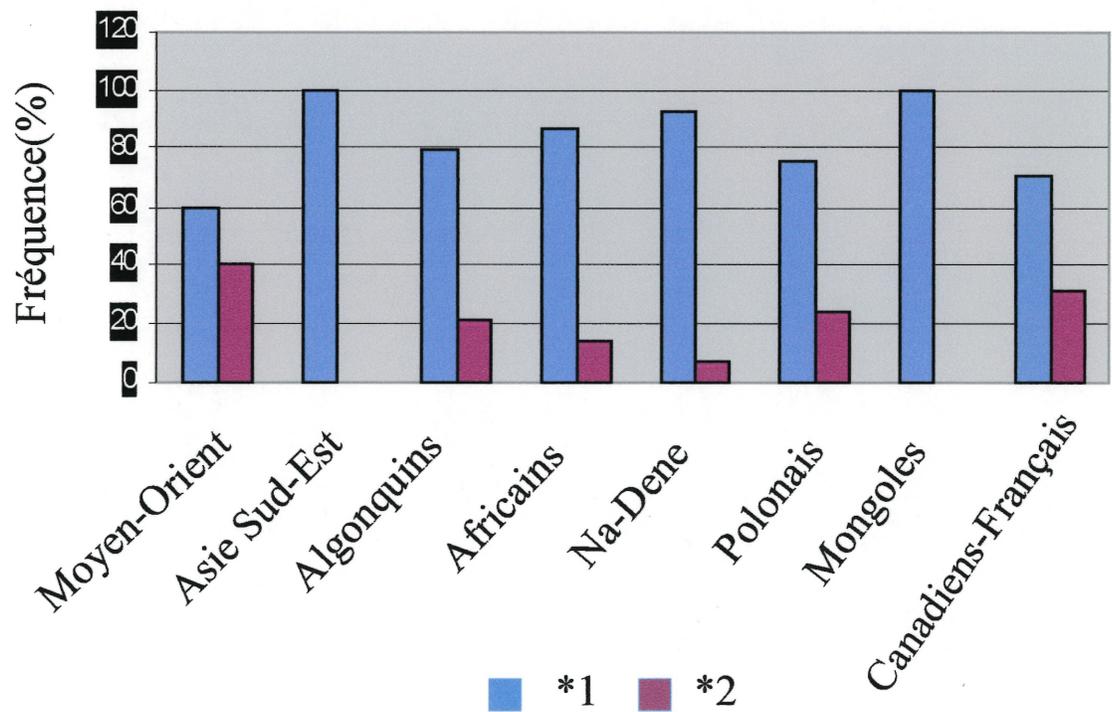


Figure 15 : Distribution des allèles de XPF

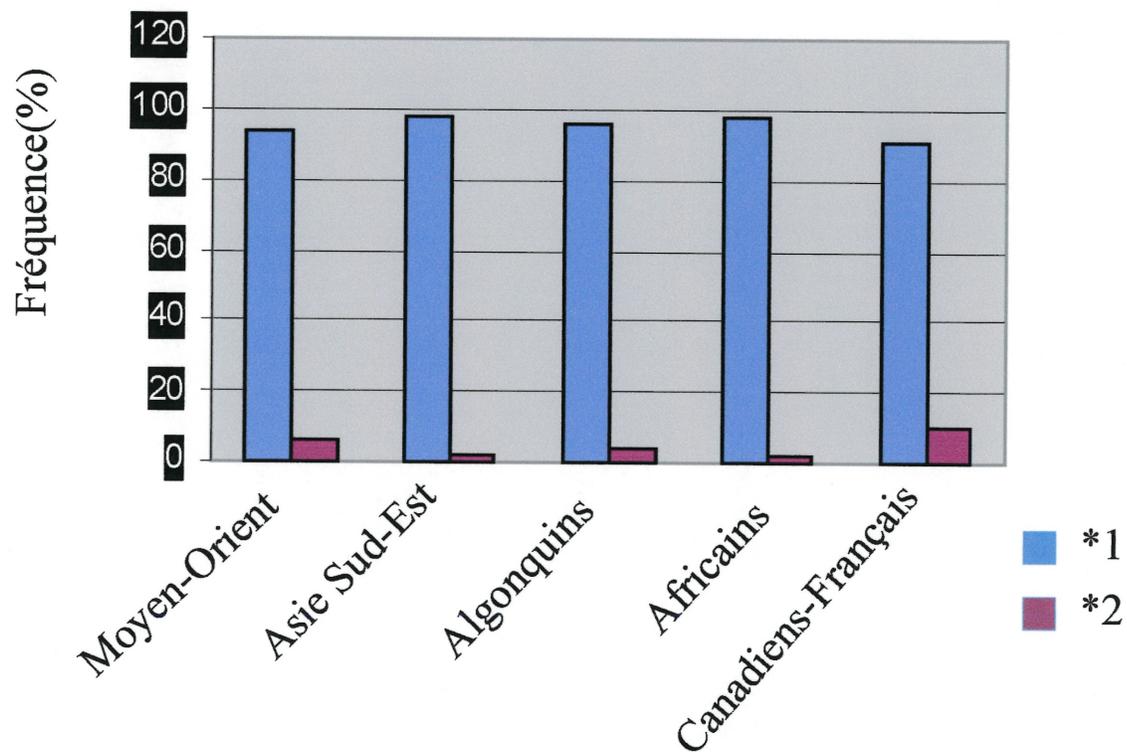


Figure 16 : Distribution des allèles de APE

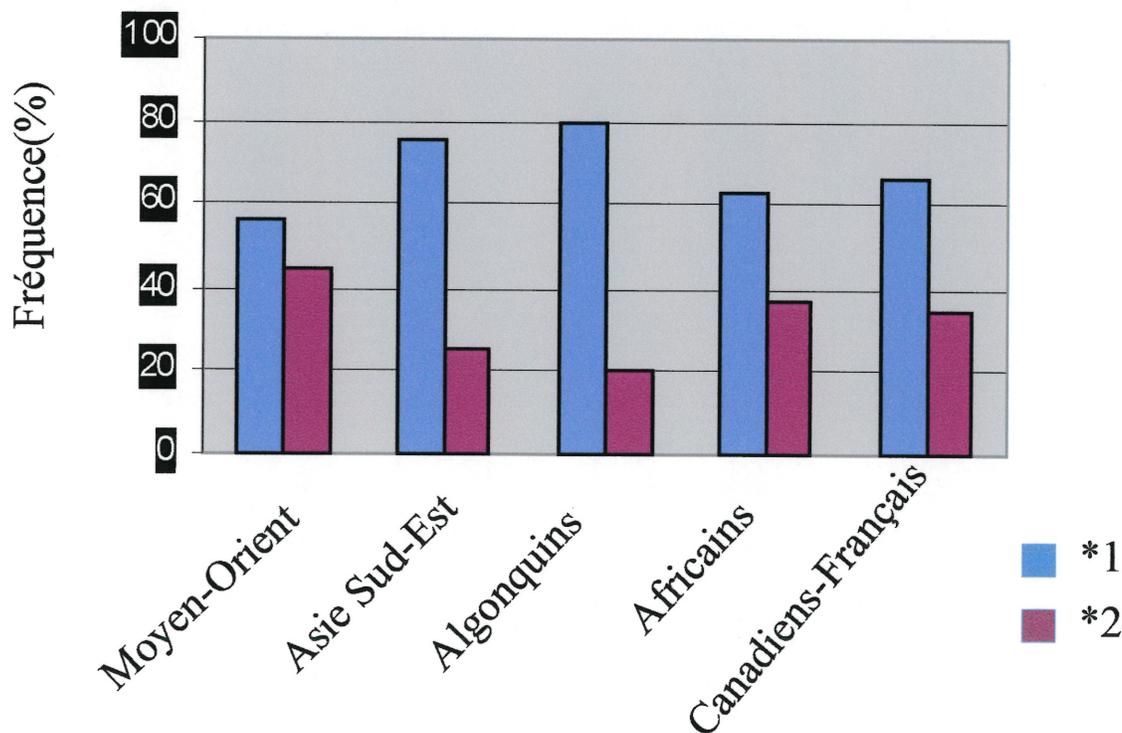


Figure 17 :Distribution des variants dans les gènes de réparation de l'ADN

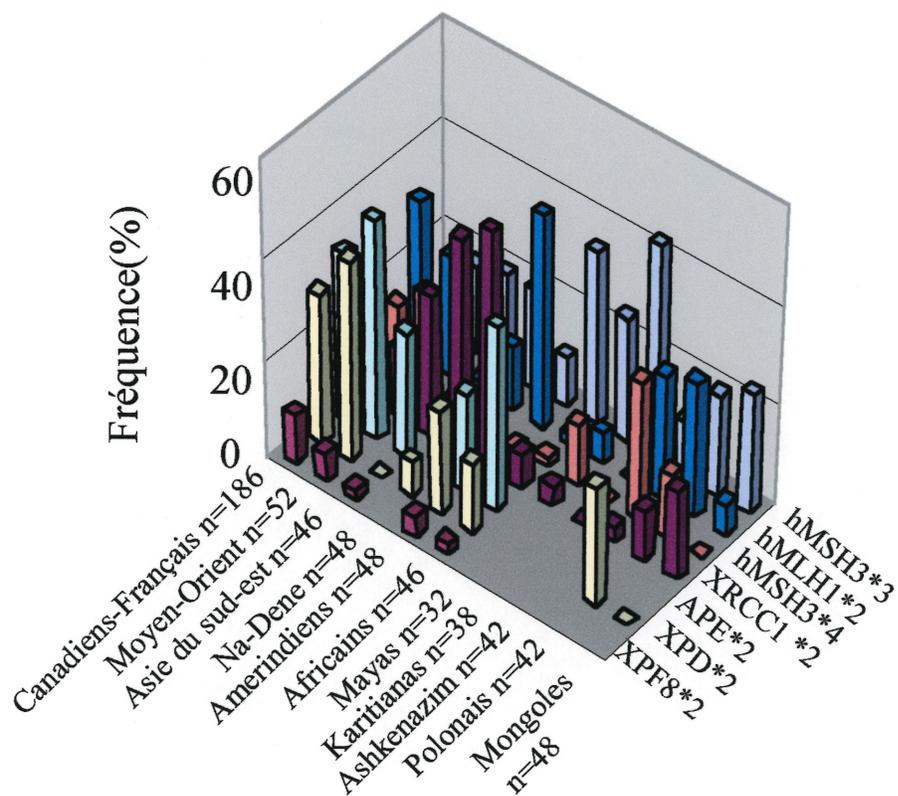


Tableau 8: Séquence des variants étudiés chez les chimpanzés et les souris

Voie de réparation	Gène	Exon	Changement de base	Changement d'acide-aminé	séquence chimpanzé	séquence souris
BER	XRCC1	6	C26304T	Arg194Trp	Arg	Arg
	APE	5	T2197G	Asp148Glu	ND	ND
NER	XPD	23	A35931C	Lys751Gln	Gln	Gln
	XPF	8	G1256A	Arg415Gln	Gln	ND
MMR	hMLH1	8	A676G	Ile219Val	Ile	ND
	hMSH3	21	G2835A	Arg940Gln	Arg	Arg
	hMSH3	23	A3124G	Thr1036Ala	Ala	Asp

ND: non déterminée

3. Étude d'épidémiologie génétique de type cas-contrôle

3.1 Fréquence des variants chez les enfants atteints de LLA (cas) ainsi que chez des individus sains (contrôles), tous d'origine Canadienne-Française.

Les patients (n=180) et les contrôles (n=323) ont été génotypé pour les variants dans les gènes de réparation de l'ADN illustrés aux figures 5 à 10. La fréquence des allèles obtenue est indiquée dans le tableau 9. La fréquence de l'allèle 2 du locus XPD est significativement plus élevée chez les patients *versus* le groupe contrôle. Ce résultat suggère que les porteurs de cet allèle ont un risque augmenté de développer la LLA (OR= 1.4, 95% CI=1.08-1.9) (p=0.015). Des résultats similaires sont obtenus lorsqu'on stratifie les individus selon leur génotype (tableau 10). Le risque relatif pour XPD atteint alors 1.7 (95% CI = 1.15-2.4, p=0.02) chez les porteurs de l'allèle 2. Par contre, nous n'avons observé aucune différence significative dans la fréquence des différents allèles des loci hMLH1, hMSH3, XRCC1, XPF et APE, entre les cas et les contrôle.

3.2 Étude de l'effet combiné avec les variants dans les enzymes du métabolisme de carcinogènes.

Nous avons voulu savoir si les porteurs de certains variants dans les gènes de réparation voient leur risque de LLA augmenter lorsque combinés à des génotypes à risque liés à des enzymes impliquées dans le procédé de carcinogénèse initiée par les xénobiotiques (figure 2). Pour cela nous avons stratifié les individus atteints de LLA et les contrôles en fonction de leur génotype pour les loci de réparation de l'ADN et des enzymes du métabolisme des carcinogènes GSTM1 et CYP1A1. Les génotypes pour ces dernières ont été effectués dans une autre étude effectuée dans notre laboratoire sur le même

groupe cas-contrôles (Krajinovic *et al* 1999) où nous avons montré que les porteurs de la délétion homozygote (génotype nul) dans GSTM1 ou de l'allèle 2A de CYP1A1 ont un risque significativement plus élevé de développer la LLA. Dans cette analyse nous donnons une valeur de OR=1 pour les individus possédant un allèle spécifique des gènes de réparation ainsi que les génotypes à « faible risque », présence de GSTM1 et absence de CYP1A1*2A. Les résultats sont présentés dans les tableaux 11 à 16. En raison des comparaisons multiples effectuées pour ces analyses le seuil de signification n'est plus de $p < 0.05$ mais de $p < 0.003$ (i.e. 0.05 divisé par le nombre de combinaisons effectuées, ici 21 combinaisons). On observe un effet synergique avec les loci hMLH1 (tableau 11) et XPD (tableau 12). En effet, les homozygotes pour l'allèle 1 de hMLH1, porteurs du génotype nul de GSTM1, et de l'allèle CYP1A1*2A, ont un risque relatif de 9.1 (95%CI: 2.6-36.1, $p=0.0002$) par rapport aux autres combinaisons. Dans le cas de XPD, ce sont les porteurs de l'allèle 2, comme on l'a vu précédemment, qui sont plus à risque de développer la LLA. Lorsque les porteurs de cet allèle possèdent aussi les génotypes à risque de GSTM1 et CYP1A1, le risque relatif atteint alors 9.2(95%CI =2.8-30.6, $p=0.0002$). Ce dernier résultat illustre bien la tendance à l'augmentation du risque de LLA en fonction du nombre de génotypes à risque. Aucun autre effet synergique significatif n'est observé avec les autres loci de réparation de l'ADN (tableaux 13-16).

Tableau 9: Distribution des allèles chez les cas et les contrôles

Locus	Allele†	Cas		Contrôles	
		n‡	No‡ (%)	n‡	No‡ (%)
hMLH1	*1	360	254(70.6)	646	441(68.3)
	*2	360	106(29.4)	646	205(31.7)
hMSH3	*1	238	162(68.1)	600	413(68.8)
	*2	238	12(5.0)	600	11(1.8)
	*3	238	33(13.9)	600	86(14.4)
	*4	238	31(13.0)	600	90(15.0)
XRCC1	*1	306	285(93.1)	600	570(95.0)
	*2	306	21(6.9)	600	30(5.0)
XPD	*1	330	221(67.0)	612	456(74.5)
	*2	330	109(33.0)	612	156(25.5)
XPF	*1	320	301(94.0)	558	508(91.0)
	*2	320	19(6.0)	558	50(9.0)
APE	*1	324	194(60.0)	544	328(60.3)
	*2	324	130(40.0)	544	216(39.7)

†Nombre total de chromosomes testés

‡Nombre de chromosomes avec l'allèle donné

† voir figures 5 à 10 pour définitions

Tableau 10: Distribution des génotypes chez les cas et les contrôles

Locus	Génotype	Cas		Contrôles		
		n‡	No§.(%)	n‡	No§.(%)	
hMLH1	*1/*1	180	91(50.6)	323	155(48.0)	
	*1/*2	180	72(40.0)	323	131(40.5)	
	*2/*2	180	17(9.4)	323	37(11.5)	
hMSH3	*1/*1	119	57(47.9)	300	151(50.3)	
	*1/*2	119	3(2.5)	300	4(1.3)	
	*1/*3	119	22(18.5)	300	55(18.3)	
	*1/*4	119	23(19.3)	300	52(17.3)	
	*1/*mut	119	48(40.3)	300	111(37.0)	
	*2/*2	119	2(1.7)	300	1(0.3)	
	*2/*4	119	5(4.2)	300	5(1.7)	
	*3/*3	119	4(3.4)	300	8(2.7)	
	*3/*4	119	3(2.5)	300	15(5.0)	
	*4/*4	119	0(0.0)	300	9(3.0)	
	*mut/*mut	119	14(11.8)	300	38(12.7)	
	XRCC1	*1/*1	153	133(86.9)	300	70(90.0)
		*1/*2	153	19(12.4)	300	30(10.0)
*2/*2		153	1(0.7)	300	0(0.0)	
XPD	*1/*1	165	75(45.5)	306	178(58.2)	
	*1/*2	165	71(43.0)	306	100(32.7)	
	*2/*2	165	19(11.5)	306	28(9.1)	
XPF	*1/*1	160	141(88.1)	279	232(83.1)	
	*1/*2	160	19(11.9)	279	44(15.8)	
	*2/*2	160	0(0.0)	279	3(1.1)	
APE	*1/*1	162	66(40.7)	272	116(42.6)	
	*1/*2	162	62(38.3)	272	96(35.3)	
	*2/*2	162	34(21.0)	272	60(22.1)	

‡ nombre total d'individus testés.§ nombre d'individus avec un génotype donné
Mut : ensemble des allèles *2, *3 et *4.

Tableau 11: Effets combinés des génotypes de hMLH1, CYP1A1 et GSTM1 sur le risque de LLA

Génotype à risque	hMLH1*2	GSTM1‡	CYP1A1*2A	Cas n=135	Contrôles n=276	OR(95%CI)
Aucun	-/+, +/+	Présent	-/-	20	61	1(référence)
Un	-/-	Présent	-/-	19	58	1(0.5-2.1)
	-/+, +/+	Présent	-/+, +/+	6	11	1.6(0.5-5.1)
Deux	-/+, +/+	Nul	-/-	38	69	1.7(0.9-3.2)
	-/-	Nul	-/-	31	55	1.7(0.9-3.4)
	-/-	Présent	-/+, +/+	3	7	1.3(0.3-5.5)
	-/+, +/+	Nul	-/+, +/+	6	11	1.7(0.6-5.1)
Trois	-/-	Nul	-/+, +/+	12	4	9.1(2.6-31.6)†

Abréviations : OR, odds ratio;CI, intervalle de confiance.

‡Nul, délétion homozygote.

†p=.0002.

n= nombre d'individus

Tableau 12: Effets combinés des génotypes de XPD, CYP1A1 et GSTM1 sur le risque de LLA.

Génotype à risque	XPD*2	GSTM1‡	CYP1A1*2A	Cas n=132	Contrôles n=253	OR(95%CI)
Aucun	-/-	Présent	-/-	15	63	1(référence)
Un	-/-	Présent	-/+, +/+	4	7	2.4(0.6-9.3)
	-/-	Nul	-/-	34	67	2.1(1.1-4.3)
Deux	-/+, +/+	Présent	-/-	24	44	2.3(1.1-4.8)
	-/+, +/+	Présent	-/+, +/+	5	10	2.1(0.6-7.1)
	-/-	Nul	-/+, +/+	6	8	3.1(0.9-10.4)
	-/+, +/+	Nul	-/-	33	49	2.8(1.4-5.8)
Trois	-/+, +/+	Nul	-/+, +/+	11	5	9.2(2.8-30.6)†

Abréviations : OR, odds ratio;CI, intervalle de confiance.

‡Nul, délétion homozygote.

†p=.0002.

n= nombre d'individus

Tableau 13: Effets combinés des génotypes de hMSH3, CYP1A1 et GSTM1 sur le risque de LLA

Génotype à risque	hMSH3§	GSTM1‡	CYP1A1*2A	Cas n=68	Contrôles n=164	OR(95%CI)
Aucun	*1/mut,mut/mut	Présent	-/-	14	34	1(référence)
Un	*1/*1	Présent	-/-	4	4	0.7(0.27-1.8)
	*1/mut,mut/mut	Nul	-/-	15	39	0.9(0.39-2.2)
Deux	*1/mut,mut/mut	Présent	-/+, +/+	3	5	2.4(0.5-11.1)
	*1/*1	Présent	-/+, +/+	10	34	0.6(0.1-5.9)
	*1/*1	Nul	-/-	1	4	0.7(0.3-1.9)
Trois	*1/mut,mut/mut	Nul	-/+, +/+	13	40	1.4(0.3-6.9)
	*1/*1	Nul	-/+, +/+	8	4	4.9(1.2-18.7)†

Abréviations : OR, odds ratio;CI, intervalle de confiance.

§*1/*1, homozygotes pour l'allèle 1; *1/mut, heterozygotes; mut/mut, non porteurs de l'allèle 1 de référence

‡ Nul, délétion homozygote.

†P=.02.

n= nombre d'individus

Tableau 14: Effets combinés des génotypes de XRCC1, CYP1A1 et GSTM1 sur le risque de LLA

Génotype à risque	XRCC1*2	GSTM1‡	CYP1A1*2A	Cas n=114	Contrôles n=255	OR(95%CI)
Aucun	-/+, +/+	Présent	-/-	7	10	1(référence)
Un	-/-	Présent	-/-	27	101	NS
	-/+, +/+	Présent	-/+, +/+	3	1	NS
	-/+, +/+	Nul	-/-	6	12	NS
Deux	-/-	Nul	-/-	50	102	NS
	-/-	Présent	-/+, +/+	5	15	NS
Trois	-/+, +/+	Nul	-/+, +/+	1	2	NS
	-/-	Nul	-/+, +/+	15	12	NS

Abréviations : OR, odds ratio;CI, intervalle de confiance.

‡ Nul, délétion homozygote.

n= nombre d'individus

NS, non significatif

Tableau 15: Effets combinés des génotypes de APE, CYP1A1 et GSTM1 sur le risque de LLA

Génotype à risque	APE*2	GSTM1‡	CYP1A1*2A	Cas	Contrôles	OR(95%CI)
				n=103	n=171	
Aucun	-/+, +/+	Présent	-/-	15	37	1(référence)
Un	-/-	Présent	-/-	15	37	1(0.4-2.3)
	-/+, +/+	Présent	-/+, +/+	3	8	0.9(0.2-3.9)
Deux	-/+, +/+	Nul	-/-	33	43	1.9(0.9-4.1)
	-/-	Nul	-/-	20	28	1.7(0.8-4.1)
	-/-	Présent	-/+, +/+	3	7	1.1(0.2-4.6)
Trois	-/+, +/+	Nul	-/+, +/+	7	7	2.4(0.7-8.3)
	-/-	Nul	-/+, +/+	7	4	4.3(1.1-16.9)†

Abréviations : OR, odds ratio;CI, intervalle de confiance.

‡Nul, délétion homozygote.

† $p=0.04$ n= nombre d'individus

Tableau 16: Effets combinés des génotypes de XPF, CYP1A1 et GSTM1 sur le risque de LLA

Génotype à risque	XPF*2	GSTM1‡	CYP1A1*2A	Cas	Contrôles	OR(95%CI)
				n=103	n=171	
Aucun	-/+, +/+	Présent	-/-	6	17	1(référence)
Un	-/-	Présent	-/-	31	82	NS
	-/+, +/+	Présent	-/+, +/+	1	5	NS
Deux	-/+, +/+	Nul	-/-	7	18	NS
	-/-	Nul	-/-	48	89	NS
	-/-	Présent	-/+, +/+	5	10	NS
Trois	-/+, +/+	Nul	-/+, +/+	2	1	NS
	-/-	Nul	-/+, +/+	14	13	NS

Abréviations : OR, odds ratio;CI, intervalle de confiance.

‡Nul, délétion homozygote.

n= nombre d'individus

NS, non significatif

4. Impact des génotypes pour les gènes de réparation de l'ADN sur la réponse thérapeutique.

Les caractéristiques des patients leucémiques en fonction des facteurs de pronostic, sont regroupées dans le tableau 17. Les facteurs de pronostic sont présentés séparément dans la partie supérieure du tableau, alors que le risque défini par les cliniciens pour des fins thérapeutiques, est indiqué dans la dernière rangée du tableau et prend en compte tous les autres facteurs. Il est clair que le groupe de risque a le plus grand pouvoir de prédiction. Nous avons voulu savoir si le fait d'être porteur d'un des variants dans les gènes de réparation de l'ADN influençait la survie des patients atteints de LLA. Pour cela, nous avons stratifié les patients en fonction de leur génotype pour chacun des variants et déterminé s'il y avait une différence dans la fréquence des événements de décès et de rechute chez les porteurs vs les non-porteurs. Nous n'avons observé aucune différence dans la fréquence de ces événements entre les porteurs et les non-porteurs des variants de hMSH3, XPD, XPF, XRCC1 et APE. Par contre, une différence presque significative après ajustement pour les autres facteurs de pronostic (Cox, OR=2.2, 95% CI=0.9-5.2) a été observée chez les patients homozygotes pour l'allèle 1 de hMLH1 versus les hétérozygotes et les homozygotes pour l'allèle 2 (figure 18). Cette différence est significative chez les filles seulement (Kaplan Meyer p=0.013) mais disparaît après ajustement avec la régression de Cox (p=0.1), de même que dans le groupe de patients ayant un immunophénotype pré-B (Kaplan Meyer p=0.01; Cox p=0.08). Par contre, lorsqu'on regarde les patients dont l'indice d'ADN inférieur à 1.16 (figure 19), on observe une différence significative conservée même après ajustement (Cox, OR=2.5 95%CI=1.2-5.4) entre les homozygotes pour l'allèle 1 de hMLH1 et les porteurs de l'allèle 2.

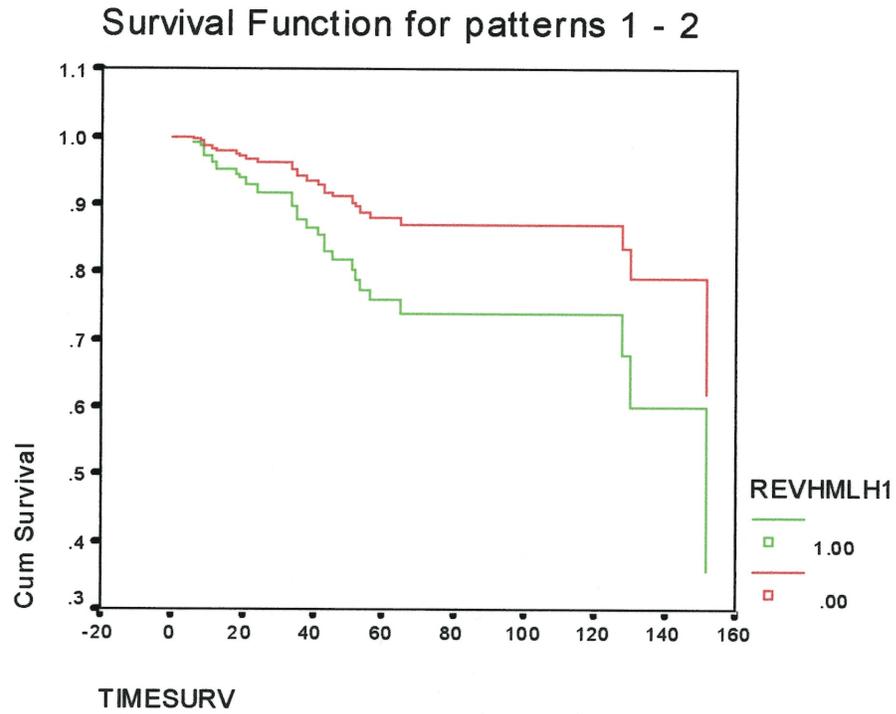
Tableau 17: Valeur prédictive des facteurs de pronostique.

	No de patients (%)		p
	Rechute(n=54)	non-rechute(n=202)	
Sexe			
Filles	14(25.9)	96 (47.5)	0.005
Garçons	40(74.1)	106 (52.5)	
Age			
<1	2(3.7)	4(62.0)	0.7
1 à 10	43(79.6)	158(78.2)	
>10	9(16.7)	40(19.8)	
CGB (10³/ul)			
<50	40(80)	163(82.7)	0.7
>50	10(20)	34(17.3)	
Phénotype†			
B	40(88.9)	159(87.8)	0.5
T	5(11.1)	22(12.2)	
Indice d'ADN			
<1.16	26(78.8)	109(81.3)	0.8
>1.16	7(21.2)	35(18.7)	
Risque			
Standard	14(29.8)	73(38.6)	<0.001
Élevé	20(42.6)	111(58.7)	
Très élevé	13(27.7)	5(2.6)	

†B : pré-B, B matures et pré-pré B ; T : pré T.

CGB : compte de globules blancs.

Figure 18: Courbe de survie des patients LLA selon leur génotype pour hMLH1



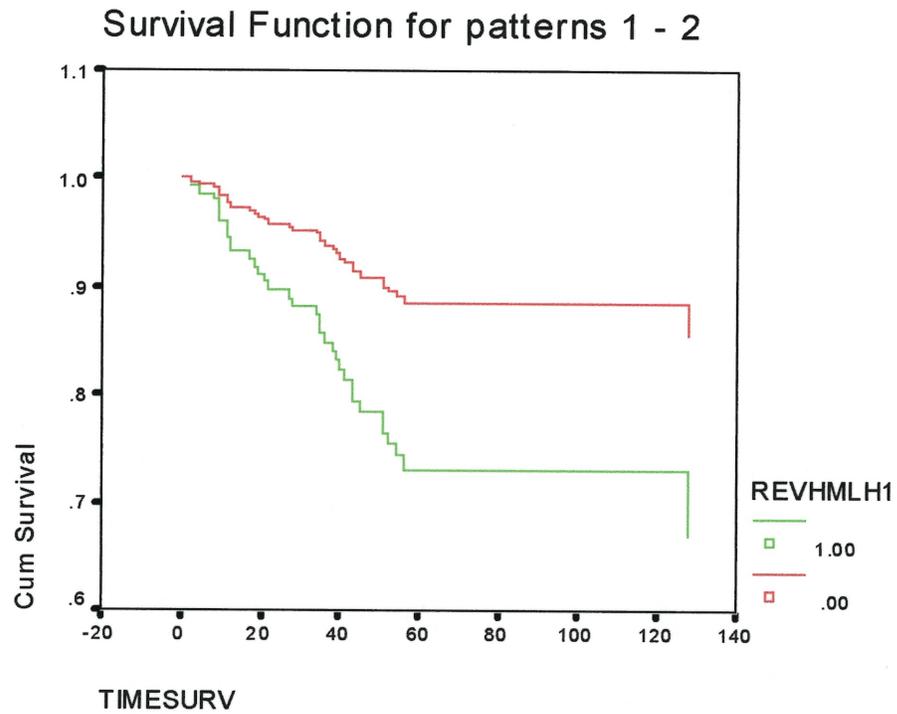
OR=2.17, 95%CI=0.9-5.2

1=homozygotes pour l'allèle 1

0=hétérozygotes et homozygotes pour l'allèle 2

Temps de survie en mois

Figure 19 : Courbe de survie des patients LLA ayant un indice d'ADN <1.16 selon leur génotype pour hMLH1



OR=2.55, 95%CI=1.2-5.4

1=homozygotes pour l'allèle 1

0=hétérozygotes et homozygotes pour l'allèle 2

Temps de survie en mois

DISCUSSION

Le génotypage des individus des différents groupes continentaux montre que la fréquence des différents variants dans les gènes de réparation de l'ADN hMLH1, hMSH3, XRCC1, XPD, XPF et APE chez les Canadiens-Français montre que cette population est similaire à d'autres populations européennes. Ces observations indiquent que l'effet fondateur qui a touché cette population n'a pas influencé la fréquence de ces variants.

La grande variabilité observée entre les différents groupes continentaux dans la fréquence des allèles de hMLH1, hMSH3, XPD et XRCC1, est illustrée dans les figures 20 à 23. Ces résultats suggèrent que ces variants seraient fonctionnels. En effet, les variants communs neutres ont généralement une fréquence semblable dans différents groupes (Zietkiewicz *et al.*, 1997), comme on l'observe ici avec les variants dans XPF (figure 24) et APE (figure 25). D'autres groupes (Wu *et al.*, 1999, Escobar *et al.*, 1999) ont aussi montré que la fréquence du variant dans XPD est différente entre plusieurs groupes ethniques (Caucasiens, Africains-Américains et Mexicains-Américains).

La différence dans la fréquence de l'allèle 2 de hMLH1 entre les populations situées au nord et au sud de l'équateur (figure 20), suggère l'effet d'une pression sélective et appuie l'idée de fonctionnalité de ce variant. Cette pression sélective pourrait être due à une exposition différente à divers facteurs environnementaux (nourriture, ensoleillement, pollution...).

L'allèle 2 de hMSH3 n'est observé que dans la population Canadienne-Française, peut-être parce que le nombre d'individus génotypés est plus important que dans les autres groupes. La faible fréquence de l'allèle 2 pourrait s'expliquer par son apparition très récente, ou par son absence d'avantage sélectif. A l'opposé, le génotypage des chimpanzés suggère que l'allèle 3 serait l'allèle ancestral. L'allèle 4 serait apparu plus tard, probablement en Europe comme l'indique la figure 21.

Figure 20 : Distribution des allèles de hMLH1 dans le monde

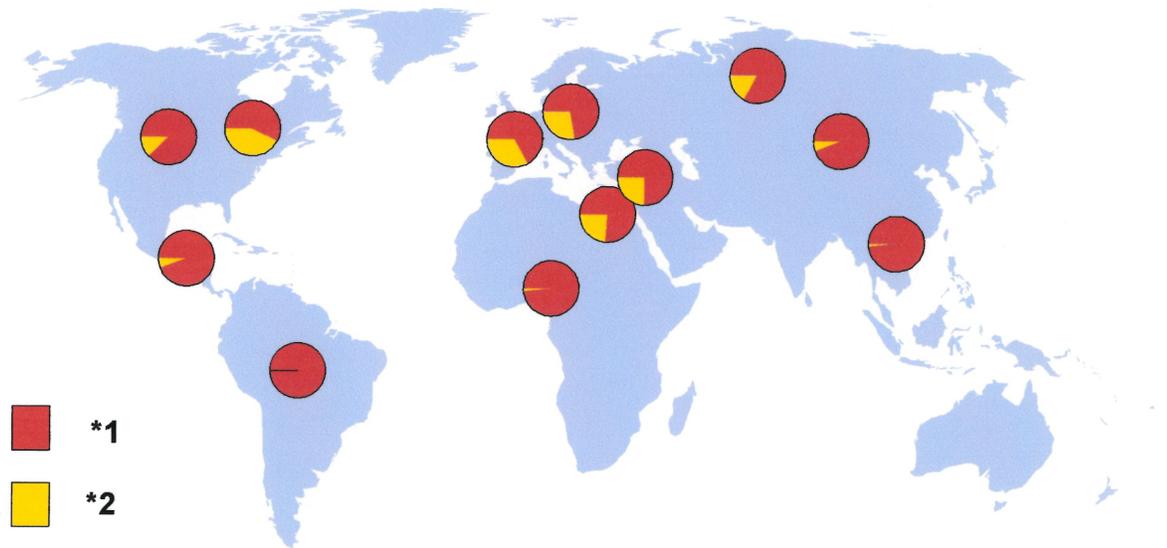


Figure 21 : Distribution des allèles de hMSH3 dans le monde

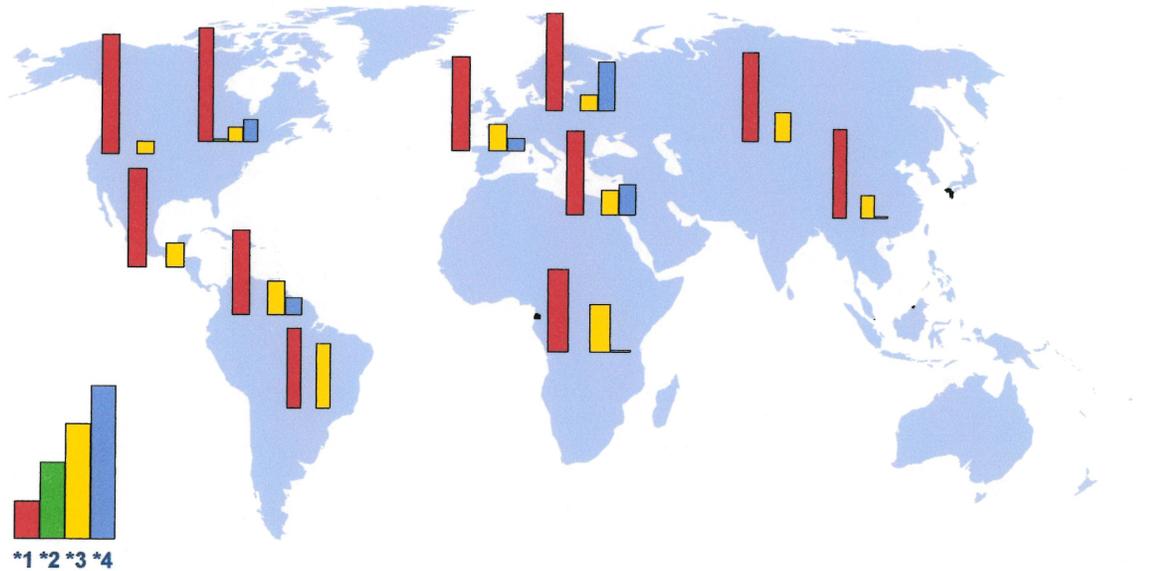


Figure 22 : Distribution des allèles de XRCC1 dans le monde

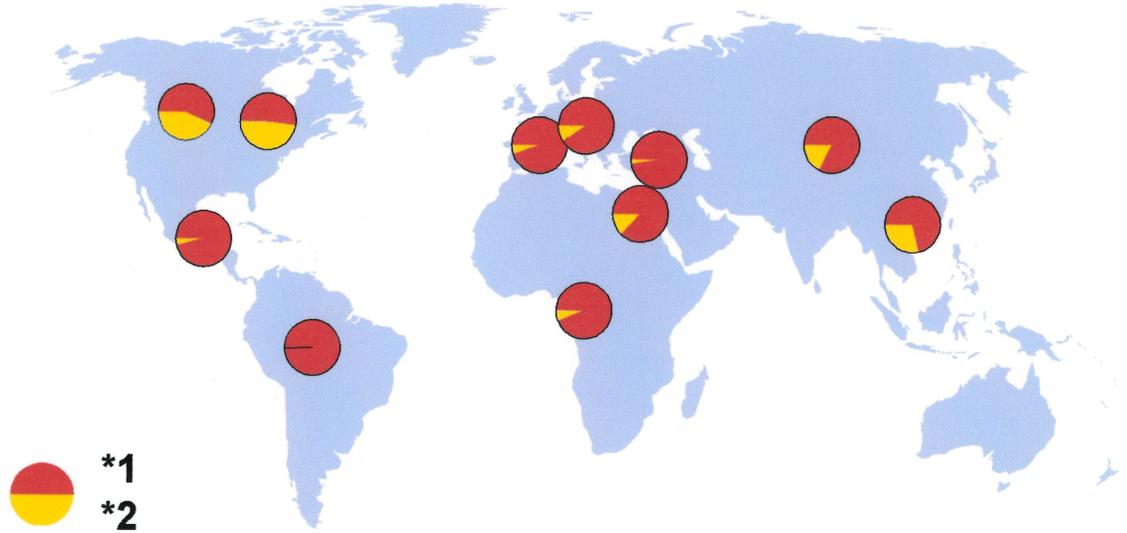


Figure 23: Distribution des allèles de XPD dans le monde

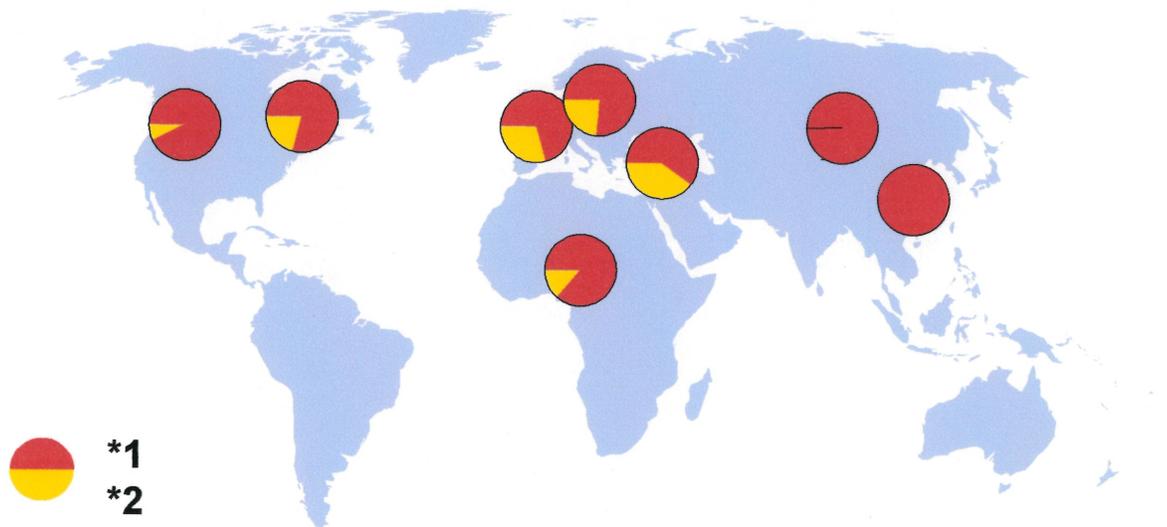


Figure 24 : Distribution des allèles de XPF dans le monde

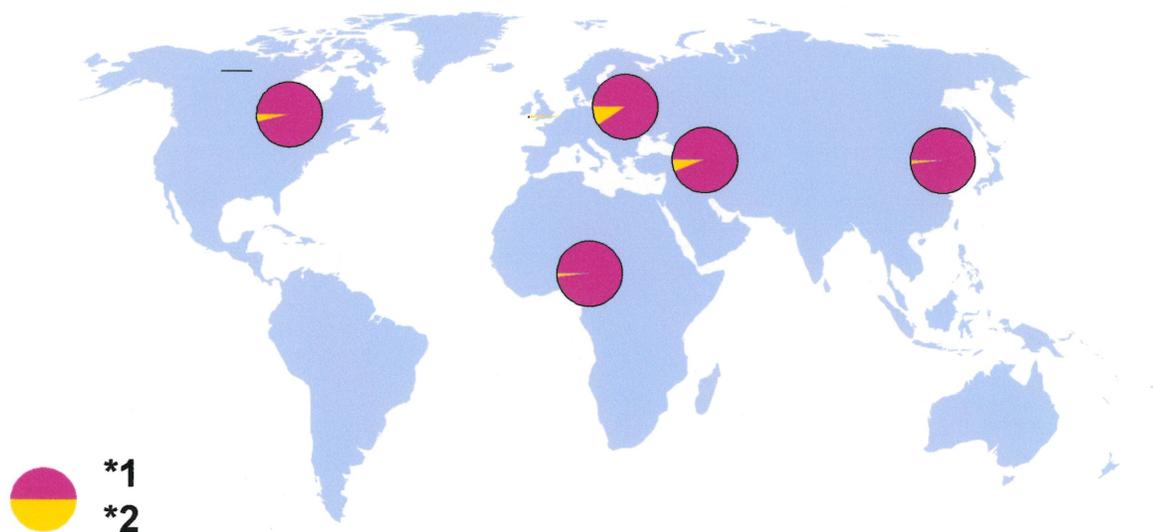
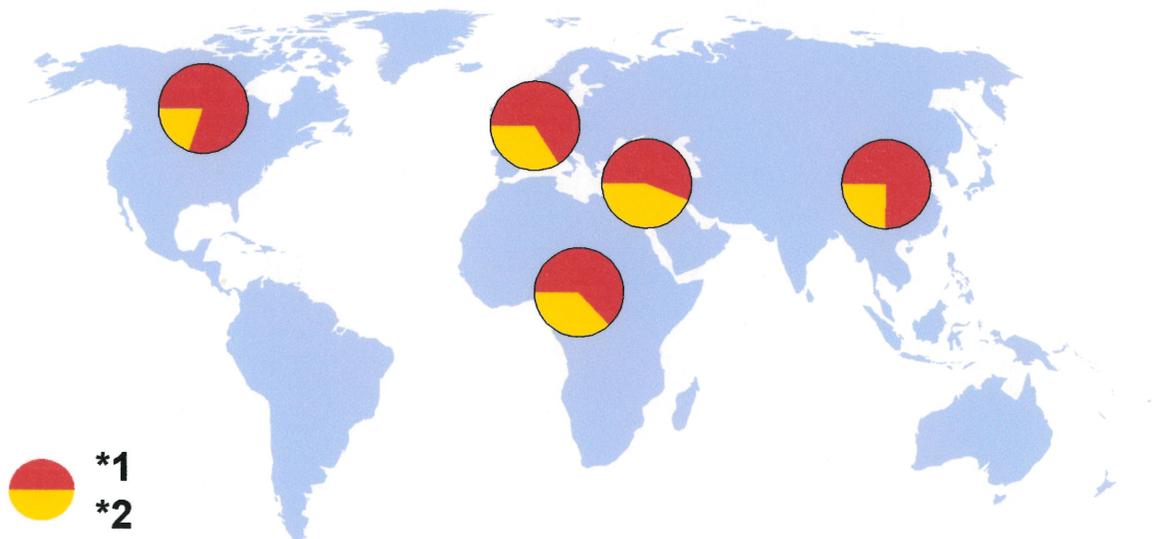


Figure 25: Distribution des allèles de APE dans le monde



Le génotypage des trois chimpanzés a permis de montrer que les allèles 1 de hMLH1 et XRCC1 sont les allèles ancestraux alors que ce sont les allèles 2 pour les gènes XPD et XPF. L'allèle le plus fréquent chez l'homme n'est donc pas forcément l'allèle ancestral, comme c'est le cas pour les gènes XPD et XPF. Chez ces derniers, l'apparition de l'allèle 1 au cours de l'évolution a dû conférer un avantage sélectif aux individus porteurs, permettant à cet allèle de perdurer de génération en génération en augmentant ainsi sa fréquence dans la population générale. L'impossibilité d'amplifier la région du locus APE chez le chimpanzé est peut-être due à une différence trop importante dans la séquence de l'ADN empêchant un des oligonucléotides de s'y fixer.

Nous venons de voir que les polymorphismes étudiés ici sont des variants communs distribués différemment à travers les groupes continentaux. De plus il s'agit d'un changement non conservatif d'un acide aminé conservé dans l'évolution. Ces observations sont de bons arguments quant à la fonctionnalité de ces variants. Nous proposons donc qu'il est possible de faire de la génomique fonctionnelle à l'aide d'études d'épidémiologie génétique. Ce projet offre beaucoup de possibilités avec les données générées par le projet génome où peu d'informations concernant le caractère fonctionnel sont disponibles. Nous avons testé ce concept dans une étude cas-contrôle. Nous avons démontré que l'allèle 2 du gène XPD augmente le risque de LLA chez les porteurs (OR=1.4, 95%CI=1.08-1.9). D'autres groupes ont aussi montré une augmentation significative du risque de cancer du poumon chez les porteurs de ce même variant (Wu *et al.*, 1999, Escobar *et al.*, 1999). L'allèle 2 de XPD semblerait donc modifier la fonction de la protéine XPD synthétisée et rendre la réparation de l'ADN par excision de nucléotides moins efficace. Les dommages à l'ADN persisteraient et s'accumuleraient, favorisant alors l'apparition d'un cancer. Néanmoins, un groupe a montré des résultats inverses chez des individus avec ou sans carcinome de cellules basales (BCC) (Dybdahl *et al.*,

1999). Dans cette étude, l'allèle 2 semble protéger les porteurs de ce type de cancer. Cependant, les groupes d'individus étudiés étant faibles, un plus grand nombre serait nécessaire pour obtenir un résultat plus fiable. D'autres études sont donc nécessaires pour déterminer l'impact exact de ce variant sur la fonction de la protéine XPD et son rôle dans la carcinogénèse.

Aucune différence significative n'a été observée entre le groupe de patients leucémiques et le groupe de contrôles dans la fréquence des variants dans les gènes hMLH1, hMSH3, XPF, XRCC1 et APE lorsque analysés seuls. Ces variants ne semblent pas jouer un rôle important dans l'étiologie de la LLA de l'enfant.

Néanmoins, la stratification des individus porteurs de l'un des variants dans ces gènes de réparation de l'ADN et des génotypes à risque de CYP1A1 et GSTM1, fait apparaître l'effet de l'allèle 2 de hMLH1 qui semble alors protéger les porteurs contre la LLA. L'allèle 2 de hMLH1 augmenterait l'activité de l'enzyme hMLH1 ou son affinité avec hPMS2, et donc l'efficacité de la réparation de mésappariements. Cette stratification permet aussi d'amplifier l'effet observé précédemment avec le variant dans le gène XPD. Un effet synergique est là aussi obtenu chez les porteurs des trois génotypes à risque.

La régression logistique montre qu'il n'y a pas d'interaction gène-gène c'est à dire que les effets observés pour les loci XPD et hMLH1 sont uniquement synergiques. Ces effets synergiques chez les porteurs des trois génotypes à risque montre que l'étiologie de la LLA ne peut s'expliquer par la variabilité à un seul locus et nécessite des modifications fonctionnelles des enzymes ou facteurs impliquées dans diverses voies métaboliques comme la biotransformation des xénobiotiques et la réparation de l'AND (figure 2).

Les médicaments sont aussi des composés qui sollicitent ces voies métaboliques. La chimiothérapie a pour but de causer des lésions à l'ADN qui sont ensuite reconnus par la machinerie de réparation de l'ADN qui envoie alors un signal

d'apoptose. Nous avons donc voulu déterminer si une capacité modifiée de réparer l'ADN pouvait influencer la réponse thérapeutique. Nous avons observé une différence chez les porteurs de l'allèle 1 de hMLH1 dans la survie des patients atteints de LLA. Le fait d'être homozygote pour l'allèle 1 augmenterait les risques de rechute et de décès d'individus atteints de LLA. L'allèle 1 serait moins efficace que l'allèle 2 dans la réparation de l'ADN par la protéine hMLH1, comme nous l'avons expliqué précédemment, jouant ainsi un rôle dans la réponse au traitement. Ce résultat appuie notre argument sur la fonctionnalité de ce variant. De plus, certaines études ont montré que les cellules tumorales déficientes en MMR sont résistantes à certains agents chimiothérapeutiques comme le 6-TG (Glaab *et al*, 1998) ou le cisplatine (Aebi *et al*, 1996), confirmant le rôle important de la réparation de l'ADN dans la réponse au traitement. Il serait intéressant de vérifier si les polymorphismes étudiés ici modifient effectivement la réponse au traitement et la sensibilité à certaines drogues anti-cancer comme le 6-TG ou le cisplatine.

Une différence significative a été observée même après ajustement par la régression de Cox, entre les porteurs de l'allèle hMLH1*2 et les non porteurs dans le groupe de patients ayant un indice d'ADN <1.16. Il est connu que les patients ayant une hypodiploïdie ont un taux de survie sans rechute ni décès très faible. On peut penser que le nombre d'individus ayant une hypodiploïdie dans ce groupe serait plus important parmi les individus homozygotes pour l'allèle 1. La stratification des patients aurait donc sélectionné un plus grand nombre d'individus atteints d'hypodiploïdie chez les homozygotes pour l'allèle 1 créant l'effet observé. De plus, il a récemment été montré qu'une déficience dans la voie de réparation des mésappariement pouvait affecter la ségrégation des chromosomes pendant la méiose chez l'humain (Martin *et al.*, 2000).

Par ailleurs, la régression de Cox corrige le biais de sélection des patients qui a créé une différence dans la survie des patients appartenant au groupe d'immunophénotype pré-B.

Nous avons observé que les filles atteintes de LLA et homozygotes pour l'allèle 1 de hMLH1 avaient tendance à avoir une moins bonne survie que les autres. Il est difficile d'expliquer pourquoi une tendance significative est observée chez les filles alors qu'elle ne l'est pas chez les garçons. Les patients leucémiques étant pour la plupart des enfants pré pubères, le facteur hormonal ne semble pas jouer un rôle dans ce phénomène. Il est connu que le nombre de filles atteintes de LLA est moins important que le nombre de garçons, ce qui est aussi le cas dans notre étude (110 filles pour 146 garçons). Ce nombre plus faible peut être une des raisons expliquant l'effet observé chez les filles qui disparaît après ajustement.

D'autre part, aucune différence n'a été observé dans la survie des patients porteurs ou non des variants dans les gènes hMSH3, XPD, XPF, XRCC1 et APE suggérant que ces variants n'affectent pas la réponse au traitement de la LLA.

Finalement, il faut noter que ces données s'inscrivent dans le cadre d'un projet pilote. Il faut donc prendre en considération les limites de notre étude : 1) la taille des échantillons, 2) le nombre de gènes étudiés, 3) le biais de population, 4) le biais de sélection des patients. Plusieurs de ces paramètres ont été pris en compte dans ce projet. Afin de minimiser le problème d'hétérogénéité génétique génique, nous avons concentré nos efforts sur les Canadiens-Français, tout en prenant soin d'avoir démontré que les résultats pouvaient être extrapolés à d'autres populations. Pour éviter un biais de survie, nous n'avons étudié que les cas incidents plutôt que les cas prévalents. Concernant la taille de l'échantillon, il faut souligner qu'il s'agit de la plus grande étude réalisée à ce jour sur cette maladie. Finalement, nous avons effectué une correction statistique pour les analyses multiples en rendant le seuil de signification plus sévère.

En d'autres mots, nous avons pris le maximum de précautions pour générer des résultats valides et fiables.

CONCLUSION

Cette étude d'épidémiologie génétique de la leucémie lymphoblastique aiguë nous a permis de montrer que les variants Arg415Gln et Asp148Glu des enzymes XPF et APE respectivement, ne joueraient pas un rôle important dans l'étiologie de la LLA de l'enfant.

D'autre part, les variants Arg194Trp de la protéine XRCC1, Arg940Gln et Thr1036Ala de hMSH3 sembleraient être fonctionnels car leur fréquence est très différente d'un groupe continental à un autre. Néanmoins, ces variants ne semblent pas jouer un rôle évident dans l'étiologie de la LLA.

Par ailleurs, nous avons montré que les variants Ile219Val et Lys751Gln des protéines hMLH1 et XPD respectivement, sembleraient être fonctionnels et jouer un rôle dans l'étiologie de la LLA; soit seul, ou en synergie avec d'autres variants d'enzymes du métabolisme des carcinogènes. De plus, le variant dans hMLH1 semble jouer un rôle dans la survie des patients atteints de LLA et donc dans la réponse au traitement. Pour confirmer ces résultats il serait intéressant de faire des tests de fonctionnalité de ces variants afin de déterminer si l'efficacité de la réparation de l'ADN est modifiée. De plus, il serait pertinent d'étudier d'autres types de cancers afin de déterminer si ces variants ont un rôle dans l'étiologies d'autres néoplasies.

Cette étude nous permet donc de proposer que l'étiologie de la leucémie lymphoblastique aiguë s'expliquerait par l'effet synergique de plusieurs variants d'enzymes intervenant dans la carcinogenèse, en plus des facteurs environnementaux. Le cancer étant une maladie complexe résultant de l'accumulation de mutations spontanées ou induites par des carcinogènes, les mutations dans les gènes de réparations de l'ADN ne seraient pas la cause unique du cancer mais un élément additionnel dans le procédé de carcinogenèse.

Cette étude nous a permis de montrer qu'il est important de prendre en compte la variabilité génétique interindividuelle dans la réponse à l'environnement et dans la mise au point d'un traitement.

BIBLIOGRAPHIE

1. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, *et al.* Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 813-816.
2. Aboussekhra A, Biggerstaff M, Shivji MKK, Vilpo LA, Moncollin V, Podust VN, Potric M, Hübscher U, Egly JM, Wood RD. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* 1995; 80:859-68.
3. Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, *et al.* Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res* .1996; 56: 3087-90.
4. Anthoney A, McIlwrath A, Gallagher W, *et al.* Microsatellite instability, apoptosis, and loss of p53 function in drug-resistant tumor cells. *Cancer Res* .1996; 56:1374-81.
5. Aquilina G, Biondo R, Dogliotti E, Bignami M. Genetic consequences of tolerance to methylation DNA damage in mammalian cells. *Carcinogenesis* 1993; 14: 2097-2103.
6. Baccichet A, Benachenhou N, Couture F, Leclerc J-M, Sinnett D. Microsatellite instability in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1997a; 11:797-802.
7. Baccichet A, Qualman, S.K, Sinnett D. Allelic loss in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk. Res.* 1997b; 21:817-823.
8. Barrett SF, Robbins JH, Tarone RE, Kraemer KH. Evidence for defective repair of cyclobutane pyrimidine dimers with normal repair of other DNA photoproducts in a transcriptionally active gene transfected into cockayne's syndrome cells. *Mutat. Res.* 1991; 255: 281-291.
9. Benachenhou N, Guiral S, Gorska-Flipo I, Labuda D, Sinnett D. High resolution deletion mapping reveals frequent allelic losses at the DNA mismatch repair loci hMLH1 and hMSH3 in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 1998a; 77: 173-180.

10. Benachou N, Guiral S, Gorska-Flipo I, Michalski R, Labuda D, Sinnott D. Allelic losses and DNA methylation at DNA mismatch-repair loci in sporadic colorectal cancer. *Carcinogenesis* 1998b;19: 1925-9.
11. Benachou N, Guiral S, Gorska-Flipo I, Labuda D, Sinnott D. Frequent loss of heterozygosity at the DNA mismatch repair loci hMLH1 and hMSH3 in sporadic breast cancer. *Br. J. Cancer* 1999; 79: 1012-9.
12. Ben-Yehuda D, Krichevsky S, Caspi O, *et al.* Microsatellite instability and p53 mutations in therapy-related leukemia suggest mutator phenotype. *Blood* 1996; 88:4296-4303.
13. Bessho T, Sancar A, Thompson LH, Thelen MP. Reconstitution of human excision nuclease with recombinant XPF-ERCC1 complex. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 3833-7.
14. Bhattacharyya NP, Skandalis A, Ganesh A, Groden J, Meuth M. Mutator phenotype in human colorectal carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91:6319-23.
15. Board P, Coggan M, Johnston P, *et al.* Genetic heterogeneity in the human glutathione transferases: a complex of gene families. *Pharmacol. Ther.* 1990; 48: 357-69.
16. Bohr VA, Smith CA, Okumoto DS, Hanawalt PC. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* 1985; 40: 359-369.
17. Branch P, Hampson R, Karran P. DNA mismatch binding defects, DNA damage tolerance, and mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell line. *Cancer Res.* 1995; 55: 2304-9.
18. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, *et al.* Mutation in the DNA mismatch repair gene homolog hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994; 368: 358.

19. Caldecott KW, Aoufouchi S, Johnson P, Shall S. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase β and possibly (ADP ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular "nick sensor" *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 1996; 24:4387-94.
20. Cleaver JE. Do we know the cause of xeroderma pigmentosum? *Carcinogenesis* 1990; 11: 875-882.
21. Crofts F, Taioli E, Trachman J, *et al.* Functional significance of different human CYP1A1 genotypes. *Carcinogenesis* 1994; 15: 2961-3.
22. Dantzer F, de Murcia G. Quelles sont les ADN polymérase requises pour la réplication et la réparation de l'ADN chez les eucaryotes? *Med. Sci.* 1998; 14 : 704-12.
23. Demple B, Heramn T, Chen DS. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease-definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991;88: 11450-4.
24. d'Errico A, Taioli E, Chen X, Vineis P. Genetic metabolic polymorphisms and the risk of cancer: a review of the literature. *Biomarkers* 1996; 1: 149-73.
25. De Wind N, Dekker M, Berns A, *et al.* Inactivation of the mouse MSH2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell* 1995; 82:321-30.
26. Duckett DR, Drummond JT, Murchie AIH, *et al.* Human MUTS recognizes damaged DNA bp containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG)adduct. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 6443-7.
27. Dybdahl M, Vogel U, Frenzt G, Wallin H, Nexø BA. Polymorphisms in the DNA repair gene XPD: correlations with risk and age at onset of basal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1999; 1: 77-81.

28. Ecobichon DJ, Stevens DD. Perinatal development of human blood esterases. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1973; 14:41-7.
29. Enserink M. Physicians wary of scheme to pool Icelanders' genetic data. *Science* 1998; 281: 890-1.
30. Escobar P, Modugno F, Kanbour-Shakir A, Naus G, Mohrenweiser H, Romkes M. Analysis of the DNA repair enzyme XPD exon 23 polymorphism and cancer risk. *Proc. Am. Ass. Can. Res.* 1999; 40:213.
31. Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, *et al.* The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75:1027-38.
32. Flink D, Nebel S, Norris PS, Aebi S, Kim HK, Haas M, Howell SB. The effect of different chemotherapeutic agents on the enrichment of DNA mismatch repair-deficient tumour cells. *British J. Cancer* 1998; 77:703-8.
33. Frosina G, Fortini P, Rossi O, Carrozzino F, Raspaglio G, Cox LS, Lane DS, Abbondandolo A, Dogliotti E. Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 9573-8.
34. Glaab WE, Risinger JI, Umar A, Barrett JC, Kunkel TA, Tindall KR. Resistance to 6-thioguanine in mismatch repair-deficient human cancer cell line correlates with an increase in induced mutations at the *HPRT* locus. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1931-7.
35. Godfrey DB, Bouffler SD, Musk SR, *et al.* Mammalian cells share a common pathway for the relief of DNA replication arrest by O6-alkyl guanine, incorporated 6-thioguanine and UV photoproducts. *Mutat. Res.* 1992; 272: 225-35.
36. Goldmacher VS, Cuzick RA, Thilly WG. Isolation and partial characterization of human cell mutants differing in sensitivity to killing and mutation by methylnitrosourea and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 12462-71.

37. Gretzula JC, Hevia O, Weber PJ. Bloom's syndrom. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1987 Sep; 17(3):479-88.
38. Griffin S, Branch P, Xu YZ, Karran P. DNA mismatch binding and incision at modified guanine bases by extracts of mammalian cells: implications for tolerance to DNA methylation damage. *Biochemistry* 1994; 33: 4787-93.
39. Hannan MA, Sackey K, Sigut D. Cellular radiosensitivity of patients with different types of neurofibromatosis. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1993; 66: 120-125.
40. Hawn MT, Umar A, Carethers JM, *et al.* Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. *Cancer Res.* 1995; 55: 3721-3725.
41. Holzman D. Mismatch repair genes matched to several new roles in cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996; 88: 950-1.
42. Infante-Rivard C, Labuda D, Krajcinovic M, Sinnott D. Childhood leukemia: risk associated with exposure to pesticides and with gene polymorphisms. *Epidemiology* 1999; 10:481-7.
43. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363: 558-561.
44. Jackson AL, Loeb LA. The mutation rate and cancer. *Genetics* 1988; 148: 1483-1490.
45. Johnson RE, Kovvali GK, Guzder SN, Amin NS, Holm C, Habraken Y, Sung PL, Prakash S. Evidence for involvement of yeast proliferating cell nuclear antigen in DNA mismatch repair. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 27987-90.
46. Kat A, Thilly WG, Fang W, *et al.* An Alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 6424-28.

47. Kato S, Bowman ED, Harrington AM, *et al.* Human lung carcinogen-DNA adduct levels mediated by genetic polymorphisms in vivo. *J. Natl. cancer Inst.* 1995; 87:902-7.
48. Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Watanabe J, Hayashi S. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 1993; 14:77-87.
49. Kojis T, Gatti RA, Sparks RS. The cytogenetics of ataxia telangiectasia. *Cancer genet. cytogenet.* 1991; 56: 143-156
50. Kolodner R. Biochemistry and genetics of eucaryotic mismatch repair. *Genes Dev.* 1996; 10: 1433-1442.
51. Kraemer KH, Parris CN, Gozukara EM, Levy DD, Adelberg S, Seidman MM. DNA repair protects against cutaneous and internal neoplasia; evidence from xeroderma pigmentosum.. *Carcinogenesis* 1984; 5: 511-514.
52. Krajcinovic M, Richer C, Labuda D, Sinnett D. Detection of a mutator phenotype in cancer cells by inter-Alu PCR. *Cancer Res.* 1996; 56: 2733-2737.
53. Krajcinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S, Sinnett D. Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: Influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 Genetic Polymorphisms. *Blood* 1999; 93:1496-1501.
54. Kubota Y, Nash RA, Klungland A, Schär P, Barnes DE, Lindahl T. Reconstitution of DNA base excision repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase β and the XRCC1 protein. *EMBO J.* 1996; 15: 6662-70.
55. Labuda D, Krajcinovic M, Richer C, Skoll A, Sinnett H, Yotova V, Sinnett D. Rapid detection of CYP1A1, CYP2D6, and NAT variants by multiplex polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide assay. *Anal. Biochem.* 1999 Nov 1;275(1):84-92.

56. Labuda D, Zietkiewicz E, Labuda M. The genetic clock and the age of the founder effect in growing populations: A lesson from French Canadians and Ashkenazim. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 61: 768-771.
57. Labuda M, Labuda D, Korab-Laskowska M, *et al.* Linkage disequilibrium analysis in young populations: pseudo-vitamin D-deficiency rickets and the founder effect in french Canadians. *Am. J. Hum. Genet.* 1996; 59:633-43.
58. Lehman AR. Nucleotide excision repair and the link with transcription. *Trends Biochem. Sci.* 1995; 20:402-5.
59. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* (London) 1993; 362: 709-715.
60. Lindahl T, Karran P, Wood RD. DNA excision repair pathways. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1997; 7: 158-169.
61. Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Wilson JKV, Parsons RE, Jen J, Papadopoulos N, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat. Genet.* 1995; 9:48-55.
62. London SJ, Lehman TA, Taylor JA. Myeloperoxidase genetic polymorphism and lung cancer. *Cancer Res.* 1997; 57: 5001-3.
63. Martin RH, Green J, Barclay L, Rademaker AW. Analysis of aneuploidy frequencies in sperm from patients with hereditary nonpolyposis colon cancer and an hMSH2 mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 66: 1149-52.
64. Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Ménissier-de Murcia J, de Murcia G. XRCC1 is specifically associated with poly (ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell Biol.* 1998.
65. Mellon I, Rajpal DK, Koi M, Boland CR, Chanp N. Transcription-coupled deficiency and mutations in mismatch repair genes. *Science* 1996; 272: 557-60.

66. Meyn SM. High spontaneous intrachromosomal recombination rates in ataxia telangiectasia. *Science* 1993; 260: 1327-1330.
67. Modrich P, Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.* 1996; 65: 101-133.
68. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei Y-F, Carter KC, *et al.* Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994; 371:75-80.
69. Nystrom-Lahti M, Sistonen P, Mecklin J-P, Pytkkanen L, *et al.* Close linkage to chromosome 3p and conservation of ancestral founding haplotype in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 6054-8.
70. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Liu B, *et al.* Mutations of GTBP in genetically unstable cells. *Science* 1995; 268: 1915-1917.
71. Parsons R, Li G-M, Longley M, *et al.* Hypermutability in mismatch repair deficiency in RER+ tumour cells. *Cell* 1993; 75: 1227-1236.
72. Paterson MC. Ataxia telangiectasia: an inherited human disorder involving hypersensitivity to ionizing radiation and related DNA-damaging chemicals. *Annu. Rev. Genet.* 1979; 13: 291-318.
73. Perera FP. Molecular epidemiology: insights into susceptibility, risk assessment, and prevention. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996; 88:496.
74. Poulsen HE, Loft S, Wassermann K. Cancer risk related to genetic polymorphisms in carcinogen metabolism and DNA repair. *Pharmacol. Toxicol.* 1993; 72:93-103.
75. Price EA, Bourne SL, Radbourne PA, Lawton PA, Lamerdin J, Thompson LH, Arrand JE. Rare microsatellite polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, XRCC3 and XRCC5 associated with cancer in patients of varying radiosensitivity. *Somat. Cell. Mol. Genet.* 1997; 23:237-47.

76. Ramesar RS, Madden M, Bardieni S, *et al.* Site-specific hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) which develops almost exclusively in males in a large SA kindred is linked to the hMLH1 gene on chromosome 3. *Am. J. Hum. Genet.* 1994; 55:A67.
77. Reynolds WF, Chang E, Douer D, Ball ED, Kanda V. An allelic association implicates myeloperoxidase in the etiology of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1997; 90: 2730-7.
78. Risinger JL, Umar A, Boyd J, *et al.* Mutation of MSH3 in endometrial cancer and evidence for its functional role in heteroduplex repair. *Nat. Genet.* 1996; 14:102.
79. Saiki R, Gelfand GH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
80. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, New York.
81. Schaeffer L, Egly J. BTF2/TFIIH, un facteur de transcription et réparation impliqué dans des maladies de la réparation de l'ADN. *Med. Sci.* 1994; 10 : 973-8.
82. Scuderio DA, Meyer BE, Clatterbuck BE, Tarone RE, Robbins JH. Hypersensitivity to N⁷-methyl-N⁷-nitro-N-nitrosoguanidine in fibroblasts from patients with huntington's disease, familial dysautonomia, and other primary neuronal degenerations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981; 78: 6451-6455.
83. Seeberg E, Eide L, Bjoras M. The base excision repair pathway. *Trends Biochem. Sci.* 1995; 20:391-7.
84. Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at a polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res.* 1998; 58: 604-8.

85. Simard J, Tonin P, Durocher F, *et al.* Common origins of BRCA1 mutations in canadian breast and ovarian cancer families. *Nat. Genet.* 1994; 8:392-8.
86. Sinnett D, Krajinovic M, Labuda D. Genetic susceptibility to childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia and Lymphoma* 2000; 38: 447-462.
87. Smith MA, Chen T, Simon R. Age-incidence of acute lymphoblastic leukemia in US children : In utero initiation model. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997; 89: 1542-4.
88. Speicher MR. Microsatellite instability in human cancer. *Oncol. Res.* 1995; 7: 267-275.
89. Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, Zheng R, Eicher SA, Clayman GL, Strom SS, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 1999; 20:2125-9.
90. Sung P, Bailly, Weber C, Thompson LH, Prakash L, Prakash S. Human xeroderma pigmentosum group D gene encodes a DNA helicase. *Nature* 1993; 365: 852-5.
91. Thibodeau SN, Bren G, Schaid. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-819.
92. Thomas G. Dix ans de recherché sur les predispositions génétiques au développement des tumeurs. *Med. Sci.* 1995; 11 :336-48.
93. Tonin P, Serova O, Lenoir G, *et al.* BRCA1 mutations in Ashkenazi women. *Am. J. Hum. Genet.* 1995; 57:189.
94. Umar A, Buermeyer AB, Simon JA, Thomas DC, Clark AB, Liskay RM, Kunkel TA. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* 1996; 87:65-73.
95. Wood R. DNA repair in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 1996; 65:136-60.

96. Woods CG. DNA repair disorders. *Arch. Dis. Child.* 1998 Feb;78(2):178-84.
97. Wu X, Amos CI, Wang M, Hong HK, Mohrenweiser HW, Spitz MR. Association of a polymorphism in exon 23 of the DNA repair gene, XPD, and lung cancer risk. *Proc. Am. Ass. Can. Res.* 1999; 40:89.
98. Zdzienicka MK. Mammalian mutants defective in the response to ionizing radiation-induced DNA damage. *Mutat. Res.* 1995; 336: 203-13.
99. Zeng XR, Jiang Y, Zhang SJ, Hao H, Lee MYWT. DNA polymerase δ is involved in the cellular response to UV damage in human cells. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 13748-51.
100. Zietkiewicz E, Yotova V, Jarnik M, Korab-Laskowska M, Kidd KK, Modiano D, Scozzari R, Stoneking M, Tishkoff S, Batzer M, Labuda D. Nuclear DNA diversity in worldwide distributed human populations. *Gene* 1997; 205: 161-171.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur, le Docteur Daniel Sinnett, pour m'avoir donné la chance de réaliser ce projet dans son laboratoire ainsi que pour son soutien moral et financier tout au long de cette maîtrise.

Je voudrais aussi remercier les docteur(e)s Damian Labuda et Maja Krajinovic pour leurs précieux conseils et leurs remarques toujours très pertinentes.

J'aimerais enfin remercier tous les membres du centre de recherche du pavillon Vidéotron de l'Hôpital Sainte-Justine : Stéphanie, Hugues, Nicolas, Andrej, Anne-Julie, Gino, Alexandre, Zeina, Yves, Vania, Ewa, Raffaella, Chantal, Ulrike, Émilie, Martin et Dominik, pour leur bonne humeur et pour avoir créé une ambiance de travail aussi agréable et plaisante.

Ce projet a été réalisé grâce au soutien financier de la Fondation Charles-Bruneau et de Power Corporation Inc/Fondation Hôpital Ste-Justine.

LISTE DES PUBLICATIONS

1. Infante-Rivard C, Mathonnet G and Sinnett D.
Diagnostic irradiation and polymorphisms in DNA repair genes in childhood leukemia. Numéro spécial *Environmental Health Perspectives* 108(6) : 495-8.

2. Mathonnet G, Sinnett H, Labuda D and Sinnett D.
Genotyping of DNA repair variants using a PCR Allele-Specific Oligonucleotide Hybridization Assay (Soumis).

3. Mathonnet G, Sinnett D and Labuda D.
Worldwide distribution of DNA repair allelic variants (en préparation).

4. Mathonnet G, Krajinovic M, Labuda D and Sinnett.
Mismatch-repair hMSH3 and hMLH1 DNA variants and xenobiotic metabolizing genetic polymorphisms. Gene-gene interactions in childhood acute lymphoblastic leukemia (en préparation).