

Université de Montréal

Les haplogroupes mitochondriaux et le risque de cancer chez les Canadiens-français.

par

Andrzej Rochowski

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté des études supérieures



Université de Montréal

Bibliothèque

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise des Sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

Juin 2000

© Andrzej Rochowski



Université de Montréal

Les publications imprimées et les livres de poche de la Collection

français

QH
506
U54
2000
n. 019

Programme de biologie Moléculaire
Faculté des études supérieures

Méthodes utilisées à l'échelle des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître en Sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire



1999

Université de Montréal

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Les haplogroupes mitochondriaux et le risque du cancer chez les Canadiens-
français

présenté par :
Andrzej Rochowski

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Damian Labuda

Dr William Bradley

Dr Jacques Simard

Mémoire accepté le :

Table des matières

Sommaire.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	vii
Liste des abréviations.....	ix

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Le cancer et le fardeau mutationnel.....	11
1.2 Description sommaire des cancers étudiés.....	12
1.3 Le concept du fardeau mutationnel.....	13
1.3.1 Modification du fardeau mutationnel et la susceptibilité au cancer.....	15
1.4 Hypothèse.....	18
1.5 Le stress oxydatif : formation, mutagenèse et carcinogenèse.....	19
1.5.1 Formation du stress oxydatif.....	19
1.5.2 Les lésions oxydatives de l'ADN.....	21
1.5.3 La nature des lésions oxydatives de l'ADN.....	22
1.5.4 La réponse au stress oxydatif.....	23
1.5.5 Le stress oxydatif et le cancer.....	24
1.6 La mitochondrie et la cellule.....	26
1.6.1 La génétique mitochondriale.....	27
1.6.2 La biologie mitochondriale.....	28
1.6.3 Les maladies mitochondriales.....	29
1.6.4 La mitochondrie et le vieillissement.....	32
1.7 Les mutations du génome mitochondrial et le stress oxydatif.....	33
1.7.1 Les mutations du génome mitochondrial peuvent augmenter le niveau de production des radicaux libres d'oxygène.....	34
1.8 L'approche expérimentale.....	35
1.8.1 Les études d'association.....	36
1.8.2 L'analyse de la variabilité mitochondriale.....	36
1.8.3 La variabilité mitochondriale des populations européennes.....	38

1.8.4 Le design expérimental.....	40
1.9 Objectifs.....	45

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

2.1 Échantillons biologiques.....	46
2.2 Isolement d'ADN.....	46
2.3 Amplification par PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	46
2.4 Transfert des produits de PCR sur membranes (Dot-Blot).....	49
2.5 Marquage radioactif des sondes utilisées pour les hybridations...	49
2.6 Hybridation oligonucléotide allèle-spécifique (ASO).....	51
2.7 Digestions enzymatiques.....	51
2.8 Analyses statistiques.....	51

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Hybridation ASO (<i>Allele Specific Oligo</i>).....	53
3.2 La distribution des haplogroupes mitochondriaux dans le groupe contrôle.....	54
3.3 La distribution des haplogroupes A, B, C, D et M dans l'échantillon global.....	55
3.4 Les haplogroupes mitochondriaux et le risque de la LLA.....	56
3.5 Les haplogroupes mitochondriaux et le risque du cancer du sein...	58
3.6 Les haplogroupes mitochondriaux et le risque du cancer du côlon..	60
3.7 Relations entre les haplogroupes mitochondriaux, les variants fonctionnels des enzymes de Phase I & II et le risque du cancer....	61
3.7.1 Définition des variants fonctionnels des enzymes de Phase I & II analysés.....	61
3.7.2 Relations entre les haplogroupes mitochondriaux, les formes alléliques des enzymes de Phase I & II et le risque de la LLA.....	65
3.7.3 Relations entre les haplogroupes mitochondriaux, les formes alléliques des enzymes de Phase I & II et le risque du cancer du sein.....	66

3.8 Relations entre les haplogroupes mitochondriaux, facteurs environnementaux de risque et le risque du cancer du sein.....	69
3.9 Relations entre les haplogroupes mitochondriaux, les variants alléliques des gènes de réparation de l'ADN et le risque de la LLA.....	71

Chapitre 4 : Discussion

4.1 Considérations générales sur la méthode de génotypage.....	78
4.1.1 Le PCR multiplex.....	78
4.1.2 Hybridation ASO.....	79
4.2 Les limites de l'étude.....	80
4.2.1 La taille des échantillons et la puissance de l'étude.....	80
4.2.2 La structure génétique et les fausses associations.....	82
4.2.3 Le choix des haplogroupes comme marqueurs étudiés...	84
4.3 Role du génome mitochondrial dans le cancer ?.....	84
4.4 Les haplogroupes mitochondriaux et le cancer.....	86
4.5 Conclusion.....	88

Remerciements.....	89
Bibliographie.....	90
Annexe :données brutes.....	108

Sommaire

Le cancer est une maladie complexe causée par l'interaction entre la génétique et l'environnement. Parmi les facteurs génétiques de susceptibilité au cancer, il y a ceux qui contrôlent le niveau de radicaux libres dans la cellule. Le stress oxydatif, tel que mesuré par le niveau de radicaux libres comme agents mutagènes est reconnu comme un des agents étiologiques du cancer. La mitochondrie étant le site de la phosphorylation oxydative est donc en grande partie responsable du niveau de radicaux libres dans la cellule et du fardeau mutationnel causé par le stress oxydatif. La variabilité interindividuelle du risque de développer le cancer pourrait donc s'expliquer par des différences au niveau du fardeau mutationnel.

Dans ce travail, des variants génétiques mitochondriaux pourraient modifier la capacité mitochondriale de générer des radicaux libres d'oxygène, influençant ainsi le niveau du fardeau mutationnel et le risque de cancer. Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié l'association entre les haplogroupes mitochondriaux et le risque de la leucémie lymphoblastique (LLA) aiguë chez l'enfant, des cancers du côlon et du sein chez l'adulte dans la population des Canadiens-français.

Ainsi, les variants génétiques mitochondriaux semblent modifier le risque du cancer lorsque considérés seuls (l'haplogroupe K et le cancer du sein) ou en relation avec d'autres facteurs génétiques de risque (l'haplogroupe K et les allèles NQO 1 *2 et *3 chez les enfants atteints de la LLA). Notre étude constitue la première analyse systématique du rôle possible des variants génétiques mitochondriaux dans le processus de carcinogenèse. Il est possible que l'haplogroupe K soit impliqué dans le processus du développement de la LLA et du cancer du sein, mais ce à titre d'un marqueur, en déséquilibre de liaison avec une (ou plusieurs) mutation(s) causative(s) dont la nature et l'effet phénotypique reste(nt) encore inconnue(s).

Liste des figures.

Figure 1.3.1 : Le fardeau mutationnel et le cancer.....	15
Figure 1.5.1 : Réactions impliquées dans la formation des lésions oxydatives à l'ADN.....	19
Figure 1.5.2 : Réactions cellulaires menant aux lésions oxydatives de l'ADN..	20
Figure 1.8.3 : La généalogie mondiale de l'ADN mitochondrial.....	41
Figure 3.1 : Hybridation ASO.....	53
Figure 3.2 : Distribution des 9 haplogroupes européens dans la population canadienne-française de contrôles et dans la population européenne.....	54

Liste des tableaux

Tableau 1.8.2 : Les motifs RFLP caractérisant les haplogroupes mitochondriaux européens.....	37
Tableau 2.3.1 : Amorces utilisées pour l'amplification des 13 sites définissant les haplogroupes européens.....	47
Tableau 2.3.2 : Amorces utilisées pour l'amplification des sites définissant les haplogroupes amérindiens A, B, C et D.....	48
Tableau 2.3.3 : Combinaisons de paires d'amorces utilisées pour le PCR mutliplex.....	49
Tableau 2.5 : Sondes utilisées pour le génotypage des 13 loci définissant les haplogroupes européens.....	50
Tableau 3.2 : Distribution des haplogroupes A, B, C et D dans l'échantillon global.....	57
Tableau 3.4 : Relations entre les haplogroupes et le risque de la LLA.....	58
Tableau 3.4a : Relations entre les haplogroupes mitochondriaux et le risque de la LLA chez les filles.....	59
Tableau 3.4b : Relations entre les haplogroupes mitochondriaux et le risque de la LLA chez les garçons.....	59
Tableau 3.5 : Relations entre les haplogroupes mitochondriaux et le risque du cancer du sein.....	59
Tableau 3.6 : Relations entre les haplogroupes mitochondriaux et le risque du cancer du côlon.....	60
Tableau 3.7.1 : La nature et les effets phénotypiques des variants alléliques des enzymes de Phase I & II.....	64
Tableau 3.7.2 : Relations entre les haplogroupes mitochondriaux, les variants fonctionnels des enzymes de Phases I & II et le risque de la LLA.....	66
Tableau 3.7.3 : Relations entre les haplogroupes mitochondriaux, les variants	

fonctionnels des enzymes de Phase I & II et le risque du cancer du sein.....	67
Tableau 3.8a : Données épidémiologiques considérées pour cette étude.....	70
Tableau 3.8b : Relations entre les haplogroupes mitochondriaux et le risque du cancer du sein.....	70
Tableau 3.9a : Caractéristiques des variants dans les gènes de réparation.....	71
Tableau 3.9b : Relations entre les haplogroupes mitochondriaux, les variants des gènes de réparation et le risque de la LLA.....	73
Tableau 4.2.1 : Relations entre le risque relatif, la fréquence allélique et la taille de l'échantillon dans une étude cas-contrôles.....	81

Liste des abréviations.

ADN :	Acide DéoxyriboNucléique
ADP :	Adénine Di-Phosphate
ANT :	transporteur d'ATP
ARN :	Acide RiboNucléique
ATP :	Adénine Tri-Phosphate
ASO :	« Allele Specific Oligo »
BRCA :	« Breast Cancer susceptibility gene »
COII :	Cytochrome <i>c</i> Oxydase II
CTE :	Chaîne de Transport d'Électrons
FAP :	polypose familiale adenomatique
HNPCC :	cancer colorectal héréditaire sans polyposes
LLA :	Leucémie Lymphoblastique Aiguë
MERRF :	« Myoclonic Epilepsy and Psychomotor Regression »
MTTK*MERRF83446G :	mutation de génome mitochondrial à la position 8334, dans le gène codant pour l'ARNt ^{Lys} , responsable du syndrome MERRF
MTND6*LDYT14459A :	mutation de génome mitochondrial à la position 14459, dans le gène codant pour la 6 ^{ème} sous-unité de la NADH déhydrogenase, responsable du syndrome de Leber et de la dystonie
mtPTP :	canal non-spécifique de la membrane interne de la mitochondrie
MTTQ*ADPD4336C :	mutation de génome mitochondrial à la position 4336, dans le gène codant pour l'ARNt ^{Glu} , mettant les individus à risque de développer les maladies d'Alzheimer et de Parkinson
RFLP :	« Restriction Fragment Length Polymorphism »
SOD :	Super oxyde dismutase
TG :	Thymine Glycol

Après les maladies cardio-vasculaires, le cancer est la deuxième cause de décès non reliés aux accidents au Canada (Statistique Canada, 1999). En effet, 129 300 nouveaux cas de cancer et 63 400 décès dus à cette maladie ont été enregistrés au Canada en 1999. Cependant, le cancer du poumon est le plus mortel : presque un tiers des décès chez les hommes et un cinquième chez les femmes sont attribuables au cancer du poumon. De son côté, le cancer pédiatrique représente environ 1 % du total des cas nouvellement diagnostiqués. Au moins 50 % des nouveaux cas seront attribuables au cancer de la prostate (12.8 %), du poumon (9.3 %) et du côlon et rectum (6.8 %) chez l'homme, et du sein (14.5 %), du côlon et rectum (6.0 %) et du poumon (6.6 %) chez la femme. Les deux sexes mis ensemble, 16 % des nouveaux cas diagnostiqués en 1999 ont été dus au cancer du poumon, 14.5% au cancer du sein et 12.8 % au cancer de la prostate.

1.1 Le cancer et le fardeau mutationnel.

Il existe deux formes de cette maladie. Les cancers dits héréditaires corrélerent avec une histoire familiale de la maladie et leur étiologie peut s'expliquer par la transmission dominante d'une mutation germinale dans un gène de prédisposition encodant fréquemment un supresseur de tumeur. Cependant, la majorité des mutations impliquées dans la carcinogenèse est de nature somatique. Ainsi le cancer peut être considéré comme une maladie génétique complexe impliquant une interaction gène(s) et environnement. Le paradigme stipule que, tout comme le diabète mellite (Elbein., 1997), la sclérose en plaques (Tienari., 1994), la schizophrénie (Mowry et al., 1997) et certaines formes de la maladie d'Alzheimer (Pericak-Vance et al., 1995) le cancer est une maladie génétique complexe causée, dans le cas de ce dernier, par un fardeau élevé de mutations somatiques (Dean, 1998). Ce fardeau, lié à une mutagenèse accélérée est le résultat de l'interaction entre l'environnement et la génétique individuelle (figure 1.3.1) : le fond génétique modifie le risque du cancer chez les individus exposés aux facteurs environnementaux en modifiant le niveau du fardeau mutationnel.

Dans ce projet nous proposons d'évaluer la contribution d'un locus potentiel de susceptibilité, l'ADN mitochondrial, au processus de carcinogenèse.

Pour ce faire, nous allons utiliser comme modèle de maladie, les formes non-héréditaires des cancers du côlon et du sein, ainsi que de la leucémie lymphoblastique aiguë chez l'enfant (LLA). Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet beaucoup plus vaste dans lequel notre laboratoire vise à comprendre le rôle des facteurs génétiques contrôlant le niveau du fardeau mutationnel dans le processus de carcinogenèse.

1.2 Description sommaire des cancers étudiés.

Le cancer du sein est la tumeur la plus fréquente chez les femmes. Environ 30% des cas du cancer du sein corréntent avec une histoire familiale de la maladie (Ghadirian et al., 1998, Henderson 1993). Une grande majorité de ces tumeurs est caractérisée par des mutations germinales dans les gènes BRCA1 et BRCA2 (Ingvarsson S., 1999). L'abondance de réarrangements chromosomiques dans les cellules des patientes BRCA1 et BRCA2 suggère un rôle de ces gènes dans le maintient de la fidélité de la ségrégation chromosomique (Tirkkonen et al., 1997). Cependant, en partie à cause du manque de ce type d'analyses, il est rare d'observer les mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 dans les tumeurs sporadiques. L'exposition environnementale et les loci à faible pénétrance pourraient jouer un rôle causatif dans le développement de cette maladie.

Les études épidémiologiques ont suggéré qu'environ 15% des cancers colorectaux adviennent d'une façon héréditaire (Houlston et al., 1992). Les deux formes familiales les mieux définies sont la polypose familiale adénomatique (FAP) et le cancer colorectal héréditaire sans polyposes (HNPCC). Ce dernier est caractérisé par une instabilité des microsatellites associée avec des mutations germinales des gènes hMSH2, hMLH1 et hPMS2 (Liu et al., 1996, Shen et al., 1998, Benachenhou et al., 1998a). Par ailleurs, plus de 95% des FAP sont associées avec des mutations germinales dans le gène APC (Jen et al., 1994). Le rôle postulé du gène APC est celui-ci d'un «gatekeeper», c'est-à-dire un gène responsable du maintient d'un nombre constant de cellules dans les conditions de régénération de la population cellulaire (Kinzler et Vogelstein, 1996). Ceci étant dit, plusieurs indices pointent vers une origine sporadique de la majorité des néoplasmes du côlon. Ainsi, il est intéressant de noter que les mutations somatiques du gène APC sont associées avec plus de 80% des cancers

sporadiques (Smith et al., 1993). De plus, le taux d'incidence du cancer du côlon est élevé en Amérique du Nord et en Europe mais la maladie est presque inconnue en Asie et en Afrique. On croit que cette distribution géographique particulière peut s'expliquer par la prévalence géographique de différents facteurs environnementaux. Notamment, des données épidémiologiques suggèrent fortement qu'un régime diététique riche en viande rouge soit un facteur de risque. À l'inverse, un régime riche en fruits et légumes ainsi que l'abstinence de la nourriture riche en hydrates de carbone protègent contre la maladie (Giovannucci et Willett, 1994).

Représentant près de 25% des tumeurs pédiatriques, la LLA est le cancer le plus fréquent chez les enfants. La LLA est caractérisée par une prolifération invasive des lymphoblastes (les cellules progénitrices des lymphocytes T et B). La leucémie pré-B représente plus de 80% des cas et 15% des patients souffre du type pré-T. La LLA est considérée comme une maladie complexe où l'effet des facteurs extérieurs est modulé par une série de gènes dits de faible pénétrance (Krajinovic et al., 1999). Ainsi, étant donné une exposition relativement élevée, un métabolisme rapide et moins développé et un taux de division cellulaire élevé les enfants sont particulièrement vulnérables aux toxines environnementales (Infante-Rivard et al., 1999). Les enfants sont exposés aux agents toxiques 1) avant la conception, via l'exposition des cellules germinales des parents ; 2) durant la grossesse par les substances transmises de la mère au fœtus via le placenta ; et 3) après la naissance, dans leur environnement quotidien. L'observation que le pic du taux d'incidence de la LLA a lieu entre l'âge de 2 à 5 ans, suggère une initiation de la maladie *in utero* ou très tôt dans l'enfance (Smith et al., 1997). Par ailleurs, il est à noter que la LLA n'est pas le seul type de cancer pédiatrique dont l'ontogenèse implique une interaction gène-environnement. Des études cas-contrôles ont rapporté un lien significatif entre les pesticides et les tumeurs de Wilms (Olshan et al., 1993), les cancers du cerveau (Kristensen et al., 1996) et le neuroblastome (Schwartzbaum et al., 1991).

1.3 Le concept du fardeau mutationnel.

Le fardeau mutationnel est le résultat de la charge mutationnelle environnementale (par environnement on entend l'air, l'eau, le rayonnement

cosmique, ainsi que le milieu extracellulaire) et endogène (métabolisme) et de la capacité de la cellule à la maîtriser. Ces facteurs engendrent un fardeau mutationnel qui résulte environ 1.4×10^{-10} mutations par paire de bases par division cellulaire.

Plusieurs facteurs sont à l'origine de l'existence du fardeau mutationnel et on peut les diviser en deux groupes. En premier lieu, la nature même de la molécule d'ADN ainsi que le mécanisme de sa réplication constituent une source importante de mutations et constituent ce que l'on appelle la mutagenèse spontanée. L'ADN est une molécule relativement instable et enclinée à des événements mutationnels spontanés tels que la dépurination ou la désamination. De plus, l'ADN polymérase possède un certain taux d'infidélité. On peut donc considérer ces deux facteurs comme intrinsèques et incontrôlables puisqu'ils ne relèvent que de la nature biochimique de la molécule d'ADN et de son métabolisme.

L'environnement et le milieu intracellulaire constituent une deuxième source du fardeau mutationnel que l'on appelle mutagenèse induite. En effet, l'environnement est une source ubiquitaire et inépuisable d'éléments mutagènes. Ainsi, les facteurs physiques tels que les rayons U.V. et la radiation ionisante sont des agents mutagènes puissants dont l'effet sur l'ADN résulte en plus de 10,000 différents types de lésions. Les substances chimiques telles que les organochlorines et les solvants organiques incluant le benzène et les hydrocarbures aromatiques polycycliques constituent aussi une source de mutagènes. De plus, le stress oxydatif, issu des milieux intra- et extracellulaires et environnementales, est un autre facteur mutagène important.

Toutefois, si l'environnement est une source d'agents mutagènes, l'intensité de son assaut mutationnel sur l'ADN est modulée en grande partie par des facteurs de nature génétique. En d'autres mots, le niveau du fardeau mutationnel est lié à l'interaction entre l'environnement et la génétique individuelle. Les facteurs génétiques constituent donc une sorte de filtre qui modifie l'intensité de l'effet mutationnel de l'environnement. Les différents facteurs génétiques et biochimiques qui modulent l'intensité du fardeau mutationnel peuvent être regroupés en trois catégories : 1) les gènes responsables de la réplication et de la réparation de l'ADN 2) les gènes responsables du

métabolisme des xénobiotiques et 3) les systèmes cellulaires de réponse au stress oxydatif.

1.3.1 Modification du fardeau mutationnel et la susceptibilité au cancer

Les analyses récentes de spectres mutationnels ont révélé un nombre remarquable et inattendu de mutations somatiques dans certaines des séquences répétitives des cellules cancéreuses (Loeb., 1998). Il semble en effet que le taux mutationnel (1.4×10^{-10} mutations par paire de bases par division) tel que déterminé dans les cellules normales n'est pas suffisamment élevé pour expliquer l'abondance des lésions mutationnelles, caractéristique des cellules cancéreuses. Il a donc été proposé que le grand nombre de lésions génomiques soit dû à l'augmentation du fardeau mutationnel de cellules somatiques.

La figure 1.3.1 schématise les différents processus impliqués dans la modulation du fardeau mutationnel et dans la carcinogenèse. L'environnement constitue une source ubiquitaire d'éléments carcinogènes. Cependant, dans leur état naturel les produits toxiques environnementaux sont inertes. Afin de devenir réactifs envers l'ADN (ou tout autre macromolécule) et causer les lésions impliquées dans l'initiation du cancer, ils doivent être métabolisés par une ou plusieurs enzymes transformants. La voie métabolique responsable de cette biotransformation comprend : 1) les enzymes dites de Phase I qui activent les xénobiotiques via des réactions de réduction, d'oxydation et d'hydrolyse (eg. Cytochrome P450) et 2) les enzymes dites de Phase II qui contribuent à l'élimination des métabolites actifs en les rendants inertes et solubles via les réactions de sulfonation, acetylation, méthylation, glucuronidation et conjugaison (eg. Glutathion S-Transférases). On peut donc considérer les enzymes de Phase I et II comme un filtre modulant l'intensité de la charge mutationnelle issue de l'environnement. En d'autres mots, le rôle de ces enzymes dans le processus de la carcinogenèse est de moduler le niveau du fardeau mutationnel en modifiant l'effet carcinogène de l'environnement.

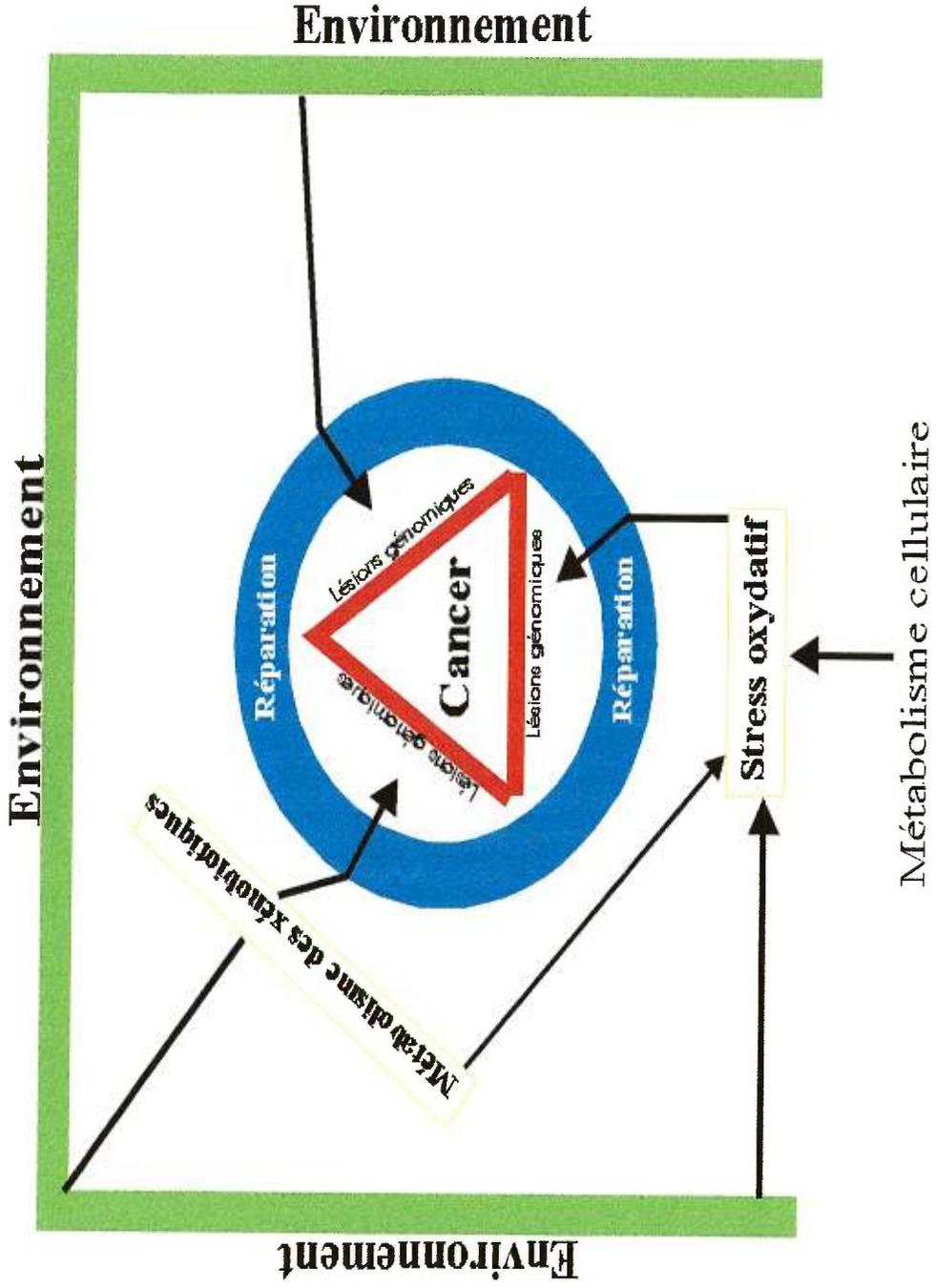


Fig. 1.3.1

Le fardeau mutationnel et le cancer.

L'étude de l'impact de ses facteurs génétiques sur la susceptibilité au cancer non-héréditaire est d'autant plus intéressante, qu'un nombre d'entre eux sont codés par des gènes polymorphes dont les allèles sont associés avec des phénotypes biochimiques définis. Etant donné que le fait d'être porteur d'un allèle particulier ne mène pas directement au cancer et ne fait que modifier le risque relatif de le développer, les gènes impliqués dans l'étiologie du cancer sont dits de pénétrance faible. Ceci explique en partie la variabilité interindividuelle de la susceptibilité au cancer.

La capacité de maintenir l'intégrité de l'ADN constitue un autre facteur génétique impliqué dans la modulation du niveau du fardeau mutationnel. Le concept du phénotype mutateur caractéristique des cellules cancéreuses, implique l'acquisition d'une mutation dans au moins un des gènes du système de réparation qui entraîne la perte de la capacité de maintenir et contrôler l'intégrité du matériel génétique. On peut donc considérer la réparation de l'ADN comme un moyen final de neutraliser les conséquences de la variabilité de la charge mutationnelle. Ainsi, la susceptibilité au cancer peut être influencée par la capacité individuelle de réparer l'ADN.

Finalement, les radicaux libres d'oxygène constituent une source importante d'éléments mutagènes et contribuent à l'augmentation du fardeau mutationnel. La radiation ionisante, la lumière U.V., l'ozone et la fumée du tabac entraînent, entre autres, la génération des éléments d'oxygène hautement réactifs. Une grande partie du contrôle du niveau intracellulaire de radicaux libres est médiée par des voies métaboliques décrites plus haut. Le stress oxydatif est généré à l'intérieur de la cellule lors du métabolisme de certains médicaments (Hu et al., 1997) et produits chimiques environnementaux (eg. benzène) (Golding et Watson, 1999) par des cytochromes P450 et son niveau est réprimé entre autres par les glutathione transférases et réductases. De plus, la fuite des électrons du complexe respiratoire mitochondrial et la réduction partielle des molécules d'oxygène contribue d'une façon significative à la génération du stress oxydatif.

En somme, la figure 1.3.1 présente le fardeau mutationnel comme une charge mutationnelle dont l'intensité est modifiée par un ensemble complexe d'interactions entre l'environnement et la génétique individuelle (qui module ou filtre cet effet). Dans les cellules normales, ce système d'interactions est en équilibre, c'est-à-dire que les interactions entre toutes ses composantes résultent

en un fardeau mutationnel dont l'intensité reste moins offensive pour la cellule (du moins en ce qui attrait à la carcinogénèse). La perte de cet équilibre, causée soit par une charge environnementale accrue, soit par une modification individuelle de la capacité de filtrer l'assaut mutationnel, soit par les deux, entraîne une augmentation et une accumulation de la charge mutationnelle des cellules somatiques. Il en résulte un fardeau mutationnel dont l'intensité compromet l'intégrité des gènes impliqués dans le contrôle et la croissance des cellules.

1.4 Hypothèse

Le cancer est une maladie complexe causée par l'interaction entre la génétique et l'environnement. Parmi les facteurs génétiques de susceptibilité au cancer, il y a ceux qui contrôlent le niveau de radicaux libres dans la cellule. Le stress oxydatif, tel que mesuré par le niveau de radicaux libres comme agents mutagènes est reconnu comme un des agents étiologiques du cancer. La mitochondrie étant le site de la phosphorylation oxydative est donc en grande partie responsable du niveau de radicaux libres dans la cellule et du fardeau mutationnel causé par le stress oxydatif. La variabilité interindividuelle du risque de développer le cancer pourrait donc s'expliquer par des différences au niveau du fardeau mutationnel.

Dans ce travail, des variants génétiques mitochondriaux pourraient modifier la capacité mitochondriale de générer des radicaux libres d'oxygène, influençant ainsi le niveau du fardeau mutationnel et le risque de cancer. Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié l'association entre les haplogroupes mitochondriaux et le risque de la leucémie lymphoblastique aiguë chez l'enfant, des cancers du côlon et du sein chez l'adulte dans la population des Canadiens-français.

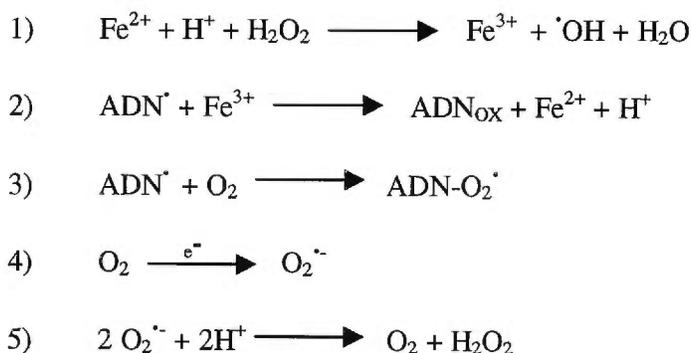
Afin de justifier notre hypothèse, nous allons décrire dans les sections suivantes 1) le rôle du stress oxydatif dans le processus de carcinogénèse (section 1.5) ; 2) le rôle de la mitochondrie dans le fonctionnement cellulaire (section 1.6) ; 3) les évidences qui suggèrent qu'en générant l'oxygène sous forme active, les mutations du génome mitochondrial puissent modifier le risque du cancer (section 1.7) ; et 4) l'utilité des études d'association dans l'identification des loci qui modifient la susceptibilité au cancer (section 1.8).

1.5 Le stress oxydatif : formation, mutagenèse et carcinogénèse.

Il est connu depuis longtemps que les radicaux libres d'oxygène, générés lors de la radiolyse d'eau sont responsables des effets de l'irradiation sur la matière vivante. La caractérisation des lésions oxydatives de l'ADN induites par la radiation et l'établissement d'un lien entre la radiation et le cancer ont suscité un intérêt particulier envers le processus d'oxydation de l'ADN. De multiples évidences ont documenté l'interaction des radicaux libres d'oxygène, générés comme produits dérivés du métabolisme cellulaire, avec les protéines, les lipides et l'ADN. Ainsi, vu l'étendue de son spectre mutationnel, le stress oxydatif participe à la modification d'une vaste gamme de mécanismes cellulaires tels que l'apoptose, la signalisation intracellulaire et l'intégrité structurale, l'impliquant ainsi dans les processus du vieillissement, de l'inflammation et de la carcinogénèse.

Figure 1.5.1

Réactions impliquées dans la formation des lésions oxydatives à l'ADN.



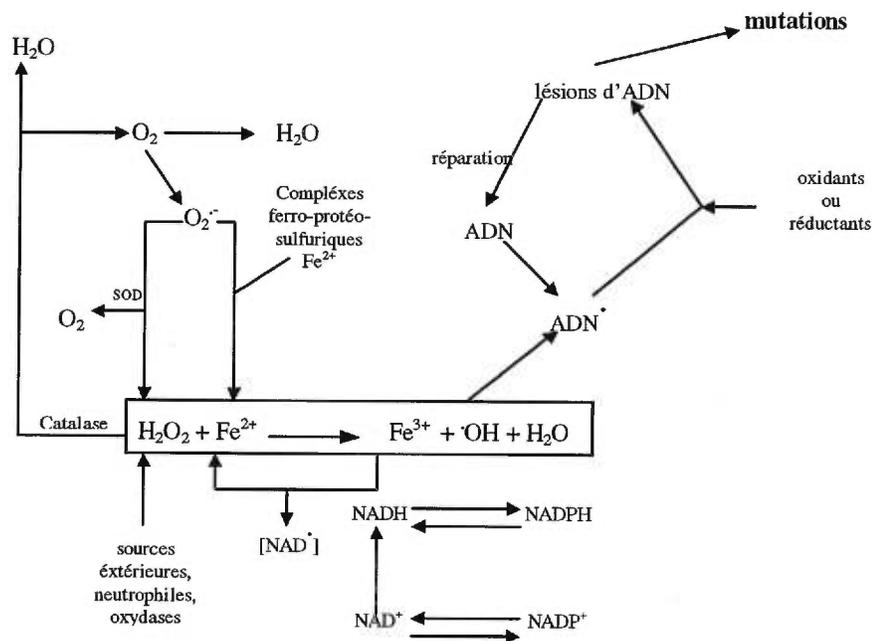
1.5.1 Formation du stress oxydatif.

En 1894, Fenton (Fenton H., 1894) a décrit le processus d'oxydation de l'acide tartrique par Fe^{2+} et H_2O_2 dont les proportions stœchiométriques sont décrites dans la réaction 1 de la figure 1.5.1. Dans cette réaction, le fer sert comme source d'électrons pour réduire une molécule de peroxyde d'hydrogène. Le radical d'hydroxyle [$\cdot\text{OH}$] généré lors de la réaction de Fenton est un élément

extrêmement réactif, responsable de la majorité des lésions liées au stress oxydatif.

Figure 1.5.2 (adaptée de Henle et Stuart, 1997)

Réactions cellulaires menant aux lésions oxydatives de l'ADN.



La figure 1.5.2 est une représentation sommaire des réactions cellulaires menant à la génération des lésions oxydatives à l'ADN via la réaction de Fenton. Le peroxyde d'hydrogène représente un point majeur d'entrée de l'oxygène dans tout le processus de lésions oxydatives. Plusieurs sources contribuent à la présence de cet élément dans la cellule. Une partie du peroxyde d'hydrogène est formée par le métabolisme endogène de la cellule. En effet la fuite constante d'électrons du complexe respiratoire mitochondrial génère les radicaux superoxyde $[\text{O}_2^{\cdot-}]$ (réaction 4, figure 1.5.1) dont la neutralisation par les superoxyde dismutases libère, comme produits dérivés, les molécules de peroxyde d'hydrogène et d'oxygène (réaction 5, figure 1.5.1). En plus de générer le peroxyde d'hydrogène le superoxyde favorise la libération du fer emmagasiné dans la cellule sous forme de complexes sulfuro-proteino-ferriques (revue dans

Henle et Linn, 1997). La réduction illégitime des molécules d'oxygènes par des électrons ayant fuit le complexe respiratoire constitue donc un point d'entrée majeur du processus qui génère les radicaux libres d'oxygène. Il faut aussi remarquer que le peroxyde d'hydrogène provient des sources extracellulaires telles que la nourriture riche en lipides et hydrates de carbone ou l'inflammation. Dans ce contexte, le stress oxydatif semble participer dans la pathogénèse de plusieurs maladies gastro-intestinales telles que la pancréatite, la maladie inflammatoire de l'intestin et le cancer colorectal (Bulger et Helton, 1998).

1.5.2 Les lésions oxydatives de l'ADN.

Une partie des lésions à l'ADN est aussi causée par les oxydants de Fenton produits par le Fe^{3+} associé directement avec l'ADN (réaction 2, figure 1.5.1). Dans ce contexte, l'emplacement du fer sur la molécule déterminerait le substrat, la nature et le lieu de l'attaque oxydative (Luo et al, 1994). En effet, il existe deux classes d'oxydants qui participent à la réaction de Fenton (Imlay et Linn, 1988). Les oxydants de catégorie I sont peu sensibles au peroxyde d'hydrogène et semblent cliver d'une manière préférentielle les séquences caractérisées par les motifs **RTGR**, **TATTY** et **CTTR** (les endroits de coupure sont indiqués en caractères gras). Les oxydants de catégorie II ont une préférence pour le motif **NGGG**. Cependant, il a été suggéré que les coupures à ces sites ne sont pas nécessairement dues aux réactions de Fenton impliquant la liaison du fer à l'ADN. Il est possible que les séquences telles que le motif NGGG représentent des évier pour électrons (« electron sinks ») qui génèrent des lésions oxydatives *in situ* en réduisant directement les molécules d'oxygène (figure 1.5.1, réaction 3) En effet, un aspect très intéressant de l'oxydation de l'ADN implique la possibilité que celle-ci peut être médiée par un transfert d'électrons à longue distance le long du faisceau π (« the π stack ») du double-brin. La structure double-brin de l'ADN, composée de faisceaux de base hétérocycliques constitue un moyen efficace de diffusion de charges électriques à longue distance. Des expériences utilisant un oligonucléotide synthétique d'ADN double-brin ont démontré que les lésions oxydatives peuvent avoir lieu loin du lieu d'attachement covalent d'un oxydant, et ce grâce à la propagation rapide de charges à travers l'ADN et son l'accumulation dans des endroits précis (évier) (Hall et al. 1996).

Cette observation suggère que la topologie de l'ADN peut donner lieu à des endroits riches en électrons libres délimitant de la sorte des zones à haut niveau de lésions oxydatives.

En somme, au moins deux mécanismes majeurs induisent les lésions oxydatives à l'ADN. Le premier d'entre eux implique la génération de l'ion d'hydroxyde via la réaction de Fenton, qui en diffusant dans le noyau induit des lésions oxydatives. Dans ce mécanisme, le fer sert de source d'électrons et réduit le peroxyde d'oxygène. Le second mécanisme est un mécanisme *in situ*, caractérisé par des contraintes spatiales qui correspondent aux endroits riches en électrons où aura lieu la réduction de l'oxygène. Ce mécanisme ne dépend donc pas de la présence du fer.

1.5.3 La nature de lésions oxydatives de l'ADN.

Plus de 100 types de lésions oxydatives ont été identifiées dans les génomes des mammifères. Ces lésions comprennent des modifications de bases, génération des sites abasiques, dommages structuraux au deoxyribose et des cassures simple et double brin.

Dans les conditions normales, le niveau du dommage oxydatif est élevé : les adduits oxydatifs sont d'un ordre de magnitude plus fréquents que les adduits non-oxydatifs (Ames et al, 1995). Les dommages les plus fréquents impliquent des modifications de bases. En effet, à l'aide des techniques de spectroscopie de masse et de chromatographie gazeuse on estime que chaque cellule contient plus de 150,000 d'adduits oxydatifs (Nakajima et al. 1996, Beckman et Ames, 1997). Il a été ultérieurement déterminé que 10% de ces adduits sont représentés par la 8-oxo-guanine (oxo-8-dG) et la thymine glycol (TG). Désormais, le niveau d'oxo-8-dG est considéré comme représentatif du niveau de dommage causé à l'ADN par le stress oxydatif. L'oxo-8-dG et la TG sont de bons exemples de composés issus d'une attaque de radicaux libres d'oxygène sur les bases. Ces attaques résultent la plupart du temps en addition d'un groupe OH aux double liaisons qui sont riches en électrons. Les doubles liaisons N-7-C-8 des purines et 5,6 des pyrimidines sont les plus portées à subir ce type d'attaque. Le 8-oxo-dG est considéré comme une lésion prémutagénique car c'est seulement lors de la réplication d'ADN que le 8-oxo-dG peut s'apparier avec l'adénine (au lieu d'une cytosine) résultant en une

transversion de G en T. En soi, ce type de lésion n'est pas létal et l'adduit peut-être enlevé par le système de réparation par excision de bases. À l'inverse du 8-oxo-dG, le TG est considérée comme létal puisque cette lésion bloque la progression des ADN et ARN polymérases (Croteau et Bohr, 1997). Le potentiel nocif de cette mutation est souligné par la présence chez les mammifères d'une glycosylase spécifique au TG (Hilbert et al 1996).

Il a aussi été démontré que les oxydants de Fenton peuvent occasionner des dommages aux parties désoxyribose des nucléotides. Les lésions de ces sucres sont initiées par l'abstraction d'un hydrogène à partir d'un des atomes du carbone du deoxyribose entraînant une cassure du brin d'ADN et la libération de la base. Une autre catégorie d'altérations que peuvent subir les désoxyriboses suite à une attaque oxydative est la conversion de la liaison au carbone-1' de la conformation β à la conformation α . Ce type d'altération perturbe la structure B de l'ADN.

1.5.4 La réponse au stress oxydatif.

La fidélité du métabolisme oxydatif et la séquestration du fer sous formes de ferritine et transferritine minimisent l'effet nocif du stress oxydatif. De plus, la compartimentalisation du fer et de radicaux de superoxyde, ainsi que la barrière physique que constituent les histones, diminuent l'impact des radicaux libres d'oxygène sur l'ADN. Mis à part ces moyens physiques de résistance, la cellule possède à sa disposition une panoplie de systèmes enzymatiques qui neutralisent les divers éléments générés par l'interaction du fer avec le peroxyde d'hydrogène. Ainsi, les Super Oxyde Dismutases (SOD) constituent le meilleur moyen de défense contre le superoxyde, une forme d'oxygène extrêmement réactive. Le rôle du deuxième système de défense, les catalases semble être beaucoup moins important. Ces enzymes catalysent la conversion du peroxyde d'hydrogène en oxygène minimisant ainsi la libération de différents oxydants issus de la réaction de Fenton. Finalement, les glutathione peroxydases en collaboration avec les glutathione réductases NADPH-dépendantes constituent le troisième système de défense cellulaire contre le stress oxydatif. Localisés dans les mitochondries, le cytoplasme et les péroxysomes, ces enzymes neutralisent le peroxyde d'hydrogène d'une façon encore plus efficace que les catalases (Michiels et al. 1994).

Tel qu'illustré à la figure 1.5.2, les niveaux relatifs des SOD, des catalases et des glutathione peroxydases influencent l'efficacité de neutralisation des radicaux libres d'oxygène. À titre d'exemple, une augmentation de la proportion des SOD, tout en vidant la cellule de radicaux de superoxyd entraînant une augmentation de la production du peroxyde d'hydrogène qui, à moins d'être contrebalancée par des niveaux élevés de catalases et de glutathione peroxydases, pourrait s'avérer fatale pour la cellule. De même, un excès de glutathione peroxydases aurait pour conséquence l'épuisement des réserves cellulaires de glutathione et de NADPH (Michiels et al. 1994). D'ailleurs, il a été démontré sur les cellules épidermales de souris que le degré de protection contre le stress oxydatif est déterminé par l'état de l'équilibre entre les enzymes antioxydants et non pas par leurs efficacité catalytique (Cerutti et al. 1994).

1.5.5 Le stress oxydatif et le cancer.

Trois sources exogènes de radicaux libres semblent contribuer au développement du cancer : la fumée du tabac, les inflammations chroniques et l'exposition aux produits chimiques. La fumée du tabac contient des niveaux élevés d'oxydes nitriques (NO_x) qui vident les réservoirs cellulaires d'antioxydants (Ames B.N., 1995). Les cellules phagocytiques recrutées aux sites des infections chroniques génèrent des quantités importantes d'oxydants tels que le HOCl.

Plusieurs études supportent le rôle des lésions oxydatives dans la carcinogenèse. Un niveau élevé de lésions oxydatives a notamment été enregistré lors des infections au *Helicobacter pylori*, (associées aux cancers de l'estomac) (Baik et al. 1996); après l'administration du nitrilotriacétate ferrique (causant expérimentalement le cancer des reins chez les rongeurs) (Toykuni et al. 1995) ; lors de la consommation du tabac, lié au cancer du poumon (Ballinger et al. 1996) ; après l'exposition aux produits de combustion du diesel et à l'amiante, lié au cancer du poumon (Ichinose et al., 1997 et Chen et al., 1996 respectivement). Des niveaux élevés de lésions oxydatives ont aussi été observés après l'exposition au benzène et à l'aflatoxine, agents causatifs de la leucémie (Liu et al. 1996, Hiraku et Kawanishi 1996) et du cancer du foie (Shen et al. 1995), respectivement.

Les expériences démontrant l'induction de l'activité spécifique des enzymes de réparation par les oxydants carcinogènes (Yamaguchi et al. 1996) et la suppression de la carcinogénèse par l'administration d'antioxydants (Hasegawa et al. 1995) ont permis de mettre en évidence plus qu'une simple association entre le produit carcinogène et les lésions oxydatives à l'ADN. La suppression de la carcinogénèse par les antioxydants est en accord avec l'observation qu'un régime riche en fruits et légumes (sources principales d'antioxydants diététiques) peut réduire considérablement le risque de développer le cancer (Ames et al. 1993 et Ames et al. 1995).

Il est intéressant de noter que des niveaux élevés de lésions oxydatives de l'ADN ont été observés dans le sperme des fumeurs (Fraga et al., 1996) ce qui indique que les lésions oxydatives des cellules germinales mâles peuvent contribuer (avec l'exposition quotidienne des cellules somatiques) au développement des cancers et de défauts de naissance chez les enfants de pères fumeurs (Woodall et al., 1997). En effet, des données épidémiologiques indiquent que le taux d'incidence de tout les types de cancers pédiatriques est plus élevé chez les enfants de parents fumeurs : le risque de la leucémie lymphoblastique aiguë, de lymphome et du cancer du cerveau est de 3 à 4 fois plus élevée chez les enfants issus de familles avec une histoire de consommation du tabac (Ji et al., 1997)

Cependant, malgré le nombre grandissant de données épidémiologiques qui suggèrent l'existence d'une relation causative entre le stress oxydatif et la carcinogénèse, relativement peu est connu sur le degré et sur la nature de l'implication des lésions oxydatives dans la carcinogénèse. Le spectre mutationnel des gènes *p53* et *ras*, impliqués dans une vaste majorité des cancers est caractérisé par une fréquence élevée de transversions G en T (l'empreinte moléculaire des lésions causées par le 8-oxo-dG) (Shen et Ong, 1996). Dans ce cas, le stress oxydatif semble influencer le fardeau mutationnel.

L'un des mécanismes possibles de transformation néoplasique implique les effets du stress oxydatif sur la signalisation intracellulaire. En modifiant le statut redox intracellulaire, le stress oxydatif peut affecter certains résidus protéiques tels que les groupes sulfhydriques. Ainsi, suite à une attaque oxydative les protéines dont les domaines stratégiques contiennent des résidus de cysteine pourraient subir d'importants changements structuraux et fonctionnels. Des études

in vitro ont démontré que le stress oxydatif modifiait la capacité de liaisons des facteurs de transcription tels que AP-1, NF- κ B, Sp1, p53, Egr-1 et autres (Sun et Oberley, 1996). La modification de l'activité des enzymes impliquées dans la transduction des signaux constitue un autre mécanisme de régulation des facteurs de transcription par le stress oxydatif. Il a été démontré que le peroxyde d'hydrogène peut modifier l'activité des kinases et des phosphatases (Mendelson et al., 1996) et ceci peut avoir un impact sur l'activité des facteurs transcriptionnels qui sont la cible de ces enzymes, tels que NF- κ B, c-Jun, Ets et Sp1 (O'Neill et al., 1994). Le stress oxydatif peut aussi moduler la signalisation cellulaire en influençant le niveau du calcium intracellulaire. Il a été observé notamment que l'exposition des fibroblastes à de faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène induit leur prolifération (Burdon et al. 1989). Ainsi, les hydroperoxydes (ou d'autres agents qui induisent la génération de radicaux libres) détériorent la séquestration du calcium et causent la libération du calcium à partir de la mitochondrie et d'autres réserves intracellulaires (Lotscher et al, 1980). Il a été montré que l'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium modifie le niveau de réplication d'ADN (Jensen et al. 1990) et de la prolifération cellulaire (Frucht et al., 1999). Cependant, si le calcium extracellulaire est considéré comme facteur de protection contre le cancer (cancer du côlon) (Kearney et al. 1996), l'effet direct du calcium intracellulaire sur la carcinogénèse reste encore indéterminé.

Il semble donc que l'effet carcinogène du stress oxydatif est causé par 1) l'impact mutational de ce dernier sur les gènes impliqués dans les processus de division et de différenciation cellulaire et 2) son impact indirect sur la signalisation intracellulaire.

1.6 La mitochondrie et la cellule.

La mitochondrie est une organelle de 3 à 7 microns de longueur et de 0,5 à 1 micron de largeur dont le rôle primordial est de produire l'ATP via la phosphorylation oxydative. Il est à noter que les 2,000 à 10, 000 mitochondries présentes dans chaque cellule représentent près de 25 % la masse cellulaire.

La présence des mitochondries dans les cellules eukaryotes peut s'expliquer par la « la théorie endosymbiotique », proposée il y a 30 ans par Lynn

Margulis (Margulis, 1970), qui stipule une association symbiotique vieille d'environ 1,5 milliards d'années entre une cellule proto-eucaryote glycolitique et une bactérie à métabolisme oxydatif. Cette hypothèse propose un scénario dans lequel un proto-eucaryote anaérobique aurait acquis un avantage sélectif en engloutissant une bactérie aérobique (probablement une α -protobactérie). Cette symbiose aurait été stabilisée par un avantage mutuel : l'ATP produit par la respiration oxydative de la bactérie aérobique contre les substrats métaboliques et la protection physique offerts par l'hôte proto-eucaryote. Ainsi les mitochondries modernes ont retenu certaines caractéristiques spécifiques telles qu'une structure à double membrane, un génome circulaire et des mécanismes de transcription, traduction et d'assemblage de protéine, qui témoignent leur origine endosymbiotique.

1.6.1 La génétique mitochondriale.

Le génome mitochondrial des mammifères est une molécule circulaire de 16.5 kb contenant : 13 gènes dont les produits sont des constituants essentiels du complexe phospho-oxydatif, 22 gènes encodants les tARNs nécessaires pour la synthèse mitochondriale des protéines, et les gènes encodant les parties 12S et 16S des ribosomes mitochondriaux. Les autres protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative, les enzymes métaboliques, les ADN et ARN polymérase, les protéines ribosomiques et les facteurs régulateurs mitochondriaux tels que le facteur transcriptionnel mitochondrial A (Tfam) sont codées par le noyau et importées dans la mitochondrie à l'aide de plusieurs protéines chaperonnes (ex.Hsp60 et 61).

Les milliers de mitochondries par cellules (et donc les milliers d'ADN mitochondriaux) sont transmises uniquement par voie maternelle lors de fertilisation de l'oocyte (riche en mitochondries) et du sperme dont la tête est dépourvue de mitochondries (Gilles et al. 1980). De plus, la réplication de l'ADN mitochondrial et la multiplication des mitochondries sont indépendantes du cycle cellulaire et semblent être plutôt dirigées par les besoins énergétiques de la cellule (Bunn et Wallace, 1974).

Le taux mutationnel de l'ADN mitochondrial est de 10 à 20 fois plus élevées que celui de l'ADN nucléaire (Neckelmann et al., 1987, Wallace et al., 1987). Suite à un événement mutationnel, la population cellulaire des génomes

mitochondriaux est dans un état hétéroplasmique, c'est-à-dire qu'elle est composée d'un mélange d'ADNs mitochondriaux mutants et sauvages. Lors de la division d'une cellule hétéroplasmique, les génomes sauvages et mutants sont répartis dans les cellules filles d'une façon aléatoire, de manière à ce qu'au courant de plusieurs générations le génotype prédominant de la population mitochondriale dérive vers l'une des deux formes. Ce processus est connu sous forme de la ségrégation répllicative.

1.6.2 La biologie mitochondriale.

Dans les cellules des mammifères, la mitochondrie joue un rôle essentiel dans la production d'énergie sous forme d'ATP, dans la régulation de la mort cellulaire programmée et dans la génération des radicaux libres d'oxygènes.

Les protéines impliquées dans le processus de la respiration oxydative incluant les composantes de la chaîne de transport des électrons (CTE), l'ATP synthase et le translocateur de l'adénine (« adenine nucleotide translocator » (ANT)) sont localisées dans la membrane interne de la mitochondrie. Le complexe CTE est responsable de l'oxydation de l'hydrogène provenant de l'oxydation des acides organiques tels que le pyruvate ainsi que de l'oxydation des acides gras contenant un atome d'oxygène, les deux processus menant à la génération de l'eau. Ainsi, les électrons transportés par le NAD^+ (« nicotidénamine adenine dinucleotide ») sont premièrement transférés au complexe respiratoire I (NADH déshydrogénase), d'où ils sont pris en charge par le coenzyme Q_{10} (CoQ). En même temps, les électrons provenant du cycle tricarboxylique sont transférés au complexe II (succinate déshydrogénase) via le succinate pour être ensuite passés au CoQ. À partir de celui-ci, les électrons passent d'une manière séquentielle par le complexe III, le cytochrome *c* (cyt *c*), le complexe IV (la cytochrome *c* oxidase, COX) pour finalement réduire une demi-molécule d'oxygène, ce qui génère de l'eau. Lors du transfert de chaque électron à partir des éléments réduits vers le CTE, un proton est pompé à travers la membrane interne de la mitochondrie. Le gradient électrochimique généré ainsi entre l'espace intermembranaire positif et acide et la matrice mitochondriale négative et alcaline constitue un condensateur qui peut être dépolarisé par un influx de protons vers l'intérieur de la matrice à travers le canal protonique de la partie F_0 de l'ATP synthase. La théorie de la réponse chimiosmotique propose

que cet influx de proton actionne la condensation de l'ADP (adénosine diphosphate) et P_i (phosphate inorganique) qui génère l'ATP. Celui-ci est ensuite exporté par l'ANT vers le cytosol en échange de ADP. Ainsi, le gradient électrochimique couple la consommation de l'oxygène par le complexe CTE avec la phosphorylation de ADP par l'ATP synthase.

La mitochondrie joue aussi un rôle essentiel dans le processus d'initiation de l'apoptose. Des études récentes suggèrent que l'étape initiale de l'apoptose implique l'ouverture d'un canal non-spécifique de la membrane interne de la mitochondrie, le mtPTP (Green and Reed, 1998). Ceci occasionne l'effondrement du gradient électrochimique, le gonflement de l'espace intermembranaire mitochondrial et la libération de facteurs apoptotiques. En effet, l'espace intermembranaire renferme plusieurs facteurs apoptotiques tels que le cytochrome *c*, les caspases et le facteur AIF. Une fois dans le cytoplasme, le cytochrome *c* active le système de dégradation des protéines cytoplasmiques, détruisant ainsi la surface externe de la membrane mitochondriale. Ce processus est médié par les caspases. Le facteur AIF migre dans le cytoplasme et induit la destruction de la chromatine (Susin et al. 1999). L'ouverture des canaux mtPTP, l'élément initial de la cascade apoptotique, semble être induite par le stress oxydatif, le déclin des capacités énergétiques mitochondriales ou une réabsorption excessive du calcium (Marzo et al, 1998, Green et Reed, 1998).

1.6.3 Les maladies mitochondriales

L'interaction entre les processus de la phosphorylation oxydative, de la génération de radicaux libres d'oxygène et de l'initiation de l'apoptose peut en partie expliquer quelques aspects perplexes de la pathophysiologie des maladies mitochondriales. En effet, les manifestations cliniques de ces maladies peuvent être diverses et chevauchantes, c'est-à-dire qu'une mutation mitochondriale peut générer des phénotypes très différents et plusieurs mutations peuvent produire des phénotypes similaires. Il en suit que la nature des mutations et non pas les manifestations cliniques constituent le critère de classification des maladies mitochondriales.

Le paradigme des maladies mitochondriales stipule qu'au fur et à mesure que la proportion cellulaire des génomes mutants augmente (ce qui est une conséquence de la replication ségrégative), la capacité énergétique de la cellule

diminue jusqu'à ce qu'elle atteigne un niveau bioénergétique critique et minimal pour le fonctionnement normal de la cellule. En bas de ce niveau, la demande énergétique de la cellule dépasse la capacité de production d'énergie (on croit que ceci est le cas quand la fraction mutante représente plus de 80 % de la population cellulaire) (Wallace DC, 1995), entraînant l'apparition des premiers symptômes de la maladie. La nature stochastique et quantitative de la propagation de l'ADN mitochondrial est à l'origine de la variabilité de transmission et d'expression des mutations hétéroplasmiques. De plus, les fluctuations stochastiques de la fraction de génomes mutants entre les générations peuvent expliquer le fait qu'une mutation ait des effets phénotypiques différents et ceci, à l'intérieur d'une même famille (Tanaka et al. 1998, Black et al. 1996).

Une vingtaine de symptômes ont jusqu'à maintenant été liés à des mutations du génome mitochondrial (Treem et al. 1998). Les lésions mitochondriales pathogéniques se divisent en réarrangements et substitutions. Les substitutions peuvent être ensuite subdivisées en mutations anti-sens des 13 gènes codants les protéines du complexe respiratoire et en mutations des gènes ARNr et ARNt.

La variabilité clinique qui peut accompagner les mutations anti-sens à caractère hétéroplasmique est très bien illustrée par les mutations du génome mitochondrial responsables du syndrome de la Neuropathie Optique Héritaire de Leber (NOHL), de la dystonie et la maladie de Leigh. Le syndrome de NOHL et la dystonie sont causés par la même mutation, MTND6*LDYT14459A : une transition de G en A dans le gène mitochondrial *ND6* dont le produit est une sous-unité de la NADH déshydrogénase. Cette mutation convertit le résidu hautement conservé d'alanine en une valine au codon 72. Contrairement aux symptômes du syndrome NOHL, caractérisés par un assaut brusque de cécité vers la milieu de leur vie causé par la mort subite du nerf optique, les symptômes de la dystonie se manifestent relativement tôt et se caractérisant par des troubles généraux de mouvement, une détérioration de la parole, un ralentissement du développement mental, des troubles de croissance et la dégénération des ganglions basaux. Certaines études suggèrent que les différences dans les manifestations cliniques des deux syndromes sont liées aux proportions du génome mutant dans la population mitochondriale d'individus affectés (Jun et al. 1994, Shoffner et al. 1995). En effet, la dystonie semble être associée avec une proportion élevée de la

mutation MTND6*LDYT14459A par rapport aux individus affectés par le syndrome du NOHL. Notons cependant que même si la nature de la mutation MTND6*LDYT14459A et son effet biochimique sont bien connues (une réduction substantielle de l'activité du complexe I (Jun et al. 1996)), son rôle exact dans l'étiologie des deux maladies reste à déterminer. Notamment, nous ne savons pas comment une seule mutation peut engendrer deux phénotypes différents.

Les mutations mitochondriales des gènes dont les produits sont responsables de la synthèse protéique sont à l'origine d'une vaste et complexe gamme de symptômes. Au niveau des mitochondries, ses mutations compromettent l'efficacité de la synthèse protéique entraînant une baisse de la capacité énergétique de l'organelle. Les tissus dont les mitochondries sont mutées aux gènes ARNr ou ARNt se distinguent sur le plan morphologique par un nombre élevé de mitochondries dans le cytoplasme des cellules. Il est donc possible qu'afin de maintenir le même niveau de production énergétique, la cellule favorise la réplication mitochondriale. Dans certains cas, lorsque ces mutations se trouvent à l'état hétéroplasmique, elles peuvent causer des troubles du système nerveux central, l'ensemble de ces troubles étant connu sous le nom des encephalomyopathies mitochondriales. À l'inverse de la mutation MTND6*LDYT14459A, où la proportion du génome mutant dans la population mitochondriale semble déterminer la nature du syndrome (NOHL ou la dystonie), les caractéristiques des manifestations cliniques des différentes encephalomyopathies mitochondriales ne dépendent que de la nature des mutations impliquées. Ainsi, l'épilepsie myoclonique est associée uniquement avec la mutation MTTK*MERRF8344G dans le gène tARN^{Lys} (Wallace et al. 1988). Il est intéressant de noter que certaines mutations homoplasmique des gènes rARN et tARN sont beaucoup moins sévères que la plupart des mutations hétéroplasmiques. Ceci est notamment le cas de la mutation MTTQ*ADPD4336C du gène tARN^{Gln}, associée avec la maladie d'Alzheimer du type tardif (Hutchin et Cortopassi, 1995).

Les maladies mitochondriales impliquant des réarrangements de l'ADN mitochondrial incluent le syndrome de Pearson et le diabète mellite héréditaire avec cécité.

En terminant, il est important de remarquer que même si les génopathies mitochondriales se caractérisent par une panoplie de symptômes, toutes les manifestations cliniques impliquent les tissus avec des besoins énergétiques importants tels que les fibres musculaires et le système nerveux central.

1.6.4 La mitochondrie et le vieillissement.

L'apparition subite et le caractère progressif des maladies mitochondriales suggèrent que le fonctionnement mitochondrial peut décliner avec l'âge. L'accumulation des réarrangements somatiques de l'ADN mitochondrial dans les tissus post-mitotiques des primates ainsi qu'un déclin gériatrique de l'efficacité phosphorylative dans les cellules du muscle, du cerveau et du foie semblent supporter cette hypothèse (Trounce et al. 1989). Chez les humains, il a été démontré que les fibres musculaires provenant de sujets de moins de 40 ans contiennent principalement de l'ADN mitochondrial intact. À l'inverse, les génomes mitochondriaux de ces mêmes tissus, mais provenant de sujets dont l'âge moyen dépasse la cinquantaine sont caractérisés par une panoplie de réarrangements génomiques (Melov et al. 1995). De plus, le spectre mutationnel des fibres musculaires provenant de sujets sénescents diffère non seulement d'un individu à l'autre mais aussi d'une fibre à l'autre (Müller-Hocker et al. 1992). Ceci semble suggérer que chacune des mutations est apparue *de novo* pour être ensuite amplifiée d'une manière sélective engendrant ainsi un défaut respiratoire local.

Les mutations somatiques du génome mitochondrial ont aussi été retrouvées dans le cerveau. Les études de quantification de la délétion de 4,977 paires de bases (une des délétions somatiques les plus fréquentes et observée dans plusieurs tissus) ont mis en évidence une accumulation significative de cette lésion dans les ganglions basaux d'individus dont l'âge dépasse 75 ans, atteignant chez les individus de 80 ans et plus un niveau de 12% du total des génomes mitochondriaux. Or, pendant la vie adulte, le niveau de cette délétion reste bas, tel que mesuré dans le cervelet (Corral-Debrinski et al. 1992a, Song et al. 1992). Étant donné que la plupart des études quantifiant le niveau de lésions du génome mitochondrial selon l'âge ont démontré que celles-ci s'accumulent d'une façon semblable à la délétion commune, il a été proposé que chez les individus

sénescents, une portion substantielle des ADNs mitochondriaux des tissus post-mitotiques peut-être mutée (Corral-Debrinski et al. 1992*b*).

Plusieurs indices portent à croire que le stress oxydatif peut-être à l'origine de l'accumulation de mutations observée avec l'âge. Des niveaux de 8 à 2,000 plus élevés que la moyenne de lésions mitochondriales ont été observés chez les patients souffrant de la ischémie cardiaque chronique (Corral-Debrinski et al. 1992*b*), une condition associée avec la libération massive de radicaux libres d'oxygène lors des épisodes d'ischémie et de repérfusion. De même, les tissus corticaux des patients souffrant des maladies d'Alzheimer et de Huntington contiennent des niveaux élevés de génomes mitochondriaux délétés (Corral-Debrinski et al. 1994, Horton et al. 1995). Il a été démontré ultérieurement que les lésions des ADNs mitochondriaux provenant de patients atteints de la maladie de Huntington sont de caractère oxydatif (Mecocci et al. 1994).

Toutes ces observations ont mené à proposer que l'impact du stress oxydatif sur le génome mitochondrial constitue l'une des causes principales du phénomène du vieillissement. Ce modèle postule que les lésions oxydatives somatiques subies par le génome mitochondrial au courant de la vie entraîneraient un déclin de la performance respiratoire mitochondriale dégradant ainsi la capacité bioénergétique des tissus. La chute de cette capacité en bas d'un certain niveau critique serait à l'origine de la dégénération tissulaire et du vieillissement. Notons que ce modèle ressemble beaucoup à celui expliquant le rôle de mutations germinales du génome mitochondrial dans l'étiologie des maladies mitochondriales. Dans les deux cas, les lésions de l'ADN mitochondrial entraînent une baisse de la capacité bioénergétique compromettant ainsi le fonctionnement normal des tissus à haute demande énergétique.

1.7 Les mutations mitochondriales et le stress oxydatif.

Le stress oxydatif, tel que mesuré par le niveau de radicaux libres comme agents mutagènes est reconnu comme un des agents étiologiques du cancer. La mitochondrie étant le site de la phosphorylation oxydative est donc en grande partie responsable du niveau de radicaux libres dans la cellule et du fardeau mutationnel causé par le stress oxydatif. Dans cette section, nous allons présenter les évidences qui suggèrent qu'une mutation du génome mitochondrial peut

entraîner la génération de radicaux libres d'oxygène et entraîner une modification du niveau du stress oxydatif.

1.7.1 Les mutations du génome mitochondrial peuvent augmenter la production de radicaux libres d'oxygène.

Il est difficile de présenter un mécanisme précis qui pourrait lier les mutations du génome mitochondrial à la transformation néoplasique. Néanmoins, le stress oxydatif constitue un lien plausible entre ces deux concepts. Etant donné que les éléments du complexe respiratoire codés par les gènes mitochondriaux sont impliqués dans le recyclage d'intermédiaires réduits, la plupart des mutations subies par l'ADN mitochondrial prédispose la mitochondrie à une augmentation de la génération d'oxygène actif, puisque ces éléments subiront une auto-oxydation par l'eau. Le génome mitochondrial encode le cytochrome *b*, trois grandes sous-unités hydrophobiques de la cytochrome oxidase, deux sous-unités de la F_0F_1 -ATPase, 2 ARN ribosomiaux nécessaires à l'assemblage des ribosomes mitochondriaux, tout les ARNts mitochondriaux et sept unités hydrophiliques de la NADH déshydrogénase. Ainsi, les mutations du génome mitochondrial peuvent compromettre le fonctionnement entre autres de la cytochrome oxidase, ubiquinol : cytochrome *c* oxidase (qui contient le cytochrome *b*), NADH déshydrogénase ou du complexe de la F_0F_1 -ATPase.

Il est important de noter que même à son état normal, suite à l'auto-oxydation des intermédiaires réduits de la flavine, du complexe ferro-sulphurique et de l'ubiquinone générés par le succinate, le NADH et d'autres déshydrogénases, la chaîne respiratoire de la mitochondrie libère de faibles quantités de O_2^{\cdot} et H_2O_2 (Trumpower et Simmons 1979, Bandy et Davidson, 1990). En effet, la mitochondrie consomme près de 90 % d'oxygène cellulaire et dans les conditions normales environ 1 à 2 % de cet oxygène est partiellement réduit en particules d'oxygène actif par la fuite des électrons de la chaîne respiratoire (Tzagoloff and Boveris, 1986). Une des conséquences possibles des lésions mutagéniques sur les composantes du complexe respiratoire serait la modification du niveau de fuite des électrons. Une lésion qui aurait pour effet d'augmenter le niveau de la fuite des électrons à partir de la chaîne respiratoire entraînerait une augmentation de la production d'éléments d'oxygène actif. Effectivement, au lieu de réduire l'oxygène d'une façon complète afin de générer

de l'eau, les électrons ayant fuit la chaîne respiratoire d'une façon précoce réduiraient l'oxygène atmosphérique d'une façon partielle produisant ainsi de l'oxygène actif (voir réaction 4 dans la figure 1.5.1), (Cocco et al. 1999). À l'inverse, une lésion du génome mitochondrial pourrait générer un élément du complexe respiratoire dont l'activité diminuerait le niveau de fuite des électrons, diminuant par conséquent la chance d'une réduction partielle d'oxygène.

De plus, les éléments de la chaîne respiratoire codés par les gènes mitochondriaux sont responsables de l'oxydation des différents composés réduits tels que les flavines ou l'ubiquinol. En endommageant les éléments du complexe respiratoire, les mutations subies par le génome mitochondrial pourraient modifier le niveau d'éléments réduits, ce qui pourrait entraîner une modification du niveau de radicaux libres issus de l'auto-oxydation des éléments réduits. Cette supposition est basée en partie sur l'observation que l'inhibition de l'activité des enzymes responsables de l'oxydation des éléments réduits (la cytochrome oxydase ou le cytochrome *b*) stimule la génération de O_2' et de H_2O_2 par les mitochondries (Forman et Boveris, 1982; Turrens et Boveris, 1980).

En somme, les évidences présentées ci-haut suggèrent que les mutations du génome mitochondrial peuvent avoir un effet sur le niveau de radicaux libres d'oxygène.

1.8 L'approche expérimentale

Afin de tester si les variants génétiques mitochondriaux modifient le risque du cancer, nous allons étudier l'association entre les haplogroupes mitochondriaux européens et la susceptibilité à la maladie. Cette section a pour but d'introduire le concept d'un haplogroupe et de présenter l'approche expérimentale développée dans le cadre de cette étude.

1.8.1 Les études d'association.

Plusieurs approches permettent d'identifier les gènes impliqués dans l'étiologie des maladies complexes. Certaines méthodes sont basées sur l'analyse du déséquilibre de liaison chez les individus apparentés ou chez les jumeaux. Les études d'association sont un autre outil permettant l'identification des régions chromosomiques contenant des loci impliqués dans l'expression des traits phénotypiques sous investigation. De surcroît, les études d'association cas-

contrôles sont considérées comme une méthode de choix pour la cartographie des loci impliqués dans l'expression des maladies (ou traits) complexes. Etant donné que le cancer non-héréditaire est considéré comme une maladie génétique complexe dont l'étiologie peut s'expliquer par l'interaction de plusieurs gènes à faible pénétrance, les études d'association cas-contrôles constituent un outil permettant l'identification des loci impliqués dans l'étiologie du cancer. Le principe de base des études d'associations consiste à identifier un locus-marqueur dont certains allèles sont distribués d'une façon non aléatoire entre les cas et les contrôles. Une association statistique entre l'allèle en question et le phénotype implique une relation causative entre le locus et le phénotype ou une liaison physique entre le locus marqueur et le locus impliqué dans l'ontogenèse du phénotype.

Dans la présente étude d'association, nous avons considéré la mitochondrie comme un locus polymorphe qui, chez les Européens est caractérisé par la présence de 9 variants. Ces variants, définis par des mutations spécifiques représentent des haplogroupes mitochondriaux. Afin de déterminer s'il existe un lien entre ces marqueurs et le cancer, nous avons analysé la distribution des 9 haplogroupes mitochondriaux européens dans trois groupes de patients cancéreux et dans un groupe contrôle.

1.8.2 L'analyse de la variabilité mitochondriale

La nature, la prévalence et la distribution géographique de la variabilité mitochondriale reflètent l'histoire des femmes. Etant donné que les mutations mitochondriales s'accumulent d'une manière séquentielle le long de lignées maternelles, les lignées mitochondriales ont divergé suivant les routes de migration qu'ont empruntées les femmes lors de l'expansion mondiale de l'espèce humaine pendant les 150,000 ans suivant son apparition en Afrique. Il en suit que la diversité mitochondriale est corrélée avec la distribution ethnique et géographique des individus.

L'analyse de la nature de la variabilité mitochondriale s'effectue à l'aide de deux approches complémentaires. La première approche, développée au courant des années 80 par l'équipe de D.C. Wallace, consiste à analyser le profil de digestion de l'ADN mitochondrial avec un ensemble de 13 enzymes de restriction : *AluI*, *MseI*, *BstOI*, *BamH1*, *HinfI*, *DdeI*, *HhaI*, *HincII*, *HpaI*, *HaeII*,

HeaIII, *BfaI*, et *NlaIII*. Cette procédure permet de scruter plus de 20 % de la séquence de l'ADN mitochondrial (Torrioni et al. 1992). Une combinaison particulière de profils de digestions d'une molécule d'ADN mitochondrial définit un haplotype et un groupe d'haplotypes caractérisés par un motif central constitue un haplogroupe. Le tableau 1.8.2. présente les motifs qui caractérisent les 9 haplogroupes retrouvés dans les populations européennes : à titre d'exemple, on peut remarquer que l'haplogroupe V est défini comme un ensemble d'haplotypes caractérisés par la perte du site de restriction de l'enzyme *MseI* à la position 14766. En utilisant cette approche, l'équipe de Wallace (Torrioni et al., 1994) a réussi à classer la grande majorité de la variabilité mitochondriale dans des haplogroupes de sorte que les analyses complexes de la distribution géographique des haplogroupes et les estimations des dates de leurs expansions ont permis de jeter plus de lumière sur les événements marquants de l'expansion spatiale de l'homme moderne (revue en détail dans Wallace, 1995). La deuxième approche, développée au début des années 90, consiste à séquencer la région non-codante contrôle de l'ADN mitochondrial qui est caractérisée par un degré de diversité 3 à 4 fois plus élevé que celui de la région codante. Il est important de remarquer que ces deux types de données (le profil de digestion de la région codante et les séquences de la région contrôle) sont complémentaires. L'utilisation des deux ensembles de données constitue un outil puissant qui permet d'effectuer des

Tableau 1.8.2: les motifs caractérisant les haplogroupes européens.

Haplogroupe	Motif
H	-7025 <i>AluI</i>
	-14766 <i>MseI</i>
V	-14766 <i>MseI</i>
U	+12308 <i>HinfI</i>
K	+12308 <i>HinfI</i>
	+10394 <i>DdeI</i>
	-9052 <i>HaeII</i>
J	-13704 <i>BstOI</i>
	+10394 <i>DdeI</i>
	+4216 <i>NlaIII</i>
T	-15925 <i>MspI</i>
	+13366 <i>BamHI</i>
	+4914 <i>BfaI</i>
I	+4216 <i>NlaIII</i>
	+10032 <i>AluI</i>
	-8250 <i>HaeIII</i>
W	-8250 <i>HaeIII</i>
X	+14465 <i>AccI</i>

N.B.

Les gains et les pertes par d'un site de restriction par rapport à la séquence consensus (Anderson et al., 1981) sont indiqués par les signes (+) et (-), respectivement.

analyses beaucoup plus détaillées et informatives (Quintana-Murci et al 1999; Kivisild et al. 1999 ; Brown et al. 1998 et Torroni et al 1998). Malheureusement jusqu'à maintenant une synthèse complète et informative des séquences et des RFLPs n'a été publiée que pour les populations européennes (Macaulay et al 1999).

1.8.3 La variabilité mitochondriale des populations européennes.

Dans les populations européennes, un ensemble de 13 polymorphismes dinucléotidiques répartis dans la partie codante de l'ADN mitochondrial permet de classer plus de 95% de la variabilité mitochondriale dans 9 haplogroupes distincts. Les treize polymorphismes ont été initialement identifiés par la technique RFLP et correspondent aux sites de digestions de treize enzymes de restrictions (voir ci-haut).

La figure 1.8.3 est une représentation schématique des relations phylogénétiques entre les 9 haplogroupes européens dans le contexte de la variabilité mondiale. L'arbre est enraciné par la séquence mitochondriale provenant de l'homme de Néanderthal (Krings et al., 1997). Il est intéressant de noter que tout les haplogroupes européens émanent de l'haplogroupe africain L3a que l'on considère comme point d'origine de la grande majorité des haplogroupes mondiaux (Watson et al., 1997).

L'haplogroupe H, distribué d'une façon uniforme dans les populations européennes et dont l'origine remonte au Moyen-Orient à 25,000-30,000 regroupe près de 50 % de la diversité mitochondriale en Europe. Cet haplogroupe est apparenté phylogénétiquement à l'haplogroupe V qui regroupe un peu moins de 5 % de la variabilité mitochondriale européenne. L'haplogroupe V, qui semble avoir pris naissance dans la partie Nord de la péninsule ibérique il y entre 10,000 et 15,000 ans, devient de plus en plus rare au fur et à mesure que l'on se déplace vers l'est du continent. Cette distribution ainsi que son temps de coalescence font de l'haplogroupe V le marqueur d'une expansion démographique majeure du Paléolithique supérieur, c'est-à-dire celle suivant la dernière période de glaciation (Torroni et al 1998).

L'haplogroupe K regroupe près de 7 % de la variabilité mitochondriale européenne. Sa distribution géographique ainsi que son temps de coalescence

estimé à entre 13,500 et 17,500 ans (Richards et al. 1998 et Torroni et al. 1994) ressemblent à ceux de l'haplogroupe V et en font un autre marqueur putatif de la dernière expansion post-glaciale.

L'haplogroupe K est en général considéré comme un sous-groupe de l'haplogroupe U dont les origines remontent il y a environ 50,000 ans probablement en Afrique de l'Est. Ce dernier est caractérisé par une structure phylogénétique complexe, les différentes parties de laquelle s'avèrent restreintes à des régions géographiques bien définies. En effet, les 7 sous-groupes de l'haplogroupe U (U1-U7) ont une distribution géographique très précise, le sous-groupe U5 étant restreint à l'Europe et le sous-groupe U2 représentant plus de 90 % de l'haplogroupe U présent dans les populations indiennes (Kivisild et al. 1999). L'estimation de la coalescence de l'haplogroupe U5 (40,000-50,000 ans) (Richards et al. 1998) correspond à l'arrivée en Europe de l'industrie augrignacienne, caractérisée par un bel outillage osseux et des lames à retouche écailleuse, qui constitue la première industrie majeure en Europe à être accompagnée par les restes de l'homme anatomiquement moderne. L'haplogroupe U5 semble donc avoir été introduit en Europe par la première vague de migration de *Homo sapiens sapiens*.

L'haplogroupe J regroupe environ 11 % de la diversité mitochondriale en Europe. La phylogénie de cet haplogroupe est centrée autour des haplotypes dont les motifs ne semblent être présents qu'au Moyen-Orient. On trouve les différents sous-groupes de l'haplogroupe J dans des régions géographiques précises. À titre d'exemple, on ne retrouve le sous-groupe J1 que dans les Alpes, alors que le sous-groupe J1b1 n'a été retrouvé que chez les Britanniques (Richards et al. 1998). L'estimation du temps de coalescence des différents sous-groupes de J présents en Europe (de 7,000 à 10,000 ans) ainsi que leurs relations phylogénétiques suggèrent qu'ils ont été introduit lors de l'expansion néolithique par plusieurs vagues indépendantes de migrations.

L'haplogroupe T, considéré comme apparenté phylogénétiquement avec l'haplogroupe J, regroupe environ 8 % de la diversité mitochondriale européenne. On estime son temps de coalescence à 22,000-29,000 ans.

Les haplogroupes I, W et X regroupent seulement 5 % de la variabilité mitochondriale en Europe. L'haplogroupe I dont on estime l'âge à 35,000 ans est présent particulièrement dans le nord et l'ouest du continent. L'haplogroupe W est

un peu plus jeune (18,500 ans) et on le retrouve principalement dans la partie sud de l'Europe. L'haplogroupe X représente moins de 2 % de la variabilité mitochondriale en Europe et son temps de coalescence est estimé à environ 24,000 ans. Il est intéressant de noter qu'on retrouve aussi cet haplogroupe parmi les Amérindiens parlant les langues de la famille Na-Dene. En effet, les études récentes ont démontré que même si distincts, les variants de l'haplogroupe X spécifiques à l'Europe et ceux spécifiques aux Amérindiens sont néanmoins apparentés phylogénétiquement (Brown et al. 1998). L'estimation de la date de coalescence des variants nord-américains de l'haplogroupe X allant de 12,000 à 36,000 ans, supporte la notion que les porteurs de ce marqueur faisaient parti des premiers fondateurs des populations nord-américaines. À ce jour, il est impossible d'identifier hors-doute la présence de l'haplogroupe X en Asie. Ceci soulève la possibilité que certains des premiers fondateurs des peuples Amérindiens étaient d'origine caucasienne.

En somme, le portrait mitochondrial européen est caractérisé par la présence de 9 haplogroupes dont l'arrivée coïncide avec les expansions démographiques du Paléolithique Supérieure tard et du Néolithique.

1.8.4 Le design expérimental.

Les haplogroupes ne représentent que des regroupements majeurs de la variabilité mitochondriale. Notamment, il a été mentionné que les haplogroupes J, U et X possèdent une structure phylogénétique riche qui est un reflet de leur diversité interne. Depuis quelques années, on commence à s'apercevoir que ceci n'est pas seulement le cas de ces trois haplogroupes. En effet, à l'intérieur de chacun des 9 haplogroupes européens, il existe un vaste répertoire de variabilité (schématisée symboliquement sur la figure 1.8.2 par les croix vertes). La digestion d'une molécule d'ADN mitochondrial avec les 13 enzymes de restrictions peut générer plus d'une cinquantaine de fragments ce qui signifie que cette molécule contient plusieurs sites de restrictions propres à chacun des enzymes et témoigne de sa diversité. Il a été estimé que l'utilisation des treize enzymes de restrictions

La généalogie mondiale de l'ADN mitochondrial

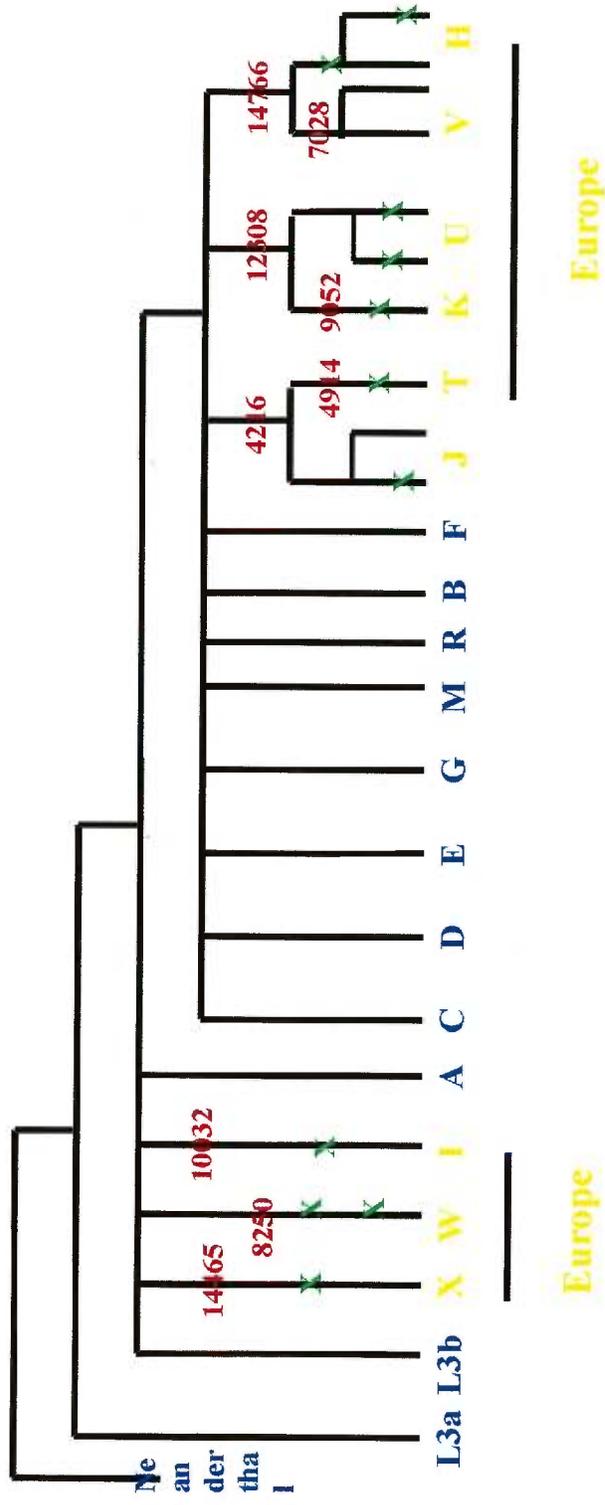


Figure 1.8.3

Les mutations principales définissant les haplogroupes européens sont indiquées en rouge. La nature de ces mutations est décrite dans le tableau 1.8.2. La variabilité de nature inconnue est représentée schématiquement par des lettres «xX» en vert.

permet de scruter seulement 20 % du génome mitochondrial (Torroni et al. 1992). Bien évidemment seul le séquençage complet du génome mitochondriale serait en mesure de révéler toute la variabilité de cette molécule. Cependant, étant trop coûteuse dans son état actuel, cette approche n'est pas utilisée comme moyen de génotypage. Donc, on supposant que le restant 80 % du génome mitochondrial est autant variable que le 20 % déjà analysé, nous pouvons dire que les moyens actuels de génotypage basés sur la technique RFLP nous permettent d'amasser qu'un aperçu de la totalité de la variabilité mitochondriale.

Par ailleurs, si nous pouvons revendiquer une bonne connaissance de la nature du 20 % de la variabilité, nous ne pouvons pas dire autant de l'état actuel de notre connaissance de ses effets phénotypiques. En effet, même si nous sommes en mesure de spéculer sur les implications phénotypiques de plusieurs polymorphismes, notamment ceux impliqués dans l'étiologie des génopathies mitochondriales (voir l'exemple du syndrome NOHL et d'autres maladies mitochondriales), jusqu'à maintenant aucun variant fonctionnel du génome mitochondrial n'a été identifié et caractérisé (dans le cas des maladies mitochondriales nous avons une bonne connaissance de la nature des mutations impliquées mais nous ne savons presque rien sur leurs rôle dans les mécanismes étiologiques sous-jacents).

L'étude de l'effet des mutations mitochondriales dans l'étiologie des maladies, y incluant le cancer se bute donc à un double obstacle : les moyens actuels de génotypage de l'ADN mitochondrial ne permettent d'amasser qu'une partie mineure de la diversité nucléotidique et les études des phénotypes biochimiques associés avec les polymorphismes mitochondriaux n'existent pas.

L'une des caractéristiques particulières de l'ADN mitochondrial pouvant apporter une solution aux difficultés décrites ci-haut est que cette molécule ne subit pas de recombinaison. Des études extensives de transmission des marqueurs RFLP dans les cellules en culture ont documenté d'une façon convainquante le maintien total du déséquilibre de liaison pendant la durée expérimentale (Giles et al., 1980 ; Case et Wallace, 1981). En effet, malgré deux études récentes qui suggèrent la recombinaison comme le principal mécanisme à l'origine de niveau élevé des homoplasmies (Eyere-Walker et al. 1999 et Hagelberg et al. 1999), aucune étude n'a jusqu'à maintenant démontré hors doute l'échange de marqueurs entre deux génomes mitochondriaux. Ainsi, la manque de recombinaison de

l'ADN mitochondrial fait en sorte que la totalité du génome mitochondrial est en déséquilibre de liaison complet.

L'absence de recombinaison dans un contexte d'analyses phylogénétiques nous permet de postuler que toute la variabilité dont nous ignorons encore la nature et l'effet phénotypique est en déséquilibre de liaison avec les mutations qui définissent les branches phylogénétiques sur lesquelles cette variabilité se trouve. Il en suit qu'en étudiant l'association entre les haplogroupes mitochondriaux et le risque d'une maladie, nous analysons l'association entre la maladie et toute la variabilité encore inconnue (y compris les mutations qui définissent les haplogroupes). Il est envisageable que sur une de ses branches phylogénétiques se trouve une mutation impliquée dans le cancer. Si c'est le cas, étant donné le déséquilibre de liaison complet, nous postulons qu'il y aura une association significative entre l'haplogroupe dont fait partie la mutation putative et le risque du cancer.

Notre approche phylogénétique est basée sur un précédent dans la littérature. En effet, il a été dernièrement démontré que l'haplogroupe J augmente la pénétrance des mutations responsables du syndrome de la Neuropathie Optique Héréditaire de Leber (NOHL) (Torrioni et al 1997). On dénombre aujourd'hui dans la littérature un total de 17 mutations ponctuelles du génome mitochondrial associées avec le développement du syndrome NOHL (Wallace et al. 1995). Cependant, plusieurs évidences génétiques, biochimiques et cliniques indiquent que seulement trois de ces dix-sept mutations peuvent être considérées comme mutations primaires, mettant les individus à haut risque de développer la maladie. Ces mutations représentent des changements nucléotidiques aux positions 3460 (Howell et al. 1991a), 11778 (Wallace et al. 1988) et 14484 (Mackey and Howell 1992; Johns et al. 1992). Afin d'établir une relation phylogénétique des mutations responsables du syndrome NOHL, l'équipe de Torrioni a analysé la distribution des 9 haplogroupes européens ainsi que celle des trois mutations primaires dans un groupe patients-contrôles d'origine italienne (37 patients et 99 contrôles). Ainsi, l'analyse de l'association entre la maladie et les haplogroupes mitochondriaux a permis de déterminer que seule la combinaison des mutations 4216 et 13708 (qui définit l'haplogroupe J) augmente d'une façon considérable la pénétrance des mutations primaires 11778 et 14484. Les mutations 4216 et 13708 impliquent des changements d'acides aminés dans les sous-unités ND1 et ND5

de la NADH déshydrogénase qui pourraient affecter la structure, la stabilité ou l'activité du complexe I en présence des changements nucléotidiques causés par les mutations 11778 (ND4) et 14484 (ND6). Ainsi, les auteurs proposent que l'augmentation de la pénétrance des mutations primaires 11778 et 14484 associées avec l'haplogroupe J soit causée par une combinaison particulière de multiples changements d'acides aminés au niveau des gènes codants pour la ND. Dès lors, la même approche a été utilisée pour identifier l'haplogroupe J comme facteur de risque associé avec la neurite optique (Reynier et al., 1999) et l'haplogroupe U comme facteur de risque de la congestion occipitale associée avec la migraine (Majamaa et al., 1998).

1.9 Objectifs.

Ainsi, afin de déterminer si les variants génétiques mitochondriaux modifient le risque du cancer nous avons effectué des études cas-contrôles dans lesquelles nous avons étudié :

- 1) la distribution des 9 haplogroupes européens dans trois groupes de patients cancéreux (141 enfants atteints de la LLA, 94 femmes atteintes du cancer du sein et 47 personnes atteintes du cancer du côlon) et dans un groupe de 241 contrôles ;
- 2) l'effet sur le risque du cancer de l'interaction des haplogroupes mitochondriaux avec :
 - les gènes responsables du métabolisme des produits carcinogènes
 - les gènes responsables du maintien de l'intégrité de l'ADN
 - les facteurs environnementaux du risque.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1 Echantillons biologiques

Un total de 540 individus d'origine canadienne-française, tels que déterminés par la langue maternelle ainsi que le lieu de naissance a été analysé dans cette étude. A) un groupe d'enfants atteints de la leucémie lymphoblastique aiguë (n=141), composé de 51 filles et 90 garçons âgés entre 3 et 18, qui furent diagnostiqués dans le centre d'hémo-oncologie de l'Hôpital Ste-Justine, à Montréal. B) un groupe de femmes atteintes du cancer du sein (n=98) diagnostiquées entre 1988 et 1992 dans 9 centres hospitaliers du Grand Montréal. C) un groupe d'individus atteint du cancer du côlon (n=47), diagnostiqués entre 1988 et 1993 dans 9 centres hospitaliers du Grand Montréal. D) un groupe d'individus contrôles (n=241) issus de 3 sources : 74 adultes (35 hommes et 39 femmes) provenant du Centre de Prélèvements Ste-Justine, 76 enfants (61 garçons et 15 filles) provenant de la salle d'accouchements de l'Hôpital Ste-Justine et 91 adultes (47 hommes et 44 femmes) recrutés dans les Centres de Prélèvements de 9 centres hospitaliers de la région du Grand Montréal

Le sang périphérique total, ainsi que les frottis buccaux constituent les principales sources de matériel biologique.

Le protocole de recherche dont fait parti cette étude a été revu et approuvé par le Comité Institutionnel d'Éthique (Hôpital Ste-Justine, Université de Montréal).

2.2 Isolement d'ADN.

L'extraction d'ADN à partir du sang a été effectuée à l'aide du kit commercial FastDNA[®] (BIO 101). L'extraction de l'ADN à partir des frottis buccaux a été effectuée à l'aide d'un protocole optimisé et publié (Richards et al., 1993).

2.3 Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction).

Le tableau 2.3.1 présente les séquences des treize paires d'amorces utilisées pour l'amplification des segments contenant les polymorphismes qui définissent les 9 haplogroupes européens. Le tableau 2.3.2 décrit les amorces

utilisées pour l'amplification des segments contenant les polymorphismes qui définissent les quatre haplogroupes retrouvés chez les Amérindiens. Dans les deux cas, l'extension riche en GC, ajoutée à la partie 5' de chaque amorce est indiquée en caractère gras. Le tableau 2.3.3 présente les combinaisons d'amorces utilisées pour les réactions en «duplexe». Celles-ci étaient réalisées avec une

Tableau 2.3.1: amorces utilisées pour l'amplification des 13 sites définissant les haplogroupes européens.

Amorce	Séquence
15928F	5' ATATCTGCAGGGAGA CTAATACACCAGTCTTGT
15928R	5' ATATCTTAAGGGAGA TGGAAAAGGTTTTTCATC
14766F	5' ATATCTGCAGGGAGA AATGACCCCAATACGCCAA
14766R	5' ATATCTTAAGGGAGA ATTAATTTTATTAGGGGG
14470F	5' ATATCTGCAGGGAGA TCAATAGCCATCGCTGTA
14470R	5' ATATCTTAAGGGAGA AATGATGGTTGTCTTTGG
13708F	5' ATATCTGCAGGGAGA CTACTAAACCCCATTAATA
13708R	5' ATATCTTAAGGGAGA GCGAATAGGCTTCCGGCT
13368F	5' ATATCTGCAGGGAGA CATACTATTTATGTGCTC
13368R	5' ATATCTTAAGGGAGA TAAAGTTGTGGATGATGG
12308F	5' ATATCTGCAGGGAGA CCATTGGTCTTAGGCCCC
12308R	5' ATATCTTAAGGGAGA ATTTGGAGTTGCACCAAA
10398F	5' ATATCTGCAGGGAGA CTACAAAAAGGATTAGAC
10398R	5' ATATCTTAAGGGAGA TAAACTATATACCAATTC
10034F	5' ATATCTGCAGGGAGA TTAACTTCCAATTAACTA
10034R	5' ATATCTTAAGGGAGA ACTCTTTTTTGAATGTTG
9055F	5' ATATCTGCAGGGAGA ACTCATGCACCTAATTGG
9055R	5' ATATCTTAAGGGAGA TGGTTGATATTGCTAGGG
8251F	5' ATATCTGCAGGGAGA CCCTAAAAATCTTTGAAA
8251R	5' ATATCTTAAGGGAGA CTGCTATAGGGTAAATAC
7028F	5' ATATCTGCAGGGAGA CACGACACGTACTACGTT
7028R	5' ATATCTTAAGGGAGA TTGATAGGACATAGTGG
4917F	5' ATATCTGCAGGGAGA ATACCAAATCTCTCCCTC
4917R	5' ATATCTTAAGGGAGA GAGTGAGGAGAAGGCTTA
4216F	5' ATATCTGCAGGGAGA TCACCCTAGCATTACTTA
4216R	5' ATATCTTAAGGGAGA TGTAATGGGTATGGAGAC

concentration d'ADN génomique de 0,5 ng/μl dans un volume final de 40 μL contenant 4 amorces à 1 μM chaque, du MgCl₂ à 1,5 mM, de l'ADN polymérase Taq à 0,05 U/μL (GibcoBRL) et le tampon de PCR 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM). Les mêmes conditions furent utilisées dans les réactions « monoplexe », à l'exemption de la concentration des amorces qui était de 2 μM. L'amplification s'effectuait en deux étapes : 6 cycles avec

Tableau 2.3.2: amorces utilisées pour l'amplification des sites définissant les haplogroupes amérindiens A, B, C et D.

Amorce	Séquence
663F	5' ATATCTGCAGGGAGAAAATAGGTTTGGTCC
663R	5' ATATCTTAAGGGAGAGCTAATAGAAAGG
5176F	5' ATATCTGCAGGGAGAAATCTCGCACCTGAAACAA
5176R	5' ATATCTTAAGGGAGAAAGGGGTTTAGTCATGTT
13263F	5' ATATCTGCAGGGAGATAGCCTTCTCCACTTCAA
13263R	5' ATATCTTAAGGGAGATGTAAC TATTATGAGTCC
9bp-delF	5' ATATCTGCAGGGAGACCCTAAAAATCTTTGAAA
9bp-delR	5' ATATCTTAAGGGAGATAGCTTTACAGTGGGCTC

Tableau 2.3.3 Combinaisons de paires d'amorces utilisées pour le PCR multiplexe.

Réaction	Amorces	
1	15997F 15997R	14766F 14766R
2	14470F 14470R	13708F 13708R
3	13368F 13368R	12308F 12308R
4	10398F 10398R	10034F 10034R
5	9055F 9055R	8251F 8251R
6	7028F 7028R	4917F 4917R
7	4216F 4216R	

dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, hybridation à 48 °C pendant 30 secondes, extension à 72 °C pendant 45 secondes ; et 30 cycles avec dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, hybridation à 60 °C pendant 30 secondes et extension à 72 °C pendant 45 secondes. Toutes les réactions étaient préparées dans des plaques à 96 puits et réalisées dans un thermocycleur automatique Perkin-Elmer .

2.4 Transfert des Produits PCR sur membrane (« Dot-Blot »).

Avant de transférer les produits de PCR sur un support solide, 40 µl du mélange réactionnel était dilué dans un volume final de 200 µl avec 60 µL d'eau désionisée stérile et 100 µl de tampon SSC 20X. 100 µl de cette dilution était déposé en duplexe sur une membrane de Nylon Hybond™ N+ (Amersham) et installée dans un collecteur à 96 puits (Schleicher & Schuell), afin de créer deux dot-blots identiques. La membrane était ensuite incubée pendant 5 minutes dans une solution dénaturante (NaCl 1,5 M ; Tris-HCl (pH 7,2) 0,5 M ; EDTA 1 mM) et 5 minutes dans une solution neutralisante (NaCl 1,5 M ; NaOH 0,5 N). L'ADN était ensuite fixé sur la membrane en exposant celle-ci à la lumière ultraviolette avec une énergie de 120,000 µJ/cm² (Stratalinker 1800, Stratagene).

2.5 Marquage radioactif des sondes utilisées pour l'hybridation.

Les sondes oligonucléotidiques d'hybridations sont décrites dans le tableau 2.5. Elles ont été conçues de façon à ce qu'elles soient complémentaires aux variants. Les températures d'hybridation et de lavage de chacune des sondes ont été déterminées empiriquement. Les oligonucléotides à une concentration de 8.3 µM étaient incubés avec la kinase T4 (1 U/µl), le tampon de réaction de la kinase (Imidazole 25 mM (pH 6.4) ; MgCl₂ 15 mM ; 2-mercaptoéthanol 1 mM ; ADP 0,05 mM) , et le γ-[P³²]dATP à 5µM (activité spécifique 1500mCi/mmol), le tout dans un volume final de 10µL. Après une heure d'incubation à 37 °C le volume de la réaction était amené à 100µL par l'ajout d'eau. Le tout était ensuite passé sur une colonne Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech) pour éliminer le γ-[P³²]d'ATP non incorporé. 2µL de la solution était ensuite utilisé pour vérifier

l'activité des sondes à l'aide d'un compteur à scintillation. Seules étaient retenues les sondes dont l'activité dépassait 500,000 cpm/ μ L

Tableau 2.5: sondes utilisées pour le génotypage des 13 loci définissant les haplogroupes européens.

Sonde	Séquence	T(H)	T(L)
15928 WT	5' GGTTTTCATCT C CGG	37	40
15928 MT	5' GGTTTTCATCT T CGG	37	45
14766 WT	5' ACGCAAAAT T AACCC	37	37
14766 MT	5' ACGCAAAAC C TAACCC	37	40
14470 WT	5' CTTTGG A TATACTAC	37	42
14470 MT	5' GTAGTATA C CCAAAG	37	45
13708 WT	5' GCTG C CAGGCGTTTA	37	42
13708 MT	5' TAAACGCCTG A ACAGC	37	37
13368 WT	5' TGGATGAT T GGACCCG	42	55
13368 MT	5' CGGAT C CATCATCCA	42	55
12308 WT	5' CTTAGG C CCCAAAA	37	37
12308 MT	5' TTCTTGGGG C CTAAG	37	51
10398 WT	5' GACTGA A CCGAATTG	37	45
10398 MT	5' GACTGA A CCGAATTG	42	42
10034 WT	5' ATTA A CTAG T TTTGA	37	37
10034 MT	5' ATTA A CTAG C TTTGA	37	37
9055 WT	5' AGC G CCACCCTAGCA	55	60
9055 MT	5' AGC A CCACCCTAGCA	55	55
8251 WT	5' GGCCCTATTT C AAAG	37	37
8251 MT	5' CTTT G AAATAGGACC	37	37
7028 WT	5' GTTGTAG C CACTTC	37	40
7028 MT	5' GAAG T GAGCTACAAC	37	37
4917 WT	5' CACTAAAC G TAAGCC	37	42
4917 MT	5' GGCTTAC G TCTAGTG	37	51
4216 WT	5' CATATCATA T AAGTA	37	40
4216 MT	5' TACTTAT A TGACATG	37	37

T(H): température d'hybridation

T(L): température de lavage

La position polymorphique est indiquée en caractère gras.

2.6 Hybridation oligonucléotide allèle-spécifique (ASO).

Les membranes étaient préhybridées à la température d'hybridation des sondes pendant 30 minutes avec 5 ml de solution d'hybridation : SSPE 20X (NaCl 3mM ; phosphate de sodium monohydraté 0,2 M ; EDTA 25 mM ; pH 7,0 avec NaOH); NaCl 750 mM ; SDS 1% ; héparine 0,8 µg/ml ; Tris-HCl 70 µM. Après l'ajout des sondes radioactives à une activité finale de 1 000 000 cpm/ml, les membranes étaient hybridées pendant 30 minutes. Le lavage était effectué en deux cycles de 10 minutes en submergeant les membranes dans la solution de lavage (SSPE 2X ; SDS 0,1%) à la température spécifique pour chaque sonde (voir tableau 2.5). Une fois ceci fait, les membranes étaient trempées dans une solution SSPE à 2X pour être ensuite emballées dans du « saran wrap » et exposées pendant environ 16h à -20 °C en présence d'un film autoradiographique Fuji.

2.7 Digestions enzymatiques

Les réactions de digestions par les enzymes *AluI*, *AvaII*, *MseI*, *BstOI*, *BamHI*, *Hinfl*, *DdeI*, *HhaI*, *HincII*, *HpaI*, *HaeII*, *HeaIII*, *BfaI*, et *NlaIII* ont été réalisées suivant les indications du manufacturier. Les résultats des digestions étaient visualisés par électrophorèse et coloration avec du bromure d'éthidium sur un gel d'agarose Nu-Sieve de 4 %.

2.8 Analyses statistiques

La signification statistique des différences entre les groupes était calculée à l'aide du test exact de Fisher. Les analyses multivariées logistiques étaient faites pour chaque haplogroupe analysé. Tous les haplogroupes étudiés et les interactions possibles avec d'autres loci (voire Chapitre 3) étaient inclus comme covariables. Toutes ces analyses ont été effectuées à l'aide des logiciels GraphPad InStat (GraphPad Software. v2.05a) et SPSS v7.5 (SPSS Inc, Chicago, IL). Le seuil de signification a été fixé à 0,05 pour les comparaisons simples. Lors de comparaisons multiples, la correction de Bonferroni (voir Armitage P et Berry G) a été appliquée pour fixer le seuil de signification à 0,003.

Le tableau 4.3.2 a été dérivé à partir des équations suivantes avec une correction pour la continuité (pour plus de détails voir Armitage P. et Berry G. pp 195-204) :

$$1) n > \left\{ \frac{z_{2\alpha} \sqrt{[2\pi(1-\pi)]} + z_{2\beta} \sqrt{[\pi_1(1-\pi_1) + \pi_2(1-\pi_2)]}}{\pi_1 - \pi_2} \right\}^2$$

où π_1 est la fréquence de l'allèle sous étude dans la population des patients

π_2 est la fréquence de l'allèle sous étude dans la population contrôle

n le nombre de groupes comparés (dans notre cas $n=2$)

$$2) p' = OR_1 \times \frac{p}{p(OR_1) + 1 - p}$$

où OR est le risqué relatif

p' est la fréquence de l'allèle sous étude dans la population des patients

p est la fréquence de l'allèle sous étude dans la population contrôle

Si un groupe comprends m sujets et l'autre rm , alors l'étude est

approximativement équivalente à une étude avec n sujets dans chaque groupe, où

$$\frac{2}{n} = \frac{1}{m} + \frac{1}{rm}$$

Chapitre 3 : résultats.

3.1 PCR et hybridation ASO (*Allele Specific Oligo*).

Etant donné le nombre élevé d'échantillons-sites à génotyper (523 échantillons x 13 sites par échantillon), au lieu d'utiliser l'approche classique RFLP, une technique relativement chère et laborieuse, nous avons opté pour la méthode de génotypage ASO (*Allele Specific Oligonucleotide hybridization*). Cette technique permet un génotypage rapide et efficace d'un nombre élevé d'échantillons dans un temps relativement court. Dans sa forme la plus simple, la méthode ASO consiste à hybrider un échantillon immobilisé sur un support solide (eg. une membrane de Nylon) avec deux sondes, chacune correspondant à un allèle distinct. Dans notre cas, tous les échantillons ont été hybridés avec une sonde dite mutante (voir tableau 2.5), dont la séquence correspond à la forme allélique caractérisant un haplogroupe particulier. Parallèlement, ces mêmes échantillons ont été hybridés avec une sonde dite sauvage (WT) dont la séquence correspond à la séquence de référence (Anderson et al, 1981). La figure 3.1 illustre le résultat d'une telle hybridation ASO. Comme on peut remarquer, les échantillons se situant dans les blocs A1-A3 hybrident avec la sonde mutante, mais ils n'hybrident pas avec la sonde sauvage. Ceci indique que ces échantillons appartiennent à l'haplogroupe défini par la sonde mutante. Ainsi, l'hybridation des 523 échantillons avec les 13 paires de sondes décrites dans le tableau 2.5 permet d'en classer la vaste majorité (voir plus loin) en 9 haplogroupes. L'ensemble de ces données pour tout les groupes analysés se trouve attaché dans l'annexe.

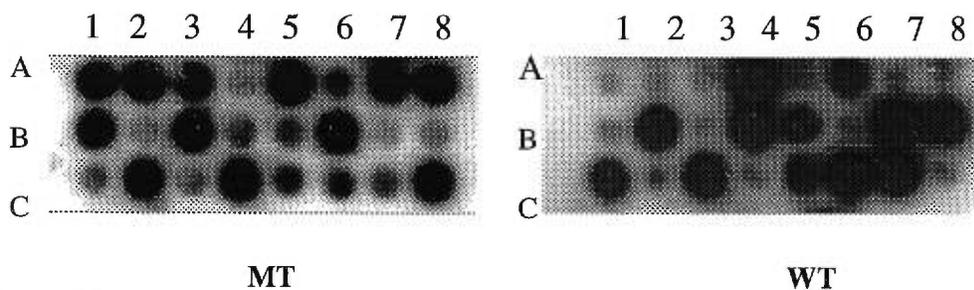
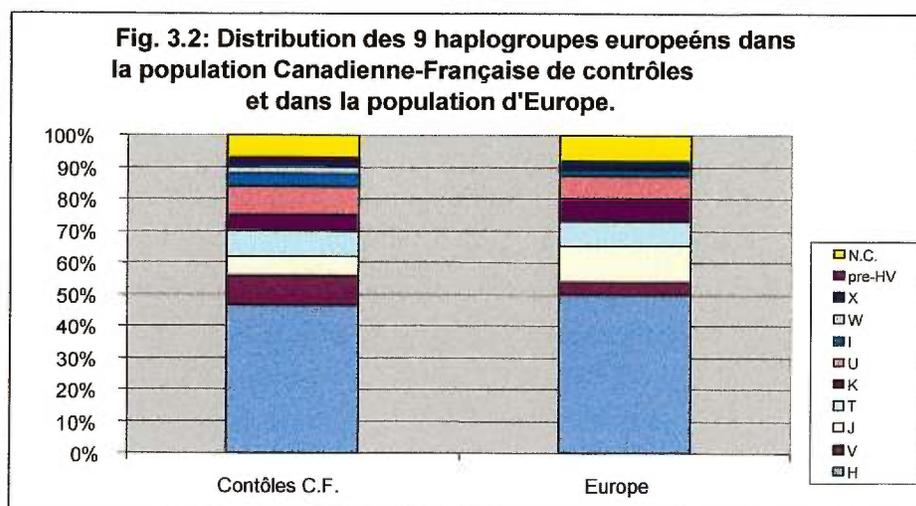


Figure 3.1

Hybridation ASO- les segments amplifiés ont été hybridés avec une sonde mutante (MT) et une sonde sauvage (WT). Une hybridation positive avec la sonde mutante assigne un échantillon à l'haplogroupe défini par la sonde.

3.2 La distribution des haplogroupes mitochondriaux dans le groupe contrôle.

La figure 3.2 présente la distribution des 9 haplogroupes européens dans notre échantillon de 241 contrôles d'origine canadienne-française et dans un échantillon de 757 individus représentant la population européenne (Richards et al., 1998). Comme on peut remarquer, la distribution des haplogroupes dans l'échantillon contrôle est semblable à la distribution européenne et les légères fluctuations entre les deux distributions ne sont pas significatives d'un point de vue statistique. Dans les deux populations, on trouve les 9 haplogroupes caractéristiques des populations européennes parmi lesquels l'haplogroupe H est le plus fréquent, regroupant près de 50 % des échantillons. Ces observations démontrent que malgré la présence d'un effet fondateur (Labuda et al., 1997), la structure génétique mitochondriale de la population canadienne-française ressemble à celle des autres populations européennes. Ce maintien de l'hétérogénéité génétique est particulièrement important dans le cadre d'une étude d'épidémiologie génétique car l'association d'un marqueur avec un phénotype est très sensible à la fréquence *a priori* du marqueur étudié dans la population générale. Ce point sera repris plus tard dans le cadre de la discussion des effets de la structure génétique d'une population sur les associations entre un marqueur et un phénotype.



On remarque que 7% des échantillons contrôles n'appartiennent à aucun des 9 haplogroupes. Nous verrons dans la section 3.3 que ceci est aussi le cas de 1 à 15 % d'échantillons prévenants de patients cancéreux. Dans la section suivante, nous avons donc décidé d'évaluer la possibilité que certains de ces échantillons appartiennent aux haplogroupes spécifiques aux populations amérindiennes et asiatiques.

3.3 La distribution des haplogroupes A, B, C, D et M dans l'échantillon global.

Les études de la diversité mitochondriale européenne ont rapporté que le système actuel de classification en 9 haplogroupes basé sur l'ensemble de 13 polymorphismes bi-nucléotidiques ne permet de classer qu'environ 95% de la variabilité. Le 5% non-classé représente soit des séquences appartenant aux haplogroupes asiatiques M et C, soit des séquences identiques à la séquence Cambridge (Anderson et al. 1981) laquelle certains auteurs voudraient classer dans l'haplogroupe H (Andrews et al., 1999).

Dans l'étude présente, nous avons rencontré la même difficulté puisque sur 523 individus analysés nous n'étions pas capables de classer 41 échantillons, soit 8%. Afin de vérifier si certains de ces échantillons appartiennent aux haplogroupes caractéristiques des populations amérindiennes et asiatiques, nous avons en premier lieu analysé la distribution de ces haplogroupes dans le groupe de 41 échantillons non-classés (tableau 3.3). En effet, la quasi-totalité de la variabilité mitochondriale retrouvée dans les populations amérindiennes peut être classée en 4 haplogroupes : A (défini par un gain du site de restriction de l'enzyme *HaeIII* à la position 663, B (défini par une délétion de 9 paires de bases entre les gènes COII/tARN^{Lys}), C (défini par la perte du site de restriction de *HincII* à la position 13259 et le gain du site de *AluI* à la position 13262) et D (défini par la perte du site de restriction de *AluI* à la position 5176). De plus, les séquences appartenant aux haplogroupes C et D partagent les gains de sites de restriction des enzymes *DdeI* et *AluI* aux positions 10394 et 10397 respectivement (pour les détails sur la variabilité et la distribution géographique des haplogroupes amérindiens voir Torroni et al., 1992, 1993a). Cependant, étant donné que ces deux mutations sont stables (Torroni, communication personnelle), l'appartenance

d'un échantillon à ces deux haplogroupes a été testée en utilisant des combinaisons de seulement deux positions, chacune des combinaisons étant spécifique à un haplogroupe donné (positions 10398 et 13262 pour l'haplogroupe C et positions 5176 et 10394 pour l'haplogroupe D).

Ainsi, nous avons déterminé que 6 des 41 échantillons appartiennent aux haplogroupes amérindiens (1 échantillon appartient à l'haplogroupe A, 3 à l'haplogroupe C et 2 à l'haplogroupe D). De plus, 3 des 41 échantillons (individus 49, 689 et 169) semblent appartenir à l'haplogroupe asiatique M (définis par les gains de sites de restriction des enzymes *DdeI* et *AluI* aux positions 10394 et 10397 respectivement), la source du doute étant le génotypage de seulement une position (10397). Cette supposition est néanmoins tout à fait raisonnable compte tenu le degré de stabilité et de liaison de ces deux mutations (10394 et 10397) (Torroni, communication personnelle).

En somme, l'échantillon global de 523 Canadiens-français génotypé dans le cadre de cette étude est composé de 92 % d'individus d'origine maternelle européenne, de 2% (9/523) d'individus d'origines maternelles asiatiques ou amérindiennes et de 6% des individus non-classés. Ainsi, nous postulons que le degré de métissage maternel non-européen des Canadiens-français ne dépasse pas 2 %.

3.4 Les haplogroupes mitochondriaux et le risque de la LLA.

Le tableau 3.4 présente les résultats de l'analyse des relations entre les haplogroupes mitochondriaux (et les combinaisons phylogénétiques des haplogroupes HV, UK et TJ) et le risque de la LLA. Comme dans tous les tableaux qui suivent, la valeur estimée du risque relatif (Odds Ratio, OR) y est rapportée avec les intervalles de confiance de 95 %, ainsi qu'avec la valeur *P* du test de Fisher. Ainsi, on remarque qu'aucune des relations considérées n'est statistiquement significative. Afin de déterminer si le sexe est un facteur qui influence les associations étudiées, nous avons analysé la distribution de ces mêmes haplogroupes

Tableau 3.3. Distribution des haplogroupes A, B, C et D dans l'échantillon global.

groupe	individus	Position					Haplogroupe
		-10394a	+663b	-5176c	+13262c	9bp-del	
		1		1			D
		1			1		C
			1				A
						1	B
Cancer du sein (15%)	275						
	308						
	318						
	343						
	380						
	375						
	387						
	374						
	392						
	301						
	250						
	383						
	299						
330							
302		1		1			
259							
Contrôles (7%)	49	1		1			
	86	1			1		
	87						
	120						
	126						
	145	1			1		
	190						
	130						
	181						
	195						
	721						
	681						
	725						
720							
215							
689		1					
168		1					
Cancer du colon (6%)	641						
	678						
	413		1				
	573						
LLA (1.4%)	157	1		1			
	166a						
	76	1			1		
	78						

N.B.

- 1) L'état diagnostique de chaque haplogroupe est représenté par le chiffre (1) et l'état opposé est représenté par un espace vide. Dans le cas de la déletion de 9 paires de bases, le chiffre (1) indique la présence de la déletion, son absence étant indiquée par un espace vide.
- 2) Le signe (+) indique la présence d'un site de restriction et le signe (-) indique l'absence d'un site de restriction.
- 3) Les enzymes de restriction utilisés dans cette analyse sont désignés par le codage suivant: a = *Dde*I; b = *Hae* III et c = *Afu* I.
- 4) La proportion des haplotypes non-classés dans chaque groupe est indiquée en pourcentage.

chez les filles et chez les garçons (tableaux 3.4a et 3.4b respectivement). Aucune association significative n'a été détectée chez les filles. Chez les garçons, la plupart des associations sont non-significatives, sauf l'haplogroupe K qui montre une tendance vers un risque plus élevé de développer la maladie (OR. = 2.5; 95% IC, 0.9-7.4). En tout, l'analyse des relations entre les haplogroupes mitochondriaux et le risque de la LLA montre qu'à l'exception de l'haplogroupe K, les haplogroupes mitochondriaux n'ont pas (ou peu) d'impact sur la susceptibilité à la LLA.

3.5 Les haplogroupes mitochondriaux et le risque du cancer du sein.

Le tableau 3.5 présente les résultats de l'analyse des relations entre les haplogroupes mitochondriaux (ou combinaisons phylogénétiques d'haplogroupes) considérés et le risque de développer le cancer du sein. Il faut remarquer que le groupe contrôle utilisé dans cette analyse est constitué de 83 femmes (39 provenant du Centre de Prélèvements de L'Hôpital Ste-Justine et 44 provenant de l'Hôpital Hôtel-Dieu). Comme dans le cas de la LLA, aucune association n'étant statistiquement significative, les haplogroupes mitochondriaux seuls ne semblent pas modifier le risque de développer le cancer du sein.

Tableau 3.4 Relations entre les haplogroupes et le risque de la LLA.

Haplogroupe	Cas (n= 141)	Contrôles (n = 241)	OR	95% I.C.	P
H	71	112	1,2	0,8-1,8	0,5
V	15	21	1,2	0,6-2,5	0,6
J	7	16	0,7	0,3-1,8	0,7
K	12	13	1,6	0,7-3,7	0,3
T	12	20	1		1
U	10	22	1		1
HV	86	133	1,2	0,8-1,9	0,3
UK	22	35	1	0,6-1,9	0,8
TJ	19	36	0,7	0,4-1,4	0,4

Tableau 3.4a: Relations entre les haplogroupes mitochondriaux et le risque de la LLA chez les filles.

Haplogroupe	Cas (n = 51)	Contrôles (n = 98)	OR	95% I.C.	P
H	25	46	1	0,5-2,1	0,9
V	5	9	1	0,3-3,4	1
J	4	6	1,3	0,3-4,8	0,7
K	3	7	0,8	0,2-3,3	1
T	5	8	1,2	0,4-4,0	0,8
U	4	8	1	0,3-3,0	1
HV	30	55	1,1	0,6-2,2	0,9
UK	7	15	0,9	0,3-2,3	1
TJ	9	14	1,3	0,5-3,2	0,6

Tableau 3.4b. Relations entre les haplogroupes mitochondriaux et le risque de la LLA chez les garçons

Haplogroupe	Cas (n = 90)	Contrôles (n = 143)	OR	95% I.C.	P
H	46	66	1,2	0,7-2,0	0,5
V	10	12	1,4	0,6-3,3	0,5
J	3	10	0,5	0,1-1,7	0,4
K	9	6	2,5	0,9-7,4	0,1
T	7	12	0,9	0,3-2,4	1
U	6	14	0,6	0,2-1,8	0,5
HV	56	78	1,3	0,8-2,3	0,3
UK	15	20	1,2	0,6-2,5	0,6
TJ	10	22	0,7	0,3-1,5	0,4

Tableau 3.5: Relations entre les haplogroupes mitochondriaux et le risque du cancer du sein.

Haplogroupe	Cancer (n = 94)	Contrôles (n = 83)	OR.	95% I.C.	P
H	39	37	0,9	0,5-1,6	0,8
V	11	9	1	0,4-2,8	1,0
J	7	5	1,4	0,4-4,6	1,0
K	4	7	0,5	0,1-1,7	0,4
T	6	8	0,6	0,2-2,0	0,6
U	4	5	0,7	0,2-2,0	0,6
HV	50	46	0,9	0,5-1,6	1,0
UK	8	12	0,5	0,2-1,4	0,5
TJ	13	13	0,9	0,4-2,0	1,0

3.6 Les haplogroupes mitochondriaux et le risque du cancer du côlon.

Le tableau 3.6 présente les résultats de l'analyse des relations entre les haplogroupes (ou combinaisons phylogénétiques d'haplogroupes) considérés et le risque de développer le cancer du côlon. Ainsi, on remarque qu'aucune association entre les haplogroupes ou groupements phylogénétiques et cancer est statistiquement significative. Ceci est aussi le cas quand l'analyse tient en compte le sexe : aucune association significative n'a été relevée aussi bien chez les hommes que chez les femmes (résultats non-inclus). Ces analyses montrent donc que les haplogroupes mitochondriaux ne modifient pas le risque du cancer du côlon.

En somme, à l'exception de l'haplogroupe K qui présente une tendance vers un risque plus élevé de développer la LLA (OR.= 2.5; 95% IC, 0.9-7.4), l'analyse de la distribution des haplogroupes européens dans les trois groupes cancéreux n'indique pas que les haplogroupes mitochondriaux seuls modifient le risque de développer la maladie.

Tableau 3.6: Relations entre les haplogroupes et le risque du cancer du côlon.

Haplogroupe	Cas (n= 47)	Contrôles (n = 241)	OR	95% I.C.	P
H	15	112	0,8	0,4-1,6	0,6
V	7	21	1,8	0,7-4,6	0,2
J	5	16	1,7	0,6-4,8	0,4
K	4	13	1,6	0,5-5,2	0,5
T	3	20	1,2	0,3-4,2	0,7
U	6	22	1,5	0,6-3,8	0,4
HV	22	133	0,7	0,4-1,3	0,3
UK	10	35	1		1
TJ	8	36	0,4	0,1-1,3	0,2

3.7 Relations entre les haplogroupes mitochondriaux, les variants fonctionnels des enzymes de Phase I & II et le risque du cancer.

Tout en utilisant près de 90 % de l'oxygène dans la cellule, la mitochondrie n'est pas le seul système cellulaire à produire des radicaux libres d'oxygène. Parmi d'autres systèmes qui contribuent à l'augmentation du stress oxydatif il y a des réactions contrôlées par les enzymes de Phase I et II dont le rôle de modificateur de l'effet carcinogène de l'environnement est bien connu. En effet tout en activant (enzymes de phase I) et détoxifiant (les enzymes de phase II) les différents produits carcinogènes, ces enzymes génèrent comme produits dérivés des radicaux libres d'oxygène. Certains des enzymes de cette voie métabolique sont codés par des gènes polymorphiques. Le tableau 3.7.1 décrit les gènes faisant l'objet de cette étude, ainsi que leur effet phénotypique. Étant donné que les échantillons analysés dans cette étude ont aussi été génotypés pour les variants décrits dans le tableau 3.7.1 (Krajinovic et al. 1999 ; Krajinovic et al., 2000, Krajinovic et al. en préparation), l'étape suivante de notre étude consistait à analyser les relations entre les haplogroupes mitochondriaux, les différentes formes alléliques des enzymes de Phase I et II et le risque de la LLA et du cancer du sein.

3.7.1 Définition des variants fonctionnels des enzymes de Phase I et II analysés.

Afin de comprendre l'intérêt d'analyser les relations entre les haplogroupes mitochondriaux, les variants fonctionnels des enzymes de Phase I & II et le risque du cancer, il est important de décrire plus en détails les variants alléliques considérés ainsi que leurs effets phénotypiques pertinents pour cette étude.

Les enzymes de la famille du cytochrome P-450 (CYP). Les quelques 200 formes d'enzymes appartenant à la famille CYP sont codées par environ 60 gènes dispersés dans le génome. Les polymorphismes fonctionnels des gènes CYP1A1 et CYP2D6 ont été bien caractérisés et décrits. Ainsi, l'enzyme CYP1A1 joue un rôle critique dans l'activation des hydrocarbonés aromatiques

polycycliques. Trois variants de l'enzyme CYP1A1 ont été considérés: l'allèle 2A, caractérisé par une transition T en C à la position 6235 de la partie 3' non-codante (Kawajiri et al. 1990), l'allèle 2B caractérisé par une transition T en C à la position 6235 de la partie 3' non-codante et une transition de A en G à la position 4889 de l'exon 7 (Hayashi et al. 1991), et l'allèle *4 caractérisé par un changement nucléotidique à la position 5639 de l'intron 7 (Crofts et al. 1993). L'allèle *2A représente un enzyme dont l'inducibilité de l'activité catalytique est augmentée et l'allèle *2B est caractérisé par une augmentation du niveau de transcription du gène. L'effet phénotypique de l'allèle *4 est jusqu'à maintenant inconnu, cependant cet allèle est associé avec un risque élevé de développer le carcinome du sein (OR. = 3.3, 95% I.C. 1.1-9.7) (Krajinovic et al., 1999)

L'enzyme CYP2D6 est impliquée dans la transformation de nombreux substrats : les antihistamines, les analgésiques, les antidépresseurs tricycliques et les bloqueurs beta. En effet, les dernières estimations suggèrent que CYP2D6 pourrait être responsable du métabolisme de plus de 25 % de médicaments prescrits (Benet et al., 1996). Ainsi, les variants fonctionnels de CYP2D6 sont à l'origine des variations interindividuelles importantes du métabolisme médicaments observées dans le clinique. Cependant, l'effet des différents variants de CYP2D6 sur la susceptibilité au cancer est difficile à déterminer, en partie à cause du manque de carcinogènes-candidats reconnus comme substrats. Le génotype de l'enzyme CYP2D6 analysé dans cette étude est celui des individus homozygotes pour allèle *3 (une délétion d'une adénine à la position 2637 du gène) (Daly et al. 1996) ou l'allèle *4 (une transition de G en A à la position 1934) (Daly et al., 1996) ou à des hétérozygotes composés pour les allèles *3 et *4. Ce génotype (dit PM, pour « poor métabolizer ») correspond à une enzymes dont l'activité catalytique est diminuée.

Glutathione S-Transférase (GST). La famille des gènes GST comprends trois sous-groupes : GSTM, GSTP et GSTT. Ces enzymes de Phase II ont la capacité de détoxifier un nombre important de composés électrophiliques incluant les carcinogènes sous formes actives. Parmi les substrats de GST, on retrouve aussi les radicaux libres d'oxygène. En effet, il a été établi que les enzymes GST réagissent avec les produits du stress oxydatif de l'ADN et des lipides mais la nature des mécanismes de détoxification sous-jacents reste inconnue (Hayes et Strange, 1995). Deux variants de la famille GST ont été considérés.

Ainsi, les enzymes GSTM1 et GSTT1 sont caractérisés par des allèles qui correspondent à des délétions complètes du gène (Seidergard et al. 1988, Pemble et al. 1994). Pour les deux gènes, le génotype analysé est celui des individus homozygotes pour la délétion. Le génotype null de GSTM1 est associé avec un risque élevé de développer le cancer du sein chez les femmes post-ménopausales qui consomment de l'alcool (RR = 4.0, 95%I.C. 0.9-18) (Krajinovic et al., soumis).

N-Acetyltransférases (NAT). Les enzymes NAT1 et NAT2 sont impliquées dans le métabolisme des amines aryliques et hétérocycliques. Certains des variants alléliques de ces gènes dont les phénotypes biochimiques varient entre les acétylateurs lents et rapides semblent modifier le risque du cancer du côlon (Badawi et al., 1995) et du cancer du sein (Krajinovic et al., en préparation). L'enzyme NAT2 est caractérisé par 6 allèles (*3, *4, *10, *11, *14 et *15) (Vatsis et al., 1995). Les génotypes analysés dans cette étude sont ceux des individus homo-, hétéro ou hétéro- composé pour tous les allèles excepté l'allèle *4. Des tels génotypes correspondent à des acétylateurs lents. L'enzyme NAT1 est représenté par l'allèle *10 dont l'effet est d'augmenter l'activité catalytique de la molécule (Bell et al., 1995). Ainsi, l'allèle *10 est associé avec un risque élevé de développer le cancer du sein chez les femmes qui consomment de la viande bien cuite (RR. = 4.4 95% I.C. 1.0-19) (Krajinovic et al., soumis)

Myeloperoxidase (MPO). La myeloperoxidase, localisée en majorité dans les lysosomes des neutrophiles joue un rôle central dans la défense antibactérienne (Josephy et Coomber, 1996). En tant qu'enzyme de Phase I, MPO est impliquée dans l'activation des carcinogènes contenus dans la fumée du tabac et les solvants organiques, ces derniers étant particulièrement hématotoxiques (Ross, 1996). De plus, MPO catalyse la formation endogène de radicaux libres, incluant les radicaux libres d'oxygène (Trush et al., 1991). Une diminution du niveau d'expression du gène MPO (allèle *2 qui correspond à transition de G en A à la position -463 du promoteur) (Piedrafita et al., 1996) a été associée avec une réduction du risque de la leucémie adulte (Reynolds et al., 1997).

Tableau 3.7.1. La nature et les effets phénotypiques des variants alléliques des enzymes de Phase I & II.

	Locus	Génotype	Effet Fonctionnel
Phase I	CYP1A1	*2A	augmentation de l'inducibilité de l'activité catalytique
		*2B	augmentation du niveau de transcription
		*4	
	CYP2D6	PM	augmentation de l'activité catalytique
	MPO	*2	diminution du niveau de transcription
Phase II	NAT1	*10	augmentation de l'activité catalytique
	NAT2	tout excepté l'allèle *4A	diminution de l'activité catalytique
	GSTM	null	homozygotes pour délétion du gène
	GSTT	null	homozygotes pour délétion du gène
	NQO1	allèles *2 et *3 ensemble	diminution de l'activité catalytique

NAD(P)H Quinone Oxireductases (NQO1). Cet enzyme de Phase II participe à la détoxification et la protection contre les radicaux libres. Notamment, NQO1 est impliqué dans la neutralisation des quinones issues du métabolisme du benzène (Rothman et al., 1997). De plus, des études récentes suggèrent qu'en maintenant le niveau intracellulaire des formes antioxydatives d'ubiquinone (Beyer et al., 1996) et de Vitamine E (Siegel et al., 1997), NQO1 confère une protection contre le stress oxydatif. Il a été dernièrement démontré que les individus homozygotes pour allèle *2 (une transition de C en T à la position 609) (Traver et al., 1997) ou pour l'allèle *3 (une mutation de C en T à la position 465) (Gaedigk et al., 1998) sont dépourvus de l'activité enzymatique (Eickelman et al., 1994). Ainsi, l'allèle *2 a été associé avec une augmentation du risque du cancer du poumon (Lin et al., 1999). Le génotype considéré dans cette étude fut celui des individus porteurs des allèles *2 et *3, associé avec un risque élevé de développer la LLA (OR=1.7, 95%IC, 1.2-2.5) (Krajinovic et al., soumis).

Il en suit que l'intérêt d'analyser les relations entre les haplogroupes mitochondriaux et les variants fonctionnels présentés ci-haut repose dans la

capacité différentielle de ces derniers d'influencer le niveau cellulaire de radicaux libres d'oxygène. Ainsi, le variant rapide d'un enzyme qui génère les éléments d'oxygène actif (eg. CYP1A1*2A) au même titre que la délétion d'un gène qui participe à la détoxification de radicaux libres (eg. GSTM, génotype null) contribueront à l'augmentation du stress oxydatif.

Avant de présenter les résultats de cette analyse, nous devons nous attarder sur un aspect particulier des analyses à multiples comparaisons. Les lois de la distribution bimodale dictent que la valeur P du test de Fisher atteindra niveau de $\alpha=0.05$ pour une association sur vingt. Une telle association sera donc significative par chance, sans qu'il n'y ait aucune relation causative sous-jacente. Une façon de contourner ce problème consiste à baisser le seuil de signification statistique. Ainsi, la correction de Bonferonni propose d'adopter une valeur de P qui correspond au ratio de $\alpha=0.05$ sur le nombre de comparaisons effectuées. Étant donné que nous avons analysé la relation entre chaque haplogroupe et une vingtaine de loci, l'application de la correction de Bonferonni à notre étude se traduit par l'adoption d'une nouvelle valeur de $\alpha=0.003$, en dessous de laquelle une association est considérée comme significative.

3.7.2 Relations entre les haplogroupes mitochondriaux, les variants des gènes codant les enzymes de Phase I & II et le risque de la LLA.

Le tableau 3.7.2 présente les résultats de l'analyse de l'effet de l'interaction entre les haplogroupes mitochondriaux et les variants des enzymes de Phase I & II sur le risque de la LLA. Il faut remarquer que la présentation n'est pas exhaustive : le tableau 3.7.2 présente seulement les résultats les plus intéressants. Cependant, le seul résultat significatif est l'association de l'haplogroupe K avec les allèles *2 et *3 de NQO1. Ainsi, les enfants porteurs des allèles *2 et *3 et dont les mitochondries appartiennent à l'haplogroupe K sont à risque élevé de développer la LLA (OR=12; 95% IC, 1.5-101). Ceci étant dit, l'étendue des intervalles de confiances associés avec le risque relatif ne nous permet pas d'établir, ni même approximer, leurs valeurs exactes.

On peut donc dire que l'analyse exhaustive des relations entre les haplogroupes mitochondriaux et les variants alléliques des enzymes des phase I &

Il suggère que l'haplogroupe K en association avec l'allèle *2 et *3 de NQO1 semble être un modificateur de risque significatif.

Tableau 3.7.2. Relations entre les haplogroupes mitochondriaux, les variants fonctionnels des enzymes de Phase I & II et le risque de la LLA.

Allèle	Haplogroupe	OR	95% I.C.	P
NQO1(*2 et *3)	H	2,1	1,2-3,9	0,01
	V	2,9	0,9-9	0,09
	K	1,2	1,5-101	0,004
NAT2	H	0,55	(0,26-1,2)	0,2
	V	1,6	(0,52-4,9)	0,6
	K	8,5	(1-70)	0,03

3.7.3 Relations entre les haplogroupes mitochondriaux, les variants des gènes codant pour les enzymes de Phase I & II et le risque du cancer du sein.

Le tableau 3.7.3 présente les relations entre les variants des enzymes de phase I et II, les 9 haplogroupes mitochondriaux et le risque relatif de développer le cancer du sein. N'ayant pas été génotypés dans le groupe cancer du sein, les variants des gènes NAT1 et NAT2 ont été exclus de l'analyse.

L'analyse exhaustive des données n'a relevé aucune association significative entre les 9 haplogroupes mitochondriaux, les variants fonctionnels des enzymes considérés et le risque du cancer du sein. Dans plusieurs cas, il a été même impossible de calculer le risque relatif, faute d'individus avec un génotype combiné dans les échantillons. Ceci est particulièrement visible dans l'analyse de l'association des haplogroupes V, K, J et T avec les allèles *2A, *2B, *4 et le génotype PM des gènes du cytochrome P450.

En somme, mis à part quelques tendances, les associations entre les haplogroupes mitochondriaux et les variants fonctionnels des enzymes de phase I & II ne semblent pas modifier le risque de développer le cancer du sein.

Tableau 3.7.3: Relations entre les haplogroupes mitochondriaux, les variants fonctionnels des enzymes de Phase I & II et le risque du cancer du sein.

Haplogroupe	Allèle	Sein (n = 94)	Contrôle (n = 83)	OR	95% I.C.	corrigé #	
						OR	95% I.C.
H	CYP1A1*2A	2/41	5/36	0,4	0,1-1,9	0,1	0,002-7,8
	CYP1A1*2B	1/43	5/37	0,2	0,01-1,5	3,3	0,1-99
	CYP1A1*4	10/39	2/35	4,5	0,9-22		
	CYP2D6 *PM	1/45	2/38	0,4	0,03-4,8		
	GSTM null	19/21	20/23	1,00		0,7	0,2-2,7
	GSTT null	7/36	8/28	0,7	0,2-2,1	1,2	0,2-90,
	MPO *2	13/35	16/25	0,6	0,2-1,4	1,00	0,2-3,5
	NQO1*2A et*3A	17/24	11/20	1,2	0,5-3,4		
V	CYP1A1*2A	0/60	0/60				
	CYP1A1*2B	0/66	1/62				
	CYP1A1*4	2/57	0/05	0,7	0,1-4,7		
	CYP2D6 *PM	0/68	0/66				
	GSTM null	6/34	4/37	1,6	0,4-6,3		
	GSTT null	0/10	0/05	2,1	0,4-10		
	MPO *2	2/49	6*45	0,3	0,05-1,6		
	NQO1*2A et*3A	6/38	4/43	1,7	0,4-6,4		
K	CYP1A1*2A	0/71	1/64				
	CYP1A1*2B	0/74	1/65				
	CYP1A1*4	0/63	0/64				
	CYP2D6 *PM	0/76	0/69				
	GSTM null	2/38	3/39	0,7	0,1-4,3		
	GSTT null	0/63	3/48				
	MPO *2	1/56	3/45	0,3	0,02-2,7		
	NQO1*2A et*3A	1/41	5/47	0,2	0,02-2,0		
J	CYP1A1*2A	0/66	1/66				
	CYP1A1*2B	0/69	0/66				
	CYP1A1*4	0/58	0/68				
	CYP2D6 *PM	0/71	0/71				
	GSTM null	4/35	1/39	4,5	0,5-41		
	GSTT null	1/59	0/47				
	MPO *2	3/53	1/45	2,5	0,3-25	3,00	0,1-63
	NQO1*2A et*3A	3/38	1/45	3,5	0,4-36		
T	CYP1A1*2A	2/71	1/64	1,8	0,2-20		
	CYP1A1*2B	1/73	0/64				
	CYP1A1*4	1/62	1/67	1,00	0,1-18		
	CYP2D6 *PM	0/74	1/70				
	GSTM null	2/36	2/38	1,00	0,1-8,0	1,00	0,03-26
	GSTT null	0/61	0/46				
	MPO *2	0/53	1/43				
	NQO1*2A et*3A	1/39	3/46	0,4	0,04-3,9		

tableau 3.7.3 (suite)

Haplogroupe	Allèle	Sein (n=94)	Contrôle (n=83)	OR	95% I.C.	Corrigé	
						OR	95% I.C.
U	CYP1A1*2A	0/70	0/65				
	CYP1A1*2B	0/73	0/66				
	CYP1A1*4	0/61	0/68				
	CYP2D6 *PM	0/74	0/71				
	GSTM null	2/36	3/41	0,8	0,1-4,8	0,5	0,02-12
	GSTT null	0/61	0/46				
	MPO *2	0/53	2/46				
	NQO1*2A et*3A	1/39	3/47	0,4	0,04-4,0		
H+V	CYP1A1*2A	2/31	5/26	0,3	0,1-1,9	0,1	0,002-4,6
	CYP1A1*2B	1/33	6/28	0,1	0,02-1,2	3,2	0,1-99
	CYP1A1*4	12/31	5/28	2,2	0,7-7,0		
	CYP2D6 *PM	1/35	2/28	0,4	0,03-4,6		
	GSTM null	25/17	24/17	1,00	0,4-2,5	0,4	0,1-2,9
	GSTT null	10/32	10/20	0,6	0,2-1,8	2,00	0,3-15
	MPO *2	15/27	22/21	0,5	0,2-1,3	1,00	0,2-5,5
	NQO1*2A et*3A	23/20	15/14	1,00	0,4-2,8		
U+K	CYP1A1*2A	0/68	1/59				
	CYP1A1*2B	0/71	1/60				
	CYP1A1*4	0/59	0/61				
	CYP2D6 *PM	0/72	0/64				
	GSTM *0	2/39	6/30	0,3	0,04-1,4		
	GSTT *0	6/17	8/11	0,5	0,1-1,8		
	MPO *2	1/52	5/42	0,2	0,02-1,4	2,4	0,4-15
	NQO1*2A et*3A	2/38	8/45	0,3	0,1-1,5		
T+J	CYP1A1*2A	2/111	2/91	0,8	0,1-6,0	1,3	0,05-34
	CYP1A1*2B	1/120	0/89				
	CYP1A1*4	1/112	1/96	0,3	0,05-14		
	CYP2D6 *PM	0/126	1/101				
	GSTM null	6/62	0/06	1,6	0,4-7,0	0,4	0,02-6,0
	GSTT null	1/104	0/72				
	MPO *2	3/90	2/63	1,00	0,2-6,5	0,8	0,1-5,6
	NQO1*2A et*3A	4/70	4/68	1,00	0,2-4,0		

N.B.

Le risque relatif a été calculé à partir du ratio du nombre de génotypes sous investigation sur le de génotypes opposés chez les patients comparé au même type de ratio chez les individus
Le test de Fisher n'a pas été appliqué dans les cas où un des génotypes était absent dans l'un deux groupes (patients ou contrôles).

En absence de données épidémiologiques, il a été impossible dans certains cas d'appliquer la régression localistique (voir section

3.8 Relations entre les haplogroupes mitochondriaux, facteurs environnementaux de risque et le risque du cancer du sein.

Étant donné que les facteurs tels que l'histoire familiale du cancer du sein ou les gènes BRCA1 et BRCA2 ne sont liés qu'à environ 30 % des cas de la maladie, l'exposition environnementale semble jouer un rôle important dans le développement de la maladie. Puisque nous disposons d'informations sur l'exposition des patientes et d'une partie du groupe contrôle aux facteurs environnementaux de risque, nous avons voulu examiner l'effet de l'interaction gène-environnement sur la susceptibilité au cancer du sein.

En effet, nous disposons pour les échantillons provenant de l'Hôtel-Dieu (98 femmes atteintes du cancer du sein et 43 contrôles) des données épidémiologiques décrites dans le tableau 3.8a. Ces informations ont été recueillies sous forme de variables à catégorisation dichotomique (oui-non ; dessus-dessous de la valeur moyenne ; jamais-toujours), lors des entrevues réalisées entre 1989 et 1993. Les différentes catégories présentées dans le tableau 3.8a représentent des facteurs confondants qui peuvent influencer le risque de développer le cancer du sein. Grâce à ces données, il a été possible d'effectuer une analyse multivariée utilisant une régression logistique non-linéaire. Le but de cette analyse était de corriger le risque du cancer tel que déterminé à partir des données génétiques pour l'effet confondant des facteurs épidémiologiques de risque. En d'autres mots, cette analyse a pour but de déterminer le risque du cancer du sein tel que conféré par les haplogroupes mitochondriaux, quand celui-ci est corrigé pour l'effet confondant de l'environnement.

Le tableau 3.8b présente les résultats de l'analyse des relations entre les haplogroupes mitochondriaux, les facteurs environnementaux du risque et le risque de développer le cancer du sein. Comme il a été décrit dans la section 3.5, les haplogroupes mitochondriaux seuls ne semblent pas modifier le risque de la maladie. Néanmoins, quand le risque associé à chaque haplogroupe est corrigé pour l'effet confondant des facteurs environnementaux, on remarque que

l'haplogroupe K est un facteur significatif de protection. En effet, l'haplogroupe K seul ne modifie pas le risque de la maladie (OR= 0.5; 95% IC, 0.1-1.7) . Cependant une fois corrigé, il devient un facteur de protection significatif (OR.= 0.1; 95% IC, 0.01-0.8).

Tableau 3.8a Données épidémiologiques considérées pour cette étude.

grossesse	oui
	non
allaitement	oui
	non
ménopause	oui
	non
Index de Masse Corporelle	<24 kg/m
	>24 kg/m
consommation d'alcool	jamais
	oui
usage du tabac	oui
	non
thérapie du remplacement hormonal	oui
	non
âge	> 55 ans
	< 55 ans
âge à la première menstruation	>13 ans
	<13 ans
histoire familiale des cancers du sein et ovaires	non
	oui

Tableau 3.8b. Relations entre les haplogroupes et le risque du cancer du sein.

Haplogroupe	Cancer (n = 94)	Contrôles (n = 83)	OR	95% I.C.	corrigé*	
					R.R	95% I.C.
H	39	37	0,9	0,5-1,6	2,3	0,8-6,2
V	11	9	1	0,4-2,8	0,2	0,03-1,0
J	7	5	1,4	0,4-4,6	0,5	0,1-3,3
K	4	7	0,5	0,1-1,7	0,1	0,01-0,8
T	6	8	0,6	0,2-2,0	3,3	0,3-35
U	4	5	0,7	0,2-2,0	1,5	0,2-9,5
HV	50	46	0,9	0,5-1,6	1,2	0,5-3,1
UK	8	12	0,5	0,2-1,4	0,4	0,1-1,3
TJ	13	13	0,9	0,4-2,0	1,2	0,3-4,3

N.B.

* voir section 3.8 pour l'analyse des relations entre les haplogroupes mitochondriaux et les facteurs environnementaux de risque.

3.9 Relations entre les haplogroupes mitochondriaux, les variants alléliques des gènes de réparation de l'ADN et le risque de la LLA.

Étant donné que les échantillons provenant d'enfants leucémiques ont aussi été génotypés pour les variants des gènes de réparations décrits dans le tableau 3.9a (Mathonnet et al., 1999), nous avons voulu analyser les effets de l'interaction entre les haplogroupes mitochondriaux, les différents allèles des gènes de réparation et le risque de la leucémie lymphoblastique aiguë. En effet dans la population générale il existe une variabilité interindividuelle considérable dans la capacité de la réparation de l'ADN qui, comme avec bien d'autres traits phénotypiques, est un reflet de la variabilité génétique sous-jacente.

L'identification récente de variants communs dans les régions codantes des gènes APE, XRCC1, XRCC3, XPF, XPD, hMSH2, hMLH1 et hMSH3, ainsi que l'implication possible des gènes de réparation dans le phénomène du phénotype mutateur permettent de tester l'hypothèse

Tableau 3.9a: Caractéristiques des variants dans les gènes de réparation.

Système de réparation	Locus	Exon	position	Allèle	
				WT	MT
Réparation par excision de bases	XRCC1	6	26304	cytosine	thymine
	APE	5	2197	thymine	guanine
Réparation par excision de nucléotides	XPD	23	35931	adénine	cytosine
	XPF	8	1256	guanine	adénine
Réparation par mésappariements	hMLH1	8	676	adénine	guanine
	hMSH3	21	2835	guanine	adénine
	hMSH3	23	3124	adénine	guanine

Tableau adapté de Mathonnet et al., en préparation
WT- sauvage; MT-mutant

des gènes de réparation comme facteurs de risque du cancer. Ainsi, le gène APE encodant une endonuclease apurinique et apyrimidique (Dempfle et al., 1991); XRCC1 est impliqué dans la recombinaison, la réparation des cassures double-brin (Zdzienicka et al., 1995) et dans le mécanisme de réparation par excision de bases (Lindahl et al., 1997). Même si relativement peu est connu sur le rôle spécifique du gène XRCC3, une association entre les variants de gènes XRCC1 et XRCC3 et le risque du cancer a été rapportée (Price et al., 1997). XPF est une nucléase capable de réagir avec la région 5' des lésions à l'ADN et XPD possède une activité de hélicase. Cependant, le rôle exact de XPF et XPD dans le mécanisme de réparation de l'ADN reste à déterminer.

Le tableau 3.9b présente l'analyse des relations entre les haplogroupes mitochondriaux, les variants alléliques des enzymes de réparation et le risque de la leucémie lymphoblastique aiguë. Il est important de noter que puisqu'il s'agit ici d'une analyse à multiples comparaisons, nous avons adopté une valeur de $\alpha=0.003$, en dessous de laquelle une association est considérée comme statistiquement significative. Comme illustré dans le tableau 3.9b, aucune association statistiquement significative n'a été observée. Ainsi, l'analyse exhaustive des relations entre les haplogroupes mitochondriaux, les variants alléliques des enzymes de réparation permet de conclure que celles-ci n'influencent pas le risque de développer la LLA.

Tableau 3.9b: Relations entre les haplogroupes
les variants des gènes de réparation et le risque de

Haplogroupe	Génotype	LLA (n = 141)	Contrôle (n = 241)	OR.	95% I.C.	P
H	nHMLH1(8)	34/23	32/31	1,4	0,7-3,0	0,4
	nHMLH1(8)	24/28	23/24	1	0,4-1,9	0,8
	nAPE(5)	30/18	25/15	1		1
	nAPE(5)	18/22	18/22	1		1
	nMSH3(21)	16/34	15/37	1		1
	nMSH3(21)	33/10	37/13	1,2	0,4-3,0	0,8
	nMSH3(23)	28/25	25/28	1,3	0,6-2,7	0,7
	nMSH3(23)	26/20	31/26	1		1
	nXPD(23)	35/27	26/33	1,6	0,8-3,3	0,2
	nXPD(23)	24/19	32/17	0,7	0,3-1,6	0,4
	nXPF(8)	7/37	11/44	1		1
	nXPF(8)	44/6	42/6	1		1
	nXRCC1(6)	8/33	6/47	1,9	0,6-6,0	0,4
	nXRCC1(6)	45/5	40/4	1		1
	nnHMLH1(8)	6/44	10/53	1		1
	nnHMLH1(8)	52/7	45/2	0,3	0,06-1,7	0,3
	nnMSH3(21)	1/41	2/48	1		1
	nnMSH3(21)	48/3	50/2	0,6	0,1-4,0	0,7
	nnXPD(23)	9/43	11/46	0,9	0,3-2,3	0,8
	nnXPD(23)	50/3	47/4	1,4	0,3-6,7	0,7
nnXRCC1(6)	1/58	1/51	1		1	
nnXRCC1(6)	52/0	46/0				
nnMSH3(23)	6/40	6/47	1		1	
nnMSH3(23)	48/5	56/7	1		1	
V	nHMLH1(8)	5/43	6/49	1		1
	nHMLH1(8)	4/58	5/50	0,7	0,2-2,7	0,7
	nAPE(5)	3/31	4/27	1		1
	nAPE(5)	6/49	6/43	1		1
	nMSH3(21)	1/60	3/68	0,4	0,1-3,7	0,6
	nMSH3(21)	7/25	6/25	1		1
	nMSH3(23)	1/43	5/54	0,3	0,02-2,2	0,2
	nMSH3(23)	8/48	5/46	1,5	0,5-5,0	0,6
	nXPD(23)	4/45	4/58	1,3	0,3-5,4	0,7
	nXPD(23)	6/51	7/39	0,7	0,2-2,1	0,6
	nXPF(8)	2/73	1/77	1		1
	nXPF(8)	8/11	9/16	1		1
	nXRCC1(6)	0/72	0/77			
	nXRCC1(6)	6/14	10/10	0,4	0,1-1,5	0,3
	nnHMLH1(8)	2/90	1/88	1		1
	nnHMLH1(8)	7/11	10/11	1		1
	nnMSH3(21)	1/82	0/89			
	nnMSH3(21)	7/3	9/4	1		1
	nnXPD(23)	0/82	0/84			
	nnXPD(23)	10/12	11/15	1		1
nnXRCC1(6)	0/85	0/87				
nnXRCC1(6)	6/1	10/1	0,6	0,03-11	1	
nnMSH3(23)	0/80	3/90				
nnMSH3(23)	9/11	7/10	1		1	

Tableau 3.9b (suite)

Haplogroupe	Génotype	LLA (n = 141)	Contrôle (n = 241)	OR	95% I.C.	P
K	nHMLH1(8) *1	4/53	3/53	1		1
	nHMLH1(8) *0	5/59	1/53	4,5	0,5-39	0,2
	nAPE(5) *1	4/33	2/33	2,0	0,3-12	0,7
	nAPE(5) *0	4/48	0/45			
	nMSH3(21) *1	2/61	0/70			
	nMSH3(21) *0	6/24	4/28	1,7	0,4-6,9	0,5
	nMSH3(23) *1	5/47	0/55			
	nMSH3(23) *0	4/44	4/51	1		1
	nXPD(23) *1	2/44	1/63	2,8	0,3-32	0,6
	nXPD(23) *0	7/53	2/42	1		1
	nXPF(8) *1	0/75	0/83			
	nXPF(8) *0	6/13	3/17	2,6	0,5-12	0,3
	nXRCC1(6) *1	1/73	0/83			
	nXRCC1(6) *0	5/13	4/10	1		1
	nnHMLH1(8) *1	1/89	0/94			
	nnHMLH1(8) *0	8/12	4/12	2,0	0,5-8,4	0,5
	nnMSH3(21) *1	0/81	0/94			
	nnMSH3(21) *0	8/4	4/4	2,0	0,3-12	0,6
	nnXPD(23) *1	0/85	1/91			
	nnXPD(23) *0	9/12	2/14	5,2	0,9-29	0,07
	nnXRCC1(6) *1	0/58	0/93			
	nnXRCC1(6) *0	6/1	4/1	1,5		1
	nnMSH3(23) *1	1/81	0/93			
nnMSH3(23) *0	8/10	4/13	2,6	0,6-11	0,3	
U	nHMLH1(8) *1	6/44	4/48	1,6	0,4-6,0	0,5
	nHMLH1(8) *0	3/57	6/52	0,5	0,1-2,0	0,3
	nAPE(5) *1	4/33	8/33	0,5	0,1-1,8	0,4
	nAPE(5) *0	4/48	0/39			
	nMSH3(21) *1	1/62	1/67	1		1
	nMSH3(21) *0	5/25	7/27	1		1
	nMSH3(23) *1	3/48	3/52	1		1
	nMSH3(23) *0	3/46	7/48	0,4	0,1-1,8	0,3
	nXPD(23) *1	1/47	2/57	1,3		1
	nXPD(23) *0	4/54	8/41	0,4	0,1-1,3	0,1
	nXPF(8) *1	1/74	3/79	1		1
	nXPF(8) *0	7/12	7/14	1		1
	nXRCC1(6) *1	1/71	0/77			
	nXRCC1(6) *0	7/13	10/10	0,5	0,1-1,9	0,5
	nnHMLH1(8) *1	2/90	0/88			
	nnHMLH1(8) *0	7/11	10/12	1		1
	nnMSH3(21) *1	0/83	0/90			
	nnMSH3(21) *0	6/4	8/4	1,5		1
	nnXPD(23) *1	0/89	0/83			
	nnXPD(23) *0	5/12	10/15	0,6	0,2-2,3	0,5
	nnXRCC1(6) *1	0/83	0/87			
	nnXRCC1(6) *0	8/1	10/1			
	nnMSH3(23) *1	0/83	0/87			
nnMSH3(23) *0	6/11	10/13	0,7	0,2-2,6	0,7	

Tableau 3.9b (suite)

Haplogroupe	Génotype	LLA (n = 141)	Contrôle (n = 241)	OR	95% I.C.	P	
T	nHMLH1(8) *1	4/41	2/50	2,4	0,4-14	0,4	
	nHMLH1(8) *0	6/59	4/54	1,3	0,4-5,1	0,7	
	nAPE(5) *1	3/34	1/32	2,8	0,3-28	0,6	
	nAPE(5) *0	3/49	1/46	2,8	0,3-28	0,6	
	nMSH3(21) *1	3/60	2/70	1,7	0,3-10	0,7	
	nMSH3(21) *0	7/23	4/26	2,0	0,5-7,6	0,5	
	nMSH3(23) *1	4/47	3/56	1,6	0,3-7,4	0,7	
	nMSH3(23) *0	4/45	3/38	1		1	
	nXPD(23) *1	4/46	3/62	1,8	0,4-8,4	0,4	
	nXPD(23) *0	5/51	3/40	1		1	
	nXPF(8) *1	1/75	0/80				
	nXPF(8) *0	6/12	6/17	1		1	
	nXRCC1(6) *1	1/70	0/81				
	nXRCC1(6) *0	8/13	6/10	1		1	
	nnHMLH1(8) *1	0/87	0/92				
	nnHMLH1(8) *0	10/13	6/10	1		1	
	nnMSH3(21) *1	1/80	1/93	1		1	
	nnMSH3(21) *0	9/3	5/3	1,8	0,2-12	0,6	
	nnXPD(23) *1	0/85	1/88				
	nnXPD(23) *0	9/12	5/14	2,1	0,6-8,0	0,3	
	nnXRCC1(6) *1	0/82	0/91				
	nnXRCC1(6) *0	9/1	6/1	1		1	
	nnMSH3(23) *1	2/83	1/92	2,2	0,5-24	0,6	
	nnMSH3(23) *0	6/9	5/12	1,6	0,4-7,0	0,7	
	J	nHMLH1(8) *1	3/47	5/49	0,6	0,1-2,7	0,7
		nHMLH1(8) *0	0/60	5/51			
nAPE(5) *1		2/37	4/32	1		1	
nAPE(5) *0		0/50	1/43				
nMSH3(21) *1		0/63	3/67				
nMSH3(21) *0		2/26	7/25	0,3	0,05-1,4	0,15	
nMSH3(23) *1		0/50	6/55				
nMSH3(23) *0		1/49	4/45	0,2	0,02-2,1	0,2	
nXPD(23) *1		3/50	3/58	1		1	
nXPD(23) *0		1/52	7/40	0,1	0,01-0,9	0,02	
nXPF(8) *1		1/78	1/77	1		1	
nXPF(8) *0		3/12	9/16	0,4	0,1-20,	0,5	
nXRCC1(6) *1		1/78	2/79	2		1	
nXRCC1(6) *0		0/13	8/8				
nnHMLH1(8) *1		0/94	0/88				
nnHMLH1(8) *0		3/13	10/12	0,3	0,1-12	0,2	
nnMSH3(21) *1		0/87	1/89				
nnMSH3(21) *0		2/4	9/3	0,2	0,02-1,4	0,1	
nnXPD(23) *1		1/91	1/84	1		1	
nnXPD(23) *0		3/11	9/14	0,4	0,1-1,9	0,3	
nnXRCC1(6) *1		0/90	0/87				
nnXRCC1(6) *0		10/1	1/0				
nnMSH3(23) *1		0/88	2/89				
nnMSH3(23) *0		1/11	9/11	0,1	0,01-1,0	0,05	

Tableau 3.9b (suite)

Haplogroupe	Génotype	LLA (n = 141)	Contrôle (n = 241)	OR	95% I.C.	P
H+V	nHMLH1(8) *1	39/20	38/28	1,4	0,7-2,9	0,4
	nHMLH1(8) *0	30/26	28/20	0,6	0,3-1,3	0,3
	nAPE(5) *1	34/26	29/11	1,0		1,0
	nAPE(5) *0	25/19	24/18	1,0		1,0
	nMSH3(21) *1	17/28	18/34	1,1	0,5-2,6	0,8
	nMSH3(21) *0	42/10	43/10	1,0		1,0
	nMSH3(23) *1	29/19	30/26	1,3	0,6-2,9	0,5
	nMSH3(23) *0	36/20	36/22	1,0		1,0
	nXPD(23) *1	41/22	30/27	1,7	0,8-3,5	0,2
	nXPD(23) *0	30/17	39/16	0,7	0,3-1,6	0,5
	nXPF(8) *1	9/31	12/39	1,0		1,0
	nXPF(8) *0	53/5	51/5	1,0		1,0
	nXRCC1(6) *0	8/30	6/40	1,8	0,6-5,7	0,4
	nnHMLH1(8) *1	8/41	11/46	1,0		1,0
	nnHMLH1(8) *0	61/5	55/2	0,4	0,1-2,4	0,4
	nnMSH3(21) *1	2/35	2/42	1,0		1,0
	nnMSH3(21) *0	57/3	59/2	1,0		1,0
	nnXPD(23) *1	9/35	11/39	1,0		1,0
	nnXPD(23) *0	62/4	58/4	1,0		1,0
	nnXRCC1(6) *1	0/35	0/44			
	nnXRCC1(6) *0	56/0	60/0			
	nnMSH3(23) *1	6/34	9/44	1,0		1,0
	nnMSH3(23) *0	59/5	57/4	1,0		1,0
U+K	nHMLH1(8) *1	9/42	7/49	1,5	0,5-4,3	0,6
	nHMLH1(8) *0	8/56	7/51	1,0		1,0
	nAPE(5) *1	8/32	10/35	1,0		1,0
	nAPE(5) *0	8/96	0/84			
	nMSH3(21) *1	3/59	1/66	3,5	0,3-33	0,3
	nMSH3(21) *0	11/24	11/27	1,0		1,0
	nMSH3(23) *1	7/24	3/51	2,5	0,6-10	0,3
	nMSH3(23) *0	7/42	11/49	1,0		1,0
	nXPD(23) *1	2/41	3/56	1,0		1,0
	nXPD(23) *0	11/56	10/43	0,8	0,3-2,1	0,8
	nXPF(8) *1	1/71	3/80	1,0		1,0
	nXPF(8) *0	13/13	10/14	1,4	0,5-4,3	0,6
	nXRCC1(6) *1	2/144	0/160			
	nXRCC1(6) *0	13/1	14/1	1,0		1,0
	nnHMLH1(8) *1	3/179	0/182			
	nnHMLH1(8) *0	14/10	14/13	1,3	0,4-3,0	0,8
	nnMSH3(21) *1	0/164	0/184			
	nnMSH3(21) *0	14/5	12/4	1,0		1,0
	nnXPD(23) *1	0/174	1/174			
	nnXPD(23) *0	13/13	12/14	1,0		1,0
	nnXRCC1(6) *1	0/168	0/180			
	nnXRCC1(6) *0	13/1	14/1	1,0		1,0
	nnMSH3(23) *1	1/164	0/180			
nnMSH3(23) *0	13/10	14/13	1,0		1,0	

Tableau

Haplogroupe	Génotype	LLA (n =	Contrôle (n =	OR	95% I.C.	P
T+J	nHMLH1(8)	8/43	7/47	1,3	0,4-	0,8
	nHMLH1(8)	7/57	9/51	0,7	0,2-	0,6
	nAPE(5)	5/34	5/33	1,0		1,0
	nAPE(5)	5/48	5/33	1,0		1,0
	nMSH3(21)	3/60	5/66	0,7	0,2-	0,7
	nMSH3(21)	10/2	11/2	1,0		1,0
	nMSH3(23)	5/49	9/55	0,6	0,2-	0,6
	nMSH3(23)	6/44	7/43	1,0		1,0
	nXPD(23)	9/46	6/56	1,8	0,6-	0,4
	nXPD(23)	6/49	10/4	0,5	0,2-	0,3
	nXPF(8)	3/75	1/75	3,0	0,3-	0,6
	nXPF(8)	9/11	15/1	1,0		1,0
	nXRCC1(6)	3/74	2/76	1,0		1,0
	nnHMLH1(8)	0/18	0/18			
	nnHMLH1(8)	15/1	16/1	1,0		1,0
	nnMSH3(21)	1/80	2/87	0,5	0,04-	1,0
	nnMSH3(21)	12/4	12/2	0,4	0,1-	0,7
	nnXPD(23)	1/83	2/83	0,5		1,0
	nnXPD(23)	14/1	14/1	1,0		1,0
	nnXRCC1(6)	0/17	0/17			
nnXRCC1(6)	12/1	16/0				
nnMSH3(23)	2/84	3/88	1,0		1,0	
nnMSH3(23)	9/9	13/1	1,0		1,0	

N.B.

R.R, risque relatif calculé à partir du ratio du nombre de génotypes sous investigation sur le nombre de génotypes opposés chez les patients, comparé au même type de ratio chez les individus contrôles.

Le test de Fisher n'a pas été appliqué dans les cas où un des génotypes était absent dans un des deux groupes (patients ou contrôles).

Le nom du locus est inscrit en caractère majuscule et le numéro de l'exon où se trouve la mutation est indiqué entre les parenthèses (pour la description de la nature des mutations voir le tableau 3.9a).

Le suffix "n" placé devant le nom du locus définit l'état dans lequel le chiffre "0" représente les génotypes homozygotes pour l'allèle sauvage et le chiffre "1" représente les génotypes homo- et heterozygotes pour l'allèle mutant.

À l'inverse, le suffix "nn" placé devant le nom du locus définit l'état dans lequel le chiffre "0" représente les génotypes homo- et heterozygotes pour l'allèle sauvage et le chiffre "1" représente les génotypes homozygotes pour l'allèle mutant.

Remarque finale.

Nous avons déterminé que les haplogroupes I, W et X, qu'ils soient analysés seuls ou en regroupement phylogénétique ne modifient pas le risque d'aucune des cancers étudiés. Pour cette raison, les résultats des analyses sous-jacentes sont exclus de tous les tableaux présentés.

Chapitre 4 : Discussion

4.1 Considérations générales sur la méthode de génotypage.

Le génotypage des treize loci définissant les 9 haplogroupes européens a été effectué par la méthode PCR-ASO (*Allele-Specific-Oligo*). Cette méthode consiste à amplifier par PCR le fragment contenant le site sous investigation, transférer l'amplicon sur une membrane de Nylon et l'hybrider avec deux sondes différentes, chacune correspondant à une forme allélique. Cette approche a été mise au point dans notre laboratoire (Labuda et al., 1999) et son efficacité a été vérifiée dans le cadre d'une vaste étude sur l'influence des polymorphismes fonctionnels des enzymes de Phase I et II sur le risque de la LLA (Krajinovic et al., 1999).

4.1.1 Le PCR multiplex.

Etant donné le nombre élevé d'individus (523) et de sites (13) analysés, nous avons décidé d'effectuer les réactions PCR de manière «multiplex» c'est-à-dire en amplifiant plusieurs segments dans une même réaction. Ce principe a été validé dans notre laboratoire au préalable dans le cadre des études de génotypage (Krajinovic et al 1999, Labuda et al 1999). Le tableau 2.3.3 présente les différentes combinaisons d'amorces utilisées. Ces combinaisons ont été déterminées de façon empirique. Comme on peut remarquer, deux sites étaient amplifiés par réaction à l'exception de la position 4216 amplifiée seule.

Il est important de noter que le contenu des amorces en guanine et cytosine varie entre chaque paire d'amorces. Etant donné que la température d'hybridation d'un oligonucléotide dépend en grande partie de son contenu en guanine et cytosine, il était nécessaire de normaliser les températures d'hybridation de chaque amorce dans une réaction «multiplex», afin d'optimiser la probabilité d'initiation de la polymérisation et d'hybridation des amorces (Wang et al., 1998). Nous avons donc décidé d'ajouter à l'extrémité 5' de chaque amorce des séquences de 15 nucléotides, riches en GC. Ainsi, chaque amorce « Forward » et « Reverse » était complétée par les séquences ATATCTGCAGGGAGA et ATATCTTAAGGGAGA respectivement. L'utilisation de telles amorces nous a

permis de standardiser les températures d'hybridation pour toutes les réactions d'amplification. Ainsi, nous avons déterminé d'une façon empirique que l'efficacité des réactions est maximisée par un processus d'amplification à deux étapes : une première étape de 6 cycles où la température d'hybridation est de 48 °C suivie d'une deuxième étape de 30 cycles où la température d'hybridation est de 68 °C.

4.1.2 Hybridation ASO.

Etant donné le nombre élevé d'échantillons-sites à géotyper (523 échantillons x 13 sites par échantillon) au lieu d'utiliser l'approche classique RFLP, une technique relativement coûteuse et laborieuse, nous avons opté pour la méthode de géotypage ASO (pour une description détaillée de cette technique voir la section 3.1). À nos connaissances, ceci est un précédent en ce qui concerne le géotypage des haplogroupes mitochondriaux. Toutefois, l'approche ASO a cependant déjà été utilisée avec succès pour le géotypage des variants de la région-contrôle de l'ADN mitochondrial (Stoneking et al., 1991). Cette technique, mise au point dans notre laboratoire pour différents systèmes génétiques, permet un géotypage rapide et efficace d'un nombre élevé d'échantillons dans un temps relativement court.

Parmi les avantages de la méthode ASO par rapport à l'approche RFLP il y a : 1) la rapidité, 2) la fiabilité (la méthode ASO permet notamment de contourner les difficultés d'interprétations que posent les digestions enzymatiques incomplètes) et 3) le coût. Cependant, l'approche ASO ne permet d'analyser que les mutations ciblées par les sondes utilisées. Ainsi, même si dans un contexte général de phylogénie cette approche rend possible l'étude de l'association de l'ensemble de la variabilité avec un phénotype donné, elle ne permet que d'orienter l'investigation vers des embranchements phylogénétiques majeurs. Hormis donc la possibilité que les mutations géotypes par les sondes soient directement impliquées dans l'ontogenèse du phénotype en question, l'investigation ASO de la variabilité interne de chaque haplogroupe nécessite une connaissance *a priori* de la nature des mutations sous-jacentes. C'est ainsi que dans un contexte de variabilité inconnue, la méthode RFLP représente un avantage puisqu'elle permet non seulement le géotypage mais aussi l'exploration de la diversité. Ceci étant dit, notre étude n'était qu'un projet pilote dont le but fut

de pointer vers des embranchements majeurs de l'arbre phylogénétique mitochondrial. Dans ce contexte, l'approche ASO s'est avérée rapide et fiable.

4.2 Les limitations de notre étude.

La taille des échantillons analysés, la structure génétique de la population utilisée et le choix des polymorphismes étudiés constituent des facteurs limitant de notre étude.

4.2.1 La taille des échantillons et la puissance de l'étude.

L'un des aspects essentiels de toute analyse statistique est la relation entre la taille de l'échantillon et le degré de précision avec lequel nous pouvons faire des conclusions. Dans cette section, nous allons évaluer le potentiel de précision avec laquelle nous pouvons tirer les conclusions de l'ensemble des données utilisées dans cette étude. En d'autres mots, nous aimerions déterminer la valeur des risques relatifs que la taille de nos échantillons aurait dû nous permettre de détecter.

Le tableau 4.2.1 présente les relations entre le risque relatif, la fréquence allélique et la taille de l'échantillon. Le tableau a été dérivé à partir des équations 1) et 2), décrites dans la section 2.8. L'information incluse dans ce tableau permet de déterminer la taille de l'échantillon nécessaire afin de détecter de façon significative ($\alpha=0.05$) un risque relatif X associé avec un marqueur de fréquence Y. Pour les fins de cette analyse, nous allons considérer la mitochondrie comme un locus polymorphe caractérisé par deux classes de fréquences alléliques : la classe de fréquence 0,3 (l'haplogroupe H) et la classe de fréquences 0,05-0,1 (haplogroupes V, U, K, J et T). De plus, il faut noter que les corrélations du tableau 4.2.1 s'appliquent seulement dans les cas où les groupes cas et contrôle sont de taille semblable. Dans le cas de l'étude présente, cette situation s'applique seulement aux groupes cas et contrôles utilisés pour l'étude du risque du cancer du sein (94 patientes et 98 contrôles). Pour les deux autres groupes de patients, il est nécessaire d'effectuer une conversion que nous allons décrire plus-bas. Finalement, l'utilisation du tableau 4.2.1 est conditionnelle sur la supposition que l'allèle investigué a une pénétrance complète. Pour les besoins de cette discussion, nous allons donc assumer que ceci est le cas des haplogroupes mitochondriaux.

Ainsi, le tableau 4.2.1 indique que l'étude de la relation entre les haplogroupes mitochondriaux et le risque du cancer du sein basée sur un échantillon

Tableau 4.2.1: Relations entre le risque relatif détectable, la fréquence allélique et la taille de l'échantillon dans une étude cas-contrôles.

Fréquence allélique	Risque Relatif							
	0.5	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0	10.0
0.05	1369	2347	734	393	259	150	105	43
0.1	701	1266	402	219	146	87	62	27
0.15	479	913	295	163	110	67	48	23
0.2	370	743	244	136	93	58	43	21
0.25	306	647	216	122	85	53	40	21
0.3	264	590	200	115	80	51	39	22
0.35	236	556	192	111	79	51	39	23
0.4	216	538	188	111	79	52	41	24
0.45	203	533	189	112	81	54	43	26
0.5	194	538	194	116	85	58	46	29

N.B.

Dans le cas d'une étude cas-contrôle avec un nombre égal de cas et de contrôles, ce tableau permet de déterminer la taille de l'échantillon nécessaire pour obtenir un risque relatif donné à un niveau de signification de 5%.

Tableau adapté de Armitage P. et Berry G., 1994, page 580

de 94 cas nous permettrait de détecter d'une façon significative les risques relatifs supérieurs à 3,0.

Étant donné que les données du tableau 4.2.1 s'appliquent seulement quand la taille des groupes cas et contrôle est semblable, afin d'appliquer ce même type d'analyse aux résultats des associations entre les haplogroupes mitochondriaux et le risque de la LLA et du cancer du côlon, il est nécessaire d'effectuer quelques ajustements. L'équation 3) (section 2.8) permet de convertir une étude de deux groupes à taille différente en une étude de deux groupes à taille semblable. Ainsi, d'un point de vue de précision statistique, l'étude de l'association entre les haplogroupes mitochondriaux et le risque de la LLA utilisant des groupes de 141 patients et 241 contrôles est équivalente à une étude incluant 180 individus dans chacun des groupes. Le tableau 4.2.1 indique que

l'étude de la relation entre les haplogroupes mitochondriaux et le risque de la LLA basée sur un échantillon de 180 cas nous permettrait de détecter d'une façon significative les risques relatifs supérieurs à 2,5.

De même, l'équation 3) permet de postuler que l'étude de l'association entre les haplogroupes mitochondriaux et le risque du cancer du côlon utilisant des groupes de 47 patients et 241 contrôles possède le même potentiel de précision statistique qu'une étude incluant environ 80 individus dans chacun des groupes. Le tableau 4.2.1 indique qu'une telle étude nous permettrait de détecter d'une façon significative les risques relatifs supérieurs à 3,0.

En somme, la taille des échantillons et la fréquence des allèles analysés dans cette étude permettent de détecter d'une façon significative des risques relatifs supérieurs à 2,5. Étant donné que, tout on en étant capable, nous n'avons pas observé de telles associations, ceci nous permet d'avoir plus de confiance en la conclusion que les haplogroupes mitochondriaux seuls n'ont pas d'effet majeur sur le risque du cancer.

Cependant, même si l'absence d'un lien biologique entre le fonctionnement mitochondrial et le cancer peut expliquer le fait que la plupart associations entre les haplogroupes mitochondriaux et le risque des trois types de cancers ne sont pas statistiquement significatives, nous ne pouvons pas négliger la possibilité d'une erreur du type II : vu la fréquence des marqueurs analysés, la taille des échantillons fut insuffisante pour conférer un degré de signification statistique (à un niveau $\alpha=0,05$) aux associations observées. En effet, la grande majorité des valeurs du risque relatif calculés pour les trois types de cancers est en dessous de 2,0 (tableaux 3.4, 3.5 et 3.6) or, comme nous l'avons vu, la méthodologie de notre étude impose un seuil de sensibilité de 2,5.

4.2.2 La structure génétique et les fausses associations.

Dans les études d'association du type cas-contrôles, une subdivision structurelle de la population ou un récent métissage (« admixture ») des populations peuvent donner lieu à de fausses associations entre un phénotype et un locus-candidat (Pritchard et Rosenberg, 1999 ; Ewens et Spielman, 1995). Une association fausse est définie ici comme une association entre un phénotype et un locus marqueur quand ce-dernier n'a aucun lien avec le phénotype étudié. La subdivision de la population peut donner lieu à de fausses associations quand

l'échantillonnage d'individus qui seront inclus dans l'étude ne tient pas compte du contenu ethnique ou/et de la distribution spatiale (géographique) de la population étudiée. En effet, la subdivision d'une population (ou tout autre forme d'accouplement non-aléatoire (« non-random mating »)) favorise la dérive génétique et les effets fondateurs (Slatkin, 1991). Ceux-ci peuvent entraîner des fluctuations dans les proportions d'allèles marqueurs entre les différents segments de la population. Ainsi, une maladie présente dans une sous-population sera artificiellement associée avec tout marqueur dont la fréquence est élevée dans cette même sous-population.

De même, les populations issues d'un récent métissage possèdent une structure génétique hétérogène qui peut engendrer de fausses associations. À titre d'exemple, les études d'association du diabète du type II chez les indiens Pima (population caractérisée par une incidence élevée de la maladie) étaient biaisées par le fait que les individus Pima d'origine caucasienne étaient peu susceptibles à la maladie (Lander et Schork, 1994). Ainsi, tout marqueur dont la fréquence est plus élevée chez les Pima que chez les Caucasiens était associé avec la maladie.

Afin de diminuer le risque de telles associations, il est préférable d'utiliser pour les études cas-contrôles des populations homogènes, dont on connaît bien la structure génétique. Les résultats présentés dans cette étude montrent que du point de vue de la structure mitochondriale, les Canadiens-français constituent une population homogène, sans subdivisions et donc adéquate pour le type d'étude d'association que nous venons de décrire. En effet, la comparaison de la distribution des 9 haplogroupes mitochondriaux européens dans le groupe contrôle et dans la population pan-européenne (Richards et al., 1998) n'a révélé aucune fluctuation significative dans la fréquence des haplogroupes entre les deux populations. De plus, l'analyse de la distribution des haplogroupes mitochondriaux asiatiques et amérindiens M et C nous a permis d'évaluer le taux de métissage de la population canadienne-française à moins de 2%. En somme, le spectre de la variabilité mitochondriale de la population des Canadiens-français est semblable à celui des populations européennes et le niveau du métissage y est négligeable. Ainsi, il est peu probable que les associations significatives observées dans cette étude seraient causées par des subdivisions de la structure mitochondriale de la population des Canadiens-français.

4.2.3 Le choix des haplogroupes mitochondriaux comme marqueurs étudiés.

La définition du système mondial des haplogroupes est basée sur les données RFLP. Comme nous l'avons vu dans la section 1.7.4, cette méthode permet de scruter seulement 20 % du génome mitochondrial (Torroni et al. 1992). Par conséquent, aucun des haplogroupes n'est défini à partir de la séquence complète du génome mitochondrial car dans un contexte de génotypage à grande échelle, le séquençage d'une molécule entière de l'ADN mitochondrial représente une tâche trop laborieuse. Ceci souligne l'importance de l'application dans le génotypage mitochondrial d'autres méthodes permettant la détection de mésappariements simples de l'ADN, telles que SSCP (Thomas et al., 1994), électrophorèse sur gel dénaturant (Gross et al., 1994) ou « mutation détection enhancement gel matrix » (Alonso et al., 1996). Un tel exemple est illustré par l'application de l'électrophorèse sensible aux changements de conformation (« conformation-sensitive gel electrophoresis » (Ganguly et al., 1993)), utilisée récemment dans la population finlandaise pour l'identification de polymorphismes additionnels, appartenant à l'haplogroupe U (Finnilä et al., 2000).

Ceci dit, nous ne croyons pas avoir « manqué » une mutation, au moins à ce qui attrait à la diversité des populations européennes. L'absence de recombinaison dans le génome mitochondrial fait en sorte que toute mutation est en déséquilibre de liaison avec la mutation qui définit sa branche phylogénétique. Ainsi, tout effet phénotypique d'une mutation encore inconnue serait associé avec un des 9 haplogroupes étudiés.

Nous ne pouvons cependant pas négliger la possibilité dans les populations autres que européennes existent une ou des mutation(s) qui modifient le risque du cancer. Des études du type que nous avons présenté, appliquées aux autres haplogroupes mondiaux (présentés dans la figure 1.7.3) sont nécessaires pour répondre à cette question.

4.3 Rôle du génome mitochondrial dans le cancer ?

Brown *et al.* (1979) ont été parmi les premiers à proposer que les mutations du génome mitochondrial peuvent jouer un rôle important dans l'initiation, la progression et la régression tumorale. À présent, plusieurs anomalies mitochondriales associées avec le cancer ont été rapportées dans la

littérature. Notamment, des délétions du génome mitochondrial ont été observées dans les cellules d'adénocarcinome du côlon (Savre-Train et al., 1992, Heerdt et al., 1994), cancer du sein (Bianchi et al., 1995, Sharp et al., 1992), les tumeurs oncocytiques rénales et thyroïdiennes (Tallini et al., 1994, Kovacks et al., 1992), des gliomes humains (Liang et Hays, 1996) et dans le tissu cirrhotique entourant les tumeurs hépatiques (Yamamoto et al., 1992). On retrouve souvent des anomalies structurales et fonctionnelles des mitochondries dans les cellules des patients leucémiques et ceux atteints du syndrome myelo-dysplasique (MDS) (Hatfill et al., 1992). De plus, plusieurs types de MDS sont caractérisés par des réarrangements spontanés du génome mitochondrial suggérant que certaines cytopathies mitochondriales jouent un rôle dans la pathogenèse de la maladie (Bader-Meunier et al., 1994). Il a donc été ultérieurement proposé que les lésions de la chaîne respiratoire, causées par des mutations du génome mitochondrial, peuvent entraîner le développement d'un syndrome myeloblastique à lignées multiples. Des altérations génétiques subséquentes impliquant le génome nucléaire peuvent précipiter le processus de la transformation entraînant ainsi l'apparition de la leucémie (Gattermann et al., 1993). En effet, Hatfill et al., (1993) ont décrit un polymorphisme nucléotidique dans le gène du cytochrome *b* chez les individus MDS ayant progressés vers la leucémie myéloïde aiguë. En somme, les auteurs de toutes ces études suggèrent que les lésions du génome mitochondrial sont impliquées dans l'oncogenèse.

Il existe seulement deux études sur les relations entre la variabilité nucléotidique du génome mitochondrial et le cancer. Monnat et al. (1985) ont analysé la diversité mitochondriale dans la population d'adultes atteints de la leucémie. Le séquençage d'un segment de la région codante chez 387 individus n'a révélé aucune mutation somatique que l'on ne retrouverait que chez les patients. Afin de mettre en évidence les mutations mitochondriales impliquées dans la pathogenèse de la LLA, Ivanova et al. (1998) ont analysé la variabilité de l'ADN mitochondrial provenant de 30 patients leucémiques et 100 contrôles, les deux d'origine française. Pour ce faire, ils ont étudié les profils de digestion de la molécule avec les enzymes *HpaI*, *BamHI*, *HaeII*, *MspI*, *AvaII* et *HincII*. Cette analyse a révélé : 1) la présence, chez les patients leucémiques, de deux polymorphismes uniques, la perte des sites de restriction des enzymes *MspI* et *AvaII* aux positions 8112 et 16390, respectivement; et 2) la présence chez les

patients leucémiques de trois haplotypes uniques (malheureusement les auteurs ne précisent pas la nature exacte de ces haplotypes).

Cependant, il est difficile d'établir un parallèle entre notre étude et celle de Ivanova et al. Premièrement, dans la publication de Ivanova et al il n'y aucune information sur la nature (ou la définition) des haplogroupes étudiés. De plus, ces auteurs ne rapportent que des polymorphismes représentés par des pertes de sites de restriction, or les gains de sites des restrictions sont aussi des polymorphismes informatifs. De plus, l'approche expérimentale étant sensiblement semblable avec la nôtre, les enzymes de restriction utilisés dans l'étude citée ne représentent qu'un sous-groupe des enzymes utilisés dans notre étude. Cette étude est donc limitée à plusieurs niveaux. Notre étude représente donc la première analyse systématique et exhaustive de la relation entre les variants génétiques mitochondriales et le risque du cancer.

4.4 **Les haplogroupes mitochondriaux et le risque du cancer.**

Parmi toutes les relations analysées dans cette étude, seule l'association entre l'haplogroupe K et les allèles NQO1*2 et *3 (risque élevé de la LLA), ainsi que le rôle protecteur de l'haplogroupe K contre le cancer du sein représentent un indice d'une relation biologique entre les variants mitochondriaux et le risque du cancer. Ainsi, les individus les porteurs des allèles NQO1*2 et *3 et dont les mitochondries appartiennent à l'haplogroupe K sont à un risque élevé de développer la LLA (OR=12, 95%I.C., 1.5-101). Étant donné que l'enzyme NQO1 participe à la détoxification et à la protection des radicaux libres et que le génotype composé d'allèles *2 et *3 correspond à un enzyme dont la capacité métabolique est affaiblie, les individus porteurs de ces allèles seront caractérisés par un niveau du stress oxydatif plus élevé. Ceci est d'ailleurs reflété par l'augmentation significative du risque de développer la LLA propre à les allèles NQO1*2 et*3 seuls (OR = 2.1, 95% I.C. 1.2-3.9) (Krajinovic et al., *soumis*). De plus, dans un contexte où le risque de développer la LLA est encore plus élevé chez les individus ayant l'allèle NQO1*2 et*3, **et** dont les mitochondries appartiennent à l'haplogroupe K (OR = 12, 95% I.C. 1.5-101), il est probable que l'haplogroupe K soit associé avec un phénotype oxydatif particulier. Ceci est de plus supporté par l'observation que les garçons porteurs de l'haplogroupe K montrent une tendance vers un risque élevé de développer la LLA (OR=2.5 95% I.C, 0.9-7.4). À

l'opposé, les porteurs de l'haplogroupe K semblent être protégés contre le cancer du sein lorsque corrigé pour l'effet confondant des facteurs environnementaux. Quel peut-être donc l'effet phénotypique de l'haplogroupe K ?

Il n'existe pas dans la littérature d'évidences liant une mutation du génome mitochondrial au processus de carcinogenèse. De plus, aucune des trois mutations définissant l'haplogroupe K ne semble être associée avec un phénotype précis. Les mutations A10398G (changement d'une thréonine en une alanine dans la 3^{ème} sous-unité de la NADH Déshydrogénase) et G9055A (substitution d'une alanine en une thréonine dans le 6^{ème} sous-unité de la ATPase) sont des polymorphismes communs et une recherche exhaustive de la base de données mitochondriale MITOMAP (MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. Center for Molecular Medicine, Emory University, Atlanta, GA, USA.) n'a pu mettre en évidence aucune association de ces deux mutations avec des phénotypes mitochondriaux. La mutation A12308G est localisée dans le gène codant pour la tARN^{Leucine2} et elle n'entraîne pas de changement au d'acides aminés. Ceci étant dit, les effets phénotypiques de cette mutation demeurent ambivalents : certaines études l'identifiant comme une des lésions impliquées dans l'Ophthalmoplegie Chronique Externe (van den Ouweland et al., 1992), d'autres comme un polymorphisme commun et neutre (Marzuki et al., 1991, Torroni et al., 1994).

Ceci étant dit, les effets de l'haplogroupe K sur le risque du cancer suggèrent un rôle des variants génétiques mitochondriaux dans l'initiation du cancer. Dans ce contexte, il est important de rappeler que les haplogroupes mitochondriaux ne représentent que des embranchements majeurs de l'arbre phylogénétique mitochondrial, chacun d'entre eux ayant une structure interne riche. Comme il l'a été mentionné dans la section 1.7.4, cette structure interne des haplogroupes reflète le degré de diversité de l'ADN mitochondrial. L'absence de recombinaison du génome mitochondrial impose un déséquilibre de liaison entre toutes les mutations faisant partie d'une même branche phylogénétique. Ceci nous permet de postuler qu'en étudiant l'association entre l'haplogroupe K et le risque du cancer, nous analysons parallèlement l'association entre la maladie et toute la variabilité (y compris les mutations aux positions 12308, 10398 et 9055) propre à ce haplogroupe. Il est donc envisageable que sur une des sous-branches de la phylogénie interne de l'haplogroupe K se trouve une mutation encore inconnue, dont l'effet est d'augmenter ou de diminuer le degré de génération de radicaux

libres d'oxygène. Etant donné le déséquilibre de liaison complet du génome mitochondrial, une telle mutation pourrait être à l'origine de l'effet de l'haplogroupe K sur la susceptibilité au cancer. Il est donc envisageable que l'haplogroupe K modifie d'une façon significative les risque de développer la LLA et le cancer du sein à titre d'un marqueur, en déséquilibre de liaison avec un (ou plusieurs) mutation(s) causative(s) dont la nature et l'effet phénotypique reste(nt) encore inconnue(s). De plus, les effets phénotypiques des ces mutations ne semblent être mis en évidence qu'en présence d'autres facteurs de risque.

4.5 Conclusion

À la lumière des résultats présentés, les variants génétiques mitochondriaux semblent modifier le risque du cancer lorsque considéré seuls (l'haplogroupe K et le cancer du sein) ou en relation avec d'autres facteurs génétiques de risque (l'haplogroupe K et les allèles NQO 1 *2 et*3 chez les enfants atteints de la LLA). L'étude que nous venons de décrire constitue la première analyse systématique du rôle possible des variants génétiques mitochondriaux dans la transformation néoplasique. Il est possible que l'haplogroupe K participe dans le processus du développement de la LLA et du cancer du sein, mais ceci à titre d'un marqueur, en déséquilibre de liaison avec un (ou plusieurs) mutation(s) causative(s) dont la nature et l'effet phénotypique reste(nt) encore inconnue(s). Il en suit que nos résultats ont besoin d'être confirmés par d'autres études dont l'approche expérimentale devrait tenir compte des avatars méthodologiques de l'étude présente.

Remarques finales

L'étude dont nous venons de présenter les résultats est la première de son genre. En effet il n'existe dans la littérature aucune investigation systématique et exhaustive de la relation entre les variants génétiques mitochondriaux et le risque du cancer. L'originalité de notre étude repose dans l'approche expérimentale appliquée et dans la méthode de génotypage utilisée. En effet, l'approche phylogénétique que nous avons développée permet d'analyser l'effet de tout les variants mitochondriaux européens sur le risque du cancer. Il demeure tout de même possible (et d'ailleurs probable) que les 523 échantillons analysés ne représentent pas toute la variabilité mitochondriale européenne. Néanmoins, nous considérons avoir couvert dans cette étude une tranche plus que substantielle du spectre de la diversité mitochondriale des populations européennes. De plus, l'application de la méthode ASO au génotypage de nos échantillons est un précédent en ce qui concerne le génotypage des haplogroupes mitochondriaux.

À la lumière des résultats que nous venons de présenter, nous croyons que l'haplogroupe K constitue un facteur de modification du risque de la LLA et du cancer du sein. Cette modification n'est toutefois mise en évidence que dans un contexte d'interaction gène-gène ou gène-environnement. Cependant, ceci n'est-il pas la quintessence du modèle de carcinogenèse non-héréditaire. Après tout, le cancer est une maladie complexe causée par un fardeau mutationnel accru dont l'intensité est déterminée par l'interaction de l'environnement avec plusieurs loci à faible pénétrance. Dans ce contexte, l'haplogroupe K apparaît comme un facteur putatif de modification du risque de la LLA et du cancer du sein. Nos résultats ont besoin d'être confirmés par d'autres études dont l'approche expérimentale devrait tenir compte des avatars méthodologiques de l'étude présente.

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Damian Labuda pour m'avoir dirigé et encadré tout au long du périple. Je remercie Dr Daniel Sinnett pour son expertise dans le domaine d'épidémiologie génétique et pour son apport précieux et constructif tout au long de ce travail. Je remercie également les membres du laboratoire, notamment Dr Maja Krajnovic pour l'aide apportée aux analyses statistiques, Dr Ewa Zietkiewicz pour son aide inestimable dans les moments du doute, Dr Vania Yotova pour l'initiation à toutes les manipulations, Géraldine Mathonnet, B.Sc pour avoir partagé ses données sur les variants des gènes de réparation et enfin Dominik Gehl et Richard Côté pour le support informatique. Finalement, je tiens à remercier Raffaella Ballarano pour son assistance au secrétariat sans laquelle ce travail n'aurait pas pu être accompli.

Bibliographie

- Allen JA et Coombs MM (1980). Covalent binding of polycyclic aromatic compounds to mitochondrial and nuclear DNA. *Nature* 287 :244-245
- Alonso A, Martin P, Albarran C, Garcia O et Sancho M (1996) Rapid detection of sequence polymorphisms in the human mitochondrial DNA control region by polymerase chain reaction and single-strand conformation analysis in mutation detection enhancement gels. *Electrophoresis* 17 :1299-301
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290 :457-65
- Ames BN, Gold LS et Willett WC. (1995). The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92:5258-65
- Armitage P, Berry G, *Statistical Methods in Medical Research* Blackwell Science Ltd
- Baccichet A, Qualman SK et Sinett D. (1997) Allelic loss in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research* 21 :817-823
- Backer JM et Weinstein IB (1980) Mitochondrial DNA is a major cellular target for a dihydrodiol-epoxide derivative of benzo(a)pyrene. *Science* 209 :297-299
- Badawi AF, Hirvonen A, Bell DA, Lang NP et Kadlubar FF (1995) Role of aromatic amine acetyltransferases, NAT1 and NAT2, in carcinogen-DNA adduct formation in the human urinary bladder. *Cancer. Res.* 55 :5230-7
- Bader-Meunier JP, Rotig BA, Mielot F, Lavergne JM, Groisille L, Rustin P, Landrieu P, Dommergues-Munnich A et Tchernia G. (1994) Refractory anaemia and mitochondrial cytopathy in childhood. *Brit. J. Haemat.* 87 :381-385
- Bandy B et Davison A. (1990). Mitochondrial mutations may increase oxidative stress : implications for carcinogenesis and aging ? *Free Rad. Res.* 8 :523-539
- Beckmann KB et Ames BN. (1997) Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.* 272 :19633-19636
- Bell D.A., Stephens E.A., Castranio T, Umbach D.M., Watson M, Deakin M, Elder J, Hendrickse C, Duncan H et Strange R.C. (1995) Polyadenylation polymorphism in the acetyltransferase 1 gene (NAT1) increases the risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* 55 :3537-3540

- Benet LZ, Foetz DL et Sheiner LB. (1996). Pharmacokinetics. In : Hardmann JG, Goodman Gilman A, Limbird LE (eds.) *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed., McGraw-Hill, New York, pp 3-27
- Beyer RE, Segura-Aguilar J, Di Bernardo S, Cavazzoni M, Fato R, Fiorentini D, Galli MC, Setti M, Landi L et Lenaz G. (1996) The role of DT-diaphorase in the maintenance of the reduced antioxidant form of coenzyme Q in membrane systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 :2528-32
- Bianchi MS, Bianchi NO et Baillet G. (1995) Mitochondrial DNA mutations in normal and tumor tissues from breast cancer patients. *Cytogenet. Cell Genet.* 71 :99-103
- Black GC, Morten K, Laborde A et Poulton J (1996) Leber's hereditary optic neuropathy: heteroplasmy is likely to be significant in the expression of LHON in families with the 3460 ND1 mutation. *Br. J. Ophthalmol.* 80:915-7
- Bouchard , De Breakeleer (1990) L'Histoire d'un génome. *Presses de l'Université du Québec.*
- Brown MD, Hosseini SH, Torroni A, Bandelt HJ, Allen JC, Schurr TG, Scozzari R, Cruciani F et Wallace DC. (1998) mtDNA haplogroup X: An ancient link between Europe/Western Asia and North America ? *Am J Hum Genet* 63:1852-61
- Brown MD, Torroni A, Reckord CL, Wallace DC (1995) Phylogenetic analysis of Caucasian 11778-positive and 11778-negative Leber's hereditary optic neuropathy patients indicates multiple independent occurrences of the common primary mitochondrial DNA mutations. *Hum Mutat* 6 :311-325
- Brown WM, George M et Wilson AC. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 :1967-1971
- Bulger EM et Helton WS. (1998) Nutrient antioxidants in gastrointestinal diseases. *Gastroenterol Clin North Am* 27:403-19
- Bunn CL, Wallace DC et Eisenstadt JM. (1974) Cytoplasmic inheritance of chloramphenicol resistance in mouse tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 71:1681-5
- Burdon RH et Rice-Evans C. (1989) Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Rad. Res. Comm.* 6 :345-358
- Case JT et Wallace DC. (1981) Maternal inheritance of mitochondrial DNA polymorphisms in cultured human fibroblasts. *Somat. Cell Genet* 7 :103-108.

- Cavalli LR et Liang BC. (1998) Mutagenesis, tumorigenicity and apoptosis : are the mitochondria involved ? *Mutation Res.* 398 :19-26
- Cerutti P, Ghosh R, Oya Y et Amstad P. (1994) The role of the cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis. *Environ. Health. Perspect.* 102 Suppl 10:123-9
- Charbonneau H, Guillemette A, Légaré J, Desjardins B, Landry Y and Nault F (1987). Naissance d'une population : les Français établis au Canada au XVII-ème siècle. Institut National d'Études Démographiques, Presses de l'Université de Montréal.
- Chatel Geneviève (1999) Diversité génétique au Saguenay. *Mémoire présenté à la Faculté des Étude Supérieures.*
- Chinnery PF, Howell N, Andrews RM et Turnbull DM. (1999) Mitochondrial DNA analysis : polymorphisms and pathogenicity. *J. Mol. Genet.* 36 :505-510
- Clark KM, Bindoff LA, Lightowlers RN, Andrews RM, Griffiths PG, Johnson MA, Brierley EJ et Turnbull DM. (1997) Reversal of a mitochondrial DNA defect in human skeletal muscle. *Nat. Genet.* 16 :222-4
- Cocco T, Di Paola M, Papa S et Lorusso M. (1999) Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation. *Free Radic. Biol. Med.* 27:51-9
- Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, McKee AC, Beal MF, Graham BH et Wallace DC. (1994) Marked changes in mitochondrial DNA deletion levels in Alzheimer brains. *Genomics* 23:471-6
- Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF et Wallace DC. (1992a) Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat. Genet.* 2:324-9
- Corral-Debrinski W, Stepien G, Shoffner JM, Lott MT, Kanter K et Wallace DC. (1992b). Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. *Mutat. Res.* 275 :169-180
- Crofts F, Cosma G.N., Taioli E, Currie D.C., Toniolo P.T. et Garte S.J. (1993) A novel CYP1A1 gene polymorphism in African-Americans. *Carcinogenesis* 14 :1729-1731.
- Croteau DL et Bohr VA. (1997) Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J. Biol. Chem* 272 :25409-25412

- Daly A.K., Brockmüller J, Broly F, Eichelbaum M, Evans W.E., Gonzalez F.J., Huang J.D., Idle J.R., Ingelmann-Sundberg M, Ishizaki T, Jacqz-Aigrain E, Meyer U.A. Nebert D.W., Steen V.M., Wolf C.R. et Zanger U.M. (1996) Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics* 6 :193-201
- Davies SM et Ross JA. (1999) Childhood cancer etiology :recent reports. *Med. & Ped. Oncology* 32 :49-51
- Dean M (1998) Cancer as a complex developmental disorder – Nineteenth Cornelius P. Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer. Res.* 58 :5633-5636
- DeJong J.L., Chang C, WongPeng J, Knutsen T et Tu C.D. (1988) The human liver glutathione S-transferase gene superfamily: expression and chromosome mapping of Hb subunit cDNA. *Nucleic Acids Res.* 16 :8541-8554
- Demple B, Herman T et Chen DS (1991) 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. U S A* 88 :11450-4
- Eickelmann P, Schulz WA, Rohde D, Schmitz-Dräger B et Sies H (1994) Loss of heterozygosity at the NAD(P)H: quinone oxidoreductase locus associated with increased resistance against mitomycin C in a human bladder carcinoma cell line. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 5 :439-45
- Eickelmann P, Ebert T, Warskulat U, Schulz WA et Sies H. (1994) Expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase and glutathione S-transferases alpha and pi in human renal cell carcinoma and in kidney cancer-derived cell lines. *Carcinogenesis* 15 :219-25
- Ekblom A. (1998) Growing evidence that several human cancers may originate *in utero*. *Sem. Canc. Biol.* 8 :237-244
- Elbein SC. (1997) The genetics of human noninsulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *J. Nutr.* 127 :1891S-1896S
- El-Zein RA, Zwischenberger JB, Abdel-Rahman SZ, Sankar AB et Au WW. (1997) Polymorphism of metabolizing genes and lung cancer histology: prevalence of CYP2E1 in adenocarcinoma. *Cancer. Lett.* 112 :71-8
- d'Errico A, Taioli E, Chen X et Vineis P. (1996) Genetic metabolic polymorphisms and the risk of cancer: review of the literature. *Biomarkers* 1 :149-173
- Ewens WJ et Spielman RS (1995) The transmission/disequilibrium test : history, subdivision, and admixture. *Am. J. Hum. Genet.* 57 :455-464

- Eyre-Walker A, Smith NH et Smith JM. (1999) How clonal are human mitochondria ?. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 266 :477-83
- Fenton H. *J. Chem. Soc. (Lond.)* 65:899-910
- Finnilä S, Hassinen IE, Ala-Kokko L et Majamaa K. (2000) Phylogenetic network of the mtDNA haplogroup U in the northern Finland based on sequence analysis of the complete region by conformation-sensitive gel electrophoresis. *Am. J. Hum. Genet.* 66 : 1017-26
- Forman HJ et Boveris A. (1982) Superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria. *Free Radicals in Biology.* Vol. V p.65-90
- Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM et Ames BN. (1996) Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA *Mutat. Res.* 351 :199-203
- Frucht H, Jensen RT, Dexter D, Yang WL et Xiao Y. (1999) Human colon cancer cell proliferation mediated by the M3 muscarinic cholinergic receptor. *Clin Cancer Res* 5:2532-9
- Gaedigk A, Tyndale RF, Jurima-Romet M, Sellers EM, Grant DM, Leeder JS. (1998) NAD(P)H: quinone oxireductase: polymorphisms and allele frequencies in Caucasian, Chinese and Native Indian and Inuit populations. *Pharmacogenetics* 8 : 305-313
- Ganguly A, Rock MJ et Prockop DJ (1993) Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 :10325-9
- Gattermann N, Aul C et Schneider W. (1993) Is acquired idiopathic sideroblastic anemia (AISA) a disorder of mitochondrial DNA? *Leukemia* 7 :2069-76
- Ghadirian P, Lacroix A, Perret C, Robidaoux A, Falardeau M, Maisonneuve P et Boyle P. (1998) Breast cancer risk and nutrient intake among French Canadians in montreal :a case-control study. *The Breast* 7 :108-113
- Giovannucci E et Willett WC. (1994) Dietary factors and risk of colon cancer *Ann. Med.* 26 :446-452
- Giles RE, Blanc H, Cann HW et Wallace DC. (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:6715-9.
- Golding BT et Watson WP. (1999) Possible mechanisms of carcinogenesis after exposure to benzene. *IARC Sci. Publ.* 150 :75-88
- Graff C, Clayton DA et Larsson NG. (1999) Mitochondrial medicine-recent advances. *J. Internal Med.* 246 :11-23

- Green DR et Reed JC. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*. 281:1309-12.
- Guengerich FP, Kim DH et Iwasaki M (1991) Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol.* 4 :168-179
- Hagelberg E, Goldman N, Lio P, Whelan S, Schiefenhover W, Clegg JB et Bowden DK. (1999). Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 266 :485-92
- Hall DB, Holmlin RE et Barton JK. (1996) Oxidative damage through long-range electron transfer. *Nature* 382 :731-735
- Hatfill SJ, La Cock CJ, Laubscher R, Downing TG, Kirby R. (1993) A role for mitochondrial DNA in the pathogenesis of radiation-induced myelodysplasia and secondary leukemia. *Leuk. Res.* 17 :907-13
- Hatfill SJ, Bohm L, Downing TG et Kirby R. (1992) Mitochondrial DNA mutations in the myelodysplastic syndrome *Lancet* 340 :370-370
- Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K et Kawajiri K (1991) Genetic linkage of lung-associated Msp1 polymorphism with amino acid replacement in the haeme-binding region of the human cytochrome P4501A1 gene. *J. Biochem.* 110 :407-411
- Hayes JD et Strange RC (1995) Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free. Radic. Res.* 22:193-207
- Heddi A, Lestienne P, Wallace DC et Stepien G. (1993) Mitochondrial DNA expression in mitochondrial myopathies and coordinated expression of nuclear genes involved in ATP production. *J. Biol. Chem.* 268:12156-63
- Heerdt BG, Chan J, Steward LR et Augenlicht LH. (1994) Polymorphisms, but lack of mutations or instability, in the promoter region of the mitochondrial genome in human colonic tumors. *Cancer Res.* 54 :3912-3915
- Henderson IC. (1993) Risk factors for breast cancer development. *Cancer* 71 :2127-2140
- Henle ES et Linn S. (1997) Formation, prevention and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J.Biol.Chem.* 272 :19095-19098
- Hilbert TP, Boorstein RJ, Kung HC, Bolton PH, Xing D, Cunningham RP et Teebor GW. (1996) Purification of a mammalian homologue of *Escherichia coli* endonuclease III: identification of a bovine pyrimidine

hydrate-thymine glycol DNase/AP lyase by irreversible cross linking to a thymine glycol-containing oligoxynucleotide. *Biochemistry* 35:2505-11

- Howell N, Bindoff LA, McCullough DA, Kubacka I, Poulton J, Mackey D, Taylor L, et al (1991a) Leber hereditary optic neuropathy : identification of the same mitochondrial ND1 mutation in six pedigrees. *Am J Hum Genet* 49 :939-950
- Horton TM, Graham BH, Corral-Debrinski M, Shoffner JM, Kaufman AE, Beal MF et Wallace DC. (1995) Marked increase in mitochondrial DNA deletion levels in the cerebral cortex of Huntington's disease patients. *Neurology* 45:1879-83
- Houlston RS, Collins A, Slack J et Morton NE. (1992) Dominant genes for colorectal cancer are not rare. *Ann. Hum. Genet.* 56 : 99-103
- Hutchin T et Cortopassi G. (1995) A mitochondrial DNA clone is associated with increased risk for Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92:6892-5
- Hu Y, Oscarson M, Johansson I, Yue QY, Dahl ML, Tabone M, Arinco S, Albano E, Ingelman-Sundberg M. (1997) Genetic polymorphism of human CYP2E1: characterization of two variant alleles *Mol. Pharmacol.* 51 :370-6
- Imlay JA et Linn S (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 1240:1302-9
- Infante-Rivard C, Labuda D, Krajcinovic M et Sinnett D. (1999) Risk of childhood leukemia associated with exposure to pesticides and with gene polymorphisms *Epidemiology* 10 :481-7
- Ivanova R, Lepage V, Loste MN, Schächter F, Wijnen E, Busson M, Cayuel JM, Sigaux F et Charron D. (1998) Mitochondrial DNA sequence variation in human leukemic cells. *Int. J. Cancer* 76 :495-498
- Jackson AL et Loeb LA. (1998a) On the origin of multiple mutations in human cancers. *Semin. Cancer. Biol.* 8:421-9
- Jackson AL et Loeb LA. (1998b) The mutation rate and cancer. *Genetics* 148:1483-90
- Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, Smith KJ, Hamilton SR, Vogelstein B et Kinzler KW. (1994) Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res.*56 :5523-5526
- Jensen PK, Norgard JO, Knudsen C, Nielsen V et Bolund L (1990) Effects of extra- and intracellular calcium concentration on DNA replication, lateral growth, and differentiation of human epidermal cells in culture. *Virchows. Arch. B. Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 59:17-25

- Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, Ying DM et Jin F. (1997) Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers *J. Natl. Cancer Inst.* 89 :238-44
- Johns DR, Neufeld MJ (1991) Cytochrome b mutations in Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 181 :1358-1364
- Joseph et Coomber BL (1998) The 1996 Veylien Henderson Award of the Society of Toxicology of Canada. Current concepts: neutrophils and the activation of carcinogens in the breast and other organs. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76 :693-700
- Jun AS, Trounce IA, Brown MD, Shoffner JM et Wallace DC (1996) Use of transmitochondrial cybrids to assign a complex I defect to the mitochondrial DNA-encoded NADH dehydrogenase subunit 6 gene mutation at nucleotide pair 14459 that causes Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. *Mol. Cell. Biol.* 16:771-7
- Jun AS, Brown MD et Wallace DC. (1994) A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91:6206-10
- Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Yoshii A, Shinoda N et Watanabe J (1990) Identification of genetically high-risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P4501A1 gene. *FEBS* 263 :131-133.
- Kearney J, Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Wing A, Kampman E et Willett WC. (1996) Calcium, vitamin D, and dairy foods and the occurrence of colon cancer in men. *Am. J. Epidemiol.* 143 :907-17
- Kivisild T, Bamshad MJ, Kaldma K, Metspalu M, Metspalu E, Reidla M, Laos S, Parik J, Watkins WS, Dixon ME, Papiha SS, Mastana SS, Mir MR, Ferak V et Villems R. (1999) Deep common ancestry of Indian and western-Eurasian mitochondrial DNA lineages. *Curr. Biology* 22 :1331-1334
- Kovacs A, Storkel S, Thoenes W et Kovacs G. (1992) Mitochondrial and chromosomal DNA alterations in human chromophobe renal cell carcinomas *J. Pathol.* 167 :273-277
- Krajinovic M, Sinnett H, Richer Ch, Labuda Damian et Sinnett D. Benzene metabolizing genes are associated with susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. (*soumis*)
- Krajinovic M, Ghadirian P, Gandini S, Lacroix A, Sinnett H, Richer Ch, Labuda Damian et Sinnett D. Genetic susceptibility to breast cancer in French-

Canadians : the role of carcinogen-metabolising enzymes and gene-environment interactions. (soumis).

- Krajinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S and Sinnett D (1999) Susceptibility to childhood Acute Lymphoblastic Leukemia : influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms. *Blood* 93 :1496-1501
- Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M et Paabo S. (1997) Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90 :19-30
- Kristensen P, Andersen A, Irgens LM, Bye AS et Sundheim L. (1996) Cancer in offspring of parents engaged in agricultural activities in Norway: incidence and risk factors in the farm environment. *Int. J. Cancer* 65 :39-50
- Labuda D, Krajinovic M, Richer C, Skoll A, Sinnett H, Yotova V and Sinnett D (1999) Rapid detection of CYP1A1, CYP 2Dd and NAT2 variants by Multiplex-PCR and Allele-Specific Oligonucleotide Assay *Analyt. Biochem.* 275 : 84-92
- Labuda D, Zietkiewicz E, Labuda M (1997). The genetic clock and the age of the founder effect in growing populations : A lesson from French Canadians and Ashkenazim. *Am J Hum Genet* 61 :768-778
- Lakshmipathy U et Campbell C. (1999) Double strand break rejoining by mammalian mitochondrial extracts. *Nucleic Acids Research* 27 :1198-1204
- Lander ES et Schork NJ. (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science* 265 :2037-48
- Larson RA, Wang Y, Banerjee M, Wiemels J, Hartford C, Le Beau MM et Smith MT (1999) Prevalence of the inactivating 609C-->T polymorphism in the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia. *Blood* 94 :803-7
- Liang BC et Hays L. (1996) Mitochondrial DNA copy number changes in human gliomas *Cancer Lett.* 105 :167-173
- Lin P, Wang HJ, Lee H, Lee HS, Wang SL, Hsueh YM, Tsai KJ et Chen CY (1999) NAD(P)H: quinone oxidoreductase polymorphism and lung cancer in Taiwan. *J. Toxicol. Environ. Health.* 58 :187-97
- Lindahl T, Karran P et Wood RD (1997) DNA excision repair pathways. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7 :158-69

- Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jem J, Papadopoulos N, Peltomaki P, de al Chapelle A, Hamilton SR et al., (1995) Mismatch repair genes defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat. Genet.* 9 :48-55
- Loeb LA (1998) Cancer cells exhibit a mutator phenotype. *Adv. Cancer. Res.* 72:25-56
- Lotscher HR, Winterhalter KH, Carafoli E et Richter C. (1980) Hydroperoxide-induced loss of pyridine nucleotides and releas of calcium from rat liver mitochondria. *J. Bio. Chem.* 255 :9325-9330
- Luo Y, Han Z, Chin SM et Linn S. (1994) Three chemically distinct types of oxidants formed by iron-mediated Fenton reactions in the presence of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91 :12438-42
- Macauley V, Richards M, Hickey E, Vega E, Cruciani F, Guida V, Scozzari R, Bonné-Tamir B, Sykes B et Torroni A. (1999) The emerging tree of West Eurasian mtDNAs : a synthesis of control-region sequences and RFLPs. *Am. J. Hum. Genet.* 64 :232-249
- Mackay D, Howell N (1992) A variant of Leber hereditary optic neuropathy characterized by recovery of vision and by unusual mitochondrial etiology. *Am J Hum Genet* 59 :481-485
- Majamaa K, Finnila S, Turkka J et Hassinen IE. (1998) Mitochondrial DNA haplogroupe U as a risk factor for occipital stroke in migraine. *Lancet* 8 :455-466
- Margulis L. (1970) Origin of Eukaryotic Cells. *Yale University Press*, New Haven, CT
- Martin WF et Müller M. (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392 :37-41
- Marres CAM, Van Loon PGM, Oudsoorn P, Van Steeg H, Grivell LA et Slater EC. (1985) Nucleotide sequence analysis of the nuclear gene coding for manganese superoxide dismutase of yeast mitochondria, a gene previously assumed to code for the Rieske iron-sulfur protein. *Eur. J. Biochem.* 147 :153-161
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC et Kroemer G. (1998) Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281:2027-31
- Marzuki, S., Noer, A.S., Letrit, P., Thyagarajan, D., Kapsa, R., Utthanaphol, P. et

- Byrne, E. (1991) Normal variants of human mitochondrial DNA and translation products: the building of a reference data base. *Human Genetics* 88 : 139-145
- Mathonnet G, Sinnett H, Labuda D et Sinnett D (1999). Genotyping of DNA repair variants using a PCR allele-specific oligonucleotide hybridization assay. (soumis)
- Mecocci P, MacGarvey U et Beal MF (1994) Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 36:747-51
- Melov S, Shoffner JM, Kaufman A et Wallace DC. (1995) Marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging human skeletal muscle. *Nucleic. Acids. Res.* 23:4122-6
- Mendelson KG, Contois LR, Tevosian SG, Davis RJ et Paulson KE (1996) Independent regulation of JNK/p38 mitogen-activated protein kinases by metabolic oxidative stress in the liver. *Proc. Natl. Acad.Sci. U S A* 93:12908-13
- Michiels C, Raes M, Toussaint O et Remacle J. (1994) Importance of S-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free. Radic. Biol. Med.* 17:235-48
- Monnat RJ Jr, Maxwell CL et Loeb LA (1985) Nucleotide sequence preservation of human leukemic mitochondrial DNA. *Cancer. Res.* 45 :1809-14
- Morel Y et Barouki R. (1998) Down-regulation of Cytochrome P450 gene promoter by oxidative stress –critical contribution of nuclear factor 1. *J. Biol. Chem.* 273 :26969-26976
- Mowry BJ, Nancarrow DJ et Levinson DF (1997) The molecular genetics of schizophrenia: an update. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* 31 :704-13
- Muller-Hocker J, Schneiderbanger K, Stefani FH et Kadenbach B (1992) Progressive loss of cytochrome c oxidase in the human extraocular muscles in ageing--a cytochemical-immunohistochemical study. *Mutat. Res.* 275:115-24
- Nakajima M, Takeuchi T et Morimoto K. (1996) Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine in human cells under oxygen-free conditions. *Carcinogenesis* 17:787-91
- Neckeleman N, Li K, Wade RP Shuster R et Wallace DC. (1987) cDNA sequence of a human skeletal muscle ADP/ATP translocator : lack of a leader peptide, divergence from a fibroblast translocator cDNA, and coevolution with mitochondrial DNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 :7580-7584

- Olshan AF, Breslow NE, Falletta JM, Grufferman S, Pendergrass T, Robison LL, Waskerwitz M, Woods WG, Vietti TJ et Hammond GD. (1993) Risk factors for Wilms tumor. Report from the National Wilms Tumor Study. *Cancer* 72 :938-44
- O'Neill EM, Rebay I, Tjian R et Rubin GM (1994) The activities of two Ets-related transcription factors required for *Drosophila* eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. *Cell* 78:137-47
- van den Ouweland, J.M., Bruining, G.J., Lindhout, D., Wit, J.M., Veldhuyzen, B.F., et Maassen, J.A. (1992) Mutations in mitochondrial tRNA genes: non-linkage with syndromes of Wolfram and chronic progressive external ophthalmoplegia. *Nucleic Acids Research* 20 : 679-682
- Pemble S, Schroeder K.R., Sepnker S.R., Meyer D.J., Hallier E, Bolt H.M., Ketterer B et Taylor J.B (1994) Human glutathione S-transferase theta (GSTT1) cDNA cloning and the characterisation of a genetic polymorphism. *Biochem. J.* 300 :271-276
- Pericak-Vance MA et Haines JL. (1995) Genetic susceptibility to Alzheimer disease. *Trends. Genet.* 11 :504-8
- Piedrafita FJ, Molander RB, Vansant G, Orlova EA, Pfahl M, Reynolds WF. (1996) An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *J. Biol. Chem.* 271 :14412-14420
- Price HE, Bourne SL, Radbourne PA, Lawton PA, Lamerdin J, Thompson LH et Arrand JE (1997) Rare microsatellite polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, XRCC3 and XRCC5 associated with cancer in patients of varying radiosensitivity. *Somatic Cell Mol. Genet.* 23 :237-247
- Pritchard JK et Rosenberg NA (1999) Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am. J. Hum. Genet.* 65 :220-228
- Quintana-Murci L, Semino O, Bandelt HJ, Passarino G, McElreavey K et Santachiara-Benerecetti AS (1999) Genetic evidence of an early exit of *Homo sapiens sapiens* from Africa through eastern Africa. *Nature Genet* 23 :437-441
- Rebeck T, Rosvold EA, Duggan DJ, Zhang J et Buetow KH. (1994) Genetics of CYP1A1: Coamplification of specific alleles by polymerase chain reaction and association with breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 3 :511-530
- Reynier P, Penisson-Besnier I, Moreau C, Savagner F, Vielle B, Emile J, Dubas F

- et Malthiery Y. (1999) mtDNA haplogroupe J : a contributing factor of optic neuritis *Eur. J. Hum. Genet.* 7 :404-406
- Reynolds WF, Chang E, Douer D, Ball ED et Kanda V. (1997) An allelic association implicates myeloperoxidase in the etiology of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 90:2730-7
- Richards B, Skoletsy J, Shuber AP, Balfour R, Stern RC, Dorkin HL, Parad RB, Witt D et Klinger KW. (1993) Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Hum. Mol. Genet.* 2 :159-63
- Richards MB, Macaulay VA, Bandelt H-J et Sykes BC (1998) Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe *Ann. Hum. Genet.* 62 :241-260
- Richter C, Park JW et Ames BN. (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear-DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 :6465-6467
- Rothman N, Smith MT, Hayes RB, Traver RD, Hoener B, Campleman S, Li GL, Dosemeci M, Linet M, Zhang L, Xi L, Wacholder S, Lu W, Meyer KB, Titenko-Holland N, Stewart JT, Yin S et Ross D (1997) Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1 609C-->T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone. *Cancer. Res.* 57 :2839-42
- Ross D. (1996) Metabolic basis of benzene toxicity. *Eur. J. Haematol.* Suppl 60 : 111-118
- Sancar A. (1995) DNA repair in humans. *Annu. Rev. Biochem.* 29 :69-105
- Savre-Train I, Piatyszek MA et Shay JW. (1992) Transcription of deleted mitochondrial DNA in human colon adenocarcinoma cells. *Hum. Mol. Genet.* 1 : 203-204
- Sharp MG, Adams SM, Walker RA, Brammar WJ et Varley JM. (1992) Differential expression of mitochondrial gene cytochrome oxidase II in benign and malignant breast tissue 168 :163-168
- Schwartzbaum JA, George SL, Pratt CB et Davis B (1991) An exploratory study of environmental and medical factors potentially related to childhood cancer. *Med. Pediatr. Oncol.* 19 :115-21
- Seidergard J, Vorachek W.R., Pero R.W. et Pearson W.R. (1988) Hereditary differences in the expression of human glutathione transferase activity on trans-stillbene oxide are due to a gene deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 :7293-7297.
- Shay JW et Werbin H. (1987) Genetic mechanisms in tumor initiation and

progression. Are mitochondrial-DNA mutations involved in the carcinogenic process ?. *Mutation Res.* 186 :149-160

- Shen HM, Ong CN, Lee BL et Shi CY. (1996) Aflatoxin B1-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat hepatic DNA. *Carcinogenesis* 16:419-22
- Shen HM et Ong CN. (1995) Mutations of the p53 tumor suppressor gene and ras oncogenes in aflatoxin hepatocarcinogenesis. *Mutat. Res.* 366 :23-44
- Shields PG, Ambrose C, Graham S, Bowman ED, Harrington AM, Gillenwater KA, Marshall JR, Vena JE, Laughlin R et Nemoto T, Freudenheim JL. (1996) A cytochrome P4502E1 genetic polymorphism and tobacco smoking in breast cancer. *Mol. Carcinog.* 17:144-50
- Shoffner JM, Brown MD, Stugard C, Jun AS, Pollock S, Haas RH, Kaufman A, Koontz D, Kim Y, Graham JR, et al (1995) Leber's hereditary optic neuropathy plus dystonia is caused by a mitochondrial DNA point mutation. *Ann. Neurol.* 38:163-9
- Shoffner JM et Wallace DC. (1994) Oxidative phosphorylation diseases and mitochondrial DNA mutations :diagnosis and treatment. *Annu. Rev. Nutr.* 14 :535-568
- Siegel D, Bolton EM, Burr JA, Liebler DC et Ross D. (1997) The reduction of alpha-tocopherolquinone by human NAD(P)H: quinone oxidoreductase: the role of alpha-tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. *Mol. Pharmacol.* 52 :300-5
- Sinnett D, Lavergne L, Melançon SB, Dallaire L, Potier M et Labuda D. (1988) Lesch-Nyhan syndrome; molecular investigation of three French Canadian families using HPRT cDNA probe. *Hum. Genetics* 81 :4-12.
- Slatkin M. (1991) Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genet. Res.* 58 :167-175
- Smith KJ, Levy DB, Maupin P, Pollard TD, Vogelstein B et Kinzler KW. (1994). Wild-type but not mutant APC associates with microtubule cytoskeleton *Cancer Res.* 54 :3672-3675
- Smith MT. (1996) The mechanism of benzene-induced leukemia: a hypothesis and speculations on the causes of leukemia. *Environ. Health. Perspect.* 104 Suppl. 6:1219-25
- Smith MT, Chen T et Simon R. (1997) Age-incidence of acute lymphoblastic leukemia in US children : In utero initiation model. *J. Natl. Cancer Inst.* 89 :1542-1544

- Soong NW, Hinton DR, Cortopassi G et Arnheim N. (1992) Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain. *Nat. Genet.* 2 :318-323
- « Statistiques canadiennes sur le cancer en 1999 » Statistiques Canada
- Stoneking M, Hedgecock D, Higuchi RG, Vigilant L et Erlich HA. (1991) Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes *Am. J. Hum. Genet.* 48 :370-82
- Sun Y et Oberley LW. (1996) Redox regulation of transcriptional activators. *Free. Radic. Biol. Med.* 21:335-48
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM et Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-6
- Susin SS.(1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-6.
- Tagoloff JR et Boveris A. (1986). Genetics of mitochondrial biogenesis. *Ann. Rev. Biochem.* 55 :249-285
- Tallini G, Ladanyi M, Rosai J et Jhanwar SC. (1994) Analysis of nuclear and mitochondrial DNA alterations in thyroid and renal oncocyctic tumors *Cytogenet. Cell Genet.* 66 :253-259
- Tanaka A, Kiyosawa M, Mashima Y et Tokoro T. (1998) A family with Leber's hereditary optic neuropathy with mitochondrial DNA heteroplasmy related to disease expression. *J. Neuroophthalmol* 18 :81-3
- Thomas AW, Morgan R, Sweeney M, Rees A et Alcolado J. (1994) The detection of mitochondrial DNA mutations using single stranded conformation polymorphism (SSCP) analysis and heteroduplex analysis. *Hum. Genet.* 94 :621-3
- Thyagarajan B, Padua RA et Cambell C. (1995) Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. *J. Biol. Chem* 44 :27536-27543
- Tienari PJ. (1994) Multiple sclerosis: multiple etiologies, multiple genes? *Ann. Med.* 26 :259-69
- Tirkkonen M, Johansson O, Agnarsson BA, Olsson H, Ingvarsson S, Karhu R, Tanner M, Isola J, Barkardottir RB, Borg A et Kallioniemi OP. (1997) Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression ni

- carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations. *Cancer Res.* 57 :1222-1227
- Torrioni A, Bandelt HJ, D'Urbano L, Lahermo P, Moral P, Sellitto D, Rengo C, Forster P, Savontaus ML, Bonne-Tamir B et Scozzari R (1998) mtDNA analysis reveals a major late Paleolithic population expansion from southwestern to northeastern Europe.. *Am J Hum Genet* 62:1137-52
- Torrioni A, Petrozzi M, D'Urbano L, Sellitto D, Zeviani M, Carrara F, Carducci C, Leuzzi V, Carelli V, Barboni P, De Negri A and Scozzari R (1997) Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am J Hum Genet* 60 :1107-1121
- Torrioni A, Carelli V, Petrozzi M, Terracina M, Barboni P, Malpassi P, Wallace DC, et al (1996a) Detection of the mtDNA 14484 mutation on an African-specific haplotype : implications about its role in causing Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet* 59 :248-252
- Torrioni A, Lott MT, Cabell MF, Chen YS, Lavergne L et Wallace DC (1994). mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am. J. Hum. Genet.* 55:760-76
- Torrioni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, Larsen M, Smith DG, et al (1993a) Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am. J. Hum. Genet.* 53 :563-590
- Torrioni A, Schurr TG, Yang C-C, Szthmary EJ, Williams RC, Schanfield MS, Troup GA et Wallace D.C. (1992) Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Na-Dene populations were founded by two independent migrations. *Genetics* 130 :287-296
- Traver RD, Siegel D, Beall HD et al. (1997) Characterization of a polymorphism in NAD(P)H : quinone oxidoreductase (DT-diaphorase). *Br. J. Cancer* 75 : 69-75
- Treem WR et Sokol RJ. (1998) Disorders of the mitochondria. *Seminars in liver disease* 18 : 237-253
- Trounce I, Byrne E et Marzuki S (1989) Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. *Lancet* 1:637-9
- Trumpower BL et Simmons Z (1979) Diminished inhibition of mitochondrial electron transfer from succinate to cytochrome c by thenoyltrifluoroacetone induced by antimycin. *J. Biol. Chem.* 254 :4608-4616
- Trush MA, Seed JL et Kensler TW. (1991) Oxidant-dependent metabolic

activation of polycyclic aromatic hydrocarbons by phorbol ester-stimulated human polymorphonuclear leukocytes: possible link between inflammation and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 82 :5194-8

- Turrens JF et Boveris A. (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J* 191 :421-427
- Vatsis K.P., Weber W.W., Bell D.A., Dupret J.M., Evans D.A.P., Grant D.M., Hein D.W., Lin H.J., Meyer U.A., Relling M.V., Sim E., Suzuki T et Yamazoe Y. (1995) Nomenclature for N-acetyl-transferases. *Pharmacogenetics* 5 :1-17
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AMS, Elsas LJ, et al (1988) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242 :1427-1430.
- Wallace DC (1995) Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease and aging. *Am J Hum Genet* 57 :201-223
- Wallace DC, Lott MT, Brown MD, Huoponen K, Torroni A 1995. Report of the committee on human mitochondrial DNA. In Cuticchia AJ (ed) *Human genemapping 1995: a compendium*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp 910-954 (also available on the World Wide Web at <http://www.gen.emory.edu/mitomap.html>)
- Wallace DC, Zheng XX, Lott MT, Shoffner JM, Hodge JA, Kelley RI, Epstein CM et Hopkins LC. (1988). Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* 55:601-10
- Wallace DC, Ye J, Neckelmann SN et Singh G. (1987) Sequence analysis of the cDNAs for the human and bovine ATP synthetase B subunit: mitochondrial genes sustain seventeen times more mutations. *Curr. Genet.* 12 :81-90
- Watson E, Forster P, Richards M et Bandelt HJ. (1997) Mitochondrial footprints of human expansions in Africa. *Am. J. Hum. Genet.* 61:691-704
- Wood R. (1996). DNA repair in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 65 :136-160
- Woodall AA et Ames BN. (1997) in *Preventive Nutrition :The Comprehensive Guide for Health Professionals* (Bendich A et Deckelbaum RJ eds.) pp.373-385, Humana Press Inc., Totowa, NJ
- Yamamoto H, Tanaka M, Katayama M, Obayashi T, Nimura Y et Ozawa T. (1992) Significant existence of deleted mitochondrial DNA in cirrhotic liver surrounding hepatic tumor *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 182 :913-920
- Zdzienicka MZ. (1995) Mammalian mutants defective in the response to ionizing radiation-induced DNA damage. *Mutat. Res.* 336 :203-13

Annexe

Distribution des haplogroupes dans la population contrôlée.

pos.	15928	14766	14470	13708	13368	12308	10398	10034	9055	8251	7028	4917	4216
A.	H	1									1		
	15	1									1		
	16	1									1		
	18	1									1		
	21	1									1		
	24	1									1		
	34	1									1		
	54	1									1		
	56	1									1		
	66	1									1		
	76	1									1		
	87	1									1		
	88	1									1		
	91	1									1		
	109	1									1		
	110	1									1		
	121	1									1		
	160	1									1		
	168	1									1		
	196	1									1		
	129	1									1		
	189	1									1		
	145	1									1		
	73b	1									1		
	135	1									1		
	189	1									1		
	176	1									1		
	142	1									1		
	133	1									1		
	202	1									1		
H.D.	162	1									1		
	240	1									1		
	265	1									1		
	266	1									1		
	274	1									1		
	328	1									1		
	340	1									1		
	363	1									1		
	365	1									1		
	590	1									1		
	602	1									1		
	163	1									1		
	164	1									1		
	178	1									1		
	212	1									1		
	408	1									1		
	204	1									1		
	213	1									1		
	239	1									1		
	253	1									1		
	453	1									1		
	461	1									1		
	462	1									1		
	469	1									1		
	536	1									1		
	600	1									1		
	478	1									1		
	490	1									1		
	229	1									1		
	378	1									1		
	704	1									1		
	719	1									1		
	724	1									1		
	729	1									1		
	598	1									1		
	544	1									1		
	635	1									1		
	409	1									1		
	506	1									1		
	329	1									1		
	722	1									1		

	89			1			1						1	
	98			1			1						1	
	141			1			1						1	
	147			1			1						1	
H.D.	276			1			1						1	
	290			1			1						1	
	444			1			1						1	
	640			1			1						1	
	354			1			1						1	
C.P.	76			1			1						1	
	132			1			1						1	
	77			1			1						1	
	pos.	15928	14766	14470	13708	13368	12308	10398	10034	9055	8251	7028	4917	4216
	T	1				1							1	1
A.	41	1				1							1	1
	68	1				1							1	1
	72	1				1							1	1
	100	1				1							1	1
	131	1				1							1	1
	112	1				1							1	1
H.D.	584					1							1	1
	599					1							1	1
	203					1							1	1
	384					1							1	1
	499					1							1	1
C.P.	50					1							1	1
	65					1							1	1
	93					1							1	1
	121					1							1	1
	144					1							1	1
	26					1							1	1
	34					1							1	1
	47					1							1	1
	106					1							1	1
	pos.	15928	14766	14470	13708	13368	12308	10398	10034	9055	8251	7028	4917	4216
	K						1	1		1				
A.	35						1	1		1				
	60						1	1		1				
	74b						1	1		1				
H.D.	217						1	1		1				
	373						1	1		1				
	278						1	1		1				
	466						1	1		1				
	582						1	1		1				
	585						1	1		1				
	264						1	1		1				
	364						1	1		1				
	401						1	1		1				
C.P.	88						1	1		1				
	pos	15928	14766	14470	13708	13368	12308	10398	10034	9055	8251	7028	4917	4216
	U						1							
A.	17						1							
	62						1							
	83						1							
	90						1							
	96						1							
	124						1							
	146						1							
	179						1							
	265						1							
	195						1							
	172						1							
H.D.	377						1							
	467						1							
	372						1							
	507						1							
	723						1							
	728						1							

Distribution des haplogroupes chez patients atteints de la LLA.

pos.	15928	14766	14470	13708	13368	12308	10398	10034	9055	8251	7028	4917	4216
H		1									1		
122		1									1		
127		1									1		
132		1									1		
133		1									1		
142		1									1		
146		1									1		
235		1									1		
159		1									1		
113		1									1		
188		1									1		
163		1									1		
170		1									1		
172		1									1		
175		1									1		
182		1									1		
198		1									1		
202		1									1		
216		1									1		
TH46		1									1		
TH97		1									1		
TH99		1									1		
TH26		1									1		
37		1									1		
84		1									1		
6		1									1		
12		1									1		
13		1									1		
34		1									1		
48		1									1		
14		1									1		
16		1									1		
18		1									1		
19		1									1		
20		1									1		
28		1									1		
29		1									1		
36		1									1		
40		1									1		
43		1									1		
49		1									1		
53		1									1		
62		1									1		
68		1									1		
73		1									1		
199		1									1		
193		1									1		
207		1									1		
208		1									1		
231		1									1		
242		1									1		
pos.	15928	14766	14470	13708	13368	12308	10398	10034	9055	8251	7028	4917	4216
H		1									1		
7		1									1		
11		1									1		
88		1									1		
84a		1									1		
67		1									1		
95		1									1		
63		1									1		
99		1									1		
103		1									1		
110		1									1		
145		1									1		
120		1									1		
61		1									1		

Distribution des haplogroupes chez les femmes atteintes du cancer du sein.

pos.	15928	14766	14470	13708	13368	12308	10398	10034	9055	8251	7028	4917	4216
201		1									1		
211		1									1		
224		1									1		
228		1									1		
235		1									1		
236		1									1		
237		1									1		
242		1									1		
243		1									1		
249		1									1		
279		1									1		
280		1									1		
282		1									1		
283		1									1		
284		1									1		
288		1									1		
295		1									1		
303		1									1		
255		1									1		
304		1									1		
254		1									1		
324		1									1		
327		1									1		
341		1									1		
348		1									1		
368		1									1		
379		1									1		
386		1									1		
389		1									1		
258		1									1		
376		1									1		
208		1									1		
244		1									1		
394		1									1		
226		1									1		
230		1									1		
292		1									1		
293		1									1		
267		1									1		
pos.	15928	14766	14470	13708	13368	12308	10398	10034	9055	8251	7028	4917	4216
223		1											
269		1											
294		1											
410		1											
349		1											
350		1											
362		1											
331		1											
358		1											
411		1											
353		1											
pos.	15928	14766	14470	13708	13368	12308	10398	10034	9055	8251	7028	4917	4216
313				1			1						1
315				1			1						1
403				1			1						1
241				1			1						1
319				1			1						1
388				1			1						1
393				1			1						1

Distribution des haplogroupes chez patients atteints du cancer du colon.

pos.	15928	14766	14470	13708	13368	12308	10398	10034	9055	8251	7028	4917	4216
H		1									1		
297		1									1		
305		1									1		
306		1									1		
326		1									1		
336		1									1		
398		1									1		
605		1									1		
417		1									1		
422		1									1		
436		1									1		
456		1									1		
708		1									1		
662		1									1		
357		1									1		
437		1									1		
V		1											
356		1											
552		1											
616		1											
617		1											
711		1											
471		1											
594		1											
J				1			1						1
207				1			1						1
457				1			1						1
449				1			1						1
344				1			1						1
697				1			1						1
I	1				1							1	1
314	1				1							1	1
583	1				1							1	1
402	1				1							1	1
K						1	1		1				
366						1	1		1				
613						1	1		1				
369						1	1		1				
407						1	1		1				
U						1							
412						1							
618						1							
423						1							
426						1							
622						1							
205						1							
I							1	1		1			
296							1	1		1			
W										1			
588										1			
692										1			

pos.	15928	14766	14470	13708	13368	12308	10398	10034	9055	8251	7028	4917	4216
X			1										
pos.	10398	663	5176	13262	9bp-del								
A		1											
413		1											
pos.	15928	14766	14470	13708	13368	12308	10398	10034	9055	8251	7028	4917	4216
N.C.													
641													
678													
573													

N.B.

- a) C.P. = échnatillons prélevés au Centre de Prélèvements de l'Hôpital Ste.-Justine
b) H.D. = échantillons prélevés à l'Hôtel-Dieu
c) A. = échantillons prélevés au Centre de Natalité de l'Hôpital Ste.-Justine.
d) Le symbole "1" représente l'hybridation avec une sonde identique avec la séquence définissant un haplogroupe.
e) L'espace vide indique l'hybridation avec une sonde identique à la séquence consensus.
f) N.C. - non classés