

1

Mécanismes fondamentaux

Au cours de ces dernières décennies, de nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension des origines et des mécanismes de développement des cancers. Il est admis à présent que les cancers peuvent avoir une origine génétique et une origine environnementale. La contribution de l'environnement dans l'apparition des cancers a été suspectée depuis longtemps. Dès le 18^e siècle, la fréquence des cancers du scrotum chez les ramoneurs a été associée à leur environnement professionnel (Pott, 1775 repris dans *Natl Cancer Ins Monograph*, 1963). Au cours des dernières décennies, de nombreux exemples de la part de l'environnement dans l'apparition de cancers spécifiques ont été établis : amiante et mésothéliome (Britton, 2002), rayonnement UV et mélanome (Tucker et Goldstein, 2003), trichloréthylène et cancer du rein (Bruning et Bolt, 2000).

La part relative de l'environnement et des facteurs génétiques dans l'apparition des cancers n'est pas simple à déterminer. Des travaux effectués sur des milliers de jumeaux scandinaves ont permis de faire la part de l'environnement et de l'hérédité dans l'apparition de différents types de cancers (Lichtenstein et coll., 2000). Ces observations ont été confirmées dans une étude portant sur des millions d'individus en Suède évaluant le caractère familial de nombreux cancers (Czene et coll., 2002). D'autres travaux effectués sur des conjoints ont aussi amélioré notre connaissance des origines des cancers et notamment la part importante du mode de vie (Heminski et coll., 2001). Une séparation trop tranchée entre mécanismes génétiques et environnementaux semble cependant particulièrement réductrice de nos jours puisque les polymorphismes génétiques pourraient expliquer partiellement la susceptibilité individuelle aux effets toxiques de certains polluants.

Enfin, différentes composantes de l'environnement peuvent interagir entre elles : ainsi dans certains pays, l'apparition de cancers hépatiques est potentialisée par l'infection par le virus de l'hépatite B, la contamination par l'aflatoxine et le profil génétique déterminant le métabolisme de ce composé.

Ainsi, les origines des cancers doivent être examinées selon leur type et leur localisation en tenant compte de l'interaction entre facteurs génétiques et

environnementaux, et pour ces derniers entre les différentes composantes de l'environnement.

L'exposition aux facteurs environnementaux peut se faire par ingestion, inhalation ou par voie transdermique. En ce qui concerne les contaminants chimiques, une bonne connaissance de leur distribution dans l'environnement, des voies de contamination et des propriétés cinétiques et dynamiques dans l'organisme est nécessaire pour définir leur toxicité réelle.

Classification des polluants

On peut classer les polluants physico-chimiques principaux selon leur structure ou selon leur mode d'action probable. Les deux classifications présentent un intérêt.

Dans le classement par nature physique ou structure chimique, on distingue les polluants suivants :

- hydrocarbures aromatiques polycycliques (benzo(a)pyrène) ;
- organochlorés et organobromés (pesticides, dioxines, PCB, polybromés) ;
- solvants ;
- amines aromatiques ;
- organophosphorés (sarin, chlorpyrifos) ;
- nitrosamines ;
- fibres (amiante) ;
- métaux lourds ;
- autres (toxines comme l'aflatoxine) ;
- mélanges : tabac, particules fines, goudrons ;
- rayonnements ionisants ;
- rayonnements non ionisants.

Dans le classement par mode d'action principal, on distingue traditionnellement les agents génotoxiques des composés non génotoxiques. Cette distinction est inspirée des premiers modèles de cancérogenèse comprenant des agents initiateurs (génotoxiques) et des agents promoteurs (non génotoxiques).

Les génotoxiques (directs ou après métabolisme) sont : les agents physiques, le benzo(a)pyrène, l'aflatoxine, les fibres d'amiante.

Les non génotoxiques sont les suivants :

- polluants agissant par une signalisation cellulaire propre : dioxines (récepteur AhR *aryl hydrocarbon receptor*) ;
- polluants de type pesticides (récepteur PXR *pregnane X receptor*) ;
- polluants de type perturbateurs endocriniens : activation ou inhibition de signalisation ;

- polluants de type perturbateurs cellulaires : œstrogéno-mimétiques, pesticides organochlorés ;
- polluants de type perturbateurs enzymatiques : organophosphorés ;
- polluants provoquant un stress cellulaires : stress oxydant (amiante, métaux, dioxines...) ; inflammation (dépôt particules, fibres).

Des travaux récents relativisent la séparation entre génotoxiques et non génotoxiques. De nombreux composés qui ne sont pas génotoxiques, provoquent un stress oxydant pouvant altérer l'ADN et provoquer par ce biais une génotoxicité indirecte (dioxine). D'autres composés exercent eux-mêmes une action non génotoxique, mais leurs métabolites sont capables de former des adduits à l'ADN (benzo(a)pyrène). Le protocole classique de cancérogénèse chimique chez le rongeur (initiateur *versus* promoteur) peut paraître schématique dans ces conditions. De plus, l'étude des altérations géniques dans les tumeurs humaines montre une succession d'altérations conduisant à l'apparition de cancers. Enfin, outre leurs effets sur l'initiation et la promotion tumorale, les polluants pourraient induire la progression tumorale et éventuellement favoriser la dissémination cancéreuse et les métastases. Ce dernier aspect est malheureusement peu étudié en raison de l'absence de modèles expérimentaux pertinents.

Les modèles d'étude de la toxicité des polluants sont nombreux. Nous disposons de nombreux tests *in vitro*, *ex vivo* et chez l'animal. Ces tests sont bien caractérisés pour les composés génotoxiques même si la valeur des tests est parfois controversée. Pour les composés non génotoxiques, l'étude de leurs mécanismes d'action est moins bien structurée et dépend des expertises de chaque laboratoire, de la disponibilité et la pertinence des modèles animaux et des modèles cellulaires. Certains modèles animaux peuvent difficilement être transposés à l'homme pour des raisons très diverses : il s'agit parfois de la spécificité d'espèce de la cible toxique, de différences d'affinité entre un récepteur animal et le récepteur humain pour un composé donné, de différences de métabolisme et de toxicocinétique... Une bonne connaissance du mécanisme d'action permet de mieux juger de la pertinence du modèle utilisé.

Il faut souligner que les mécanismes d'action des composés purement génotoxiques ou non génotoxiques sont distincts et il est hasardeux de transposer ce qui est connu pour une catégorie à l'autre. Ceci est particulièrement important en ce qui concerne les modèles mathématiques de prédiction de toxicité à faible dose. Ces modèles sont souvent fondés sur la linéarité de la toxicité en fonction de la dose pour les composés génotoxiques, mais ceci est très discuté pour les autres composés.

Pour mieux comprendre le mécanisme d'action de certains xénobiotiques, il est nécessaire de tenir compte des voies de métabolisme et de détoxification qui, paradoxalement, peuvent conduire à l'apparition de métabolites intermédiaires particulièrement toxiques.

Métabolisme des xénobiotiques : équilibre entre toxicité et détoxification

Les organismes peuvent être fréquemment exposés à une grande diversité de molécules chimiques (contaminants de l'environnement et de l'alimentation, médicaments...). Ces molécules de petite taille sont le plus souvent trop hydrophobes et de ce fait doivent d'abord être métabolisées avant d'être éliminées par les voies biliaire et urinaire. Pour augmenter l'hydrophilie des molécules exogènes, les organismes ont développé des systèmes de détoxification diversifiés et performants. Trois phases sont habituellement nécessaires.

La phase I est constituée d'enzymes qui créent un groupement fonctionnel (-OH, -COOH, -NH₂, -SH) sur le xénobiotique. Le principal système enzymatique est représenté par les cytochromes P450 (CYP) mais d'autres enzymes peuvent également intervenir, notamment les flavines mono-oxygénases, les alcool déshydrogénases, les estérases, les monoamine oxydases...). Les CYP forment une superfamille d'hémoprotéines divisées en familles, sous-familles et isoformes qui assurent la prise en charge de nombreuses molécules exogènes et endogènes. La nomenclature repose sur les homologies de la séquence en acides aminés. Chez l'homme, 18 familles (1, 2, 3...), 32 sous-familles (A, B, C, D...) et 50 gènes fonctionnels (1, 2...) ont été identifiés¹. Cependant, seules les trois premières familles sont impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques. Si la distribution tissulaire des CYP est relativement ubiquiste, les quantités sont très variables. Le foie exprime les taux les plus élevés et possède la plus grande diversité. Des cellules d'autres tissus cibles (intestin, poumon, rein) expriment également des quantités abondantes de certains CYPs. Cependant, quel que soit le tissu et en premier lieu le foie, les quantités des CYPs, et en particulier les CYPs 1A2 et 2B6 peuvent grandement varier d'un individu à l'autre. Elles sont modulées par des facteurs génétiques, physiopathologiques et environnementaux. Certains CYPs sont absents chez une fraction des individus (CYP 2D6, 3A5). Cette absence est d'origine génétique. Les activités dépendantes des CYPs peuvent également être modulées en fonction de différents facteurs (âge, sexe, jeûne...). Une forte inhibition de nombreux CYPs peut être observée au cours d'une inflammation ou d'une infection. Elle est due à une production accrue de cytokines pro-inflammatoires.

La plupart des isoformes peuvent être inhibées ou induites par des composés chimiques. Il existe de nombreux xénobiotiques inhibiteurs ou inducteurs de CYPs. Parmi les inhibiteurs, on trouve la β -naphthoflavone et le dithiocarbamate et parmi les inducteurs l'alcool, les dioxines et le benzo(a)pyrène

composant de la fumée de tabac. Même peu ou pas exprimés les CYPs 1A1 et 1B1 sont inductibles dans le foie. Des isoformes de la famille 4 sont également inductibles par des molécules exogènes (fibrates, phtalates). On estime que 6-8 CYPs sont impliqués dans le métabolisme de la plupart des cancérigènes (CYP 1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2E1, 3A4).

Les CYPs des cellules eucaryotes sont principalement localisés dans la membrane du réticulum endoplasmique mais il en existe également dans la membrane interne des mitochondries. Un CYP peut métaboliser de nombreux substrats et un substrat peut être métabolisé par plusieurs CYPs.

Le niveau d'expression des CYPs est dépendant de cascades de régulation qui font généralement intervenir des récepteurs nucléaires également appelés « *xenosensors* », notamment l'*aryl hydrocarbon receptor* (AhR), le *pregnane X receptor* (PXR) et le *constitutive androstane receptor* (CAR) qui sont activés par de nombreux contaminants de l'environnement reconnus comme cancérigènes ou potentiellement cancérigènes chez l'homme. Alors que AhR est impliqué dans la régulation des CYP de la famille 1, PXR et CAR le sont dans celle des familles 2 et 3. Des récepteurs de molécules endogènes peuvent également être impliqués. Ainsi l'activation du récepteur aux glucocorticoïdes augmente l'expression des récepteurs CAR et PXR et toute altération de son activité se traduit par une baisse de l'expression de ces deux récepteurs (Coumoul et coll., 2002 ; Duret et coll., 2006). Le récepteur à l'œstradiol (ER α) est également important car les pesticides organochlorés inhibent le CYP1A1 via ce récepteur (Coumoul et coll., 2001).

La phase II est caractérisée par la conjugaison d'un ligand endogène sur le composé chimique, généralement après la phase I. Elle regroupe 7 systèmes enzymatiques : les UDP-glucuronosyl-transférases, les sulfotransférases, les glutathion transférases, les N-acétyl-transférases, les méthyl transférases, les acyl CoA transférases qui catalysent le transfert respectivement de l'acide glucuronique, de SO $_3^-$, du glutathion, d'un acétyl, d'un méthyl et d'un acide aminé. Quant aux époxydes hydrolases, elles transforment les époxydes en métabolites stables par transfert d'une molécule d'eau. Les UDP-glucuronosyl-transférases et les glutathion transférases sont impliquées dans la conjugaison de nombreux intermédiaires toxiques résultant de l'activation, ou plus précisément l'addition d'une fonction réactive, de polluants environnementaux par les CYPs (King et coll., 2000 ; Hayes et coll., 2005).

La phase III correspond à l'étape d'excrétion des xénobiotiques ou de leurs métabolites. Elles est assurée par des protéines de transport ATP-dépendantes, en particulier la P-glycoprotéine (ABCB1) codée par le *multi drug resistance 1* (MDR1) gène, les *multi drug resistance protein 2* et 3 (MRP2/BCC2 et MRP3/ABCC3) et la *breast cancer resistance protein* (BCRP/ABCG2). Comme les cytochromes P450, la plupart des enzymes de phase II et les transporteurs membranaires peuvent être régulés par les récepteurs nucléaires AhR, PXR et/ou CAR (Klaassen et Slitt, 2005).

Le métabolisme des xénobiotiques peut conduire à la formation de métabolites électrophiles (benzo(a)pyrène, chlorure de vinyle...) ou de radicaux libres (CCl_4 ,...) qui peuvent se fixer sur des protéines, des lipides et des acides nucléiques et ainsi les modifier, ce qui peut avoir pour conséquence l'apparition de lésions cellulaires ou génétiques. Leur métabolisme peut aussi entraîner la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). En effet, la réduction de l'O_2 en eau par les CYPs lors de la réaction d'oxygénation de leur substrat peut être incomplète et provoquer la formation d'anions peroxydes, de peroxydes d'hydrogène et de radicaux hydroxyles. Ces réactions abortives sont fréquentes avec les CYP 1A1 et 2E1 qui sont responsables de l'activation de nombreux cancérigènes. L'excès d'ERO entraîne également des altérations de protéines, lipides et d'acides nucléiques avec pour conséquence la survenue de lésions cellulaires ou génétiques. Il existe en outre des possibilités de formation de métabolites réactifs à partir de conjugués de quelques composés (N-hydroxy-2-naphtylamine à partir du glucuronide du 2-aminonaphtalène...) et d'autres enzymes de phase I (formation d'acroléine à partir d'alcool allylique par l'alcool déshydrogénase).

Tous les cancérigènes ne nécessitent cependant pas une métabolisation préalable. Certains sont directement génotoxiques (agents alkylants), d'autres exercent leurs effets par des mécanismes épigénétiques (dioxines, phtalates).

Les lésions de l'ADN induites par des génotoxiques incluent des modifications covalentes de la double hélice et des structures anormales non covalentes. Les premières comprennent les alkylations, les adduits interbrins (*interstrand cross link*, ICL) et les cassures simple et double brin (*single strand break*, SSB et *double strand break*, DSB) tandis que les secondes regroupent les fourches de réplication arrêtées et les mésappariements (Hoeijmakers, 2001).

Les contaminants de l'environnement peuvent former différents types de lésions sur les bases de l'ADN directement ou après biotransformation. Celles-ci sont principalement des adduits résultant d'une réaction avec des sites nucléophiles, en particulier ceux présents en N7 de l'adénine et O6 de la guanine. Les époxydes des hydrocarbures aromatiques polycycliques forment des adduits volumineux. Les produits chimiques peuvent également produire d'autres lésions telles que les SSB et les DSB et les sites abasiques. Certains génotoxiques induisent des lésions types, mais ils peuvent également former d'autres lésions et celles-ci peuvent se transformer ; par exemple une dépurination (sites abasiques) peut s'oxyder spontanément et résulter en une cassure simple brin.

Les produits chimiques peuvent induire des lésions génotoxiques par l'intermédiaire du stress oxydant qu'ils génèrent. Certaines espèces réactives de l'oxygène formées sont particulièrement réactives ; c'est le cas du radical hydroxyle $^{\circ}\text{OH}$ qui est responsable de la plupart des lésions génotoxiques produites par un stress oxydant. Il peut causer plus de cent types de lésions : des oxydations de bases et de sucres, des fixations de protéines sur l'ADN (*cross links*) ainsi que des SSB et des DSB (Cadet et coll., 1997).

Les ERO peuvent également être produits par les radiations UV et les radiations ionisantes, les voies de signalisation, le métabolisme respiratoire de la mitochondrie ou encore l'inflammation. Les ERO seraient responsables d'environ 2×10^4 lésions par cellule et par jour chez l'homme (Ames et Shigenaga, 1992).

Des espèces réactives de l'azote sont également responsables de liaisons génotoxiques. L'acide nitrique $^{\circ}\text{NO}$, produit notamment lors de l'inflammation, forme par sa liaison avec $\text{O}_2^{\cdot-}$ le radical peroxy-nitrite $\text{ONOO}^{\cdot-}$ qui est presque aussi toxique que le radical $^{\circ}\text{OH}$. Il pourrait réagir avec des produits chimiques et les rendre plus réactifs (Yoshie et Ohshima, 1997).

Les radiations UV peuvent réagir directement avec l'ADN et former des produits spécifiques qui sont des dimères de cyclobutane pyrimidine et les 6-4 pyrimidone photoproduits. Les radiations ionisantes peuvent également directement interagir avec l'ADN et provoquer la formation de sites abasiques, des SSB et des DSB.

Les différences individuelles dans les capacités de biotransformation d'une part et dans les capacités de protection ou de défenses d'autre part expliquent les différences de susceptibilité des individus aux agressions d'origine chimique ou physique.

Réparation de l'ADN

L'intégrité du matériel génétique présent dans toute cellule vivante est continuellement remise en cause par une variété d'agents génotoxiques d'origine exogène (rayonnements solaires ou ionisants, fumée de cigarette, produits chimiques, médicaments...) ou endogène (espèces activées de l'oxygène, radicaux libres...). Un ensemble de mécanismes complexes de réparation permet à la cellule de détecter et d'éliminer les lésions délétères induites par ces agents sur l'ADN afin de sauvegarder l'intégrité de son génome et d'assurer sa survie (Hoeijmakers, 2001 ; Friedberg, 2003).

Ces mécanismes sont classiquement regroupés en 4 grands systèmes au sein des cellules eucaryotes : la réparation par excision de bases (*base excision repair*, BER) ou de nucléotides (*nucleotide excision repair*, NER), la réparation des mésappariements (*mismatch repair*, MMR) et la réparation des cassures double brin (*double strand break repair*, DSBR). La NER intervient essentiellement dans la réparation des lésions produites par des agents exogènes (UV, hydrocarbures aromatiques polycycliques...), la BER principalement dans la réparation des lésions produites lors du métabolisme cellulaire ou suite aux rayonnements ionisants, et le MMR dans les erreurs produites lors de la réplication normale de l'ADN. Chacun de ces systèmes fait intervenir des enzymes différentes. Schématiquement, le principe des 3 premiers systèmes (BER, NER et MMR) consiste à exciser le brin d'ADN contenant la lésion,

à combler la brèche par l'insertion de base(s) correcte(s) en utilisant le brin complémentaire comme matrice, et enfin à ligaturer les 2 parties du brin d'ADN. Ces trois mécanismes de réparation sont considérés comme fonctionnant de façon fidèle.

Des dysfonctionnements dans la voie NER se traduisent par des maladies génétiques rares mais graves, telles que le *xeroderma pigmentosum* caractérisée par une hypersensibilité aux UV du soleil. Chez ces malades, le risque de cancer de la peau dans les zones exposées est environ 2 000 fois plus élevé que dans la population générale (Hoeijmakers, 2001). De même, des mutations sur les gènes *MLH1* et *MSH2*, impliqués dans la voie MMR, sont associées à une forme héréditaire de cancer du colon (*Hereditary Non Polyposis Colon Cancer*, HNPCC) (Friedberg, 2003). En revanche, aucune maladie clairement associée à un dysfonctionnement de la voie BER n'est, à l'heure actuelle, connue.

La réparation des cassures double brin, induites principalement par les radiations ionisantes et certaines drogues anti-tumorales, implique deux voies majeures de réparation : la recombinaison homologue (*homologous recombination*, HR), et la suture d'extrémités non-homologues (*non-homologous end-joining*, NHEJ), faisant intervenir différents complexes de protéines. La recombinaison homologue consiste à échanger des régions équivalentes d'ADN entre chromatides sœurs ou entre chromosomes homologues. Ce processus nécessite une région importante d'homologie de séquence entre les brins endommagés et non-endommagés et se traduit par une réparation fidèle. La voie de réparation NHEJ, prépondérante dans les cellules somatiques des mammifères, consiste à aligner et ressouder les extrémités cassées du chromosome avec la plupart du temps perte de matériel génétique.

Il existe là encore des maladies génétiques rares, telles l'ataxie télangiectasie (A-T) (Bott et coll., 2006) ou l'anémie de Fanconi (Kook, 2005), caractérisées par une hypersensibilité aux radiations ionisantes et une forte prédisposition au cancer. Les enfants atteints d'A-T ont un risque très élevé de développer un cancer (le plus souvent une hémopathie lymphoïde), qui résulterait d'un défaut de reconnaissance et/ou de signalisation des altérations de l'ADN, et donc de leur réparation. Les enzymes déficientes responsables de ces maladies appartiennent à des complexes protéiques impliqués dans la réparation HR.

Mode d'action des composés non génotoxiques : signalisation cellulaire

Les polluants non génotoxiques activent différentes catégories de récepteurs que l'on peut classer en deux grands types : les récepteurs des xénobiotiques au sens strict (récepteur AhR de la dioxine et des hydrocarbures aromatiques polycycliques, récepteur PXR capable de lier des médicaments et des

pesticides, le récepteur CAR (dont le rôle concernant les polluants de l'environnement reste à établir) et les récepteurs de composés endogènes, comme les récepteurs hormonaux, qui sont néanmoins susceptibles d'être modulés par des polluants (par exemple pesticides organochlorés et récepteur de l'œstradiol). Ces récepteurs du premier groupe ont pour fonction principale l'adaptation de l'organisme à l'afflux de xénobiotiques puisqu'ils sont responsables de l'induction des systèmes enzymatiques d'élimination des xénobiotiques. Pour le deuxième ensemble de récepteurs pertinents en terme d'environnement une « activation illégitime » de ces récepteurs par des facteurs environnementaux conduit à une perturbation endocrinienne ou métabolique. Le schéma suivant illustre ce propos (figure 1.1).

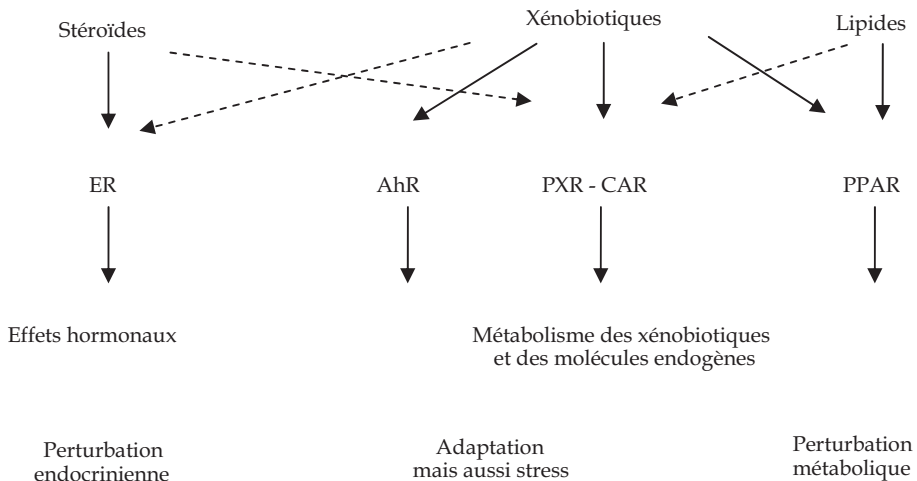


Figure 1.1 : Différents types de récepteurs de xénobiotiques

ER : récepteur à l'œstradiol ; AhR : *Acyl Hydrocarbon Receptor* ; PXR : *Pregnane X Receptor* ; CAR : *Constitutive Androstane Receptor* ; PPAR : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*

Il est intéressant de noter que la toxicité provient à la fois de l'interaction d'un polluant avec son récepteur « légitime » (par exemple dioxine et récepteur AhR), et de l'interaction de ces polluants avec des récepteurs de composés endogènes. Notons que cette classification des récepteurs est trop schématique dans la mesure où les récepteurs des xénobiotiques sont également capables de lier des composés endogènes (par exemple récepteur PXR et acides biliaires). Enfin, la notion d'affinité des récepteurs nucléaires est à prendre en compte : le récepteur de l'œstradiol a une affinité 1 000 fois plus forte pour l'hormone naturelle que pour les pesticides organochlorés. En général, les xénobiotiques ont des affinités modérées pour leurs récepteurs (de l'ordre du μM), ce qui impose de vérifier la pertinence des observations

obtenues ; seule la dioxine présente une forte affinité (nM) pour son récepteur, le AhR.

Nouvelles cibles cellulaires des polluants de l'environnement

Au cours de ces dernières années, de nouvelles cibles cellulaires des polluants de l'environnement ont été identifiées. Nous discuterons plus en détail dans le chapitre 2, (en prenant des exemples précis) des effets des xénobiotiques sur la prolifération et la migration cellulaires. Plusieurs travaux récents ont montré que la perturbation des jonctions cellulaires pouvaient potentialiser les effets cancérogènes des polluants.

En effet, les xénobiotiques perturbent la morphologie cellulaire, notamment au niveau des jonctions communicantes. Ce sont des structures organisées de la membrane cellulaire constituées de protéines dites « connexines ». Elles permettent le passage de petites molécules d'une cellule à l'autre et maintiennent l'assemblage des cellules entre elles. L'idée émerge actuellement selon laquelle une dislocation de ces jonctions pourrait être associée au processus de cancérogenèse (Yamasaki et coll., 1999). On observe une perturbation de ces structures dans les lignées de cancer du sein par rapport aux cellules normales (Saunders et coll., 2001). Les pesticides altèrent la structure des jonctions communicantes dans les cellules épithéliales normales de sein en culture (Kang et coll., 1996). Les ligands AhR (dioxines, PCB) font de même dans divers types cellulaires et pourraient ainsi induire ou favoriser des cancers (Bager et coll., 1997 ; Legare et coll., 2000).

Mécanismes épigénétiques

L'épigénèse est un mécanisme de modification du génome sans modification de la séquence ADN, basé sur une modification de la méthylation de l'ADN et de l'acétylation des histones de la chromatine. Ces modifications perdurent sur plusieurs générations et peuvent donc provoquer un changement de phénotype sous l'influence de l'environnement.

Le tabagisme actif ou passif est impliqué dans les cancers « mucineux » de l'ovaire (Modugno et coll., 2002). Il est à noter que ce type de cancer de l'ovaire se caractérise notamment par l'expression du gène *MUC2*, or une modification épigénétique du promoteur de *MUC2* a été observée dans ces cancers (Vincent et coll., 2007). La carence en folates est associée aux cancers de l'ovaire de tous types (Larsson et coll., 2004 ; Navarro Silvera et coll., 2006). Un des mécanismes évoqué est l'implication de la méthylène

tétrahydrofolate réductase dans les mécanismes de méthylation de l'ADN en relation avec la fonction du suppresseur de tumeur *BRCA1* (*Breast Cancer associated (gene) 1*) (Jakubowska et coll., 2007). Il faut observer que la N-glycine méthyl transférase aussi nommée « protéine de liaison des folates » est capable de lier les hydrocarbures aromatiques comme le benzo-a-pyrène, ce qui ouvre des possibilités de perturbation spécifique des mécanismes épigénétiques par ces composés (Bresnick, 1997).

De nouvelles études explorent l'impact des perturbateurs hormonaux (dont les œstrogènes de synthèse (DES), xénoœstrogènes et phytoœstrogènes) au niveau de cette épigénèse (Mielnicki et coll., 2001). Ces modifications stables sont susceptibles de provoquer des effets pathologiques dans la descendance non exposée d'individus ayant été exposés même en dehors d'une grossesse (Anway et coll., 2005). En outre, ces modifications semblent pouvoir s'étendre au niveau des tissus sains entourant les tumeurs (Yan et coll., 2006). La littérature décrit des modifications de la méthylation des gènes *MUC2*, *ATM*, *HoxA5*, *p21WAF*, *gelsoline*, *BRCA1*, *BRCA2*, *E-cadherine*, récepteur rétinolique, *WIF-1*, notamment au niveau de leurs promoteurs. Tous ces gènes sont impliqués dans le contrôle du phénotype et de la prolifération (Yang et coll., 2001 ; Sarrio et coll., 2003 ; Lehmann et coll., 2004 ; Leu et coll., 2004 ; Staalesen et coll., 2004 ; Vo et coll., 2004 ; Ai et coll., 2006 ; Birgisdottir et coll., 2006 ; Novak et coll., 2006 ; Vincent et coll., 2007). Un tel mécanisme impliquant les hydrocarbures polyaromatiques a été proposé (Jeffy et coll., 2002). Toutefois, la description des paramètres biologiques observés évoque beaucoup plus la génotoxicité, le dommage oxydatif et les effets anti-œstrogènes de ces ligands du AhR qu'un réel mécanisme épigénétique impliquant des modifications stables de la chromatine. Il n'en est pas de même du diéthylstilbestrol (DES) qui est considéré à ce jour comme l'exemple même d'un perturbateur épigénétique de la méthylation de la chromatine des cellules germinales dans le cancer du sein (Li et coll., 2003).

Des travaux plus récents du groupe de Skinner portant sur la vinclozoline ont mis en évidence des effets toxiques épigénétiques transmissibles sur plusieurs générations chez la souris (Anway et coll., 2005). Il est évident que ces observations qui doivent encore être confirmées dans d'autres systèmes expérimentaux ouvrent un champ de recherche nouveau qui est actuellement en plein essor.

Mécanismes de toxicité communs : stress oxydant et inflammation

Le stress oxydant est impliqué dans un grand nombre de mécanismes physiopathologiques (Morel et Barouki, 1999). De très nombreux travaux ont permis de corrélérer la cancérogenèse et le stress oxydant (Schumacker, 2006).

Les cellules cancéreuses ont un niveau basal d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) supérieur à celui des cellules normales. Dans un travail récent, Trachoutham et coll. (2006) ont montré que l'introduction d'un oncogène dans une lignée cellulaire entraînait une élévation des ERO et s'accompagnait de la transformation maligne de cette cellule. Il est peu probable que l'élévation des ERO soit l'intermédiaire nécessaire à la transformation maligne de la cellule suite à l'introduction de l'oncogène, mais le stress oxydant peut potentialiser les effets de l'oncogène par son action sur la prolifération cellulaire et la génotoxicité. Certains auteurs suggèrent que l'état pro-oxydant de la cellule cancéreuse peut être exploité d'un point de vue thérapeutique puisqu'une aggravation du stress oxydant dans ces cellules peut conduire à la mort cellulaire. En effet, selon les systèmes expérimentaux et sans doute selon le taux d'ERO, le stress oxydant peut favoriser soit la croissance soit la mort cellulaire. Plusieurs facteurs décrits récemment viennent conforter l'implication du stress oxydant en cancérogenèse : le rôle des anomalies mitochondriales qui provoquent un stress oxydant (Wallace, 2005), le rôle de l'inflammation et du micro-environnement tumoral qui s'accompagne également d'un stress oxydant.

Parallèlement à ces travaux sur le cancer et le stress oxydant, la recherche de mécanismes de toxicité des polluants a également mis en première ligne le stress oxydant. La relation entre polluants et stress oxydant a été mise en évidence dans des systèmes cellulaires où l'augmentation des ERO a été suivie après addition de polluants. Cette relation a été vérifiée *in vivo* grâce à des biomarqueurs comme la 8-oxo-guanine (Shertzer et coll., 1998 ; Senft et coll., 2002). L'augmentation des ERO après exposition aux polluants peut être soit directe comme dans le cas des métaux, soit indirecte comme pour un certain nombre de polluants organiques. Ces derniers sont de bons inducteurs des cytochromes P450 dont la fonction principale est le métabolisme des xénobiotiques visant à les éliminer. Or, ces enzymes qui sont des mono-oxygénases sont susceptibles de libérer des ERO et sont en partie responsables de la part du stress oxydant provenant du réticulum endoplasmique (Barouki et Morel, 2001 ; Marchand et coll., 2004). Ainsi, certains polluants provoquent un stress oxydant par l'intermédiaire de l'induction des cytochromes P450.

La littérature foisonnante sur le sujet permet de conclure que le stress oxydant est un effet secondaire fréquent de l'exposition à des polluants. Plusieurs polluants entraînent également l'induction de cytokines et une situation inflammatoire qui peut être liée au stress oxydant (Lecureur et coll., 2005 ; Pande et coll., 2005). Néanmoins, il est difficile à ce stade de définir la part du stress oxydant dans les effets toxiques des polluants, notamment la cancérogénicité. Dans ce cadre, l'utilisation d'anti-oxydants pourrait aider à définir le rôle de l'élévation des ERO. Or, l'utilisation pharmacologique à long terme des anti-oxydants *in vivo* a été décevante jusqu'à présent malgré leur efficacité dans des expériences bien ciblées et à court

terme *in vitro*. La mise au point de nouveaux protocoles expérimentaux et cliniques semble nécessaire pour éclaircir l'implication réelle du stress oxydant dans la cancérogénicité des polluants.

Susceptibilité génétique

Au cours des 20 dernières années, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle de facteurs génétiques dans la survenue de cancers (Balmain et coll., 2003). Les premières études se sont tournées vers l'identification de mutations rares à forte pénétrance, dans des familles présentant une fréquence très élevée de sujets atteints de cancers. Le rôle des mutations sur les gènes *BRCA1* et *BRCA2* dans les cancers de l'ovaire ou du sein chez la femme avant la ménopause illustre bien ce champ de recherche. On considère néanmoins que la part attribuable à ces mutations dans les cancers familiaux n'excède pas 20 % (Houlston et Peto, 2004). Bien que de nouvelles mutations à forte pénétrance puissent être découvertes pour expliquer la part restante, d'autres modèles considèrent cependant comme plus probable l'existence de mécanismes polygéniques, mettant en jeu de nombreux allèles, conférant chacun un risque faible de cancer. Cette hypothèse dépasse le seul cadre du cancer du sein et s'applique vraisemblablement à de nombreuses localisations cancéreuses. L'hypothèse polygénique permettrait d'expliquer la grande variabilité du risque de cancer d'un individu à l'autre, dépendant en particulier du nombre d'allèles délétères.

Chacun de nos gènes comporte des variations nucléotidiques (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) pouvant modifier leur efficacité biologique. Une diminution de cette efficacité pourrait donc moduler le risque de cancer associé à une exposition à des agents toxiques. L'étude de leurs effets dans le développement de cancers, et leurs interactions avec l'exposition aux toxiques, représentent une part importante de la recherche actuelle en épidémiologie des cancers. Ces polymorphismes peuvent avoir un impact important au niveau de la population si leur fréquence est élevée. Par exemple, 20 % des cas de cancer peuvent être attribués à un polymorphisme dont l'effet est faible (OR = 1,5) mais dont la prévalence est élevée (50 % de la population). Cette part attribuable est la même que pour un gène conférant un risque élevé (OR = 5) mais dont la prévalence est faible (5 % de la population) (Brennan, 2002).

Les résultats de plusieurs centaines d'études d'association entre des polymorphismes génétiques relativement fréquents dans la population générale et divers cancers ont été publiés durant les 10 dernières années. En dépit de cet effort considérable, le bilan des connaissances acquises est assez décevant ; à quelques exceptions près, les associations positives mises en évidence n'ont généralement pas été confirmées. La taille relativement faible des populations

étudiées (généralement quelques centaines de cas) et de ce fait la puissance statistique insuffisante pour mettre en évidence des effets modestes (ORs attendus inférieurs à 1,5), pourrait en partie expliquer la discordance des résultats. Parmi les exceptions, on peut cependant citer l'exemple de l'augmentation du risque de cancer de la vessie associé au génotype NAT2-acétyleur lent retrouvée dans la majorité des études cas-témoins réalisées en population générale (Garcia-Closas et coll., 2005, pour revue de la littérature et résultats de méta-analyses).

Interactions gènes-environnement

La majorité des études d'interactions gènes-environnement réalisées jusqu'à présent sont d'ordre 2 et portent sur des variables dichotomiques (présence/absence du facteur). Quelques gènes, impliqués dans le métabolisme des cancérigènes ou la réparation de l'ADN, pourraient avoir un effet modificateur sur le risque de cancer associé à des expositions environnementales ou professionnelles (Kelada et coll., 2004, pour revue). Bien que biologiquement plausibles, ces résultats nécessitent d'être confirmés. En effet, la puissance statistique des études n'était généralement pas suffisante pour détecter de telles interactions. En considérant par exemple un OR associé au facteur environnemental de 3 et un OR associé au facteur génétique de 1,5, la puissance d'une étude comportant 500 cas et 500 témoins est d'environ 60 % pour détecter un OR d'interaction de 2 et seulement de 29 % pour un OR d'interaction de 1,5. Ces chiffres sont respectivement de 43 % et 19 % pour les études portant sur 300 cas et 300 témoins (estimations réalisées en utilisant un programme développé par le *National Cancer Institute*, Bethesda, Maryland). De larges effectifs peuvent être obtenus en regroupant les données individuelles ou publiées des différentes études. Dans l'exemple sur le cancer de la vessie, l'interaction entre NAT2 et le tabac a pu être étudiée en combinant les données individuelles de 6 études (1 530 cas et 731 témoins) (Vineis et coll., 2001) et les données publiées de 22 études (environ 4 300 cas) (Garcia-Closas et coll., 2005). Ces deux analyses mettent en évidence une augmentation de risque associée au génotype NAT2-acétylateur lent plus élevée chez les fumeurs que chez les non-fumeurs.

En résumé, plusieurs variants au sein d'un même gène, et plusieurs gènes au sein d'une même voie métabolique, interviennent probablement dans le développement d'un cancer. Une même personne peut ainsi être à risque élevé de cancer pour certains polymorphismes et à faible risque pour d'autres, et il est probable que la population générale comporte un très petit nombre de personnes porteuses de tous les génotypes à risque et une grande proportion de sujets ayant à la fois des génotypes à haut risque et à faible

risque. La somme de leurs effets est cependant difficile à évaluer dans les études actuelles qui n'ont considéré qu'un, voire deux polymorphismes génétiques. Les avancées récentes dans l'identification de nouveaux variants et dans les techniques de génotypage à haut-débit facilitent maintenant l'analyse simultanée de plusieurs centaines de milliers de polymorphismes dans les études épidémiologiques. Cependant, l'étude simultanée de multiples variants, et des interactions complexes gène-gène et gène-environnement, nécessite des tailles d'échantillons considérables, de l'ordre de plusieurs milliers de cas. De telles études, difficilement réalisables par des équipes de recherche individuelles, sont actuellement développées au niveau international ou dans le cadre de consortiums.

BIBLIOGRAPHIE

AI L, TAO Q, ZHONG S, FIELDS CR, KIM WJ, et coll. Inactivation of Wnt inhibitory factor-1 (WIF1) expression by epigenetic silencing is a common event in breast cancer. *Carcinogenesis* 2006, **27** : 1341-1348

AMES BN, SHIGENAGA MK. Oxidants are a major contributor to aging. *Ann NY Acad Sci* 1992, **663** : 85-96

ANWAY MD, CUPP AS, UZUMCU M, SKINNER MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 2005, **308** : 1466-1469

BAGER Y, KATO Y, KENNE K, WARNGARD L. The ability to alter the gap junction protein expression outside GST-P positive foci in liver of rats was associated to the tumour promotion potency of different polychlorinated biphenyls. *Chem Biol Interact* 1997, **103** : 199-212

BALMAIN A, GRAY J, PONDER B. The genetics and genomics of cancer. *Nature Genet* 2003, **33** (Suppl) : 238-244

BAROUKI R, MOREL Y. Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem Pharmacol* 2001, **61** : 511-516

BIRGISDOTTIR V, STEFANSSON OA, BODVARSDOTTIR SK, HILMARSDDOTTIR H, JONASSON JG, et coll. Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2006, **8** : R38

BOTT L, THUMERELLE C, CUVELLIER JC, DESCHILDRE A, VALLEE L, SARDET A. Ataxia-telangiectasia: a review. *Arch Pediatr* 2006, **13** : 293-298

BRENNAN P. Gene-environment interaction and aetiology of cancer: what does it mean and how can we measure it? *Carcinogenesis* 2002, **23** : 381-387

BRESNICK E. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-binding protein and glycine N-methyltransferase (GNMT). *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **237** : 758

BRITTON M. The epidemiology of mesothelioma. *Semin Oncol* 2002, **29** : 18-25

BRUNING T, BOLT HM. Renal toxicity and carcinogenicity of trichloroethylene: key results, mechanisms, and controversies. *Crit Rev Toxicol* 2000, **30** : 253-285

CADET J, BERGER M, DOUKI T, RAVANAT JL. Oxidative damage to DNA : formation, measurement and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1997, **131** : 1-87

COUMOUL X, DIRY M, ROBILLOT C, BAROUKI R. Differential regulation of cytochrome P450 1A1 and 1B1 by a combination of dioxin and pesticides in the breast tumor cell line MCF-7. *Cancer Res* 2001, **61** : 3942-3948

COUMOUL X, DIRY M, BAROUKI R. PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides. *Biochem Pharmacol* 2002, **64** : 1513-1519

CZENE K, LICHTENSTEIN P, HEMMINKI K. Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *Int J Cancer* 2002, **99** : 260-266

DURET OC, DAUJAT-CHAVANIEU M, PASCUSI JM, PICHARD-GARCIA L, BALAGUER P, et coll. Ketoconazole and miconazole are antagonists of the human glucocorticoid receptor: Consequences on the expression and function of the constitutive androstanolone receptor and the pregnane X receptor. *Mol Pharmacol* 2006, **70** : 329-339

FRIEDBERG EC. DNA damage and repair. *Nature* 2003, **421** : 436-440

GARCIA-CLOSAS M, MALATS N, SILVERMAN D, DOSEMECI M, KOGEVINAS M, et coll. NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet* 2005, **366** : 649-659

HAYES JD, FLANAGAN JU, JOWSEY IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005, **45** : 51-88

HEMMINKI K, DONG C, VAITTINEN P. Cancer risks to spouses and offspring in the Family-Cancer Database. *Genet Epidemiol* 2001, **20** : 247-257

HOEIJMAKERS JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001, **411** : 366-374

HOULSTON RS, PETO J. The search for low-penetrance cancer susceptibility alleles. *Oncogene* 2004, **23** : 6471-6476

JAKUBOWSKA A, GRONWALD J, MENKISZAK J, GORSKI B, HUZARSKI T, et coll. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms modify BRCA1-associated breast and ovarian cancer risks. *Breast Cancer Res Treat* 2007, **104** : 299-308

JEFFY BD, CHIRNOMAS RB, ROMAGNOLO DF. Epigenetics of breast cancer: polycyclic aromatic hydrocarbons as risk factors. *Environ Mol Mutagen* 2002, **39** : 235-244

KANG KS, WILSON MR, HAYASHI T, CHANG CC, TROSKO JE. Inhibition of gap junctional intercellular communication in normal human breast epithelial cells after treatment with pesticides, PCBs, and PBBs, alone or in mixtures. *Environ Health Perspect* 1996, **104** : 192-200

KELADA SN, EASTON DL, WANG SS, ROTHMAN NR, KHOURY MJ. Applications of human genome epidemiology to environmental health. *In* : Human Genome

Epidemiology. KHOURY MJ, LITTLE J, BURKE W (eds). Oxford University Press, 2004 : 145-167

KING CD, RIOS GR, GREEN MD, TEPHLY TR. UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab* 2000, 1 : 143-161

KLAASSEN CD, SLITT AL. Regulation of hepatic transporters by xenobiotic receptors. *Curr Drug Metab* 2005, 6 : 309-328

KOOK H. Fanconi anemia: current management. *Hematology* 2005, 10 : 108-110

LARSSON SC, GIOVANNUCCI E, WOLK A. Dietary Folate Intake and Incidence of Ovarian Cancer: The Swedish Mammography Cohort. *J Natl Cancer Inst* 2004, 96 : 396-402

LECUREUR V, FERREC EL, N'DIAYE M, VEE ML, GARDYN C, et coll. ERK-dependent induction of TNFalpha expression by the environmental contaminant benzo(a)pyrene in primary human macrophages. *FEBS Lett* 2005, 579 : 1904-1910

LEGARE ME, HANNEMAN WH, BARHOUMI R, BURGHARDT RC, TIFFANY-CASTIGLIONI E. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters hippocampal astroglia-neuronal gap junctional communication. *Neurotoxicology* 2000, 21 : 1109-1116

LEHMANN U, LANGER F, CELIKKAYA G, LUCK HJ, KREIPE H. Epigenetic changes in breast cancer shown by aberrant promoter methylation. *Zentralblatt fur Gynakologie* 2004, 126 : 272-274

LEU YW, YAN PS, FAN M, JIN VX, LIU JC, et coll. Loss of estrogen receptor signaling triggers epigenetic silencing of downstream targets in breast cancer. *Cancer Res* 2004, 64 : 8184-8192

LI S, HURSTING SD, DAVIS BJ, MCLACHLAN JA, BARRETT JC. Environmental exposure, DNA methylation, and gene regulation: lessons from diethylstilbestrol-induced cancers. *Ann N Y Acad Sci* 2003, 983 : 161-169

LICHTENSTEIN P, HOLM NV, VERKASALO PK, ILIADOU A, KAPRIO J, et coll. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000, 343 : 78-85 (commentaires in : *N Engl J Med* 2000, 343 : 1494)

MARCHAND A, BAROUKI R, GARLATTI M. Regulation of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 gene expression by CYP1A1 activity. *Mol Pharmacol* 2004, 65 : 1029-1037

MIELNICKI LM, ASCH HL, ASCH BB. Genes, chromatin, and breast cancer: an epigenetic tale. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001, 6 : 169-182

MODUGNO F, NESS RB, COTTREAU CM. Cigarette smoking and the risk of mucinous and nonmucinous epithelial ovarian cancer. *Epidemiology* 2002, 13 : 467-471

MOREL Y, BAROUKI R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* 1999, 342 : 481-496

NAVARRO SILVERA SA, JAIN M, HOWE GR, MILLER AB, ROHAN TE. Dietary folate consumption and risk of ovarian cancer: a prospective cohort study. *Eur J Cancer Prev* 2006, 15 : 511-515

NOVAK P, JENSEN T, OSHIRO MM, WOZNIAK RJ, NOUZOVA M, et coll. Epigenetic inactivation of the HOXA gene cluster in breast cancer. *Cancer Res* 2006, **66** : 10664-10670

PANDE K, MORAN SM, BRADFIELD CA. Aspects of dioxin toxicity are mediated by interleukin 1-like cytokines. *Mol Pharmacol* 2005, **67** : 1393-1398

POTT P. Chirurgical observations relative to the cataract, polypus of the nose, the cancer of the scrotum, the different kinds of ruptures and the mortification of the toes and feet. London, England, Hawes, Clarke, and Collins, 1775. *National Cancer Institute Monograph* 1963, **10** : 7-13

SARRIO D, MORENO-BUENO G, HARDISSON D, SANCHEZ-ESTEVEZ C, GUO M, et coll. Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. *Int J Cancer* 2003, **106** : 208-215

SAUNDERS MM, SERAJ MJ, LI Z, ZHOU Z, WINTER CR, et coll. Breast cancer metastatic potential correlates with a breakdown in homospecific and heterospecific gap junctional intercellular communication. *Cancer Res* 2001, **61** : 1765-1767

SCHUMACKER PT. Reactive oxygen species in cancer cells : live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell* 2006, **10** : 175-176

SENFT AP, DALTON TP, NEBERT DW, GENTER MB, PUGA A, et coll. Mitochondrial reactive oxygen production is dependent on the aromatic hydrocarbon receptor. *Free Radic Biol Med* 2002, **33** : 1268-1278

SHERTZER HG, NEBERT DW, PUGA A, ARY M, SONNTAG D, et coll. Dioxin causes a sustained oxidative stress response in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **253** : 44-48

STAALESEN V, LEIRVAAG B, LILLEHAUG JR, LONNING PE. Genetic and epigenetic changes in p21 and p21B do not correlate with resistance to doxorubicin or mitomycin and 5-fluorouracil in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004, **10** : 3438-3443

TRACHOOTHAM D, ZHOU Y, ZHANG H, DEMIZU Y, CHEN Z, et coll. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell* 2006, **10** : 241-252

TUCKER MA, GOLDSTEIN AM. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 2003, **22** : 3042-3052

VINCENT A, PERRAIS M, DESSEYN JL, AUBERT JP, PIGNY P, et coll. Epigenetic regulation (DNA methylation, histone modifications) of the 11p15 mucin genes (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6) in epithelial cancer cells. *Oncogene* 2007, **26** : 6566-6576. Epub 2007 Apr 30

VINEIS P, MARINELLI D, AUTRUP H, BROCKMOLLER J, CASCORBI I, et coll. Current smoking, occupation, N-acetyltransferase-2 and bladder cancer: a pooled analysis of genotype-based studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001, **10** : 1249-1252

VO QN, KIM WJ, CVITANOVIC L, BOUDREAU DA, GINZINGER DG, et coll. The ATM gene is a target for epigenetic silencing in locally advanced breast cancer. *Oncogene* 2004, **23** : 9432-9437

WALLACE DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer : a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 2005, 39 : 359-407

YAMASAKI H, OMORI Y, ZAIDAN-DAGLI ML, MIRONOV N, MESNIL M, et coll. Genetic and epigenetic changes of intercellular communication genes during multistage carcinogenesis. *Cancer Detec Prev* 1999, 23 : 273-279

YAN PS, VENKATARAMU C, IBRAHIM A, LIU JC, SHEN RZ, et coll. Mapping geographic zones of cancer risk with epigenetic biomarkers in normal breast tissue. *Clin Cancer Res* 2006, 12 : 6626-6636

YANG Q, MORI I, SHAN L, NAKAMURA M, NAKAMURA Y, et coll. Biallelic inactivation of retinoic acid receptor beta2 gene by epigenetic change in breast cancer. *Am J Pathol* 2001, 158 : 299-303

YOSHIE Y, OHSHIMA H. Synergistic induction of DNA strand breakage by cigarette tar and nitric oxide. *Carcinogenesis* 1997, 18 : 1359-1363