



HAL
open science

Contribution à l'étude des mécanismes de l'interaction alcool-tabac dans l'étiologie du cancer de l'oesophage

Mathilde Lechevrel

► **To cite this version:**

Mathilde Lechevrel. Contribution à l'étude des mécanismes de l'interaction alcool-tabac dans l'étiologie du cancer de l'oesophage. Sciences agricoles. Université Paul Verlaine - Metz, 1997. Français. NNT: 1997METZ039S . tel-01777222

HAL Id: tel-01777222

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777222>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITÉ de METZ
CENTRE DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

THÈSE

présentée pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE METZ
Mention "Toxicologie de l'environnement"
par

Mathilde LECHEVREL

**Contribution à l'étude des mécanismes
de l'interaction alcool-tabac dans
l'étiologie du cancer de l'œsophage**

Soutenue le 3 décembre 1997 devant la commission d'examen composée de :

Directeur :	Professeur P. Gauduchon	Université de Caen
Rapporteurs :	Docteur P. Hainaut	CIRC, Lyon
	Docteur A.-M. Mandard	Centre François Baclesse, Caen
Examineurs :	Professeur Ph. Beaune	INSERM, Université Paris
	Docteur G. Launoy	INSERM, CHRU, Caen
	Professeur P. Vasseur	Université de Metz
	Professeur C.P. Wild	Université de Leeds, Royaume-Uni

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 177178 7

V

0425702

UNIVERSITÉ de METZ
CENTRE DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

THÈSE

présentée pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE METZ
Mention "Toxicologie de l'environnement"

par

Mathilde LECHEVREL

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19970825
Cote	S/M3 97/39
Loc	Magasin

**Contribution à l'étude des mécanismes
de l'interaction alcool-tabac dans
l'étiologie du cancer de l'œsophage**

Soutenue le 3 décembre 1997 devant la commission d'examen composée de :

Directeur : Professeur P. Gauduchon Université de Caen
Rapporteurs : Docteur P. Hainaut CIRC, Lyon
 Docteur A.-M. Mandard Centre François Baclesse, Caen
Examineurs : Professeur Ph. Beaune INSERM, Université Paris
 Docteur G. Launoy INSERM, CHRU, Caen
 Professeur P. Vasseur Université de Metz
 Professeur C.P. Wild Université de Leeds, Royaume-Uni

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été initiés au Centre International de Recherche sur le Cancer au sein de l'Unité des Mécanismes de la Cancérogenèse dirigée par le Docteur Rugerro Montesano, puis au sein de l'Unité de la Cancérogenèse Environnementale dirigée par le Professeur Christopher Wild. Je remercie Le Docteur Rugerro Montesano de m'avoir encouragée et accueillie dans son unité. Je tiens tout particulièrement à remercier le Professeur Christopher Wild, pour ses précieux conseils et ses messages inestimables qui m'ont permis d'aborder la recherche avec un nouveau regard. Je lui suis reconnaissante de m'avoir accordé toute sa confiance et de m'avoir réconciliée avec l'humour anglais (surtout pour une cherbourgeoise!). Qu'il trouve, ici, le témoignage de ma profonde et sincère gratitude.

La poursuite des travaux a été réalisée au sein du GRECAN (Groupe Régional d'Etudes sur le Cancer) et du CJF INSERM 96-03 "Epidémiologie et Biologie des Cancers" dans le Laboratoire de Cancérologie Expérimentale du Centre Régional de Lutte Contre Le Cancer François Baclesse, à Caen. J'adresse mes remerciements au Professeur Jean-François Héron, Directeur du Centre F. Baclesse, au Professeur Jean-Yves Le Talaer, Directeur du GRECAN et responsable du Laboratoire de Cancérologie Expérimentale et au Professeur Marc Gignoux, Directeur du CJF, pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe.

Je voudrais exprimer ma sincère reconnaissance au Docteur Anne-Marie Mandard pour son soutien et ses précieux conseils. Je la remercie vivement pour m'avoir fait bénéficier de sa grande expérience dans le domaine de l'anatomo-pathologie de l'oesophage et d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail

Je tiens à remercier le Professeur Pascal Gauduchon, l'instigateur de ce travail, qui a dirigé mes travaux, en me faisant bénéficier de ses compétences scientifiques, de sa rigueur et de son érudition dans la cancérogenèse chimique. Je lui suis très reconnaissante pour son soutien et pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de mon parcours épique (mais non hippique...)

Je remercie le Docteur Pierre Hainaut d'avoir accepté d'être rapporteur et membre du jury de cette thèse. Je le remercie de l'intérêt qu'il a porté à mon travail et des conseils qu'il m'a adressés pour la correction de ce document.

Je remercie le Professeur Philippe Beaune, qui en tant que spécialiste des cytochromes P450, a accepté de juger ce travail. Je le remercie de l'intérêt qu'il a porté à mon travail et des discussions qu'il m'a accordées.

Je remercie sincèrement le Professeur Paule Vasseur dont le soutien a été déterminant pour le déroulement de cette thèse, pour l'intérêt constant qu'elle a porté à mon travail. Je suis sensible à l'honneur qu'elle me fait en siégeant dans mon jury.

Je remercie surtout le Docteur Guy Launoy, pour son enthousiasme, sa disponibilité et sa participation à l'analyse des résultats statistiques. Je lui présente ma profonde et sincère gratitude.

Je remercie également le Docteur Annie Canu, le Professeur R. Kandolf, le Docteur Robert Leroyer, le Docteur Paulette Herlin ainsi que Masha Schuiling pour leur collaboration dans ces travaux de recherche.

Enfin je voudrais remercier tout ceux qui m'ont apporté leur aide et leur soutien :

Tous les membres de l'unité de la cancérogenèse de l'environnement qui ont contribué à rendre ce séjour au CIRC si agréable : Brigitte Chapot, Isabelle Chemin, Liliane Garren pour leur amitié, leur disponibilité et leur soutien.

Jean-Jacques Castégnéro, en tant qu'éminent chimiste, pour sa bienveillance et ses précieux conseils,

Joceline Michelon et Gisèle Brun pour leur enthousiasme et leur compréhension,

Alain Schouft pour ses compétences techniques.

J'aimerais remercier pour leurs compétences et leur gentillesse, Anne-Marie Camus, Jean-Claude Béréziat et Françoise Raffali.

A ces remerciements j'ajoute mes collègues du Centre François Baclesse pour leur soutien et leur participation au projet oesophage :

Toute l'équipe sympathique du laboratoire d'anatomo-pathologie, en particulier Jacques Marnay, Christian Lebeau, Mme Baudron, Françoise Ingouf pour leur compétence, leur disponibilité,

Jean-Jacques Baumann et Gilbert Roussel du laboratoire de biochimie pour leur sympathie et leurs conseils techniques, ainsi qu'Agnès Hardouin pour son dynamisme,

Madame Michel, photographe au centre pour sa disponibilité,

François Sichel pour sa patience, sa confiance et son amitié, sans qui l'étude cas-témoins n'aurait pu exister,

Cathy Staedel pour m'avoir initié à certaines techniques de biologie moléculaire et pour m'avoir accordé de son temps pour de nombreuses discussions,

Karine Delvinquière pour son amitié et son soutien morale : je lui souhaite bon courage pour la poursuite de ses projets.

Je remercie les autres membres du laboratoire pour leur écoute permanente, leur bonne humeur et leurs friandises.

Je voudrais aussi remercier ma famille et mes amis qui ont toujours cru en mon travail.

A Jean-Luc, mon ami sans qui cette thèse n'aurait pas pris cette forme,

A Jonas.

Table des matières

Abréviations	5
Introduction	7
Partie I :	
Présentation bibliographique	13
1 La cancérogenèse chimique	15
1.1 Introduction	15
1.2 Etapes de la carcinogenèse chimique	15
1.2.1 L'initiation	15
1.2.2 La promotion	16
1.2.3 La progression	16
1.3 Généralités sur les bases moléculaires du cancer	17
1.4 Métabolisme des carcinogènes chimiques	19
1.5 Les cytochromes P450	20
1.5.1 Structure et rôle des cytochromes P450	20
1.5.2 Nomenclature des P450	21

TABLE DES MATIÈRES

1.5.3	Régulation de l'expression des P450	22
1.5.4	Principales familles des P450 humains impliqués dans le métabolisme des carcinogènes chimiques	24
1.6	Formation des adduits à l'ADN	26
1.7	Réponse cellulaire aux dommages à l'ADN	28
1.7.1	Généralités	28
1.7.2	Le gène <i>ATM</i>	28
1.7.3	Le gène <i>p53</i>	29
1.7.4	Contrôle du cycle cellulaire par p53	31
1.7.5	p53 et réparation	33
1.7.6	p53 et apoptose	34
1.7.7	Réparation des adduits de l'ADN	34
1.8	Transformation des dommages à l'ADN en altérations stables du message génétique	38
1.8.1	Transformation des dommages à l'ADN au cours du cycle cellulaire	38
1.8.2	Influence de l'efficacité de réparation et de la prolifération cellulaire d'un tissu	40
1.8.3	Mutations induites par les adduits de l'ADN	41
1.9	Conclusion	42
2	Cancer épidermoïde de l'œsophage et facteurs étiologiques	43
2.1	Anatomie, histologie et biochimie de l'œsophage	43
2.2	Lésions non néoplasiques de l'œsophage	45
2.3	Cancer de l'œsophage	46

2.3.1	Carcinome épidermoïde	47
2.3.2	Adénocarcinome	47
2.3.3	Autres tumeurs	48
2.4	Pronostic du cancer de l'œsophage	48
2.5	Incidence géographique	48
2.5.1	Incidence dans le monde	48
2.5.2	Incidence en Europe	50
2.5.3	Incidence en France et dans le département du Calvados	50
2.6	Facteurs étiologiques	52
2.6.1	Alcool-tabac	52
2.6.2	L'alimentation	54
2.6.3	Irritation chronique	55
2.6.4	Les agents biologiques	57
2.6.5	Les facteurs génétiques	58
2.6.6	Immunosuppression	58
2.7	Conclusion	58
3	Tabac, alcool et cancer de l'œsophage	61
3.1	Introduction	61
3.2	Tabac et cancer	62
3.2.1	Principales substances carcinogènes du tabac et leur origine	62
3.2.2	Mutations de <i>p53</i> et le tabac	64
3.2.3	Carcinogènes du tabac et prolifération cellulaire	66
3.2.4	Tabac et polymorphismes génétiques des enzymes du métabolisme	66

3.2.5	Tabac et cancer épidermoïde de l'œsophage	67
3.3	Alcool et cancer	71
3.3.1	Déficits nutritionnels associés à la prise d'alcool	72
3.3.2	Rôle des congénères carcinogènes contenus dans les boissons alcoolisées	72
3.3.3	L'action de l'alcool en tant que solvant	72
3.3.4	Influence de l'alcool sur le métabolisme des carcinogènes du tabac	73
3.3.5	Augmentation de la prolifération cellulaire	74
3.3.6	Alcool et polymorphisme génétique	75
3.3.7	Alcool et mutations de <i>p53</i>	76
3.4	Conclusion	76
4	Objectifs de la thèse	79
 Partie II :		
Travaux de recherche		83
5	Etude <i>in vivo</i> chez le rat	85
5.1	Introduction	85
5.2	Essais préliminaires concernant la préparation des microsomes	86
5.3	Etude <i>in vivo</i> de l'influence de différentes boissons alcoolisées sur l'expression du CYP2E1 chez le rat	87
5.3.1	Induction du CYP2E1 hépatiques par différentes boissons alcoolisées	87
5.3.2	Expression du CYP2E1 et du CYP1A1/2 dans la muqueuse œsophagienne	88

5.4	Etude de l'effet des différents boissons alcoolisées sur la NMBA déméthylase de l'œsophage et le taux de la 7-méthylguanine dans le foie et l'œsophage.	91
5.4.1	Matériels et méthodes	92
5.4.2	Résultats	92
5.4.3	Discussion	93
5.5	Conclusion	95
6	Expression des cytochromes P450 dans la muqueuse œsophagienne humaine	97
6.1	Introduction	97
6.2	Expression des cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme des carcinogènes dans la muqueuse œsophagienne humaine	98
6.3	Localisation des P450 dans la muqueuse œsophagienne humaine .	100
6.4	Mesure des adduits de méthylation dans l'ADN de la muqueuse œsophagienne	104
6.4.1	Mesure de la 7-méthylguanine	104
6.4.2	Mesure de l'adduit O ⁶ méthylguanine	104
6.5	Discussion	109
6.6	Conclusion	112
7	Influence de l'alcool et du tabac sur l'expression de marqueurs de prolifération cellulaire et de p53 dans la muqueuse oesophagienne humaine	113
7.1	Introduction	113
7.2	Description histologique des échantillons	114
7.3	Résultats	117

7.3.1	Choix du marqueur de prolifération cellulaire	117
7.3.2	Analyse qualitative de l'immunomarquage du Ki67 et de p53	118
7.3.3	Influence de l'alcool et de son mode de consommation sur l'apparition de zones d'œsophagite chronique au sein du revêtement malpighien	121
7.4	Discussion	127
7.5	Conclusion	132
Conclusion		133
Bibliographie		141
Annexe		I
A	Activité NMBA déméthylase	III
B	Extraction de l'ADN	V
C	Dosage de la 7-méthylguanine (7meG)	VII
D	Extraction du produit amplifié à partir d'un gel	IX
E	Séquençage de l'ADNc du CYP2E1 par une méthode enzymatique	XI
E.1	Marquage de l'amorce sens du CYP2E1	XI
E.2	Détermination de la séquence de l'oligonucléotide par amplification (PCR) en présence de di-désoxynucléotides	XII

F	Marquage de la sonde ADNc du CYP2E1	XV
F.1	Vérification du marquage de la sonde	XV
G	Extraction des ARN totaux à partir de blocs en paraffine	XVII
H	Hybridation <i>in situ</i>	XIX
I	Dosage de la O(6)méthyl-déoxyguanosine (O6medG)	XXI
I.1	Dosage des nucléotides normaux	XXI
I.2	Purification des O-alkyl 2'déoxyribonucléoside 3'monophosphates (3'Oalkyl dNp)	XXII
I.3	Post-marquage des adduits	XXII
I.4	Immunoprécipitation	XXIII
J	Immunohistochimie de la protéine p53 et du Ki67	XXV
J.1	Réactifs	XXV
J.2	Préparation des lames	XXVI
J.3	Inhibition des peroxydases endogènes	XXVII
J.4	Démasquage des sites antigéniques	XXVII
J.5	Réactions immunohistochimiques	XXVII
J.6	Réaction avec le chromogène	XXVIII
J.7	Contre coloration	XXVIII
J.8	Différenciation	XXVIII

Abréviations

Macromolécules et gènes :

ADH	: alcool déshydrogénase
AHH	: aryl hydrocarbon hydroxylase
ALDH	: aldéhyde déshydrogénase
ATM	: gène muté dans l'ataxie télangiectasie
CYP	: cytochrome
GADPH	: glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GST	: glutathion-S-transférase
HPV	: Papillomavirus humain
MGMT	: O ⁶ méthylguanine-méthyltransférase
PCNA	: proliferating cell nuclear antigen
Rnase	: ribonucléase
cdk	: cyclin dependent kinase
pRb	: protéine du rétinoblastome

Bases, nucléosides et nucléotides modifiés :

3'O ⁶ -medGp	: O ⁶ méthyldéoxyguanosine-3'-monophosphate
3'dGMP	: désoxyguanosine-3'-monophosphate
3'dTMP	: désoxythymidine-3'-monophosphate
5'O ⁶ -medGp	: O ⁶ méthyldéoxyguanosine-5'-monophosphate
7meG	: 7-méthylguanine
ADNc	: acide désoxyribonucléique complémentaire
O ⁶ medG	: O ⁶ -méthyldéoxyguanosine

Techniques d'analyse :

CLHP	: chromatographie liquide à haute performance
PCR	: amplification par réaction de polymérase multicycle
RT-PCR	: transcriptase inverse suivie d'une PCR
rpm	: tours par minute

ABRÉVIATIONS

Produits chimiques :

B(a)p	: Benzo(a)pyrène
DMN	: diméthylnitrosamine
HPAs	: hydrocarbures aromatiques polycycliques
NMBA	: N-méthylbenzylnitrosamine
NNK	: 4(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
NNN	: N'-nitrosonornicotine
NOSTs	: nitrosamines spécifiques du tabac
NOVs	: nitrosamines volatiles
PBS	: solution saline tamponnée par le phosphate (phosphate buffer saline)
TBS	: solution saline tamponnée par le chlorydrate de tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris buffered saline)
Tris	: tris(hydroxyméthyl)aminométhane

INTRODUCTION

Le cancer de l'œsophage se situe au 4^e rang des affections malignes rencontrées dans les régions en voie de développement et au 15^e rang dans les pays développés [Parkin et al., 1992]. Cette estimation moyenne masque en fait la caractéristique épidémiologique de ce cancer : son extraordinaire variabilité géographique. Dans la majorité des pays, l'incidence annuelle est inférieure à 5 cas pour 100 000 habitants, quasiment toujours plus élevée chez l'homme que chez la femme. Il existe cependant dans certaines régions, comme le Nord-Ouest de la France, des zones où l'incidence est 20 à 50 fois plus élevée [Pottier et al., 1989]. Elle concerne essentiellement les populations rurales et les catégories socio-professionnelles les plus défavorisées. Une tendance à la baisse est observée dans les régions françaises à haut risque, alors qu'elle reste stable ou augmente dans les zones à faible risque. Cette diminution au cours du temps, qui concerne la forme la plus courante, le carcinome épidermoïde, localisé dans les 2/3 supérieurs de l'œsophage, est tempérée par une légère augmentation d'une forme particulière, l'adénocarcinome, localisé dans le 1/3 inférieur de l'œsophage.

Outre sa grande fréquence, le cancer de l'œsophage se caractérise par un diagnostic tardif et un mauvais pronostic avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 10%.

La responsabilité de la consommation d'alcool et de tabac dans l'apparition du cancer épidermoïde de l'œsophage a été établie dans les pays développés depuis plusieurs années [Tuyns et al., 1977]. Ces deux facteurs étiologiques primordiaux combinent leurs effets selon un mode multiplicatif. Le mécanisme de cette interaction est pour l'instant inconnue. De même, l'origine des contrastes géographiques et sociaux de la fréquence de ce cancer reste inexpliquée. La responsabilité spécifique de certaines boissons alcoolisées, notamment les alcools issus de la pomme, n'a jamais été démontrée ni expérimentalement, ni épidémiologiquement. Les quelques études menées à ce sujet présentent des résultats très controversés [Tuyns et al., 1979], [Craddock, 1993].

Notre travail avait pour objectif l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires de l'interaction alcool-tabac impliquée dans l'apparition du cancer épidermoïde de l'œsophage.

La cancérogénèse est un phénomène multifactoriel à plusieurs étapes. Elle met en jeu des interactions complexes entre des facteurs exogènes environnementaux et des facteurs endogènes génétiques ou acquis [Peto, 1977]. La plupart des cancérogènes chimiques nécessite une activation métabolique pour exercer leurs effets biologiques [Miller and Miller, 1981]. Cette activation est principalement médiée

par les mono-oxygénases à cytochrome P450. Un produit chimique peut ainsi être métabolisé en dérivé électrophile susceptible de se lier de façon covalente sur des macromolécules, protéines ou acides nucléiques et former des adduits. Face à ces attaques nucléophiles, la cellule est en mesure de répondre en faisant intervenir différents paramètres, induisant l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation et dans le cas échéant l'apoptose. Lorsque ces différents systèmes sont perturbés, il en résulte des altérations génomiques dont certaines peuvent traduire un état pré-néoplasique. La connaissance de ces mécanismes au sein de la muqueuse oesophagienne permettra de relier l'apparition d'événements précoces avec l'étiologie du cancer de l'oesophage.

Les questions auxquelles l'ensemble de l'étude a permis de répondre ont été les suivantes :

- Dans quelle mesure certaines boissons alcoolisées pouvaient exercer une influence sur le métabolisme des carcinogènes du tabac à la fois dans le foie et l'oesophage de rat ?
- Quelles étaient les capacités métaboliques de la muqueuse oesophagienne humaine et les niveaux d'expression des cytochromes P450 après une exposition à l'alcool et au tabac ?
- Existait-il une relation entre l'exposition du tabac, de l'alcool et de son mode de consommation (chaleur) avec l'apparition d'altérations précoces dans l'épithélium malpighien normale de l'homme ?.

Une première partie de ce manuscrit reprend les mécanismes impliqués dans la genèse du cancer (le métabolisme des carcinogènes, les adduits d'alkylation à l'ADN et la réponse cellulaire au dommages à l'ADN). Les caractéristiques du cancer de l'oesophage, son incidence et ses facteurs de risque sont ensuite abordées. Les connaissances actuelles des mécanismes moléculaires de l'alcool et du tabac dans la carcinogenèse de l'oesophage sont étudiées afin d'approcher celui de l'interaction alcool-tabac actuellement mal connue.

La deuxième partie du manuscrit est consacrée à la présentation et à la discussion des résultats. Elle comporte trois chapitres. Le premier présente l'étude *in vivo* réalisée chez les rats, dont le but est de mesurer l'influence des boissons alcoolisées sur l'induction du CYP2E1 et sur le taux d'alkylation à la suite d'une injection de la NMBA. Le deuxième chapitre décrit les différents cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme des carcinogènes du tabac au sein

de la muqueuse œsophagienne humaine. Enfin le dernier chapitre aborde l'effet d'une consommation excessive de boissons bues chaudes et de tabac sur le taux de prolifération cellulaire et sur la surexpression de p53 dans l'épithélium non néoplasiques de cas et de témoins.

Première partie

Présentation bibliographique

Chapitre 1

La cancérogenèse chimique

1.1 Introduction

La cancérogenèse chimique expérimentale a décrit le processus de cancérisation en trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression. Avec l'essor de la biologie moléculaire, de la biochimie et de l'épidémiologie moléculaire, cette vision s'est élargie en insistant sur la complexité du cancer, en particulier sur son caractère multiphasique, l'aspect multifactoriel de son étiologie et l'hétérogénéité tissulaire des phénomènes. Néanmoins, la subdivision en trois étapes reste intéressante sur le plan pratique puisque chaque phase peut refléter un ou plusieurs événements au niveau moléculaire.

1.2 Etapes de la carcinogenèse chimique

1.2.1 L'initiation

L'étape d'initiation décrit le changement irréversible des cellules normales en cellules dites "initiées". Au cours de cet événement, l'initiateur (agent chimique métabolisé ou non) se fixe sur l'ADN et l'altère selon le mécanisme suivant. Doté d'un fort pouvoir électrophile, le composé cancérigène est capable de se lier de manière covalente à des sites nucléophiles de l'ADN cellulaire et de former ainsi des produits d'addition appelés adduits. Si les adduits ne sont pas éliminés par le processus de réparation avant la réplication de l'ADN, une mutation peut

se produire. Cette altération génomique peut se présenter sous diverses formes : "mésappariements" de bases, décalage du cadre de lecture, réarrangements de fragments d'ADN (insertions, délétions, transpositions, recombinaisons et amplifications). Au cours de cette première étape, les cellules peuvent subir une altération du contrôle de la division homéostatique, de la différenciation ou de la mort cellulaire programmée (apoptose).

1.2.2 La promotion

L'étape de promotion se caractérise par la survie et la prolifération autonome des cellules initiées au détriment des cellules normales. Elle conduit ainsi à la formation d'une lésion pré-néoplasique ou tumeur bénigne. Au cours de cette phase la probabilité d'altérations génétiques s'ajoute aux mutations endogènes accumulées dans les cellules en prolifération. La promotion est partiellement réversible. Elle peut être inhibée par des agents antioxydants ou à l'inverse, influencée positivement par des promoteurs. Ces composés exogènes ne possédant pas ou peu d'activités cancérogènes seraient dotés d'une activité mitogène et agirait en augmentant la prolifération cellulaire [Ames and Gold, 1990], [Cohen and Ellwein, 1991]. Ce processus favoriserait l'expansion clonale de la cellule initiée.

1.2.3 La progression

L'étape de la progression correspond au passage de la lésion pré-néoplasique (tumeur bénigne) à un néoplasme (tumeur maligne). Des travaux montrent qu'une cellule doit subir au moins une dizaine de mutations distinctes avant de devenir cancéreuse [Marx, 1989]. L'accumulation de nouvelles mutations va de pair avec une instabilité génétique croissante des cellules tumorales. Elle favorise la sélection et la croissance de clones cellulaires de plus en plus agressifs. Outre les mutations des proto-oncogènes et des gènes supresseurs de tumeurs responsables de la prolifération cellulaire incontrôlée, d'autres classes de gènes mutés participeraient à la malignité, en conférant un caractère invasif aux cellules tumorales [Weinberg, 1996]. L'action permanente de produits mitogènes contribuerait également à l'expansion tumorale [Purchase, 1994].

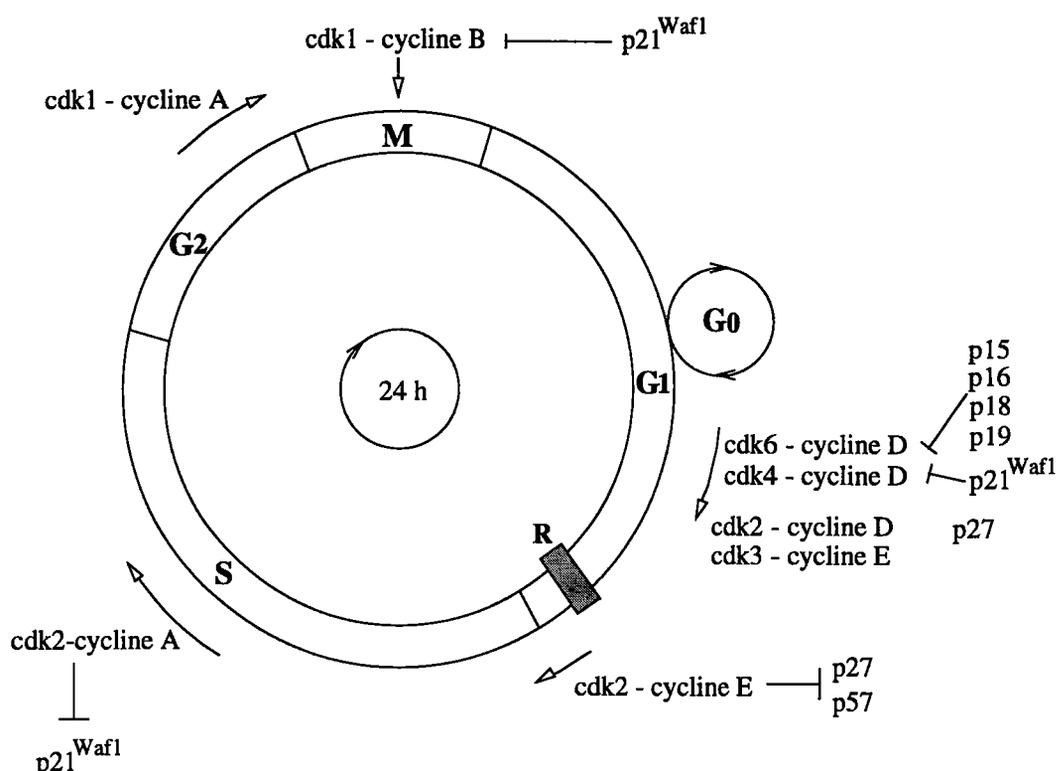


FIG. 1.1 – Contrôle du cycle cellulaire par les complexes cdk-cycline. R représente le point de restriction. La régulation négative de ces complexes est prise en charge par différentes protéines : p15, p16, p18, p19, p27, p57, p21^{Waf1}.

1.3 Généralités sur les bases moléculaires du cancer

La cellule peut, après avoir reçu des informations externes, soit rester dans un état de repos, soit se diviser pour former par mitose deux cellules filles ayant les mêmes caractéristiques morphologiques et physiologiques. La prolifération cellulaire est caractérisée par des alternances de mitose et de phases intermitotiques qui vont permettre la réplication de l'ADN et la distribution du message génétique dans deux cellules filles. Ces deux processus sont coordonnés au niveau du cycle cellulaire, lequel est soumis à des contrôles intrinsèques garantissant que chaque événement important du cycle est bien achevé avant que les événements suivants ne commencent (cf figure 1.1).

Les points de contrôle du cycle cellulaire sont régulés par des complexes protéiques, formés d'une sous-unité enzymatique (cyclin-dépendant kinase) et d'une

sous-unité régulatrice appelée cycline. L'activation d'une cdk dépend d'une part, de son association à une cycline, dont la quantité varie au cours du cycle et d'autre part, de réactions de phosphorylation-déphosphorylation. Les cellules de mammifères disposent de 7 cdks et de 8 Cyclines intervenant à différents moments du cycle cellulaire.

La cellule est souvent exposée à des agressions exogènes ou endogènes qui vont perturber le bon déroulement du cycle cellulaire. Les perturbations majeures vont se localiser au niveau de la réplication (mutations, délétions ..) et de la division (mauvaise distribution des chromosomes dans les deux cellules filles, et/ou fragmentation des chromosomes). Aussi la cellule est en mesure de développer des systèmes réagissant à ces agressions, en induisant le blocage du cycle, la réparation et en dernier lieu l'apoptose. Pour déclencher cette réponse, la cellule utilise des voies de signalisation et des systèmes de détection de lésions. Le dysfonctionnement de ces voies peut contribuer à la cancérogenèse, via une instabilité génétique.

Les gènes impliqués dans cette réponse cellulaire peuvent être la cible d'altérations génétiques dans les cancers et font partie des trois classes majeurs des gènes impliqués dans la cancérogenèse : les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur et les gènes impliqués dans la surveillance du génôme.

Sous l'appellation de proto-oncogènes sont regroupés les gènes dont les protéines font partie intégrante de la chaîne d'événements qui à partir d'un stimulus extérieur, conduisent la cellule à se multiplier et/ou à se différencier. Il s'agit de facteurs de croissance, de récepteurs transmembranaires, du système de transduction et des facteurs de transcription. L'activation de proto-oncogènes en oncogènes résulte d'amplifications, de réarrangement structuraux ou de dérégulations de l'expression par translocations chromosomiques ou par des mutations ponctuelles. Dans d'autres cas en l'absence d'altérations génétiques, les produits de ces gènes peuvent intervenir secondairement dans la progression tumorale à la suite de dérèglements initiaux causés par l'altération d'autres molécules.

Les gènes suppresseurs de tumeurs agissent comme des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire. Lorsque ces gènes subissent des altérations génétiques, on observe l'inactivation voire l'absence de la protéine conduisant à une perte de fonction. Ils favorisent l'apoptose.

La régulation de l'apoptose est un phénomène important dans le développement du cancer. L'apoptose est un mode ubiquitaire de mort cellulaire qui est activé pour éliminer sélectivement les cellules indésirables (sénescents, endom-

magées, étrangères dans un environnement donné). Une résistance inappropriée de quelques cellules à la mort par apoptose peut produire l'émergence d'une population cellulaire avec un potentiel de survie anormalement élevé. L'apoptose est régulée par de multiples voies qui interagissent les unes avec les autres en faisant intervenir des facteurs pro- et anti-apoptotiques. Parmi les gènes impliqués, on trouve des oncogènes et des gènes supresseurs de tumeurs. Par exemple p53 favorise la mort cellulaire alors que bcl2 protège la cellule de l'apoptose.

Enfin, les altérations des gènes de réparation joueraient un rôle important en favorisant l'accumulation des dommages génomiques au sein des gènes indispensables à la régulation de la division cellulaire. C'est le cas des gènes hNSH2 et hMLH1 qui sont à l'origine d'un syndrome (syndrome de Lynch) caractérisé par une prédisposition génétique au cancer colorectal familial non polyposique.

Les différentes classes de gènes dont les altérations sont impliquées dans la cancérogenèse codent fréquemment pour des protéines possédant de multiples fonctions qui agissent de concert dans le maintien de la stabilité génétique d'une population cellulaire, en formant des réseaux interdépendants. Les processus tumoraux restent complexes. La multiplicité des facteurs étiologiques et l'origine tissulaire de la tumeur font que les lésions cellulaires et moléculaires diffèrent d'un cancer à l'autre.

1.4 Métabolisme des carcinogènes chimiques

La majorité des produits chimiques toxiques et cancérogènes de l'environnement sont hydrophobes. Aussi, les êtres vivants sont dotés de systèmes enzymatiques capables de métaboliser et d'éliminer ces xénobiotiques en dérivés stables plus polaires. Deux types de réactions enzymatiques sont mis en jeu. Les enzymes de la phase I, principalement représentées par les cytochromes P450, réalisent une fonctionnalisation (hydroxylation, oxydation, époxydation, réduction). Cette première étape permet l'addition secondaire d'une molécule telle que l'acide glucuronique, le glutathion et les sulfates, par des enzymes dites de conjugaison (par exemple les glutathion-S-transférases). Le conjugué ainsi obtenu, très soluble dans l'eau est désormais éliminable dans les urines et/ou dans la bile. L'existence d'une multitude formes de cytochromes P450 et l'inductibilité de certains d'entre eux améliorent considérablement les performances de ce système. Cependant ce système présente un revers. Au lieu d'être transformées en dérivés stables, les substances chimiques peuvent être activées en un métabolite ultime capable de

réagir rapidement avec divers sites nucléophiles et de créer par conséquent des altérations cellulaires.

1.5 Les cytochromes P450

La phase I de métabolisation regroupe un ensemble d'enzymes, parmi lesquels les cytochromes P450 jouent un premier rôle. Ces enzymes ont suscité l'intérêt de nombreuses études en cancérogenèse chimique, pour plusieurs raisons :

- ce sont les premiers systèmes intervenant dans la détoxification ou l'activation d'un xénobiotique,
- la présence de ces enzymes dans la plupart des êtres vivants et la multiplicité de leurs expressions (propriétés catalytiques et régulation) permet de développer des modèles permettant d'évaluer leur contribution à la cancérogenèse chimique,
- l'existence de polymorphismes génétiques acquis ou innés peut constituer les bases d'une susceptibilité individuelle au cancer [Gonzalez and Gelboin, 1993].

1.5.1 Structure et rôle des cytochromes P450

Le cytochrome P450 appartient à un système multienzymatique où interviennent plusieurs constituants d'une chaîne de transport d'électrons. Ce système est appelé monooxygénase à cytochrome P450. Il comprend :

- une hémoprotéine de 45000 à 55000 Daltons : le cytochrome P450. Il est constitué d'une partie hémique où le fer est relié à une cystéine proche de la partie C-terminale de l'apoprotéine. Cette partie est commune à tous les P450. La protéine qui est différente d'un P450 à l'autre, est insérée dans la membrane du réticulum endoplasmique par un peptide N-terminal.
- une réductase : la NADPH-cytochrome P450 réductase : il s'agit d'une flavoprotéine contenant deux cofacteurs flaviniques, la flavine adénine dinucléotide (site d'entrée de l'électron) et la flavine mononucléotide (site donneur d'électron).
- les phospholipides membranaires assurant la cohésion du système.

La principale fonction du P450 est de catalyser une réaction de monooxydation [Guengerich, 1991]. Il est le site où le substrat et les électrons, provenant du NADPH et de l'oxygène moléculaire, interagissent entre eux avec pour résultat l'activation et l'insertion d'un atome d'oxygène dans le substrat.

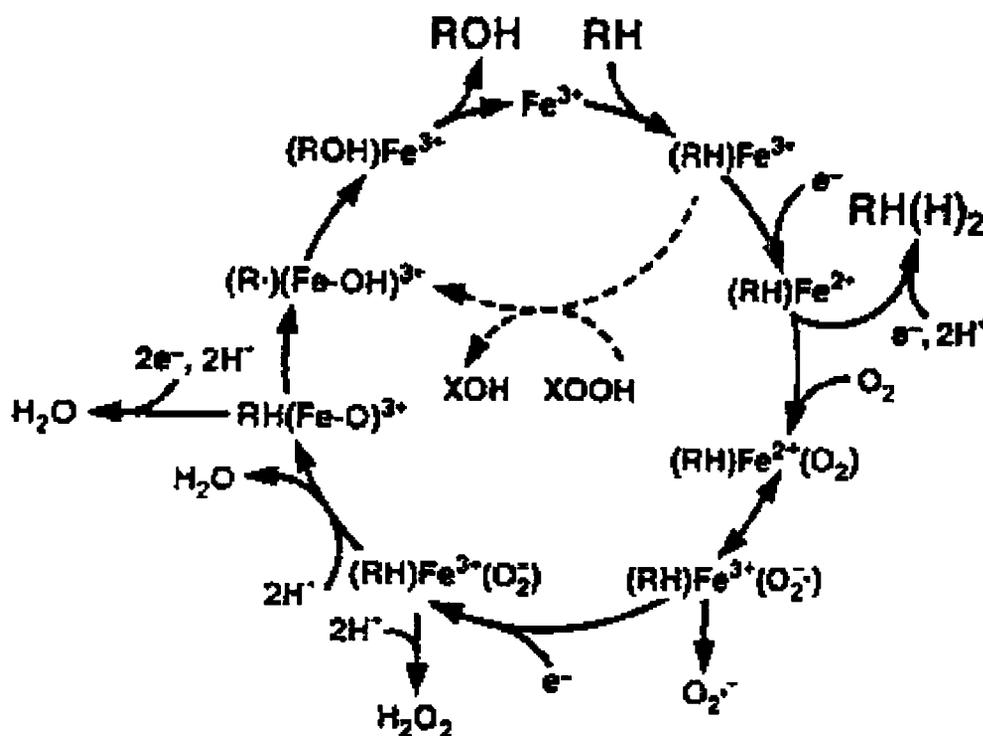


FIG. 1.2 – Cycle catalytique du cytochrome P450. Fe représente l'atome de fer de l'hémoprotéine, RH(H₂) le produit de la réduction du substrat, ROH le produit de la monooxygénation et XOOH le produit peroxydé devenant un donneur d'oxygène potentiel [Porter and Coon, 1991]

La multiplicité des cytochromes P450 est le reflet des différentes affinités existantes envers plusieurs substrats [Gonzalez, 1992]. D'une façon générale, les cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme de substances endogènes (stéroïdes, leucotriènes, prostaglandines, ...) sont très spécifiques alors que ceux intervenant dans le métabolisme des xénobiotiques le sont moins.

1.5.2 Nomenclature des P450

Face à la multiplicité des cytochromes P450, la purification et le clonage des différents isoformes ont permis de définir une nomenclature internationale fon-

dée sur des similitudes de séquences des ADNc. L'homologie de structure des P450 dans les différentes familles laissent supposer une évolution à partir d'un seul gène ancestral commun. Les gènes les moins évolués sont impliqués dans le métabolisme de molécules endogènes et s'expriment de façon constitutive. En revanche les gènes les plus récents et de loin les plus nombreux, interviennent dans le métabolisme des xénobiotiques et s'expriment de manière inductible. A l'heure actuelle, 221 gènes de P450 et 12 pseudogènes ont été caractérisés et regroupés en familles et sous-familles[Nelson et al., 1993].

Par définition, tout gène de cytochrome P450 est indiqué par le préfixe *CYP* (*Cyp* chez la souris). La famille est désignée par le premier chiffre arabe. Elle regroupe les les protéines présentant une homologie de séquence d'acides aminés de plus de 40%. Les sous-familles sont indiquées par une lettre majuscule (minuscule chez la souris) et regroupent les protéines ayant une homologie de structure primaire supérieure à 55%. Enfin, les gènes des cytochromes P450 appartenant à la même sous-famille mais ayant une propre séquence nucléotidique sont signalés par un chiffre arabe. Par exemple le *CYP2E1* induit par l'éthanol appartient à la famille 2 et sous-famille E.

1.5.3 Régulation de l'expression des P450

Chez les mammifères les niveaux d'expression des cytochromes P450 sont variables selon l'espèce, l'individu ou l'organe considéré. Ils sont présents dans la plupart des tissus avec toutefois une majorité exprimée dans le foie. Au sein même de l'organe où coexistent différents types cellulaires, une variation de concentration cellulaire des P450 peut apparaître [Beaune, 1993]. Chaque organe possède alors un patrimoine isoenzymatique propre. Les cytochromes P450 sont présents sous forme constitutive ou inductible. Il est à noter que l'inductibilité des cytochromes P450 par un stress chimique constitue une adaptation permettant une détoxification plus efficace.

Les mécanismes de régulation des P450 sont très complexes. Ils mettent en jeu des substances exogènes et endogènes qui vont à la fois jouer sur l'induction et la répression des P450. Les mécanismes moléculaires de l'induction ont largement été documentés. Elle peut résulter d'une stimulation transcriptionnelle, une maturation des pré-messagers, une stabilisation des ARNm, une stimulation de la traduction ou une stabilisation de la protéine.

La répression de la synthèse des cytochromes P450 est moins bien explo-

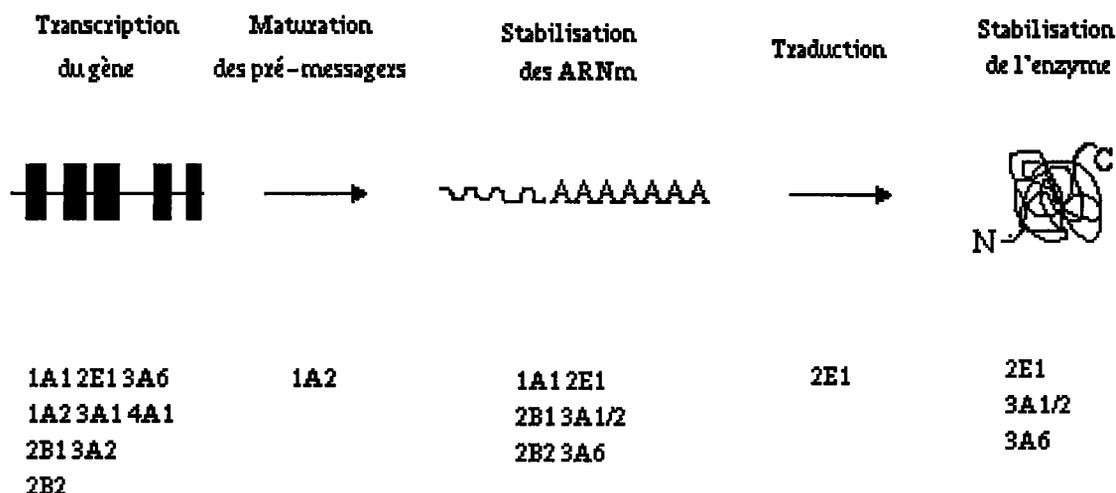


FIG. 1.3 – Régulation des cytochromes P450 inductibles [Porter and Coon, 1991]

rée. Elle peut se manifester au niveau transcriptionnel sous l'action de molécules telles que les cytokines [Wright and Morgan, 1991], au niveau traductionnel et au niveau de la protéine par une inhibition de la synthèse de l'hème (action des ions métalliques) ou par une modification de la stabilité par phosphorylation [Batt et al., 1993].

Il existe des différences entre individus dans la capacité à métaboliser les substances exogènes. Elles peuvent être liées à leur environnement, à leurs conditions physiopathologiques (espèces, sexes, âge, diabète, jeûne, ...) ou à un polymorphisme génétique. De nombreuses études ont mis en évidence une relation entre un polymorphisme génétique des cytochromes P450 et une susceptibilité individuelle à un cancérigène donné. Les polymorphismes génotypiques sont associés à un phénotype altéré qui se caractérise soit par une absence du produit génique, soit par une modification de l'expression de l'enzyme. En général, lorsqu'il survient dans une région codante d'un *CYP* la spécificité de l'enzyme vis à vis du substrat est affectée. Par contre lorsqu'il se localise dans la région régulatrice du gène, le niveau d'expression enzymatique est perturbé. Par exemple, parmi les polymorphismes de site de restriction décrits pour le gène *CYP1A1*, le polymorphisme *MspI*, caractérisé par une substitution d'un acide aminé dans la région active du gène, code pour une protéine ayant une activité HAP hydroxylase beaucoup plus élevée que celle de la protéine native. Ce polymorphisme a été relié avec le cancer des poumons chez les populations asiatiques [Kawajiri et al., 1993]. Le

polymorphisme du gène codant pour la débrisoquine hydroxylase, le *CYP2D6*, est de type autosomal récessif et s'exprime par une absence de protéine 2D6 [Gonzalez et al., 1988]. Les phénotypes métaboliseurs lents et métaboliseurs rapides ont été associés avec l'apparition des cancers des poumons, du foie, des reins et de la vessie [Wolf et al., 1994].

1.5.4 Principales familles des P450 humains impliqués dans le métabolisme des carcinogènes chimiques

Parmi les 36 familles de gènes de cytochromes, 12 ont été identifiées chez les mammifères. Chez l'homme quatre familles géniques 1-4, contiennent les enzymes impliqués dans le métabolisme des substances exogènes, cf. tableau1.1

La famille CYP1 regroupe les deux isoenzymes issus de gènes CYP1A1 et CYP1A2 dont l'homologie est très forte. Ils seraient impliqués dans l'activation de plus de 90% de carcinogènes [Ioannides and Parke, 1990]. Ils sont inductibles par les hydrocarbures aromatiques polycycliques dont les principaux candidats sont le méthyl-3-cholanthrène et la dioxine TCDD (2, 3, 7, 8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine). Le CYP1A1 métabolise les HAP, notamment le benzo(a)pyrène. Il est exprimé principalement dans les tissus extrahépatiques, surtout après induction. Le CYP1A2 est impliqué dans l'oxydation des arylamines, des arylacétamides et dans la N-déméthylation en 3 de la caféine. Il est exprimé constitutivement dans le foie à des taux très variables. Il est également inductible par des produits alimentaires, tels les dérivés du tryptophane des grillades ou des dérivés indolés des végétaux crucifères. Cette famille comprend également le CYP1B. Il métabolise essentiellement les HPA. Il est exprimé dans plusieurs tissus extrahépatiques (rein, poumon, intestin, colon thymus, utérus, ...) et est inductible par des antifongiques, la quinidine.

La famille CYP2 est très vaste. Elle comprend chez l'homme six sous-familles dont la sous-famille C regroupant à elle seule de nombreux isoformes. Les principaux isoenzymes étudiés dans le métabolisme des xénobiotiques figurent dans le tableau1.1. Ces isoenzymes oxydent des substances très variées notamment des procancérigènes (amines aromatiques, nitrosamines, stéroïdes, aflatoxines, ...). Elles sont présentes dans de nombreux tissus. L'expression des gènes de cytochromes P450 de la famille 2 est régulée par des hormones et un grand nombre de substances exogènes (phénobarbital, alcool, pyrazole, acétone, ...).

Les représentants de la famille CYP3 sont de loin les plus exprimés chez

P450	Carcinogen/toxin
CYP1A1	Benzo(a)pyrene, diméthylbenz(a)anthracene, 6-nitrochrysene
CYP1A2	2-Aminofluorene, 2-acetylaminofluorene, aflatoxin B1, 2-amino-3-méthylimidazo[4,5f] quinoline(IQ), 2-amino-3,8-diméthylimidazo[4,5f]quinoline(MeIQ), 2-amino-3,8-diméthylimidazo[4,5f]-quinoxaline(MeIQ _x), 2-amino-3,4,8-triméthylimidazo[4,5f]quinoxaline(DiMeIQ _x), 2-amino-6-méthyl-dipyrido[1,2-a:3',2'-d] imidazole (Glu P-2), 3-amino-1,4-diméthyl-5H-pyridol[4,3-b] indole (Trp P-1), 3-amino-1-méthyl-5H-pyrido[4,3-b] indole (Trp P-2), 2-amino-1-méthyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine (PhIp), 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), 6-nitrochrysene
CYP2A6	Aflatoxin B ₁ , N-nitrosodiethylamine, NNK
CYP2B6	6-Aminochrysene
CYP2C8,	none known
9, 19	
CYP2D6	NNK
CYP2E1	Acetaminophene, acrylonitrile, benzene, carbon tetrachloride, chloroform, 1,2-dichloropropane, ethyl carbanate, ethylene dibromide, ethylene dichloride, méthyl chloride, méthylene chloride, N-nitrosodiethylamine, styrene, vinyl carbamate, vinyl bromide, vinyl chloride, 1,1,1-trichloroéthane, trichloréthylène
CYP2F1	none known
CYP3A4	Aflatoxin B1, aflatoxin G1, 6-aminochrysene, benzo(a)pyrene-7,8 diol, 6-nitrochrysene, 1-nitropyrene, tris-(2,3-dibromopropyl) phosphate, sterigmatocystin, serecionine
CYP4A11	none known
CYP4B1	none known

TAB. 1.1 – *Cancérogènes métabolisés par les cytochromes P450 humains [Gonzalez and Gelboin, 1994]*

l'homme [Gonzalez and Gelboin, 1993]. Les principaux isoenzymes sont les CYP3A3, CYP3A4. qui ne diffèrent que de 11 acides aminés et dont les propriétés catalytiques sont sensiblement identiques. Le CYP3A5 est exprimé minoritairement et le CYP3A7 est une forme fœtale de cette sous-famille. Les CYP3A3/4 catalysent le métabolisme de nombreux composés chimiques, médicaments, pré-cancérogènes (aflatoxines, benzo(a)pyrene-7,8 diol,1-nitropyrene, ...). Quantitativement ils représentent 50 pour cent des P450 hépatiques totaux [Beaune, 1993] et sont présents dans de nombreux tissus. Ils peuvent être induit par les glucocorticoïdes, les biphényles polychlorés, les antibiotiques de type macrolide, le phénobarbital, ...

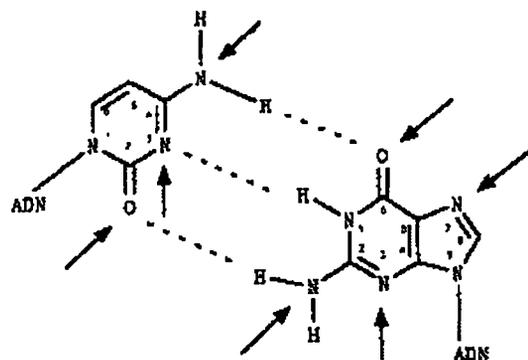
Les membres de la famille CYP4 sont impliqués dans le métabolisme des acides gras et des prostaglandines. Le CYP4A11 a été identifié dans le rein et le CYP4B1 dans le poumon. Ils sont inductibles par des agents hypolipidémiantes tels que le clofibrate.

1.6 Formation des adduits à l'ADN

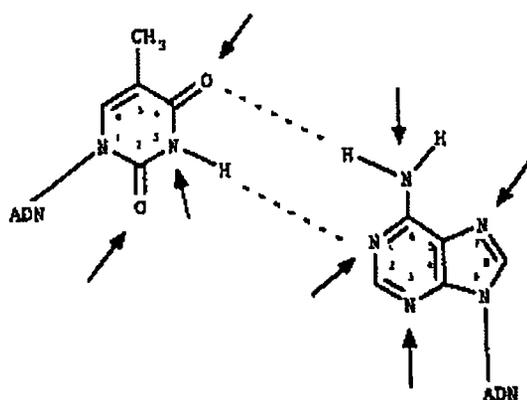
Le caractère commun aux diverses classes de cancérogènes est la formation soit directement soit après activation métabolique, des dérivés électrophiles. Déficients en électrons, ils acquièrent la propriété de se lier de façon covalente à des sites nucléophiles (riches en électrons) des macromolécules cellulaires comme l'ADN, cible critique des cancérogènes [Miller and Miller, 1981]. Les zones riches en électrons (N, O, S ou C) sont particulièrement localisées au niveau N-1, N-3 et N-7 de l'adénine, N-3, N-7 et O⁶ de la guanine, N-3, O² de la cytosine, N-3, O⁴, O² de la thymine, ainsi qu'au niveau des groupements phosphates 1.4.

Les agents alkylants qui constituent un important groupe de mutagènes et de cancérogènes, forment des adduits avec l'ADN principalement au niveau N-7 et O⁶ de la guanine, N-3 de l'adénine et au niveau de l'oxygène des liaisons phosphodiesteres. Les proportions relatives des différents adduits sont déterminées par la sélectivité nucléophile de l'agent alkylant considéré [Lawley and Warren, 1976]. Ainsi les agents de forte sélectivité nucléophile réagissent essentiellement avec les atomes d'azote de l'ADN par un mécanisme de substitution nucléophile bimoléculaire. Les agents de faible sélectivité réagissent avec les atomes d'oxygène par un mécanisme de substitution d'ordre 1 voire d'ordre 2. Ces réactivités particulières conditionnent leur pouvoir mutagène et cancérogène.

Au niveau subcellulaire, la distribution des adduits n'est pas aléatoire dans



Cytosine - guanine



Thymine - adénine

FIG. 1.4 - Sites de réaction des cancérogènes sur les bases de l'ADN
[Miller and Miller, 1981]

l'ADN. Par exemple, le potentiel de fixation d'un cancérogène, comme le N-hydroxy-acétylamino-2-fluorène serait influencé par la conformation (forme B ou Z) de l'ADN *in vitro* [Rio and Leng, 1983]. L'accessibilité de l'ADN à l'éthyl-nitrosourée dépend également de l'organisation spatiale de la chromatine *in vivo* [Nehls and Rajwesky, 1985]. La séquence nucléotidique environnant la base cible (triplets GGN) peut conditionner le profil d'alkylation d'un cancérogène.

1.7 Réponse cellulaire aux dommages à l'ADN

1.7.1 Généralités

L'intégrité du matériel génétique contenu dans une cellule vivante est continuellement remise en cause par une variété d'agents génotoxiques d'origine exogène ou endogène. Aussi, avant que les altérations génomiques induites par la présence des adduits ne deviennent des lésions potentiellement oncogéniques, la cellule est en mesure de répondre grâce à des systèmes qui vont relier les trois phénomènes: le blocage du cycle, l'induction de la réparation et l'apoptose. En effet, il existe une voie de signalisation dans la réponse cellulaire aux dommages génétiques qui permet le blocage de la cellule en phase G1 et ou en phase G2 indépendante des systèmes de contrôle classiques. Ces points de contrôle donnent l'opportunité à la cellule de réparer les lésions produites et de s'engager en dernier lieu dans un processus de mort par apoptose. La perte de ces points de contrôles entraîne une instabilité génétique [Elledge, 1997]. Le gène suppresseur de tumeurs *p53* et le gène *ATM* interviendraient dans une des voies de signalisation. La voie de transmission du signal depuis la détection des dommages dans l'ADN à l'arrêt du cycle en phase G1 et G2 est mal connue [Kaufmann and Paules, 1996].

1.7.2 Le gène *ATM*

La relation entre le gène *ATM* et la cancérogenèse est récente. Elle est l'objet de nombreuses recherches au cours desquelles le rôle de ce gène dans la réponse cellulaire aux génotoxiques et la relation génotype -phénotype sont actuellement étudiés.

L'ataxie-télangiectasie (AT) est une maladie autosomique récessive caractérisée par une sensibilité particulière aux radiations ionisantes. Dans les familles

atteintes par cette maladie, les hétérozygotes ont une probabilité plus grande que la population générale de développer des lymphomes et des cancers du sein chez la femme jeune. L'irradiation des cellules AT s'accompagne d'une dérégulation du cycle cellulaire au niveau des points de contrôle autorisant l'entrée en phase S, en phase M et au niveau de la progression dans la phase S. Elle induit de nombreuses anomalies chromosomiques et une entrée massive en apoptose. Cette observation a été rapprochée avec l'absence ou le retard d'induction de p53 et de l'expression du gène *gadd45*. L'implication de la protéine ATM dans la réponse cellulaire à un stress génotoxiques est renforcée par la découverte récente de l'existence d'une interaction avec le gène *c-Abl*. Les cellules AT seraient également incapables de réguler correctement le stress oxydatif [Rodriguez and Theillet, 1997].

Le gène *ATM* code pour une phosphoprotéine nucléaire de 350kDa qui possède dans sa partie C-terminale une séquence apparentée au domaine catalytique d'une phosphatidyl-inositol-3'kinase. La PI3 est une protéine submembranaire intervenant dans la transduction des signaux mitotiques. La protéine ATM présente des similitudes fonctionnelle et structurale avec des protéines possédant également des régions analogues au domaine fonctionnel de la PI, pour qui une implication dans la signalisation des dommages à l'ADN, la régulation du cycle cellulaire et la stabilité mitotique et méiotique a déjà été décrite [Satvitsky et al., 1995]. Un autre fait remarquable est la relation entre les mutations dominantes du gène et l'inactivation ou la perte du domaine PI3 [Rodriguez and Theillet, 1997].

1.7.3 Le gène *p53*

La protéine p53 est induite dans la réponse cellulaire aux agents génotoxiques . Elle est surnommée " gardien du génôme ", car par ses fonctions multiples, elle prévient la survenue des altérations génomiques. Elle participe au contrôle de la prolifération des cellules initiées, soit en induisant l'arrêt du cycle cellulaire, soit en favorisant le suicide par apoptose des cellules comportant de nombreuses altérations génétiques. La perte de ses fonctions contribue à l'instabilité génomique et permet la prolifération démesurée de cellules à haut potentiel oncogénique.

Structure et régulation de p53

La séquence primaire de la protéine de type sauvage est découpée en plusieurs domaines parmi lesquels figurent un domaine de fixation à l'ADN situé dans la

partie centrale (domaine de liaison à l'ADN), un domaine d'oligomérisation situé dans la région carboxy-terminale et un domaine de transactivation localisé dans la partie N-terminale (voir 1.5. Chaque domaine est assigné d'un rôle spécifique.

La région carboxy-terminale peut être divisée en deux portions : le domaine d'oligomérisation (résidu 320-360) qui permet la tétramérisation de la protéine sauvage et l'extrémité carboxy-terminale qui joue un rôle dans la régulation allostérique de la protéine c'est-à-dire la conversion de la forme latente vers la forme active de la protéine. La levée de son effet inhibiteur entraîne l'activation du domaine de fixation spécifique à l'ADN. Il est à noter que ce domaine est capable de se lier de manière non spécifique à l'ADN et de reconnaître directement les cassures, les mésappariements et les simples brins de l'ADN issus d'altérations.

Le domaine central (résidus 110 à 290) comporte des séquences nucléotidiques permettant à la protéine p53 de se lier à des séquences d'ADN spécifiques. Parmi les gènes cibles, il y a *p21^{Waf1}*, un inhibiteur de cyclines dépendantes-kinases impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire et *Bax1*, un inhibiteur de bcl-2 impliqué dans le contrôle de l'apoptose.

La partie amino-terminale contient un domaine de transactivation, capable de stimuler la transcription d'autres gènes dont les promoteurs contiennent des séquences qui lient p53. C'est le cas du complexe TFII impliqué dans la transcription, la réparation et le contrôle du cycle cellulaire.

Par sa conformation, p53 peut interagir avec d'autres protéines en offrant des sites d'accrochages [Hainaut, 1997], telles que mdm-2, qui agit comme un régulateur négatif de p53 en neutralisant sa capacité transactivatrice et en facilitant sa dégradation [Haupt et al., 1997], [Kubbutat et al., 1997].

Il est à noter que de nombreux gènes cibles de p53 ont été décrits *in vitro* [Ozturk and Soussi, 1994]. Il reste toutefois à prouver leur véritable implication *in vivo* dans les diverses voies de signalisation comportant p53 et à mesurer les réelles fonctions de p53 (car elles sont nombreuses) au sein de ces différentes interactions.

Les mécanismes régulant la protéine p53 à la suite de dommages à l'ADN ne sont pas encore connus. Cependant, lorsque la cellule est soumise à des agressions génotoxiques, on observe une surexpression de la protéine qui découlerait apparemment d'une stabilisation. Cette stabilisation pourrait être le résultat d'un changement conformationnelle de la protéine qui résulterait de mécanismes de régulation allostérique [Hupp and Lane, 1994]. Elle pourrait également être contrô-

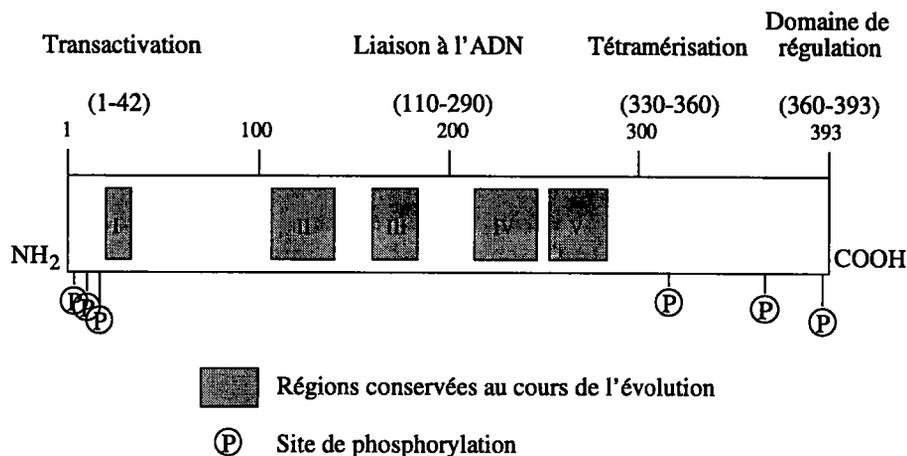


FIG. 1.5 – Domaines fonctionnels de p53. Les chiffres correspondent aux codons. Les sites de phosphorylation sont localisés aux codons 6, 15, 37, 315, 378 et 392.

lée par des mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation. En effet, p53 peut être soumise à des processus de phosphorylation dans les domaines N et C-terminaux par de multiples kinases, notamment les kinases cycline-dépendantes des phases S, G2 et M [Hansen and Oren, 1997] et par conséquent être activée à certaines étapes du cycle cellulaire. Il est possible que p53 puisse interagir avec des protéines stabilisatrices encore inconnues [Ruley, 1996]. Enfin, le groupe de P. Hainaut à Lyon a montré un changement de conformation en fonction des conditions d'oxydo-réduction et de la disponibilité du zinc [Verhaegh et al., 1997]. Bien que l'implication de ces différents mécanismes dans la régulation de p53 sauvage soit encore mal connue, la conformation de p53 semble influencer notablement les propriétés fonctionnelles de la protéine au sein de la cellule.

1.7.4 Contrôle du cycle cellulaire par p53

Un des rôles majeurs de p53 concerne son implication dans le contrôle de la prolifération cellulaire, par transactivation des gènes $p21^{Waf1}$, $Gadd45$ et cycline G [Ruley, 1996] cf figure 1.6.

Le gène $p21^{Waf1/Cip-1/Sdi-1}$ joue un rôle très important dans le blocage du cycle cellulaire en phase G1. La protéine $p21^{Waf1}$ inhibe les complexes cyclines-cdk ("cyclin dépendant kinase"). Ces complexes sont des assemblages de cdk, protéines constitutives, et de cyclines dont la synthèse est sous la dépendance de facteurs de croissance. Ils interviennent à plusieurs niveaux du cycle cellulaire. Le

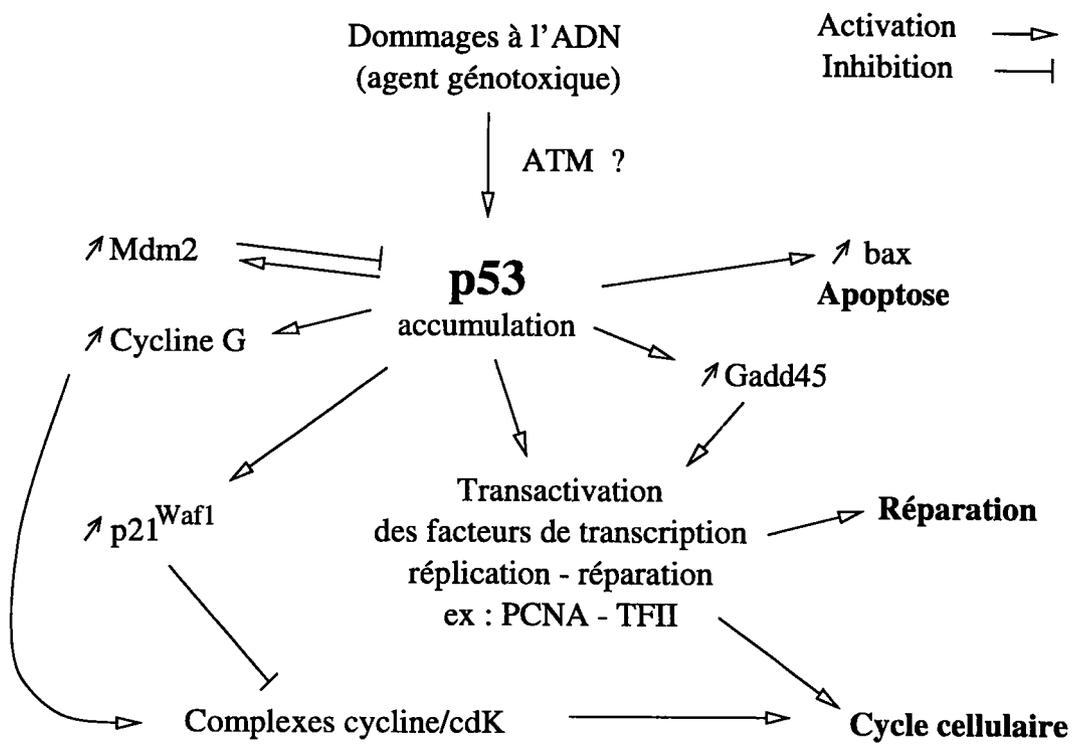


FIG. 1.6 – Implication des différents facteurs, via p53 dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN.

passage du point de restriction R est permis par le complexe cyclineD-cdk4/6 qui, en phosphorylant les protéines Rb ("retinoblastoma protein") lève le frein de la division cellulaire et permet la libération de facteurs de transcription, tel que E2F. Ce facteur interagit avec d'autres gènes codant pour des protéines indispensables à la division cellulaire (la DNA polymérase alpha, la dihydrofolate réductase, thymidine kinase, cdK1, cycline E, E2F lui-même). D'autres protéines p27, p15, et p16 contrôlent négativement les complexes cyclines-cdk. p21^{Waf1} interagit également avec un polypeptide intranucléaire lié à la prolifération cellulaire, le PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Ce polypeptide est un composé des complexes cdk et de la DNA polymérase alpha. Par cette interaction, p21^{Waf1} pourrait bloquer la réplication de l'ADN et participer à la réparation. Il est à noter que p53 est capable d'induire une stabilisation de la forme hypophosphorylée de pRb et de favoriser l'inhibition de la transcription par séquestration de E2F par pRB.

Le gène *Gadd45* code pour une protéine qui est capable de se lier avec PCNA, de stimuler la réparation par excision *in vitro* et inhiber l'entrée des cellules en phase S. L'induction de ce gène par p53 expliquerait la relation entre p53 et la réparation au niveau du point de contrôle G1-S.

Lors d'une lésion à l'ADN, la cycline G est induite via p53. Elle influencerait la progression du cycle cellulaire en modulant l'activité des kinases cyclines-dépendantes.

Parallèlement à l'activation de gènes suppresseurs de la prolifération cellulaire, p53 réprime la transcription de gènes qui facilitent la transformation maligne des cellules (oncogènes fos, c-jun, interleukine 6).

p53 contrôlerait le bon déroulement de la mitose (nombre centrosomes dupliqués, la ségrégation chromosomique). Elle serait ainsi impliquée dans le contrôle du fuseau et les arrêts du cycle en G2-M [Hansen and Oren, 1997].

1.7.5 p53 et réparation

p53 interagit avec les systèmes de réparation et de réplication soit directement grâce à son activité exonucléasique 3'-5', soit indirectement à travers la transactivation d'autres gènes (interaction avec l'hélicase ERCC2 et la protéine ERCC3 impliquées dans la réparation par excision, les sous-unités TAFII 31 et TAFII 70 du complexe de transcription TFII et PCNA). Par ces différentes interactions, p53 est donc en mesure d'intervenir dans la recombinaison, la réplication et la réparation de l'ADN [Hansen and Oren, 1997].

1.7.6 p53 et apoptose

Lorsque la stabilité génomique est mise en cause, la cellule s'engage en dernier lieu dans un processus suicidaire appelé communément apoptose. Plusieurs gènes agissent de concert pour initier ce programme [Harrington et al., 1994]. Les gènes *p53*, *bcl2/bax*, *c-myc* font parti des quelques gènes clés impliqués dans la régulation de l'apoptose. Leur importance relative et leur intervention dans le temps sont peu connues. Toutefois la perte de la fonction des produits de gènes suppresseurs de tumeurs *p53* et *Rb* ainsi que les voies régulatrices situées en aval et médiées par les gènes de la famille *bcl-2*, seraient déterminantes dans les mécanismes de la carcinogénèse.

Ainsi la protéine p53 dans son rôle de "chef d'orchestre" apparait indispensable au maintien de la stabilité génétique, cf figure 1.7. Elle induit l'expression simultanée de plusieurs gènes ainsi que sa propre expression. Elle contrôle l'intégrité de l'ADN de la cellule en veillant au bon déroulement des différentes étapes du cycle cellulaire et en participant aux mécanismes de réparation et de réplication. Nous comprenons donc qu'une altération dans le fonctionnement normal de la protéine p53 soit génératrice de désordres cellulaires.

1.7.7 Réparation des adduits de l'ADN

La cellule protège son génome des attaques électrophiles des xénobiotiques et des produits de la voie oxydative par séquestration de ces formes réactives grâce à l'intervention des enzymes telles que la glutathion-S-transférase ou superoxyde dismutase. Lorsque les adduits sont présents dans l'ADN, la cellule met alors en place des systèmes de réparation appropriés capables de restaurer le message génétique [Essigman and Wood, 1993]. L'intervention de ces systèmes de réparation va dépendre de l'espèce, de l'organe, de la cellule considérée mais également du type de lésions, de sa localisation dans le génome et de l'état fonctionnel de l'ADN au niveau du site [La and Swenberg, 1996]. Plusieurs systèmes de réparation ont été mis en évidence chez les procaryotes et chez les eucaryotes.

Réparation par transfert du groupement alkyl

Le transfert du groupement alkyl intervient dans la réparation des lésions prémutagènes O⁶-alkylguanine, par l'intermédiaire d'une protéine appelée O⁶-

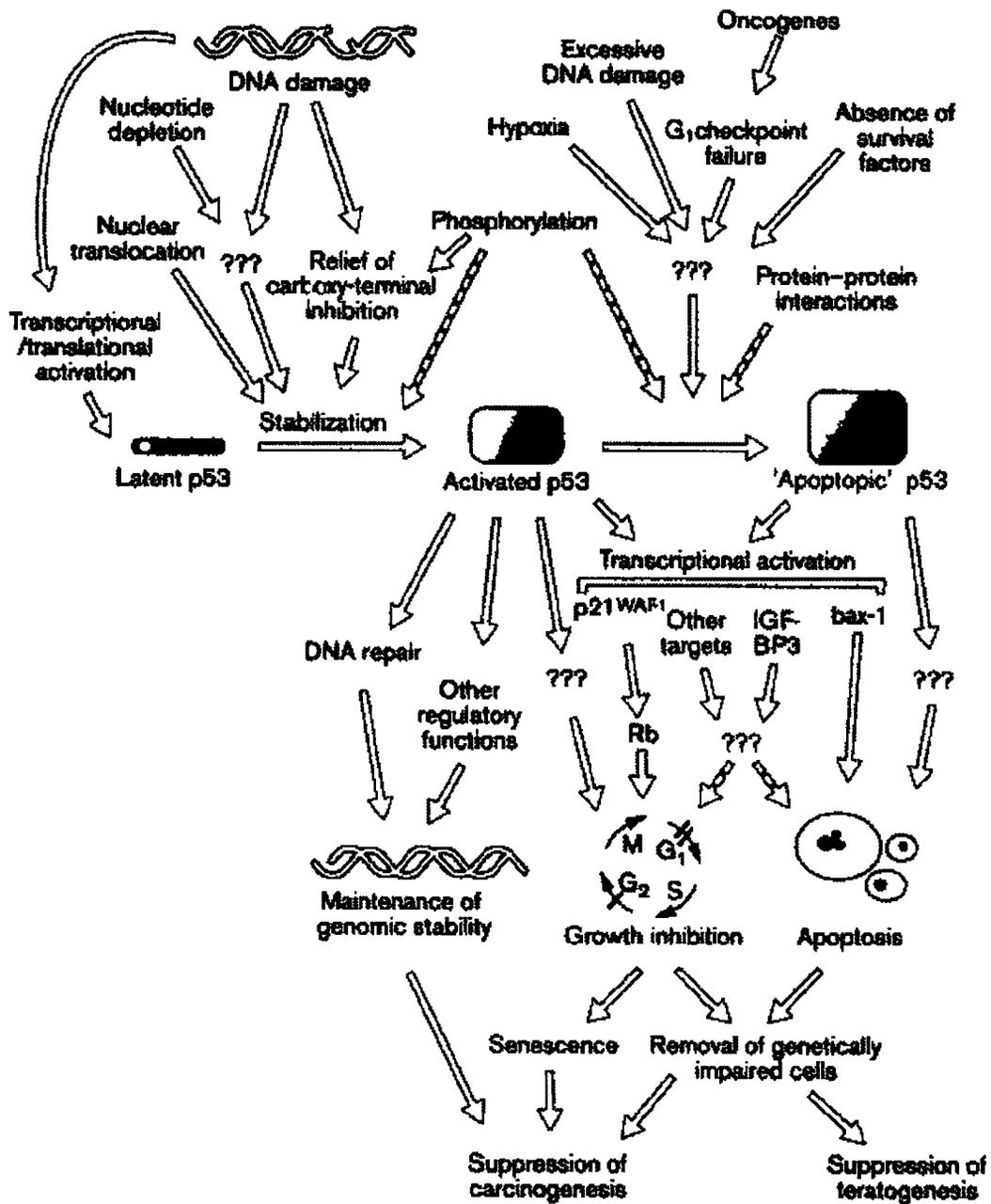


FIG. 1.7 - La protéine p53 dans son rôle de "chef d'orchestre" [Hansen and Oren, 1997]

alkylguanine-ADN-alkyltransférase. Cette enzyme s'approprie le groupement alkyl en le transférant sur l'un de ses propres acides aminés, la cystéine puis devient inactif. Comme le site accepteur "Cystéine" n'est pas réparé, le nombre d'O⁶-alkylguanine sera égal au nombre de molécules d'alkyltransférases actives. Le potentiel de réparation par ce mécanisme est donc restreint, cependant l'expression de la O⁶-alkylguanine-ADN-alkyltransférase peut être induite par exposition à de petites quantités d'agent alkylant [Lindahl, 1982], [Laval, 1991].

Réparation par excision-resynthèse

C'est un système peu spécifique. On différencie les réparations faisant intervenir l'excision d'une seule base, des mécanismes faisant intervenir l'excision d'un nucléotide.

Excision d'une base Les enzymes impliqués de façon prépondérante dans ce type de réparation sont les ADN-glycosylases. Une endonucléase assure la reconnaissance de la lésion sur l'ADN et l'incision du brin lésé, puis une glycosidase spécifique permet l'hydrolyse de la liaison glucosidique entre le sucre et la base incriminée pour conduire à la création d'un site apurique ou apyrimidique (Ap). Une Ap-endonucléase intervient alors en incisant la liaison sucre-phosphate, puis une exonucléase élimine le fragment du brin endommagé. Le brin intact sert de matrice pour la synthèse d'un nouveau fragment d'ADN, lequel est soudé par une ADN-ligase. Lorsque le nombre de lésions n'est pas important, ce système de réparation est prépondérant. Il opère avec un minimum d'erreurs (réparation fautive). Chez l'*Escherichia coli* il existe deux types d'ADN-glycosylases ; la 3-méthyladénine-ADN-glycosylase I, enzyme constitutif réparant spécifiquement la 3-méthyladénine et la 3-méthyladénine-ADN-glycosylase II, enzyme inductible dont la spécificité s'élargit à d'autres adduits (3-méthylguanine, 7-méthyladénine et 7-méthylguanine). Chez les mammifères, il n'existerait qu'un seul type d'ADN-glycosylase de faible spécificité de substrat [Gallagher and Brent, 1984] Grâce à ce système de réparation, il est possible de doser les bases excrétées dans l'urine (3-méthyladénine) [Bartsch, 1996].

Excision de nucléotides Ce système intervient dans la réparation des lésions de taille importante causées par des substances chimiques telles que les hydrocarbures aromatiques polycycliques, l'aflatoxine B1, cis-platine, ..., mais également par les UV. Ce système de réparation a bien été documentée chez la bactérie

[Sancar and Sancar, 1988]. L'endonucléase uvrABC reconnaît les régions plus ou moins déformées du squelette de la double hélice et coupe le brin de part et d'autre de la lésion. Avec l'intervention de l'hélicase II un fragment de 12 à 13 nucléotides est libéré. L'ADN polymérase I et la ligase interviennent comme précédemment pour achever la réparation [Sarasin, 1994]. Ce système est beaucoup plus complexe chez l'homme. Il est pris en charge par des protéines composées de plusieurs sous-unités qui sont impliquées à différents niveaux du processus de réparation depuis la reconnaissance des lésions sur l'ADN jusqu'à l'excision du fragment altéré. L'étude des pathologies (xeroderma pigmentosum, syndrome de Cockayne et trichothiodystrophie), consécutives à l'altération des gènes de réparation permet l'identification et la compréhension des système mis en jeu. On distingue deux voies de réparation selon que l'ADN est en cours de transcription ou non : les modèles GGR (global genome repair) et TCR (transcription-coupled repair) [Vermeulen et al., 1997].

Le système de réparation GGR comprend 3 étapes : reconnaissance et délimitation de la lésion, coupure et excision du brin altéré puis synthèse d'un nouveau fragment, le brin intact servant de matrice. La première étape fait intervenir la protéine XPA (xeroderma pigmentosum) qui est capable de reconnaître plusieurs types de lésions. Elle est indispensable à l'assemblage et à l'orientation du complexe d'excision qui regroupe la protéine de réplication A (RPA), ERCC1 (excision repair cross complementing) et le complexe TFIIH. Ce dernier contient les hélicases ERCC2 et ERCC3 agissant respectivement dans le sens 5', 3' et 3', 5'. La protéine RPA semble stabiliser les deux brins dissociés. Deux endonucléases spécifiques, ERCC1-XPF (incision en 5') et XPG (incision en 3') interviennent pour couper le fragment endommagé. La protéine RPA détermine les sites de coupures de XPF, généralement 22 nucléotides en amont de la lésion. La synthèse du nouveau brin est réalisée par l'ADN polymérase (et/ou (, assistée par le PCNA, la RPA, et le facteur de réplication C. Ce brin est ensuite soudé par l'ADN ligase I. Il semblerait que d'autres facteurs, encore mal connus, soient impliqués dans cette étape.

Ce système de réparation de l'ADN peut également intervenir pendant la transcription (modèle TCR). Ce système est initié par le blocage de l'ARN polymérase II au niveau des lésions induites par les UV. Deux protéines CSA et CSB (protéines impliquées dans le syndrome de Cockayne) reconnaîtraient l'ARN polymérase paralysée et mobiliseraient les protéines d'excision décrites dans le modèle précédent.

La réparation post-réplivative

Ce mécanisme intervient pendant la réplication de l'ADN. L'ADN-polymérase retrouve un site d'initiation au delà de la lésion. En face de la lésion persiste une brèche qui sera comblée par échange entre le brin parental intact et le brin fils porteur de la brèche. La nouvelle brèche ainsi créée n'est plus située en face d'une lésion et peut être réparée par intervention d'une ADN-polymérase puis d'une ligase [Moustacchi, 1982].

L'efficacité de la réparation de l'ADN est un élément déterminant de la phase d'initiation de la cancérogenèse chimio-induite. Elle peut parfois être déficiente et fautive et entraîner alors la persistance des altérations de la structure de l'ADN, leur accumulation.

1.8 Transformation des dommages à l'ADN en altérations stables du message génétique

1.8.1 Transformation des dommages à l'ADN au cours du cycle cellulaire

Le schéma 1.8 illustre les transformations structurales d'une altération de l'ADN causée par la liaison d'un métabolite du benzo(a)pyrène à l'azote N2 de la guanine, au cours du cycle cellulaire (triole N-2guanosyl benzo(a)pyrène). Cet adduit est reconnu et éliminé par le système de réparation par excision de nucléotide. Si ces adduits ne sont pas réparés, ils peuvent bloquer l'ARN polymérase II et provoquer la mort des cellules en interférant avec la synthèse de gènes essentiels [Kaufmann and Paules, 1996].

La réparation de ces adduits en phase G1 n'entraîne pas d'effets génotoxiques permanents. En phase S, s'ils ne sont pas excisés rapidement et sont rencontrés par la fourche de réplication, ils peuvent bloquer la synthèse de l'ADN, et provoquer des interruptions (GAP) dans le brin nouvellement synthétisé. Ces lésions sont généralement comblées par des systèmes de réparation post-réplivative fidèle ou infidèle qui peuvent induire à leur tour des mutations par substitution. Dans le cas d'une réparation inefficace, la cellule a la possibilité de convertir ces interruptions nucléotidiques en cassure double brin. Le mécanisme mis en jeu est encore inconnu. La dégradation pourrait être catalysée par une endonucléase qui

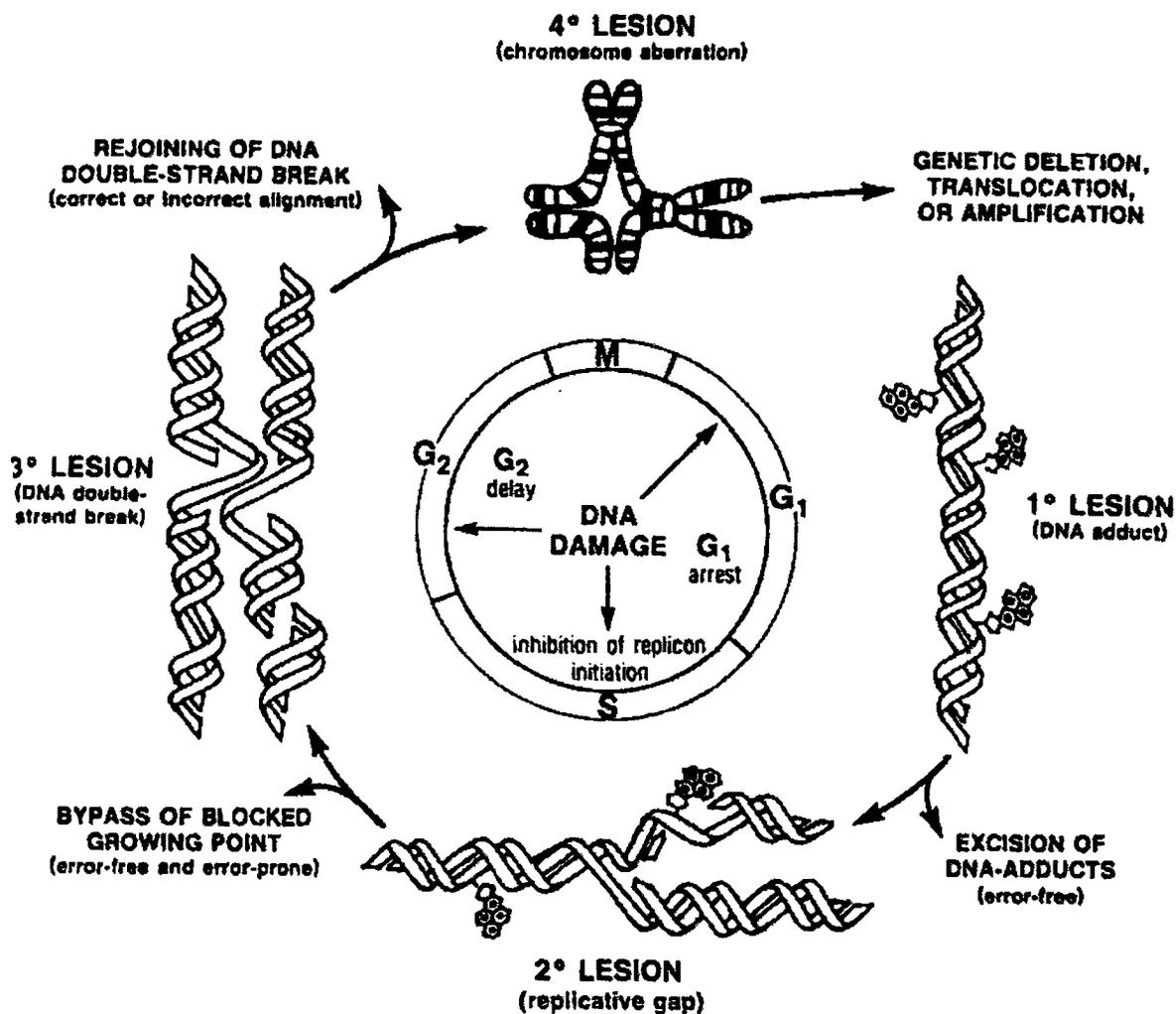


FIG. 1.8 – Transformation des lésions de l'ADN au cours du cycle cellulaire

reconnaît un brin unique d'ADN ou la jonction entre le simple et le double brin d'ADN au niveau de l'interruption. Une autre possibilité serait l'intervention d'une dépurination thermique suivie d'une attaque par une endonucléase sur le site abasique. Les cassures double brins peuvent provenir de la présence d'un seul adduit dans un réplicon actif, qui de par sa conformation peut bloquer l'élongation et former des interruptions. Cet adduit du B(a)p est également capable d'induire des aberrations chromosomiques de type chromatidien réplication-dépendante. A ce niveau du cycle la cellule peut réparer correctement les cassures double-brin par recombinaison. Mais elle peut combler ces dommages avec induction d'altérations génétiques. En effet, des recombinaisons illégitimes peuvent être créées par des microdélétions induites lors de l'élimination de quelques bases avant la ligation. La jonction erronée des extrémités libres des deux fragments double-brin occasionne des échanges inter ou intrachromatidiens. Des chromatides dicentriques ainsi générées peuvent casser au cours de l'anaphase lors du mouvement des centromères vers les pôles opposés du fuseau mitotique. Les cellules filles en phase G1 détiennent alors dans leur patrimoine génétique des cassures qui le cas échéant peuvent induire un blocage de la croissance.

L'exemple de ces adduits montre bien que la présence d'une seule lésion dans le génome, si elle n'est pas réparée avant la phase S, occasionne une cascade de dommages génétiques qui peuvent s'amplifier au cours du cycle et devenir délétères pour la cellule.

1.8.2 Influence de l'efficacité de réparation et de la prolifération cellulaire d'un tissu

Il existe une hétérogénéité de la formation des adduits au niveau de l'espèce, de l'organe et de la cellule considérée [La and Swenberg, 1996]. Elle est liée à la concentration du génotoxique dans l'environnement, à sa pénétration dans l'organisme et à l'expression des enzymes responsables de son métabolisme au sein du tissu cible. L'efficacité des systèmes de réparation ainsi que l'activité mitogène varient d'un tissu à l'autre. Ils vont conditionner l'installation des altérations génétiques au sein du tissu cible et par conséquent favoriseraient la transformation de lésions non néoplasiques vers un état tumoral. Par exemple, Swenberg [Swenberg et al., 1982] constate dans des foies de rat après un traitement à la diméthyl hydrazine, agent alkylant capable d'induire des angiosarcomes du foie, un rapport d'O⁶-méthylguanine et de 7-méthylguanine cinquante fois plus élevé dans les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer que dans les hépatocytes.

Cette différence est liée à un taux d'O⁶-méthylguanine-ADN-méthyltransférase plus important dans les hépatocytes. L'activité mitotique d'un tissu peut jouer un rôle dans l'organotropisme des effets du génotoxique. Une exposition à la diméthylhydrazine révèle des concentrations d'O⁶-méthylguanine plus élevées dans le foie que dans le colon chez le rat, alors que les tumeurs sont localisées essentiellement au niveau du colon. Cette différence serait due au fait que la réplication cellulaire au niveau du colon est plus importante qu'au niveau du foie [Ciroussel et al., 1990]. Une exposition à la N-méthylbenzylnitrosamine entraîne une accumulation d'O⁶-méthylguanine et de 7-méthylguanine dans les cellules glandulaires et épithéliales de la cavité nasale des rats. Ce phénomène est probablement dû à leur faible capacité à réparer ces adduits et à un faible taux de prolifération cellulaire. [Benthem et al., 1992].

1.8.3 Mutations induites par les adduits de l'ADN

Au cours d'études *in vitro* l'induction d'activités mutagènes par des adduits présents dans des génomes de levures et de plasmide a pu être mise en évidence [Essigman and Wood, 1993]. Le contexte moléculaire et tissulaire dans lequel se forme l'adduit, la nature des systèmes de réparation vont conditionner le type de mutation induite.

Les produits d'alkylation au niveau des oxygènes O⁶ de la guanine, O² et O⁴ de la thymine peuvent induire respectivement des mutations GC → AT, AT → GC et AT → TA. L'apparition et la persistance de ces lésions dans l'ADN a été corrélée avec les effets mutagènes et cancérogènes de ces adduits [La and Swenberg, 1996].

La N-7alkylguanine n'est pas mutagène en elle-même. La lésion en N-7 de la guanine par l'aflatoxine induisant des transversions GC → TA est un cas particulier [La and Swenberg, 1996]. La N-7alkylguanine peut toutefois être impliquée indirectement dans la mutagénèse par la formation de sites apuriques générés par son instabilité ou par sa réparation. Outre les mutations par substitution de paire de bases, certains composés chimiques peuvent induire des mutations par décalage du cadre de lecture en modifiant la conformation de l'ADN. C'est le cas des produits aromatiques polycycliques. Par exemple l'oxide 9, 10-dihydrodiol-7, 8 benzo[a]pyrène, en se liant avec la N-7 de la guanine serait responsable de l'apparition de mutations par substitution de paire de bases (GC → AT, GC → TA ou GC → CG), mais également de mutations par décalage du cadre de lecture.

Toute lésion ne conduit pas nécessairement à une mutation. En effet, les adduits comme les 3-alkylpurines ou les O²-alkylpyrimidiques peuvent entraîner la mort cellulaire en bloquant l'ADN-polymérase [Karran and Lindahl, 1985]. Leur cytotoxicité est liée à la présence du groupement alkyle dans le petit sillon de la double hélice.

La formation d'adduit en position 7 de la guanine fragilise la liaison glycosique du nucléotide qui après rupture peut générer un site apurique, prémutagène dans l'ADN. L'alkylation en position 7 de la guanine favorise également la rupture du cycle imidazole donnant une forme ouverte, appelée formamidopyrimidine (Fapy) qui est plus stable que l'adduit parental. Ces résidus Fapy bloquent la synthèse d'ADN *in vitro* [Boiteux and Laval, 1985].

Les agents bifonctionnelles peuvent former des monoadduits mais également créer des pontages interbrins et intrabrins.

1.9 Conclusion

L'élucidation progressive des mécanismes moléculaires qui régissent la cancérogenèse chimique permet d'entrevoir la possibilité d'identifier le processus cancéreux chez l'homme à un stade précoce. La réponse cellulaire aux dommages de l'ADN est une étape cruciale et limitante dans la genèse des cancers. Elle met en œuvre plusieurs paramètres dont l'étude approfondie associée à celle des altérations génétiques permettra l'identification de marqueurs biologiques, lesquels amélioreront le dépistage précoce d'un cancer chez des populations à risque.

Chapitre 2

Cancer épidermoïde de l'œsophage et facteurs étiologiques

2.1 Anatomie, histologie et biochimie de l'œsophage

L'œsophage est un segment du tube digestif qui relie le pharynx à l'estomac. Grâce à son élasticité et à sa musculature, il permet au bol alimentaire de progresser depuis la bouche vers l'estomac, sous l'action de séries de contractions. Par ailleurs, l'œsophage est un des premiers organes avec la bouche et le pharynx à être directement exposé à diverses agressions issues de l'alimentation et/ou d'intoxications accidentelles.

L'œsophage a l'aspect d'un ruban musculaire creux long de 25 cm, avec quelques sinuosités et rétrécissements. Il traverse successivement la partie inférieur du cou, le thorax, le diaphragme, puis il pénètre dans l'abdomen en s'ouvrant dans l'estomac au niveau du cardia. Il est constitué de cinq tuniques : l'adventice (tissu conjonctif), la musculeuse (cellules musculaires lisses), la sous-muqueuse (tissu conjonctif), la musculaire muqueuse (cellules musculaires lisses) et la muqueuse composée de tissu conjonctif et d'un épithélium de revêtement de type malpighien, bordant la lumière de l'œsophage. Elle repose sur le chorion. L'épithélium est lui-même divisé en trois couches cellulaires : une assise basale formée de cellules nucléées, une couche cellulaire intermédiaire et superficielle (figure 2.1). Cet épithélium de revêtement qui est en principe non kératinisé, excepté après

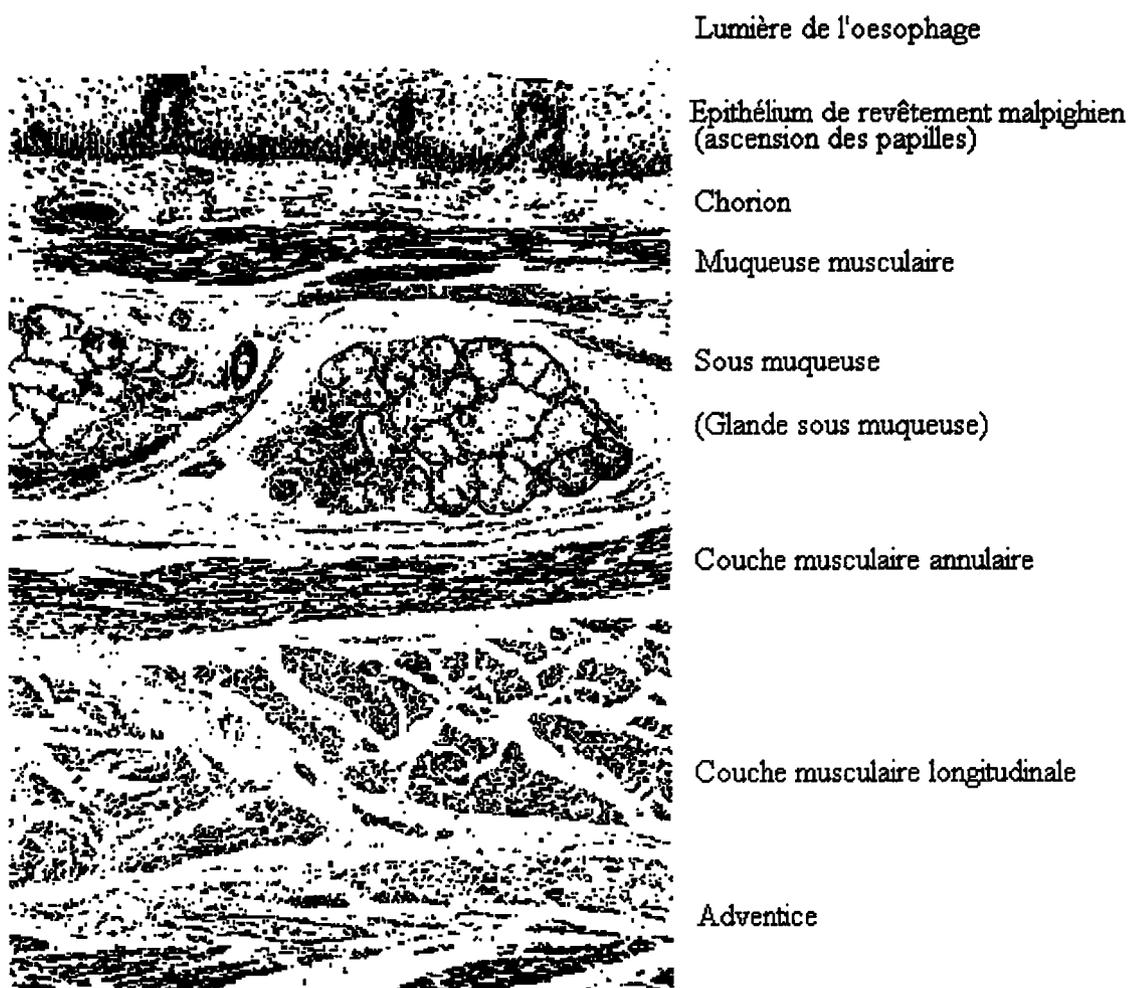


FIG. 2.1 – Schéma de l'œsophage, coupe longitudinale [Hurt, 1989].

un traumatisme, assure la protection de l'organe par la production d'un mucus déversé dans le lumen.

Les activités métaboliques du tissu œsophagien ont été peu étudiées, par rapport à d'autres organes tels que le foie et le poumon. Il y a peu d'informations concernant les phénomènes de différenciation (perte du noyau, augmentation du glycogène, présence de kératine) entre les cellules de la couche basale et celles des autres couches. Toutefois lors d'une irritation de la muqueuse, le processus de desquamation des couches superficielles s'accélère. Un phénomène régénératoire se met en place au niveau de la couche basale. Des mitoses et une compaction de la chromatine dans les noyaux sont observées.

Ainsi, par sa structure et sa physiologie, l'œsophage est en mesure de faire face aux agressions auxquelles il est confronté constamment. Cependant par la fréquence et le degré de ces agressions des lésions apparaissent et peuvent mettre en place un processus pré-néoplasique.

2.2 Lésions non néoplasiques de l'œsophage

Les cancers de l'œsophage sont souvent associés à certaines conditions ou pathologies considérées comme des états précancéreux. La lésion précancéreuse de l'épithélium malpighien est la dysplasie, également connue sous le terme de néoplasie intraépithéliale.

Elle résulte d'une anomalie de développement du tissu malpighien qui se caractérise par la perte de la différenciation structurale et fonctionnelle des cellules, suite à une prolifération anormale de la couche basale. La dysplasie ou néoplasie intraépithéliale est qualifiée de modérée, marquée ou sévère selon l'importance et l'extension des anomalies cellulaires [Mandard et al., 1984].

Dans les dysplasies modérées et marquées dites de grade I et II, les anomalies cytologiques sont limitées aux couches basales et ne dépassent pas les deux tiers inférieurs de l'épithélium. La dysplasie de grade III, appelée également carcinome *in situ*, est caractérisée par des anomalies cytologiques plus marquées présentes jusqu'au couches superficielles de l'épithélium avec des anomalies architecturales. Mandard et Coll. différencient également deux types de dysplasies : la forme indifférenciée constituée de cellules immatures indifférenciées et la forme différenciée caractérisée par la présence de cellules malpighiennes bien différenciées.

La nature précancéreuse a été mentionnée en premier par les cytologistes chinois. Chez des personnes vivant dans une région à forte incidence, la province de Honan et le comté de Lin Xian, ils ont montré que le taux de carcinome qui se développait sur des œsophages de dysplasie marquée était de 26% alors qu'il n'était plus que de 0.19% sur des œsophages cytologiquement normaux [Peking, 1974]. Une autre étude récente, effectuée dans cette région, a permis d'évaluer le risque de progression des lésions dysplasiques vers un cancer épidermoïde. Seules les lésions de dysplasies modérées ou de grade 3 sont associées à un risque accru de développer un cancer dans un délai de trois à cinq ans [Dawsey et al., 1994]. Une étude effectuée en France et aux U.S.A., rapporte respectivement un taux de dysplasies de 13 et de 10,5 pour 100 chez des sujets alcool-tabagiques chroniques [Seitz et al., 1990].

Un autre concept abordé depuis quelques années est la prévalence des œsophagites chroniques, qui ne sont pas des œsophagites peptiques par reflux, dans les populations à haut risque pour le cancer de l'œsophage [Mandard, 1980].

Sur le plan histologique, l'œsophagite chronique est caractérisée par une infiltration polynucléaire et lymphoplasmatocyte de la muqueuse et de la sous muqueuse associée à une hyperplasie basale cellulaire. La sévérité de la lésion s'observe par une intense infiltration inflammatoire avec une prédominance mononucléaire et par une hyperplasie basale caractérisée par une ascension papillaire importante.

Des études endoscopiques menées en Chine et en Iran révèlent l'impact de l'œsophagite chronique associée à une déficience nutritionnelle dans le risque de développer un cancer [Munoz et al., 1991]. De même une étude biopsique de la muqueuse œsophagienne de 124 volontaires résidant dans une zone à haute incidence, la Normandie, a montré des œsophagites chroniques chez 63% des sujets et un taux de dysplasie de 4.8% [Jacob et al., 1993]. Ces lésions étaient significativement associées à la consommation de tabac. D'autres études épidémiologiques ont montré le rôle favorisant de la consommation abondante de boissons chaudes et d'alcool dans la prévalence de l'œsophagite chronique. Au sud du Brésil, les consommateurs de maté chaud ont 2,2 fois plus de chance de développer une œsophagite chronique que les non buveurs [Victoria et al., 1987].

Le parallélisme entre la prévalence des lésions d'œsophagite chronique et l'incidence du cancer épidermoïde, la localisation préférentielle de ces deux lésions dans le tiers moyen de l'épithélium œsophagien [Ohta et al., 1986a] et la similitude des facteurs de risque (voir partie II) suggèrent fortement l'existence d'une séquence œsophagite chronique-dysplasie-cancer dans le développement tumoral de l'œsophage.

2.3 Cancer de l'œsophage

Le cancer de l'œsophage est latent. Il est généralement découvert fortuitement à l'occasion de l'exploration du tractus digestif supérieur pour des troubles sans rapport avec sa présence, ou au cours de la surveillance endoscopique de sujets atteints de maladies prédisposantes (œsophagite caustique, méga-œsophage primitif, endo-brachyœsophage...). Le signe clinique majeur du cancer de l'œsophage reste la dysphagie. Elle est le premier symptôme chez 86% des malades atteints

d'un cancer et correspond à une gêne à la déglutition voire un blocage alimentaire. Elle révèle la présence d'un ou plusieurs obstacles organiques ou fonctionnels localisés entre le pharynx et le cardia. Au moment où apparaît la symptomatologie, la tumeur est déjà évoluée.

2.3.1 Carcinome épidermoïde

Le type histologique le plus fréquent est l'épithélioma malpighien ou épidermoïde plus ou moins différencié. Il représente 90% des tumeurs malignes de l'œsophage. Il siège généralement dans le tiers moyen et le tiers supérieur de l'œsophage, en présentant parfois un caractère multifocal. Au niveau macroscopique, le carcinome épidermoïde, est visible sous la forme d'une muqueuse verruqueuse, soit érodée, soit légèrement surélevée. Lorsqu'il est évolué, il se présente sous quatre formes qui peuvent s'associer entre elles : végétante, ulcéro-végétante, infiltrante, ulcéro-infiltrante. Histologiquement le cancer malpighien est initialement intra-épithélial. Le potentiel invasif ganglionnaire ou métastatique apparaît dès que la tumeur a dépassé la couche épithéliale, et envahi la sous-muqueuse. Ce type de carcinome existe sous la forme différenciée en reproduisant de façon élaborée la structure d'un épithélium malpighien avec présence de kératine, ou sous une forme peu différenciée. Ohta et al. [Ohta et al., 1986b] définissent trois types de cancers épidermoïdes selon la topographie des lésions dysplasiques : le type extensif où des lésions étendues de dysplasie siègent au contact de volumineuses tumeurs ulcérées ; le type multifocal où les dysplasies sont multiples, dispersées à distances de petites tumeurs superficielles et le type isolé sans dysplasie associée. Suivant ce classement la progression d'un cancer de l'œsophage peut se faire selon deux voies : l'une est la fusion de cancers multifocaux, l'autre est l'extension horizontale à partir d'une lésion principale.

2.3.2 Adénocarcinome

L'adénocarcinome de l'œsophage représente 4 à 8% des cas. Il survient habituellement sur un endobrachyœsophage, appelé également l'œsophage de Barret. Ce dernier correspond à une métaplasie définie par le remplacement de la muqueuse malpighienne de l'œsophage distal par une muqueuse glandulaire, telle que la muqueuse gastrique. Du fait de son siège situé dans le tiers inférieur de l'œsophage, l'adénocarcinome doit être distingué du cancer du cardia envahissant secondairement l'œsophage. L'adénocarcinome peut également se développer à

partir de glandes normalement présentes dans la paroi œsophagienne. Ce type de cancer est en augmentation dans les pays développés [J.Blot, 1997].

2.3.3 Autres tumeurs

Les autres tumeurs malignes œsophagiennes sont exceptionnelles : léiomyosarcome, carcinosome, mélanome malin, cancer anaplasique, lymphosarcome, métastases (le plus souvent d'un cancer du sein ou du pharynx).

2.4 Pronostic du cancer de œsophage

La survie moyenne d'un cancer de l'œsophage non traité est de quelques mois [Gouerou, 1993] après la première consultation. Malgré l'amélioration des traitements classiques (chimiothérapie, radiothérapie, chirurgie), le pronostic du cancer de l'œsophage reste effroyable, car il se présente souvent comme une lésion très évoluée au moment où il est diagnostiqué. Les examens endoscopique et radiographique permettent de mesurer l'importance du développement tumoral œsophagien et d'apprécier le pronostic mais ne contribuent pas à l'amélioration de la survie. Seuls le diagnostic précoce d'une lésion pré-néoplasique ou l'identification de marqueurs biologiques dans une population à risque permettraient d'améliorer les conditions de dépistage de ce cancer et de sa prise en charge thérapeutique.

2.5 Incidence géographique

2.5.1 Incidence dans le monde

Le cancer de l'œsophage est le 4ème cancer le plus fréquemment rencontré dans les régions en voie de développement et le 15ème dans les pays développés [Parkin et al., 1992]. Cette estimation moyenne cache une caractéristique épidémiologique : l'extraordinaire variabilité de son incidence à travers le monde. Dans les zones à haut risque, l'incidence est de plus de 160 pour 100000 habitants, soit plus de 100 fois celle des régions à faible risque, parfois géographiquement très proche [Li, 1982]. Le tableau 2.1 décrit de façon grossière la distribution géographique du cancer de l'œsophage et nous permet de localiser les zones de haute

Afrique	une partie de l'Afrique de Sud et de l'Est
Amérique	l'Amérique latine, (sud du Brésil, nord-est de l'Argentine et de l'Uruguay) et quelques régions des Etats-Unis
Asie	l'est de la Turquie, l'Iran (pourtour de la mer Caspienne), la Chine, et l'Inde
Europe	nord ouest de la France, nord de l'Italie, Ecosse

TAB. 2.1 – Localisation des zones à haute incidence

incidence. 200000 nouveaux cas apparaissent chaque année [Parkin et al., 1992]. Dans ces zones, cette maladie se caractérise par une corrélation entre le taux d'incidence et le taux de mortalité [Pisani et al., 1993].

Le cancer de l'œsophage concerne souvent les groupes socio-économiques les plus défavorisés aussi bien dans les villes que dans les campagnes [Pottier et al., 1989], [Pottern et al., 1981]. Un niveau d'instruction bas et des conditions économiques difficiles sont des facteurs qui conduisent souvent à une forte consommation d'alcool et de tabac.

Le cancer de l'œsophage est un cancer touchant principalement les hommes ; le sex-ratio homme/femme est inégal dans le monde. Il est généralement voisin de 1 dans les régions à forte incidence telles que la Chine et l'Iran, alors qu'il est très élevé en France de l'ordre de 20 [Day and Munoz, 1982]. Dans d'autres pays à moyenne incidence, comme le Royaume-Uni, le sex-ratio dépasse rarement le chiffre 2. Ces données suggèrent que les facteurs de risque pour les deux sexes peuvent être différents selon les habitudes culturelles. La prépondérance masculine serait reliée fortement avec l'abus de tabac et de l'alcool, alors que la consommation de boissons trop brûlantes (thé, mate) ou d'aliments irritants et toxiques seraient responsables d'un sexe ratio moins marqué. Il est à noter l'existence d'une incidence relativement forte chez les femmes en Suède et en Finlande où l'on n'a jamais expliqué de façon satisfaisante ce taux [Muir, 1981].

L'incidence du cancer épidermoïde de l'œsophage apparaît assez stable dans le temps, avec toutefois une légère tendance à la baisse dans les pays où l'on a noté une diminution de la consommation de l'alcool [Moller et al., 1990]. Par contre la maladie est apparue récemment en Afrique du Sud [Cook, 1971] et continue de progresser dans les pays en voie de développement.

2.5.2 Incidence en Europe

En Europe, la France détient le taux d'incidence le plus élevé (cf figure 2.2). Selon les statistiques de l'O.M.S., le taux de mortalité par cancer de l'œsophage chez l'homme en France est de deux à quatre fois supérieur à celui observé dans les autres pays de l'Europe occidentale. En Angleterre une augmentation a été constatée avec l'apparition d'une surincidence dans la profession de "barman" [Muir and McKinney, 1992]. L'Italie du Nord détient également des taux d'incidence (7/100000) et de mortalité (4.8/100000) élevés chez les hommes [Parkin et al., 1992].

2.5.3 Incidence en France et dans le département du Calvados

A l'intérieur du territoire français d'importantes variations de l'incidence du cancer de l'œsophage existent entre différents départements, voire différents cantons [Pottier et al., 1989]. Cette incidence révèle, depuis une quinzaine d'année, une tendance à la baisse dans les régions française à haut risque, alors qu'elle reste stable ou augmente dans les zones à faible risque [Launoy et al., 1994].

Il existe cependant dans certaines régions, comme l'Ouest de la France, des zones où l'incidence est 20 à 50 fois plus élevée. C'est le cas du département du Calvados. Deux études réalisées dans cette région enregistrent respectivement entre 1978-1982 [Chérié-Challine et al., 1988] et 1988-1992 [IARC, 1997] des taux annuels d'incidence brutes égaux à 34,5 et 26,9/100000 habitants chez l'homme et 1,9/100000 habitants chez la femme. Après standardisation par rapport à la population mondiale, les taux sont respectivement de 31,6, 21,3 pour l'homme et de 1,2, 1,1 pour la femme avec un sexe ratio de 26,4 et de 19,4. Ces données placent le département du Calvados au premier rang européen, et au 5ème rang mondial pour le taux de cancer de l'œsophage chez l'homme. La survie globale est de 31% à 1 an et de 3% à 5 ans. L'incidence du cancer de l'œsophage touche essentiellement les hommes âgés de plus de 50 ans. Au sein même du département, la distribution géographique des décès entre les cantons est très inégale [Pottier et al., 1989]. Des zones de densité très élevées sont remarquées au centre et dans les cantons du sud ouest. Ces zones sont de prédominance rurale où la culture de pommes à cidre est largement répandue. Il est d'ailleurs intéressant de noter que des études antérieures avaient déjà souligné l'existence dans ces cantons d'une corrélation entre le taux annuel de mortalité par cancer de l'œsophage et le nombre de bouilleurs de cru [Tuyns and Vernhes, 1981].

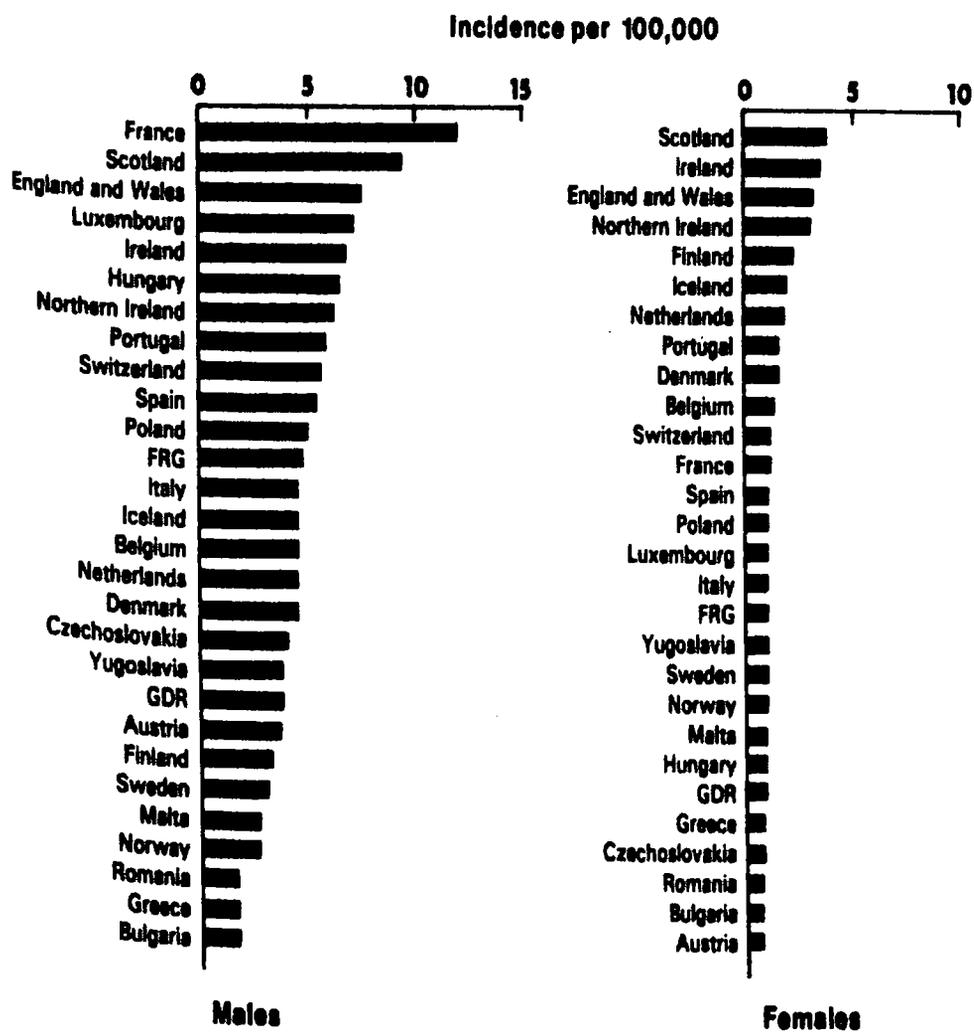


FIG. 2.2 – Incidence du cancer de l'œsophage en Europe [Craddock, 1993]

Les données mentionnées ci-dessus révèlent une diminution du taux d'incidence chez l'homme. Cette tendance à la baisse s'expliquerait soit par un exode rural, particulièrement marqué dans ce département depuis la seconde guerre mondiale, soit par un changement des habitudes alimentaires, en particulier une baisse de la consommation régulière des eaux-de-vie issues de la pomme.

2.6 Facteurs étiologiques

Le cancer épidermoïde de l'œsophage est une des seules tumeurs connues qui soit aussi marquée par son caractère multicausal. Les variations de son incidence dans l'espace, dans le temps, mais aussi dans les différences ethniques et culturelles suggèrent l'existence de différents facteurs étiologiques tels que des facteurs environnementaux, comportementaux et/ou génétiques. Nous décrirons successivement les différents facteurs exogènes décrits par la littérature. La responsabilité de la consommation d'alcool et de tabac dans l'apparition du cancer de l'œsophage dans les pays développés est établie depuis plusieurs années. Elle intervient dans 80% des cas. Les mécanismes cellulaires et moléculaires de ces deux facteurs étiologiques impliqués dans la carcinogenèse de l'œsophage seront traités en détail dans le chapitre suivant.

2.6.1 Alcool-tabac

La consommation excessive d'alcool et de tabac dans l'étiologie du cancer épidermoïde de l'œsophage est bien établie. En Europe occidentale et en Amérique du Nord, plus de 80% des cas sont imputables à la consommation d'alcool et de tabac [Memik et al., 1992], [Yu et al., 1988]. Le rôle de ces deux facteurs semble également importants au Japon [Parrish et al., 1993], en Amérique latine [Victoria et al., 1990], et à un moindre degré en Afrique du Sud et en Inde [Sankaranarayanan et al., 1991]. Les travaux de Tuyns et collaborateurs ont montré que ces deux facteurs interagissaient en multipliant leurs effets [Tuyns et al., 1977]. Toutefois l'alcool et le tabac peuvent agir de manière indépendante. Ainsi au cours d'une étude menée dans le département du Calvados sur 704 malades, Tuyns montre que le risque relatif parmi les fumeurs non buveurs est supérieur à 5, et que chez les buveurs non fumeurs le risque est plus important [Tuyns, 1983]. Dans ce dernier cas, la croissance est fortement liée à la prise journalière d'alcool. Le risque est égal à 10 pour une consommation de 80-120 g

d'éthanol par jour et à 100 pour des doses supérieures à 120 g par jour. Moller et coll. [Moller et al., 1990] soulignent également, en comparant la consommation d'alcool dans différents pays Européens, l'importance de la quantité d'alcool consommé sur l'incidence et la mortalité du cancer de l'œsophage.

Récemment, Launoy et coll. [Launoy et al., 1997b] ont conduit une étude cas-témoins dans les départements du Calvados, de Côte d'Or et de Haute Garonne entre 1991-1994. Ils ont montré que les modes de consommation à risque étaient complètement différents pour l'alcool et le tabac. Pour l'alcool, le risque augmente linéairement avec la dose hebdomadaire moyenne. Il est plus faible pour une dose moyenne consommée pendant de nombreuses années que pour une dose forte consommée pendant une période courte. Le risque persiste longtemps après la fin de la période de consommation. Pour le tabac, le risque existe dès les premières cigarettes fumées régulièrement, augmente jusqu'à 10 cigarettes par jour, et se stabilise ensuite. Le risque est plus élevé pour une dose faible consommée pendant de nombreuses années que pour une dose, même très élevée, consommée pendant une courte période de temps. Le risque diminue très vite avec l'arrêt du tabac quelle que soit la consommation précédente.

La façon de consommer le tabac joue un rôle déterminant dans le risque de développer un cancer de l'œsophage. Par exemple, le risque est moindre si le tabac est prisé ou chiqué sans avaler le jus [Sankaranarayanan et al., 1991]. Par contre la consommation de tabac roulé à la main [Stefani et al., 1993], l'usage de la pipe et du cigare [Fransceschi et al., 1990], tendent à augmenter le risque. Dans une étude cas-témoins en Uruguay, la prise de tabac brun s'associe à un risque de cancer 3 fois plus élevé que la prise de cigarettes blondes. Dans la zone de forte incidence du littoral iranien de la mer Caspienne, la consommation du sukteh, un mélange de tabac contenant de l'opium dont le résidu de combustion est ingéré, est considéré comme responsable d'environ 6% des cancers de l'œsophage. En Inde, la consommation de bidi (cigarette locale) ainsi que la chique du bétel seraient à l'origine de plus de 50% des cancers observés [Benamouzig et al., 1993].

Des risques différents sont également associés avec le type de boissons alcoolisées consommées. Plusieurs études ont évoqué une responsabilité particulière des boissons alcoolisées dans la surincidence du cancer de l'œsophage, sans jamais le démontrer : les alcools dérivés de la pomme dans l'Ouest de la France [Tuyns et al., 1979], le cachaça, alcool de canne à sucre, dans le sud du Brésil [Victoria et al., 1987] et le vin rouge en Italie [Barra et al., 1990]. Récemment, Launoy et ses collaborateurs ont mené une étude cas-témoin multicentrique (Normandie, Bourgogne, Midi-pyrénées) dont l'objectif était d'identifier le ou les types

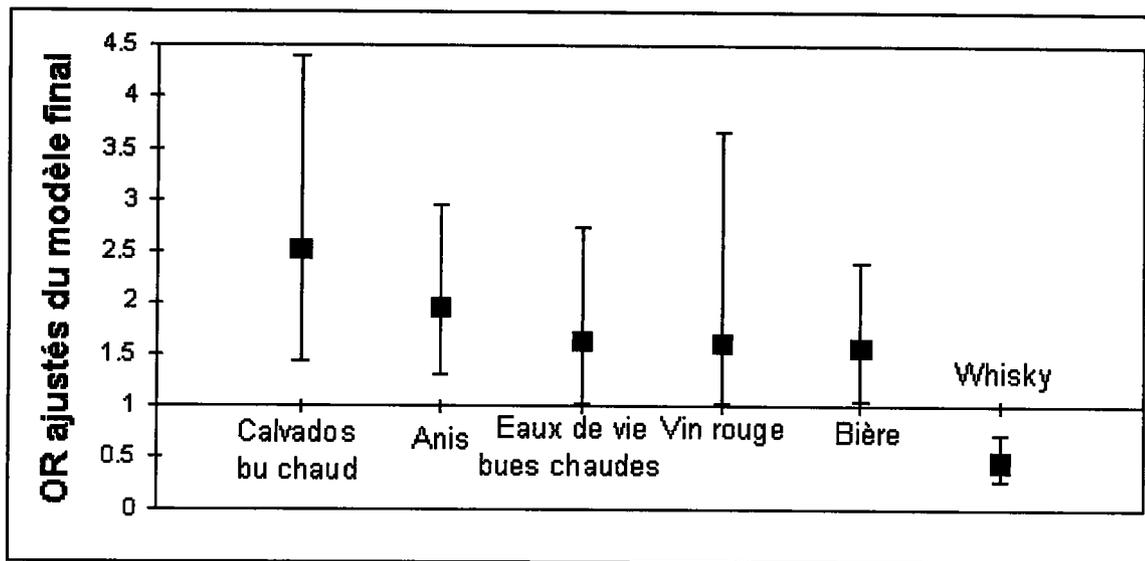


FIG. 2.3 – Boissons alcoolisées ayant un effet sur le risque de cancer de l'œsophage [Launoy et al., 1997a].

de consommation alcoolique et tabagique à l'origine d'un haut risque de cancer de l'œsophage. Ils ont obtenu les résultats suivants : il n'existe pas de liaison significative entre la consommation de cidre et le risque de cancer ; par contre, le calvados absorbé avec une boisson chaude (café ou grog) est fortement associé au risque de cancer comme le sont toutes les autres eaux de vie. Les apéritifs anisés sont les boissons alcoolisées les plus fortement associées au risque de cancer de l'œsophage après les eaux de vie bues chaudes. Le vin rouge et la bière ont également un effet propre significatif sur le risque, mais plus faible que celui engendré par les alcools forts. Enfin le whisky aurait un effet protecteur vis à vis de cette pathologie. Ces résultats suggèrent une action particulière de certaines boissons alcoolisées dans l'apparition d'un cancer de l'œsophage (cf figure 2.3). Ils mettent également en lumière le rôle important des boissons alcoolisées chaudes dans le pic d'incidence observé dans le Nord-Ouest de la France (aspect développé dans le paragraphe irritation chronique de ce chapitre).

2.6.2 L'alimentation

Les facteurs de risque alimentaire suspectés ou identifiés dans le cancer de l'œsophage diffèrent selon les régions étudiées [Grahams et al., 1990], [Ribeiro et al., 1996]. Des carences alimentaires ont souvent été associées à ce

risque. Plusieurs études invoquent le rôle protecteur d'une alimentation riche en légumes et en fruits frais. Les agrumes, les bananes, le soja, ainsi que l'ail seraient riches en micronutriments (vitamine C, bêta-carotène) qui par différents processus, contribueraient à cet effet protecteur. A ces produits viennent s'ajouter les composés ioniques (sélénium, zinc, cuivre, molybdène). Mais les données concernant le rôle de ces ions dans la carcinogenèse du cancer épidermoïde de l'œsophage restent pauvres et controversées.

Il existe d'autres régions du monde où une nutrition médiocre ne s'accompagne pas d'une surincidence du cancer œsophagien. Ceci suggère l'existence de substances cancérigènes dans les produits de consommation. Dans les zones de forte incidence en Chine [Cheng et al., 1992] et au Cachemire [Khuroo et al., 1992], le mode de conservation artisanale, la façon de préparer et de cuire les aliments ont été mis en cause par la présence de substances hautement carcinogènes, les nitrosamines et les hydrocarbures aromatiques polycycliques. C'est également le cas en Ecosse où le risque est associé à la forte production et à la consommation de saumon fumé. En Arabie Saoudite [Amer et al., 1990] l'augmentation de l'incidence du cancer de l'œsophage a été relié à la contamination de l'eau par les produits pétroliers présents dans le sol.

2.6.3 Irritation chronique

L'irritation chronique de la muqueuse œsophagienne est fréquemment évoquée chez les patients atteints d'un cancer de l'œsophage. L'ingestion de boissons très chaudes a été associée à un risque très élevé dans plusieurs études cas-témoins. La consommation de maté très chaud (70 °C), à l'aide d'une paille métallique déposée au fond de la gorge, et immédiatement dégluti, est une pratique ancestrale courante en Amérique latine. La répartition géographique de cette coutume est fortement reliée avec les zones à hautes incidences. Au Brésil [Victoria et al., 1990] la consommation est de l'ordre de 1.8 litre par jour. Ce facteur pourrait être responsable de 25% des cancers œsophagiens observés et de plus de 75% de ceux observés en Uruguay. La prise de thé très chaude est également incriminée dans d'autres parties du globe : Japon, Sibérie, Grande-Bretagne, Iran, pays où le risque varie de 2 à 5,6. Pour certains auteurs, une partie du risque serait liée à la présence de carcinogènes dans le thé, notamment à la présence de tannins [Morton, 1987], ou de nitrosamines, comme au Cachemire, où le thé est bu salé et conservé en saumure [Khuroo et al., 1992]. Un risque associé à la consommation de café chaud a été rapporté à Puerto-Rico [Martinez, 1969]. En Normandie il est de tradition de

boire son calvados mélangé à du café chaud ou sous forme de grog. Cette pratique expliquerait en partie les différences existant entre les régions, les milieux urbains et ruraux dans l'incidence du cancer de l'œsophage [Launoy et al., 1997a].

D'autres produits sont à l'origine d'une irritation de la muqueuse œsophagienne associée à l'apparition du cancer œsophagien. La contamination de l'alimentation par des fibres de silice semble contribuer à l'irritation de la muqueuse œsophagienne. En effet il a été retrouvé dans l'œsophage de sujets atteints un taux de particules de silice 10 fois supérieure à celui des témoins [O'Neill et al., 1992]. La présence de ces fibres est liée à la contamination de la farine de millet par les grains d'une herbe, *Phalaris minor*.

La consommation d'épices peut contribuer à l'irritation de la muqueuse œsophagienne. Un risque égal à 3 avec une relation dose-effet a été observée à Porto-Rico [Martinez, 1969].

Un risque accru de cancer de l'œsophage a été décelé dans certaines population de travailleurs : les vulcaniseurs, les ramoneurs et les travailleurs des régions minières des Asturies. Le risque pourrait être lié au rôle irritant des matières pyrroliques et des poussières métalliques d'arsenic, de chrome, de nickel, et au béryllium [Benamouzig et al., 1993].

L'irritation mécanique ou thermique de la muqueuse œsophagienne est un facteur étiologique très important dans la carcinogenèse du cancer épidermoïde. Il serait potentialisé par l'effet de l'alcool et du tabac.

Il est intéressant de voir au travers de ces études que l'effet irritant est généralement constatée dans la partie supérieure de l'œsophage. [Ribeiro et al., 1996]. Ces éléments épidémiologiques pourraient être rapprochés avec la prévalence des lésions pré-néoplasiques et des cancers épidermoïdes, dans le tiers supérieur et dans le tiers moyen des œsophages des sujets à risque [Chérié-Challine et al., 1988, Muir, 1981].

Il faut souligner qu'un traumatisme de la muqueuse œsophagienne suite à une ingestion accidentelle de produits caustiques peut être à l'origine d'un cancer épidermoïde.

2.6.4 Les agents biologiques

Le rôle des micro-organismes, tels que les mycotoxines et les papillomavirus, dans la carcinogenèse de l'œsophage a été suggéré par plusieurs études.

Dans certaines parties du globe où l'alimentation est à base de céréales (le blé et le maïs), des champignons ont été fréquemment retrouvés dans les grains mal conservés. En Chine [Chang et al., 1992], un risque accru a été observé chez les sujets consommant régulièrement des aliments moisissés. Les champignons appartenant au genre *Fusarium*, *Alternaria*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Penicillium* ont été détectés. En Afrique du Sud, un champignon *Fusarium moniliforme* serait responsable de l'apparition du cancer de l'œsophage, en contaminant le maïs par la production de mycotoxines carcinogènes, les fumonisines. En effet la déficience des sols arides en molybdène et en zinc, est propice au développement du *Fusarium moniliforme* sur le maïs [Norred, 1993].

Plusieurs études ont mentionné l'implication du papillomavirus dans le développement tumoral de différents tissus épithéliaux (peau, larynx, utérus). La présence de l'HPV (papillomavirus humain) a été confirmée dans la muqueuse œsophagienne aussi bien dans les zones d'œsophagites que dans les zones cancéreuses [Chang et al., 1992]. Dans une série française, la présence d'HPV a été observé chez 5 des 12 patients atteints de cancer épidermoïde de l'œsophage et chez aucun des 17 témoins exposés à l'alcool et au tabac [Benamouzig et al., 1992]. Cependant, il est impossible, à l'heure actuelle, de conclure quant au rôle exact de ce virus dans la carcinogenèse de l'œsophage et à sa prévalence dans les lésions pré-néoplasiques, étant donné la pauvreté des données épidémiologiques et moléculaires.

La présence d'autres virus (virus de l'herpès, le cytomégalovirus, et le virus d'Epstein Bar) a été rapportée par quelques études qui nécessitent d'être confirmées [Chang et al., 1992].

L'état dentaire a un effet propre significatif dans l'incidence du cancer de l'œsophage [Chérié-Challine et al., 1988] ; Les bactéries des voies digestives supérieures convertissent partiellement les nitrates en nitrites. Une dérégulation de la flore de la cavité buccale humaine pourrait entraîner une production anormale de nitrites et par conséquent participer à la formation endogènes de nitrosamines [Chang et al., 1992, Ribeiro et al., 1996].

2.6.5 Les facteurs génétiques

Dans les régions de haute incidence aucune étude ne mentionne l'intervention directe de facteurs génétiques dans la carcinogenèse du cancer épidermoïde, excepté une étude récente portant sur 221 familles chinoises. L'analyse de la ségrégation selon un mode mendélien suggère l'existence d'un facteur génétique autosomique récessif [Carter et al., 1992]. Aux U.S.A. l'incidence du cancer épidermoïde est 5 fois plus élevée dans la population noire que dans la population blanche [Brown et al., 1994]. Après avoir envisagé la possibilité d'un facteur héréditaire dans l'explication de cette disparité raciale [Schoenberg et al., 1971, Pottern et al., 1981], plusieurs études américaines ont finalement montré une grande fréquence des habitudes alcoolo-tabagiques et une alimentation pauvre en fruits et légumes frais parmi les classes noires défavorisées.

Une susceptibilité génétique interviendrait lorsque le risque accru de cancer de l'œsophage est associée à des pathologies, comme la tylose, kératomodermie palmo-plantaire héréditaire qui est une affection transmise sur le mode autosomal dominant. Dans ce syndrome, le risque de développer un cancer de l'œsophage atteint les 100 pour cent après 65 ans. De même qu'un facteur génétique pourrait être à l'origine de l'association maladie cœliaque/cancer de l'œsophage [Benamouzig et al., 1993]. Il est à noter qu'une susceptibilité génétique liée au métabolisme des carcinogènes intervient dans l'incidence de ce cancer. Cet aspect est développé dans le chapitre suivant.

2.6.6 Immunosuppression

Une étude rapporte la survenue précoce de carcinome épidermoïde de l'œsophage chez des sujets transplantés sans facteurs de risques connus, suite à une chimiothérapie immunosuppressive [Scobey et al., 1987].

2.7 Conclusion

Le cancer épidermoïde de l'œsophage est marqué par sa grande variabilité géographique et par sa forte dépendance avec les facteurs environnementaux. La région de Basse-Normandie présente l'incidence de ce cancer la plus élevée d'Europe. Dans cette région ainsi que dans les autres parties du monde, la forte

consommation d'alcool et de tabac sont les deux facteurs de risques incriminés dans plus de 80% des cas. Ces deux facteurs étiologiques agissent en synergie. Le mécanisme de cette interaction est pour l'instant inconnu. La responsabilité spécifique de certaines boissons alcoolisées (la consommation d'alcools de pomme, d'apéritifs anisés, de vin rouge...) et du mode de consommation (boissons bues chaudes) ont été évoquées. Cependant les connaissances actuelles des mécanismes d'action de ces facteurs étiologiques ne permettent pas d'expliquer l'ampleur des variations géographiques et sociales de son incidence. De même l'association du caractère multifocal des lésions prénéoplasiques avec l'existence de champs de cancérisation sur la muqueuse œsophagienne plaide en faveur de l'action d'une substance exogène cancérigène. Il apparaît ainsi important d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes cellulaires et moléculaires induits par l'alcool et le tabac dans la carcinogénèse de l'oesophage.

Chapitre 3

Tabac, alcool et cancer de l'œsophage

3.1 Introduction

Ce chapitre a pour objectif de faire le bilan des connaissances actuelles des mécanismes moléculaires de l'alcool et du tabac dans la carcinogenèse de l'œsophage afin d'approcher celui de l'interaction alcool-tabac actuellement inconnu. L'étude sur les facteurs étiologiques menée dans le chapitre précédent, porte un regard particulier sur les nitrosamines et les HPA, car outre dans le tabac, ils sont également présents dans les produits consommés dans les régions à haut risque pour le cancer de l'œsophage. Ces produits sont de puissants génotoxiques. Après activation par les cytochromes P450, ils sont capables d'alkyler l'ADN, et de créer des adduits dont certains sont responsables de l'apparition de mutations qui conduiraient à la cancérisation. L'alcool quant à lui n'est pas carcinogène. Son implication dans le processus tumoral se traduirait soit par un effet co-carcinogène en influençant positivement l'activation des génotoxiques, soit par un effet promoteur en augmentant la prolifération cellulaire. Enfin, les connaissances actuelles sur ces différents mécanismes constituent le fondement de la compréhension des mécanismes de l'interaction alcool/tabac dans la cancérogenèse de l'œsophage.

3.2 Tabac et cancer

La relation tabac-cancer est de nos jours bien établie. Elle est marquée dans l'apparition de différents cancers : les cancers de la cavité buccale, du larynx, du pharynx, du poumon, de l'oesophage, du rein, du pancréas, et de la vessie. 1,1 millions de nouveaux cas par an, soit 30% de la population mondiale, sont attribués à la consommation de tabac [Parkin et al., 1994].

La fumée de tabac renfermerait plus de 3800 composés [Dube, 1982]. Certains de ses produits sont de puissants carcinogènes : les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPA), le polonium-210, les amines aromatiques et les nitrosamines.

3.2.1 Principales substances carcinogènes du tabac et leur origine

Formation des nitrosamines

Les nitrosamines sont générées au cours d'une réaction N-nitrosée entre une amine et un nitrite à un pH approprié. Elles peuvent être produites directement dans le tabac ou dans l'organisme à partir de précurseurs endogène et exogène. Le tabac et la fumée de tabac renferment trois types de nitrosamines :

- les nitrosamines volatiles (NOVs)
- les nitrosamines dérivées de résidus provenant de l'agriculture chimique
- les nitrosamines spécifiques du tabac (NOSTs).

Les NOVs sont formées majoritairement pendant la combustion du tabac à partir soit d'une réaction classique de N-nitrosation, soit d'une réaction de décarboxylation des acides N-nitrosoaminés non carcinogènes et non volatiles. Une faible partie peut provenir du séchage des feuilles de tabac. Les principales sont la N-nitrosodiméthylamine et la N-nitrosopyrrolidine. Elles peuvent atteindre respectivement dans la fumée de cigarette commerciale des taux de 20 ng/cigarette et 110 ng/cigarette.

La présence du deuxième groupe de nitrosamines, dont le principal candidat est la N-nitrosodiethanolamine (36 à 20 ng dans la fumée de cigarette commerciale), est justifiée par l'utilisation concomitante de deux produits chimiques dans

le traitement de la culture de tabac : l'hydrazine maléique et le sel de la diéthanolamine.

Les NOSTs sont à la fois présentes dans le tabac et la fumée de cigarette à des taux importants [Hecht and D.Hoffmann, 1989]. La prise de NOSTs par jour s'élève à 48 μg chez un gros fumeur, à 223 μg chez un mâcheur de tabac et à 733 μg chez un priseur régulier. Parmi ces dérivés, les plus connus sont la 4-(N-méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) et la N'-nitrosornicotine (NNN) dont la présence en faible quantité dans le tabac diminue le risque des personnes exposées [Fisher et al., 1991], [IARC, 1985]. Dans les feuilles de tabac les NOSTs apparaissent au cours des phases de maturation (séchage et fermentation). Il est à noter que les feuilles vertes de tabac fraîchement cueillies ne contiennent pas ces produits. Ces étapes de séchage et de fermentation sont importantes car elles conditionnent la teneur définitive du tabac commercialisé. Les nitrates, constituants normaux des feuilles de tabac, peuvent être réduits en nitrites qui peuvent à leur tour réagir avec les alcaloïdes du tabac. Le principal candidat est la nicotine qui génère 90 pour 100 des NOSTs. Les autres alcaloïdes jouant également un rôle important, sont la nornicotine, l'anatabine et l'anabasine [Craddock, 1993]. Des auteurs Spiegelhalder et Bartsch soulignent l'influence du taux initiaux de nitrates sur la teneur en NOSTs dans différents type de tabac [Spiegelhalder and Bartsh, 1996]. Par exemple le tabac blond contenant des faibles taux de nitrates renferme des taux de NOSTs peu élevés, alors que le tabac brun qui est très enrichi en nitrates détient des taux de NOSTs les plus forts. La différence entre ces deux types de tabac réside dans l'étape de séchage où les feuilles du tabac blond sont séchées dans un séchoir alors que celles du tabac brun sont séchées à feu direct ou indirect. La présence de la NNN et de la NNK dans la fumée de cigarette n'indique pas l'existence d'une synthèse de ces NOSTs au cours de la consommation mais plutôt d'un transfert des produits préformés depuis la feuille de tabac vers la fumée [Fisher et al., 1990].

La teneur du tabac en nitrosamines préformées, et celles générées au cours de la combustion et/ou par voie endogène, apparaissent déterminantes dans la carcinogénèse du tabac.

Formation des hydrocarbures polycycliques aromatiques

Les HPA se forment au cours de la combustion. En effet, la cigarette se consume en développant à l'intérieur du cône d'ignition une chaleur nettement supérieure à celle dégagée par une pipe ou un cigare; or, à forte température, la

pyrolyse du tabac engendre une polymérisation responsable de l'apparition d'hydrocarbures polycycliques dont certains sont dotés d'un fort pouvoir cancérigène tel que le benzo(a)pyrène.

3.2.2 Mutations de *p53* et le tabac

Les nitrosamines et les HPAs du tabac sont capables d'alkyler l'ADN après activation par les cytochromes P450. Certains de ces adduits, comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre précédent sont responsables de l'apparition de mutations qui conduiraient à la cancérisation [Montesano et al., 1992].

Les mutations du gène *p53* sont retrouvées dans plus de la moitié des tumeurs humaines dont la plupart sont associées à une perte fonctionnelle de p53. L'analyse des mutations de *p53* est susceptible de fournir des indications sur l'étiologie et le pronostic de certains cancers. En effet, le spectre mutationnel du gène *p53* peut refléter les contributions diverses des facteurs étiologiques exogènes et endogènes au processus de cancérisation. La nature et la localisation des mutations sur le gène *p53* diffèrent selon le type histologique de la tumeur, de sa localisation et de sa progression tumorale [Hollstein et al., 1994b]. Les profils mutationnels de *p53* dans les cancers sont donc complexes. Les tumeurs liées au tabac illustrent bien cette complexité. Les mutations *p53* sont plus fréquemment rencontrées chez les fumeurs, mais le spectre mutationnel varie d'une pathologie à l'autre [Montesano et al., 1996].

Mutations de *p53* et cancer : généralités

Parmi les mutations de *p53*, 90% sont des mutations ponctuelles de type faux sens. Elles touchent essentiellement la région centrale de la protéine qui contient le domaine de fixation à l'ADN (91,5%). Elles ne sont pas distribuées uniformément. Elles touchent préférentiellement des points chauds : les acides aminés 129-146, 171-179, 234-260, 270-287, qui appartiennent à des régions très conservées au cours de l'évolution [Vogelstein and Kinzler, 1992b]. La plupart des mutations conduisent à une altération de la conformation de p53, qui se traduit par une altération de p53 à lier spécifiquement l'ADN et à une perte récessive de la fonction suppresseur de tumeurs [Hainaut, 1997]. Il est à noter que certaines mutations peuvent exercer un effet transdominant du gène [Ozturk and Soussi, 1994].

La plupart des mutations décrites dans les cancers colorectaux, les tumeurs

cérébrales, les leucémies et les lymphomes surviennent sur les dinucléotides CpG qui sont connus pour être le siège fréquent de mutations. Les transitions G→A forment la majorité des mutations ponctuelles, excepté dans les carcinomes hépatocellulaires et pulmonaires où les transversions G→T sont fréquemment notées.

L'apparition des mutations de *p53* est associée à différents stades de la progression tumorale [Riley, 1996]. Les mutations de *p53* peuvent apparaître précocément. C'est le cas des tumeurs liées à une exposition chronique à un carcinogène ou à une inflammation (cancer de l'œsophage épidermoïde associé à l'alcool et le tabac, l'œsophage de Barret au reflux gastroœsophagien, le colon à l'ulcère, la peau aux UV, la tête et le cou au tabac...). Dans les tumeurs du colon, du sein, de la vessie, du poumon à petite cellule, l'apparition des mutations *p53* correspond à l'émergence du carcinome *in situ* à partir de lésions bénignes. Dans d'autres cancers (la thyroïde, la prostate, ...) les formes mutées de *p53* sont corrélées avec la perte de la différenciation cellulaire, l'apparition du caractère agressif de la tumeur et la présence des métastases précoces.

L'analyse du spectre mutationnel de *p53* peut refléter l'exposition de l'ADN à des cancérigènes spécifiques [Vogelstein and Kinzler, 1992a]. C'est le cas de l'aflatoxine B1 responsable de l'apparition de carcinome hépatocellulaire chez des sujets exposés. Cette mycotoxine est à l'origine d'une transversion de type G →T sur le codon 249 du gène *p53*. Par ailleurs, Les mutations par substitution en tandem de type CC→TT dans le carcinome squameux de la peau, sont typiques des mutations induites par les rayons ultraviolets. Dans les angiosarcomes de personnes exposées au chlorure de vinyle, les mutations A:T→T:A serait spécifique de cet agent carcinogène [Hollstein et al., 1994a]. Par ailleurs certains types de mutations comme les transitions C vers T aux sites CpG, sont probablement liés à un mécanisme endogène. La déamination spontanée de la (5-méthylcytosine) et la méthylation des cytosines seraient liées soit à un dérèglement des méthyltransférases, soit à un déficit des mécanismes de réparation impliqués dans la réparation des mésappariements.

Mutations de *p53* et adduits des carcinogènes du tabac

Dans la plupart des tumeurs humaines de la cavité orale liées à l'alcool et au tabac, une forte proportion de transitions GC→AT et AT→GC dans le gène *p53* est constatée. Elles seraient induites par les adduits de petite taille des nitrosamines. Alors que pour les autres cancers liés à la prise de tabac (cancer du cou, de la tête, du larynx et du pharynx) [Lazarus et al., 1995], [Hollstein et al., 1994b],

la prédominance des transversions G:C→T:A de *p53* seraient engendrée par les adduits de taille plus importante tels que les adduits des HPA et de la NNK [Greenblatt et al., 1994]. Dans les carcinomes bronchiques [Zhang et al., 1994], la fréquence des transversions G vers T à des codons particuliers (157, 248, 273) a été reliée à l'action du benzo(a)pyrène qui réagit préférentiellement sur la guanine [Denissenko et al., 1997]. Dans les cancers de la vessie, le spectre mutationnel est dominé par les mutations au niveau des paires de bases G:C. Elles résulteraient de l'exposition d'amines aromatiques tels que le 4-aminobiphényle présent dans le tabac [Montesano et al., 1996].

3.2.3 Carcinogènes du tabac et prolifération cellulaire

Les mécanismes par lesquels les carcinogènes du tabac agiraient dans le développement tumoral (phase de promotion et de progression) ont fait l'objet de quelques études. Il a été montré dans les cellules lymphoïdes humaines que les HPA interfèrent avec les voies de signalisation dans lesquelles le calcium est impliqué [Davila et al., 1995]. Les HPA augmenteraient le taux de calcium intracellulaire et perturberaient l'homéostasie cellulaire. Le calcium joue entre autre un rôle important dans la régulation des cellules épithéliales en prolifération en activant la protéine kinase C. Récemment, Tannheimer et ses collaborateurs [Tannheimer et al., 1997] ont montré une élévation du calcium intracellulaire dans des cellules épithéliales mammaires (HMEC) exposées à des HPA carcinogènes (B(a)P, diméthylbenz(a)anthracène) et 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Par contre aucune altération significative du taux calcique n'a été observée après un traitement avec des HPA non carcinogènes (benzo(e)pyrène, anthracène). Le récepteur AhR (aryl hydrocarbon receptor), impliqué dans la régulation des cytochromes P450 métabolisant les HPA (CYP1A), pourraient jouer un rôle dans la voie de signalisation calcium-dépendant. Ces auteurs ont également mis en évidence une augmentation de la prolifération des cellules HMEC par le B(a)p avec un pic plus important en présence du facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor). Ces résultats mettent en lumière l'induction de la prolifération cellulaire par les HPA carcinogènes dont l'activité mitogène s'effectuerait par une stimulation des voies de signalisation calcium-dépendantes.

3.2.4 Tabac et polymorphismes génétiques des enzymes du métabolisme

Les polymorphismes génétiques des enzymes du métabolisme des agents carcinogènes du tabac peuvent être à l'origine des variations interethniques et indivi-

est modulé par la capacité du tissu à resynthétiser l'enzyme et par la mutagenicité des substances carcinogènes [Montesano et al., 1992]. Ainsi, son efficacité peut être perturbée par la présence de mutations géniques. Dans des tissus tumoraux œsophagiens en provenance du Nord de la Chine, Wang [Wang et al., 1997] relèvent l'existence de mutations G vers A et de délétions dans différentes parties codantes du gène. De telles lésions géniques entraîneraient des perturbations de la conformation et de l'activité de l'enzyme [Pieper et al., 1994].

Mutations de *p53* et cancer épidermoïde de l'œsophage

La fréquence des mutations diffère selon l'origine géographique des tumeurs. En France elle est de 80% dans les régions de haute incidence (Normandie) contre 35% dans les zones de faible incidence. Ceci est un argument en faveur de l'implication de différents facteurs de risque dans l'incidence du cancer épidermoïde de l'œsophage. De même, une étude [Montesano et al., 1996] révèle, une forte relation entre le tabac et la fréquence des mutations du gène *p53*. 91 échantillons en provenance de patients atteints d'un cancer épidermoïde de l'œsophage ont été analysés puis regroupés en trois groupes : non fumeur, fumeur modéré (moins de 20 cigarettes par jour), gros fumeur (plus de 20 cigarettes par jour). La fréquence des mutations était respectivement de 20%, 50% et de 80%.

Dans les cancers de l'œsophage, les mutations de *p53* sont fréquentes et précoces [Bennett et al., 1992], [Gao et al., 1994], [Wang et al., 1993]. Au sein de la muqueuse œsophagienne, le type de mutation rencontré dans les lésions préneoplasiques peut différer de celui localisé dans la tumeur. Cet aspect met en lumière la contribution de facteurs exogènes au processus de cancérisation à différents niveaux de la muqueuse œsophagienne. Le profil mutationnel est différent de celui observé pour les autres cancers notamment ceux du tractus digestif (voir figure 3.1).

Les mutations les plus fréquemment rencontrées dans le cancer épidermoïde se situent au niveau du codon 175 (8%), 193,194,195 (8% tous réunis), 248 (3%), de 273 (3%) et 270 (4%). Ce dernier codon est intéressant dans la mesure où il est rarement muté dans les autres cancers (0,4%) et jamais dans les adénocarcinomes de l'œsophage. L'analyse des mutations de *p53* dans des échantillons provenant de régions de haute incidence, la Normandie et l'Uruguay montre une prévalence de transversion G→T chez les consommateurs de tabac et d'alcool dans les régions conservées de *p53* [Hollstein et al., 1991]. Toutefois par comparaison avec d'autres tumeurs solides, les mutations au niveau des bases A:T (non

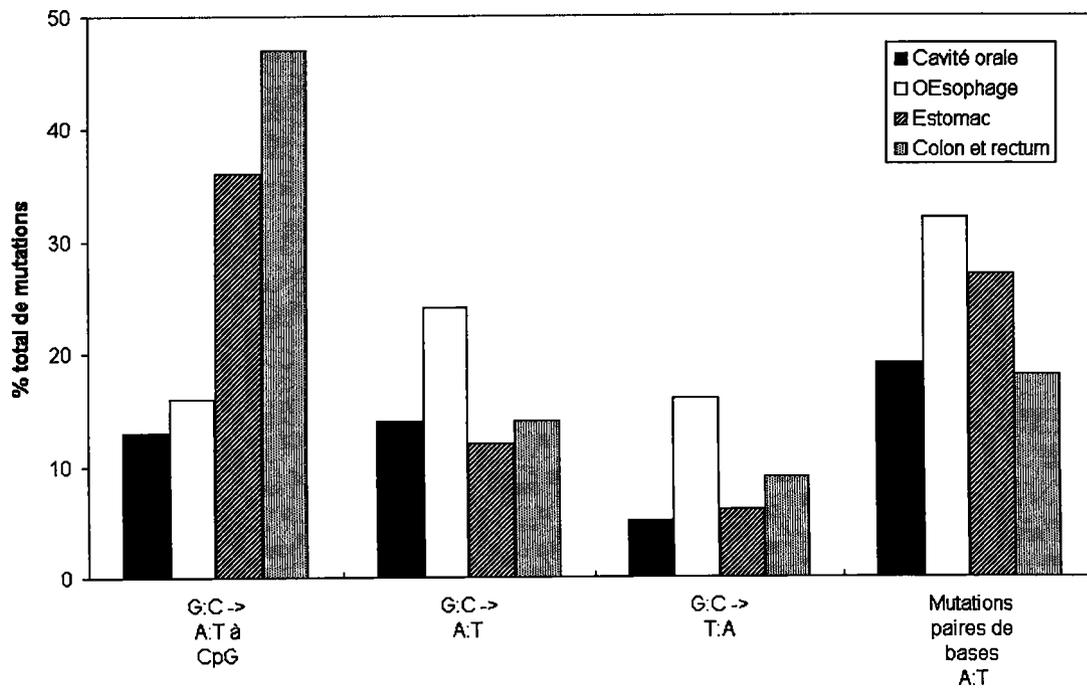


FIG. 3.1 - Spectre mutationnel de P53 dans les cancers du tractus digestif [Hollstein et al., 1994b]

localisées sur les sites CpG) sont les plus fréquentes dans le cancer épidermoïde de l'œsophage (31% de toutes les mutations). Ces mutations refléteraient une forte dépurination de l'ADN à la suite d'une réaction de carcinogène avec l'adénine et /ou d'une exposition avec des génotoxiques tels que l'acétaldéhyde (métabolite de l'éthanol). D'autres auteurs mentionnent également une différence dans le type de mutation entre les cancers squameux et les adénocarcinomes de l'œsophage [Collet et al., 1995], [Montesano et al., 1996]. Pour ce dernier les transitions G vers A sur les site CpG sont plus nombreuses, et les mutations au niveau des base A:T et de type transversion G vers T sont rarement rencontrées. Ceci suggère l'intervention de facteurs différents dans la genèse de ces deux types de cancer [J.Blot, 1997].

Polymorphismes génétiques des enzymes du métabolisme des carcinogènes du tabac

La relation entre les polymorphismes génétiques des gènes *CYP* et une susceptibilité au cancer de l'œsophage est peu documentée par comparaison avec le cancer du poumon. Quelques études ont incriminé les génotypes CD et c1c2 du *CYP2E1* comme facteurs de susceptibilité génétique pour les cancers du tractus digestif [Tsutsumi et al., 1993, Uematsu et al., 1992, Lucas et al., 1996]. Cependant une étude récente japonnaise a recherché d'éventuels facteurs génétiques de susceptibilité, responsables de l'apparition du cancer de l'œsophage épidermoïde, parmi les polymorphismes *CYP2E1*, *CYP1A1* et *GSTM*. Aucun des trois polymorphismes n'a pu être pris en compte [Morita et al., 1997].

3.3 Alcool et cancer

L'association alcool et cancer est établie depuis plusieurs décennies. Il est un facteur de risque pour différents types de cancers : cancer du foie, de l'estomac, de l'œsophage, du nasopharynx, du larynx, du poumon, du rein, du pancréas, du sein du colon. Les mécanismes de l'effet carcinogène de l'alcool est très discuté. En effet, chez l'animal la consommation isolée de l'alcool n'est pas carcinogène. Cependant, les diverses observations réalisées par les études *in vitro* et *in vivo* ont permis d'étudier les différents mécanismes par lesquels les boissons alcoolisées exerceraient un effet carcinogène indirecte [Driver and Swann, 1987], [Blot, 92].

3.3.1 Déficits nutritionnels associés à la prise d'alcool

Le déficit alimentaire accompagnant généralement l'alcoolisme chronique peut contribuer au processus tumoral. La prise d'alcool peut diminuer l'absorption et augmenter l'excrétion de certains nutriments; par exemple le zinc, la vitamine A, la vitamine B12, l'acide folique, la thiamine et la pyridoxine [Ahmed, 1995]. Le rôle protecteur de ces nutriments étant diminué, les fonctions cellulaires dans les tissus cibles sont perturbées voire altérées. Une augmentation de l'exposition à certains carcinogènes peut alors apparaître. Ces différentes observations sont en accord avec les études épidémiologiques qui signalent un rôle important de la consommation de fruits et de légumes frais dans la prévention du cancer de l'œsophage.

3.3.2 Rôle des congénères carcinogènes contenus dans les boissons alcoolisées

La variation du risque selon le type de boisson consommée suggère le rôle de congénères carcinogènes. Ainsi des fractions possédant une activité mutagène, attribuables à des produits non encore identifiés, ont été décelées dans les distillats de cidre de pomme. La présence de NOVs dans ces boissons à base de pomme ont été signalées à l'état de trace [Tuyns et al., 1980]. Des concentrations bien plus élevées ont par contre été mesurées dans les bières brunes. D'autres substances carcinogènes et mutagènes ont également été incriminées dans le processus tumoral : l'uréthane dans certains alcools de fruit, les mycotoxines dans la bière de maïs sud-africaine, les tannins du vin et des alcools de pomme, l'arsenic inorganiques, les résidus pesticides, mais aussi les produits carcinogènes naturels comme les aldéhydes, les phénols, l'acroléine ou les cétones [Benamouzig et al., 1993].

3.3.3 L'action de l'alcool en tant que solvant

Par son action de l'alcool, faciliterait l'accès des tissus cibles à d'autres carcinogènes mais également l'accès à la cellule. Des expériences *in vitro* ont montré l'apparition d'altérations de la fluidité et des constituants de la membrane plasmique (cholestérol, phospholipide, acides gras) après un traitement alcoolique chronique [Gutiérrez-Ruiz et al., 1995]. Le risque accru de tumeurs dans les tissus exposés directement à l'alcool et au tabac (cavité buccale, larynx, œsophage...) tend à confirmer cette hypothèse.

3.3.4 Influence de l'alcool sur le métabolisme des carcinogènes du tabac

Augmentation de l'activation de certains carcinogènes, induction du CYP2E1

L'alcool peut induire des enzymes hépatiques responsables du métabolisme des carcinogènes du tabac, en particulier le cytochrome P450 2E1 qui active des nitrosamines spécifiques du tabac. La régulation de ce cytochrome est complexe : le mécanisme dépend de la nature de l'inducteur, de l'âge, du statut nutritionnel et hormonal. L'action de l'alcool illustre bien cette complexité : il peut induire directement le CYP2E1 et/ou indirectement en perturbant les mécanismes cellulaires hormonaux dépendants.

En effet, le CYP2E1 est inductible par une grande variété d'agents de structure diverse mais aussi par des changements hormonaux et métaboliques. L'induction de ce cytochrome P450 met en jeu des mécanismes très variés : une stabilisation de l'ARNm, une augmentation transcriptionnelle ou l'inhibition de la dégradation protéique [Koop and Tierney, 1990]. En ce qui concerne la régulation transcriptionnelle, il s'agit essentiellement d'une activation au moment de la naissance. Elle passe par la déméthylation (un jour avant la naissance et jusqu'à 10 semaines après) de résidus cytosine en amont du début de la transcription. Cette activation transcriptionnelle intervient également pour des taux élevés d'alcool dans le sang. Or le gène ne contient pas d'élément de réponse spécifique à l'alcool, cette activation serait un effet indirect, probablement due à des changements hormonaux ou nutritionnels. La régulation posttraductionnelle est la plus importante chez l'adulte. Elle est médiée par la stabilisation de la protéine par certains substrats spécifiques, souvent les inducteurs eux mêmes (c'est le cas de l'éthanol) qui inhibe la phosphorylation de l'enzyme et donc sa dégradation. Ce mécanisme augmente donc alors le taux d'apoprotéine sans passer par une élévation de la quantité d'ARNm du CYP2E1 [Koop and Tierney, 1990].

Inhibition du métabolisme hépatique des carcinogènes

L'existence d'une corrélation significative entre les taux de mortalité par alcoolisme et par cirrhose du foie, dans les régions françaises de haute incidence pour le cancer de l'oesophage, ont suggéré l'importance de la clairance hépatique dans l'étiologie de ce cancer. En effet l'alcool est capable par différents processus

toxiques de bloquer la détoxification des xénobiotiques dans le foie et de modifier la clairance de ces substances [Ahmed, 1995]; ceci favorise et augmente par conséquent, l'exposition des tissus extrahépatiques aux carcinogènes. Il est à noter que l'alcool est à la fois un substrat et un inducteur du CYP2E1. Il peut inhiber également l'activation des carcinogènes au niveau du foie par simple compétition vis à vis de cet isoenzyme.

Influence des alcools sur l'apparition des tumeurs de l'œsophage, induites par des nitrosamines et sur leurs effets mutagènes

Plusieurs études ont rapporté l'influence de l'alcool sur la cancérogénicité des nitrosamines aux niveaux de l'activation métabolique et de la formation des adduits de ces carcinogènes. Il s'est avéré, par exemple pour la NNN induisant des tumeurs à la fois dans la cavité nasale et dans l'œsophage, un changement d'incidence selon la voie d'administration. Par voie intrapéritonéale, la NNN n'induit pas de tumeur dans les deux organes chez l'animal traité à l'alcool; par contre lorsque la nitrosamine est ingérée per os, l'éthanol augmente l'incidence des tumeurs dans la cavité nasale et diminue celle dans l'œsophage [Castonguay et al., 1984]. Certaines équipes ont déjà rapporté l'importance du type d'alcool sur le métabolisme des nitrosamines et le taux d'alkylation de l'ADN induit par ces carcinogènes. Par exemple, le 2-méthylbutanol exerce par compétition un effet inhibiteur plus important que celui de l'éthanol sur le métabolisme de la NMBA [Craddock and Henderson, 1991]. Par ailleurs, le rythme de la coadministration de l'alcool influence fortement le taux d'alkylation. L'alcool administré avant, pendant ou après le traitement à la nitrosamine modifie le taux d'adduits au sein de l'épithélium œsophagien [Yamada et al., 1992], [Kouros et al., 1983], [Peng et al., 1982].

3.3.5 Augmentation de la prolifération cellulaire

L'éthanol et les alcools de haut poids moléculaires, également présents dans les eaux de vie, sont capables d'augmenter le taux de prolifération cellulaire de l'épithélium œsophagien. Craddock [Craddock, 1993] fait état de plusieurs expériences décrivant ce mécanisme. Ainsi l'injection d'alcool par voie intraveineuse ou par voie orale chez des volontaires humains tend à diminuer le péristaltisme œsophagien. Ceci prolongerait le contact des composés chimiques (carcinogènes et ou inflammatoires) avec la surface du lumen et favoriserait l'endommagement

de la muqueuse œsophagienne. Des études chez les animaux ayant subi une intoxication chronique à l'alcool montrent un doublement de l'index de prolifération accompagné d'un épaissement de l'épithélium, sans modification de la morphologie des cellules. Dans ce contexte, la prolifération cellulaire correspond à une hyperplasie restauratrice. Au vue de ces résultats, il est probable que la prolifération cellulaire soit le signe d'un métabolisme de l'alcool *in situ* et non d'une action directe de l'alcool. La relation alcool/cancer résiderait alors dans l'activité des métabolites (aldéhydes) des différents alcools. En effet l'éthanol est métabolisé principalement en acétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase (ADH) et à un moindre degré par le CYP2E1 [Couzigou, 1996]. L'acétaldéhyde est carcinogène et tératogène chez l'animal [IARC, 1985]. Il induit des échanges de chromatides soeurs et augmentent le taux d'aberrations chromosomiques dans les cellules en culture [Ahmed, 1995]. Il est capable d'alkyler de nombreuses macromolécules (albumine, microtubule, hémoglobine), de perturber l'homéostasie de la cellule (en particulier en modifiant le taux de calcium intracellulaire), favoriser l'activité des facteurs de croissance et par conséquent augmenter la prolifération cellulaire. L'acétaldéhyde peut également interférer avec les enzymes participant à la détoxification des carcinogènes (diminution de l'activité de la O⁶-méthylguanine transférase) et des radicaux libres (liaison à une cystéine du glutathion). Ceci influence notablement le taux de produits oxydants dans les cellules et l'apparition d'altérations génétiques [Ahmed, 1995].

3.3.6 Alcool et polymorphisme génétique

Etant donné la relation entre l'incidence du cancer de l'œsophage et les pathologies hépatiques associées à l'alcool, il est possible qu'une susceptibilité particulière à la cirrhose alcoolique soit corrélée avec ce type de cancer.

La recherche des gènes impliqués dans l'alcoolisme est rendue difficile par le fait qu'il s'agit d'une intoxication chronique fréquente et complexe caractérisée par une hétérogénéité clinique et génétique, une hérédité polygénique et l'existence de phénocopies (alcoolisme sans déterminant génétique). De plus, le facteur génétique est fortement associé avec les facteurs environnementaux; des variations de la fréquence de l'alcoolisme sont observées dans des populations génétiquement stables.

Les enzymes intervenant dans le métabolisme de l'alcool sont l'alcool déshydrogénase (ADH) divisée en trois classes, le cytochrome P450 2E1 et l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). L'existence de polymorphisme génétique pour

la cirrhose alcoolique a été décrite [Couzigou, 1996]. Ainsi la présence des allèles ADH2-2, l'ADH3-1 et l'ALDH2-2 augmenterait le risque de cirrhose dans la population asiatique. Chez les caucasiens, les données épidémiologiques sont discordantes pour l'allèle ADH3-1, et pour l'allèle ADH2-2. Elles doivent être complétées par d'autres études.

Le rôle du CYP2E1 dans la production de radicaux libres via la voie de lipopéroxydation et la genèse des lésions alcooliques hépatiques ont conduit à rechercher une implication du polymorphisme du CYP2E1 dans les maladies hépatiques liées à l'alcoolisme. Chez les caucasiens, les premières études ne retrouvent pas d'association entre la fréquence des allèles c1 et c2, et le développement de pathologie hépatique; à l'exception des travaux de Pirmohamed [Pirmohamed et al., 1995], pour qui l'implication de l'allèle c2 se caractériserait par un risque relatif de 4. Chez les japonais, deux études retrouvent une association entre le polymorphisme du CYP2E1 (allèle c1 et c2) et l'existence de cirrhose alcoolique mais avec des résultats opposés [Tsutsumi et al., 1994], [Maezawa et al., 1994].

3.3.7 Alcool et mutations de *p53*

L'alcool et le tabac sont les deux facteurs de risque incriminés dans le processus du cancer épidermoïde de l'œsophage dans plusieurs régions du monde. Comme nous l'avons mentionné précédemment, il existe une forte relation entre le spectre mutationnel de *p53* et le tabac. En ce qui concerne l'alcool la relation est moins claire. On note toutefois une fréquence des mutations plus élevée chez les buveurs (moins d'un litre de vin par jour) (51%) et les " gros " buveurs (58%) que chez les non buveurs (32%) [Montesano et al., 1996]. De même, les mutations des base A:T pourraient résulter de l'action de l'acétaldéhyde avec l'ADN. Cependant, il est actuellement très difficile de mesurer le réel impact de l'alcool et du tabac sur les altérations du gène *p53* étant donné qu'il sont généralement consommés ensemble.

3.4 Conclusion

La présence d'adduits dans la muqueuse œsophagienne, l'augmentation de la prolifération cellulaire et la distribution du spectre mutationnel de *p53* dans les tumeurs indiquent l'implication de carcinogènes exogènes dans le processus

tumoral du cancer épidermoïde. Elle conforte les données épidémiologiques mentionnant le rôle d'agents environnementaux en particulier l'alcool et le tabac. Cependant l'ensemble de ces données ne suffisent pas à expliquer l'ampleur des variations géographiques et sociales de l'incidence de ce cancer. Les interactions entre les altérations cellulaires, génétiques et l'exposition à l'alcool et au tabac doivent être approfondies.

Chapitre 4

Objectifs de la thèse

La caractéristique épidémiologique du cancer épidermoïde de l'œsophage est l'extraordinaire variabilité de son incidence à travers le monde. La Basse-Normandie est une des régions à haut risque; le taux d'incidence de ces cancers chez l'homme est le plus élevé d'Europe. La responsabilité de la consommation d'alcool et de tabac dans l'apparition du cancer de l'œsophage dans les pays développés a été établie depuis longtemps, mais elle ne rend pas compte de la grande variabilité de l'incidence. En outre les bases moléculaires des effets synergiques de ces deux facteurs sont inconnues.

Parmi les nombreux carcinogènes chimiques contenus dans le tabac, certaines nitrosamines sont capables d'induire des cancers de l'œsophage chez différentes espèces animales. Après activation par des cytochromes P450, ces nitrosamines sont capables d'alkyler l'ADN et de créer par exemple des adduits de méthylation. Certains de ces adduits sont responsables de mutations qui conduiraient à la cancérisation (cf chapitre 1 et 3).

L'éthanol n'est pas carcinogène chez l'animal [IARC, 1988]. Toutefois un lien a pu être établi entre les effets de l'éthanol, ou du déficit nutritionnel qui accompagne une intoxication éthylique chronique, et une réduction du métabolisme hépatique des nitrosamines. Au cours de ces expériences, une augmentation de l'alkylation de l'ADN a été observée dans l'œsophage, après traitement des animaux avec des nitrosamines. On sait, en outre, que le cytochrome P4502E1, capable de métaboliser des nitrosamines en dérivés carcinogènes, est inductible par l'éthanol dans le foie humain et animal. Ces données conduisent à une hypothèse selon laquelle les altérations des fonctions hépatiques et les déficits nutritionnels associés à l'alcoolisme chronique, viendraient inhiber le métabolisme hépatique

des nitrosamines, en particulier sur l'expression des cytochromes P450 (notamment le CYP2E1) dans les microsomes de foie et de l'œsophage, et sur le taux d'adduits de méthylation de l'ADN dans ces organes?

- Est-il possible de mettre en évidence dans la muqueuse œsophagienne humaine l'expression des cytochromes P450 qui interviennent dans le métabolisme des carcinogènes du tabac?
- L'étude des immunomarquages d'un marqueur de prolifération et de la protéine p53 associés aux données épidémiologiques peut-elle rendre compte de l'existence d'une augmentation de la prolifération à la suite d'une exposition directe de la muqueuse œsophagienne aux boissons alcoolisées bues chaudes?

Deuxième partie

Travaux de recherche

Chapitre 5

Etude *in vivo* chez le rat

5.1 Introduction

La responsabilité spécifique du cidre et de ces distillats dans l'apparition du cancer de l'œsophage en Basse-Normandie, a souvent été évoquée, mais n'a jamais été clairement démontrée expérimentalement. La composition du calvados en alcool de haut poids moléculaire (propanol, 2-et 3-méthylbutanol...) et d'autres composés (acides, aldéhydes, esters, méthanol, acroléines ...) générés au cours de la distillation dépend fortement du mode de fabrication. La teneur de ces produits est contrôlé par le service de la répression des fraudes. En Normandie, il existe une production industrielle, à côté de laquelle subsiste une production dite fermière qui échappe à tous les contrôles imposés au Calvados commercialisé. La concentration en composés décrits ci-dessus est plus élevée dans les eaux de vie dites de fabrication fermière; la totalité des produits générés au cours de la distillation sont totalement préservés, alors que dans l'industrie, les composés issus du début et de la fin de la distillation sont éliminés. Par conséquent la composition des différentes eaux-de-vie dépendra non seulement du mode de fabrication mais aussi de leur origine. Certaines équipes ont déjà rapporté l'importance du type d'alcool, notamment le calvados, sur le taux d'alkylation de l'ADN après co-administration d'alcool et de nitrosamines chez le rat [Yamada et al., 1992], [Peng et al., 1982], [Kouros et al., 1983]. Une autre étude [Craddock, 1993] mentionne l'influence particulière des alcools de haut poids moléculaire sur le métabolisme des nitrosamines à tropisme œsophagien. Par exemple le 2-méthylbutanol exerce par compétition un effet inhibiteur sur le métabolisme de la NMBA plus important que celui de l'éthanol seul. Ainsi il est probable que des composés autres que l'éthanol présents dans les boissons issues de pomme puissent jouer un rôle prédominant dans la carcinogenèse de l'œsophage.

Le but de la présente étude est donc d'étudier l'influence de différentes boissons alcoolisées sur l'expression des P450, en particulier le CYP2E1, et sur le métabolisme des nitrosamines dans le foie et l'œsophage de rat. Le rat a été choisi comme modèle animal du fait d'une similitude avec l'homme au niveau de l'induction du CYP2E1 hépatique, après consommation d'alcool [Song et al., 1986]. Le choix de la nitrosamine s'est porté naturellement vers la NMBA du fait de son action spécifique sur l'œsophage.

Dans cette perspective, nous avons examiné dans un premier temps l'induction du CYP2E1 dans le foie de rats traités avec diverses boissons alcoolisées pendant trois jours. L'expression du CYP2E1 dans la muqueuse œsophagienne a été étudiée en parallèle. Dans un deuxième temps, il nous apparaissait indispensable d'élargir l'étude à d'autres voies de métabolisation. Pour ce faire, nous avons vérifié l'effet du calvados fermier et de l'éthanol sur les voies d'activation et de détoxication de la NMBA. Après avoir mesuré l'activité NMBA déméthylase dans la muqueuse œsophagienne, le taux de méthylation à l'ADN a été quantifié par le dosage de la 7-méthylguanine dans le foie et l'œsophage de rats traités avec une injection intrapéritonéale de NMBA après une exposition aux boissons alcoolisées.

5.2 Essais préliminaires concernant la préparation des microsomes

Le sacrifice des animaux peut s'effectuer soit par décapitation, soit par anesthésie. Pour des raisons pratiques (nécessité d'un matériel performant pour la première méthode), nous préférons tuer les animaux par anesthésie plutôt que par décapitation. Aussi, avant que ne débute l'étude, il était nécessaire de vérifier que le sacrifice des animaux par inhalation à l'éther n'avait pas d'influence sur l'activité déméthylase du CYP2E1. En effet, des essais préliminaires ont donc été effectués sur deux groupes de deux rats. Le premier groupe a été tué par décapitation, l'autre par inhalation à l'éther. Après avoir sacrifié les animaux, les foies ont été prélevés puis immédiatement utilisés pour la préparation des microsomes.

Les résultats obtenus dans le tableau 5.1 ne montrent aucune variation significative entre les activités catalytiques des microsomes hépatiques des animaux sacrifiés par décapitation et de ceux tués par inhalation. A la suite de cette vérification, nous avons donc décidé de sacrifier les animaux par inhalation à l'éther pour des raisons pratiques.

Sacrifice des rats	DMN déméthylase	
	0,1 mM	4 mM
décapitation	0,35 ± 0,05	1,02 ± 0,04
	0,38 ± 0,03	1,06 ± 0,26
inhalation à l'éther	0,53 ± 0,10	1,21 ± 0,08
	0,41 ± 0,13	1,07 ± 0,18

TAB. 5.1 – Effets de la décapitation et de l'inhalation sur le métabolisme de DMN par des microsomes hépatiques de rats. Les activités DMN déméthylase sont exprimées en nmoles de formaldéhyde formées par minute et par mg de protéine. Chaque valeur correspond à la moyenne et aux variations standards de trois essais.

5.3 Etude *in vivo* de l'influence de différentes boissons alcoolisées sur l'expression du CYP2E1 chez le rat

L'influence des différentes boissons alcoolisées sur l'expression des cytochromes P450 au niveau du foie et de l'œsophage a été analysée par la mesure des activités enzymatiques en utilisant des substrats spécifiques et par l'étude des protéines grâce à des anticorps spécifiques.

5.3.1 Induction du CYP2E1 hépatiques par différentes boissons alcoolisées

Les résultats sont présentés dans l'article ci-après : " Absence of a differential induction of cytochrome P450 2E1 by different alcoholic beverages in rats : implications for the aetiology of human oesophageal cancer", publié dans Archives of Toxicology.

Mathilde Lechevrel · Christopher P. Wild

Absence of a differential induction of cytochrome P450 2E1 by different alcoholic beverages in rats: implications for the aetiology of human oesophageal cancer

Received: 10 February 1997 / Accepted: 26 May 1997

Abstract Alcohol is an important risk factor for human oesophageal cancer. There is evidence from epidemiological studies that some specific alcoholic drinks, e.g. Calvados apple brandy, are associated with a greater risk than others. Alcohol induces cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) and the hypothesis was tested that different alcoholic beverages, containing a variety of alcoholic compounds, could differentially induce expression of cytochrome P450 enzymes. Twelve groups of five rats each were treated for 3 days with different alcoholic beverages (ethanol alone, whisky, farm-produced or commercial Calvados brandy, beer, cider, wine) adjusted to 4, 10 or 20% of ethanol in drinking water. Immunoblotting using a monoclonal antibody specific for rat CYP2E1 revealed a single protein band in liver microsomes. Densitometric quantitation of microsomal proteins demonstrated a significant two-, three- and sixfold increase in band intensity after treatment with ethanol concentrations of 4, 10 and 20% respectively, compared to control rats drinking water alone. There was a dose-dependent increase in liver microsomal metabolism of CYP2E1 substrates (para-nitrophenol and dimethylnitrosamine) in ethanol-treated rats. However, there were no significant differences in the level of CYP2E1 protein or enzymatic activity between the different alcoholic beverages at the same ethanol concentration. There was a slight increase in hepatic CYP1A-related enzymatic activities in the alcohol-treated rats compared to the controls, but no difference between the treated groups either with dose of ethanol or type of beverage. These data show that induction of CYP2E1 with acute

alcohol treatment is predominantly determined by the ethanol content of the beverage.

Key words Alcohol · Cytochrome P450 2E1 · Oesophageal cancer · *N*-Nitrosamines

Introduction

Squamous cell carcinoma of the oesophagus is characterised by a marked geographical variation in incidence. In Europe, the male incidence rates for this cancer are highest in northern France, particularly in the department of Calvados (Parkin et al. 1992). In both Europe and North America, the major risk factors are alcohol and tobacco consumption with a multiplicative increase in risk in individuals exposed to both of these risk factors (Tuyns et al. 1977; Yu et al. 1988).

Despite the strong epidemiological data implicating alcohol and tobacco in the aetiology of oesophageal cancer, the mechanism of this multiplicative interaction remains unclear. Alcohol itself is not carcinogenic in experimental animals (IARC 1988). However, alcohol is known to induce hepatic cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in man (Perrot et al. 1989; Takahashi et al. 1993) and this isoenzyme metabolises many chemical carcinogens including *N*-nitrosamines (NNO) present in tobacco and the diet (Yang et al. 1990; Crespi et al. 1991; Mirvish 1995). NNO induce oesophageal cancer in animals (Craddock 1993) and were also associated in a recent epidemiological study with an increased risk of oesophageal cancer (Rogers et al. 1995). In addition, the promutagenic DNA methylation adduct, O⁶-methyldeoxyguanosine (O⁶-medG) is formed by methylating NNO and has been detected in human oesophageal mucosa (Umberhauer et al. 1985).

The influence of alcohol on NNO metabolism could therefore represent one mechanism of interaction between alcohol and tobacco, although this interaction is likely to be complex and a number of possible effects can

M. Lechevrel · C.P. Wild¹ (✉)
Unit of Environmental Carcinogenesis,
International Agency for Research on Cancer,
150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France

Present address:

¹ Molecular Epidemiology Unit, Research School of Medicine,
Algeron Firth Building, University of Leeds,
Leeds LS2 9JT, UK

be envisaged. Firstly, alcohol may induce CYP2E1 extra-hepatically, as reported for rat oesophagus and other alimentary tract organs (Shimizu et al. 1990), and consequently result in increased carcinogen metabolism in these extrahepatic organs. Secondly, since ethanol is a substrate for CYP2E1, concomitant administration of ethanol and NNO in rats can lead to increased extrahepatic carcinogen exposure by an inhibition of hepatic NNO metabolism, resulting in a reduced first-pass clearance (Swann et al. 1987). A third possibility is that cirrhosis induced by chronic alcohol intake could result in a reduced metabolic capacity in the liver and as a result extrahepatic exposure to carcinogens is increased.

Certain epidemiological studies have suggested an elevated risk to be associated with specific alcoholic drinks in northern France, particularly cider and its distillate, Calvados brandy (Tuyns et al. 1979), but this suggestion has never been fully evaluated. Calvados brandy contains many higher alcohols (propanol, 2- and 3-methylbutanol, etc.) in addition to a variety of other compounds including acids, aldehydes, esters, methanol, tannins, etc. (see Craddock 1993). While the composition of commercial Calvados is subjected to routine analysis, the farm-produced Calvados consumed locally is not subjected to such control. The composition of the latter drinks is likely to be more variable and to depend on the distillation process used, which can vary considerably between producers. Craddock (1993) has shown that some higher alcohols, e.g. 2-methylbutanol, exert a stronger inhibition on NNO metabolism *in vitro* than ethanol (Craddock and Henderson 1991). In addition, Yamada et al. (1992) reported that certain alcoholic drinks, including Calvados brandy, were more efficient than ethanol alone in increasing extrahepatic DNA alkylation when administered together with *N*-nitroso-*N*-methylbenzylamine (NMBA) to rats.

Based on the above observations, our hypothesis was that CYP2E1 could have a higher affinity for some alcohols present in alcoholic beverages, such as Calvados brandy, than for ethanol. These higher alcohols may therefore be more efficient inducers of CYP2E1 than ethanol, thus leading to particularly high levels of activity after exposure to alcoholic drinks containing these compounds. We addressed this hypothesis by examining the influence of different alcoholic beverages on levels of cytochromes P450 in the rat. Rat liver was chosen as a model because of the similarity to human with respect to the hepatic induction of CYP2E1 following alcohol intake (Perrot et al. 1989; Takahashi et al. 1993; Roberts et al. 1994; Wrighton et al. 1987).

Materials and methods

Reagents

Chemicals were obtained from the following sources: Resorufin methyl ether (methoxyresorufin) was from Molecular Probes, Eugene, Ok., USA. All reagents for sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were from Biorad

Table 1 Ethanol content of alcoholic beverages

Type of alcoholic beverage	Ethanol (g/l)
Beer	33.9
Cider	37.8
Red wine	91.3
Whisky	247.5
Commercial Calvados	370.9
Farm-produced Calvados	392.9

Laboratories, Richmond, Calif., USA. Para-nitrophenol (PNP) *N*-nitroso-dimethylamine (NDMA) and NADPH were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, Mo., USA. Absolute ethanol was from Merck, Darmstadt, Germany. 7-Ethoxyresorufin, NADP, glucose-6-phosphate (disodium salt), glucose-6-phosphate dehydrogenase, RNase A and T₁ were purchased from Boehringer Mannheim, Meylan, France. All other chemicals were of the highest grade commercially available.

Alcoholic beverages

Farm-produced Calvados was kindly provided by Dr P. Gaduchon, Centre François Baclesse, Caen, France. All other alcoholic beverages were from commercial sources. Ethanol concentrations of undiluted beverages (Table 1) were determined by gas chromatography (Delsi Nermag DN200) with a flame spectrophotometer in the Toxicology Unit of Dr Leroyer, Centre Hospitalier Universitaire, Caen, France.

Animals and treatment

Male BDIV rats with average body weight of 200 g were from the IARC animal house and maintained on standard laboratory diet with water provided *ad libitum*. Experimental protocols were approved by the IARC Animal Care and Use Committee. Rats were divided into 12 groups of five animals and each group was treated for 3 days with different beverages diluted to yield 4, 10 or 20% of ethanol (v/v) in the drinking water. The alcoholic beverages adjusted to 4% were ethanol alone, red wine, beer, cider, commercial Calvados, farm-produced Calvados and whisky. Those adjusted to 10% and 20% were ethanol alone and farm-produced Calvados. Control rats received water alone. Throughout this report the groups are referred to by the percentage final ethanol concentration and the alcoholic drink concerned, e.g. 10% farm-produced Calvados is Calvados diluted into water to give an ethanol concentration of 10%.

The animals were housed either two or three rats per cage and the drinking water consumption was monitored for rats in each cage over 3 days. The average water consumption per rat in the control group was 27 ml/day and for the different treatment groups at 4% ethanol varied between 22 and 29 ml/day, except for the beer group, which consumed an average of 34 ml/day. With 10 and 20% alcohol the consumptions were lower at between 11 and 21 ml/rat per day. A 4% ethanol concentration would be equivalent to approximately 3 g ethanol/kg body weight per day. After killing the rats by ether anaesthesia livers were removed and immediately used for microsome preparation.

Monooxygenase activities

Microsomes were prepared by differential centrifugation as described previously (Camus et al. 1993). Protein and total P450 content of microsomal preparations were determined according to the methods of Lowry et al. (1951) and Omura and Sato (1964) respectively. The liver microsomes of individual rats were prepared from freshly isolated tissues and the preparations were frozen in aliquots to avoid repeated freezing and thawing when testing different activities.

NDMA demethylase activities were determined as previously described (Castonguay et al. 1991) with slight modifications. The assay mixture contained liver microsomal protein (0.6 mg) in 1 ml final volume; 70 mM TRIS-HCl, pH 7.4, 14 mM MgCl₂, 215 mM KCl, and an NADPH-generating system (10 mM glucose-6-phosphate, 0.4 Units of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 0.4 mM NADP); the NDMA concentration was 4 mM. The mixture was incubated for 30 min at 37 °C in a shaking water bath and the reaction was stopped by addition of 100 µl 25% ZnSO₄ and 100 µl saturated Ba(OH)₂. After centrifugation, 0.7 ml of the supernatant was used to detect formaldehyde (Nash 1953).

For measurement of CYP2E1 activity by PNP hydroxylation (Reinke and Moyer 1985), the assay mixture contained 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 5 mM glucose-6-phosphate, 1 Unit of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 0.5 mM NADP, 0.2 mM PNP and 0.5 mg of microsomal protein in a final volume of 1 ml. After incubation for 15 min at 37 °C, reactions were terminated by the addition of 0.25 ml HClO₄. The precipitated proteins were removed by centrifugation and 1 ml of the supernatant was mixed with 0.1 ml of 10 M NaOH for spectrophotometric measurement of 4-nitrocatechol at 546 nm.

The activities of 7-ethoxyresorufin deethylase (EROD) and methoxyresorufin demethylase (MROD), corresponding to CYP1A1/2, were determined by measuring the dealkylation of 7-ethoxyresorufin and methoxyresorufin (1 µM substrate concentration in each case) using a method adapted from Burke et al. (1985). Negative controls for each enzymatic activity comprised all reaction components other than substrates.

Immunoblotting

SDS-PAGE and immunoblot analysis were performed according to the manufacturers instructions (Biorad) except for the immunodetection, which was by the ECL™ method (Amersham, Buckinghamshire, UK). Antibodies used for this study were as follows: mouse monoclonal antibody (Mab) 1-98-1 to rat CYP2E1 was kindly donated by Drs S.S. Park and H.V. Gelboin (National Cancer Institute, Bethesda, Md., USA; Park et al. 1986) and polyclonal antibody raised to rat 2C6 (Forrester et al. 1992) was a kind gift from Professor C.R. Wolf, University of Dundee, UK. The secondary antibodies were either ImmunoPur^R goat antimouse IgG peroxidase conjugated (Pierce, Ill., USA) or anti-rabbit IgG peroxidase conjugated (Sigma), depending on the primary antibody. Rat CYP1A2 was analysed using a commercial immunoblotting kit specific for this isoenzyme (Amersham). The intensity of staining of P450 proteins was measured by densitometry (Biorad model GS670). For all immunoblots, microsomes from the same group of alcoholic treated rats were pooled with equal amounts of protein per rat included in the pooled sample.

Statistical analysis

The mean enzymatic activities in the different animal groups were compared by one-way analysis of variance (ANOVA), Student's *t*-test or alternate *t*-test where appropriate. All tests were two-tailed with a significance level of *P* = 0.05.

Results

The influence of different alcoholic drinks on cytochrome P450 expression in rat liver was examined by measuring enzymatic activities using specific substrates and by determination of P450 protein levels by immunoblotting. Ethanol in the drinking water at concentrations of 4%, 10% and 20% resulted in a dose-dependent increase in hepatic metabolism of two substrates specific for CYP2E1, namely PNP and NDMA (Fig. 1a, b).

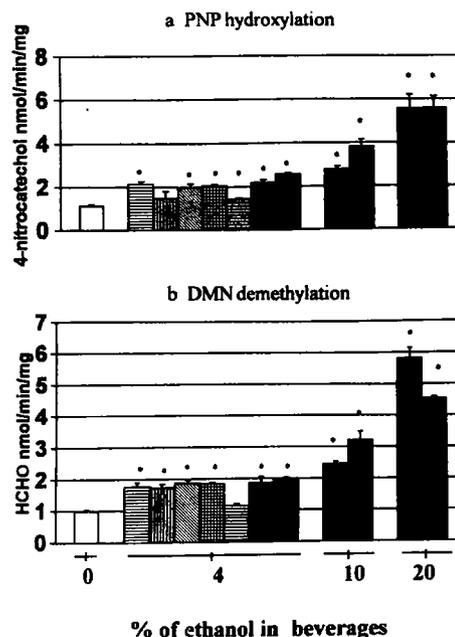


Fig. 1a, b In vitro metabolism of specific CYP2E1 substrates (a PNP, b NDMA) using hepatic microsomes. The columns (from left to right) show activities in rats receiving water, beer, red wine, cider, commercial Calvados, whisky, ethanol and farm-produced Calvados at 4%, and subsequently 10% ethanol, 10% farm-produced Calvados, 20% ethanol and 20% farm-produced Calvados. Data are presented as mean with standard error. Columns marked with an asterisk are significantly different to the water treated control group (*P* < 0.05). (PNP Para-nitrophenol; NDMA N-nitroso-dimethylamine)

NDMA demethylation and PNP hydroxylation were increased approximately two-, three- and fivefold compared to the water-treated control at the three respective doses. A comparison of the different alcoholic drinks adjusted to 4% ethanol in the drinking water showed that while all drinks increased both CYP2E1-related enzymatic activities compared to the control group, there were no significant differences between the groups in those activities (Fig. 1). Furthermore, a dose-response relationship was seen in the induction of these activities with farm-produced Calvados (4%, 10% and 20%) but the induction was not significantly different to that observed with an equivalent concentration of ethanol alone. The kinetic parameters of NDMA demethylation in the control group and rats treated with 20% ethanol alone or 20% farm-produced Calvados were determined: *K_m* values of 0.75 ± 0.45, 0.42 ± 0.08, 0.46 ± 0.14 mM, and *V_{max}* values of 0.75 ± 0.23, 2.73 ± 0.51 and 3.83 ± 0.67 nmol/min per mg were observed with the three respective groups.

Immunoblotting of hepatic microsomal CYP2E1 protein revealed a single band and there was a clear increase in this protein level with alcohol treatment (Fig. 2). The increase in the level of CYP2E1 protein with alcoholic drinks adjusted to 4% ethanol was approximately twofold compared to the control group, as determined by densitometry. The treatments with 10%

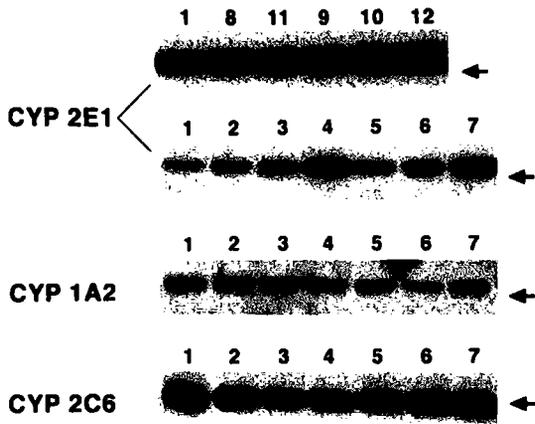


Fig. 2 Immunoblotting of hepatic CYP2E1, CYP1A2 and CYP2C6 after treatment with: 1 water, 2 ethanol 4%, 3 ethanol 10%, 4 ethanol 20%, 5 farm-produced Calvados 4%, 6 farm-produced Calvados 10%, 7 farm-produced Calvados 20%, 8 beer 4%, 9 cider 4%, 10 commercial Calvados 4%, 11 red wine 4%, 12 whisky 4%. The arrow indicates 53-kDa molecular weight marker. Microsomal protein loaded per well, 20 μ g

or 20% ethanol alone or farm-produced Calvados resulted in three- and sixfold increases compared to the control rats receiving water.

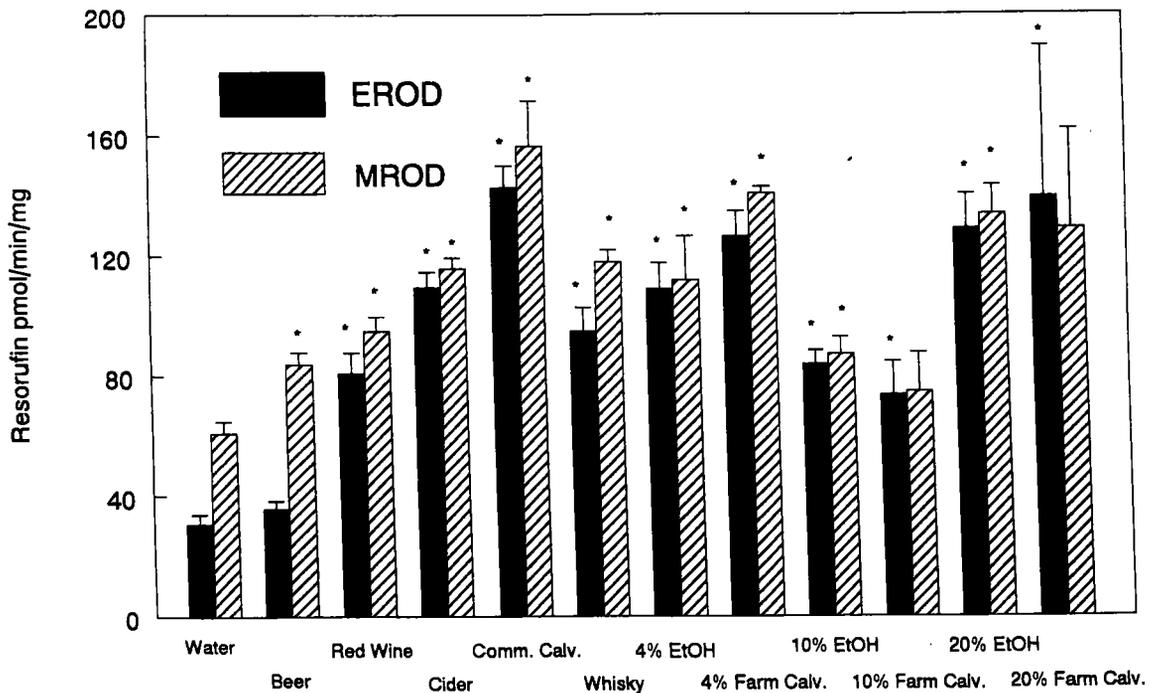
The hepatic microsomal metabolism of CYP1A substrates, EROD and MROD, were also examined in the different treatment groups (Fig. 3). In both cases there was an increase in the activity in all alcohol treated

and 20% farm Calvados (MROD activity). The increase was actually similar at 4% and 20% ethanol concentrations and was slightly lower at the intermediate dose of 10%, although this difference was not statistically significant. As in the case of the CYP2E1 substrates, there was no significant difference between the different alcoholic drinks at the same ethanol concentration. Immunoblotting using the commercial kit specific for CYP1A2 revealed a single band and no increase in protein level even after treatment with 20% ethanol (Fig. 2). Similarly for CYP2C6 no alteration in protein level was observed between the groups by immunoblotting (Fig. 2).

Discussion

Our objective was to test the hypothesis that the degree of induction of CYP2E1 differs depending on the nature of the alcoholic drink. This would help in understanding whether the risk of oesophageal cancer associated with alcohol consumption is at least partly determined by the altered efficiency of metabolism of carcinogens into DNA-binding metabolites in the liver or extrahepatic organs (see the Introduction); either one or a combination of the described mechanisms was envisaged.

One epidemiological study suggested an increased risk with apple-based alcoholic beverages, particularly cider and apple brandy (known as Calvados) compared to other alcoholic beverages (Tuyns et al. 1979) but the



groups compared to water treated controls; the values reached statistical significance in all groups except the group treated with beer (EROD activity) and both 10%

Fig. 3 Hepatic microsomal activities of EROD and MROD (for details see the Materials and methods). For further explanation see the legend to Fig. 1. (EROD 7-Ethoxyresorufin deethylase; MROD methoxyresorufin demethylase)

mechanism behind the increased risk remains unclear. For example, there was little evidence for significant levels of carcinogens (e.g. NNO) in apple-based alcoholic beverages (Tuyns et al. 1980). Alternative suggestions were that the high fusel alcohol content of the apple-based spirits could increase cell proliferation in oesophageal mucosa or could alter NNO metabolism (Craddock 1993). Craddock and Henderson (1991) demonstrated potent inhibition of the metabolism of N-nitroso-methylbenzylamine (NMBA) in vitro by higher alcohols, such as 2-methylbutanol and β -phenethylalcohol, which are present in Calvados brandy. The results described suggest that NNO metabolism may be influenced by alcohols other than ethanol. In the context of these observations we examined whether various alcoholic beverages containing different alcoholic compounds, can differentially induce the expression of liver cytochromes P450 in a rat model.

The level of hepatic microsomal CYP2E1 protein and enzymatic activity were assessed respectively by immunoblotting and by the use of two specific substrates (NDMA and PNP). The induction of this isoenzyme was found to be related to the ethanol concentration contained in the alcoholic beverages. No variation in induction of protein level or activity was observed between the different alcoholic beverages at the same ethanol concentration. The increase of CYP2E1 protein is probably the result of protein stabilization by ethanol as previously described (Yang et al. 1990; Song et al. 1989). The K_m and V_{max} of NDMA demethylase activity by hepatic microsomes from rats treated with ethanol and farm-produced Calvados were the same. EROD and MROD activities also increased significantly following acute ethanol administration, although the effect was independent of the dose of ethanol or type of alcoholic beverage. Other studies support the findings of this report that ethanol does not induce only CYP2E1 (Roberts et al. 1994). Overall, the data suggest that CYP2E1 induction in this model is due predominantly, if not exclusively, to ethanol and indicate that other compounds including higher alcohols contained in the various beverages are unlikely to be involved in this process.

It is important to determine whether the current model of hepatic CYP2E1 in the rat is of relevance to the human situation. The model was chosen because the CYP2E1 enzyme has a similar substrate specificity in rat and man (Song et al. 1986) and has been shown to be ethanol inducible in both human and rat liver. However, we cannot rule out the possibility that the enzymes from the two species are differentially affected by higher alcohols. It will also be of interest to examine further the relationship between alcohol consumption and oesophageal CYP2E1 expression in man with respect to a possible induction directly in the target organ (Nakajima et al. 1996). In the current study, we examined CYP2E1 by immunoblotting in microsomes from the rat oesophagus but saw no increase in levels with any of the alcoholic drinks employed, including ethanol alone (data not shown).

There are other possible explanations for the fact that the various alcoholic drinks did not result in a greater increase in CYP2E1 than treatment with ethanol alone. One is that the duration of alcohol treatment could have been too short or the concentration of alcoholic compounds too low to effect an induction of CYP2E1. For example, the amount of 2-methylbutanol consumed by each rat treated with 20% farm-produced Calvados can be calculated to be approximately 100–200 mg/kg per day, taking into account the dilution needed to achieve the desired ethanol concentration, whereas the ethanol dose amounted to ≤ 10 g/kg per day. Nevertheless, studies of in vitro metabolism showed that the inhibition of NMBA metabolism by higher alcohols is 100–1000 times more effective than ethanol (Craddock and Henderson 1991). Thus we would still have expected to see an additional effect in our in vivo study, particularly taking into account that we would be including all the higher alcohols present and not just one as in the in vitro experiment.

In studies of chronic ethanol administration, the importance of dietary adjustment for calorie intake is recognised; chronic treatment can lead to a protein deficiency, accompanied by a decrease in the cytochrome level (Lieber 1990; Wilson et al. 1986). In the present experiment no adjustment was made for caloric intake because of the short duration (3 days) of the treatment. Over this period the rats ingested between 3 and 10 g of ethanol/kg per day; metabolic effects appeared to be negligible given that the microsomal protein and P450 content are not decreased in alcohol-treated rats compared to control rats. In addition, no pathological lesions were observed in the livers of the rats from the different groups (data not shown).

The data presented in this paper do not support the hypothesis that a specific role for Calvados brandy in the aetiology of oesophageal cancer is due to a greater induction of carcinogen-metabolising enzymes. However, the data do not exclude a higher risk being associated with this beverage but acting via different mechanisms than the one examined here. Given the poor prognosis of oesophageal cancer patients, an understanding of the mechanisms underlying oesophageal carcinogenesis associated with alcohol and tobacco in humans would be valuable in developing primary prevention strategies.

Acknowledgements We would like to thank Dr G. Launoy from the Centre Hospitalier Universitaire, Caen, France, for assistance with the statistical analysis in this manuscript and Dr P. Gauduchon for his interest and support. The excellent technical assistance of Mr Alain Schouft is gratefully acknowledged. The work of M. Lechevreil was supported by IARC through a Special Training Award and by the Ministry of Research and Technology, France.

References

- Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haaparanta T, Mayer RT (1985) Ethoxy-, penthoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of the substrates to distinguish between different induced cytochromes P450. *Biochem Pharmacol* 34: 3337–3345

- Camus AM, Geneste O, Honkakoski P, Bereziat JC, Henderson CJ, Wolf CR, Bartsch H, Lang MA (1993) High variability of nitrosamine metabolism among individuals: role of cytochromes P450 2A6 and 2E1 in the dealkylation of *n*-nitrosodimethylamine and *n*-nitrosodiethylamine in mice and humans. *Mol Carcinogenesis* 7: 268–275
- Castonguay A, Pepin P, Briere N (1991) Modulation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1 butanone demethylation and denitrosation by rat liver microsomes. *Cancer Lett* 59: 67–74
- Craddock VM (1993) Alcoholic beverages and tobacco. In: Craddock VM (ed) *Cancer of the esophagus. Approaches to the etiology*. Cambridge Monographs on Cancer Research, Cambridge University Press, pp 117–169
- Craddock VM, Henderson AR (1991) Potent inhibition of oesophageal metabolism of *N*-nitrosomethylbenzylamine, an oesophageal carcinogen, by higher alcohols present in alcoholic beverages. In: O'Neill IK, Chen J, Bartsch H (eds) *Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, pp 564–567
- Crespi CL, Penman BW, Gelboin HV, Gonzalez FJ (1991) A tobacco smoke derived nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone is activated by multiple human cytochrome P450s including the polymorphic human cytochrome P4502D6. *Carcinogenesis* 12: 1197–1201
- Forrester LM, Henderson CJ, Glancey MJ, Back DJ, Park BK, Ball SE, Kitteringham NR, McLaren AW, Miles JS, Skett P (1992) Relative expression of cytochrome P450 isoenzymes in human liver and association with the metabolism of drugs and xenobiotics. *Biochem J* 281: 359–368
- International Agency for Research on Cancer (1988) *Monographs on the evaluation carcinogenic risks to humans: alcohol drinking*, volume 44. IARC, Lyon, France
- Lieber CS (1990) Mechanism of ethanol induced hepatic injury. *Pharmacol Ther* 46: 1–41
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall FJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275
- Mirvish SS (1995) Role of *N*-nitroso compounds (NOC) and *N*-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett* 93: 17–48
- Nakajima T, Wang RS, Nimura Y, Pin YM, He M, Vainio H, Murayama N, Aoyama T, Iida F (1996) Expression of cytochrome P450s and glutathione *S*-transferases in human esophagus with squamous-cell carcinomas. *Carcinogenesis* 17: 1477–1481
- Nash T (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem J* 55: 416–421
- Omura T, Sato R (1964) The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes: solubilization purification and properties. *J Biol Chem* 239: 2379–2385
- Park SS, Ko Y, Patten C, Yang CS, Gelboin HV (1986) Monoclonal antibodies to ethanol induced cytochrome P450 that inhibit aniline and nitrosamine metabolism. *Biochem Pharmacol* 35: 2855–2858
- Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao Y-T, Ferlay J, Powell J (1992) *Cancer incidence in five continents*, volume VI. IARC Scientific Publication 120. IARC, Lyon, France
- Perrot N, Nalpas B, Yang CS, Beaune PH (1989) Modulation of cytochrome P450 isozymes in human liver, by ethanol and drug intake. *Eur J Clin Invest* 19: 549–555
- Reinke LA, Moyer J (1985) *p*-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug Metab Dispos* 13: 548–552
- Roberts BJ, Shoaf SE, Jeong KS, Song BJ (1994) Induction of CYP2E1 in liver, kidney, brain and intestine during chronic ethanol administration and withdrawal: evidence that CYP2E1 possesses a rapid phase half-life of 6 hours or less. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 1064–1071
- Rogers MA, Vaughan TL, Davis S, Thomas DB (1995) Consumption of nitrate, nitrite, and nitrosodimethylamine and the risk of upper aerodigestive tract cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4: 29–36
- Shimizu MO, Lasker JM, Tsutsumi M, Lieber CS (1990) Immunohistochemical localization of ethanol-inducible P450 IIE1 in the rat alimentary tract. *Gastroenterology* 99: 1044–1053
- Song BJ, Gelboin HV, Park SS, Yang CS, Gonzalez FJ (1986) Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human cytochrome P450s. *J Biol Chem* 261: 16689–16697
- Song BJ, Veech RL, Park SS, Gelboin HV, Gonzalez FJ (1989) Induction of rat hepatic *N*-nitrosodimethylamine demethylase by acetone is due to protein stabilization. *J Biol Chem* 264: 3568–3572
- Swann PF, Graves RJ, Mace R (1987) Effect of ethanol on nitrosamine metabolism and distribution – implication for the role of nitrosamines in human cancer and for the influence of alcohol consumption on cancer incidence. *Mutat Res* 186: 261–267
- Takahashi T, Lasker JM, Rosman AS, Lieber CS (1993) Induction of cytochrome P-4502E1 in the human liver by ethanol is caused by a corresponding increase in encoding messenger RNA. *Hepatology* 17: 236–245
- Tuyns AJ, Pequignot G, Jensen OM (1977) Le cancer de l'oesophage en Ile-et-Vilaine en fonction des niveaux de consommation d'alcool et de tabac. Des risques qui se multiplient. *Bull Cancer* 64: 45–60
- Tuyns AJ, Pequignot G, Abbatucci JS (1979) Oesophageal cancer and alcohol consumption: importance of type of beverage. *Int J Cancer* 23: 443–447
- Tuyns AJ, Castegnaro M, Toussaint G, Walker EA, Griecute LL, Le Talaer JY, Loquet C, Guerain J, Drilleau JF (1980) Recherches concernant les facteurs etiologicals du cancer de l'oesophage dans l'ouest de la France. *Bull Cancer* 67: 2–28
- Umberhauer D, Wild CP, Montesano R, Saffhill R, Boyle JM, Huh N, Kirstein U, Thomale J, Rajewsky MF, Lu SH (1985) O⁶-Methyldeoxyguanosine in oesophageal DNA among individuals at high risk of oesophageal cancer. *Int J Cancer* 36: 661–665
- Wilson JS, Korsten MA, Lieber CS (1986) The combined effects of protein deficiency and chronic ethanol administration on rat ethanol metabolism. *Hepatology* 6: 823–829
- Wrighton SA, Thomas PE, Ryan DE, Levin W (1987) Purification and characterization of ethanol-inducible human hepatic cytochrome P-450HLj. *Arch Biochem Biophys* 258: 292–297
- Yamada Y, Weller RO, Kleihues P, Ludeke BI (1992) Effects of ethanol and various alcoholic beverages on the formation of O⁶-methyldeoxyguanosine from concurrently administered *N*-nitrosomethylbenzylamine in rats: a dose-response study. *Carcinogenesis* 13: 1171–1175
- Yang CS, Yoo JS, Ishizaki H, Hong JY (1990) Cytochrome P450IIE1: roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug Metab Rev* 22: 147–159
- Yu MC, Garabrant DH, Peters JM, Mack TM (1988) Tobacco, alcohol, diet, occupation, and carcinoma of the oesophagus. *Cancer Res* 48: 3843–3848

L'objectif de ces premiers travaux a été de vérifier si chez des rats traités de manière aiguë avec différentes boissons alcoolisées (vin rouge, cidre, bière, whisky, calvados fermier ou industriel, éthanol seul), il était possible de mettre en évidence une relation entre l'activité de certains cytochromes P450, en particulier le CYP2E1, et la nature des alcools. Le calvados fermier, utilisé pour cette étude, provient d'une fabrication dite fermière et, par conséquent est susceptible de renfermer des concentrations plus importantes en composés alcooliques (décrits dans l'introduction) que le calvados commercialisé. L'étude porte essentiellement sur l'expression du CYP2E1 dans le foie, car cet isoenzyme est majoritairement exprimé dans ce tissu. Les activités catalytiques ont été mesurées à l'aide de substrats spécifiques (N-diméthylnitrosamine et le para-nitrophénol) et les taux de protéines ont été analysés par immunoblot. Les résultats montrent que l'expression du CYP2E1 dépend du taux d'éthanol et qu'elle est indépendante de la nature de la boisson. Ces différents alcools n'influencent pas l'expression d'autres isoenzymes tels que les CYP1A et le CYP2C6. Il apparaît donc au travers de ces résultats que seul l'éthanol joue un rôle prépondérant dans l'induction du CYP2E1 hépatique et que les autres composés susceptibles d'être contenus dans les boissons issus de la pomme ne semblent pas influencer l'expression de ces cytochromes dans le tissu hépatique. Néanmoins, il était important de vérifier s'il existait une action particulière de ces boissons alcoolisées vis à vis des cytochromes P450 de l'œsophage. Les résultats obtenus de cette étude sont présentés ci-après.

5.3.2 Expression du CYP2E1 et du CYP1A1/2 dans la muqueuse œsophagienne

Résultats

Après le sacrifice des animaux, de l'étude précédente, les muqueuses œsophagiennes ont été isolées en même temps que les foies puis stockées à -80°C . Après décongélation, nous avons préparé la fraction microsomale après avoir mélangé les muqueuses œsophagiennes par groupe, afin d'avoir un taux de protéines suffisants pour l'analyse des cytochromes. Le taux des protéines pour chaque groupe de rats traités sont indiquées dans le tableau 5.2

L'analyse par immunoblot des protéines CYP2E1 et CYP1A1/2 a été réalisée dans les conditions décrites précédemment dans l'article.

A partir des microsomes œsophagiens de rats traités par les différentes bois-

Echantillon	Protéines $mg.ml^{-1}$
Eau	5,50
Bière	6,98
Calvados commercial	8,06
Vin rouge	4,90
Cidre	6,75
Whisky	6,53
Ethanol 4%	8,29
Ethanol 10%	6,07
Ethanol 20%	7,14
Calvados fermier 4%	8,20
Calvados fermier 10%	6,25
Calvados fermier 20%	5,80

TAB. 5.2 – Teneur en protéines des microsomes obtenus à partir des épithéliums œsophagiens de rats abreuvés avec différentes boissons. Le dosage a été effectué par la méthode de Lowry.

sons alcoolisées, nous avons détecté par immunoblot puis analysé par densitométrie les protéines CYP2E1 et CYP1A1/2 (cf figure 5.1).

La protéine CYP2E1 au niveau de l'œsophage de rat, est représentée par deux polypeptides alors que l'analyse du CYP2E1 hépatique ne révèle qu'une seule bande. Pour un taux de protéines microsomaux identiques, l'évaluation semi-quantitative montre une intensité d'environ 20 fois plus élevée pour la bande de la protéine hépatique que pour celles des protéines présentes dans les muqueuses œsophagiennes. L'utilisation d'un anticorps monoclonal antiCYP1A1/2 de rat reconnaissant à la fois 1A1 et 1A2 met en évidence également deux bandes dont les intensités sont inversées dans le foie. L'absence d'un marquage avec l'anticorps anti CYP1A2 permet de suggérer la présence du CYP1A1 dans la muqueuse œsophagienne. Ceci serait en accord avec les données concernant ces deux isoenzymes ; Le CYP1A1 est essentiellement exprimé dans les tissus extrahépatiques après induction et le CYP1A2 est exprimé dans le foie constitutivement (cf. chapitre I).

Au sein des tissus œsophagiens, aucune relation significative n'a pu être mise en évidence entre les teneurs en protéines CYP2E1 et CYP1A mesurées par densitométrie et l'administration des différentes boissons alcoolisées.



FIG. 5.1 – Détection des CYP2E1 et CYP1A1/2 dans l'œsophage de rats. Pour chaque échantillon, 20 μ g de protéines microsomales ont été analysées par immunoblot avec des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre les isoenzymes CYP2E1 et CYP1A1/2 de foie de rat. Piste 1 et 9 : foies de rats traités à l'eau et à l'éthanol à 4%, piste 2 : œsophage de rats traités à l'eau, pistes 3, 4, 5 : œsophages de rats traités à l'éthanol 4%, 10%, 20%, pistes 6, 7, 8 : œsophages de rats traités au calvados fermier ajusté à 4%, 10%, 20%, pistes 10, 11, 12, 13, 14 : œsophages de rats traités à la bière, au cidre, au calvados commercial, au vin rouge et au whisky.

Discussion

Ces différents résultats confortent l'hypothèse selon laquelle un métabolisme des carcinogènes du tabac, en particulier les nitrosamines et les HPA, par les cytochromes P450 est possible au sein de l'œsophage. Un métabolisme préférentiel pour les nitrosamines asymétriques par les microsomes d'œsophage humain et de rat avait déjà été décrit [Labuc and Archer, 1982], [Huang et al., 1992].

En revanche, aucune induction du CYP2E1 au sein de l'œsophage n'est constatée à la suite d'une ingestion aiguë d'alcool. Il est possible que la durée du traitement (limitée à 3 jours) et la concentration des produits alcooliques soient trop faibles pour obtenir une modification de l'expression de cet isoenzyme. Pourtant, une induction significative du CYP2E1 dans l'œsophage de rat a déjà été mise en évidence à la suite d'une ingestion d'éthanol pendant 3 semaines [Shimizu et al., 1990]. Ces auteurs ont cependant montré cette induction par immunohistochimie alors que la même étude faite avec la méthode des immunoblots donne des résultats négatifs. Les faibles limites de détection de cette dernière méthode seraient responsables de l'absence de résultats positifs. Cet argument ne peut pas s'appliquer au foie étant donné que nous avons obtenu une induction du CYP2E1 comparables à d'autres études [Roberts et al., 1994], [Lee et al., 1989].

Par ailleurs, il est possible que l'exposition de l'œsophage aux dérivés alcooliques soit insuffisante pour permettre aux alcools de diffuser au travers de la mu-

queuse œsophagienne et d'exercer leurs effets *in situ*. Il se pourrait également que la durée du traitement alcoolique soit trop courte pour induire les cytochromes P450 de l'œsophage par voie systémique. Ces observations sont en accord avec une étude, [Mandard et al., 1981] montrant l'absence d'anomalies histologiques et de lésions précancéreuses chez des rats ayant consommé pendant 23 mois différentes eaux-de-vie de cidre diluées ou pures.

5.4 Etude de l'effet des différents boissons alcoolisées sur la NMBA déméthylase de l'œsophage et le taux de la 7-méthylguanine dans le foie et l'œsophage.

De nombreuses études ont rapporté l'influence de l'alcool sur la cancérogénicité des nitrosamines. Ainsi différentes équipes ont étudié chez le rat, l'alkylation de l'ADN au niveau de l'œsophage et du foie, après co-administration de boissons alcoolisées et de nitrosamines [Peng et al., 1982], [Kouros et al., 1983]. La synthèse de ces différents travaux montre que le taux d'alkylation dépend de l'organe étudié, du type d'alcool et de nitrosamine, mais également du protocole d'administration (voie d'administration, durée du traitement et chronologie).

Dans cette perspective, nous avons envisagé de vérifier, par la mesure d'aduits de méthylation dans le foie et l'œsophage, l'influence des différentes boissons alcoolisées sur les voies de détoxication et d'activation des nitrosamines. Dans un premier temps, nous avons mesuré l'activité N-méthylbenzylnitrosamine (NMBA) déméthylase à partir des microsomes d'œsophage des rats traités lors de la première expérience. Le but de cette étude est de vérifier l'effet de l'alcool sur cette activité catalytique. Puis afin d'avoir une indication globale du métabolisme de la NMBA, dans une deuxième expérience, nous avons étudié le taux de la 7-méthylguanine (7meG) dans le foie et l'œsophage de rats ayant subi immédiatement après une exposition à diverses boissons alcoolisées, une injection intrapéritonéale de la NMBA.

5.4.1 Matériels et méthodes

Activité NMBA déméthylase

L'activité NMBA déméthylase des fractions microsomiales œsophagiennes est déterminée en mesurant la production de formaldéhyde par CLHP selon la méthode décrite par Farelly [Farelly, 1980] et Camus [Camus et al., 1993] (voir le descriptif en annexe A).

Traitement des animaux

Dans une deuxième expérience, trois groupes de cinq rats traités respectivement avec de l'eau, avec une solution d'éthanol à 20% et avec du calvados fermier dilué à 20% d'éthanol, ont reçu par voie intrapéritonéale une injection de NMBA (2.5 mg/kg) après le troisième jour. Durant les six heures qui ont suivi l'injection, les rats n'ont bu que de l'eau. Les foies et les muqueuses œsophagiennes ont été ensuite prélevées puis congelés à -80°C .

Dosage de la 7-méthylguanine (7meG)

La 7-medG est dosée selon la méthode mise au point par Bianchini en suivant strictement les conditions expérimentales décrites dans [Bianchini et al., 1993] et résumées en annexe C(ainsi que l'extraction d'ADN, annexe B).

5.4.2 Résultats

A partir des microsomes d'œsophages des rats témoins et traités avec les boissons alcoolisées, l'activité enzymatique NMBA déméthylase a été mesurée. Le tableau 5.3 regroupe les différents résultats.

Aucune différence significative n'est observée entre les différents groupes. La qualité des échantillons à partir desquels ont été déterminées les activités catalytiques n'est certainement pas optimale pour ce type de mesure. Chaque groupe est représenté par une seule valeur et non par la moyenne de cinq activités enzymatiques. Les épithéliums œsophagiens ayant été décongelés pour la préparation des microsomes et le taux de protéines par œsophage de rat étant déjà très faible, les œsophages des cinq animaux par groupe ont dû être mélangés.

Echantillons	[HCHO]		
	1 ^{re} mesure	2 ^e mesure	moyenne
Eau	0,10	0,12	0,11
Bière	0,12	0,10	0,11
Calvados commercial	0,11	0,10	0,11
Vin rouge	0,19	0,19	0,19
Cidre	0,10	0,10	0,10
Whisky	0,08	0,12	0,10
Ethanol 4%	0,11	0,16	0,14
Ethanol 10%	0,10	0,08	0,09
Ethanol 20%	0,12	0,12	0,12
Calvados fermier 4%	0,07	0,06	0,07
Calvados fermier 10%	0,07	0,07	0,07
Calvados fermier 20%	0,07	0,15	0,11

TAB. 5.3 – *Effet d'une ingestion aiguë d'alcool sur le métabolisme de la NMBA par des microsomes d'œsophage de rats. Les activités sont exprimées en nmoles de formaldéhyde formées par minute et par mg de protéines.*

Dans notre deuxième étude *in vivo*, nous avons mesuré le taux de la 7-meG dans le foie et l'œsophage six heures après une injection de NMBA chez des rats traités auparavant par différents alcools durant trois jours. Dans cette expérience, seul l'éthanol et le calvados fermier ont été pris en compte. Dans le foie, quelque soit la boisson consommée le taux de la 7meG n'est pas modifié (tableau 5.4). Le niveau d'alkylation est deux fois supérieur dans le tissu œsophagien par rapport au foie. Comme pour le foie, aucune variation du taux de la 7meG n'est observée entre les rats traités et les rats témoins. La faible valeur (94 pmol de 7-meG par μ mol guanine) rencontrée chez les animaux ayant ingéré la solution d'éthanol à 20% est surprenante. Mais étant donné que la valeur est issue du mélange de cinq œsophages, il est difficile de prendre en compte ce résultat. D'autres expériences seraient dans ce cas nécessaires.

5.4.3 Discussion

La NMBA a été choisie pour plusieurs raisons; elle induit des tumeurs de l'œsophage chez le rats [Benthem et al., 1991]. Après activation elle génère des adduits de méthylation dans le foie et l'œsophage [Bianchini and Wild, 1994], [Benthem et al., 1992]. Le métabolisme de cette nitrosamine se caractérise par une α -hydroxylation au cours de laquelle la déméthylation et la débenzylation se-

Echantillons	7-meG / G (pmol/ μ mol)
Foie	
Eau	110 \pm 4
Ethanol 20%	114 \pm 22
Calvados Fermier 20%	101 \pm 20
Oesophages	
Eau	206
Ethanol 4%	199
Ethanol 10%	185
Ethanol 20%	94
Calvados Fermier 4%	240
Calvados Fermier 10%	190
Calvados Fermier 20%	209

TAB. 5.4 – Rapport de la 7-méthylguanine sur la guanine (G) dans les foies et les œsophages de rats traités avec la NMBA après une exposition à diverses boissons alcoolisées. Ce rapport est de l'ordre de 7 dans le foie de rat non traité et de 2 dans l'œsophage [Bianchini and Wild, 1994]

raient catalysées respectivement par le CYP2E1 et le CYP2B1 [Shu and Hollenberg, 1997], [Xie and Archer, 1994]. Selon certains auteurs la dé-méthylation prédominerait sur la débenzylation dans l'œsophage [Yang et al., 1991]. Nos résultats s'accordent avec ses conclusions. La détection par immunoblot du CYP2E1, la présence d'une activité NMBA déméthylase ainsi que le taux de la 7-meG au niveau de l'œsophage suggèrent la possibilité d'un métabolisme de la nitrosamine, via ce mécanisme. Nous avons obtenu un taux d'alkylation plus important dans l'œsophage par rapport au foie. Ces résultats qui avait déjà été démontrés dans une précédente étude [Bianchini and Wild, 1994], confirme également son statut d'organe cible vis à vis de cette nitrosamine. Cependant, Il existerait d'autres voies intervenant dans le métabolisme de ce carcinogène. Murphy et ses collaborateurs rapportent l'implication d'une enzyme spécifique dans la déalkylation par α -hydroxylation des nitrosamines aspécifiques dans l'œsophage [Murphy and Spina, 1994]. Aussi, pour justifier une interaction entre l'alcool et le tabac au sein de la muqueuse œsophagienne, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'alcool sur la régulation de cette enzyme spécifique au sein de cette muqueuse.

Nous avons voulu également vérifier, en étudiant le taux de la 7meG induite par une dose de NBMA après un traitement à l'alcool, si l'effet des différentes boissons alcoolisées pouvaient se révéler à d'autres niveaux du métabolisme de

Chapitre 6

Expression des cytochromes P450 dans la muqueuse œsopaghienne humaine

6.1 Introduction

Ce chapitre est consacré à l'analyse de l'expression des cytochromes P450 dans la muqueuse œsopaghienne humaine. La première démarche a été de caractériser différents isoenzymes par leurs protéines et leurs transcrits, à partir de pièces d'exérèses de patients atteints d'un cancer œsophagien provenant de la région de Toronto. Ces personnes avaient été interrogées sur leurs habitudes alimentaires et leur consommation alcoolo-tabagique. Les données épidémiologiques ainsi recueillies, ont pu être confrontées avec les résultats biologiques obtenus. Les résultats de cette première étude, qui sont présentés dans ce chapitre, ont donné lieu à la rédaction d'un article soumis pour publication à *Carcinogenesis*. La suite de notre analyse a consisté à localiser ces cytochromes P450 au sein de la muqueuse œsopaghienne avec la technique d'hybridation *in situ*. Les résultats présentés restent préliminaires et ne permettent pas de conclure quant à la répartition de ces isoenzymes au sein du revêtement malpighien. Ils ont toutefois permis de valider les conditions expérimentales optimales avant d'étendre cette technique à d'autres échantillons. D'autre part, nous avons mesuré le taux de la O⁶-méthyl-déoxyguanine dans des pièces d'exérèses provenant de patients atteints d'un carcinome épidermoïde dans la région de Basse-Normandie.

6.2 Expression des cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme des carcinogènes dans la muqueuse œsophagienne humaine

Les résultats sont présentés dans l'article suivant : " Characterisation of cytochrome P450 expression in human oesophageal mucosa. Soumis pour publication à Carcinogenesis.

Characterisation of cytochrome P450 expression in human oesophageal mucosa

^{1,5}Mathilde Lechevrel, ^{2,6}Alan G. Casson, ³C. Roland Wolf, ⁴Ruggero Montesano and
^{1,7}Christopher P. Wild.

¹Unit of Environmental Carcinogenesis, International Agency for Research on Cancer,
150, cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France

²Division of Thoracic Surgery, University of Toronto, Ontario, Canada

³Imperial Cancer Research Fund, Molecular Pharmacology Unit, Biomedical Research
Centre, Dundee, Scotland

⁴Unit of Mechanisms of Carcinogenesis, International Agency for Research on Cancer,
150, cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France

⁵Current address: Centre Francois Baclesse, CJF9603-EA1772, Caen, France

⁶Current address: Department of Thoracic Surgery, Birmingham Heartlands Hospital
and the University of Warwick, Coventry CV4 7AL.

⁷Current address and to whom correspondance should be addressed: Molecular
Epidemiology Unit, Research School of Medicine, Algernon Firth Building, University
of Leeds, LS2 9JT

Key Words: cytochrome P450, oesophagus, alcohol, tobacco

Running Title: cytochrome P450s in human oesophagus

Abbreviations: CYP, cytochrome P450; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase
chain reaction

Abstract

The expression of cytochrome P450 enzymes in human oesophageal mucosa was investigated in a total of twenty-five histologically non-neoplastic surgical tissue specimens by using specific antibodies in immunoblot and by mRNA analysis by RT-PCR. The presence of CYP 1A, 2E1, 3A was demonstrated by both techniques; CYP2A and 4A reactive proteins were also detected by immunoblot. The presence of CYP 4B1 mRNA was established but no specific antibody was available for detection of this isoenzyme by immunoblot. CYP 2B6/7 mRNA was not detected in any sample. The mRNA transcripts for CYP 1A1, 2E1, 3A3/4 and 4B1 were consistently detected in the majority of samples (>84%) whereas CYP 1A2 mRNA was only detected in eleven of nineteen specimens examined. There were significant interindividual variations in the amount of proteins ranging from 8-fold for CYP4A to 43-fold for CYP2E1. For each patient, data on exposure to risk factors for oesophageal cancer were available including tobacco smoke, alcohol, gastro-oesophageal reflux and hot beverage consumption. None of these risk factors was correlated with the protein level of the individual CYP isoenzymes as determined by quantitation of immunoblot staining in this small series of samples. In addition, no correlation between other patient characteristics (age, sex, tumour location, tumour stage) and CYP protein level was observed. There were no differences between squamous cell carcinomas and adenocarcinomas in either the qualitative or quantitative expression of the CYP enzymes. These data demonstrate that a range of CYP enzymes are expressed in human oesophageal mucosa and indicate that this tissue has the capacity to activate chemical carcinogens to reactive DNA binding metabolites.

Introduction

The marked geographical variation in incidence of oesophageal squamous cell carcinoma implies the involvement of environmental factors in the aetiology of this disease. Ninety percent of cases of this cancer in Europe and North America are attributable to tobacco smoke and alcohol with a multiplicative increase in risk in individuals exposed to both factors and having a diet deficient in fresh fruit and vegetables (1). The molecular mechanisms involved in this interaction between alcohol and tobacco are however unclear. Other risk factors are less well characterised but include consumption of hot drinks, N-nitroso compounds present preformed in foods or formed endogenously, a diet deficient in micronutrients, and possibly exposure to mycotoxins (2-4).

Most environmental carcinogens require enzymatic metabolism to reactive intermediates which bind to critical cellular macromolecules initiating toxic and carcinogenic events. The cytochromes P450 (CYP) comprise a multigene family of microsomal enzymes that carry out the oxidative metabolism of numerous endogenous and exogenous compounds. Interindividual differences in CYP gene expression are observed and this may contribute to interindividual susceptibility to environmental carcinogens (5,6). The major CYP enzymes involved in the metabolic activation of chemical carcinogens include CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2E1, 3A3/4 (7,8). Individual CYP isoforms vary in tissue distribution, mechanism of regulation and substrate specificity. The majority are expressed in the liver with extrahepatic expression being less well characterised. In particular there are few studies which have investigated CYP isoenzyme expression in human oesophagus (9-12). CYP2E1 has not been reported in human oesophageal mucosa, yet given the interaction between tobacco and alcohol in the aetiopathogenesis of oesophageal cancer and the ethanol-inducibility of human hepatic CYP 2E1 (13) there is a particular interest in this isoenzyme. CYP2E1 is involved in the bioactivation of low molecular weight compounds, including the tobacco specific N-nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), other N-nitrosamines (NNO) and various other compounds present in tobacco smoke e.g. acrolein, 1,3 butadiene (4, 14-17). The

modulation of hepatic and extrahepatic metabolism of tobacco-related carcinogens by alcohol ingestion could represent one mechanism of interaction between these two risk factors. Therefore the expression of various P450s in human oesophageal mucosa was studied as a first step to developing a better understanding the role of metabolism of chemical carcinogens in the development of cancer at this site.

Materials and Methods

Patient description

A total of twenty-five oesophageal tissue specimens were obtained at the time of oesophagectomy from oesophageal cancer patients (all Caucasians) who had undergone no prior chemotherapy or radiotherapy. Patients underwent surgery within 24 hours of admission to the Mount Sinai Hospital, Toronto, Canada. Specimens of tissue were from regions distant (>8cm) to the tumour at the proximal resection margin and were histologically normal. The mucosa was separated from the connective tissue immediately after resection and snap-frozen in liquid nitrogen prior to long-term storage at -80°C. These mucosa contained only the malpighien epithelium, without the muscle layer. The amount of extracted microsomal protein was sufficient to investigate several isoenzymes (see below): 0.13 to 7 mg microsomal protein were obtained from 0.1 to 1.5 g oesophageal mucosa. Nineteen of the patients included in the study were diagnosed as having primary adenocarcinomas of the oesophagus (according to strict criteria) and six had squamous cell carcinomas. Questionnaire information was obtained on age, sex, history of tobacco smoking (cigarettes per day and duration in years; current or ex-smoker), alcohol consumption (categorised as heavy (>6 units per week), light (<6 units per week), or none), duration of medically significant symptoms of gastro-oesophageal reflux and hot beverage intake (no. of hot drinks per day x heat of drink on a linear scale of 0 (cold) to 10 (very hot)). The histological characteristics of the tumor, location in the oesophagus and the U.I.C.C. stage of the disease were also known for all subjects (see Table 1).

Microsome preparation

The mucosal sample (0.1 to 1.5g tissue) was homogenized gently on ice in 0.15 M KCl, pH 7.4, 10 mM K₂EDTA, 0.1 mM DTT. The homogenate was centrifuged at 9000g for 20 minutes at 4^oC, the supernatant removed and centrifuged (105,000g for 60 minutes at 4^oC). The microsomal fraction was resuspended and stored in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4, 0.5 mM K₂EDTA, 0.1 mM DTT and 0.25 M sucrose at -80^oC. Protein concentrations were determined by a protein dye-binding assay (BioRad, Richmond, CA, U.S.A.).

Immunoblot analysis

Aliquots (25 µg) of microsomal protein were applied to polyacrylamide gels and separated by electrophoresis in the presence of sodium-dodecyl-sulfate according to the manufacturers instructions (Biorad, Richmond, CA, U.S.A.). Resolved proteins were transferred to nitrocellulose and incubated with different polyclonal antibodies. The rabbit polyclonal antibodies raised to rat CYP1A1/2, CYP2A1, CYP3A1, and CYP4A1 were described previously (18). All these antibodies have been shown in previous studies to cross-react with known human counterparts. The CYP3A1 antibody reacts with both CYP3A4 and 3A5 while the antibody to CYP4A1 reacts with CYP 4A human proteins but the specific isoenzymes have not been determined. The rabbit polyclonal antibody raised to human CYP2E1 was a gift from Professor P. Beaune, Paris. The secondary antibodies were anti-rabbit IgG peroxidase conjugated (Sigma Chemical, St Louis MO). The CYP staining was visualised using the ECL-TM method (Amersham, Buckinghamshire, U.K.) and intensity of staining was measured by densitometry (Biorad model GS670). As a positive control on the immunoblots, microsomes prepared from human liver and lung were used at the same level of proteins (25 µg). Staining intensity of CYP in samples examined on different membranes were normalised with respect to the staining intensity of the liver control.

Reverse transcriptase- polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA extracted from oesophageal mucosa, was reverse transcribed to cDNA with Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase with priming oligo(dT) (Appligene Oncor, Illkirch, France). The cDNA was stored at -20^oC. The

PCR reaction comprised 10 µl out of the total 40 µl cDNA, 2.5 U Taq DNA polymerase (Appligene), 5 µl 10x Taq buffer, 2.5 µM dNTP, 1 pmol of each primer and water to a final volume of 50 µl. The primers, their location and their size were as described (19). Briefly, the samples were denatured at 94°C for 2 min and submitted to 30 cycles of amplification as follows: 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, 2 min at 72°C, followed by a final polymerase extension step at 72°C for 10 minutes. The PCRs with CYP2E1 were performed with co-amplification with β-actin primers to control for the efficiency of reaction. For the other enzymes, the cDNA of CYP1A1, CYP1A2, CYP3A3/4, CYP2B6/7, CYP4B1, were co amplified with GAPDH primers. The primers to CYP 1A1, CYP1A2, CYP2E1 and CYP4B1 are specific to one isoenzyme while others (CYP2A6/7, CYP2B6/7 and CYP3A3/4 can detect more than one (see 19). PCR reaction products were electrophoresed in an 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. All analyses were repeated at least twice. Unfortunately for six of the 25 samples no RT-PCR product could be generated due to partial degradation of mRNA.

Statistical Analysis

Subjects were categorised for the various clinical and lifestyle parameters considered in the study. Mean intensities of staining by immunoblot were calculated for each group and compared either by Students t test or the alternate t test depending on the similarity or otherwise of the standard deviations. Statistical significance was considered at $p = 0.05$.

Results

CYP protein detection by immunoblot

The CYP investigated by immunoblot were the CYP1A1/2, CYP2A6, CYP2E1, CYP3A4/5 and CYP4A. All the tissue specimens tested revealed a single immunoreactive protein with each of the five antibodies at a molecular weight equivalent to that observed in the human liver and lung preparations. However, there were quite marked interindividual variations in amount of protein ranging from 8-fold with CYP4A to 43-fold with CYP2E1. Some individuals (e.g. patients 1,2 and 12;

Figure 1) appeared to express high levels of several CYP isoenzymes but this was not related to any of the patient information collected in the study (see below).

Comparisons of the intensities of staining between liver, lung and oesophagus, show tissue specific differences in expression of these isoenzymes. The antibody directed to human CYP2E1 revealed a single band in oesophageal microsomes but in most cases with 5 to 20-fold lower intensity than the equivalent band stained in liver microsomes. The intensity of staining in oesophagus was of a similar order to that in the lung. One immunoreactive CYP1A1/2 protein band was observed in oesophagus with an intensity of staining similar in amount to that in lung but somewhat greater (up to 10-fold) than in the liver microsomes. CYP4A staining was weak in all oesophageal samples examined and proved to be relatively constant between individuals. CYP2A and CYP3A4/5 were also detected clearly in oesophageal microsomes and at similar amounts to those in liver. However, given that liver and lung microsomes from only one individual were included for comparison the relative amounts of P450 in oesophageal microsomes compared to these tissues can only be considered preliminary. In addition, it should be noted that while the CYP protein level for a given quantity of microsomes in oesophagus and liver may be similar the absolute quantities of protein and therefore metabolic capacity are higher in the liver.

Patient characteristics and CYP protein levels

The level of expression of the individual isoenzymes in the normal mucosa, as determined by quantitation of immunoblot staining intensities, was not associated with histological type or other characteristics (stage, location) of the tumour (data not shown). Data concerning smoking and drinking were collected from all patients by questionnaire but no significant correlation was observed between these exposures and the level of cytochrome P450 proteins. Similarly neither the index of gastro-oesophageal reflux nor hot beverage intake were correlated to any of the specific CYP enzyme levels. However, for each of these parameters the small number of patients limited the possibility of observing such differences.

CYP specific mRNA by RT-PCR

All PCR reactions were performed as co-amplifications with β -actin or GADPH. The results obtained with this specific and sensitive method confirmed the presence of CYP2E1, CYP1A1, CYP1A2 and CYP3A3/4 in the oesophageal epithelium (see Figure 2). The primers for CYP3A3/4 detect more than one isoform (19). The RT-PCR data were only evaluated on a qualitative level but in Table 2 it is notable that CYP1A2 mRNA was only detected in eleven out of nineteen oesophageal mucosal specimens while CYP1A1 and 2E1 were detected in the majority (sixteen and seventeen respectively). CYP 2B6/7 mRNA was not detected any sample, whereas CYP 4B1 mRNA was detected in all cases.

Discussion

The expression of cytochrome P450s was investigated by use of specific antibodies in immunoblot and by specific mRNA analysis by RT-PCR in a series of twenty-five histologically normal non-tumourous oesophageal mucosa specimens from cancer patients. Evidence for expression of a number of carcinogen metabolising enzymes was obtained by these methods. The presence of CYP 1A, 2E1 and 3A proteins was demonstrated by both techniques; CYP2A and 4A reactive proteins were also detected by immunoblot but no cDNA could be generated for 2A6/7 (data not shown); CYP 4A mRNA was not investigated. Finally CYP 4B1, but not CY2B6 mRNA, was detected.

The extrahepatic expression of CYP enzymes in man is still relatively poorly characterised. Two previous studies have examined human oesophagus for P450s in some detail (9,10). Murray and colleagues (9) examined a small series of 10 non-tumourous oesophageal mucosa specimens obtained from cancer patients. They examined CYP 1A, 2C9 and 3A and obtained positive results only for CYP 1A (three of ten cases). In contrast in 50 oesophageal tumour specimens positive staining for all three enzymes was frequently observed; there were no differences in CYP expression between patients with squamous cell or adenocarcinoma. Nakajima et al., (10) studied only five non-tumourous oesophageal mucosal samples from Chinese oesophageal cancer patients by immunoblot and reported the presence of CYP 1A1/2 in all of these;

protein levels were higher still in tumourous mucosa in a larger series of patients. CYP 2B6 and 3A staining was observed in a proportion of samples but it appears from their report that only tumour samples were examined for these enzymes.

The data in the current paper concerns a larger series of normal oesophageal mucosa than previously studied and the rapid freezing of samples post-surgery allowed the more specific approach of mRNA transcript analysis to be performed. CYP 3A4/5 was detected in the current series of samples by immunoblot and mRNA, consistent with the immunoblot data of Nakajima et al., (10). Our data also confirm the previous observations (9,10) that enzymes of the CYP1A family are present in oesophagus. Only a single immunoreactive protein is revealed by immunoblot (Figure 1) with a mixed antibody preparation which recognises CYP1A1 and 1A2. CYP 1A1 is expressed in human lung and the human lung microsomes used as a positive control on the immunoblot revealed a single band at the same position on the gel as that seen in oesophagus. However, in the liver microsomes, in which only CYP 1A2 is expected to be expressed, a single band was also revealed on all immunoblots. Under the conditions used with these antibodies we could not therefore discern a difference in the molecular weight of the lung and liver bands. Consequently from the immunoblot data we cannot conclude whether only CYP 1A1 or both 1A1 and 1A2 are present. Although CYP 1A2 has been shown to be mainly expressed in the liver some extrahepatic expression occurs (20,21). CYP 1A1 mRNA was detected in all the samples examined whereas CYP 1A2 mRNA was observed in only about half. Those samples without the presence of CYP 1A2 mRNA did not have noticeably lower CYP 1A protein levels and CYP 1A2 mRNA detection was not associated with a particular exposure group (e.g. smokers or alcohol drinkers). From the combined mRNA and protein data therefore we conclude that CYP 1A1 is expressed in human oesophagus; further study is needed, perhaps using more specific monoclonal antibodies, to conclude with respect to CYP 1A2.

The identification of CYP2E1 in human oesophagus is a novel finding supported both by presence of the protein using an antibody to human CYP2E1 and its mRNA transcript. Of relevance to the association between alcohol consumption and cancer

risk is the fact that CYP 2E1 was also identified in human larynx, as were 1A, 2C, 3A4 and 2A6 (22). CYP 2E1 has been reported previously in mouse oesophagus (23). The proteins of CYP2A and 4A were detected in the current study and mRNA of CYP4B1 was also demonstrated. No data on these latter enzymes are available from other studies of oesophagus but the fact that we only used one technique in the case of each means that confirmation of their expression requires further study. CYP2B6 mRNA was absent in this study somewhat in contradiction with the immunoblot data of Nakajima et al., (10) where up to half the samples were positive. This difference may be a function of an increased expression of CYP in oesophageal tumours compared to normal mucosa or reflect a limited stability of the 2B6 mRNA in oesophageal cells. Finally it should be noted that these data are obtained on subjects from different populations and consequently ethnic group differences in the expression CYP enzymes could occur.

Significant interindividual variations in hepatic P450 levels are known to occur (18) and a similar variation is seen in the oesophagus. Several endogenous parameters and environmental factors modulate the constitutive expression and the inducibility of these isoenzymes (24-26). For example, smoking and alcohol, are known to induce CYP1A and 2E1 respectively in human lung (20) and liver (27,28). It is unknown whether these exposures also induce these isoenzymes in oesophageal mucosa. We attempted to examine this question by correlating questionnaire data on environmental exposures with presence and levels of specific CYP, particularly whether alcohol intake was associated with higher CYP 2E1 in oesophagus as in liver. No such association was found although it is important to emphasise that the small number of patients studied prevents firm conclusions being drawn concerning this aspect of the study. Apart from the small size of the study the lack of association could reflect the short-term duration of any induction combined with the delay in obtaining specimens after the exposure last occurred. Patients were operated on within 10-14 days of diagnosis and 24 hours after admission; consequently the delays between diagnosis, admission and surgery are relatively short. In this regard it is of note that hepatic CYP 2E1 (mRNA and protein) was shown to be still elevated in heavy drinkers 36 hours after the last alcohol intake (28).

The oesophageal mucosal specimens studied were from both squamous cell carcinoma and adenocarcinoma patients. Although the aetiology of these types of carcinoma is thought to differ (29,30), squamous cell carcinoma being the type predominantly associated with tobacco and alcohol, our primary objective was to examine histologically normal oesophageal mucosa for the expression of CYP isoenzymes. In this sense the histological type of the tumour was of limited importance and this was also suggested by the fact that samples from the two groups of patients did not differ qualitatively or quantitatively in CYP expression.

The presence of a number of different CYP isoenzymes in oesophageal mucosa suggests that several xenobiotic chemicals to which humans are exposed could be metabolized in the basal cell layer of the epithelium. Indeed CYP 1A1/2 and 3A4 are involved in the metabolism of many polycyclic aromatic hydrocarbons, including benzo(a)pyrene (5) while CYP2A6 and 2E1 are known to activate NNO and other carcinogens to DNA damaging metabolites (15,31,32). This is consistent with earlier studies showing the presence of carcinogen-DNA adducts in oesophageal epithelium (33). Carcinogen metabolism and subsequent DNA damage will also be influenced by expression of phase II metabolising enzymes and several glutathione S-transferases are also expressed in human oesophagus (10). In considering the impact of CYP expression in oesophagus on the carcinogenic process it is important to also consider the impact of environmental exposures on hepatic metabolism. George et al., (34,35) described a reduction in CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4 mRNA and CYP protein levels in patients suffering from chronic liver disease. This decrease, due for example to cirrhosis induced by chronic alcohol consumption, could result in a decreased metabolism of carcinogens in the liver and consequently in a higher systemic exposure of oesophageal mucosa to these compounds.

Acknowledgements

The authors would like to thank Anne-Marie Camus for provision of human lung and liver microsomes. The excellent work of Alain Schouft in the mRNA analysis was essential to the success of this project.

References

1. Tuyns, A.J., Péquignot, G., Jensen, O.M. (1977) Le cancer de l'oesophage en Ille-et-Villaine en fonction de niveau de consommation d'alcool et de tabac. Des risques qui se multiplient. *Bull Cancer*, **64**, 45-60.
2. O'Neill, I.K., Chen, J. and Bartsch, H. (1991) Relevance to Human Cancer of N-Nitroso Compounds, Tobacco Smoke and Mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, Scientific Publ. no. 105, Lyon, France.
3. De Stefani, E., Munoz, N., Esteve, J., Vasallo, A., Victora, C.G., Teuchmann, S. (1990) Mate drinking, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Res.* **50**, 426-431.
4. Yang, C.S. (1980) Research on esophageal cancer in China: a review. *Cancer Res.* **40**, 2633-2644.
5. Gonzalez, F.J., Gelboin, H.V. (1992) Human cytochromes P450: evolution and cDNA-directed expression. *Environ Health Perspect.* **98**, 81-85.
6. Wolf, C.R., Smith, C.A.D., Forman, D. (1994) Metabolic polymorphisms in carcinogen metabolising enzymes and cancer susceptibility. *British, Med. Bull.* **50**, 718-731.
7. Guengerich, F.P. (1988) Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **48**, 2946-2954.
8. Kawajiri, K., Fujii-Kuriyama, Y. (1991) P450 and human cancer. *Jpn J Cancer Res.* **82**, 1325-1335.

9. Murray, G.I., Shaw, D., Weaver, R.J., McKay, J.A., Ewen, S.W., Melvin, W.T., Burke, M.D. (1994) Cytochrome P450 expression in oesophageal cancer. *Gut*, **35**, 599-603.
10. Nakajima, T., Wang, R.S., Nimura, Y., Pin, Y.M., He, M., Vainio, H., Murayama, N., Aoyama, T., Iida, F. (1996) Expression of cytochrome p450s and glutathione s-transferases in human esophagus with squamous-cell carcinomas. *Carcinogenesis*, **17**, 1477-1481.
11. McKinnon, R.A., Burgess, W.M., Hall, P.M., Roberts-Thomson, S.J., Gonzalez, F.J. and McManus, M.E. (1995) Characterisation of CYP3A gene subfamily expression in human gastrointestinal tissues. *Gut*, **36**, 259-267.
12. McDonnell, W.M., Scheiman, J.M., and Traber, P.G. (1992) Induction of cytochrome P4501A genes (CYP1A) by omeprazole in the human alimentary tract. *Gastroenterology*, **103**, 1509-1516.
13. Perrot, N., Nalpas, B., Yang, C.S., Beaune, P.H. (1989) Modulation of cytochrome P450 isozymes in human liver, by ethanol and drug intake. *Eur J Clin Invest.* **19**, 549-555.
14. Crespi, C.L., Penman, B.W., Gelboin, H.V., Gonzalez, F.J. (1991) A tobacco smoke derived nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone is activated by multiple human cytochrome P450s including the polymorphic human cytochrome P450 2D6. *Carcinogenesis*. **12**, 1197-1201.
15. Guengerich, F.P. (1991) Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* **4**, 391-407.

16. Yang, C.S., Yoo, J.S., Ishizaki, H., Hong, J.Y. (1990) Cytochrome P450IIE1: roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug Metab Rev.* **22**, 147-159.
17. Yoo, J.S., Guengerich, F.P., Yang, C.S. (1988) Metabolism of N-nitrosodialkylamines by human liver microsomes. *Cancer Res.* **48**, 1499-1504.
18. Forrester, L.M., Henderson, C.J., Glancey, M.J., Back, D.J., Park, B.K., Ball, S.E., Kitteringham, N.R., McLaren, A.W., Miles, J.S., Skett, P. (1992) Relative expression of cytochrome P450 isoenzymes in human liver and association with the metabolism of drugs and xenobiotics. *Biochem J.* **281**, 359-368.
19. Hakkola, J., Pasanen, M., Purkunen, R., Saarikoski, S., Pelkonen, O., Maenpaa, J., Rane, A., Raunio, H. (1994) Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 forms in human adult and fetal liver. *Biochem Pharmacol.* **48**, 59-64.
20. Eaton DL, Gallagher EP, Bammler TK, Kunze KL. (1991). Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics*, 1995
21. McKinnon, R.A., Hall, P.D., Quattrochi, L.C., Tukey, R.H., McManus, M.E. Localization of CYP1A1 and CYP1A2 messenger RNA in normal human liver and in hepatocellular carcinoma by in situ hybridization. *Hepatology*, **14**, 848-856.
22. Degawa, M., Stern, S.J., Martin, M.V., Guengerich, F.P., Fu, P.P., Ilett, K.F., Kaderlik, R.K., Kadlubar, F.F. (1994) Metabolic activation and carcinogen-DNA adduct detection in human larynx. *Cancer Res.* **54**, 4915-4919.

23. Freeman, J.E., Stirling, D., Russell, A.L., and Wolf, C.R. (1992) cDNA sequence, deduced amino acid sequence, predicted gene structure and chemical regulation of mouse Cyp2e1. *Biochem. J.* **281**, 689-695.
24. Watkins, P.B., Wrighton, S.A., Maurel, I., Schuetz, E.G., Mendez-Picon, G., Parker, G.A., Guzelian, P.S. (1985) Identification of an inducible form of cytochrome P-450 in human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 6310-6314.
25. Johansson, I., Eliasson, E., Ingelman-Sundberg, M. (1991) Hormone controlled phosphorylation and degradation of cyp2B1 and cyp2E1 in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **174**, 37-42.
26. Brown, L.M., Hoover, R.N., Greenberg, R.S., Schoenberg, J.B., Schwartz, A.G., Swanson, G.M., Liff, J.M., Silverman, D.T., Hayes, R.B., Pottern, L.M. (1994) Are racial differences in squamous cell esophageal cancer explained by alcohol and tobacco use? *J Natl Cancer Inst.* **86**, 1340-1345.
27. Girre, C., Lucas, D., Hispard, E., Menez, C., Dally, S., Menez, J.F. (1994) Assessment of cytochrome P4502E1 induction in alcoholic patients by chlorzoxazone pharmacokinetics. *Biochem Pharmacol.* **47**, 1503-1508.
28. Takahashi, T., Lasker, J.M., Rosman, A.S., Lieber, C.S. (1993) Induction of cytochrome P-4502E1 in the human liver by ethanol is caused by a corresponding increase in encoding messenger RNA. *Hepatology*, **17**, 236-245.
29. Vaughan, T.L., Davis, S., Kristal, A., Thomas, D.B. (1995) Obesity, alcohol, and tobacco as risk factors for cancers of the esophagus and gastric cardia: adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **4**, 85-92.

30. Garidou, A., Tzonou, A., Lipworth, L., Signorello, L.B., Kalapothaki, V., Trichopoulos, D. (1995) Life-style factors and medical conditions in relation to esophageal cancer by histologic type in a low-risk population. *Int. J. Cancer.* **68**, 17-49.
31. Camus, A.M., Geneste, O., Honkakoski, P., Berezat, J.C., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Bartsch, H., Lang, M.A. (1993) High variability of nitrosamine metabolism among individuals: role of cytochromes P450 2A6 and 2E1 in the dealkylation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in mice and humans. *Mol Carcinogen.* **7**, 268-275.
32. Crespi, C.L., Penman, B.W., Leakey, J.A., Arlotto, M.P., Stark, A., Parkinson, A., Turner, T., Steimel, D.T., Rudo, K., Davies, R.L. (1990) Human cytochrome P450IIA3: cDNA sequence, role of the enzyme in the metabolic activation of promutagens, comparison to nitrosamine activation by human cytochrome P450IIE1. *Carcinogenesis.* **11**, 1293-1300.
33. Umbenhauer, D., Wild, C.P., Montesano, R., Saffhill, R., Boyle, J.M., Huh, N., Kirstein, U., Thomale, J., Rajewsky, M.F., Lu, S.H. (1985) O(6)-methyldeoxyguanosine in oesophageal DNA among individuals at high risk of oesophageal cancer. *Int J Cancer.* **36**, 661-665.
34. George, J., Liddle, C., Murray, M., Byth, K., Farrell, G.C. (1995a) Pre-translational regulation of cytochrome P450 genes is responsible for disease-specific changes of individual P450 enzymes among patients with cirrhosis. *Biochem Pharmacol.* **49**, 873-881.

35. George, J., Murray, M., Byth, K., Farrell, G.C. (1995b) Differential alterations of cytochrome P450 proteins in livers from patients with severe chronic liver disease. *Hepatology*. **21**, 120-128.

Figure Legends

Figure 1 : Immunoblotting of oesophageal cytochrome P450s: CYP1A1/2, CYP2A6, CYP2E1, CYP3A4/5 and CYP4A. Microsomes from individual oesophageal mucosa were analysed by immunoblotting as described in the Materials and Methods. In this figure a representative sample of those specimens analysed is presented. Microsomes from human liver (B) and lung (A) are analysed on the same membrane for comparison. Densitometric values of staining intensity for each patient were adjusted for staining intensity of the liver microsomes on the same immunoblot for calculation of interindividual variations in protein levels. The fold-variation in intensity of staining between samples on these particular immunoblots was 5.2, 1.9, 15, 5.4, and 5.2 for CYP 1A1/2, CYP2A6, CYP2E1, CYP3A4/5 and CYP4A respectively. Variation in staining intensities for a given CYP between all samples examined was greater than that in the samples presented in the figure, namely, 14.5, 22, 43, 12.6, and 8-fold for CYP 1A1/2, CYP2A6, CYP2E1, CYP3A4/5 and CYP4A respectively.

Figure 2: Representative RT-PCR data from oesophageal specimens of mRNA using the methods described in Materials and Methods.

Table 1: Patient Characteristics

Patient code	Age (years)	Sex (m/f)	1Histology	2Tumour Location	3Tumour Stage	Tobacco exposure cigarette/day/years	Current Smoker	4Alcohol intake	5GERD (duration)	4Hot Beverage Intake
E01	66	m	ad	mid	IIA	30 day x 30 yr	quit 15 yr	light	30 yrs	0
E02	61	m	ad	abdo	IIA	no	no	light	no	8
E03	65	m	sq	mid	IIA	10 day x 40yr	yes	no	no	0
E04	67	m	ad	lower	I	no	no	light	no	48
E05	78	m	ad	lower	IV	20 day x 56 yr	yes	light	no	36
E06	75	m	ad	lower	IIA	30 day x 62 yr	yes	heavy	no	3
E07	59	m	ad	abdo	IV	no	no	no	no	10
E08	73	m	ad	mid	III	30 day x 49 yr	quit 10 yr	no	20 yrs	48
E09	68	m	ad	lower	III	no	no	no	no	32
E10	66	m	ad	lower	IIA	no	no	no	no	36
E11	51	m	ad	mid	III	20 day x 30 yr	yes	heavy	1 yr	0
E12	78	m	sq	lower	III	10 day x 58 yr	yes	no	no	0
E13	48	m	ad	abdo	III	10 day x 22 yr	yes	light	no	12
E14	56	f	sq	mid	III	20 day x 36 yr	quit 7 yr	light	no	10
E15	41	f	sq	mid	IV	40 day x 27 yr	yes	heavy	no	48
E16	62	m	ad	lower	III	25 day x 38 yr	yes	heavy	no	8
E17	55	m	ad	lower	IIB	10 day x 17 yr	quit 20 yr	light	20 yrs	0
E18	72	m	sq	lower	IIA	no	no	no	no	72
E19	63	m	ad	lower	III	20 day x 43 yr	yes	light	5 yrs	24
E20	76	m	ad	abdo	IIA	20 day x 61 yr	yes	light	no	6
E21	67	m	ad	abdo	III	30 day x 51 yr	yes	heavy	7 yrs	12
E22	72	m	ad	lower	IV	no	no	no	no	56
E23	71	m	ad	upper	IIA	no	no	no	no	3
E24	59	m	sq	mid	III	10 day x 23 yr	quit 10 yr	no	no	10
E25	62	m	ad	lower	III	no	no	no	2 yrs	48

1, ad, primary adenocarcinoma; sq, squamous cell carcinoma.

2, upper, above tracheal bifurcation; mid, tracheal bifurcation to inferior border of inferior pulmonary vein; lower, inferior pulmonary vein to phreno-oesophageal ligament; abdo, phreno-oesophageal ligament to anatomic oesophagogastric junction

3, Stage was defined as by the UICC for primary cancer of the oesophagus

4, Hot beverage and alcohol intake, see Materials and Methods for details

5, History of gastro-oesophageal reflux disease defined clinically

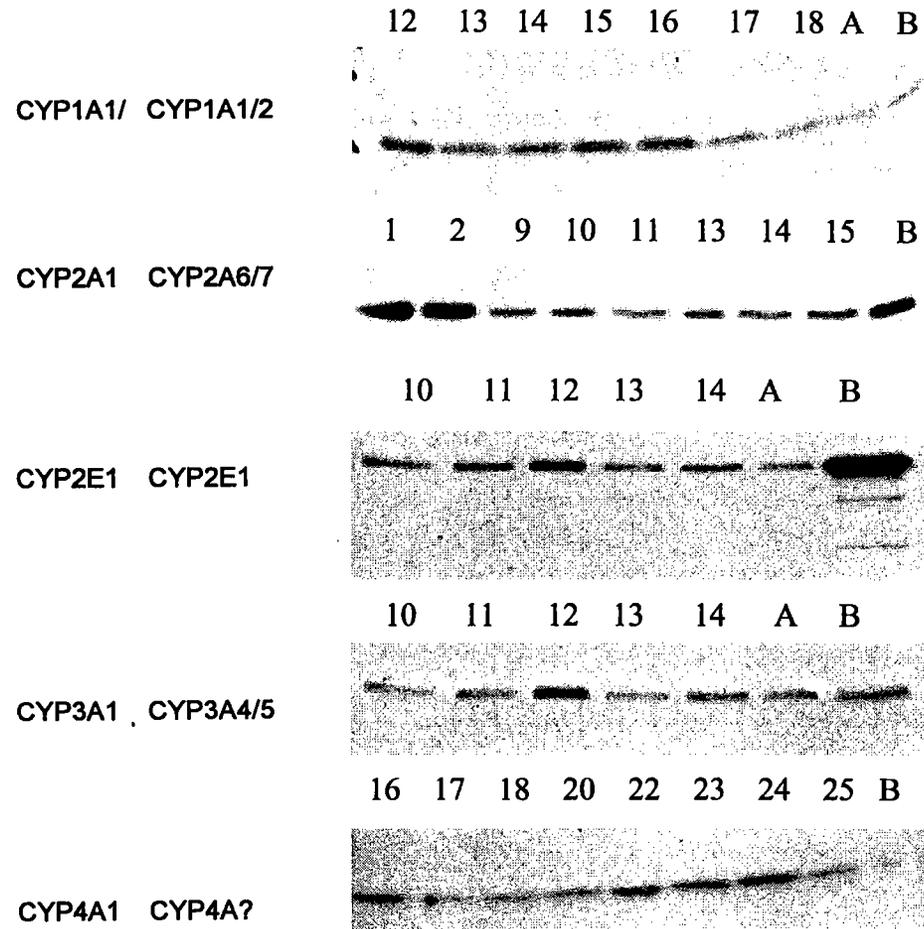
Table 2: CYP mRNA expression in normal human oesophageal mucosa

CYP mRNA	^a positive	negative
CYP 2E1	17	2
CYP 1A1	16	3
CYP 1A2	11	8
CYP 3A3/4	19	0
CYP 2B6/7	0	19
CYP 4B1	19	0

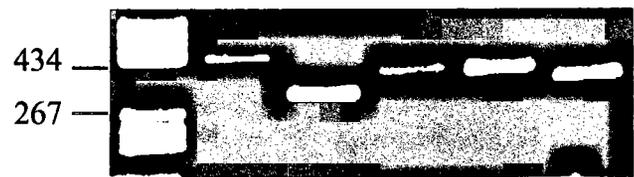
^a a total of 19 samples of tissue yielded mRNA in this study

Antibody Human P450
Used isoenzyme

Patient no.



bp CYP 1A1 1A2 2B6/7 2E1 3A3/4



L'expression des principaux cytochromes P450 intervenant dans le métabolisme de carcinogènes du tabac, c'est à dire le CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1 et le CYP3A3/4, a été mise en évidence dans la muqueuse non néoplasique par les techniques de Western-Blot et de RT-PCR liquide. Les protéines des CYP2A et 4A ont également été révélées par immunoblot. La présence de l'ARNm du CYP4B1 a été démontrée. Le transcrite du CYP2B6/7 n'a été détectée dans aucun échantillon. Les transcrits des CYP1A1, 2E1, 3A3/4 et 4B1 sont exprimés dans la majorité des muqueuses œsophagiennes, alors que l'ARNm du CYP1A2 n'est présent que dans 11 échantillons sur 19. Une variation interindividuelle a été également constatée parmi les taux de protéines pour les différents P450. La confrontation de ces résultats avec les données épidémiologiques n'a pas permis de mettre en évidence une relation entre l'expression de ces isoenzymes et les facteurs de risque (alcool, tabac, reflux gastro-œsophagien, chaleur).

Ces résultats confirment l'expression au sein de la muqueuse œsophagienne humaine, des enzymes capables d'activer *in situ* les carcinogènes du tabac. Par contre ils ne permettent pas de conclure définitivement quant à l'existence ou non d'une induction de ces enzymes dans la muqueuse œsophagienne sous l'influence de l'alcool. Nous avons mis en évidence le CYP2E1 dont l'expression au sein de ce tissu n'avait pas été décrit dans la littérature jusqu'à ce jour. Il aurait été intéressant de mesurer une activité spécifique de l'isoenzyme CYP2E1 à partir de ces muqueuses œsophagiennes et de corrélérer les résultats avec les données épidémiologiques. Nous avons tenté, en vain, de déceler une activité enzymatique en suivant les conditions opératoires de la NMBA déméthylase (cf annexes). Le niveau d'expression de ces enzymes dans les muqueuse digestives est peut-être trop faible pour être décelé avec la méthode utilisée et/ou les enzymes se sont peut-être dégradées au cours de la préparation et de la conservation des pièces d'exérèse. La sensibilité de la méthode pourrait être améliorée par l'utilisation de produits radiomarqués et de substrats plus spécifiques du CYP2E1 humain (par exemple la chlorzoxazone).

L'ARN messenger du CYP2E1 a été observé dans 4 échantillons de biopsies de muqueuse non néoplasique en provenance de Normandie. La séquence du produit amplifié obtenu à partir de l'un de ces échantillons a été vérifiée en utilisant la méthode enzymatique par les di-désoxynucléotides de Sanger (voir annexes D et E). La séquence du fragment oligonucléotidique correspond à la séquence de l'ARNm du CYP2E1 décrite par Song [Song et al., 1986]. Ainsi, ce résultat complète ceux obtenus par Western-Blot et RT-PCR liquide pour le CYP2E1.

6.3 Localisation des P450 dans la muqueuse œsophagienne humaine

Les résultats qui sont décrits dans les paragraphes suivants, ont été obtenus à partir d'échantillons recueillis dans le cadre d'une étude cas-témoins multicentrique (Caen, Marseille) mise en place par notre équipe.

Détection des transcrits du CYP2E1 par hybridation *in situ*

Dans le but d'analyser par hybridation *in situ* la répartition du CYP2E1 dans la muqueuse œsophagienne, nous avons choisi d'utiliser un fragment d'ADNc obtenus par RT-PCR comme sonde oligonucléotidique complémentaire de l'ARNm du CYP2E1 (oligo2E1), après marquage avec la digoxigénine-11-d'UTP (voir annexe F). Les contraintes méthodologiques ne nous ont pas permis, dans un premier temps, de mener ces essais dans notre propre laboratoire (Caen). La collaboration avec le laboratoire de Pathologie Moléculaire du Pr Kandolf (Université de Tübingen, Allemagne), nous permet de proposer les premiers résultats des essais d'adaptation à notre système d'une méthode pratiquée en routine (voir annexe H).

A partir de deux pièces d'exérèse (tissu non néoplasique et tissu tumoral) provenant d'un même malade (Caen), nous avons cherché à établir les conditions optimales pour l'hybridation *in situ*. La première étape a consisté à vérifier la présence d'ARN intacts au sein des deux tissus, fixés par le paraformaldéhyde tamponné puis inclus dans la paraffine. A partir de deux coupes préalablement déparaffinées au xylène, les ARN totaux ont été extraits par la méthode classique de Chomczynski et de Sacchi [Chomczynski and Sacchi, 1987](voir annexe G). La figure 6.1 présente les résultats de l'électrophorèse. L'amplification par RT-PCR d'une séquence de l'ARNm de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), présente dans tous les tissus (pistes 6 et 7) constitue le témoin interne de validité de la méthode d'extraction. Dans le tissu tumoral les produit d'amplification obtenus avec des amorces hexamériques, prouvent la présence d'ARN spécifiques du tissu tumoral (piste 5). L'absence de bandes avec les amorces spécifiques du CYP2E1 (pistes 1 et 2) et les amorces hexamériques dans le tissu non néoplasique (piste 3) pourrait s'expliquer par une perte de l'intégrité des ARN au cours du déparaffinage des coupes, compromettant ainsi les étapes de RT et de PCR.

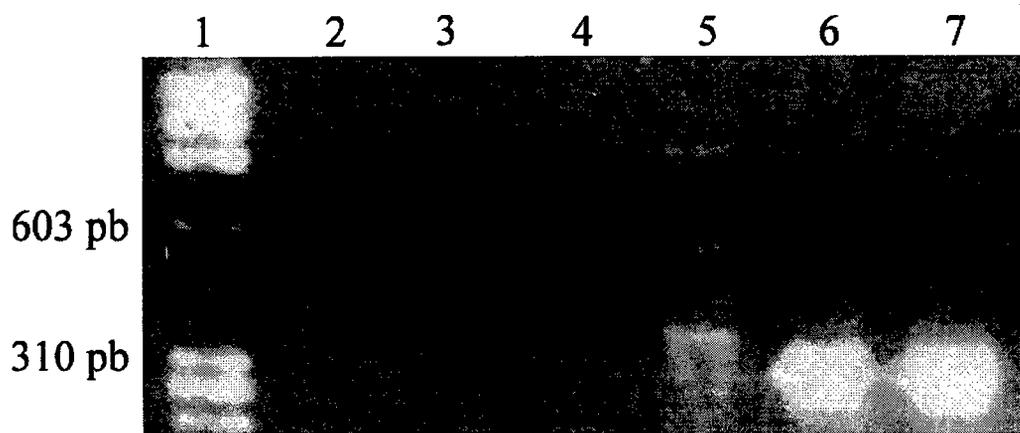
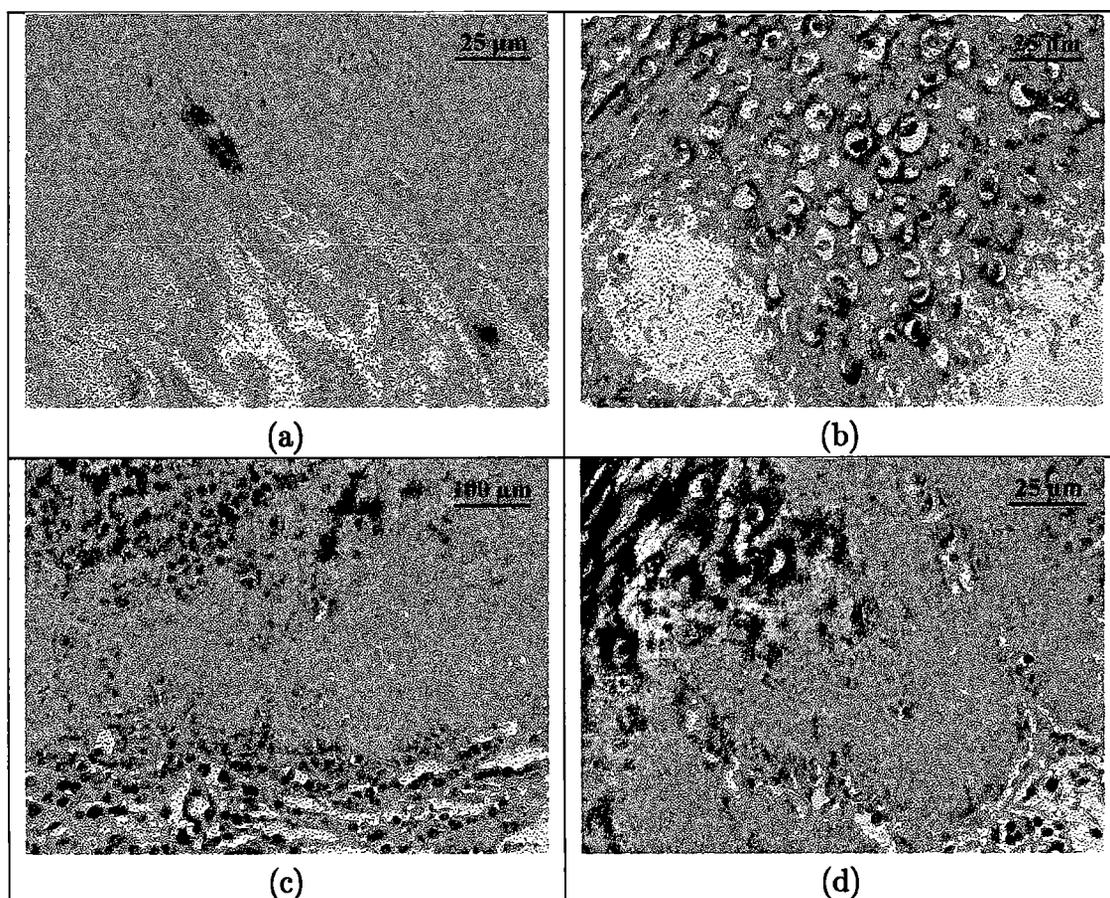


FIG. 6.1 – Détection sur gel d'agarose 2% d'ARNs extraits de coupes tissulaires de 5 μ m d'épaisseur par RT-PCR. La PCR s'est déroulée en 35 cycles dont chacun comprend 3 étapes: 30 secondes à 94 °C(dénaturation), 45 secondes à 55 °C(hybridation), 1 minute à 72 °C(élongation) suivi d'une étape d'élongation finale (7 minutes à 72 °C). Gel d'agarose 2%: un marqueur de la taille des fragments (piste 1), avec les amorces spécifiques de l'ARNm-CYP2E1 en présence de tissu normal (piste2) et du tissu tumoral (piste3), avec les amorces hexamériques (piste 4, tissu non néoplasique) (piste 5, tissu tumoral), contrôle interne avec les amorces de la GAPDH (piste 6, tissu non néoplasique) (piste 7, tissu tumoral).

Pour assurer la validité des résultats, deux types de témoins négatifs sont indispensables. L'absence de bruit de fond associé à l'utilisation d'une sonde marquée à la digoxigénine doit être vérifiée. Ainsi une sonde utilisée pour détecter la présence de génomes d'entérovirus dans certains tissus, a été marquée à la digoxigénine-11-d'UTP puis hybridée avec chaque type de muqueuse oesophagienne [Kandolf et al., 1987]. Les résultats se sont avérés négatifs même en présence de concentrations élevées de la sonde. La spécificité de l'hybridation de notre sonde avec les ARNm du CYP2E1 est confirmée par l'absence de signal dans le cas d'une hybridation *in situ* à partir d'un autre type de tissu (muscle cardiaque de souris SWR). L'absence de signal traduit également l'absence d'adsorption non spécifique de la digoxigénine. Le déroulement optimal de l'expérience est aussi validé par la lecture du témoin positif: les ARNs d'Enterovirus sont détectés par la sonde spécifique dans les coupes de muscle cardiaque de souris.

Le système ainsi mis au point, a permis d'obtenir les résultats présentés sur la figure 6.2. Ils mettent en évidence la présence d'un marquage avec la sonde oligo2E1 uniquement dans la muqueuse oesophagienne non néoplasique. Ce marquage se situe dans les cellules endothéliales du chorion et dans les couches superficielles de l'épithélium malpighien. Le signal s'intensifie avec les concentrations croissantes de la sonde. En revanche, aucune réponse n'est obtenue avec le tissu tumoral. La présence de cytochromes P450 notamment du CYP2E1 dans les cellules endothéliales, avait déjà été détectées dans le tissu hépatique [Botto et al., 1994], [Palmer et al., 1992]. Par contre la détection du transcrit dans les cellules épithéliales des couches superficielles n'a jamais été documentée jusqu'à ce jour. Ce résultat demanderait à être confirmé sur d'autres échantillons, afin de tenter de trouver une signification. Quant à l'absence d'un signal dans le tissu néoplasique, elle pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité de l'expression des cytochromes au sein des deux types tissulaires (normal et tumoral) [Sultatas and E.S., 1980]. Un gain de sensibilité par l'utilisation de nouvelles sondes radiomarquées pourrait être envisagé dans ce cas, pour améliorer et confirmer la détection de l'ARNm-CYP2E1. L'utilisation d'une sonde hybridant le transcrit d'une protéine endogène dont l'expression reste constante (par exemple GAPDH), devra être envisagée parallèlement, comme contrôle interne.

Il est difficile d'interpréter les résultats de manière définitive car l'analyse d'un seul échantillon en limite l'exploitation. Néanmoins, ces résultats préliminaires nous incitent à étendre l'étude à d'autres échantillons biologiques et à améliorer la sensibilité de la méthode en utilisant la même sonde mais radiomarquée. Cette approche nous permettra de mettre en évidence une éventuelle relation entre l'ex-



- (a) : Témoin positif. Détection d'ARN d'Entérovirus dans le muscle cardiaque de souris.
- (b) : Détection d'ARNm du CYP2E1 dans les couches superficielles de l'épithélium malpighien (faible concentration de la sonde).
- (c) et (d) : Détection d'ARNm du CYP2E1 dans les couches superficielles de l'épithélium malpighien et les cellules endothéliales (forte concentration de la sonde) à deux grossissement différents.

FIG. 6.2 – Etude par hybridation *in situ* de la localisation du transcrite du CYP2E1 au sein d'une muqueuse œsophagienne non néoplasique. Utilisation de sonde marquée à la digoxigénine-11-dUTP.

pression de cet isoenzyme et la présence de lésions imputables à la consommation d'alcool et aux carcinogènes du tabac.

6.4 Mesure des adduits de méthylation dans l'ADN de la muqueuse œsophagienne

Le tabac contient des nitrosamines spécifiques capables, après activation par des cytochromes P450, comme le CYP2E1, de créer sur l'ADN des adduits de méthylation. Afin de confirmer l'existence d'une activité de ces isoenzymes au sein de la muqueuse œsophagienne, nous avons tenté de mesurer le taux d'alkylation de l'ADN sur quelques échantillons en provenance de Normandie et de Lyon.

6.4.1 Mesure de la 7-méthylguanine

Nous avons dans un premier tenter de mesurer la 7-meG, en suivant le protocole décrit dans la rubrique matériels et méthodes, dans 4 tissus œsophagiens humains.

Comme nous l'avions mentionné dans le chapitre précédant, la vérification de l'absence de contamination en ARN est une étape primordiale de la quantification de la 7meG, la 7-méthylguanosine étant présente naturellement dans les acides ribonucléiques. Aussi, pour la mesure de cet adduit dans nos échantillons humains, 3 traitements à la RNase se sont avérés nécessaires. En effet, une contamination en ARN de 10% a été mesurée après 2 traitements à la RNase. Elle n'était plus que de 0.5% après la dernière digestion enzymatique. Or, comme nous pouvons le constater dans le tableau 6.1 ces différents traitements diminuent notablement le taux d'ADN. De ce fait, la majorité des échantillons n'ont pu être quantifiés. Ils se situaient dans une zone de concentration correspondant à la limite de détection; ce seuil de détection dépendant non seulement de la sensibilité de la méthode mais aussi de la quantité d'ADN de départ.

6.4.2 Mesure de l'adduit O⁶méthylguanine

Etant donné la faible quantité de tissu œsophagien disponible (généralement inférieure à 1 gramme), nous avons donc poursuivi l'étude en appliquant une

Echantillons	[ADN] mg/ml	[ADN] mg/ml après deux traitements à la Rnase	[ADN] mg/ml après trois traitements à la Rnase
1	0,334	0,121	ND
2	0,854	0,538	0,205
3	0,350	0,137	ND
4	0,811	0,411	0,183

TAB. 6.1 – *Quantification de l'ADN extrait de muqueuses œsophagiennes humaines avant et après plusieurs traitements à la RNase.*

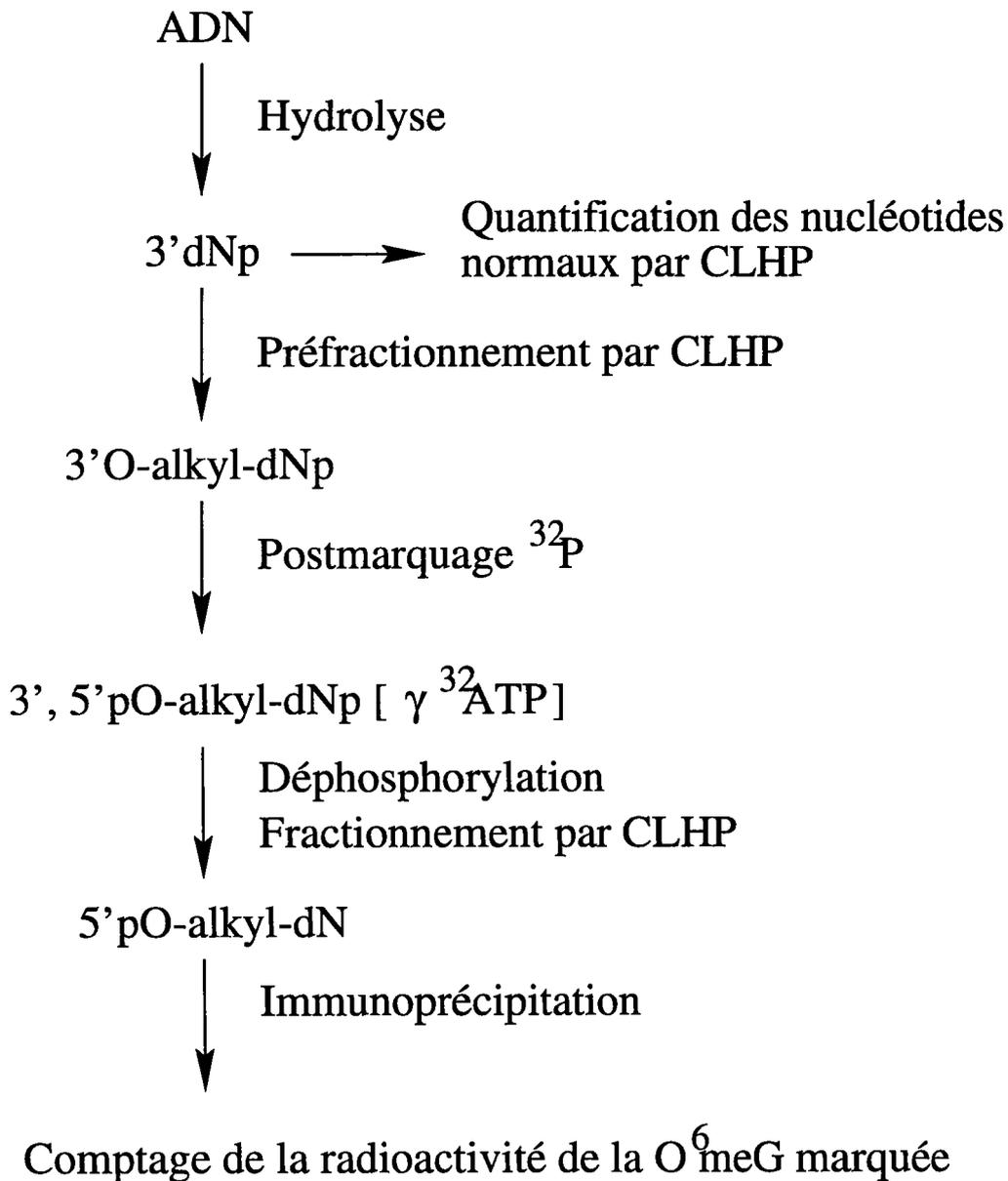
méthode beaucoup plus sensible (voir annexe I). Elle détecte la O⁶-méthyl-déoxy-guanosine à partir de petites quantités d'ADN (100 µg), en combinant les performances d'un préfractionnement par CLHP avec la sensibilité du postmarquage et la spécificité de l'immunopurification (figure 6.3). Ainsi, les limites de détection peuvent atteindre le femtomole, soit 1 adduit 10⁸ bases parentales. Cette méthode avait déjà été décrite par des japonais [Kang et al., 1992].

Cette technique a été appliquée à 4 muqueuses non néoplasiques humaines en provenance de Normandie et de Lyon. Les adduits ont été recherchés dans le revêtement malpighien préalablement séparé des autres couches de la muqueuse.

L'hydrolyse enzymatique de l'ADN est nécessaire pour permettre l'analyse de la totalité des adduits présents. Elle a été réalisée en présence de coformycine, inhibiteur de l'adénosine déaminase, afin d'éviter une dégradation de la O⁶-medG. La figure 6.4 montre un chromatogramme type d'élution par CLHP des déoxy-ribonucléosides 3'-monophosphates issus de l'hydrolyse enzymatique de l'ADN. Elle permet en outre de vérifier la qualité de l'hydrolyse et de quantifier les nucléotides normaux.

Les résultats de l'hydrolyse pour les quatre échantillons sont regroupés dans le tableau 6.2. Ils indiquent un rapport de la 3'dTMP/3'dGMP égal à 1.

La O⁶-méthyl 2'déoxyguanosine 3'monophosphate (3'O⁶-medGp) présente dans les hydrolysats d'ADN est ensuite purifiée par CLHP couplée à un collecteur de fraction. Cette méthode simple et rapide (30 minutes) permet d'éluer et de séparer la 3'O⁶-medGp des déoxyribonucléotides 3'-monophosphates qui donnent des pics à des temps de rétention différents en début d'élution (figure 6.5). L'incorporation de la caféine dans les hydrolysats d'ADN permet entre autre de récupérer les fractions de la 3'O⁶-medGp qui ne sont pas détectables par simple CLHP.

FIG. 6.3 – Schéma de la méthode d'analyse de la O⁶méthyldéoxyguanosine

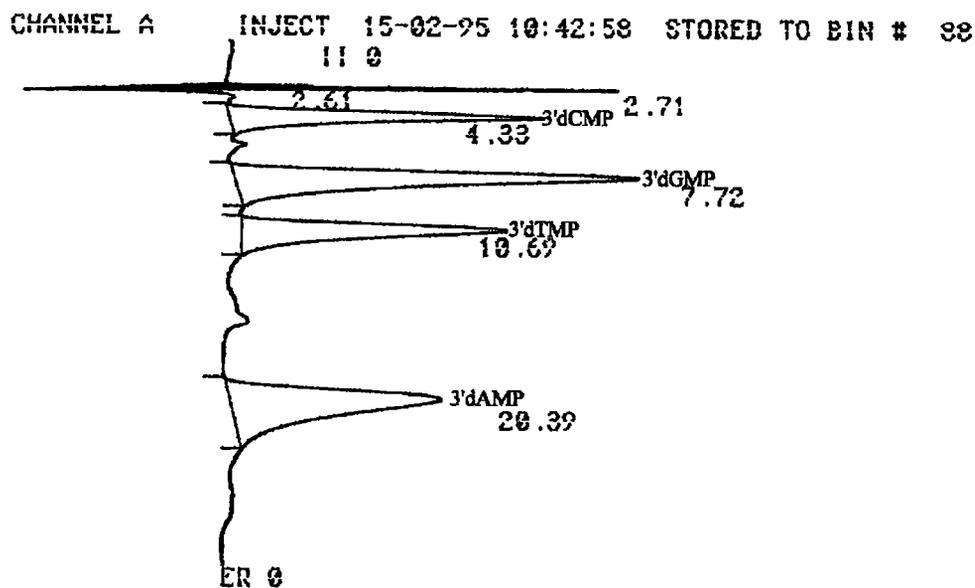


FIG. 6.4 - Profil typique d'éluion par CLHP des déoxyribonucléosides-3'-monophosphates issus de l'hydrolyse enzymatique de l'ADN (Absorbance 254 nm)

Echantillon	3'dTMP	3'dGMP	$\frac{3'dTMP}{3'dGMP}$
A	61856	48886	1,3
B	65657	71021	0,94
C	47350	68544	0,7
D	72680	85363	0,9

TAB. 6.2 - Quantification des nucléotides normaux (en pmol par 100 μ l du milieu d'hydrolyse de l'ADN (100 μ g).

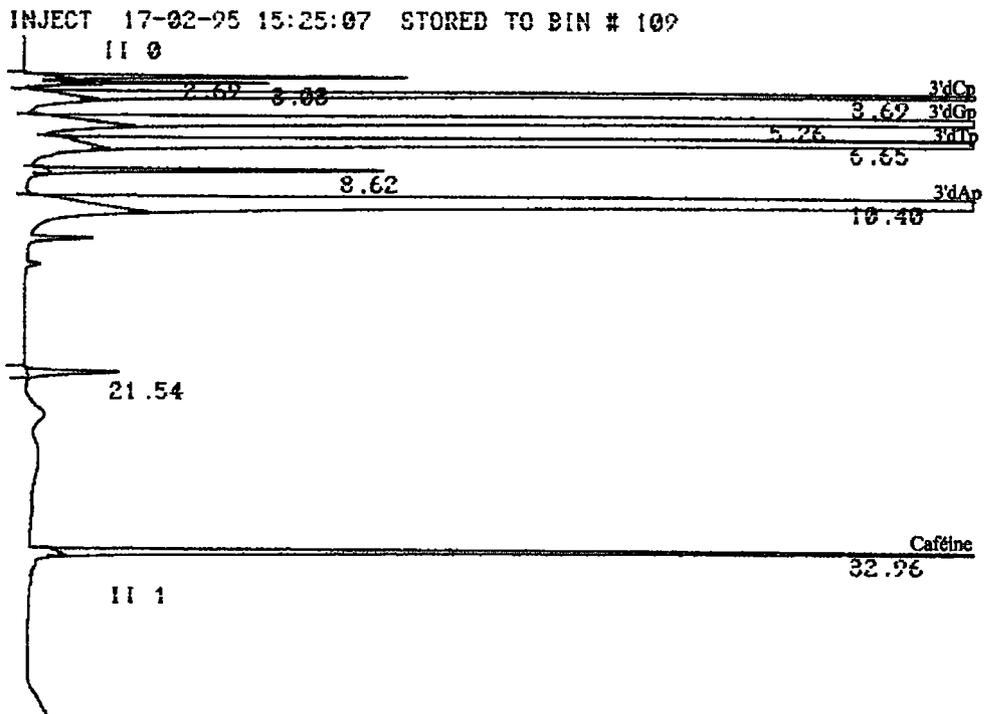


FIG. 6.5 - Chromatogramme de préfractionnement par CLHP (Absorbance 254 nm).

Echantillon	Taux de radioactivité (cpm)
1 fmol O ⁶ -medGp	5700
5 fmol O ⁶ -medGp	13378
20 fmol O ⁶ -medGp	44923
A	2549
B	737
C	2227
D	1064

TAB. 6.3 – Quantification de la O⁶-medGp.

Après l'étape de postmarquage et d'un nouveau préfractionnement par CLHP, il est possible de vérifier la présence de ces adduits par mesure de la radioactivité. La figure 6.6 illustre l'étape du préfractionnement de l'adduit radiomarqué (5'-O⁶-medGp).

L'intérêt de l'immunoprécipitation est de piéger les molécules radioactives par addition d'anticorps monoclonaux spécifiques et à isoler par précipitation les complexes antigènes-anticorps marqués. Après un comptage de la radioactivité, les résultats ont été rassemblés dans le tableau 6.3

Ils mettent en évidence la présence de l'adduit O⁶-méthylguanine au sein de l'épithélium œsophagien. Mais étant donné que la totalité des échantillons sont situés dans la zone limite de détection, il est impossible de quantifier cet adduit.

6.5 Discussion

L'analyse de l'adduit O⁶-méthyl-déoxyguanosine par une technique associant CLHP, le post-marquage et l'immunoprécipitation a été réalisée dans un premier temps sur des muqueuses œsophagienne en provenance de la Basse-Normandie et de la région Rhône Alpes. Elle a permis de détecter mais pas de quantifier cet adduit chez ces patients. Or, des études antérieures avait mesuré le taux de l'O⁶medG dans des pièces d'exérèses d'œsophage, d'estomac et de muqueuse orale en provenance de régions à haute incidence, où l'exposition aux nitrosamines est fortement suspectée dans l'apparition des cancers des voies aérodigestives. Dans la région de Lin-Xian en Chine, 18 échantillons de tissus œsophagiens sur 26 et 9 échantillons d'estomac sur 11 présentaient des taux de O⁶medG compris entre 50 et 161 fmol/mg d'ADN. Dans une autre étude [Wild and Montesa, 1991],

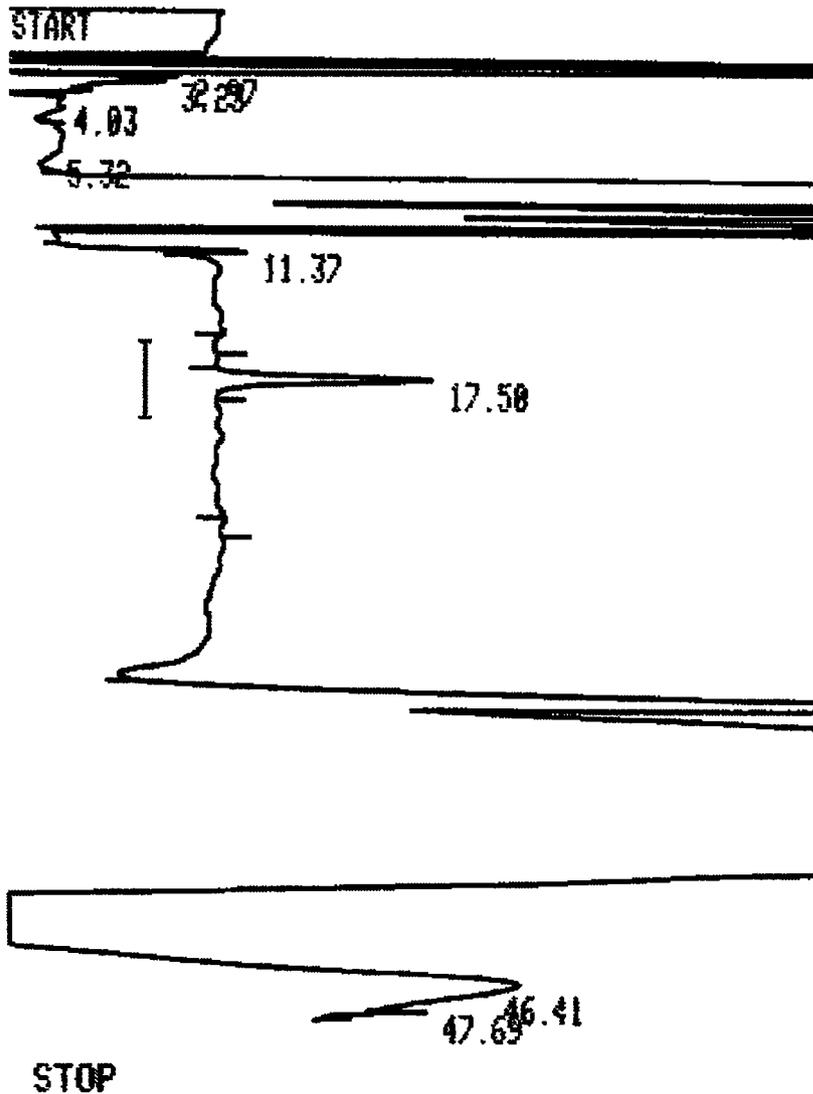


FIG. 6.6 – Elution de 5'-O⁶-medGp à partir d'une colonne CLHP C18 (Absorbance 254 nm) après postmarquage. Les fractions (|) contenant de la 5'-O⁶-medGp (suspectée par la présence d'un pic à 17,58 min) sont recueillies puis immunoprécipitées avec l'anticorps monoclonal anti 5'-O⁶-medGp. Le taux de radioactivité est ensuite mesurée en scintillation liquide

des taux de 1000 fmol/mg d'ADN ont été mesurés dans des pièces d'exérèses d'œsophage (4/5) et d'estomac (6/19) en provenance de Normandie. Par contre dans la région Rhône Alpes, région de faible incidence, un seul échantillon de tissu œsophagien sur 11 était positif, alors que la totalité des muqueuses d'estomac présentaient des taux de O⁶medG similaires à ceux de Normandie. Une étude de Wild [Wild and Montesa, 1991], rapporte également d'importants taux de O⁶medG (1300fmol à 4200fmol/mg d'ADN) dans des muqueuses de la cavité orale de fumeurs et constate l'absence de cet adduit dans les échantillons des non fumeurs. Ces différentes études ont mesuré cet adduit en couplant la CLHP avec un dosage immunologique utilisant un anticorps monoclonal spécifique de l'O⁶medG. La limite de détection est également pour ces méthodes de dosages, de l'ordre d'1 adduit pour 10⁸ nucléotides naturels dans l'ADN. La spécificité et la sensibilité de notre méthode ne peut donc pas être mise en cause. La quantité d'ADN disponible n'apparaît pas non plus comme un facteur limitant de notre analyse. En effet, les quantités de muqueuses œsophagiennes de notre étude ont permis d'extraire des taux d'ADN compris entre 349 et 457 µg, lesquels étaient suffisamment importants pour la méthode utilisée (100 µg d'ADN). Par contre, par comparaison avec les précédentes études qui disposaient de la totalité du tissu œsophagien (de 1 à 6 g de tissu), la mesure de l'O⁶medG dans nos échantillons a été réalisée uniquement dans l'épithélium malpighien de l'œsophage, la musculature ayant été séparée. La sélectivité cellulaire dans la distribution de la O⁶medG au sein du tissu œsophagien pourrait expliquer le faible niveau d'adduits. Ayant mis en évidence les cytochromes P450 responsables de l'activité des carcinogènes du tabac dans le revêtement malpighien, l'hypothèse d'une vitesse de réparation plus rapide pourrait expliquer la distribution hétérogène de l'O⁶medG au sein de l'organe. Le potentiel de réparation par l'O⁶méthylguanine-ADN-méthyltransférase pourrait être induit à la suite d'une exposition directe et répétée du revêtement malpighien au tabac [Laval, 1991]. Une étude *in vivo* illustre l'hétérogénéité de la formation et de la réparation des adduits au niveau cellulaire, par la mise en évidence de l'accumulation d'O⁶medG dans les différentes couches cellulaires du tube digestif de rats traités par un cancéro-gène méthyliant (N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine). Pour l'estomac et l'œsophage, les cellules positives se localisent au niveau de la couche basale, avec un marquage immunocytochimique dose-dépendant. Toutefois, la répétition des traitements influe le taux de méthylation. L'administration répétée d'une faible dose diminue l'intensité du marquage, par rapport à l'administration d'une dose unique forte. L'induction de l'O⁶méthylguanine-ADN-méthyltransférase, qui avait déjà été mis en évidence dans l'œsophage et l'estomac de rat [Zaidi et al., 1993] expliquerait en partie ce phénomène.

6.6 Conclusion

Au vu de ces résultats, il apparaît essentiel de prendre la globalité des couches tissulaires de l'œsophage pour étudier la formation des adduits. Il serait intéressant de mettre en évidence une relation entre l'expression des enzymes du métabolisme des carcinogènes du tabac et la distribution des adduits au niveau cellulaire. Ceci est d'autant plus important que nos connaissances sur les mécanismes biochimiques régissant les systèmes d'activation et de réparation des carcinogènes du tabac au sein de cet organe ne sont pas jusqu'à ce jour bien élucidés.

Chapitre 7

Influence de l'alcool et du tabac sur l'expression de marqueurs de prolifération cellulaire et de p53 dans la muqueuse oesophagienne humaine

7.1 Introduction

Le calvados et les autres eaux-de-vie sont fortement associés au risque de cancer lorsqu'ils sont absorbés avec une boisson chaude. Afin de vérifier l'hypothèse d'une augmentation de la prolifération cellulaire à la suite d'une exposition directe de la muqueuse aux boissons alcoolisées bues chaudes, nous avons recherché par immunohistochimie, l'expression d'un marqueur de prolifération (Ki67) et de la protéine p53 dans la muqueuse œsophagienne non néoplasique prélevée à distance du cancer. 12 échantillons archivés au Laboratoire d'Anatomie Pathologique du Centre François Baclesse ont été analysés. Ils proviennent de patients pour lesquels des données épidémiologiques détaillées (exposition alcool/tabac, régime alimentaire) ont été recueillies [Launoy et al., 1997b]. Cette étude n'a un intérêt que si on inclut des muqueuses saines provenant de non malades. L'obtention de ce type d'échantillons est très difficile. En 1981, dans le canton de Vassy (dans le Sud-Ouest du Calvados), Jacob et ses collaborateurs avaient prélevé chez des volontaires sains des biopsies de muqueuses normales, pour étudier la prévalence des lésions pré-néoplasiques de l'œsophage dans une population à haut risque

[Jacob et al., 1993]. Parmi les échantillons qui avaient été ainsi recueillis et archivés, nous avons sélectionné 32 biopsies de muqueuses normales. Les personnes avaient répondu à un questionnaire portant sur leurs habitudes alimentaires et leur consommation alcoolo-tabagique.

En associant ces deux études, nous avons cherché à déterminer si l'existence d'une relation entre le taux de prolifération cellulaire, le marquage immunohisto-chimique de p53 avec les données épidémiologiques pouvaient nous renseigner sur le rôle du tabac, de l'alcool et de son mode de consommation (action de la chaleur) dans la survenue d'un processus prénéoplasique dans les zones d'œsophagite chronique.

7.2 Description histologique des échantillons

Les 12 pièces d'exérèse chirurgicale ont été prélevées chez des patients atteint d'un cancer épidermoïde de l'œsophage de juin 1990 à juin 1993. Ces malades n'avaient reçu aucun traitement pré-opératoire (chimiothérapie et radiothérapie). Chaque prélèvement a été soigneusement étudié en présence du Dr A.M. Mandard, chef de service d'Anatomie-Pathologie du Centre F. Baclesse de Caen. Nous avons ainsi défini pour chaque cas, les types histologiques des cancers et les différentes lésions qui lui sont associées. Les critères histologiques de l'œsophagite chronique et de la dysplasie ont déjà été décrits dans le chapitre 2. Ces données sont regroupés dans le tableau 7.1.

Après avoir analysé chaque section de la pièce d'exérèse, nous avons choisi la coupe représentant au mieux la présence d'une œsophagite chronique.

Les biopsies en provenance du canton de Vassy ont été également examinées. Sur les 134 personnes volontaires, 38 ont eu une enquête sur leurs habitudes diététiques et alcoolo-tabagiques. Elle concerne des hommes âgés de 35 ans à 64 ans. 32 biopsies prélevées à une distance de 25 cm ou de 33 cm de la cavité buccale ont été sélectionnées pour l'étude. 22 blocs ont pu être utilisés pour la technique d'immunohistochemie, car ils étaient les seuls à fournir les coupes histologiques présentant à la fois le revêtement malpighien et une partie du chorion. L'étude histologique de chaque biopsie est résumée dans le tableau 7.2.

Il est à noter que parmi ces 134 personnes, 3 patients ont développé un cancer de la sphère aérodigestive supérieure (cancer de l'hypopharynx, de l'œsophage et de la langue) et 2 ont souffert d'un cancer sans relation avec l'imprégnation

N.Echan.	Type de cancer	Lésions associées
239 576	carcinome malpighien indifférencié basaloïde	œsophagite chronique modérée, dysplasie de grade I et II
229 701	carcinome malpighien moyennement différencié	œsophagite chronique, dysplasie de grade III
241 911	carcinome malpighien différencié	œsophagite chronique modérée, dysplasie de grade III, œsophagite aiguë, discrètes atypies basales
219 822	carcinome malpighien peu ou moyennement différencié	œsophagite chronique légère et modérée, hyperplasie basale
221 707	carcinome malpighien différencié kératinisant	œsophagite chronique légère et modérée, dysplasie de grade I, II ou III, œsophagite aiguë
226 438	carcinome malpighien moyennement différencié kératinisant	œsophagite chronique modérée, œsophagite aiguë, foyer d'atypie épithéliale
226 238	carcinome malpighien différencié	œsophagite chronique modérée, dysplasie de grade III
223 224	carcinome malpighien moyennement différencié	œsophagite chronique modérée, dysplasie de grade III
261 484	carcinome malpighien moyennement différencié	œsophagite chronique modérée, dysplasie de grade I, II ou III, présence de cellules anormales accompagnées d'une hyperplasie basale
261 634	carcinome malpighien moyennement différencié avec des territoires peu différenciés.	œsophagite chronique modérée, dysplasie de grade I, II ou III, présence de cellules anormales accompagnées d'une hyperplasie basale.
218 609	carcinome malpighien moyennement différencié kératinisant	œsophagite chronique légère à modérée, zones d'œsophagites aiguës.
236 471	carcinome indifférencié basaloïde	œsophagite chronique modérée, dysplasie de grade I, II ou III, dysplasie de grade I, II ou III (nombreuses).

TAB. 7.1 – Description histologique des pièces d'exérèses de personnes atteintes d'un cancer épidermoïde.

Echant.	Histologie des biopsies
3264005	Muqueuse subnormale, petite ascension papillaire
3280004	Œsophagite chronique légère
3251034	Œsophagite chronique modérée
3266024	Belle Œsophagite chronique
3264041	Histologie subnormale
3266004	Œsophagite chronique modérée
3167041	Œsophagite chronique légère, ectopie
3277022	Histologie normale
3279042	Œsophagite chronique légère à modérée
3252013	Œsophagite chronique légère
3252022	Histologie normale
3252044	Œsophagite chronique légère à modérée
3252029	Œsophagite chronique légère à modérée
3280034	Discrète œsophagite chronique légère,
3250067	Œsophagite chronique légère
3167013	Œsophagite chronique modérée
3275042	Œsophagite chronique légère
3251029	Histologie normale
3264038	Histologie subnormale, voire Œsophagite chronique lé- gère
3264059	Œsophagite chronique légère
3264037	Muqueuse normale
3266001	Œsophagite chronique modérée

TAB. 7.2 – Description histologique des biopsies prélevées chez les volontaires sains de Vassy.

alcoolo-tabagique (cancer de la prostate et syndrome myéloprolifératif). Ces cas n'ont pas été retenus pour la présente étude.

7.3 Résultats

7.3.1 Choix du marqueur de prolifération cellulaire

Pour la mesure de la prolifération cellulaire au sein de muqueuse non néoplasique, nous avons choisi comme marqueur l'antigène Ki67. Il s'agit d'une protéine non histonique composée de deux sous-unités de poids moléculaires égaux à 345 et 395 kD. Son rôle est peu connu. Elle participerait au maintien de la structure de l'ADN pendant la mitose [Youssef et al., 1995] [Porschen et al., 1991]. Cette protéine est présente dans les noyaux des cellules proliférantes, mais absente dans les cellules en phase G₀. Parmi les cellules en G₁, seules les cellules provenant d'une mitose expriment l'antigène Ki67. Il est retrouvé dans les cellules en phase S et G₂. Son expression au cours du cycle cellulaire augmente de la phase G₁ à la mitose, puis diminue progressivement au cours de la phase G₁. Cet antigène est mis en évidence en immunohistochimie par un anticorps monoclonal Mib1. Diverses études ont validé l'utilisation de cet anticorps au cours de mesures du coefficient de prolifération (rapport du nombre de cellules tumorales Ki67+ sur le nombre de cellules tumorales) dans plusieurs pathologies tumorales. Il s'avère un bon indicateur de la croissance tumorale et pourrait être utilisé comme marqueur pronostic de certaines pathologies [Porschen et al., 1991], [Diebold et al., 1994], [Kawamura et al., 1996]. La proportion de cellules proliférantes et par conséquent l'activité proliférante d'un tissu peut donc être déterminé par la présence de l'antigène Ki67 [Diebold et al., 1994].

Il faut noter que PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) est également un marqueur de prolifération cellulaire très utilisé [Lam et al., 1996]. Cette protéine nucléaire de 36 KD est un marqueur histologique endogène exprimée par les cellules en phase terminale G₁ et en phase S. Son rôle est déterminant dans la réplication de l'ADN (protéine auxiliaire de l'ADN polymérase (Podust95)). Il est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire (cf. chapitre 1), via l'interaction avec p21^{Waf1}, p53 et dans les système de réparation par excision de nucléotide [Li et al., 1994]. Notre choix s'est porté sur l'utilisation de l'anticorps Mib1 car l'interprétation des résultats est plus aisée. Le marquage immunohistologique avec les anticorps dirigés contre PCNA varie considérablement en fonction de la

dilution de l'anticorps choisi et les caractéristiques tissulaires, notamment dans le tissu œsophagien. Avec l'anticorps MiB1, le bruit de fond est quasiment nul et l'intensité du marquage est plus fort et plus uniforme que celui obtenu avec l'anticorps anti PCNA.

7.3.2 Analyse qualitative de l'immunomarquage du Ki67 et de p53

Une prolifération cellulaire est observée dans les zones d'œsophagite chronique, figures 7.1, 7.2. Le marquage immunohistochimique est plus intense dans les couches suprabasales et le long des ascensions papillaires, stigmates d'une prolifération cellulaire suite à une agression exogène. Par contre aucune cellule du tapis basal n'exprime l'antigène Ki67.

Le marquage nucléaire de p53 est également présent dans les cellules proliférantes, avec quelques particularités ; seuls des îlots de cellules localisées dans la couche basale et les couches suprabasales sont observés dans la muqueuse non néoplasique. Le marquage s'intensifie au fur et à mesure de la sévérité des lésions (dysplasies de grade I, II et Carcinome *in situ*).

Afin de vérifier si la surexpression de p53 est une réponse de protéines de type sauvage ou l'accumulation de protéines mutées, nous avons testé par immunohistochimie sur quelques échantillons, différents gènes interagissant avec p53, tels que p21^{Waf1} et mdm2. Sur la figure 7.1, nous pouvons observer que l'immunomarquage de p21^{Waf1} au sein l'épithélium malpighien est similaire à celui du Ki-67. La protéine p21^{Waf1} est localisée essentiellement dans les cellules épithéliales proliférantes. L'immunomarquage est nucléaire et/ou cytoplasmique. Quelques noyaux de la couche basale sont positifs.

La détection de mdm2 par cette méthode n'a pas donné de résultat concluant avec nos échantillons.

L'étude immunohistochimique de p53 et du Ki67 sur les biopsies en provenance de Vassy montre également un état prolifératif dans les zones d'œsophagite chronique avec toutefois une différence dans le marquage de p53 par comparaison avec les muqueuses non néoplasiques ; la majorité des noyaux présents dans les couches basales et suprabasales sont positifs. Ce résultat sera discuté ultérieurement.

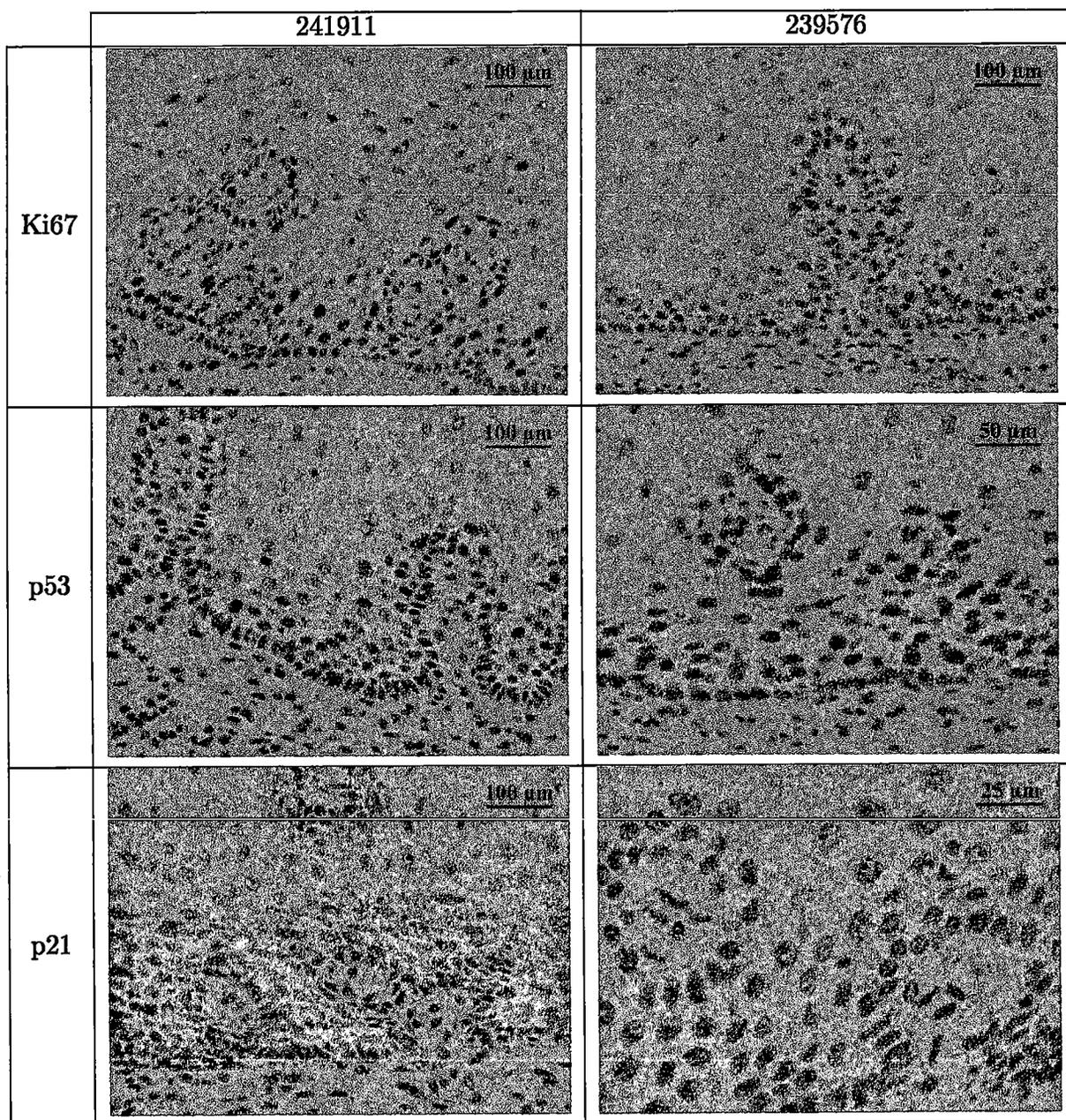


FIG. 7.1 – Etude immunohistochimique de l'expression d'un marqueur de prolifération cellulaire Ki67, de l'expression des protéines p53 et p21^{Waf1} dans les muqueuses non néoplasiques de patients

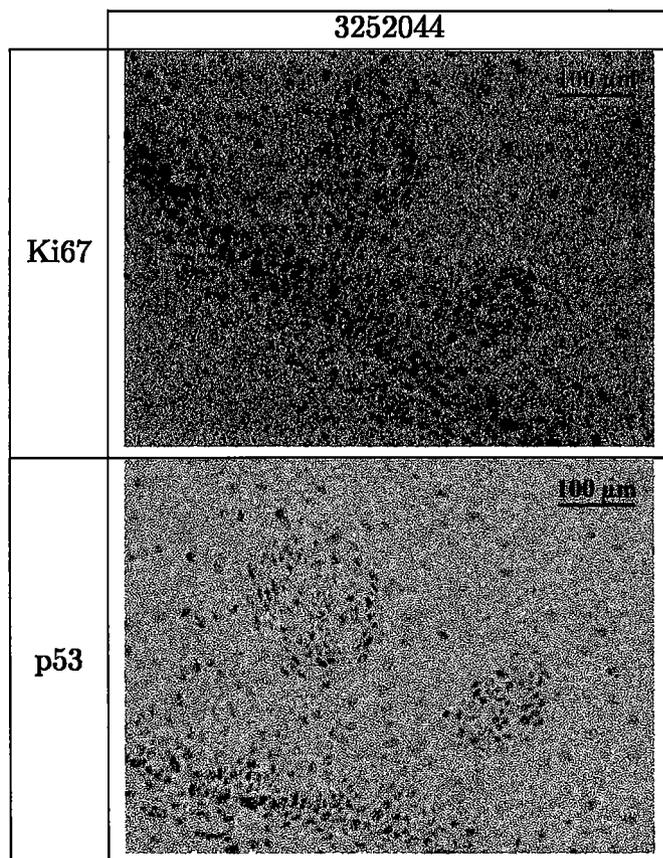


FIG. 7.2 – Etude immunohistochimique de l'expression d'un marqueur de prolifération cellulaire Ki67, de l'expression des protéines p53 et p21^{Waf1}, exemple obtenu à partir d'un volontaire sain de Vassy.

7.3.3 Influence de l'alcool et de son mode de consommation sur l'apparition de zones d'œsophagite chronique au sein du revêtement malpighien

La quantification des immunomarquages de Ki67 a été réalisée afin de mesurer la fréquence de ce marqueur de prolifération cellulaire au sein de chaque muqueuse œsophagienne (non néoplasique et normale) et de rapprocher ces résultats avec les données épidémiologiques.

Analyse quantitative des immunomarquages par l'approche stéréologique

Une approche semi-manuelle est offerte au pathologiste par la stéréologie. Cette méthode, qui tire parti de l'interface graphique d'un PC a été mise au point au laboratoire. Elle est en accord avec les règles de l'échantillonnage et est peu consommatrice en temps. Une trame constituée de rectangles est superposée à l'image couleur du champ à analyser figure 7.3. L'intérieur des rectangles constitue un échantillon systématique du champ, limitant l'analyse à quelque dizaines de profils nucléaires ; on dénombre les profils marqués et non marqués pour établir l'index de marquage, les profils coupés par la ligne interdite gauche et inférieure du rectangle ne sont pas comptabilisés et l'on exclut de l'analyse les rectangles tombant dans le chorion.

Dans chaque coupe, deux zones ont été sélectionnées :

- une zone de muqueuse normale voire subnormale (c'est-à-dire l'épithélium avec une seule couche basale voire quelques cellules proliférantes)
- une zone d'œsophagite chronique (l'épithélium avec ses différentes couches basales, suprabasales et ascension papillaire)

La zone ainsi définie est ensuite divisée verticalement en champ d'analyse. Un nombre de champs limité à 2 ou à 3 est suffisant, pour prendre en compte la totalité de l'épithélium malpighien. Le comptage des noyaux marqués est réalisée dans chaque champs selon la méthode décrite ci-dessus. La totalité des noyaux marqués sont ensuite rapportés au nombre total de noyaux compris dans la zone sélectionnée. Les résultats sont présentés dans le tableau 7.3.

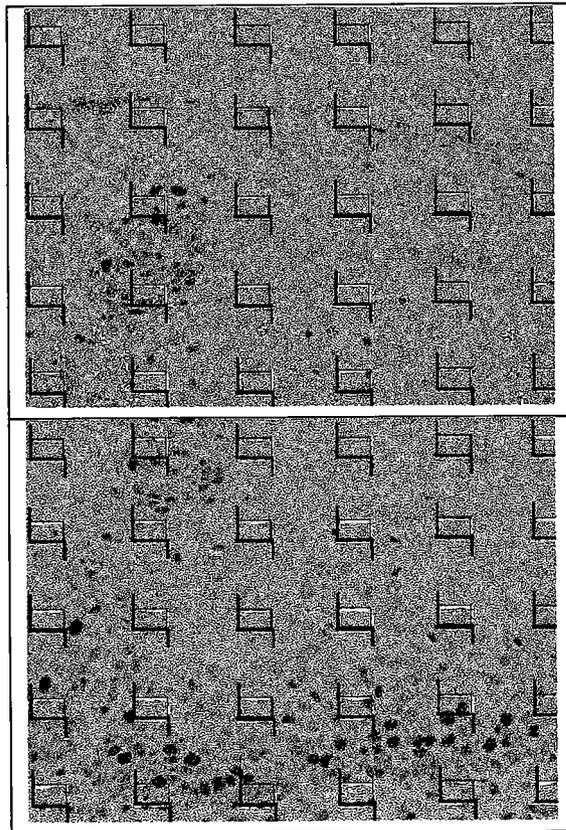


FIG. 7.3 – Trames d'échantillonnage superposées à une image représentant une zone d'œsophagite chronique.

Estimation de l'œsophagite chronique

Comme nous l'avons déjà décrit dans le chapitre 2, la sévérité de l'œsophagite chronique s'observe par une intense infiltration inflammatoire et par une hyperplasie basale caractérisée par une ascension papillaire importante. Aussi, nous avons estimé l'œsophagite chronique en effectuant un rapport (B/L) de longueur du tapis basal sur la longueur de la muqueuse exposée (côté lumen). Pour cela, nous avons transformé nos images colorées en image binaire grâce au logiciel Corel Photo Paint puis nous avons mesuré les différentes longueurs en utilisant le logiciel Aphelion. Ainsi, plus l'œsophagite est sévère (nombreuses ascensions papillaires) plus le rapport est grand. Les résultats sont regroupés dans les tableaux 7.3, 7.5. Dans le tableau 7.3, le rapport B/L déterminé dans les régions de muqueuse subnormale constitue le critère de normalité validant le diagnostic du pathologiste. Il varie entre 0,96 et 1,26.

Les indices biologiques lors de l'analyse statistique seront les rapports des noyaux marqués sur les noyaux totaux et les rapports du tapis basal sur la longueur de la muqueuse exposée.

Données épidémiologiques

Les données épidémiologiques ont été réévaluées par le Dr Guy Launoy (INSERM, Registre des Tumeurs Digestives du Calvados). Les questionnaires n'ont pas évalué l'exposition de la même manière. Dans l'un (étude de Vassy), le questionnaire est court et apprécie la consommation alcoolo-tabagique de manière binaire (oui, non) pour chaque type de produit consommé, en se basant que sur la période de consommation récente. Dans l'autre (étude cas-témoin multicentrique Caen-Dijon-Toulouse), il s'agit d'un historique détaillé de la consommation alcoolo-tabagique, appréciant celle-ci de manière quantitative sur toute la vie de l'individu. Par conséquent, les données concernant ces deux études ne peuvent pas être traitées de la même façon, même si cette analyse séparée fait perdre de la puissance à l'analyse.

Les données épidémiologiques concernant les 12 cas et les volontaires de Vassy sont regroupés respectivement dans les deux tableaux 7.4, 7.5. Les indices d'exposition sont les suivants :

- pour les 12 cas, le niveau de consommation des eaux-de-vie (associées ou non à la chaleur) est estimé en gramme d'éthanol par semaine. L'exposition

Echant.	Œsophagite chronique				Muqueuse subnormale			
	N.marq.	N.tot.	N	B/L	N.marq.	N.tot.	N	B/L
226238	5	29	0,17	1,78	3	6	0,50	0,96
226438	22	83	0,27	1,42	6	22	0,27	1,03
236471	6	40	0,15	2,31	3	14	0,21	1,22
218609	8	41	0,20	2,31	5	23	0,22	1,06
219822	5	35	0,14	2,72	0	24	0,00	1,07
221707	16	49	0,32	4,35				
223224	32	61	0,53	2,77	2	24	0,08	1,13
225634	14	35	0,40	1,73	5	31	0,16	1,03
241911	20	93	0,22	3,75	12	69	0,17	1,26
229701	8	68	0,12	1,66	0	13	0,00	1,11
239576	9	57	0,16	3,15	0	4	0,00	
261484	12	21	0,57	1,05	3	18	0,17	1,11

N.marq. : Nombre de noyaux immunomarqués.

N.tot. : Nombre total de noyaux.

N : Rapport du nombre de noyaux marqués sur le nombre total noyaux

:

B/L : Rapport de la longueur du tapis basal sur la longueur de la zone exposée

TAB. 7.3 – Description des indices biologiques des 12 cas dans les zones d'œsophagite chronique et dans les régions normales de la muqueuse œsophagienne.

Echant.	AGE	A. dig.	Dig. ch.	Cal. s.	Cal. ch.	An. tab.	Qu. al.
226238	55	0	0	0	2	29	296
226438	70	0	0	0	168	54	849
236471	61	0	0	0	0	27	236
218609	67	7	0	0	0	44	279
219822	45	0	47	0	0	31	438
221707	62	0	0	0	288	42	1208
223224	65	2	0	0	44	25	217
225634	60	1	0	2	2	45	730
241911	71	0	0	0	0	38	502
229701	63	0	0	0	112	13	152
239576	45	0	0	0	20	26	282
261484	69	2	0	0	2	40	82

A.dig. : Autres digestifs

D.ch. : Digestif bu chaud

C.s. : Calvados seul

C.ch. : Calvados bu chaud

An. tab. : Nombre d'années de consommation tabagique

Qu. al. : Quantité d'alcool total

TAB. 7.4 – *Données épidémiologiques concernant les 12 malades atteints d'un cancer épidermoïde de l'œsophage. Les quantités d'alcool sont exprimées en g d'éthanol par semaine*

au tabac a été également prise en compte. Elle est représentée par le nombre d'années de consommation tabagique.

- pour les individus de Vassy, la consommation de chaque type de produit est évaluée de manière binaire (oui =1, non=0), à l'exception de la consommation de tabac qui est estimée par le nombre de cigarettes par jour et le nombre d'années de consommation.

Confrontation des données biologiques et des données épidémiologiques

L'analyse statistique des données biologiques avec les données épidémiologiques repose respectivement pour les cas et les témoins, sur l'utilisation d'un test de régression linéaire des moindres carrés et d'un test d'égalité des rangs non paramétriques, pour un seuil de signification de $p=0,05$. Chaque indice biologique a été corrélé avec chaque indice d'exposition.

Echant.	R.l.	N.+	N.t.	V.r.	Cid	Anis.	C.s.	C.ch.	D.ch.	A.ch.	Cig	C.a.
3264005	2,21	13	31	1	1	1	0	0	0	1	7	33
3280004	2,49	24	74	1	1	1	1	1	0	0	10	56
3251034	2,11	7	22	0	0	0	0	0	0	1	0	0
3266024	4,69	20	61	1	1	0	0	1	1	1	20	46
3264041	1,25	7	39	0	0	0	0	0	0	1	10	42
3266004	1,92	17	37	0	1	0	0	0	0	1	10	20
3167041	1,59	3	17	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3277022	0,79	5	20	0	1	0	0	0	0	1	3	10
3279042	1,99	4	20	1	1	0	0	0	0	1	0	0
3252013	0,95	10	24	1	1	1	0	1	0	1	10	31
3252022	1,32	6	23	0	0	0	0	0	0	1	0	0
3252044	1,89	6	29	1	0	0	0	0	0	1	20	41
3252029	1,84	15	45	1	0	1	0	0	0	1	15	39
3280034	0,65	7	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3250067	1,95	5	28	1	0	1	0	0	0	1	8	13
3167013	1,73	16	46	0	1	1	0	0	0	1	30	6
3275042	2,00	8	35	0	1	0	0	1	1	1	0	0
3251029	1,30	4	11	0	1	0	0	0	0	1	0	0
3264038	1,48	4	27	0	1	0	0	0	0	1	0	0
3264059	1,36	6	19	0	1	1	0	0	0	1	3	8
3264037	1,05	2	21	0	1	0	0	0	0	1	0	0
3266001	4,25	38	73	0	1	0	0	1	0	1	15	39

Echant. : Numéro de l'échantillon

R.l. : Rapport des longueurs du tapis basa sur muqueuse exposée (côté lumen)

N.+ : Nombre de noyaux positifs

N.t. : Nombre total de noyaux

V.r. : Vin rouge

Cid : Cidre

Anis : Boisson anisée

C.s. : Calvados seul

C.ch. : Calvados bu chaud

D.ch. : Autres digestifs bus chauds

A.ch. : Aliments solides consommés chauds

Cig : Nombre de cigarettes par jour

C.a. : Nombre d'années de consommation tabagique

TAB. 7.5 – *Données épidémiologiques concernant les volontaires sains de Vassy. La consommation de chaque produit est évalué de manière binaire (oui=1 et non=0), excepté la consommation de tabac qui est exprimée en nombre de cigarettes par jour et en nombre d'année de consommation.*

Pour les 12 cas, il n'existe aucune relation significative entre les indices biologiques et les indices d'exposition, aussi bien dans les zones d'œsophagite chronique que dans les zones de muqueuse subnormale. Par contre une relation significative est mise en évidence ($p=0,046$) pour les échantillons en provenance de Vassy, entre le rapport B/L et le fait de boire du calvados chaud. Quant aux autres eaux-de-vie consommées chaudes, l'analyse est proche de la signification ($p=0,068$) ; ceci est d'autant plus frappant qu'aucune relation n'a pu être mise en évidence avec les autres indices d'exposition : la consommation de boissons alcoolisées (seules), de tabac et d'aliments chauds.

Ces résultats sont intéressants car ils mettent en lumière l'action de l'alcool associé à la chaleur sur l'évolution de la muqueuse œsophagienne normale vers un état d'œsophagite chronique. L'ascension des papilles serait apparemment un meilleur marqueur de l'œsophagite chronique que le comptage des cellules proliférantes.

7.4 Discussion

Le cancer épidermoïde de l'œsophage est associé à des lésions (dysplasies, œsophagites chroniques) dont le caractère pré-néoplasique a souvent été évoqué (cf chapitre 2). La prévalence de ces lésions dans les populations à haut risque suggère fortement le rôle promoteur de l'imprégnation alcoolo-tabagique et la consommation de boissons chaudes dans la formation d'une lésion pré-néoplasique au sein de ce tissu. En effet, par leur action irritante, ces facteurs sont capables de générer un état inflammatoire et d'agir sur la réplication des cellules basales de l'épithélium œsophagien. Plusieurs auteurs ont évoqué l'hypothèse selon laquelle des composés non génotoxiques participeraient au processus carcinogène en induisant la mitogenèse et l'hyperplasie [Purchase, 1994] [Ames and Gold, 1990] [Cohen and Ellwein, 1991]. La fixation de dommages génomiques induits dans les cellules normales par des agents exogènes ou endogènes créeraient des mutations qui s'accumuleraient alors dans les cellules en prolifération. L'expansion clonale des cellules initiées serait amorcée puis augmentée au cours de la mitogenèse. Ceci conduirait à la survenue d'un processus pré-néoplasique dans les zones lésées de la muqueuse.

Dans notre approche, nous avons étudié l'implication de l'alcool, de l'action irritante du tabac et de la chaleur dans la réponse proliférative du tissu. Nous avons ainsi mis en évidence par immunohistochimie la présence d'une prolifération

cellulaire dans les deux types de muqueuses normales : les muqueuses normales prélevées chez des personnes saines et des muqueuses non néoplasiques adjacentes au cancer. Il est important de différencier ces épithéliums, car la prolifération cellulaire présente dans les épithéliums adjacents au cancer peut très bien être secondaire à la présence de la tumeur. La répartition de l'antigène Ki67 est similaire dans les deux cas. L'immunomarquage s'intensifie dans les couches suprabasales en fonction de la sévérité de l'œsophagite chronique. L'absence d'un marquage immunohistochimique dans le tapis basal est également observé. Il réapparaît dès que l'œsophagite chronique évolue vers la dysplasie sévère. Ces observations sont en accord avec des études précédentes [Koga et al., 1996], [Lam et al., 1996], [Kawamura et al., 1996] qui rapportent l'augmentation de la prolifération en fonction de la sévérité de la lésion et du stade tumoral. Koga et ses collaborateurs [Koga et al., 1996] décrivent de manière précise la présence du marqueur PCNA au sein des différentes couches de l'épithélium malpighien adjacent au cancer. Il observe ainsi dans l'épithélium normal des cellules positives dans les couches suprabasales. Dans les zones de dysplasie modérée, l'intensité du marquage apparaît dans le tapis basal et devient plus élevée dans les couches suprabasales. Quant aux carcinomes *in situ*, l'intensité du marquage dans les deux couches est semblable. Ces auteurs notent également qu'il n'existe aucune différence significative entre le marquage d'une dysplasie adjacente à la tumeur et celui d'une dysplasie isolée. La concordance de nos résultats obtenus avec l'antigène Ki67, avec les conclusions apportées avec la protéine PCNA permettent de suggérer la mise en place progressive d'une dérégulation de l'activité proliférante et/ou de perturbations génétiques des cellules au cours de la transformation tumorale. Une hyperplasie restauratrice de la muqueuse œsophagienne face à l'exposition répétée des facteurs exogènes, serait mise en place dans les zones d'œsophagite chronique. L'intensité de leur marquage dans les zones de dysplasie traduirait une prolifération incontrôlée de cellules déjà initiées. L'absence des marqueurs de prolifération dans le tapis basal suppose que les cellules sont quiescentes et ne rentrent en activité qu'après avoir quitté la couche basale. L'induction massive du PCNA et du Ki67 dans les couches basales et suprabasale d'un revêtement dysplasique pourrait traduire un changement irréversible des cellules de la couche basale en cellules initiées qui, au cours du temps, acquerraient la faculté de proliférer de façon autonome.

Le gène *p53* codant pour la protéine p53 joue un rôle important dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN. Il intervient dans la régulation du cycle cellulaire, dans le contrôle de la réplication de l'ADN, de la différenciation cellulaire et la réparation. Ce gène est le plus communément muté dans les tumeurs.

La plupart des mutations sont associées à une perte fonctionnelle de la protéine. Elles sont fréquentes et précoces dans les tumeurs liées à une exposition chronique à un carcinogène ou à une inflammation. C'est le cas du cancer de l'œsophage épidermoïde. Afin d'approcher l'hypothèse selon laquelle des altérations génétiques seraient présentes dans la muqueuse non néoplasique nous avons étudié par immunohistochimie l'expression de la protéine p53.

Une augmentation de l'intensité du marquage est constatée au fur et à mesure de la sévérité de la lésion non néoplasique (œsophagite chronique, dysplasie de grade I, II et III). Ces résultats sont en accord avec plusieurs études [Waridel et al., 1997],[Mandard et al., 1997], [Shi et al., 1996], [Wang et al., 1993], [Gao et al., 1994] qui détectent dans des régions à haut risque, la présence de p53 dans les muqueuses non néoplasiques adjacentes au cancer et dans des biopsies prélevées chez des personnes saines. Il est à noter que l'expression de la protéine dans les zones d'œsophagite chronique n'est pas toujours observée [Sasano et al., 1992], [Vijeyasingam et al., 1994].

L'expression de p53 dans la muqueuse œsophagienne non néoplasique pourrait correspondre soit à l'accumulation d'une protéine sauvage en réponse à une situation de stress cellulaire, soit à l'accumulation de protéine mutée non fonctionnelle, traduisant l'état prénéoplasique d'un tissu histologiquement normal. La surexpression de p53 dans les biopsies de muqueuses saines de Vassy et dans les muqueuses non néoplasiques pourrait à illustrer la première situation. La surexpression de la protéine sauvage a déjà été observée dans l'épithélium malpighien de la peau, à la suite d'une exposition aux UV [Hall et al., 1993]. Il est à noter que les biopsies incluses dans la paraffine ne sont pas récentes. Il est possible que l'intensité du marquage soit dépendant de la qualité des blocs. Cependant il n'est pas improbable que des protéines mutées soient présentes parmi les protéines fonctionnelles. Dans les muqueuses adjacentes au cancer, la fonctionnalité de la protéine a été étudiée. Nous avons recherché par immunohistochimie dans quelques échantillons, l'expression d'un inhibiteur du cycle cellulaire, p21^{Waf1}, dont l'expression est contrôlée positivement par p53. Dans des zones d'œsophagite chronique, la présence simultanée de p53 et de p21^{Waf1} dans les cellules proliférantes suggère l'activité transcriptionnelle de p53 vis à vis du gène WAF1/CIP1, en réponse à un stress cellulaire. Il est important de noter que la détection de ces protéines dans les noyaux des couches suprabasale peut refléter leur rôle dans la régulation de la prolifération mais également dans la différenciation cellulaire des épithéliums de revêtement. [Podust et al., 1995],[Gartel et al., 1996]; ces deux événements étant étroitement liés.

L'immunomarquage de p21^{Waf1} par comparaison avec celui de p53 est plus constant dans les régions d'œsophagite chronique. L'expression de p21^{Waf1} dans les zones de prolifération où p53 serait apparemment non fonctionnelle, est possible et a déjà été observée [Yang et al., 1997]. D'autres voies indépendantes de p53 interviendraient dans l'induction de p21^{Waf1}. Il s'agirait d'une voie de signalisation des MAPKinases [Liu et al., 1996] [Hiyama et al., 1997]. Quant à la sur-expression de la protéine dans le cytoplasme, elle reflèterait la non fonctionnalité de la protéine p21^{Waf1} qui n'est active que dans le noyau [El-Deiry et al., 1994]. Hiyama [Hiyama et al., 1997] suggère dans une étude récente que l'effet inhibiteur est dépendant du niveau de p21^{Waf1} relatif à celui des complexes cdk/cyclines et non de son niveau absolu. La cellule est donc en mesure de faire face à l'agression de facteurs exogènes ou endogènes par des voies indépendantes de p53, lorsque cette dernière est non fonctionnelle. L'induction de p21^{Waf1} figurerait parmi ces voies.

La présence d'îlots de p53 s'étalant depuis le tapis basal vers les couches supra-basales tendent à suggérer l'expansion clonale de la protéine mutée. Des travaux récents ont illustré ce phénomène dans des kératinocytes de la peau exposée de manière ponctuelle ou chronique aux radiations solaires [Jonason et al., 1996]. L'exposition de la peau au soleil agirait comme promoteur tumoral en favorisant l'expansion clonale d'une protéine mutée. L'étendue des clones serait dépendante de la fréquence des expositions. Au sein des lésions de la muqueuse œsophagienne, des altérations du gène *p53* ont été décrits. Les mutations de *p53* sont fréquentes et précoces. Chaque tumeur tirerait son origine d'un clone indépendant de cellules mutées et acquerrait de nouvelles mutations au cours de son expansion. Gao et ses collaborateurs [Gao et al., 1994] enregistrent dans 37 biopsies de muqueuse œsophagienne prélevée chez des Chinois sains, des mutations non sens dans les zones de muqueuse normale (1/3), d'hyperplasie basale (3/23) et de dysplasie (4/11). Toutes les mutations sont localisées au niveau de l'exon 5 (codons 175, 176, 159, 135, 132) et se caractérisent soit par une transition (G:A), soit par une transversion (G:T). La recherche en parallèle du spectre mutationnel de *p53* dans des tumeurs en provenance de la même région, indique une prévalence de transitions par rapport aux transversions accompagnées par d'autres types de mutations (délétions) dans les exons 5 et 7. Dans une autre étude, l'analyse de mutations de *p53* au sein de six muqueuses œsophagiennes néoplasiques en provenance de la Chine, enregistre une variation du profil mutationnel entre la tumeur et la dysplasie adjacente [Bennett et al., 1992]. Récemment, des chinois ont recherché les mutations de *p53* dans les îlots de cellules répondant positivement en immunohistochimie, en enrichissant au préalable les cellules immunomarquées

par irradiation aux UV [Shi et al., 1996]. Ils enregistrent une variation du profil mutationnel entre la tumeur et la lésion associée. Parmi 4 échantillons contenant des zones d'œsophagite chronique et de dysplasie, trois mutations ont été détectées dans l'exon 5 (codon 146 et codon 175) et une dans l'intron 5, l'échantillon présentant le carcinome *in situ* renfermait une mutation dans l'exon 7. L'analyse des tumeurs associée à ces différentes lésions indique soit une divergence, soit une similitude dans le spectre mutationnel de p53, avec pour certains l'addition d'autres mutations. L'analyse de ces mutations renforce le caractère multifocal du carcinome épidermoïde et révèle la précocité des altérations génétiques dans les zones histologiquement normales.

Pour appuyer notre hypothèse quant à l'influence de l'alcool et de son mode de consommation dans la survenue d'un phénomène potentiellement préneoplasique dans les zones d'œsophagite chronique, nous avons corrélé statistiquement les résultats biologiques avec les données épidémiologiques recueillies auprès des malades et des volontaires sains. La présence d'une relation significative entre la survenue d'une œsophagite chronique (caractérisée par l'ascension papillaire) chez les volontaires sains de Vassy et la consommation d'eaux-de-vie bues chaudes est un résultat nouveau et important pour la validation de notre hypothèse. Lors de leur étude, Jacob et ses collaborateurs [Jacob et al., 1993] avaient mis en évidence une corrélation entre la prévalence des lésions (œsophagite, dysplasies) dans cette population à risque, et le fait de fumer et de consommer du beurre quotidiennement; la consommation d'alcool ne semblait pas influencer l'apparition de ces lésions. Quant à l'implication du mode de consommation des eaux-de-vie dans la survenue des œsophagites, elle n'a pas été retenue pour cette étude.

Le choix des biopsies prélevées chez les témoins a été dicté par la qualité des blocs et non par l'histologie. Nous pouvons raisonnablement considérer que la sélection des échantillons de muqueuse, qu'elle soit normale ou le siège d'une œsophagite chronique, s'est effectuée de manière aléatoire. L'analyse de ces échantillons a donc pu être réalisée sans biais majeur. Par contre, en ce qui concerne l'étude des cas, les blocs en paraffine étudiés ont été choisis parmi les zones caractérisant au mieux l'œsophagite chronique. Par conséquent, ce choix entraîne un biais dans l'analyse statistique. De plus le faible effectif des cas (n=12) limite considérablement la puissance de l'étude. Afin d'améliorer la représentativité des muqueuses étudiées et donc l'analyse statistique il serait bon d'envisager, par exemple, un protocole de prélèvement à une distance déterminée de la tumeur. De plus, l'interprétation des résultats, tant biologiques qu'épidémiologiques est très difficile pour les muqueuses non néoplasiques adjacentes à la tumeur. En effet

la tumeur peut, par sa présence, générer des états inflammatoires en amont et par conséquent des zones d'œsophagites chroniques.

7.5 Conclusion

Cette étude regroupant à la fois des échantillons de muqueuses œsophagiennes non néoplasiques de patients atteints d'un cancer épidermoïde et de biopsies de muqueuses normales dans une région à haute incidence conforte l'hypothèse qu'un processus pré-néoplasique s'installerait dans les régions histologiquement normales. La relation significative entre les alcools forts consommés chauds et l'apparition d'œsophagites chroniques renforce les résultats obtenus avec les marqueurs de prolifération cellulaire et l'immunomarquage de p53. Ils suggèrent à la fois :

- la précocité des altérations génétiques dans les zones d'œsophagite chronique qui pourrait résulter de l'interaction du tabac et l'alcool selon le mécanisme décrit dans les chapitres précédents, et vraisemblablement de l'accroissement de la voie oxydante suite à l'apparition d'un état inflammatoire,
- le rôle promoteur des alcools forts consommés chauds dans la transformation tumorale des cellules initiées; en augmentant la prolifération cellulaire, ils favoriseraient la fixation les altérations génétiques et augmenteraient l'expansion clonale des cellules initiées.

CONCLUSION

La particularité épidémiologique du cancer épidermoïde de l'œsophage est l'extraordinaire variabilité de son incidence à travers le monde. Les incidences rapportées dans le Nord-Ouest de la France sont les plus élevées d'Europe. La responsabilité de la consommation d'alcool et de tabac dans l'apparition de ce cancer a été établie depuis longtemps. Mais elle ne rend pas compte de la grande variabilité de l'incidence. En outre, les bases moléculaires des effets synergiques de ces deux facteurs sont inconnus.

L'objectif principal de nos travaux était d'explorer le mécanisme de la synergie alcool-tabac à partir d'une hypothèse générale, selon laquelle les altérations des fonctions hépatiques associées à la consommation excessive d'alcool viendraient inhiber le métabolisme hépatique des nitrosamines et par conséquent augmenter l'exposition de l'œsophage à ces substances ; L'alcool agirait, par ailleurs, sur l'activation des nitrosamines au sein de la muqueuse œsophagienne en induisant les cytochromes P450, en particulier le CYP2E1.

Nos premiers travaux ont comparé les effets de différentes boissons alcoolisées (vin, cidre, bière, whisky, calvados fermier ou industriel, éthanol seul) sur le métabolisme des nitrosamines chez des rats traités de manière aiguë. Dans les microsomes hépatiques, où le CYP2E1 s'exprime majoritairement, une induction significative de cet isoenzyme a été observée en rapport avec le taux d'éthanol mais indépendante du type de boisson alcoolisée. De même, les différentes boissons alcoolisées n'ont pas modifié de manière notable l'expression des isoenzymes CYP1A. Dans l'œsophage, les CYP2E1, 1A1 ont été détectés et une activité N-méthylbenzylnitrosamine déméthylase a été mesurée, mais leurs niveaux d'expression ne semblaient pas être influencés par une exposition aiguë à l'éthanol. Dans une autre expérience, nous avons cherché à savoir si l'action particulière des alcools de pomme pouvait agir plus globalement sur le métabolisme des nitrosamines (activation et détoxication). Des rats ont subi, immédiatement après une exposition aux boissons alcoolisées énumérées ci-dessus, une injection intrapéritonéale de N-méthylbenzylnitrosamine. Le taux de la 7-méthylguanine dans le foie et l'œsophage ne variait pas d'un groupe de rats à l'autre. Dans notre modèle animal, nous ne pouvons pas conclure à une influence particulière des boissons alcoolisées dérivées de la pomme sur le métabolisme des nitrosamines au niveau des tissus hépatique et œsophagien. Néanmoins, il reste à déterminer dans quelle mesure une pathologie hépatique chronique associée à une exposition alcoolique modifierait le métabolisme des carcinogènes au sein de la muqueuse œsophagienne de rat.

Chez l'homme, il était important de confirmer que le CYP2E1 et d'autres cytochromes P450 s'exprimaient et étaient actifs dans la muqueuse œsophagienne humaine. Lorsque nous avons commencé nos travaux, les isoenzymes du CYP450 impliqués dans l'activation des carcinogènes du tabac n'avaient pas encore été identifiés dans l'œsophage humain. Au cours d'une étude rétrospective, nous avons caractérisé par immunoblot et par RT-PCR liquide différents cytochromes P450 à partir de pièces d'exérèses de patients atteints d'un cancer œsophagien dans la région de Toronto (25 cas, dont 19 adénocarcinomes). Ces personnes avaient été interrogées sur leurs habitudes alimentaires et leurs consommations alcoolotabagique. L'expression des principaux isoenzymes intervenant dans le métabolisme des carcinogènes du tabac, c'est-à-dire le CYP2E1, CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A3/4 a été mise en évidence dans la muqueuse non néoplasique. Les données épidémiologiques ont été confrontées avec les résultats biologiques. Il n'a pas été possible de mettre en évidence de relation significative entre la quantité de protéines ou celle des transcrits et les données sur la consommation alcoolotabagique, sur le mode de consommation (chaleur), sur le type histologique de la tumeur et sur le reflux gastro-œsophagien. Notre objectif est maintenant de confirmer la présence de ces mêmes cytochromes dans des échantillons de muqueuse œsophagienne non néoplasique recueillis dans le cadre d'une étude cas-témoins multicentrique (Caen, Marseille,) et de développer de nouvelles techniques afin d'améliorer la quantification de l'expression de ces enzymes. Cette étude permet d'avoir accès à des données d'exposition aux facteurs environnementaux très détaillées. Elle concerne à la fois les cancers épidermoïdes et les adénocarcinomes. Grâce à un plus grand nombre d'échantillons, nous seront en mesure d'établir les relations existant entre les facteurs de risque, le type histologique avec l'expression de certains P450, et la contribution de certains cytochromes dans la progression tumorale à partir de lésions pré-néoplasiques.

La détection du CYP2E1 au sein de l'épithélium malpighien est un résultat nouveau, qui complète les données concernant les autres isoenzymes dont l'expression a été récemment décrites dans la littérature [Murray et al., 1994], [Nakajima et al., 1996]. Nous avons donc entrepris de poursuivre nos travaux sur la localisation dans la cellule et la répartition de ce cytochrome au sein du tissu œsophagien. La séquence du produit d'amplification de l'ARNm du CYP2E1 obtenu à partir d'un échantillon a été vérifiée et des sondes oligonucléotidiques ADNc du CYP2E1 ont été préparées pour la mise au point d'un protocole d'hybridation in situ, en collaboration avec le laboratoire de pathologie moléculaire du Pr Kandolf (Université de Tübingen). Nos résultats très préliminaires portent sur l'analyse d'un seul échantillon. Néanmoins, ils nous ont permis de valider

les conditions expérimentales optimales nécessaires à l'application de cette technique. Des transcrits du CYP2E1 ont été détectés dans les couches superficielles de la muqueuse non néoplasique et dans les cellules endothéliales du chorion. Avant d'interpréter ces résultats, l'analyse doit être étendue à d'autres échantillons d'œsophagectomie, lesquels seront analysés également en immunohistochimie. L'obtention récente auprès de l'équipe INSERM n° 490 (Pr Beaune, Paris), d'un anticorps polyclonal anti-CYP2E1 humain nous permettra de compléter les résultats obtenus par hybridation *in situ*. Elle nous renseignera, entre autre, sur les mécanismes de régulation du CYP2E1 dans la muqueuse œsophagienne humaine et sur l'existence d'une corrélation entre l'intensité globale de cette expression et la consommation d'alcool, de tabac ou l'exposition à d'autres facteurs. Des auteurs ont pu ainsi étudier l'induction du CYP2E1 dans le foie de personnes alcooliques par ces deux méthodes [Takahashi et al., 1993]. Ils ont observé une augmentation de l'ARNm et de la protéine du CYP2E1 dans les régions où se développent les premières lésions imputables à une consommation excessive d'alcool. Par cette approche, il sera possible de mettre en évidence une relation entre la localisation de l'expression du CYP2E1 et l'existence d'une lésion imputable à l'agression alcool-tabagique (œsophagites, dysplasies de grade I, II et III et tumeur).

Il serait intéressant d'utiliser cette même sonde pour la révélation en Northern-Blot des transcrits du CYP2E1. En effet, l'expression des gènes des P450 est variable d'un tissu à l'autre. L'analyse du gène CYP2E1 montre une variabilité d'expression selon les organes étudiés. Trois transcrits (4kb, 2.6kb, 1,8kb) ont été caractérisés dans plusieurs tissus (foie, poumons, peau, placenta), contenant tous la partie codante du gène [Botto et al., 1994]. Notre sonde se trouvant aux niveaux des exons 6, 7, 8, est susceptible de s'hybrider indifféremment aux trois transcrits [Umeno et al., 1988], [Song et al., 1986]. L'approche par Northern-Blot nous permettrait donc de rechercher les transcrits spécifiques du CYP 2E1 et de vérifier la présence ou non du transcrit d'1,8 KD au sein de l'épithélium œsophagien, lequel serait détecté uniquement dans les tissus exprimant une activité NDMA déméthylase [Botto et al., 1994]. Ceci compléterait nos résultats quant à l'expression du CYP2E1 au sein de la muqueuse œsophagienne.

Nous avons ensuite recherché si des activités enzymatiques relatives aux cytochromes P450, étaient supérieures en cas de consommation alcooliques élevées et si cela se traduisait par une augmentation d'adduits d'alkylation de l'ADN. Nous avons tenté en vain de mesurer une activité enzymatique (N-méthylbenzyl-nitrosamine déméthylase) par CLHP, à partir de quelques échantillons humains.

Nous envisageons la poursuite de cette mesure en améliorant le seuil de détection par l'utilisation de substrats spécifiques marqués (par exemple la chlorzoxazone). En ce qui concerne la recherche des adduits de méthylation, nous avons détecté la présence d'O6méthyl-déoxyguanosine dans le revêtement malpighien, mais nous n'avons pu quantifier cet adduit; le niveau devant être faible dans cette couche tissulaire. Il serait intéressant d'évaluer l'exposition aux nitrosamines spécifiques du tabac, par la mesure d'autres adduits tels que les adduits de pyridyloxobutyl-ation de l'ADN. Des quantités plus importantes ont été mesurées au niveau du poumon et du tractus bronchique des fumeurs par comparaison avec les non-fumeurs [Foiles et al., 1991]. De même, le dosage des adduits d'oxydation (8-hydroxy-déoxyguanine) et les éthéno-adduits peuvent s'avérer pertinents. La voie de peroxidation lipidique est médiée en partie par le CYP2E1. La détection de ces d'adduits dans des zones inflammatoires de la muqueuse œsophagienne (œsophagites chroniques) reflèterait la présence de dommages à l'ADN et représenterait une étape critique dans l'initiation tumoral.

Entre 1991 et 1994, une étude cas-témoin dans les départements du Calvados, de côte d'Or et de Haute Garonne a permis de préciser les types de consommation alcoolique et tabagique les plus liés au cancer de l'œsophage. Ils ont mis en lumière, entre autre, le rôle important des boissons alcoolisées consommées chaudes dans le pic d'incidence observé dans le Nord-Ouest de la France [Launoy et al., 1997b], [Launoy et al., 1997a]. Suite à ces données obtenues dans notre équipe, nous avons orienté nos recherches vers la mise en évidence d'une induction de la prolifération cellulaire par une exposition directe de la muqueuse aux boissons alcoolisées bues chaudes. Nous avons donc entrepris une étude rétrospective sur la mesure par immunohistochimie de l'expression d'un marqueur de prolifération cellulaire (Ki67) et de la protéine p53 dans la muqueuse œsophagienne saine prélevée à distance du cancer. 12 échantillons ont été analysés.

L'analyse qualitative montre une prolifération accrue dans les zones d'œsophagite chronique. Le marquage nucléaire de p53 est localisé sous forme d'îlots comprenant les couches basales et parabasales. Il s'intensifie au fur et à mesure de la transformation tumorale.

L'analyse quantitative du marquage Ki67, qui a consisté à mesurer le nombre de noyaux marqués sur le nombre de noyaux totaux dans une zone d'œsophagite chronique et de muqueuse subnormale, ne révèle aucune relation significative avec les données d'exposition, en particulier avec la consommation d'alcools bus chauds.

Nous avons également étudié 32 biopsies de muqueuses normales qui avaient été prélevées chez des personnes saines dans le canton de Vassy (département du Calvados), en 1981. Ces personnes avaient répondu à un questionnaire décrivant leurs habitudes alimentaires et leur consommation alcool-tabagique. L'étude immunohistochimique de p53 et du Ki67 sur ces échantillons a montré également un état prolifératif dans les zones d'œsophagite chronique avec un marquage plus important de P53 dans les couches basales et suprabasales. Deux paramètres ont été quantifiés : le rapport B/L de la longueur de la couche basale à la longueur de la muqueuse exposée et le rapport N du nombre de noyaux positifs au nombre de noyaux totaux. Aucune association n'a été trouvée entre les données d'exposition et le paramètre N. Par contre, la confrontation avec les données d'exposition a permis de mettre en évidence une corrélation significative entre le paramètre B/L et la consommation de digestifs bus chauds, y compris le calvados. Ce résultat original renforce le rôle primordial de la consommation d'eaux de vie bues chaudes dans l'apparition d'œsophagites chroniques, lésions au sein desquelles un processus pré-néoplasique pourrait apparaître. Ces deux facteurs de risque agiraient en tant que promoteurs de la cancérogenèse de l'œsophage; la présence d'adduits de méthylation et d'enzymes responsables de l'activation des carcinogènes du tabac suggèrent la présence de cellules initiées dans les muqueuses non néoplasiques. Seule l'étude de la fonctionnalité de p53 pouvait nous renseigner sur la présence d'altérations génétiques dans ces régions inflammatoires. Pour ce faire, nous avons étudié l'expression immunohistochimique de la protéine p21^{Waf1}, dont la transcription est en partie sous le contrôle de p53. L'immunomarquage se situait dans les cellules proliférantes, lesquelles n'exprimaient pas obligatoirement p53. La publication de travaux récents indiquant l'intervention d'autres voies indépendantes de p53 dans l'induction de p21^{Waf1}, nous incite à vérifier la présence de la protéine mutée par deux autres approches. La première consiste à repérer les mutations de *p53* par les techniques de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). L'analyse des mutations de p53 à divers endroits de la muqueuse non néoplasique, particulièrement dans les régions d'œsophagite chronique, sera susceptible de fournir des indications sur la contribution des facteurs étiologiques au processus de cancérisation. La seconde approche consistera à préparer, à partir des ARNm des biopsies congelées, l'ADNc de *p53* et à rechercher à l'aide d'un test de fonctionnalité chez la levure, la présence de mutants transcriptionnels inactifs.

Bibliographie

- [Ahmed, 1995] Ahmed, F. (1995). Toxicological effects of ethanol on Human health. *Crit Rev Toxicol*, 25:347–367.
- [Amer et al., 1990] Amer, M., El-Yazigi, A., Hannan, M., and Mohamed, M. (1990). Water contamination and esophageal cancer at Gassim region, Saudi Arabia. *Gastroenterology*, 98:1141–47.
- [Ames and Gold, 1990] Ames, B. and Gold, L. (1990). Chemical carcinogenesis: too many rodent carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:7772–76.
- [Barra et al., 1990] Barra, S., Francheschi, S., Negri, E., Talamini, R., and Vecchia, C. L. (1990). Type of alcoholic beverage and cancer of the oral cavity, pharynx and oesophagus in an italian area with high wine consumption. *Int J Cancer*, 46:1017–20.
- [Bartsch, 1996] Bartsch, H. (1996). DNA adducts in human carcinogenesis: etiological relevance and structure-activity relationship. *Mutat Res*, 340:67–69.
- [Batt et al., 1993] Batt, A., Strazielle, N., and Siegst, G. (1993). Induction et répression des cytochromes P450. *Thérapie*, 48:527–536.
- [Beaune, 1993] Beaune, P. (1993). Les cytochromes P450 humains. *Thérapie*, 48:521–26.
- [Benamouzig et al., 1993] Benamouzig, R., Ezratty, V., and Munoz, N. (1993). Facteurs étiologiques et mécanismes du cancer épidermoïde de l'oesophage. *Gastroenterol Clin Biol*, 17:944–954.
- [Benamouzig et al., 1992] Benamouzig, R., Pigot, F., Quiroga, G., Validire, P., Chaussade, S., Catalan, F., and Couturier, D. (1992). Human papillomavirus infection in esophageal squamous-cell carcinoma in western-countries. *Int J Cancer*, 50:549–552.

- [Bennett et al., 1992] Bennett, W., Hollstein, M., Metcalf, R., Welsh, J., He, A., Zhu, S., Kusters, I., Resau, J., Trump, B., Lane, D., and Harris, C. (1992). p53 mutations and proteins accumulation during multistage human esophageal carcinogenesis. *Cancer Res*, 52:6092–97.
- [Benthem et al., 1991] Benthem, J., Wild, C., Vermeulen, E., Engelse, L. D., and Scherer, E. (1991). Immunocytochemical localization of DNA adducts induced by a single dose of N-nitroso-N-methylbenzylamine in target and non-target tissues of tumor formation in the rat. *Carcinogenesis*, 12:1831–37.
- [Benthem et al., 1992] Benthem, J., Wild, C., Vermeulen, E., Winterwep, H., Scherer, E., and Engelse, L. D. (1992). Accumulation of O6-and 7-methylguanine in DNA of N-nitroso-N-methylbenzylamine-treated rats is restricted to non-target organs for N-nitroso-N-methylbenzylamine-induced carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 13:2101–05.
- [Bianchini et al., 1993] Bianchini, F., Montesano, R., Shuker, D., Cuzick, J., and Wild, C. (1993). Quantification of 7-methyldeoxyguanosine using immunoaffinity purification and HPLC with electrochemical detection. *Carcinogenesis*, 14:1677–82.
- [Bianchini and Wild, 1994] Bianchini, F. and Wild, C. (1994). Comparison of 7-medG formation in white blood cells, liver and target organs in rats treated with methylating carcinogens. *Carcinogenesis*, 15:1137–41.
- [Blot, 92] Blot, W. (92). Alcohol and cancer. *Cancer Res*, 52:2119s–2123s.
- [Boiteux and Laval, 1985] Boiteux, S. and Laval, F. (1985). Repair of O6-methylguanine, by mammalian cell extracts, in alkylated DNA and poly(dG-m5dG). poly (dG-m5dG) in B and Z forms. *Cancer*, 6:805–807.
- [Botto et al., 1994] Botto, F., Seree, E., Khyari, S. E., Sousa, G. D., Massacrier, A., Placidi, M., Cau, P., W.Pellet, Rahmani, R., and Barra, Y. (1994). Tissue-specific expression and methylation of the human CYP2E1 gene. *Biochem Pharmacol*, 48:1095–1103.
- [Brown et al., 1994] Brown, L., Hoover, R., Greenberg, R., Schoenberg, J., Schwartz, A., Swanson, G., Liff, J., Silverman, D., Hayes, R., and Pottern, L. (1994). Are racial differences in squamous cell esophageal cancer explained by alcohol and tobacco use? *J Natl Cancer I*, 86:1340–45.

- [Camus et al., 1993] Camus, A., Geneste, O., Honkakoski, P., Bereziat, J., Hensdenson, C., Wolf, C., Bartsch, H., and Lang, M. (1993). High variability of nitrosamine metabolism among individuals: role of cytochromes P450 2A6 and 2E1 in the dealkylation of n-nitrosodimethylamine and n-nitrosodiethylamine in mice and humans. *Mol Carcinogenesis*, 7:268–275.
- [Carter et al., 1992] Carter, C. L., Hu, N., Wu, M., Lin, P., Murigande, C., and Bonney, G. (1992). Segregation analysis of esophageal cancer in 221 high risk chinese families. *J Natl Cancer I*, 84:771–776.
- [Castonguay et al., 1984] Castonguay, A., Rivenson, A., Trushin, N., Reinhardt, J., Spathopoulos, S., Weis, C., Reiss, B., and Hecht, S. (1984). Effects of chronic ethanol consumption on the metabolism and carcinogenicity of N'-nitrosornicotine in F344 rats. *Cancer Res*, 44:2285–90.
- [Chang et al., 1992] Chang, F., Syrjänen, S., Lijuan, W., and Syrjänen, K. (1992). Infectious agents in the etiology of esophageal cancer. *Gastroenterology*, 103:1336–1348.
- [Cheng et al., 1992] Cheng, K., Day, N., Duffy, S., Lam, T., Fok, M., and Wong, J. (1992). Pickled vegetables in the aetiology of oesophageal cancer in Hong Kong chinese. *Lancet*, 339:1314–18.
- [Chomczynski and Sacchi, 1987] Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium Thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162:156–59.
- [Chérié-Challine et al., 1988] Chérié-Challine, L., Pottier, D., and Gignoux, M. (1988). Epidémiologie descriptive du cancer de l'oesophage dans le département du Calvados: 520 cas (1978-1982). *Gastroenterol Clin Biol*, 12:126–132.
- [Ciroussel et al., 1990] Ciroussel, F., Barbin, A., Eberle, G., and Bartsch, H. (1990). In vestigations on the relationship between DNA ethenobase adduct levels in several organs of vinyl chloride-exposed rats and cancer susceptibility. *Biochem Pharmacol*, 39:1109–13.
- [Cohen and Ellwein, 1991] Cohen, S. and Ellwein, L. (1991). Genetic errors, cell proliferation and carcinogenesis. *Cancer Res*, 51:6493–05.
- [Collet et al., 1995] Collet, B., Raoul, J., Quillien, V., Heresbach, D., Honoré, A., and Toujas, L. (1995). Mutations du gène supresseur de tumeurs p53 dans les cancers épidermoïdes de l'oesophage (CEO): influence des facteurs étiologiques. *Gastroenterol Clin Biol*, 19.

- [Cook, 1971] Cook, P. (1971). Cancer of oesophagus in Africa. *BJR*, 25:853–857.
- [Couzigou, 1996] Couzigou, P. (1996). Alcool: entre l'inné et l'acquis. *Médecine Thérapeutique*, 2:34–41.
- [Craddock, 1993] Craddock, V. (1993). *Cancer of Esophagus. Approches to the etiology*. Cambridge monographs on cancer research. Cambridge University Press.
- [Craddock and Henderson, 1991] Craddock, V. and Henderson, A. (1991). Potent inhibition of oesophageal metabolism of N-nitrosomethylbenzylamine, an oesophageal carcinogen, by higher alcohols present in alcoholic beverages. In O'Neill, I., Chen, J., and Bartsch, H., editors, *Relevance to Human Cancer of N-nitroso Compounds, Tobacco Smoke and Mycotoxins*, Lyon. IARC, IARC Scientific Publications n105.
- [Davila et al., 1995] Davila, D., Davis, D., Campbell, K., Cambier, J., and Burchiel, S. (1995). Role of altered calcium homeostasis and signal transduction in polycyclic aromatic hydrocarbon-induced immunotoxicity in B cells, invited review. *J Toxicol Env Health*, 45:101–126.
- [Dawsey et al., 1994] Dawsey, S., Lewin, K., Wang, G., Liu, F., Nieberg, R., and Yu, Y. (1994). Squamous esophageal histology and subsequent risk of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer*, 74:1685–92.
- [Day and Munoz, 1982] Day, N. and Munoz, N. (1982). Esophagus. In Saunders, P. ., editor, *Cancer: epidemiology and prevention*. Schottenfeld D. and Fraumeni J.
- [Denissenko et al., 1997] Denissenko, M., Chen, J., Tang, M., and Pfeifer, G. (1997). Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human p53 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:3893–98.
- [Diebold et al., 1994] Diebold, J., Lai, K. D. M., and Lohrs, U. (1994). Comparison of different monoclonal antibodies for the immunohistochemical assessment of cellular proliferation in routine colorectal biopsy specimens. *Scand J Gastroenterol*, 29:47–53.
- [Driver and Swann, 1987] Driver, H. and Swann, P. (1987). Alcohol and cancer (Review). *Anticancer Res*, 7:309–320.
- [Dube, 1982] Dube, M. (1982). Methods of collection of smoke for analytical purposes. *Recent Adv Tobacco Sci*, 8:42–102.

- [El-Deiry et al., 1994] El-Deiry, W., Tokino, T., O'Connor, P., Velculescu, V., Canman, C., Jackman, J., Pietenpol, J., Burrell, M., Hill, D., Wang, Y., Wi-man, K., Mercer, W., Kastan, M., Kohn, K., Elledge, J., Kinzler, K., and Vogelstein, B. (1994). Waf1/Cip1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*, 54:1169–74.
- [Elledge, 1997] Elledge, S. (1997). Cell cycle checkpoints: preventing and identity crisis. *Science*, 274:1664–71.
- [Essigman and Wood, 1993] Essigman, J. and Wood, M. (1993). The relationship between the chemical structures and mutagenic specificities of the DNA lesions formed by chemical and physical mutagens. *Toxicol Lett*, 67:29–39.
- [Farely, 1980] Farely, J. (1980). A nex assay for the microsomal metabolism of nitrosamines. *Cancer Res*, 40:3241–44.
- [Fisher et al., 1990] Fisher, S., Spiegelhalder, B., and Preussmann, R. (1990). Investigation on the origin of tobacco-specific nitrosamines in mainstream smoke of cigarettes. *Cancer*, 11:723–730.
- [Fisher et al., 1991] Fisher, S., Spiegelhalder, B., and Preussmann, R. (1991). Tobacco-specific nitrosamines in commercial cigarettes: possibilities for reducing exposure. In O'Neill, I., Chen, J., and Bartsch, H., editors, *Relevance to Human Cancer of N-nitroso Compounds, Tobacco Smoke and Mycotoxins*, Lyon. IARC, IARC Scientific Publications n105.
- [Foiles et al., 1991] Foiles, P., Akerkar, S., Carmella, S., Kagan, M., Stoner, G., Resau, J., and Hecht, S. (1991). Mass spectrometric analisys of tobacco-specific nitrosamine-DNA adducts in smokers and nonsmokers. *Chem Res Toxicol*, 4:364–8.
- [Fransceschi et al., 1990] Fransceschi, S., Talamini, R., Barra, S., Baron, A., Negri, E., Bidoli, E., Serraino, D., and Vecchia, C. L. (1990). Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx and esophagus in Northern Italy. *Cancer Res*, 50:6502–07.
- [Gallagher and Brent, 1984] Gallagher, P. and Brent, T. (1984). Further purification and characterization of human 3-methyladenine-DNAglycosylase. Evidence for broad specificity . *Biochem Biophys Acta*, 782:394–401.
- [Gao et al., 1994] Gao, H., Wang, L., Zhou, Q., Hong, J., Huang, T., and Yang, C. (1994). p53 tumor supressor gene mutation in early esophageal precancerous

- lesions and carcinoma among high-risk populations in Henan, China. *Cancer Res*, 54:4342–46.
- [Gartel et al., 1996] Gartel, A., Serfas, M., Gartel, M., Goufman, E., Wu, G., El-Deiry, W., and Tyner, A. (1996). P21 (Waf1/Cip1) expression is induced in newly nondividing cells in diverse epithelia and during differentiation of the Caco-2 intestinal cell line. *Exp Cell Res*, 227:171–181.
- [Gonzalez, 1992] Gonzalez, F. (1992). Human cytochromes P450: problems and prospects. *TiPS Rev*, 13:346–352.
- [Gonzalez and Gelboin, 1993] Gonzalez, F. and Gelboin, H. (1993). Role of human cytochrome P450s in risk assessment and susceptibility to environmentally based disease. *J Toxicol Env Health*, 40:289–308.
- [Gonzalez and Gelboin, 1994] Gonzalez, F. and Gelboin, H. (1994). Role of human cytochrome P450s in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev*, 26:165–183.
- [Gonzalez et al., 1988] Gonzalez, F., Skoda, R., Kimura, S., Umeno, M., Zanger, U., Nebert, D., Gelboin, H., Hardwick, J., and Meyer, U. (1988). Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature*, 331:442–446.
- [Gouerou, 1993] Gouerou, H. (1993). Cancers de l'oesophage. Epidémiologie, étiologie, diagnostic. *Rev Prat*, 43:1315–19.
- [Grahams et al., 1990] Grahams, S., Marshall, J., Haughey, B., Brasure, J., Freudenheim, J., Zielezny, M., Wilkinson, G., and Nolan, J. (1990). Nutritional epidemiology of cancer of the esophagus. *Am J Epidemiol*, 131:454–467.
- [Greenblatt et al., 1994] Greenblatt, M., Bennett, W., Hollstaein, M., and Harris, C. (1994). Mutations in the p53 tumor supressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 54:4855–78.
- [Guengerich, 1991] Guengerich, F. (1991). Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol*, 4:391–407.
- [Gutiérrez-Ruiz et al., 1995] Gutiérrez-Ruiz, M., Gomez, J., and Bucio, L. (1995). Chronic and acute treatment modifies fluidity and composition in plasma membranes of a human hepatic cell line (WRL-68). *Cell biol Toxicol*, 11:69–78.

- [Hainaut, 1997] Hainaut, P. (1997). p53 à l'échelle atomique : les multiples reflets d'un cristal. *Bull Cancer*, 84:747-51.
- [Hakkak et al., 1996] Hakkak, R., Korourian, S., Ronis, M., Ingelman-Sundberg, M., and Badger, T. (1996). Effects of diet and ethanol on the expression and localization of cytochromes P450 2E1 and P450 2C7 in the colon of male rats. *Biochem Pharmacol*, 51:61-69.
- [Hall et al., 1993] Hall, P., McKee, P., Menage, H., Dover, R., and Lane, D. (1993). High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene*, 8:203-207.
- [Hansen and Oren, 1997] Hansen, R. and Oren, M. (1997). p53; from inductive signal to cellular effect. *Current Opinion in Genetics and Development*, 7:46-51.
- [Harrington et al., 1994] Harrington, E., Fanidi, A., and Evan, G. (1994). Oncogenes and cell death. *Current Opinion in Genetics and Development*, 4:120-129.
- [Haupt et al., 1997] Haupt, Y., Mata, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387:296-299.
- [Hecht and D.Hoffmann, 1989] Hecht, S. and D.Hoffmann (1989). The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer. *Cancer Surv*, 8:273-296.
- [Hecht and Hoffmann, 1991] Hecht, S. and Hoffmann, D. (1991). N-nitroso compounds and tobacco-specific nitrosamines induced cancer in man. In O'Neill, I., Chen, J., and Bartsch, H., editors, *Relevance to Human Cancer of N-nitroso Compounds, Tobacco Smoke and Mycotoxins*, Lyon. IARC, IARC Scientific Publications n105.
- [Hewer et al., 1978] Hewer, T., Rose, E., P., G., Castegnaro, M., Bartsch, H., Malaveille, C., and Day, N. (1978). Ingested mutagens from opium and tobacco pyrolysis products and cancer of the oesophagus. *Lancet*, 2:494-496.
- [Hiyama et al., 1997] Hiyama, H., Iavarone, A., Labaer, J., and Reeves, S. (1997). Regulated ectopic expression of cyclin D1 induces transcriptional activation of the cdk inhibitor p21 gene without altering cell cycle progression. *Oncogene*, 14:2533-42.

- [Hollstein et al., 1994a] Hollstein, M., Marion, M., Lehman, T., Welsch, J., Harris, C., Martel-Planche, G., Kusters, I., and Montesano, R. (1994a). p53 mutation at A:T base pairs in angiosarcomas of vinyl chloride-exposed factory workers. *Carcinogenesis*, 15:1–3.
- [Hollstein et al., 1991] Hollstein, M., Peri, L., Mandard, A., Welsh, J., Montesano, R., Metcalf, R., and Harris, C. (1991). Genetic analysis of human esophageal tumors from two high incidence geographic areas: frequent p53 base substitution and absence of ras mutations. *Cancer Res*, 51:4102–4106.
- [Hollstein et al., 1994b] Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., E., H., Smith-Sorensen, B., Montesano, R., and Harris, C. (1994b). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*, 22:120–123551–35559.
- [Huang et al., 1992] Huang, Q., Stoner, G., Resau, J., Nickols, J., and Mirvish, S. (1992). Metabolism of N-nitrosomethyl-n-amylamine by microsomes from human and rat esophagus. *Cancer Res*, 52:3547–51.
- [Hupp and Lane, 1994] Hupp, T. and Lane, D. (1994). Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr Biol*, 4:865–75.
- [Hurt, 1989] Hurt, R. (1989). *Management of Oesophageal Carcinoma*. Springer Verlag, Berlin.
- [IARC, 1985] IARC (1985). *Allyl compounds, aldehydes, epoxides and peroxides, IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*, volume 36. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- [IARC, 1988] IARC (1988). *Monographs on the evaluation carcinogenic risks to humans: alcohol drinking.*, volume 44. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- [IARC, 1997] IARC (1997). *Cancer Incidence in five continents*, volume 121. International Agency for Research on Cancer scientific publications, Lyon, France.
- [Ioannides and Parke, 1990] Ioannides, C. and Parke, D. (1990). The cytochrome P450 I gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic activation of chemicals. *Drug Metab Rev*, 22:1–85.

- [Jacob et al., 1993] Jacob, J., Riviere, A., Mandard, A., Munoz, N., Crespi, M., Etienne, Y., Castellsagué, X., Marnay, J., Lebigot, G., and Qiu, S. (1993). Prevalence survey of precancerous lesions of the oesophagus in a high-risk population for oesophageal cancer in France. *European Journal of Cancer Prevention*, 2:53–59.
- [J.Blot, 1997] J.Blot, W. (1997). Cancer of the Esophagus: its causes and changing pattern of occurrence. In *Thirty-third annual meeting*, pages 159–63, Denver, Colorado.
- [Jonason et al., 1996] Jonason, A., Kunala, S., Price, G. J., Restifo, R., Spinelli, H., Persing, J., Leffell, D., Tarone, R., and Brash, D. (1996). Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:14025–29.
- [Kandolf et al., 1987] Kandolf, R., Ameis, D., Kirschner, P., Canu, A., and Hofschneider, P. (1987). In situ detection of enteroviral genomes in myocardial cells by nucleic acid hybridization: an approach to the diagnosis of viral heart disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:6272–76.
- [Kang et al., 1992] Kang, H., Konishi, C., Eberle, G., Rajewsky, M., Kuroki, T., and Huh, N. (1992). Highly sensitive, specific detection of O6-methylguanine, O4-methylthymine and O4-ethylthymine by the combination of high-performance liquid chromatography prefractionation, 32P postlabeling and immunoprecipitation. *Cancer Res*, 52:5307–12.
- [Karran and Lindahl, 1985] Karran, P. and Lindahl, T. (1985). Cellular defense mechanisms against alkylating. *Cancer Surv*, 4:483–99.
- [Kato et al., 1992] Kato, S., Shields, P., Caporaso, N., Hoover, R., Trump, B., Sugimura, H., Weston, A., and Harris, C. (1992). Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation and lung cancer risk. *Cancer Res*, 52:6712–15.
- [Kaufmann and Paules, 1996] Kaufmann, W. and Paules, R. (1996). DNA damage and cell cycle checkpoints. *FASEB J*, 10:238–247.
- [Kawajiri et al., 1993] Kawajiri, K., Nakachi, K., Imai, K., Watanabe, J., and Hayashi, S. (1993). The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Crit Rev Oncol Hemat*, 14:77–87.
- [Kawamura et al., 1996] Kawamura, T., Goseki, N., Koike, M., Takizawa, T., and Endo, M. (1996). Acceleration of proliferative activity of esophageal squamous cell carcinoma with invasion beyond the mucosa. *Cancer*, 77:843–849.

- [Khuroo et al., 1992] Khuroo, M., Zargar, S., Mahajan, R., and Banday, M. (1992). High incidence of oesophageal and gastric cancer in Kashmir in a population with special personal and dietary habits. *Gut*, 33:11–15.
- [Koga et al., 1996] Koga, Y., Kuwano, H., and Sugimachi, K. (1996). Biologic characteristics of esophageal epithelial dysplasia assessed by proliferating cell nuclear antigen. *Cancer*, 77:237–244.
- [Koop and Tierney, 1990] Koop, D. and Tierney, D. (1990). Multiple mechanisms in the ethanol-inductible cytochrome P450 2E1. *Bioessays*, 12:429–435.
- [Kouros et al., 1983] Kouros, M., Mönch, W., Reiffer, F., and Dehnen, W. (1983). The influence of various factors on the methylation of DNA by the oesophageal carcinogen N-nitrosomethylbenzylamine. I. The importance of alcohol. *Cancer*, 4:1081–84.
- [Kubbutat et al., 1997] Kubbutat, M., Jones, S., and Vousden, K. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm-2. *Nature*, 387:299–303.
- [La and Swenberg, 1996] La, D. and Swenberg, J. (1996). DNA adducts: biological markers of exposure and potential applications to risk assessment. *Mutat Res*, 365:129–146.
- [Labuc and Archer, 1982] Labuc, G. and Archer, M. (1982). Esophageal and hepatic microsomal metabolism of N-nitrosomethylbenzylamine and N-nitrosodimethylamine in the rat. *Cancer Res*, 42:3181–86.
- [Lam et al., 1996] Lam, K., Law, S., So, M., Fok, M., Ma, L., and ., J. W. (1996). Prognostic implication of proliferative markers MIB-1 and PC10 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 77:7–13.
- [Launoy et al., 1994] Launoy, G., Faivre, J., Pienkowski, P., Milan, C., Gignoux, M., and Pottier, D. (1994). Changing pattern of oesophageal cancer incidence in France. *Int J Epidemiol*, 23:246–251.
- [Launoy et al., 1997a] Launoy, G., Milan, C., Day, N., Faivre, J., Pienkowski, P., and Gignoux, M. (1997a). Oesophageal cancer in France: the potential importance of hot alcoholic drinks. *Int J Cancer*, 71:917–923.
- [Launoy et al., 1997b] Launoy, G., Milan, C., Faivre, J., Pienkowski, P., Milan, C., and Gignoux, M. (1997b). Alcohol, tobacco and oesophageal cancer. Effects of duration of consumption, mean intake, and current and former consumption. *Brit J Cancer*, 75:1389–1396.

- [Laval, 1991] Laval, F. (1991). Increase of O6methylguanine-DNA-methyltransferase and N3-methyladenine glycosylase RNA transcript in rat hepatoma cells treated with DNA-damaging agents. *Biochem Bioph Res Co*, 176:1086-92.
- [Lawley and Warren, 1976] Lawley, P. and Warren, W. (1976). Removal of minor methylation products 7-methyladenine and 3-methylguanine from DNA of *Escherichia Coli* treated with dimethyl sulphate. *Chem Biol Interact*, 12:211-220.
- [Lazarus et al., 1995] Lazarus, P., Garewal, H., Sciubba, J., Zwiebel, N., Calcagnotto, A., Fair, A., Schaefer, S., and Richie, J. (1995). A low incidence of p53 mutations in pre-malignant lesions of the oral cavity from non-tobacco users. *Int J Cancer*, 60:458-463.
- [Lee et al., 1989] Lee, M., Ishizaki, H., Brady, J., and Yang, C. (1989). Substrate specificity and alkyl group selectivity in the metabolism of N-nitrosodialkylamines. *Cancer Res*, 49:1470-74.
- [Li, 1982] Li, J. (1982). Epidemiology of oesophageal cancer in China. *Natl Cancer Inst Monogr*, 62:113-120.
- [Li et al., 1980] Li, M., Li, P., and Li, B. (1980). Recent progress in research on esophageal cancer in China. *Adv Cancer Res*, 33:173-249.
- [Li et al., 1994] Li, R., Waga, S., Hannon, G., Beach, D., and Stillman, B. (1994). Differential effects by p21 cdk inhibitor on PCNA-dependant DNA replication and repair. *Nature*, 371:534-537.
- [Lindahl, 1982] Lindahl, T. (1982). DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem*, 51:61-87.
- [Liu et al., 1996] Liu, Y., Martindale, J., Gorospe, M., and Holbrook, N. (1996). Regulation of p21 WAF/CIP1 expression through mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res*, 56:31-35.
- [Lucas et al., 1996] Lucas, D., Menez, C., Floch, F., Gourlaouen, Y., Sperfel, O., Joannet, I., Bodenez, P., Jezequel, J., Gouerou, H., Berthou, F., Bardou, L., and Menez, J. (1996). Cytochrome P450 2E1 and P450 1A1 and susceptibility to cirrhosis or upper aerodigestive tract cancer in alcoholic Caucasians. *Alcohol Clin Exp Res*, 20:1033-37.

- [Maezawa et al., 1994] Maezawa, Y., Yamauchi, M., and Toda, G. (1994). Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450 IIE1 and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol*, 89:561–565.
- [Mandard, 1980] Mandard, A. (1980). Precancerous lesions of the human esophagus. *Acta Endoscopica*, 10:81–87.
- [Mandard et al., 1984] Mandard, A., Marnay, J., Gignoux, M., Segol, P., Blanc, L., Ollivier, J., Borel, B., and Mandard, J. (1984). Cancer of the esophagus and associated lesions: detailed pathologic study of 100 esophagectomy specimens. *Hum Path*, 15:660–669.
- [Mandard et al., 1981] Mandard, A., Marnay, J., Hélie, H., Tuyns, A., and Leta-laer, J. (1981). Absence d'effet de l'éthanol et des eaux de vie de cidre sur le tractus digestif supérieur et l'oesophage du rat wistar. *Bull Cancer*, 68:49–57.
- [Mandard et al., 1997] Mandard, A., Marnay, J., Lebeau, C., Benard, S., and Mandard, J. (1997). Expression of p53 in oesophageal squamous epithelium from surgical specimens resected for squamous cell carcinoma of the oesophagus with special reference to uninvolved mucosa. *J Pathol*, 181:153–157.
- [Martinez, 1969] Martinez, I. (1969). Factors associated with cancer of the esophagus, mouth and pharynx in Puerto Rico. *J Natl Cancer I*, 42:1069–94.
- [Marx, 1989] Marx, J. (1989). Many gene changes found in cancer. *Science*, 246:1386–8.
- [Memik et al., 1992] Memik, F., Gulten, M., and Nak, S. (1992). The etiological role of diet, smoking, and drinking habits of patients with esophageal carcinoma in Turkey. *jepto*, 11:197–200.
- [Miller and Miller, 1981] Miller, E. and Miller, J. (1981). Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer*, 47:2327–45.
- [Mirvish, 1995] Mirvish, S. (1995). Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Letter*, 93:17–48.
- [Moller et al., 1990] Moller, H., Boyle, P., Maisonneuve, P., Veccia, C. L., and Moller-Jensen, O. (1990). Changing mortality from oesophageal cancer in males

- in Denmark and other european countries, in relation to changing levels of alcohol consumption. *Cancer Cause Control*, 1:181–188.
- [Montesano et al., 1992] Montesano, R., Hall, J., and Wild, C. (1992). Alkylating agents relating to carcinogenesis in man. In D'amato, R., Slaga, T., Farland, W., and Henry, C., editors, *Relevance of animal studies to the evaluation of human cancer risk*, volume 374 of *Progress in Clinical and Biological Research*. Wiley-Liss.
- [Montesano et al., 1996] Montesano, R., Hollstein, M., and Hainaut, P. (1996). Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer (Pred Oncol)*, 69:225–235.
- [Morita et al., 1997] Morita, S., Yano, M., Shiozaki, H., Tsujinaka, T., Ebisui, C., Morimoto, T., Kishibuti, M., Fujita, J., Ogawa, A., Taniguchi, M., Inoue, M., Tamura, S., Yamazaki, K., Mizunoya, S., and Monden, M. (1997). CYP 1A1, CYP 2E1, GST M1 polymorphisms are not associated with susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer*, 71:192–195.
- [Morton, 1987] Morton, J. (1987). Tannin and oesophageal cancer. *Lancet*, 2:327–328.
- [Moustacchi, 1982] Moustacchi, P. (1982). Les lésions génétiques et leur réparation. *Le courrier du CNRS*, 48:17–22.
- [Muir, 1981] Muir, C. (1981). Epidémiologie du cancer de l'oesophage en France et dans le monde. *Gastroenterol Clin Biol*, 5:239–242.
- [Muir and McKinney, 1992] Muir, C. and McKinney, P. (1992). Cancer of oesophagus: a global overview. *Eur J Cancer Prev*, 1:259–264.
- [Munoz et al., 1991] Munoz, N., Crespi, M., Grassi, A., Wang, G., Shen, Q., and Li, Z. (1991). Precursor lesions of oesophageal cancer in high-risk populations in Iran and China. *Lancet*, 1:876–9.
- [Murphy and Spina, 1994] Murphy, E. and Spina, D. (1994). Evidence for a high-affinity enzyme in rat esophageal microsomes which 5-hydroxylates N'-nitrosornicotine. *Carcinogenesis*, 15:2709–2713.
- [Murray et al., 1994] Murray, G., Shaw, D., Weaver, R., McKay, J., Ewen, S., Melvin, W., and Burke, M. (1994). Cytochrome P450 expression in oesophageal cancer. *Gut*, 35:599–603.

- [Nakajima et al., 1996] Nakajima, T., Wang, R., Nimura, Y., Pin, Y., He, M., Vainio, H., Murayama, N., Aoyama, T., and Iida, F. (1996). Expression of cytochrome P450s and glutathione S-transférase in human esophagus with squamous-cell carcinomas. *Carcinogenesis*, pages 1477–81.
- [Nehls and Rajwesky, 1985] Nehls, P. and Rajwesky, M. (1985). Ethylation of nucleophilic sites in DNA by N-ethyl-N-nitrosourea depends on chromatin structure and ionic strength. *Mutat Res*, 150:13–21.
- [Nelson et al., 1993] Nelson, D., Kamataki, T., Waxman, D., Guengerich, F., Estabrook, R., Feyereisen, R., Gonzalez, F., Coon, M., Gunsalus, I., Gotoh, O., Okuda, K., and Nebert, D. (1993). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA Cell Biol*, 12:1–51.
- [Norred, 1993] Norred, W. (1993). Fumonisin-mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J Toxicol Env Health*, 38:309–328.
- [Ohta et al., 1986a] Ohta, H., Nakazawa, S., Segawa, K., and Yoshino, J. (1986a). Distribution of epithelial dysplasia in the cancerous esophagus. *Scand J Gastroenterol*, 21:392–398.
- [Ohta et al., 1986b] Ohta, H., Nakazawa, S., Segawa, K., and Yoshino, J. (1986b). Distribution of epithelial dysplasia in cancerous esophagus. *Scand J Gastroenterol*, 21:392–98.
- [O'Neill et al., 1992] O'Neill, C., Clark, G., Hodges, G., Jordan, P., Newman, R., and Pan, Q. (1992). Silicea fragments from millet bran in mucosa surrounding esophageal tumors in patients in Northern China. *Lancet*, 1:1202–6.
- [Ozturk and Soussi, 1994] Ozturk, M. and Soussi, T. (1994). La p53 dans tous ses états: compte rendu du 8e symposium p53. *Med Sci*, 10:1021–3.
- [Palmer et al., 1992] Palmer, N., Coates, P., Davies, S., Shephard, E., and Phillips, I. (1992). Localization of cytochrome P-450 gene expression in normal and disease human liver by in situ hybridization of Wax-embedded archival material. *Hepatology*, 16:682–687.
- [Parkin et al., 1992] Parkin, D., Muir, C., Whelan, S., Gao, Y., Ferlay, J., and Powell, J. (1992). *Cancer incidence in five continents*, volume Scientific publication n120. IARC, Lyon.

- [Parkin et al., 1994] Parkin, D., Pisani, P., Lopez, A., and Masuyer, E. (1994). At least one in seven cases of cancer is caused by smoking. Global estimates for 1985. *Int J Cancer*, 59:494–504.
- [Parrish et al., 1993] Parrish, K., Higuchi, S., and Lucas, L. (1993). Increased alcohol-related oesophageal cancer mortality rates in Japanese men. *Int J Cancer*, 22:600–605.
- [Peking, 1974] The coordinating group for the research of esophageal carcinoma, c. a. o. m. s. and province, H. (1974). *Studies on the relationship between epithelial dysplasia and carcinoma of the esophagus*. Peking.
- [Peng et al., 1982] Peng, R., Tu, Y., and Yang, C. (1982). The induction and competitive inhibition of a high affinity microsomal nitrosodimethylamine demethylase by ethanol. *Cancer*, 3:1457–61.
- [Peto, 1977] Peto, R. (1977). Epidemiology, multistage models, and short-term mutagenicity tests. In Hiatt H.H., W. J. and J.A., W., editors, *Origins of human cancer*, volume book C, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- [Pieper et al., 1994] Pieper, R., Morgan, S., and Kelley, M. (1994). The role of two conserved amino acids, glutamine 90 and asparagine 137, in O6-methylguanine-DNA methyltransferase stability, activity and substrate specificity. *Cancer*, 15:1895–1902.
- [Pirmohamed et al., 1995] Pirmohamed, M., Kitteringham, N., Quest, L., Allot, R., Victoria, J., Gilmore, I., and Park, B. (1995). Genetic polymorphism of cytochrome P450 2E1 and risk of alcoholic liver disease in Caucasians. *Pharmacogenetics*, 5:351–357.
- [Pisani et al., 1993] Pisani, P., Parkin, D., and Ferlay, J. (1993). Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. *Int J Cancer*, 55:891–903.
- [Podust et al., 1995] Podust, V., Podust, L., Goubin, F., Ducommun, B., and Hubscher, U. (1995). Mechanism of inhibition of proliferating cell nuclear antigen-dependant DNA synthesis by the cyclin-dependant kinase inhibitor p21. *Biochemistry*, 34:8869–75.
- [Porschen et al., 1991] Porschen, R., Kriegel, A., Langen, C., Classen, S., M.Hilse, Lohe, B., Hengels, K., and D.Borchard (1991). Assessment of pro-

- liferative activity in carcinomas of the human alimentary tract by Ki-67 immunostaining. *Int J Cancer*, 47:186–691.
- [Porter and Coon, 1991] Porter, T. and Coon, M. (1991). Cytochrome P450. multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanism. *J Biol Chem*, 266:13469–13472.
- [Pottern et al., 1981] Pottern, L., Morris, E., Blot, W., Ziegler, R., and Fraumeni, J. (1981). Esophageal cancer among black men in Washington, D.C. Alcohol, tobacco, and other risk factors. *J Natl Cancer I*, 67:777–783.
- [Pottier et al., 1989] Pottier, D., Launoy, G., Cherie, L., Chuberre, C., and Gignoux, M. (1989). Le cancer de l'oesophage dans le département du Calvados. Facteurs d'inégalité géographiques et sociales. *Bull Cancer*, 76:111–119.
- [Purchase, 1994] Purchase, I. (1994). Current knowledge of mechanisms of carcinogenicity: genotoxins versus non-geotoxins. *Hum Exp Toxicol*, 13:17–28.
- [Reed, 1996] Reed, P. (1996). N-nitroso compounds, their relevance to human cancer and further prospects for prevention. *European Journal of Prevention*, 5 (supplement 1):137–147.
- [Ribeiro et al., 1996] Ribeiro, U., Posner, M., Safatle-Ribeiro, A., and Reynolds, J. (1996). Risk factors for squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Brit J Surg*, 83:1174–85.
- [Rio and Leng, 1983] Rio, P. and Leng, M. (1983). Preferential binding of the chemical carcinogen N-hydroxy-2-aminofluorene to B-DNA as compared to Z-DNA. *Nucleic Acid Res*, 11:4947–56.
- [Roberts et al., 1994] Roberts, B., Shoaf, S., Jeong, K., and Song, B. (1994). Induction of CYP2E1 in liver, kidney, brain and intestine during chronic ethanol administration and withdrawal: evidence that CYP2E1 possesses a rapid phase half-life of 6 hours or less. *Biochem Bioph Res Co*, 205:1064–71.
- [Rodriguez and Theillet, 1997] Rodriguez, C. and Theillet, C. (1997). Ataxie-télangiectasie et cancer : une question ouverte. *Bull Cancer*, 84:763–66.
- [Ruley, 1996] Ruley, H. (1996). p53 and response to chemotherapy and radiotherapy. In V.T., D. V., S., H., S.A., R., and Lippincott-Raven, editors, *Important advances in oncology 1996*. Philadelphia.

- [S et al., 1995] S, S. K., Onda, M., Matsukura, N., Tokunaga, A., Tajiri, T., Kim, D., Tsuruta, H., Matsuda, N., Yamashita, K., and Shields, P. (1995). Cytochrome P4502E1 (CYP2E1) genetic polymorphism in a case-control study of gastric cancer and liver disease. *Pharmacogenetics*, 5:41–44.
- [Sancar and Sancar, 1988] Sancar, A. and Sancar, G. (1988). DNA repair enzymes. *Ann Rev Biochem*, 57:29–67.
- [Sankaranarayanan et al., 1991] Sankaranarayanan, R., Duffy, S., Padmakumary, G., Nair, S., Day, N., and Padmanabhan, T. (1991). Risk factors for cancer of the oesophagus in Kerala, India. *Int J Cancer*, 49:485–489.
- [Sarasin, 1994] Sarasin, A. (1994). Les gènes humains de la réparation de l'ADN. *MS*, 10:43–54.
- [Sasano et al., 1992] Sasano, H., Miyazaki, S., Gooukon, Y., Nishihira, T., Sawai, T., and Nagura, H. (1992). Expression of p53 in human esophageal carcinoma. *Hum Pathol*, 23:1238–43.
- [Satvitsky et al., 1995] Satvitsky, K., Sfez, S., Tagle, D., Ziv, Y., Sartieli, A., and Collins, F. (1995). The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet*, 4:2025–32.
- [Schoenberg et al., 1971] Schoenberg, B., Bailar, J., and Fraumeni, J. (1971). Certain mortality patterns of esophageal cancer in the United States, 1930–67. *J Natl Cancer I*, 46:64–73.
- [Scobey et al., 1987] Scobey, M., Kerr, B., Geisinger, K., Hamilton, R., Richter, J., and al. (1987). Squamous cell carcinoma of the esophagus in association with long-term immunosuppressive therapy. *South Med J*, 80:1587–89.
- [Seitz et al., 1990] Seitz, J., Monges, G., Navarro, P., Giovannini, M., and Gauthier, A. (1990). Dépistage endoscopique des dysplasies et des cancers infracliniques de l'oesophage. Résultats d'une étude prospective avec coloration vitale par le bleu de toluidine chez 100 patients alcoololo-tabagiques. *Gastroenterol clin biol*, 14:15–21.
- [Shi et al., 1996] Shi, S., Feng, B., Yang, G.-Y., Wang, L.-D., and Yang, C. (1996). Immunohistoselective sequencing (IHSS) of p53 tumor suppressor gene in human oesophageal precancerous lesions. *Cancer*, 17:2131–36.

- [Shimizu et al., 1990] Shimizu, M., Lasker, J., Tsutsumi, M., and Lieber, C. (1990). Immunohistochemical localization of ethanol-inducible P450IIE1 in the rat alimentary tract. *Gastroenterology*, 99:1044–53.
- [Shu and Hollenberg, 1997] Shu, L. and Hollenberg, P. (1997). Alkylation of cellular macromolecules and target specificity of carcinogenic nitrosodialkylamines: metabolic activation by cytochromes P450 2B1 and 2E1. *Carcinogenesis*, 18:801–810.
- [Song et al., 1986] Song, B., Gelboin, H., Park, S., Yang, C., and Gonzalez, F. (1986). Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human cythochrome P-450s. *J Biol Chem*, 261:16689–97.
- [Spiegelhalder and Bartsh, 1996] Spiegelhalder, B. and Bartsh, H. (1996). Tobacco-specific nitrosamines. *European Journal of Prevention*, 5 (supplement 1):33–38.
- [Stefani et al., 1993] Stefani, E. D., Barrios, E., and Fierro, L. (1993). Black (air-cured) and blond (flue-cured) tobacco and cancer risk III: oesophageal cancer. *Eur J Cancer*, 5:763–766.
- [Sultatas and E.S., 1980] Sultatas, L. and E.S., V. (1980). Enhanced drug-metabolizing capacity within liver adjacent to human and rat liver tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:600–604.
- [Swenberg et al., 1982] Swenberg, J., Bedell, M., Billings, K., Umbenhauer, D., and Pegg, A. (1982). Cell specific difference in O6-alkylguanine DNA repair activity during continious carcinogen exposure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:5499–02.
- [Takahashi et al., 1993] Takahashi, T., Lasker, J., Rosman, A., and Lieber, C. (1993). Induction of cytochrome P-4502E1 in the human liver by ethanol is caused by a corresponding increase in encoding messenger RNA. *Hepatology*, 17:236–245.
- [Tannheimer et al., 1997] Tannheimer, S., Barton, S., Ethier, S., and Burchiel, S. (1997). Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons increase intracellular Ca²⁺ and cell proliferation in primary human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis*, 18:1177–82.
- [Tsutsumi et al., 1994] Tsutsumi, M., Takada, A., and Wang, J. (1994). Genetic polymorphism of cytochrome P450 2E1, related to the development of alcoholic liver disease. *Gastroenterology*, 107:1430–1435.

- [Tsutsumi et al., 1993] Tsutsumi, M., Takase, S., and Takada, A. (1993). Genetic factors related to the development of carcinoma in digestive organs in alcoholics. *Alcohol alcoholism*, 28:21–26.
- [Tuyns, 1983] Tuyns, A. (1983). Oesophageal cancer in non-smoking drinkers and in non-drinking smokers. *Int J Cancer*, 32:443–444.
- [Tuyns et al., 1980] Tuyns, A., Castegnaro, M., Toussaint, G., E.A., Griciute, L., Talaer, J. L., Loquet, C., Guerain, J., and Drilleau, J. (1980). Recherches concernant les facteurs étiologiques du cancer de l'oesophage dans l'ouest de la France. *Bull Cancer*, 67:2–28.
- [Tuyns et al., 1979] Tuyns, A., Péquignot, G., and Abbatucci, S. (1979). Oesophageal cancer and alcohol consumption; importance of type of beverage. *Int J Cancer*, 23:443–447.
- [Tuyns et al., 1977] Tuyns, A., Péquignot, G., and Jensen, O. (1977). Le cancer de l'oesophage en Ille-et-Vilaine en fonction de niveau de consommation d'alcool et de tabac. Des risques qui se multiplient. *Bull Cancer*, 64:45–60.
- [Tuyns and Vernhes, 1981] Tuyns, A. and Vernhes, J. (1981). La mortalité par cancer de l'oesophage dans les départements du Calvados et de l'Orne. *Gastroenterol Clin Biol*, 5:257–265.
- [Uematsu et al., 1994] Uematsu, F., Ikawa, S., Kikuchi, H., Sagami, I., Kanamaru, R., Abe, T., Satoh, K., Motomiya, M., and Watanabe, M. (1994). Restriction fragment length polymorphism of the human CYP2E1 (cytochrome P450IIE1) gene and susceptibility to lung cancer: possible relevance to low smoking exposure. *Pharmacogenetics*, 4:58–63.
- [Uematsu et al., 1992] Uematsu, F., Kikuchi, H., Motomiya, M., Abe, T., Ishioka, C., Kanamaru, R., Sagami, I., and Watanabe, M. (1992). Human cytochrome P450IIE1 gene: Dra I polymorphism and susceptibility to cancer. *Tohoku J Exp Med*, 168:113–117.
- [Umbenhauer et al., 1985] Umbenhauer, D., Wild, C., Montesano, R., Saffhill, R., Boyle, J., N.Huh, Kirstein, U., Thonale, J., Rajewsky, M., and Lu, S. (1985). O6-methyldeoxyguanosine in oesophageal DNA among individuals at high risk of oesophageal cancer. *Int J Cancer*, 36:661–665.
- [Umeno et al., 1988] Umeno, M., McBride, O., Yang, C., Gelboin, H., and Gonzalez, F. (1988). Human ethanol-inducible P450IIE1: complete gene sequence ,

promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *Biochemistry*, 37:9006–13.

- [Verhaegh et al., 1997] Verhaegh, G., Richard, M., and Hainaut, P. (1997). Regulation of p53 by metal ions and by antioxidants: dithiocarbamate down-regulates p53 DNA-binding activity by increasing the intracellular level of Copper. *Mol Cell Biol*, 17:5699–705.
- [Vermeulen et al., 1997] Vermeulen, W., de Boer, J., Citterio, E., van Gool, A., van der Horst, G., Jaspers, N., de Laat, W., Sijbers, A., van der Spek, P., K.Sugasawa, Weeda, G., Winkler, G., D.Bootsma, Egly, J., and Hoeijmakers, J. (1997). Mammalian nucleotide excision repair and syndromes. *Biochem Soc T*, 25:309–314.
- [Victoria et al., 1987] Victoria, C., Munoz, N., Day, N., Barcelos, L., Peccin, D., and Braga, N. (1987). Hot beverages and oesophageal cancer in southern Brazil: a case-control study. *Int J Cancer*, 39:710–716.
- [Victoria et al., 1990] Victoria, C., Munoz, N., Horta, B., and Ramos, E. (1990). Patterns of Maté drinking in a Brazilian city. *Cancer Res*, 50:7112–15.
- [Vijeyasingam et al., 1994] Vijeyasingam, R., Darnton, S., Jenner, K., Allen, C., Billingham, C., and Matthews, H. (1994). Expression of p53 protein in oesophageal carcinoma: clinicopathological correlation and prognostic significance. *Brit J Surg*, 81:1623–26.
- [Vogelstein and Kinzler, 1992a] Vogelstein, B. and Kinzler, K. (1992a). Carcinogens leave fingerprints. *Nature*, 355:209–210.
- [Vogelstein and Kinzler, 1992b] Vogelstein, B. and Kinzler, K. (1992b). p53 function and dysfunction. *Cell*, 70:523–526.
- [Wang et al., 1993] Wang, L., Hong, J., Qiu, S., Gao, H., and Yang, C. (1993). Accumulation of p53 protein in human esophageal precancerous lesions: a possible early biomarker for carcinogenesis. *Cancer Res*, 53:1783–1787.
- [Wang et al., 1996] Wang, L., Zhou, Q., Hong, J., Qiu, S., and Yang, C. (1996). P53 protein accumulation and gene mutation in multifocal esophageal precancerous lesions from symptom free subjects in a high incidence area for esophageal carcinoma in Henan, China. *Cancer*, 7:1244–49.

- [Wang et al., 1997] Wang, L., Zhu, D., Zhang, C., Mao, X., Wang, G., Mitra, S., Li, B., and Wang, X. (1997). Mutations of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in oesophageal cancer tissues from northern China. *Int J Cancer*, 71:719–723.
- [Waridel et al., 1997] Waridel, F., Estreicher, A., Bron, L., Flaman, J.-M., Fontollet, C., Monnier, P., Frebourg, T., and Iggo, R. (1997). Field cancerisation and polyclonal P53 mutation in the upper aerodigestive tract. *Oncogene*, 14:163–169.
- [Weinberg, 1996] Weinberg (1996). L'apparition des cancers. *Pour la science*, 229:34–42.
- [Wild and Montesano, 1991] Wild, C. and Montesano, R. (1991). *Detection of alkylated DNA adducts in human tissues in Molecular Dosimetry and Human Cancer: Analytical, Epidemiological and Social Considerations*. J.D. Groopman and P.L. Skipper CRC Press, Boston.
- [Wolf et al., 1994] Wolf, C., Smith, C., and Forman, D. (1994). Metabolic polymorphisms in carcinogen metabolising enzymes and cancer susceptibility. *Brit Med Bull*, 50:718–731.
- [Wright and Morgan, 1991] Wright, K. and Morgan, E. (1991). Regulation of cytochrome P450IIC12 expression by interleukin-1 α , interleukin-6 and dexamethasone. *Mol Pharmacol*, 39:468–74.
- [Wu et al., 1997] Wu, X., Shi, H., Jiang, H., Kemp, B., Hong, W. K., Declos, G., and Spitz, M. (1997). Associations between cytochrome P450E1 genotype, mutagen sensitivity, cigarette smoking and susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis*, 18:967–73.
- [Xie and Archer, 1994] Xie, X. and Archer, M. (1994). Metabolism of N-nitrosomethylbenzylamine by microsomes from perivenous and periportal hepatocytes. *Cancer Lett*, 81:27–31.
- [Yamada et al., 1992] Yamada, Y., Weller, R., Kleihues, P., and Ludeke, B. (1992). Effects of ethanol and various alcoholic beverages on the formation of O6-methyldeoxyguanosine from concurrently administered N-nitrosomethylbenzylamine in rats: a dose-response study. *Cancer*, 13:1171–1175.

- [Yang et al., 1991] Yang, C., Smith, T., Ishizaki, H., and Hong, J. (1991). Enzyme mechanisms in the metabolism of nitrosamines. In O'Neill I.K., C. J. and H, B., editors, *Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, Tobacco smoke and Mycotoxins*, volume 105, Lyon. International Agency for Research on Cancer (WHO), IARC scientific publications.
- [Yang et al., 1997] Yang, G.-Y., Zhang, Z., Liao, J., Seril, D., Wang, L., Goldstein, S., and Yang, Y. (1997). Immunohistochemical studies on Waf1p21, p16, pRb and p53 in human esophageal carcinomas and neighboring epithelia from a high-risk area in Northern China. *Int J Cancer*, 72:746–751.
- [Youssef et al., 1995] Youssef, E., Matsuda, T., Takada, N., H.Osugi, Higashino, M., Kinoshita, H., T.Watanabe, Katsura, Y., Wanibuchi, H., and Fukushima, S. (1995). Prognostic significance of the MIB-1 proliferation index for patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer*, 76:358–366.
- [Yu et al., 1988] Yu, M., Garabrant, D., Peters, J., and Mack, T. (1988). Tobacco, alcohol, diet, occupation, and carcinoma of the esophagus. *Cancer Res*, 48:3843–48.
- [Zaidi et al., 1993] Zaidi, N., Potten, C., Margison, G., Cooper, D., and O'Connor, P. (1993). Tissue and cell specific methylation, repair and synthesis of DNA in the upper gastrointestinal tract of Wistar rats treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine via the drinking water. *Carcinogenesis*, 14:1991–2001.
- [Zhang et al., 1994] Zhang, L., Hemminki, K., Szyfter, K., Szyfter, W., and Söderkvist, P. (1994). p53 mutations in larynx. *Cancer Res*, 15:2949–51.

ANNEXE

Annexe A

Activité NMBA déméthylase

L'activité NMBA déméthylase des fractions microsomiales œsophagiennes est déterminée en mesurant la production de formaldéhyde par CLHP selon la méthode décrite par Farelly [Farelly, 1980] et Camus [Camus et al., 1993]. Le mélange réactionnel contenant 0.6 mg de protéines microsomiales dans le tampon TRIS 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, KCL 150 mM, NMBA 5 mM et un système régénérateur de NADPH (glucose-6-phosphate 10 mM, 0,4 unités de glucose-6-phosphate deshydrogénase, 0,4 mM NADP) est incubé 20 minute à 37 °C. Après avoir stoppé la réaction en ajoutant les solutions ZnSO₄ et de Ba(OH)₂ saturé, 0,5 ml du surnageant est mélangé avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine dans des tubes en verre, équipés d'une capsule à sceller munie d'un septum en caoutchouc siliconé greffé sur du téflon (Supelco), pendant 30 minutes sous agitation très vigoureuse. Le formaldéhyde ainsi dérivé est extrait avec 1 ml d'hexane. Après évaporation sous azote, il est analysé par CLHP dont les conditions sont les suivantes : Colonne Supercosil LC-18-DB 25 mm x 4.6 mm, phase mobile composée d'acétonitrile (solvant A) et d'eau (solvant B), programme à t=0 min 20% de A, t=20 min 70% de A, flux de 1 ml/min, détecteur UV réglé à 340 nm. Le temps de rétention des dérivés de la dinitrophénylhydrazine est de 17 minutes. Les standards utilisés pour établir la courbe d'étalonnage ont subi les mêmes traitements que les échantillons.

Annexe B

Extraction de l'ADN

Après avoir réduit en poudre les tissus hépatiques et œsophagiens en présence d'azote liquide (6700 Freezer/Mill, Spex, Edison, NJ), l'ADN a été extrait selon la méthode classique utilisant le phénol [Umbenhauer et al., 1985]. Le tissu réduit en poudre (1 g) est resuspendu par 8,5 ml de tampon composé de NaCl 0,1 M, EDTA 0,02 M et de Tris-HCl 0,5 M pH 8 auquel sont ajoutés 0,5 ml de SDS à 10% et 1 ml de protéinase K (concentrée à 5 mg/ml). Après une incubation de 4 heures (voire toute la nuit) à 37 °C, 500 μ l de SDS 10% sont ajoutés. Deux extractions de l'ADN au phénol saturé sont effectuées successivement sur la phase aqueuse. Après une précipitation par l'éthanol et une centrifugation de 5 min à 2300 rpm, l'ADN est lavé deux fois avec l'éthanol puis séché sous azote. Le culot est repris par 5 ml de tampon contenant de l'EDTA 1 mM et du Tris-HCl 0,5 M pH 7,4 pendant une nuit à 4 °C. Chaque échantillon subit alors un traitement à la RNase A (100 μ g/ml) pendant une 1 heure à 37 °C. Après avoir digérée l'enzyme par la protéinase K, l'ADN est de nouveau extrait par le phénol puis par une solution phénol/chloroforme suivi d'une précipitation par l'éthanol. Le culot obtenu après centrifugation est séché puis dissous dans l'eau distillée.

Annexe C

Dosage de la 7-méthylguanine (7meG)

La 7-medG est dosée selon la méthode mise au point par Bianchini. Les conditions expérimentales sont décrites dans [Bianchini et al., 1993]. En résumé, l'adduit est isolé de l'ADN après hydrolyse thermique (incubation de l'ADN dans un tampon PBS pH 9, 8h à 70 °C) suivie d'une immunopurification sur colonne. La 7-medG est ensuite quantifiée par CLHP en phase inversée couplée à un détecteur électrochimique (Model 5100, ESA, Bedford, MA) réglé sur un potentiel d'oxydation de 800 mV. C'est une méthode sensible et spécifique (limite de détection 0,25 pmoles par échantillon d'ADN (1mg) soit un adduit pour 10^7 bases normales. Il est à noter qu'il est indispensable pour cette technique de vérifier avant chaque dosage la contamination des échantillons par L'ARN. En effet une contamination comprise entre 1 et 10% peut être responsable d'une élévation du taux de la 7meG proportionnelle à la contamination d'ARN. C'est pourquoi, tous les échantillons subissent au préalable un traitement à la Rase A suivi d'un traitement à la Rase A et T1.

Annexe D

Extraction du produit amplifié à partir d'un gel

Après avoir découpé dans le gel d'agarose la bande correspondant au produit amplifié, l'oligonucléotide a été isolé en utilisant un Kit GeneClean (). La purification du fragment a été ensuite effectuée par filtration à travers une Colonne Microspir S-300 HR, Pharmacia.

Annexe E

Séquençage de l'ADNc du CYP2E1 par une méthode enzymatique

Nous avons vérifié la séquence de l'ADNc du CYP2E1 en utilisant le Kit Amersham : Thermo sequenase cycle sequencing kit. Il s'agit d'une méthode enzymatique basée sur la synthèse de la séquence à analyser. Le principe de cette technique, mise au point par Sanger, consiste en l'arrêt de la synthèse de l'ADN par l'incorporation aléatoire de 2'-3' di-désoxynucléotides. Ces nucléotides dont l'hydroxyle en 3' a été remplacé par un hydrogène, ne peuvent plus contracter de liaison phosphodiester. La taille des fragments ainsi synthétisés est égale à la distance entre le début de l'amorce et la base où s'est arrêtée la réplication.

E.1 Marquage de l'amorce sens du CYP2E1

Avant d'effectuer une amplification de la séquence à analyser, les amorces sens et antisens spécifiques de l'ADNc du CYP2E1 doivent être radiomarquées par transfert d'une molécule de 33P-phosphate (situé en position γ de l'ATP) sur son extrémité 5'. Cette réaction est catalysée par la polymérase-kinase du bactériophage T4 (Amersham) (T4PNK).

La réaction de marquage est réalisée dans les conditions suivantes :

[g-33P](1700Ci/mmol)	25 pmol
amorces sens	20 pmol
Tampon T4PNK 10X	1X
T4PNK	10 unités
H ₂ O qsp	10 μ l

Le mélange est incubé 10 minutes à 37 °C puis la réaction enzymatique est arrêtée par inactivation de la T4PNK à la température de 95 °C pendant 3 minutes. Le mélange est conservé à -20 °C.

E.2 Détermination de la séquence de l'oligonucléotide par amplification (PCR) en présence de di-désoxynucléotides

L'oligonucléotide à séquencer est hybridé avec l'amorce radiomarquée, qui sert d'amorce pour la synthèse du second brin par une ADN polymérase thermostable dépourvue d'activité exonucléasique, la Séquénase. Quatre réactions sont menées en parallèle, chacune contenant l'une des quatre bases sous forme de di-désoxyribonucléoside triphosphate (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTT) à très faible concentration.

La composition du milieu d'incubation pour les 4 tubes est la suivante :

ADNc CYP2E1 (20 ng)	10,5 μ l
Tampon de réaction (kit)	2 μ l
Amorce radiomarquée	3 μ l
Thermo Séquénase	2 μ l

4 μ l de ce mélange est ajouté dans chacun des 4 tubes contenant chacun un mélange (4 μ l) de dNTP et d'un ddNTP déterminé.

La réaction d'amplification par PCR s'est déroulée dans un thermocycleur Amplitron, programmé de la manière suivante :

1. dénaturation des brins d'ADN matriciel à 94 °C pendant 30 secondes

2. hybridation de l'amorce radiomarquée avec la matrice à 55 °C pendant 30 secondes
3. élongation à 72 °C pendant 2 minutes

La série de ces trois étapes est répétée 60 fois.

La réaction est arrêtée par l'addition d'un tampon EDTA 20 mM, formamide à 95%, bleu de bromophénol à 0,05%, xylène cyanol 0,05%.

Les produits du séquençage sont concentrés par chauffage pendant 5 minutes à 70 °C puis analysés sur gel dénaturant de polyacrylamide (6%) / Urée. Après migration dans le tampon TBE, le gel est débarrassé de l'urée par immersion dans une solution composée d'acide acétique 5% et de méthanol 20%, pendant 15 minutes. Le gel est ensuite séché puis mis en contact direct avec un film autoradiographique pendant au moins 24 heures.

Annexe F

Marquage de la sonde ADNc du CYP2E1

Nous avons utilisé le Random Primed DNA labeling Kit de Boehringer Mannheim. La sonde est tout d'abord dénaturée à 100 °C pendant 10 minutes, puis mise dans la glace. Elle est ensuite marquée par incorporation de plusieurs molécules digoxigénine-11-dUTP dans les séquences oligonucléotides nouvellement synthétisées. Cette réaction est catalysée par l'enzyme Klenow polymérase. La réaction de marquage est réalisée dans les conditions suivantes : oligonucléotide (40ng) 4 μ l dATP 0.5mM 1 μ l dCTP 0.5mM 1 μ l dGTP 0.5mM 1 μ l dTTP 0.5mM mélangé volume à volume avec Digoxigénine -11-dUTP 0,3 mM 1,6 μ l Enzyme polymérase Klenow 1 μ l Mélange d'hexanucléotides concentrés 10 X 2 μ l H₂O qsp 20 μ l Le mélange est incubé pendant 1 heure à 37 °C, puis la réaction est arrêtée par l'EDTA 0,2M pH8. Les déoxyribonucléosides triphosphates non incorporés dans les sondes sont éliminés par filtration sur des colonnes Microspir S-300 HR (Pharmacia).

F.1 Vérification du marquage de la sonde

Le marquage des sondes est vérifié par dot blot après une irradiation aux UV (« UV cross-linking »). 1 μ l est déposé sur une membrane Hybond puis mis sous la lampe UV pendant 2 minutes. Les sites libres de la membrane sont saturés ensuite par une solution de lait écrémé déshydratée à 2% pendant 1 heure. La membrane est alors rincée par le tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M (TBS) puis incubée pendant 40 minutes en présence d'un anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline, dilué dans le tampon TBS au 1:2000.

Après 3 lavages de 15 minutes dans le tampon TBS, la membrane est équilibrée par immersion pendant 2 minutes dans le tampon Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM et MgCl₂ 50 mM, pH 9,5. Les immunocomplexes sont ensuite révélés par la solution de substrats composée de chlorure de p-nitrobleu de tétrazolium et le bromo-5-chloro-4-indolyl-3 phosphate de toluidine conservés dans le N,N'-diméthylformamide, dilués dans le précédent tampon. La réaction colorimétrique s'effectue à l'abri de la lumière durant plusieurs heures (de 3 à 16 heures). Elle est arrêtée par immersion de la membrane dans le tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0. La membrane maculée par un spot de couleur mauve, témoin du marquage de la sonde, est conservée après séchage entre deux papiers Watmann, à l'abri de la lumière.

Annexe G

Extraction des ARN totaux à partir de blocs en paraffine

Après un déparaffinage au xylène, les ARN totaux sont extraits selon la méthode de

Le tissu est homogénéisé dans une solution se composant de thiocyanate de guanidine 0,45mg/ml, d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate, du citrate de sodium 0.75 M pH 7, du sarcosyl 0.05% et de 2-mercaptoethanol. Après une extraction par du phénol et d'un mélange chloroforme- alcool isoamylique, l'ARN contenu dans la phase aqueuse est précipité par un volume d'isopropanol toute la nuit. Après une centrifugation de 20 minutes à 14000 rpm à la température de 4 °C, le culot est dissous de nouveau dans la solution d'extraction. L'ARN est ensuite précipité par l'isopropanol avant d'être lavé puis séché à l'étuve.

La qualité de l'ARN est généralement vérifiée par une électrophorèse en gel dénaturant agarose 1%/formaldéhyde. La coloration au bromure d'éthidium permet de révéler la position des ARN ribosomiaux 28S et 18S.

Annexe H

Hybridation *in situ*

La détection des acides nucléiques à l'aide de sondes spécifiques par hybridation *in situ* est indispensable pour préciser la localisation dans la cellule et la répartition au sein d'un tissu, des séquences d'ADN et d'ARN étudiés. Les contraintes méthodologiques ne nous ont pas permis, dans un premier temps, de mener ces essais dans notre propre laboratoire. La collaboration avec le laboratoire de pathologie moléculaire du Pr Kandolf (Université de Tübingen, Allemagne, nous permet de proposer les premiers résultats des essais d'adaptation à notre système d'une méthode pratiquée en routine dans ce laboratoire [Kandolf et al., 1987]. L'adaptation de la méthode en marquage en digoxigénine-11-dUTP est détaillée dans le document publié par les laboratoires Boheringer.

e la O(6)méthyl-déoxyguanosine

dosée par une méthode très sensible couplant la CLHP et l'immunoprécipitation. Subsection/Hydrolyse de l'ADN (100-200 µg) en nucléosides 3'-monophosphates est réalisée avec un tampon phosphate de sodium 1M pH6 contenant du CaCl₂ 1M, de l'ATP 100 µg, de l'endonucléase micrococcale 5 unités, de la phosphatase alcaline (préalablement dialysée contre l'eau distillée). Le milieu (154 µl) est incubé à 37 °C pendant 2 heures. Après une centrifugation à 15000 tours par minute à 4 °C, le surnageant est centrifugé sous pression réduite. Le culot est dissout dans 100 µl de

des nucléotides normaux

Les nucléotides d'ADN reconstitués dans le TBS sont dilués dans un volume approprié puis injectés en CLHP en phase inversée. L'élution des nucléotides monophosphates est réalisée avec du formate d'ammonium 0,1M dans un tampon phosphate sur une colonne Supelcosil LC-18-CB (25 x 0,46 cm). En sortie de colonne, les quatre produits sont détectés en utilisant un détecteur. L'analyse d'un mélange de quatre nucléotides standards permet de confirmer la présence des nucléotides présents dans l'échantillon d'hydrolysats d'ADN.

I.2 Purification des O-alkyl 2'déoxyribonucléoside 3'monophosphates (3'OalkyldNp)

Après le dosage des nucléotides normaux et la vérification de la qualité des échantillons, la O6méthyl 2'déoxyguanosine 3'monophosphate (3'O6-medGp) présente dans les hydrolysats d'ADN est purifiée par CLHP (colonne Supelcosil LC-18) couplée à un collecteur de fraction Frac 100. Le détecteur UV est réglé à la longueur d'onde de 254 nm. Le gradient d'éluion (débit de 1ml/min) est le suivant :

Temps(min)	méthanol(%)	Acétate d'ammonium 0,1M pH5(%)
0,1	5	95
20	15	85
15	40	60
10	100	0
15	5	95

La totalité du culot est injectée avec 1,5 μ l de caféine 10 mM. La caféine étant éluée plutôt que les autres produits, elle détermine les fractions dans lesquelles sont collectées les 3'OalkyldNp. Le collecteur de fraction est réglé pour un débit de 0,5 min/fraction. Ainsi lorsque la caféine est collectée dans la 31ème fraction, la 3'O6-medGp est récupérée dans les fractions 39 à 43 et la 3'O4-medTp dans les fractions 46 à 51. Les fractions ainsi obtenues sont regroupées puis évaporées sous pression réduite.

I.3 Post-marquage des adduits

Cette étape consiste à phosphoryler les 3'OalkyldNp en 5'. Les résidus secs sont repris par 5 μ l d'eau distillée. 5 μ l d'un tampon MgCl₂ 1M, DTT 1M, Spermidine 1M, Bis Tris propane 0,5 M pH9, 1 μ l d'ATP-[γ -³²P] (5000 Ci/mmol, 10 mCi/ml Amersham) et 1 μ l (10 U) de polynucléotide kinase T4 (Pharmacia) sont séquentiellement ajoutés. Les milieux réactionnels sont incubés 2 heures à 37 °C. Parallèlement, le marquage de différentes quantités (0 à 20 fmoles) de composé de référence 3'O6-medGp et 3'O4-medTp est réalisé dans les mêmes conditions. Après l'incubation, la déphosphorylation en 3' est effectuée en diminuant le pH à 6 par l'addition de 5 μ l d'HCl 0,05N. Les adduits sont ensuite purifiés par

CLHP et récupérés de nouveau par un collecteur de fraction (1 fraction /min). Les conditions d'élution sont les suivantes (débit 1ml/min) :

Temps(min)	méthanol(%)	Acétate d'ammonium 0,1M pH5(%)
0,1	5	95
20	15	85
5	25	75
10	100	0
15	5	95

Les fractions intéressantes peuvent être vérifiées par l'augmentation de la radioactivité par comptage Cerenkov avec un compteur de radioactivité (Kontron). Elles sont ensuite évaporées toute la nuit sous pression réduite.

I.4 Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation est réalisée grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal de souris préparé par la technique des hybridomes. Nous avons utilisé les clones d'anticorps monoclonaux ER-3 dirigés contre la O6-méthyl-2'-déoxyguanosine-5'-monophosphate (5'-pO6-MedG) et EM3-33 dirigés contre la -O4-méthyl-2'-déoxythymidine-5'-monophosphate (5'-pO6-MedT). 2 dilutions différentes sont testées pour chaque échantillon (1:2, 1:4).

Les résidus radioactifs secs sont repris dans 100 μ l de TBS auxquels sont ajoutés 100 μ l de la solution diluée d'anticorps. Le mélange est incubé 30 minutes à température ambiante suivi d'une seconde incubation (30 minutes) à 4 °C. Un volume équivalent de sulfate d'ammonium saturé froid est ensuite additionné et les tubes sont laissés dans la glace 1 heure. Les précipités sont récupérés par centrifugation à 13000 tours par minute pendant 5 minutes, lavés deux fois avec du sulfate d'ammonium demi-saturé et 1 fois avec d'HCl 0,1M. Leur radioactivité est ensuite mesurée en scintillation liquide par un compteur de radioactivité (Kontron).

Annexe J

Immunohistochimie de la protéine p53 et du Ki67

L'accumulation de la protéine p53 (DO-7) et la détection d'un marqueur de prolifération cellulaire Ki67 (Mib1) dans la muqueuse œsophagienne ont été recherchées sur des coupes de 5 mm d'épaisseur. Le système de révélation est basé sur l'utilisation d'un complexe préformé (avidine-biotine-peroxydase).

J.1 Réactifs

- PBS pH 7.4
- TBS pH 7,6 : TRIS 0,05M, NaCl 0,145M

Anticorps primaires :

- Anticorps monoclonal de souris dirigé contre la protéine P53 (DAKO p53, clone DO-7). Cet anticorps qui est résistant à la fixation en formol reconnaît un épitope présent aussi bien chez la protéine de type sauvage que chez la forme mutée de p53.
- Anticorps monoclonal d'un antigène nucléaire Ki-67, 0.2mg/ml (Immuno-tech, Mib1) Anticorps monoclonal de souris dirigé contre la protéine P21, Waf1 (Santa Cruz Biotechnology)

- Anticorps monoclonal de souris dirigé contre la protéine P21 (P 187, Santa Cruz).

Anticorps secondaires et tertiaires sont contenus dans un Kit DAKO Strep-tABCComplex HRP :

- Duet (souris/lapin) (DAKO K.492)
- Sérum normal de chèvre DAKO
- Diaminobenzidine (Merck)
- Carbonate de lithium (Merck)
- Hématoxyline : selon la méthode de Gill, Acta. Cyto. vol.18, 4, p.300. Après avoir dissout 3g d' hématoxyline (Merck) dans 250 ml d'éthylène glycol (Merck), il faut ajouter dans l'ordre 730ml d'H₂O distillée, 0,2 g d'iodate de sodium, 17,6 g d'alun de potassium. Après dissolution complète des cristaux, 20 ml d'acide acétique glacial sont ajoutés. L'hématoxyline de Gill se conserve plusieurs mois à l'abri de la lumière et à température ambiante.
- Entellan (Merck)

J.2 Préparation des lames

Le matériel tissulaire est fixé pendant un certain temps dans du formol tamponné à 10 % puis est inclus en paraffine. Les sections tissulaires sont découpées au microtome puis étalées sur des lames silanisées afin d'éviter tout décollement intempestif pendant les étapes de lavages et de démasquage des sites antigéniques.

Avant chaque expérimentation, les lames sont séchées à l'étuve toute la nuit à 56 °C.

Traitement des lames avant la mise en contact avec l'anticorps Les coupes sont déparaffinées puis réhydratées selon le protocole suivant :

Déparaffinage : toluène 3 X 5 minutes

Deshydratation : alcool absolu 2 fois 5 minutes

Réhydratation : alcool 95 1 fois 5 minutes, alcool 70 1 fois 5 minutes, alcool 50 1 fois 5 minutes.

J.3 Inhibition des peroxydases endogènes

Cette étape est réalisée afin que les enzymes endogènes n'interfèrent pas avec les enzymes exogènes apportées lors de la détection. Dans notre système il s'agit de la peroxydase. Il faut par conséquent immerger les lames dans un bain de PBS contenant 3% d'H₂O₂ 110 volumes pendant 30 minutes.

J.4 Démasquage des sites antigéniques

La perméabilisation des échantillons tissulaires est une étape importante car elle permet l'accessibilité des anticorps aux épitopes. Elle est réalisée soit par digestion enzymatique, soit par passages successifs dans le four à micro-onde. Pour la muqueuse œsophagienne, nous avons obtenus les meilleurs résultats après 5 passages successifs dans le four à micro-onde. Les lames sont donc immergées dans un tampon citrate pH 6 puis subissent 5 passages successifs de 5 minutes. Pour la reproductibilité des résultats, il est important de vérifier la pression osmotique après chaque passage dans le four à micro-onde. Le système est laissé à refroidir pendant 15 minutes à température ambiante avant d'être transféré dans un bain de PBS.

J.5 Réactions immunohistochimiques

Les lames sont incubées dans du sérum normal de chèvre dilué au 1/5. Cette préincubation est réalisée pour saturer les sites non spécifiques sur lesquels le deuxième anticorps pourrait se fixer. Au bout de 10 minutes, 100 µl d'anticorps primaire sont déposés sur les lames correspondantes. Les dilutions utilisées pour chaque anticorps ont été effectuées dans du TBS filtré aux dilutions suivantes :

Mib1: dilution au 1:100
p53 : dilution au 1: 15
p21 : dilution au 1:600

Après un temps d'incubation limité à 1 heure, chaque lame est rincée avec du TBS pendant 5 minutes. L'anticorps secondaire correspondant à un anticorps polyvalent de chèvre anti-lapin et anti-souris dilué au 1:100, est déposé (100 µl)

puis laissé pendant 30 minutes sur la coupe tissulaire. Cette étape est suivie par un rinçage et par une incubation de 45 minutes avec l'anticorps tertiaire (complexe préformé avidine-biotine-peroxydase) dilué au 1:100. Les lames sont ensuite immergées dans le tampon TBS. Au cours de chaque expérimentation, des échantillons tissulaires témoins négatifs (omission de l'anticorps primaire) et positifs sont utilisés en parallèle.

J.6 Réaction avec le chromogène

La révélation immunohistochimique se fait via une réaction enzymatique colorée. Le substrat choisi pour la peroxydase est un chromogène, la diaminobenzidine (DAB). En présence de H₂O₂, la peroxydase libère un électron qui va précipiter la DAB au niveau du complexe Ag- Ac en donnant une coloration brune. 10 mg de DAB sont donc dissous dans 15 ml de tampon PBS. Après filtration, 15 ml d'H₂O₂ 110 volumes sont ajoutés. Cette solution est déposée sur les coupes tissulaires et laissée en contact pendant 7 minutes. Les lames sont ensuite rincées avec de l'eau.

J.7 Contre coloration

Cette étape a pour but de marquer les structures tissulaires en bleu. Pour cela, nous utilisons l'hématoxyline de Gill que nous laissons en contact pendant 10 minutes. Au niveau de cette étape, il est important de bien rincer les coupes tissulaires avec de l'eau.

J.8 Différenciation

Elle permet d'éliminer les colorations bleues non nucléaires. Les lames sont alors transvasées dans un bain d'alcool acide (3 ml d'HCL qsp 1 litre d'alcool à 70 °). Au bout d'1 minute, une coloration rouge cardinal apparaît. Les lames sont ensuite maintenues dans un bain d'eau distillée puis immergées quelques secondes dans un bain de carbonate de lithium saturé. La qualité de la contre coloration dépendra de la saturation de cette solution

Avant de visualiser le marquage immunohistochimique au microscope, les lames sont déshydratées par passages successifs dans des bains d'alcool à 50 ° , d'alcool à 70 ° , d'alcool à 100 ° puis de toluène, pour être ensuite recouvertes d'une lamelle en utilisant l'Entellan comme milieu de montage.