

INTERACTION ENTRE LE POLYMORPHISME GENETIQUE DU CYTOCHROME P450-1B1 ET LES POLLUANTS ENVIRONNEMENTAUX DANS LES RISQUES DE CANCER DU SEIN

M.SAINTOT 1, C.MALAVEILLE 2, A.HAUTEFEUILLE 2 et M.GERBER 1.

European journal of Cancer prevention 2004, 13:83-86.

Correspondance avec M.Gerber : fax : (+33) 467613787, mail : marieger@valdorel.fnclcc.fr

Résumé

Le cytochrome P450-1B1 (CYP1B1) est une mono-oxygénase impliquée dans la phase I du métabolisme d'activation des xénobiotiques et des œstrogènes plasmatiques. Le polymorphisme génétique du CYP1B1 au niveau du codon 432 induit une substitution d'un acide aminé valine en leucine dans la protéine, ayant pour conséquence une modification des paramètres cinétiques de l'activité enzymatique. Dans une étude 'cas-seulement' concernant des patientes atteintes de cancer du sein, nous avons étudié l'interaction (synergie positive ou négative) entre ce polymorphisme et l'exposition à des risques environnementaux. On a trouvé que les femmes porteuses de l'allèle *Val CYP1B1* et qui avaient vécu à proximité d'un incinérateur de déchets ménagers pendant plus de 10 ans avaient une augmentation du risque de cancer du sein par rapport aux femmes homozygotes *LeuLeu CYP1B1* et non exposées, l'excès de risque avec un intervalle de confiance à 95% est égal à 3.26 (1.2-8.84) De même, les femmes exposées pendant leur vie à des pesticides utilisés en agriculture et porteuses de l'allèle *Val CYP1B1* présentaient une augmentation du risque de cancer du sein (ORi = 2.18 , IC à 95%=10-4.32). Ces xénobiotiques, principalement des hydrocarbures organochlorés sont connus pour se fixer au récepteur cytosolique des hydrates de carbone aromatiques (AhR) et induire l'expression du gène CYP1B1.

On peut considérer que l'excès de risque observé chez les femmes homo- ou hétérozygotes pour l'allèle *Val CYP1B1* pourrait résulter d'une exposition plus importante aux métabolites activés de pesticides ou de substances 'dioxine-like', qui sont des perturbateurs endocriniens. De même, chez les femmes porteuses de ce génotype, une expression augmentée de Val CYP1B1 induite par ces xénobiotiques produirait une accélération du métabolisme des oestrogènes en 4-OH catéchol-oestrogènes, et donc une exposition plus importante à ces métabolites génotoxiques.

Nos résultats suggèrent que l'allèle *Val CYP1B1* augmente la susceptibilité au risque du cancer du sein chez les femmes exposées aux effluents d'incinérateurs de déchets ménagers ou aux polluants agricoles.

Introduction.

L'implication de l'oestradiol dans la genèse du cancer du sein est bien documentée (Nandi et al., 1995). Les dioxines et les pesticides sont des composés environnementaux organochlorés avec une activité oestrogénique ou anti-oestrogénique considérée comme pouvant interférer avec le métabolisme de l'oestradiol (Adami et al., 1995; Safe, 1997; Snedeker, 2001). Des expérimentations animales ont montré que ces hydrocarbures organochlorés se liaient au récepteur cytosolique (AhR), et induisaient l'expression des cytochromes mono-oxygénases (Sutter et al., 1994; Abel et al., 1996). Le cytochrome P-450 1B1 est impliqué dans l'hydroxylation des oestrogènes en 4-hydroxy-oestrogènes, ces catéchol-oestrogènes sont génotoxiques lorsqu'ils ne sont pas métabolisés par les enzymes de phase II de détoxification (Hayes et al., 1996). Cette mono-oxygénase catalyse l'activation des xénobiotiques en composés électrophiles qui peuvent réagir avec la molécule d'ADN (Shimada et al., 1996).

Une étude sur une lignée cellulaire de cancer du sein (MCF-7) montre que la régulation des gènes codant pour les enzymes du métabolisme des oestrogènes peut constituer un aspect important dans la transformation toxique de substances telles que les dioxines et les pesticides (Coulmoul et al., 2001). Le polymorphisme du gène *CYP1B1* au codon 432 induisant la substitution de la valine par la leucine dans la protéine enzymatique a pour effet une baisse d'efficacité catalytique de l'enzyme dans l'hydroxylation des oestrogènes, et des modifications métaboliques sur la détoxification d'autres pro-carcinogènes mammaires (Shimada, 1999; Hanna, 2000). Les émissions des incinérateurs de déchets ménagers contiennent des hydrocarbures aromatiques, des polychloro-di-benzo-p-dioxines (PCDDs) et des di-benzofuranes (PCDF) (Domingo, 2002). Les pesticides utilisés en agriculture contiennent des composants organochlorés (e.g DDT et des composés biphenyls polychlorés). Nous avons fait l'hypothèse que dans la pathologie du cancer du sein, le polymorphisme du CYP1B1 peut induire des susceptibilités individuelles face aux risques d'exposition aux pro-carcinogènes environnementaux.

L'étude de 'cas-seulement' permet de tester l'existence d'interaction entre un polymorphisme enzymatique particulier et une exposition environnementale (habitat près d'un incinérateur ou dans une zone agricole). Dans le cas de cette étude, les deux facteurs étudiés sont considérés à juste titre comme présents dans la population générale de manière indépendante.

Méthodologie.

Une étude 'cas-seuls' a été menée de 1998 à 2001, sur des patientes atteintes de cancer du sein et hospitalisées au CRLC de Montpellier (Sud de la France). 90% des patientes sollicitées ont été volontaires pour participer à l'étude. Le CRLC est un hôpital régional qui reçoit 80% des patientes atteintes du cancer du sein de la région Languedoc-Roussillon. Un questionnaire a été proposé pour recueillir les informations sur les expositions environnementales, les données socio-démographiques, les événements liés à la reproduction, l'historique médicale et familiale des patientes. Concernant les habitudes tabagiques, nous avons classifié les sujets suivant le statut fumeur ou non-fumeur. Pour les risques d'exposition aux produits utilisés dans l'agriculture nous avons considéré les expositions passives de l'enfance et les expositions dues aux activités dans la vie adulte. On enregistre les durées et les périodes en relation avec les pesticides en usage à chaque période. Pour les sujets qui ont vécu au voisinage d'un incinérateur de déchets ménagers, nous avons noté l'âge aux premières et dernières expositions, le nom de la commune et le département. Nous avons vérifié la présence d'un incinérateur de déchets ménagers dans la commune à partir des données du réseau de mesure qualité de l'air (1999). En Languedoc-Roussillon, 2 incinérateurs municipaux de déchets ménagers (MSWI) avec une capacité de l'ordre de 7 tonnes/heure sont localisés à Sète et à Perpignan, les autres sites de la région ont des capacités inférieures (<3 tonnes /heure).

Des solutions d'ADN ont été préparées à partir de sang total en utilisant la méthode décrite par Spurr *et al.* (1991). Les solutions sont stockées à -30° C. Le polymorphisme de G en C à la position 1640 du *CYP1B1* qui provoque un changement au niveau du codon 432 (Val Leu), a été analysé en utilisant la méthode de PCR-RFLP, méthode décrite par Baily *et al.* (1998).

Le modèle de la régression logistique appliqué à une étude de 'cas-seuls' permet d'estimer une déviation aux effets multiplicatifs gene-environnement avec une plus grande précision que dans l'étude 'cas-témoins', à la condition que ces 2 facteurs soient statistiquement indépendants dans la population (Yang et Koury, 1997). Cette méthode est très sensible à la véracité de cette hypothèse (Albert *et al* 2001), mais dans le cas précis de cette étude il est improbable que le polymorphisme génétique de *CYP1B1* soit associé à la fréquence d'expositions environnementales passives ou professionnelles.

Les odds-ratio calculés par le modèle de la régression logistique sont ajustées sur l'âge, le status ménopausal, l'indice de masse corporelle (kg/m²), l'âge des premières règles (<=12, >12 ans), l'âge à la première grossesse menée à terme (<=25, >25 ans), la fécondité (0 ou 1, >1 enfant), l'utilisation de contraceptifs oraux, la prise de THS, la consommation tabagique (fumeur, non fumeur). La variable génotype a été classifiée: homozygote *Leu/Leu CYP1B1* (faible activité enzymatique) et homo/hétérozygote *Val CYP1B1* (activité rapide). Le groupe de référence est constitué des patientes non exposées et portant le génotype *Leu/Leu CYP1B1*.

On utilise des tests statistiques bilatéraux avec un seuil de signification inférieur à 0.05.

Résultats.

La cohorte comprenait 282 patientes atteintes de cancer du sein. L'âge moyen était de 52 ans (38-87 ans) et 59% des femmes étaient ménopausées depuis au moins un an. Toutes ces femmes étaient de race blanche. 10% d'entre elles avaient un historique familial de cancer du sein (mère et/ou sœur), 13% étaient nullipares, 81% avaient eu 1 à 3 enfants, 6% plus de 3. 77% avaient plus de 20 ans au moment de leur première grossesse menée à terme, 25% avaient un IMC>25, 66% utilisaient une contraception orale, 30% des femmes ménopausées prenaient un traitement hormonal substitutif. 65 % des femmes avaient des tumeurs classées récepteur-positives aux oestrogènes.

La durée médiane d'exposition aux polluants émis par un incinérateur était de 14 ans (7-22 ans). En raison du petit effectif, nous avons additionné le temps d'exposition passive (enfance) et temps d'exposition active (métier) aux polluants agricoles, la médiane était de 20 ans (11-29 ans).

La fréquence des génotypes *Val/Val CYP1B1*, *Val/Leu CYP1B1*, et *Leu/Leu CYP1B1* dans cet échantillon étaient respectivement de 17.7%, 50.3%, 32.0%.

Le groupe des patientes exposées aux rejets d'incinérateurs comprend un pourcentage plus élevé de femmes porteuses de l'allèle *Val CYP1B1* que le groupe des patientes non exposés (84% contre 64.6%, P>0.01). Egalement le groupe exposé à un environnement agricole comprend un pourcentage plus élevé de ce même allèle (74% contre 64%, P=0.09).

Les résultats du tableau I montrent les valeurs des ORs d'interaction ajustés sur les facteurs de confusion décrits. Le groupe 'cancer du sein' homo ou hétérozygote *ValCYP1B1* ayant vécu près d'un incinérateur de déchets ménagers pendant au moins 10 ans présentait un excès de risque de 3.3 par rapport au groupe de patientes homozygotes *Leu/Leu CYP1B1* non exposées. De même, on a observé un doublement du risque en relation avec l'exposition à un environnement agricole d'au moins 20 ans, pour les femmes porteuses de l'allèle *Val*.

Discussion.

Nous avons trouvé un excès de risque de cancer du sein chez les femmes porteuses de l'allèle *Val CYP1B1* ayant vécu dans un environnement agricole ou près d'un incinérateur.

Bien que cette étude ne concerne que peu de patientes exposées à l'un ou l'autre des polluants étudiés, l'odds-ratio des interactions respectives atteint le seuil significatif de 0.05.

Ces résultats sont en accord avec les connaissances sur le mécanisme d'interférence de ces polluants avec les activités hormonales (perturbateurs endocriniens). Les dioxines, dont principalement le 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), sont des substances d'une remarquable persistance chez l'homme avec une demi-vie d'environ 5 à 20 ans (Smith et Liperio, 2001). La monographie de l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer classe les TCDD dans le groupe I des carcinogènes humains (IARC 1997). Les pesticides agricoles comprennent des composés organochlorés tel que le p,p-dichloro-diphényl-trichloroéthane (DDT), ces substances liposolubles peuvent persister dans le corps pendant des années à cause de leur longue demi-vie. Ces substances ont été interdites depuis 30 ans, mais les femmes de plus de 30ans peuvent y avoir été exposées.

Les études épidémiologiques ne vérifient pas l'hypothèse d'une relation entre l'exposition aux pesticides et le cancer du sein (Hunter et al,1997; Wolf et al, 2000 ; Zheng et al,2000 ; Laden et al,2001 ; Janssen et al,2001). De même, les études sur des populations accidentellement exposées aux dioxines ne montrent pas d'augmentation du cancer du sein chez les femmes (Bertazzi et al,2001). Cependant, une étude plus récente sur la même exposition accidentelle (Landi et al ,2003) indique une variabilité de réponse à l'exposition.

Les études expérimentales montrent que ces composés se lient au récepteur cytosolique des hydrocarbures aromatiques (AhR), lequel s'internalise dans le noyau cellulaire en se fixant sur une protéine de translocation nucléaire, le complexe formé se lie au promoteur des gènes CYP induisant ainsi leurs transcriptions (Dasmahapatra et al 2001 ; Landi et al, 2003). Le phénotype *Val CYP1B1* a une plus grande efficacité catalytique pour l'hydroxylation des oestrogènes que le phénotype *Leu/leu CYP1B1* (Shimada et al, 1999; Hanna et al,2000). Ainsi l'induction accrue du *Val CYP1B1* enzyme sous l'influence de ces xénobiotiques pourrait avoir pour effet d'augmenter le taux circulant des 4-OH-oestrogènes considérés comme génotoxiques.

Parallèlement, on peut faire l'hypothèse que cette même induction enzymatique augmente la transformation des composés organochlorés en composés hydroxylés qui deviennent réactifs sur la molécule d'ADN ou qui agissent comme des substances perturbant le métabolisme endocrinien (Moysich et al,1999 ; Glustrom et al,2002). Ces différents mécanismes pourraient expliquer l'excès de risque de cancer du sein pour les femmes portant le *Val CYP1B1* allèle et exposées aux polluants environnementaux.

Parmi les études récentes sur les effets du polymorphisme du *CYP1B1* sur le risque de cancer du sein, trois concernent des populations de race blanche et une la population coréenne. La dernière conclut que le polymorphisme du gène *Leu(432)Val CYP1B1* n'apparaît pas jouer un rôle dans le risque du cancer du sein (Lee et al, 2000). Les trois autres suggèrent une interaction possible lorsque le niveau d'oestradiol dans l'organisme est augmenté (niveau plasmatique, indice de masse corporelle élevé ou longue période d'utilisation des traitements substitutifs de la ménopause) (De Vivo et al, 2002 ; Kocabas et al, 2002 ; Rylander –Rudqvist et al, 2003).

En conséquence, ces trois articles apportent des arguments à l'hypothèse selon laquelle l'association entre le polymorphisme du *CYP1B1* et le risque du cancer du sein est lié au métabolisme des oestrogènes. Le risque augmenté dû à l'exposition à des xénobiotiques oestrogéniques se situerait dans l'interaction avec l'activité de ce cytochrome important dans la phase d'activation des oestrogènes.

Nos recherches sous-entendent que le polymorphisme génétique des enzymes du métabolisme devrait être évalué dans les études épidémiologiques et en particulier dans les cas de faibles expositions, comme celles dues à l'environnement.

En conclusion, cette étude 'cas-seuls', portant uniquement sur l'étude des interactions gène-environnement, montre que le polymorphisme génétique des enzymes du métabolisme induit une susceptibilité individuelle face aux risques d'expositions aux polluants suspectés d'avoir une activité oestrogénique.

REMERCIEMENTS

Soutenu par une grande association de recherche sur le cancer. Nous remercions également le Pr Ph Rouanet , Pr B St Aubert , Dr Ph Quenel et le service de chirurgie du CRLC dans leur aide sur le recrutement des patients , MH Avallone pour son effort dans l'interview des patients , Y Pioche et S Poujol pour la manipulation des prélèvements sanguins .

References

Nandi S, Guzman RC, Yang J (1995). Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **25**:3650-7.

- Adami HO, Lipworth L, Titus-Ernstoff L, *et al* (1995). Organochlorine compounds and estrogen-related cancers in women. *Cancer Causes Control* **6**:551-66.
- Safe SH (1997). Xenoestrogens and breast cancer. *N Engl J Med* **337**:1303-4.
- Snedeker SM (2001). Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE, and dieldrin. *Environ Health Perspect Suppl* **1**:35-47.
- Sutter TR, Tang YM, Hayes CL, *et al* (1994). Complete cDNA sequence of a human dioxin- inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *J Biol Chem* **269**:13092-9.
- Abel J, Li W, Dohr O, *et al* (1996). Dose-response relationship of cytochrome P4501b1 mRNA induction by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in livers of C57BL/6J and DBA/2J mice. *Arch Toxicol* **70**:510-3.
- Hayes CL, Spink DC, Spink BC, *et al* (1996). 17 β -estradiol hydroxylation catalysed by human cytochrome P4501B1. *Proc Natl Acad Sci* **93**:9776-81.
- Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, *et al* (1996). Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-4501B1. *Cancer Res* **56**:2979-84.
- Coumoul X, Diry M, Robillot C, *et al* (2001). Differential regulation of cytochrome P450 1A1 and 1B1 by a combination of dioxin and pesticides in the breast tumor cell line MCF-7. *Cancer Res* **61**:3942-8.
- Shimada T, Watanabe J, Kawajiri K, *et al* (1999). Catalytic properties of polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants. *Carcinogenesis* **20**:1607-13.
- Hanna IH, Dawling S, Roodi N, *et al* (2000). Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) pharmacogenetics: Association of polymorphisms with functional differences in estrogen hydroxylation activity. *Cancer Res* **60**:3440-44.
- Domingo JL, Bocio A, Nadal M, *et al* (2002). Monitoring dioxins and furans in the vicinity of an old municipal waste incinerator after pronounced reductions of the atmospheric emissions. *J Environ Monit* **4**:395-9.
- Spurr NK, Gough AC, Smith CAD, *et al* (1991). Genetic analysis of cytochrome P450 system. In *Methods in Enzymology* (eds Waterman MR, Johnson ER); Academic Press, New-york, 149-66.
- Bailey LR, Roodi N, Dupont WD, *et al* (1998). Association of cytochrome P450 1B1 (CYP1B1). Polymorphism with steroid receptor status in breast cancer. *Cancer Res* **58**:5038-41.
- Yang Q, Khoury MJ (1997). Evolving methods in genetic epidemiology. III. Gene-environment interaction in epidemiologic research. *Epidemiologic Reviews* **19**:33-43.
- Albert PS, Ratnasinghe D, Tangrea J, *et al* (2001). Limitations of the case-only design for identifying gene-environment interactions. *Am J Epidemiol* **154**:687-93.
- Smith AH, Lopipero P (2001). Invited commentary: How do Seveso findings affect conclusions concerning TCDD as human carcinogen? *Am J Epidemiol* **153**:1045-7.
- IARC (1997). Polychlorinated dibenzo-para dioxins and polychlorinated dibenzofurans Vol 69. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. International Agency for Research on Cancer: Lyon.
- Hunter DJ, Hankinson SE, Laden F *et al* (1997). Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* **337**:1253-8.
- Wolff MS, Zeleniuch-Jacquotte A, Dubin N *et al* (2000). Risk of breast cancer and organochlorine exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**:271-7.

- Zheng T, Holford TR, Mayne ST *et al* (2000). Risk of female breast cancer associated with serum polychlorinated biphenyls and 1,1-dichloro-2,2'-bis(p-chlorophenyl)ethylene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**:167-74.
- Laden F, Hankinson SE, Wolff MS *et al* (2001). Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer: an extended follow-up in the Nurses' Health Study. *Int J Cancer* **91**:568-74.
- Janssens JP, Van Hecke E, Geys H *et al* (2001). Pesticides and mortality from hormone-dependent cancers. *Eur J Cancer Prev* **10**:459-67.
- Bertazzi AP, Consonni D, Bachetti S *et al* (2001). Health effects of dioxin exposure: a 20- year mortality study. *Am J Epidemiol* **153**:1031-44.
- Landi MT, Bertazzi PA, Baccarelli A *et al* (2003). TCDD-mediated alterations in the AhR-dependent pathway in Seveso, Italy, 20years after the accident. *Carcinogenesis* **24**:673-80.
- Dasmahapatra AK, Wimpee BA, Trewin AL *et al* (2001). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases steady-state estrogen receptor-beta mRNA levels after CYP1A1 and CYP1B1 induction in rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* **182**:39-48.
- Moysich KB, Shields PG, Freudenheim JL *et al* (1999). Polychlorinated biphenyls, cytochrome P4501A1 polymorphism, and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**: 41-4.
- Glustrom LW, Mitton-Fry RM, Wuttke DS (2002). Re: 1,1-Dichloro-2,2-bis-(p-chlorophenyl)ethylene and polychlorinated biphenyls and breast cancer: Combined analysis of five U.S. studies. *J Natl Cancer Inst* **94**:1337-8.
- Lee KM, Abel J, Ko Y *et al* (2003). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 19 and 1B1, alcohol use, and breast cancer risk in Korean women. *Br J Cancer* **88**:675-8.
- De Vivo I, Hankinson SE, Li L *et al* (2002). Association of CYP1B1 polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**:489-92.
- Kocabas NA, Sardas S, Cholerton S *et al* (2002). Cytochrome P450 CYP1B1 and catechol-O-methyltransferase (COMT) genetic polymorphisms and breast cancer susceptibility in a Turkish population. *Arch Toxicol* **76**:643-9.
- Rylander-Rudqvist T, Wedren S, Granath F *et al* (2003). Cytochrome P450 1B1 gene polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Carcinogenesis* **24**:1533-9.

Tableau 1 –Analyse de ‘cas-seulement’ : ORis d’interaction entre une exposition environnementale (habitat à proximité d’un incinérateur de déchets ménagers, ou dans une zone agricole) et le polymorphisme génétique du CYP1B1 (Val /Leu).

Exposition	Durée d’exposition	CYP 1B1 ^a		ORI(95%CI) ^b
		Val/Val et Val/Leu	Leu/Leu	
Habitat près d’un incinérateur	0	150	82	1 ^c
	<10 ans	12	3	1.72 (0.45-6.65)
	= 10 ans	30	5	3.26 (1.20-8.84)
	toute durée	42	8	2.86 (1.25-6.53)
zone agricole	0	107	58	1 ^c
	<20ans	33	15	1.25 (0.60-2.61)
	= 20ans	52	17	2.18 (1.10-4.32)
	toute durée	85	32	1.66 (0.95-2.89)

^a-les génotypes classés suivant le phénotype enzymatique (hydroxylation rapide /hydroxylation lente)

^b- OR et intervalle de confiance à 95% pour l’interaction gène-environnement ajusté sur l’âge , le status ménopausal, l’indice de masse corporelle, l’âge aux premières règles (= 12 ans,>12 ans), l’âge à la 1^{ère} grossesse (= 25ans, >25ans ou nullipare , la fécondité (0 ou 1, >1 enfant), l’utilisation de la contraception orale et les habitudes tabagiques.

^c -le groupe témoin étant le groupe non exposé avec le génotype *Leu/Leu*.