

ESCALE : Rôle de l'environnement et des interactions gène–environnement dans le risque de leucémie de l'enfant - ANR SEST 2007

Jacqueline Clavel, coordinateur, INSERM U1018
Centre de recherche en Epidémiologie et Santé des Populations

L'enquête ESCALE est une étude cas-témoins nationale en population générale, réalisée en 2003-2004 avec 3 objectifs principaux:

- Etudier l'association entre les leucémies de l'enfant et (1) *l'environnement* de l'enfant in utero ou au cours de l'enfance (tabac, expositions professionnelles parentales, expositions domestiques aux pesticides, histoire résidentielle complète pouvant être reliée à des expositions connues géographiquement comme le radon résidentiel...), (2) ses *antécédents infectieux* in utero et au cours de la petite enfance (fréquence des infections banales dans la première année) et son mode de garde, (3) ses *antécédents familiaux* de cancer, de malformations congénitales et de maladies auto-immunes.
- Identifier des *facteurs de prédisposition génétique* pouvant moduler le rôle de ces facteurs, notamment les polymorphismes des gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des xénobiotiques, dans la réparation de l'ADN, dans la réponse immunitaire, et dans le développement. Des travaux méthodologiques collaboratifs sont engagés avec d'autres équipes pour faire face aux difficultés liées à la multiplicité des gènes étudiés et aux liens structures et/ ou fonctionnels entre gènes.
- Etudier les *interactions* entre ces ensembles de polymorphismes et les facteurs environnementaux.

1. Rappel de la méthodologie utilisée

1.1 Echantillonnage

Les cas éligibles de l'étude ESCALE étaient tous les nouveaux cas de leucémie (LA), de lymphome hodgkinien (LH) ou non hodgkinien (LNH), de tumeur cérébrale (TC) et de neuroblastome (NB) survenus en 2003 et 2004 chez des enfants de moins de 15 ans résidant en France métropolitaine. L'identification des cas s'est faite par recherche active dans l'ensemble des unités d'oncologie pédiatrique de France métropolitaine, en s'appuyant sur le réseau d'enquêteurs des registres nationaux – Registre National des Hémopathies malignes de l'Enfant (RNHE) et Registre National des Tumeurs Solides de l'Enfant (RNTSE) – et sur les équipes d'oncologie pédiatrique elles-mêmes. Les cas décédés ou en soins palliatifs n'étaient pas éligibles, de même que les cas adoptés ou dont la mère biologique n'étaient pas accessibles pour l'interview parce que décédée, atteinte de trouble psychiatrique grave, ou simplement non francophone.

Les *témoins* étaient des enfants de même âge et même sexe en moyenne que les cas, échantillonnés en population générale sur la base de l'annuaire téléphonique. La stratification assurait également la représentativité de l'échantillon par rapport à la population de moins de 15 ans en termes de nombre d'enfants du foyer. La répartition âge, sexe, et taille du foyer était assurée par quotas. Les tranches d'âge retenues pour la stratification étaient de 1 an avant l'âge de 6 ans, de 2 ans au delà. Comme les cas, les enfants adoptés ou dont la mère biologique n'était pas accessible pour l'interview parce que décédée, atteinte de trouble psychiatrique grave, ou simplement non francophone n'étaient pas éligibles comme témoins.

1.2 Recueil de données

Interview

Les mères des cas et des témoins ont été interrogées par téléphone, de façon anonyme, par des enquêteurs expérimentés et spécialement formés à l'étude. Chez les cas, l'interview, soumise au consentement des mères mais également à celui des médecins, se faisait environ 2 mois après le diagnostic pour que les mères aient eu le temps de redevenir accessibles après le choc du diagnostic tout en réduisant au maximum une sélection par la survie.

L'interview durait en moyenne 40 mn. Le questionnaire, standardisé et informatisé pour l'utilisation téléphonique, était identique pour les cas et les témoins. Il comportait des questions sur les antécédents médicaux de l'enfant (infections, vaccinations, allergies, anomalies chromosomiques, médicaments), son histoire résidentielle (communes habitées, entreprises mitoyennes), son environnement (animaux, cultures, utilisation de pesticides à la maison ou autour en cas d'environnement agricole, activités de loisirs à la maison) et son mode de vie (mode de garde, loisirs, téléphones portables). Il portait également sur l'histoire professionnelle des parents, sur les expositions maternelles notamment aux radiations ionisantes, aux solvants organiques et aux pesticides avant et pendant la grossesse, et sur les antécédents familiaux de cancer, d'allergie et de maladie auto-immune.

Matériel biologique

Le recueil de données comportait également un prélèvement de matériel biologique, sous réserve du consentement signé des 2 parents. Pour les cas, il s'agissait d'un tube supplémentaire de 5 ml recueilli au cours de la prise de sang réalisée en rémission ou environ 2 mois après le diagnostic et d'un prélèvement de cellules buccales des parents. Pour les témoins, il s'agissait de salive recueillie par les parents par écouvillonnage buccal (4 brochettes par sujet). Le prélèvement était proposé aux parents des cas par le médecin lors de la présentation de l'enquête. Le refus de prélèvement n'empêchait pas l'inclusion dans l'enquête. Les prélèvements étaient pris en charge par le Centre de Ressources Biologiques de la Faculté de Médecine des Saints Pères (Inserm U775) à l'aveugle du statut cas ou témoin.

Aspects réglementaires

Le protocole a reçu l'avis favorable de la CNIL (n° 902162) et du CCPPRB de Bicêtre (n°03-08).

2. Données génétiques

Génotypages

Le génotypage génome entier des cas de leucémie et de lymphome a été réalisé par le CNG (Illumina human CNV370K QUAD). Le génotypage des témoins a été réalisé par Intégragen sur une puce à façon Illumina a permis d'analyser le statut d'environ 5000 SNPs situés dans des gènes d'intérêt chez les témoins. Pour s'assurer de la comparabilité des deux méthodes, 96 cas ont été re-génotypés avec la puce utilisée pour les témoins. Une concordance parfaite a été constatée entre les génotypages réalisés avec les deux méthodes.

Imputations des SNPs d'intérêt non génotypés

Les génotypes des SNPs d'intérêt non disponibles après le génotypage ont été imputés à l'aide du logiciel IMPUTE (version 2), étaient basées sur l'information des SNPs génotypés situés

dans le gène d'intérêt et dans les 100 000 paires de bases de part et d'autre de ce gène, et sur les données des bases *HapMap* (n° 28) et *1000 Genome* pour les individus d'ascendance d'Europe du Nord et de l'Ouest (CEU). Un génotype imputé n'était affecté à un individu que lorsque ce génotype avait une probabilité supérieure ou égale à 0,90 à l'issue de l'algorithme d'imputation.

3. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée par régression logistique ajustée sur les variables de stratification âge et sexe, et sur les facteurs de confusion potentiels (catégorie sociale, rang de naissance, habitat). Les analyses par sous-groupes ont été réalisées par régression polytomique. Les analyses de GWAS ont été réalisées au seuil de 10^{-7} . Des analyses de sensibilité ont été réalisées pour estimer l'impact des valeurs manquantes et des sélections éventuelles.

4. Résultats

L'enquête ESCALE a inclus 1454 cas incidents de moins de 15 ans atteints de LA (n=764), lymphome hodgkinien (n=128), lymphome non hodgkinien (n=194), neuroblastome (191) ou tumeur cérébrale maligne (n=209), et 1681 témoins de population générale de mêmes âge et sexe en moyenne. Les résultats présentés concernent les leucémies de l'enfant (table 1).

- Les infections banales précoces, un rang de naissance élevé, le fait d'être gardé en crèche, l'allaitement maternel étaient négativement associées aux leucémies de l'enfant, résultats qui renforcent l'hypothèse hygiéniste de Greaves (Rudant et al, 2010). Les antécédents vaccinaux, en revanche, étaient rigoureusement comparables entre cas et témoins (Mallol-Mesnard et al, 2007).
- Nous avons mis en évidence une association nette entre la manipulation d'insecticides par la mère pendant la grossesse et le risque de leucémie de l'enfant, qui renforce les doutes soulevés par la littérature et en particulier nos précédents travaux (Rudant et al, 2007).
- Les stations-service sont une source d'exposition environnementale au benzène. Comme dans notre précédente enquête, nous avons observé un lien entre leucémie de l'enfant et présence mitoyenne d'une station-service, source potentielle d'exposition au benzène (Brosselin et al, 2009).
- Nous avons localisé les dernières résidences par rapport aux routes et à la carte des concentrations mesurées de NO₂ et observé un lien entre leucémie de l'enfant et différents indicateurs de trafic routier, également source potentielle d'exposition au benzène (Amigou et al, 2011).
- Nous n'avons pas observé d'association entre la consommation maternelle de tabac pendant la grossesse et le risque de leucémie, ce qui est cohérent avec l'ensemble de la littérature, mais nous observons en revanche une association avec la consommation paternelle préconceptionnelle (Rudant et al, 2008).
- Nous n'avons pas mis en évidence d'interactions entre consommation de tabac maternelle et des gènes impliqués dans le métabolisme du benzène (*CYP2E1*, *EPHX1* et *NQO1*), des amines aromatiques (*NAT2*) et des hydrocarbures polycycliques aromatiques (*CYP1A1* et *NQO1*), mais certains polymorphismes (*NAT2*5*, combinaison *CYP2E1*5* et *EPHX1* 'slow') étaient plus fréquents chez les cas que chez les témoins (Bonaventure et al, 2011).

- Enfin, la supplémentation maternelle en folates pendant la grossesse était négativement associée aux leucémies, et cet effet compensait l'effet potentiellement délétère des polymorphismes de *MTHFR* et *MTRR* (Amigou et al, soumis).
- Enfin, contrairement à nos études précédentes, Escale n'a pas montré de lien avec les antécédents familiaux (Rudant et al, 2007). L'analyse génome entier confirme notamment le lien fort déjà publié entre LA lymphoblastiques et des SNPs situés dans *IKZF1* et *ARID5B* (Orsi, Rudant et al, soumis).

Table 1 : Extrait des principaux résultats de l'enquête ESCALE sur l'étiologie des leucémies de l'enfant

	OR	IC95%
Infections banales précoces (Rudant et al 2010)		
Isolement relatif		
ainé, ni infections répétées ni crèche	1,0	Réf.
ainé, infections répétées ou crèche	0,8	[0,6-1,0]
≥2ème né, ni infections répétées ni crèche	0,7	[0,6-0,9]
≥2ème né, infections répétées ou crèche	0,5	[0,4-0,7]
Allaitement		
< 6 mois		
≥ 6 mois	0,7	[0,5-1,0]
Utilisation maternelle de pesticides (Rudant et al 2008)		
Utilisation domestique pendant la grossesse		
Pesticides	2,2	[1,8-2,6]
Insecticides	2,1	[1,7-2,5]
Herbicides	1,5	[1,0-2,2]
Fongicides	0,9	[0,5-1,7]
Utilisation professionnelle pendant la grossesse		
Agricultrices	0,2	[0,1-0,8]
Pesticides	1,2	[0,7-2,0]
Exposition au trafic routier (Amigou et al, 2011)		
Proximité des axes routiers		
Nulle	1,0	Réf.
Faible	1,1	[0,9-1,4]
Intermédiaire	1,2	[0,8-1,8]
Elevée	2,0	[1,0-3,6]
Densité en axes routiers dans un rayon de 500 m		
Nulle	1,0	Réf.
Faible	1,1	[0,9-1,4]
Intermédiaire	1,3	[0,8-2,0]
Elevée	2,2	[1,1-4,2]
Concentration en NO2		
< 21,9 µg/m3	1,0	Réf.
21,9 - 27,7 µg/m3	1,3	[1,0-1,6]
≥ 27,7 µg/m3	1,2	[1,0-1,5]
Proximité de stations-service (Brosselin et al, 2008)		
Garage ou station-service (oui vs. non)	1,6	[1,9-2,3]
Garage (oui vs. non)	1,4	[0,9-2,1]
Station-service (oui vs. non)	1,9	[1,2-3,0]

Au total, ESCALE a contribué et contribuera encore à une meilleure connaissance des facteurs environnementaux et génétiques des cancers de l'enfant et en particulier des leucémies. Elle constitue également un partenaire important du consortium international CLIC sur les leucémies de l'enfant.

Publications

Rudant J, Menegaux F, Leverger G, Baruchel A, Nelken B, Bertrand Y, Patte C, Pacquement H, Verite C, Robert A, Michel G, Margueritte G, Gandemer V, Hemon D, Clavel J. Household exposure to pesticides and risk of childhood hematopoietic malignancies: The ESCALE study (SFCE). *Environ Health Perspect* 2007b;115(12):1787-93.

Rudant J, Menegaux F, Leverger G, Baruchel A, Nelken B, Bertrand Y, Hartmann O, Pacquement H, Vérité C, Robert A, Michel G, Margueritte G, Gandemer V, Hémon D, Clavel J. Family history of cancer in children with acute leukemia, Hodgkin's lymphoma or non-hodgkin's lymphoma: The ESCALE study (SFCE). *Int J Cancer* 2007a;121(1):119-26.

Mallol-Mesnard N, Menegaux F, Auvrignon A, Auclerc MF, Bertrand Y, Nelken B, Robert A, Michel G, Margueritte G, Perel Y, Méchinaud F, Bordigoni P, Leverger G, Baruchel A, Hémon D, Clavel J. Vaccination and the risk of childhood acute leukaemia: The ESCALE study (SFCE). *Int J Epidemiol* 2007;36(1):110-6.

Rudant J, Menegaux F, Leverger G, Baruchel A, Lambilliotte A, Bertrand Y, Patte C, Pacquement H, Verite C, Robert A, Michel G, Margueritte G, Gandemer V, Hemon D, Clavel J. Childhood hematopoietic malignancies and parental use of tobacco and alcohol: The ESCALE study (SFCE). *Cancer Causes Control* 2008a.

Rudant J, Menegaux F, Leverger G, Baruchel A, Lambilliotte A, Bertrand Y, Patte C, Pacquement H, Vérité C, Robert A, Michel G, Margueritte G, Gandemer V, Hémon D, Clavel J. Childhood hematopoietic malignancies and parental use of tobacco and alcohol: The ESCALE study (SFCE). *Cancer Causes Control* 2008b;19(10):1277-90.

Mallol-Mesnard N, Menegaux F, Lacour B, Hartmann O, Frappaz D, Doz F, Bertozzi AI, Chastagner P, Hémon D, Clavel J. Birth characteristics and childhood malignant central nervous system tumors: The ESCALE study (French society for childhood cancer). *Cancer Detect Prev* 2008;32(1):79-86.

Plichart M, Menegaux F, Lacour B, Hartmann O, Frappaz D, Doz F, Bertozzi AI, Defaschelles AS, Pierre-Kahn A, Icher C, Chastagner P, Plantaz D, Rialland X, Hémon D, Clavel J. Parental smoking, maternal alcohol, coffee and tea consumption during pregnancy and childhood malignant central nervous system tumours: The ESCALE study (SFCE). *Eur J Cancer Prev* 2008;17(4):376-83.

Munzer C, Menegaux F, Lacour B, Valteau-Couanet D, Michon J, Coze C, Bergeron C, Auvrignon A, Bernard F, Thomas C, Vannier JP, Kanold J, Rubie H, Hémon D, Clavel J. Birth-Related characteristics, congenital malformation, maternal reproductive history and neuroblastoma: The ESCALE study (SFCE). *Int J Cancer* 2008;122(10):2315-21.

Brosselin P, Rudant J, Orsi L, Leverger G, Baruchel A, Bertrand Y, Nelken B, Robert A, Michel G, Margueritte G, Perel Y, Mechinaud F, Bordigoni P, Hémon D, Clavel J. Acute childhood leukaemia and residence next to petrol stations and automotive repair garages: The ESCALE study (SFCE). *Occup Environ Med* 2009;66(9):598-606.

Rudant J, Orsi L, Menegaux F, Petit A, Baruchel A, Bertrand Y, Lambilliotte A, Robert A, Michel G, Margueritte G, Tandonnet J, Mechinaud F, Bordigoni P, Hémon D, Clavel J. Childhood acute leukemia, early common infections, and allergy: The ESCALE study. *Am J Epidemiol* 2010;172(9):1015-27.

Rudant J, Orsi L, Monnereau A, Patte C, Pacquement H, Landman-Parker J, Bergeron C, Robert A, Michel G, Lambilliotte A, Aladjidi N, Gandemer V, Lutz P, Margueritte G, Plantaz D, Méchinaud F, Hémon D, Clavel J. Childhood hodgkin's lymphoma, non-hodgkin's lymphoma and factors related to the immune system: The escale study (SFCE). *Int J Cancer* 2010.

Bonaventure A, Goujon-Bellec S, Rudant J, Orsi L, Leverger G, Baruchel A, Bertrand Y, Nelken B, Pasquet M, Michel G, Sirvent N, Bordigoni P, Ducassou S, Rialland X, Zelenika D, Hémon D, Clavel J. Maternal smoking during pregnancy, genetic polymorphisms of metabolic enzymes, and childhood acute leukemia: The ESCALE study (SFCE). *Cancer Causes Control* 2011.

Amigou A, Sermage-Faure C, Orsi L, Leverger G, Baruchel A, Bertrand Y, Nelken B, Robert A, Michel G, Margueritte G, Perel Y, Mechinaud F, Bordigoni P, Hémon D, Clavel J. Road traffic and childhood leukemia: The ESCALE study (SFCE). *Environ Health Perspect* 2011;119(4):566-72.

Co-financements

