

Prévention du carcinome rénal : l'approche nutriginétique

par Claudine Junien*, Jean-Marie Dupret, Catherine Gallou, Sandrine Longuemaux, Stéphane Richard, Céline Saquet, Rajagopal Krishnamoorthy, Claudine Delomenie, Dominique Droz, Raymonde Bouvier, Dominique Chauveau, Dominique Joly, Jean-Pierre Grunfeld, Yves Chretien, Arnaud Mejean, Christophe Beroud

*Inserm Unité de Recherche 383 « Génétique, Chromosome et Cancer », Groupe Hospitalier Necker Enfants Malades, 149 Rue de Sèvres 75743 Paris cedex 15.

Reçu le 10 mars 2000

RÉSUMÉ

La fréquence du cancer du rein (RCC), 3 % des cancers humains, augmente dans les pays industrialisés, laissant supposer l'intervention de facteurs toxiques (xénobiotiques et/ou alimentation, trichloréthylène, tabagisme et obésité). Le RCC survient le plus souvent sous forme sporadique mais est également retrouvé dans un contexte familial : la maladie de von Hippel-Lindau (VHL). L'existence, d'une part, d'une grande hétérogénéité intra- et inter-familiale dans le contexte du VHL et, d'autre part, la susceptibilité variable à des carcinogènes chimiques dans les formes sporadiques, laisse supposer, en outre, la participation de gènes modificateurs conditionnels. Afin d'identifier des sous-groupes d'individus particulièrement exposés ou, au contraire, protégés du fait de certains génotypes, nous avons collecté une série de 460 tumeurs et de patients appartenant à 79 familles VHL et développé un outil informatique, l'« universal mutation database » (UMD) pour les mutations du gène VHL, permettant de rechercher des corrélations. Les mutations du gène VHL à l'origine à la fois des RCC sporadiques et de la maladie de VHL sont de nature différente : 1) dans les tumeurs sporadiques, 83 % des mutations du gène VHL sont des mutations aboutissant à un décalage du cadre de lecture (délétion, insertion, non-sens = « frameshift »). Les 17 % restant comprennent des transversions (3/4) et des transitions (1/4). Cette proportion élevée de transversions suggère fortement l'implication de substances carcinogènes (fumée de tabac) dont l'impact est largement conditionné par la variabilité génétique de l'activité des enzymes de biotransformation ;

2) pour les formes familiales, les mutations de type faux sens prédominent dans 65 % des cas. Cette différence permet de définir un facteur pronostique de développer un RCC pour les patients VHL en fonction de la nature de la mutation germinale dont ils sont porteurs. Afin de repérer les génotypes conférant un risque élevé en présence de substances potentiellement carcinogènes, nous avons établi le génotype des patients pour 8 gènes (une cinquantaine de génotypes) impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques. Cette étude fait apparaître une relation significative entre le développement d'un RCC et des combinaisons d'allèles comprenant : CYP1A1 (« variant »), NAT2 et NAT1 (acétylateurs lents) et GSTM1 (allèle nul). D'éventuelles associations entre les génotypes « à risque » et le profil des mutations somatiques observées chez les patients, mais aussi à différents stades tumoraux, pourraient aider à 1) préciser la nature de certains profils de mutagenèse en relation avec l'activité ou la déficience de telle ou telle enzyme du métabolisme des xénobiotiques et sous l'effet de tel ou tel carcinogène ; 2) montrer que, dans le contexte du VHL, certaines combinaisons d'allèles de ces différents gènes confèrent un risque particulier de développer certains types de tumeur. Ainsi, suivre « à la trace » des substances potentiellement carcinogènes, à la fois par l'empreinte laissée au niveau de l'ADN, ainsi qu'à travers les allèles conditionnellement délétères de gènes participant à leur détoxification, devrait permettre une meilleure prévention grâce à une alimentation personnalisée pour les individus présentant ces génotypes.

SUMMARY Renal cell carcinoma prevention: a nutrigenetic approach

The development of renal cell carcinoma (RCC) has been associated with both genetic and environmental factors, with somatic and germline mutations in the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene and with tobacco smoking, obesity, long term

exposure to some nutrients, pollutants, and industrial solvents such as trichloroethylene. Intra and inter-familial variability of expression of germline mutations in the VHL gene and variable susceptibility to carcinogens in the sporadic forms strongly suggest

the involvement of conditional modifier genes. In order to identify sub groups of individuals at increased risk because of susceptibility genotypes, we have collected a series of 460 patients who developed an RCC and 79 families with the von Hippel Lindau disease. To collect clinical and mutational data for correlation analysis we have developed a unique tool the Universal Mutation Database. Comparison of the spectrum of germline and somatic mutations in the VHL gene showed that : 1) in sporadic RCC mutations lead more often to truncated proteins (83 %), while the remaining mutations (17 %), include 3/4 of transversions and 1/4 of transitions. This high proportion of transversions supports the involvement of carcinogens the impact of which is conditioned by the genetic variability of xenobiotic metabolizing enzymes ; 2) whereas in familial cases missense mutations are more common ; this difference allowed us to define a prognostic factor for the occurrence of RCC in a VHL context. In order to

look for genotypes conferring a higher risk we genotyped the RCC patients for 8 different genes (50 genotypes). A significant relationship was observed for several combinations of alleles including CYP1A1 ("variant"), NAT2 and NAT1 (slow) and GSTM1 (null allele). Associations between specific mutational profiles and at risk genotypes at different tumoral stages should allow us to : 1) define more precisely the nature of specific patterns of mutations in relation with the deficiency or overexpression of such or such enzymes in presence of particular carcinogens ; 2) demonstrate that certain combinations of genotypes confer a particular risk to develop a specific type of tumor in VHL patients. Thus tracking of potentially carcinogenic substances, through their footprints and through identification of conditionally detrimental genotypes of genes participating in their detoxification should permit a better prevention through an appropriate nutrition adapted to each individual.

Un individu sur quatre a fait ou fera un cancer. Première cause de mortalité, le cancer n'est pourtant pas nécessairement inéluctable. On estime que le mode de vie, certains facteurs environnementaux, l'alcool et le tabac, ainsi que l'ensemble des aliments sont responsables de 75 à 90 % des cancers. Si l'on renonçait au tabac, 30 % des cancers pourraient être évités. A lui seul, le régime alimentaire contribuerait au développement d'un tiers des cancers. Par ailleurs les différences d'incidence (20 fois) pour le cancer du côlon à travers le monde et surtout le fait que les populations migrantes atteignent très rapidement l'incidence du pays hôte soulignent le rôle majeur des facteurs de l'environnement (McMichael & Giles, 1988). De plus, l'allongement de l'espérance de vie augmentera le risque de survenue d'un cancer, puisque l'âge est un des principaux facteurs de risque.

Pourtant nous ne sommes pas égaux vis-à-vis de ces risques. La notion de l'existence, chez certains, d'altérations de gènes responsables d'intolérance aux nutriments n'est pas nouvelle. Ainsi les Grecs savaient déjà que certains d'entre eux, lorsqu'ils mangeaient des fèves, pouvaient souffrir d'ictères hémolytiques très sévères. Les disciples de Pythagore, redoutant ce risque, ou obéissant à un rituel, ne préféreraient-ils pas "affronter une armée de Crotoniates plutôt que de traverser un champ de fèves" ? Pendant la deuxième guerre mondiale, l'armée américaine a constaté que des soldats noirs faisaient le même type d'accident hémolytique avec un antipaludéen, la primaquine. Bien qu'il n'y ait en apparence pas de lien entre la fève et la primaquine, le gène coupable est le même. Il s'agit d'un gène codant pour une enzyme identifiée au début des années 60, la G6PD (glucose-6-phosphate déshydrogénase), qui participe au métabolisme du glucose. Certains Africains, Grecs ou Asiatiques, en tout 400 millions d'individus dans le monde, sont porteurs

d'une forme variante de ce gène. Cet exemple souligne le lien entre un aliment, la fève, et une catégorie de médicaments comme la primaquine : une même voie métabolique est impliquée.

GÈNES DE PRÉDISPOSITION, GENES DE SUSCEPTIBILITÉ ET GENES MODIFICATEURS

Si l'impact du terrain génétique est assez bien cerné aujourd'hui pour les formes familiales à transmission mendélienne classique et les gènes de prédisposition, il l'est beaucoup moins bien pour les formes sporadiques et les gènes de susceptibilité qui participent de manière cumulative mais avec un poids relatif variable aux formes polygéniques. Par ailleurs des gènes modificateurs, sans être responsables de la maladie elle-même, peuvent précipiter ou venir contrecarrer le processus tumorigène grâce à des allèles aggravants ou protecteurs. En effet ces allèles sont distribués de la même façon chez les sujets indemnes de la maladie. En revanche, chez les sujets malades, les polymorphismes de ces gènes sont capables de moduler la précocité d'apparition, la gravité ou l'expression de sous-types particuliers de la maladie. Les conséquences physiologiques peuvent n'apparaître que lorsque la fonction du gène modificateur devient critique pour compenser la maladie ou permettre la réponse adéquate au substrat endogène ou à un médicament.

Classiquement, on avait l'habitude de distinguer d'un côté les maladies génétiques mendéliennes, mais rares, qui dépendent de l'effet d'un seul gène et sont appelées monogéniques et, de l'autre côté, la vaste majorité des pathologies qui sont toutes polyfactorielles, impliquant à

la fois des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux. En fait, même pour certaines des maladies monogéniques (cf G6PD et fèves), l'intervention de facteurs modificateurs autres que génétiques joue certainement un rôle. La variabilité d'expression des maladies monogéniques tend à faire disparaître les frontières du modèle à deux catégories de maladies pour lui préférer une notion de continuum dans lequel la part de la composante environnementale sera négligeable, intermédiaire ou au contraire très importante, voire déterminante (Beaudet, 1998).

UN FACTEUR ENVIRONNEMENTAL CLÉ MAIS DÉLICAT À CERNER : L'ALIMENTATION

Les données de la littérature au cours des 20 dernières années ont tenté de faire apparaître des relations entre un type d'aliments et un risque particulier comme, par exemple, une alimentation riche en lipides et le risque d'affections cardiovasculaires. Mais très peu d'entre-elles se sont attachées à déterminer des sous-groupes d'individus particulièrement exposés ou au contraire protégés du fait de certains génotypes qui rendent compte de la variabilité génétique individuelle. Bien que la corrélation avec une toxicité accrue ou un risque élevé de cancer ait été démontrée sans ambiguïté pour certains allèles des gènes impliqués dans le métabolisme et la réponse aux médicaments et aux aliments, les effets bénéfiques ont été moins bien explorés et la relation demeure encore incertaine pour d'autres.

À la lumière de travaux récents, il apparaît que les contradictions apparentes de certains rapports sont dues aux facteurs suivants, qui diminuent considérablement la puissance de ces études à révéler les facteurs de risque : 1) le fait que les étapes successives de la cancérogenèse sont exposées à des facteurs de risque différents ; 2) les importantes variabilités génétiques et culturelles inter-ethniques non prises en compte ; 3) le trop faible nombre de marqueurs génétiques pertinents étudiés (jusqu'à trois dans le meilleur des cas). En effet, du fait de la redondance des différentes voies métaboliques pour une même substance, et de possibles effets synergiques ou antagonistes, il est nécessaire d'explorer un ensemble de marqueurs génétiques (combinaison d'allèles) et non plus un seul ; 4) mais surtout l'absence de stratification des populations étudiées en fonction de leur fonds génétique. Ce fonds génétique comprend des gènes pouvant conférer effets protecteurs ou aggravants, avec d'une part, les gènes de prédisposition à certaines pathologies (cancer, affections cardio-vasculaires etc..) et, d'autre part, les gènes impliqués dans le métabolisme et la réponse aux médicaments et aux aliments.

Par analogie avec la pharmacogénétique qui étudie les variations héréditaires de la réponse aux médicaments, la "nutrigénétique" se consacre à l'étude des variations héréditaires de la réponse aux nutriments. Grâce à une alimentation adaptée, la nutrigenétique devrait permettre de contribuer à la prévention de certaines affections.

COMMENT APPRÉHENDER D'ÉVENTUELS GÈNES MODIFICATEURS ?

Le déficit en G6PD fournit encore un exemple particulièrement démonstratif. Pendant longtemps, l'ictère néonatal sévère du nouveau-né associé au déficit en G6PD, est resté un mystère. En effet, comment comprendre pourquoi, si deux frères ont la même mutation, l'un présentera un ictère néonatal sévère alors que l'autre sera simplement sensible à certains agents connus qu'il suffit d'éviter ? On vient de s'apercevoir que le gène modificateur est, chez certains nouveau-nés atteints de déficit en G6PD, une forme variante du gène de l'uridine diphospho glucuronate-glucuronosyl-transférase (UDPGT1). Cette mutation, sous sa forme homozygote est impliquée dans la maladie de Gilbert, une forme bénigne d'ictère non hémolytique chez l'adulte (Beutler *et al.*, 1995 ; Kaplan *et al.*, 1997).

Dans le cas des tumeurs, les facteurs modificateurs peuvent être des facteurs qui agissent directement sur la méthylation des îlots CpG de promoteurs, sur l'« editing » d'ARN comme celui des gènes WT1, NF1 et APOB, sur les modifications post transcriptionnelles comme la phosphorylation du produit du gène RB, de gènes de cycline ou de leurs inhibiteurs ou de phosphatases, ou bien interférant avec les interactions entre protéines au sein de complexes (produit du gène BRCA1). Les facteurs agissant de manière synergique au cours de processus apoptotique ou de prolifération comme les produits des gènes RB, P53, MYC. Les gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité de l'ADN, comme les différents gènes de réparation ou de réplication, peuvent, du fait de mutations chez certains individus, conférer une sensibilité particulière à certains agents génotoxiques (ataxie télangiectasie). De plus l'efficacité de réparation peut varier considérablement d'un sujet à l'autre (Houlston & Tomlinson, 1998).

L'INÉGALITÉ FACE AUX CARCINOGENÈSES

En cas de prédisposition à certains types de cancer, il est clair que la recherche des polymorphismes de gènes impliqués dans le métabolisme de substances carcinogènes (aliments, médicaments, xénobiotiques) est particulièrement pertinente, car de toute évidence, nous ne sommes pas égaux vis-à-vis des carcinogènes.

Une grande variabilité interindividuelle. On connaît la grande variabilité interindividuelle dans la réponse aux médicaments, due à des différences importantes d'un individu à l'autre dans la distribution, le métabolisme, le mode d'action et l'élimination des médicaments. Comme les médicaments, les aliments, bien qu'absorbés en plus faible dose mais de manière "chronique", sont soumis à différentes étapes enzymatiques de biotransformation. Les enzymes métabolisant les xénobiotiques (EMX) et leurs récepteurs (EMXR) sont impliqués dans la synthèse et la dégradation de toute substance non pepti-

dique. Ils interviennent dans des fonctions vitales critiques puisqu'ils ont tous des substances endogènes comme substrats naturels. Ils participent aux processus biologiques comme celui de la croissance, de l'apoptose, ou des fonctions neuroendocrines (Nebert, 1997).

Une machinerie complexe. Chaque type cellulaire, comme l'épithélium rénal, possède son propre jeu d'enzymes métabolisant les xénobiotiques et participant à la synthèse et à la dégradation de substances non peptidiques, et de récepteurs capables d'en moduler l'action. Toute substance pénétrant, par une voie quelconque, dans notre organisme subit des modifications chimiques pour la rendre hydrosoluble, l'activer métaboliquement, lors d'une première phase, puis, lors d'une deuxième phase, pour la conjuguer à certains radicaux permettant son élimination.

⇒ Les enzymes de phase I, assurent, par une réaction d'oxydo réduction, faisant le plus souvent intervenir un cytochrome P450, l'activation de substances hydrophobes. Alors que l'Homme possède environ 480 gènes de cytochromes P450, moins d'une dizaine d'entre eux (CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2C17, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, et CYP4A11) sont responsables du métabolisme de la grande majorité des médicaments.

⇒ Les enzymes de phase II, les acétyl-transférases NAT1 et NAT2 ; les glutathion transférases GST α , π , θ , μ ou les glucuronyl transférases UDPGT assurent l'élimination des composés activés en les conjuguant à des groupements hydrophiles (groupement acétyl, glutathion, glucuronyl...). On estime qu'environ trois-quarts des drogues ou substances chimiques de l'environnement sont toxiques sous leurs formes naturelles non métabolisées (isoniazide, dioxine), alors qu'un quart (acétaminophène et benzène) sont métabolisés sous la forme de substances intermédiaires plus toxiques ou mutagènes.

⇒ Les protéines de phase III, ou phase d'excrétion, correspondent à des transporteurs foie-bile. Les conjugués sont transportés à travers la membrane canaliculaire dans la bile par une glycoprotéine transmembranaire appelée "canalicular multidrug resistance protein" cMRP et par un transporteur ABC appelé "bile salt export pump" (BSEP) ou "sister of p-glycoprotein" (SPGP).

⇒ Enfin, au niveau des organes cibles, les récepteurs permettent de moduler l'action des substances ainsi façonnées pour leur permettre d'agir (exemple : récepteurs d'hormones stéroïdes ou récepteurs de substances mimétiques).

Une toxicité variable. La toxicité potentielle des différents métabolites dépendra de polymorphismes responsables de variations dans la vitesse d'action (métaboliseur lent ou rapide), ou de l'affinité pour le substrat des différentes enzymes impliquées. Si tout se passe bien, les substances sont détoxifiées puis éliminées. Pourtant certains intermédiaires peuvent avoir des effets toxiques, en altérant des macromolécules de notre organisme, l'ADN ou des protéines. En se fixant à l'ADN, ils sont alors responsables de mutations, d'altérations qui peuvent être à l'origine de cancers. En se fixant sur cer-

taines protéines, ils peuvent entraîner des réactions allergiques, ou transformer la protéine en substance toxique. La répartition des allèles lents ou rapides peut varier considérablement entre les individus et d'un groupe ethnique à l'autre. Chaque individu possède donc un assortiment unique d'allèles différents de gènes codant pour ces enzymes lents, rapides ou « normaux » (Smith *et al.*, 1995).

Les principales voies métaboliques conduisant à la formation de ces molécules réactives mettent en jeu, d'une part des réactions de N-oxydation, catalysées par les monooxygénases à cytochromes p450 (en particulier les isoformes IA1 et IA2) et, d'autre part, des réactions de N- et O-acétylation, et de N, O-transacétylation potentiellement catalysées par NAT1 et NAT2. La combinaison de ces activités enzymatiques induit l'apparition de composés acétoxyester instables, à l'origine des ions arylnitrenium. D'autres voies métaboliques pourraient également intervenir telles que celles de la cycloxygénase et des sulfotransférases. Ainsi, par la production de dérivés acétylés, les enzymes NAT1 et NAT2 participent globalement à la détoxification de certains xénobiotiques mais leur rôle activateur peut aussi constituer au moins localement au sein de certains tissus, une source d'apparition de molécules génotoxiques (Delomenie *et al.*, 1998).

LE CARCINOME RÉNAL

Épidémiologie. Le cancer du rein (RCC), qui représente environ 3 % des cancers humains (11^{ème} cancer en France), voit sa fréquence augmenter dans les pays industrialisés laissant supposer l'intervention de facteurs toxiques (xénobiotiques et/ou alimentation) (Godley & Escobar, 1998 ; Guignard *et al.*, 1990).

Génétique. Il survient le plus souvent sous forme sporadique mais est également retrouvé dans un contexte familial : la maladie de von Hippel-Lindau (VHL) (Richards *et al.*, 1995). Des mutations du gène VHL sont à l'origine à la fois des RCC sporadiques et de la maladie de VHL. L'existence, d'une part, d'une grande hétérogénéité intra- et inter-familiale dans le contexte du VHL et, d'autre part, la susceptibilité variable à des carcinogènes chimiques dans les formes sporadiques, laisse supposer, en outre, la participation de gènes modificateurs.

Maladie de von Hippel Lindau. Bien que la grande majorité des cas soient sporadiques, on retrouve 2 % des cas de RCC dans le contexte de la maladie de von Hippel Lindau qui se caractérise par une prédisposition à différentes tumeurs touchant essentiellement le système nerveux central et la rétine ainsi que le rein, les surrénales et le pancréas (carcinome rénal, phéochromocytome et hémangioblastome). Malgré l'existence de corrélations génotype/phénotype pour certaines affections génétiques, l'expressivité variable de certaines affections monogé-

niques demeure inexpliquée. L'hétérogénéité clinique observée, tant au niveau intra-familial qu'inter-familial, laisse supposer que l'effet d'une mutation germinale donnée du gène VHL est modulée par le contexte génétique de l'individu. Cette notion est aujourd'hui assimilée à celle de l'existence de gènes modificateurs. A terme, l'identification de tels gènes modificateurs devrait permettre de comprendre pourquoi, avec la même mutation du gène VHL certains individus développent une tumeur à 20 ans et d'autres à 60 ans, un carcinome rénal, un phéochromocytome, ou un hémangioblastome (Richards *et al.*, 1995)!

Formes sporadiques multifactorielles. Par ailleurs, on suppose que 5 à 10 % de cas, aux critères familiaux incomplets, correspondent à des formes multifactorielles impliquant à la fois des facteurs de susceptibilité génétique et des facteurs environnementaux. Il n'existe donc pas de frontières strictes entre les formes familiales monogéniques et les formes sporadiques. A côté des facteurs génétiques bien connus, il est néanmoins évident que de nombreux facteurs d'environnement, interagissant avec le fond génétique de l'individu, sont impliqués aussi bien dans les formes héréditaires que dans les formes sporadiques.

CANCER RÉNAL ET ALIMENTATION

Le tabagisme et l'obésité constituent des facteurs de risque les mieux connus dans la survenue des formes sporadiques de CCR. D'autres facteurs ont également été décrits comme l'exposition à des produits toxiques (produits pétroliers, amiante, solvants comme le trichloréthylène) ainsi qu'à certains médicaments (antihypertenseurs). Dans ce contexte, l'intervention de molécules environnementales (xénobiotiques) de type précancérigène peut être envisagée lors de l'initiation du processus tumoral. Cependant la littérature sur le sujet ne permet pas toujours de distinguer les effets positifs des effets négatifs tant les modalités des études diffèrent. Les résultats disponibles proviennent essentiellement des États-Unis où le régime alimentaire est très différent de celui de la France. L'absence de stratification des individus en fonction de leur patrimoine génétique et le faible nombre de paramètres testés (types d'aliment, pratiques alimentaires et gènes) ou leur hétérogénéité d'une étude à l'autre, expliquent le manque de puissance de la majorité des nombreuses études réalisées à ce jour.

Facteurs protecteurs, facteurs délétères. Il semble que la consommation de légumes, de poisson, du lait, des œufs, des céréales, du thé, des sodas ou des graisses n'augmentent pas le risque. L'effet protecteur des fruits et des légumes n'apparaît que chez les non fumeurs. On note également, mais uniquement chez les femmes, un effet protecteur du vin rouge. En réalité l'effet apparemment protecteur de l'alcool observé chez la femme est considéré comme dû au hasard. Le tabac multiplie le

risque par deux. En revanche l'excès calorique, le tabac, le café, l'obésité, l'hypertension, mais aussi l'utilisation de diurétiques, l'exposition aux dérivés de l'amiante ou du pétrole, la consommation fréquente de viande rouge ou de volaille sautée ou grillée semblent s'accompagner d'une augmentation du risque. Les agrumes, la vitamine C, le β carotène et l' α tocophérol auraient un effet protecteur chez les non fumeurs uniquement (Godley & Escobar, 1998). La carence en vitamine E et en tocophérol augmente le risque (McLaughlin *et al.*, 1995; Wolk *et al.*, 1996).

La viande rouge. Le rôle délétère de la viande rouge, bien que hautement probable, doit être confirmé. La susceptibilité aux effets carcinogènes des amines polycycliques aromatiques qui sont formées au cours de la cuisson de la viande à des degrés variables, dépend de nombreux paramètres. Elle peut dépendre à la fois du mode de cuisson mais aussi des taux relatifs de N-acétylation et de N-hydroxylation dans le foie, de la voie d'excrétion des métabolites et éventuellement des taux d'hydrolyse par le glucuronide et de l'activation par la N-acétyl transférase (NAT) dans le tissu cible. Les acétylateurs lents ont un risque plus faible de cancer colorectal (CCR) mais un risque plus élevé de cancer du rein (Longo *et al.*, 1999), de cancer de la vessie, en association avec, à la fois, la cigarette et l'exposition aux arylamines (Brockmüller *et al.*, 1996). Une consommation importante de protéines semble également prédisposer au RCC (Chow *et al.*, 1994). Plusieurs études ont associé obésité, apport calorique excessif ou l'absence d'activité physique à un risque accru de RCC, aussi bien pour l'homme que pour la femme (Mellemegaard *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1986).

Les fruits et légumes. Les résultats des études épidémiologiques concernant les fruits et légumes ne sont pas toujours convergents. En effet la significativité des effets positifs varie selon le type de légumes, de fruits ou selon le mode de préparation. Un faible apport en folates, et particulièrement s'il est concomitant d'une consommation élevée d'alcool, est associé à un risque augmenté de cancer. La diminution de l'apport en folates se traduit par une réduction de la disponibilité des groupements méthyl nécessaires à la méthylation de l'ADN. Or une hypométhylation globale de l'ADN est fréquemment observée dans certains types de cancer. L'hypométhylation peut aboutir à une instabilité génomique (Chen *et al.*, 1998) et/ou à une expression incontrôlée d'oncogènes ou de gènes de résistance aux médicaments (Kantharidis *et al.*, 1997). D'autre part, plusieurs études montrent que les carcinogènes se fixent préférentiellement au niveau des dinucléotides CpG méthylés, en particulier au niveau du gène p53, expliquant ainsi certains "hot spots" de mutation dans ce gène (Chen *et al.*, 1998). Par ailleurs, une mutation fréquente (677C→T) de la MTHFR (méthylène-tétrahydrofolate réductase), présente à l'état homozygote chez 15 % des individus, diminue l'activité de l'enzyme et aboutit à des taux bas de 5-méthyl THF et à une élévation des taux plasmatiques d'homocystéine.

Cette mutation est associée à un risque élevé de maladie cardio-vasculaire et de défauts du tube neural. Une étude récente a montré que cette mutation réduit par un facteur 8 le risque du cancer du côlon, probablement en augmentant les taux de 5,10-méthyltétrahydrofolate disponibles pour la synthèse d'ADN. En revanche, un faible apport en folates, ou une consommation élevée d'alcool annulent cet effet protecteur (Ma *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 1997). De plus, l'alcool, en tant qu'antagoniste des groupes méthyl pourrait être responsable d'un déséquilibre de la méthylation de l'ADN, modification épigénétique fréquente dans le cancer du côlon et retrouvée au niveau de gènes soumis à empreinte (Bailey & Gregory, 1999; Cui *et al.*, 1988; Feinberg & Vogelstein, 1983).

L'ÉPIDÉMIOLOGIE MOLÉCULAIRE ENTRE EN SCÈNE

Dans le cas des tumeurs, une première stratégie basée sur la connaissance des facteurs de risque connus (tabac, alcool, solvants etc...) consiste à identifier les génotypes à risque ou de moins bon pronostic favorisant la toxicité ou le pouvoir cancérogène de substances toxiques, de médicaments et de nutriments. Il s'agit de repérer des génotypes conférant une susceptibilité particulière (ou une protection) vis-à-vis de certains aliments (ou autres xénobiotiques) dans le contexte du RCC. Une distribution allélique différente de celles des témoins désigne alors un candidat possible. Une autre stratégie parallèle consiste à caractériser dans un premier temps les mutations présentes dans les tumeurs. Dans un deuxième temps, à partir du spectre des mutations retrouvées, et grâce à la connaissance des carcinogènes responsables de tel ou tel type de mutation, en quelque sorte une "empreinte" laissée par un carcinogène, il est possible de suspecter certains gènes participant au métabolisme de ces substances. On peut alors génotyper les patients pour les polymorphismes connus de ces gènes. Si l'hypothèse est correcte, les patients porteurs de telle mutation, signature moléculaire de tel ou tel carcinogène, devraient montrer des fréquences alléliques différentes de celles de la population témoin. Enfin la troisième démarche consiste à identifier les médicaments, les substances de l'environnement et les nutriments en cause. Le but ultime étant d'adapter l'alimentation des sujets à risque de manière appropriée et personnalisée en proscrivant certaines substances aggravantes ou en la complétant à l'aide d'aliments ou de médicaments capables d'activer ou d'inhiber certaines enzymes génétiquement mal adaptées dans ce contexte (Fig. 1).

LES MUTATIONS CONSTITUTIONNELLES ET SOMATIQUES DU GÈNE VHL

Environ 2 % des RCC apparaissent dans le cadre d'une maladie de von Hippel Lindau (prédisposition au carcinome rénal, hémangioblastome, phéochromocyt-

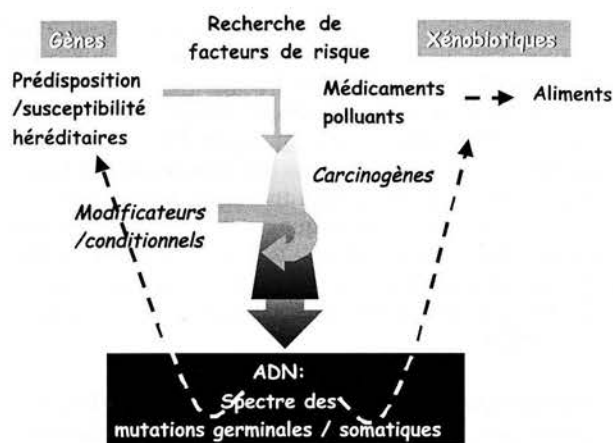


FIG. 1. – Identification de xénobiotiques et de gènes suspects à partir de l'empreinte laissée sur l'ADN.

tome) avec une mutation constitutionnelle dans le gène VHL. La plupart des carcinomes rénaux sporadiques montrent une mutation somatique du gène VHL ainsi qu'une perte de l'allèle normal. Afin d'identifier les facteurs génétiques impliqués dans le développement des RCC, nous avons collecté la plus grande série de prélèvements provenant de sujets atteints de carcinome rénal. Cette série comprend d'une part 460 couples de RCC sporadiques/rein normal et, d'autre part, des individus sains et atteints provenant de 79 familles atteintes de la maladie de von Hippel Lindau (VHL).

Dans un premier temps, nous avons recherché l'existence d'un facteur pronostique. Pour cela des pertes d'allèles des chromosomes 5, 8, 14, 17, 18 et Y ont été recherchées dans une série de 150 tumeurs. Nous avons pu montrer que la perte du chromosome 14 est liée aux facteurs de mauvais pronostic.

Parallèlement, nous avons pu identifier une mutation dans 50 % des tumeurs, associée à une perte de l'allèle normal (LOH) dans 90 % des cas. Dans les tumeurs sporadiques, 83 % des mutations du gène VHL sont des mutations aboutissant à un décalage du cadre de lecture (délétion, insertion, non-sens = frameshift). Les faux-sens comprennent des transversions (3/4) et des transitions (1/4) (Fig. 2). Cette proportion élevée de transversions suggère fortement l'implication de substances carcinogènes (fumée de tabac) dont l'impact est largement conditionné par la variabilité génétique de l'activité des enzymes de biotransformation. Les mutations de type transversions G:C→T:A liées à la réaction : C₈-guanine 8-oxoguanine peuvent être provoquées par des xénobiotiques de type hydrocarbures polycycliques aromatiques, l'aflatoxine B1. Les enzymes impliquées dans la production de ces substances réactives sont : NAT2, NAT1, GSTM1. Les transversions de type G:C→C:G sont dues à des dérivés oxydants. Les transversions de type A:T→T:A sont dues à des substances comme le chlorure de vinyle. Les transitions G:C→A:T sont généralement spontanées mais peuvent être provoquées par des xénobiotiques et en particulier les agents alkylants de la guanine, par des réactions aboutissant à la forma-

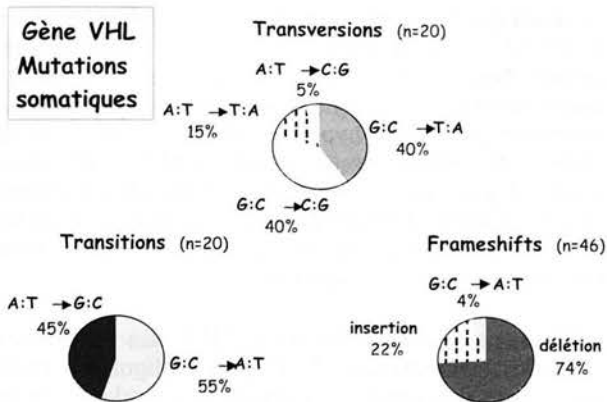


FIG. 2. – Répartition des mutations du gène VHL dans les RCC sporadiques.

tion de O₆-alkylguanine. Les enzymes impliquées dans la production de ces substances réactives sont la CYP2D6 et les GST. Enfin les transitions A:T→G:C peuvent être provoquées par les dérivés du tabac. La caractérisation des mutations somatiques du gène VHL dans les RCC sporadiques et familiaux nous a permis d'ores et déjà d'identifier un sous-groupe de tumeurs pour lesquelles la mutation est de type transversion (signe d'une exposition à un carcinogène chimique).

Relation génotype-phénotype. Nous avons ainsi démontré que les mutations étaient de nature différente : 1) pour les RCC sporadiques, des mutations aboutissent le plus souvent à la formation de protéines tronquées, dans 83 % des cas et 2) pour les formes familiales, Les mutations de type faux sens prédominent, dans 65 % des cas (Fig. 3). Cette différence nous a permis de définir un facteur pronostique de développer un RCC pour les patients VHL en fonction de la nature de la mutation germinale dont ils sont porteurs. En effet, lorsque celle-ci est de type "protéine tronquée", le risque qu'un individu au moins dans la famille développe un cancer du rein est de 79 % alors qu'il n'est que de 53 % lorsqu'il s'agit d'une mutation de type faux sens (Gallou *et al.*, 1999).

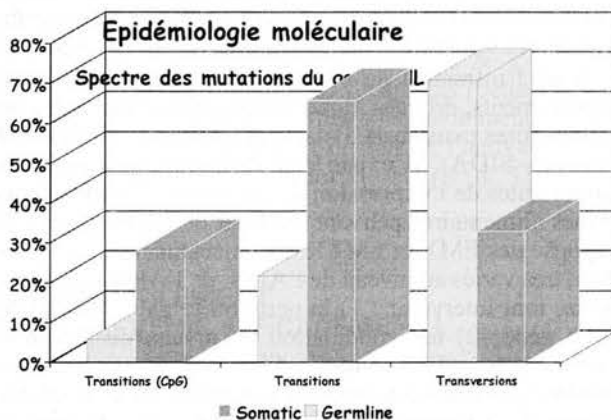


FIG. 3. – Comparaison des mutations germinales et somatiques du gène VHL.

Le questionnaire clinique et alimentaire. L'utilisation d'un questionnaire clinique et alimentaire (questionnaire alimentaire INSERM-MGEN) devrait alors nous permettre d'identifier le(s) facteur(s) toxique(s) en cause et d'établir des associations avec certaines combinaisons d'allèles clés des gènes précédemment étudiés. Ce type d'étude pourra par la suite être adapté à d'autres types de tumeurs afin d'établir des recommandations tant alimentaires qu'environnementales (expositions, professions à éviter) pour les populations à risque.

La base de données UMD. Parallèlement, afin d'analyser ces données et de les comparer à l'ensemble des données de la littérature, nous avons développé la base de données (UMD) des mutations du gène VHL, aujourd'hui reconnue comme base de référence (Bérout *et al.*, 1998 ; Gallou *et al.*, 1999) (Fig. 4). La base de

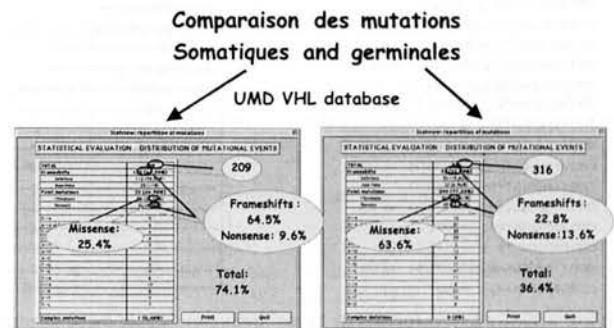


FIG. 4

données des mutations du gène VHL à l'aide du logiciel UMD (Universal Mutation Database software) est consultable sur le site internet UMD dont l'URL est : <http://www.umd.necker.fr>. Elle s'intègre à un ensemble de 5 bases de données consultables sur ce site web depuis le début de l'année (p53, VHL, FBN1, WT1, LDLR). Le nombre d'interrogations après 10 mois d'activité s'élève à 28 000, soulignant l'importance de ces outils. La base de données des mutations du gène VHL est aujourd'hui reconnue comme base de référence.

RECHERCHE DES GÉNOTYPES À RISQUE

L'ensemble de ces données nous a conduits à rechercher les substances potentiellement impliquées dans la survenue des RCC sporadiques (aliments, médicaments, toxiques de l'environnement) par le biais de la recherche de gènes modificateurs. Pour cela, nous avons établi le génotype des patients pour 8 gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (Figure 5). Parmi la cinquantaine de génotypes étudiés, notre étude fait apparaître une relation significative entre le développement d'un RCC et une combinaison d'allèles comprenant : CYP1A1 ("variant"), NAT2 et NAT1 (acétyleurs lents) et GSTM1 (allèle nul). La surreprésentation des acétyleurs lents de type NAT2 chez les malades atteints de CCR ou de cancer de la vessie peut suggérer que

l'enzyme NAT2 exerce un effet protecteur. Le risque accru des métaboliseurs actifs GSTT1 dans la survenue du CCR et du cancer de la vessie pourrait révéler l'implication de cette enzyme dans l'activation de certains pré-cancérogènes, en particulier d'alcanes halogénés. Les hydrocarbures cycliques aromatiques de la fumée de tabac sont métabolisés par la glutathion-S-transférase M1 (GSTM1). Or nous avons montré que la fréquence de l'allèle nul de ce gène est significativement augmentée chez les patients atteints de RCC (Longueaux *et al.*, 1999).

Susceptibilité au RCC : génotypes combinés

par association de 2 ou 3 loci Odds Ratio: 95% CI

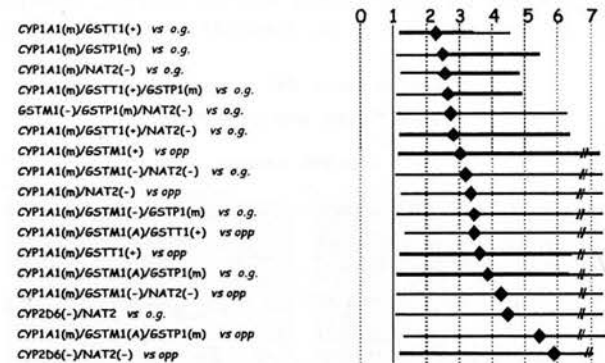


FIG. 5. – Génotypes combinés de gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et augmentation du risque de RCC.

ASSOCIATION ENTRE NATURE DE LA MUTATION ET GÉNOTYPES FAVORISANTS

Transversion dans les tumeurs et génotypes à risque.

Nous recherchons à présent d'éventuelles associations entre les génotypes "à risque" et le profil des mutations somatiques observées chez les patients et à différents stades tumoraux. Ces données pourraient aider à préciser la nature de certains profils de mutagenèse en relation avec l'activité ou la déficience de telle ou telle enzyme du métabolisme des xénobiotiques. D'après nos premiers résultats encore préliminaires, il existe effectivement une relation significative entre certains génotypes et le type d'événement mutationnel (transition ou transversion). On observe une plus grande fréquence d'allèles GSTT1 non nul et d'allèles lents NAT2 chez les patients porteurs de mutation somatique de type transversion. Ces résultats très encourageants nous orientent maintenant vers l'étude de l'hétérogénéité clinique des formes familiales et son éventuelle relation avec les génotypes identifiés précédemment.

Terrain génétique favorisant l'apparition d'une tumeur particulière chez les patients VHL. L'étude des gènes impliqués dans le métabolisme des EMX et des EMXR devrait également nous permettre de montrer que

certaines combinaisons d'allèles de ces différents gènes confèrent un risque particulier de développer certains cancers dans le contexte du VHL. Des résultats préliminaires obtenus lors de l'étude de RCC sporadiques nous confortent dans cette hypothèse et nous permettent de cibler notre étude sur un nombre restreint de gènes (quelques dizaines). La mise en évidence de ces combinaisons d'allèles à risque permettra de mieux suivre les patients et, parallèlement de rechercher une association avec d'autres types de tumeurs.

Recherche d'adduits de l'ADN. La formation d'adduits covalents de l'ADN peut préfigurer certains processus d'oncogenèse. La liaison de ces adduits est en effet considérée comme une source potentielle de mutations qui, par là même, accroîtrait la probabilité d'initiation tumorale. Parmi les voies métaboliques pouvant conduire à la formation d'adduits figure la synthèse d'ions arylnitronium, très électrophiles. Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que les N-acétyltransférases sont capables de participer à la formation de ces ions. Les pré-curseurs ainsi activés sont les amines cycliques et hétérocycliques provenant de sources environnementales telles que la fumée de cigarette, certains résidus de cuisson des aliments, ou encore les polluants industriels et issus de la combustion de produits pétroliers (Delomenie *et al.*, 1998). La mesure de la quantité d'adduits formés au sein de l'ADN génomique peut s'effectuer sur les lymphocytes circulants. La méthode de détection est celle du post-marquage après exposition carcinogénique *in vitro*, suivie par l'identification des complexes moléculaires par HPLC.

QUELS ALIMENTS PEUVENT BIEN ÊTRE RESPONSABLES ?

Les études en cours sur les substances protectrices ou délétères contenues dans certains aliments devraient permettre, dans un premier temps, de démontrer les mécanismes, les voies métaboliques impliquées puis, dans un deuxième temps, d'étudier les polymorphismes des gènes correspondants afin de préciser les génotypes à risque en cas de consommation excessive ou bien de carence.

Sous l'influence de certaines substances, aliments, médicaments, drogues, donc des pratiques culturelles ou alimentaires mais aussi d'états pathologiques particuliers (cancer, SIDA), il existe des variations quantitatives importantes de l'expression de ces gènes. Certaines pratiques alimentaires peuvent modifier de façon notable la réponse des EMX et EMXR. Les mécanismes d'interaction, très variés au niveau de l'ADN, de l'ARN ou la protéine, font intervenir : 1) la perte ou le gain d'un allèle d'un gène ; 2) une modulation du niveau de l'expression ; 3) une activation ou l'inhibition de l'activité enzymatique ; 4) une modulation de la stabilité ou de la dégradation de la protéine. Les interactions entre aliments et médicaments et leurs modes d'actions sont très variés et dépendent aussi de l'âge, du sexe, de l'état hormonal ou

physiopathologique, voire des conditions climatiques et des saisons.

L'ingestion quotidienne de jus de pamplemousse inhibe l'enzyme entérocytaire CYP3A4 (Lown *et al.*, 1997). Cette inhibition peut avoir des répercussions importantes sur la biodisponibilité des substances métabolisées par cette enzyme. Le vin rouge contient des polyphénols qui ont les mêmes effets (Serafini *et al.*, 1998). Mais le jus de pamplemousse active également le gène MDR, ce qui pourrait avoir un effet compensateur (Soldner *et al.*, 1999).

D'autres composés courants de l'alimentation possèdent des propriétés préventives multiples contre le cancer. Le resvératrol, une phytoalexine trouvée dans le raisin mais aussi d'autres plantes, se comporte comme un antioxydant, un antimutagène et induit les enzymes de phase II. De plus il a un effet anti-inflammatoire et inhibe la cyclooxygénase et l'hydroperoxydase (Jang *et al.*, 1997). Les jeunes pousses de brocoli mais aussi d'autres crucifères comme le chou-fleur sont très riches en glucoraphanine et en sulforaphane, de puissants inducteurs des enzymes de phase II, très efficaces dans la réduction de l'incidence de tumeurs mammaires chimio-induites chez le Rat (Fahey *et al.*, 1997). Les additifs de l'alimentation constituent également une source très importante de substances variées capables d'induire ou d'inhiber les EMX et EMXR. Certains induisent de manière préférentielle les enzymes de phase I, comme la NQO1 (NAD(P)H-quinone oxyréductase) ou de phase II comme la GST et l'UDPGT et inhibent le développement de tumeurs (Zhu *et al.*, 1997).

Certains des effets pharmacologiques du thé sont dus à l'interaction de la caféine avec des récepteurs membranaires de l'adénosine (Ledent *et al.*, 1997). La caféine, mais aussi d'autres composants de certains thés, sont des inhibiteurs de la carcinogenèse induite par les UVB (Huang *et al.*, 1997). La consommation de thé vert est également associée à une fréquence réduite de cancers du sein et de la prostate dans les populations asiatiques (Jankun *et al.*, 1997).

Par ailleurs l'alcool induit une autre enzyme hépatique, le CYP2E1, (cytochrome P4502E1), et inhibe une enzyme intestinale, le CYP3A4, (cytochrome P4503A4), enzymes qui interviennent dans le métabolisme de près de la moitié des médicaments (Shibuya & Yoshida, 1988). Les effets de certains médicaments (benzodiazépine, paracétamol) sont modifiés : ils deviennent inefficaces, toxiques ou dangereux du fait de l'activation du CYP2E1, également polymorphe (Girre & Thomas, 1997).

PRÉDIRE UTILEMENT POUR PRÉVENIR EFFICACEMENT !

Jusqu'à présent, les spécialistes en Nutrition ou en Endocrinologie s'intéressaient essentiellement aux maladies ayant un rapport direct, qualitatif ou quantitatif, avec l'alimentation : le diabète, l'hypercholestérolémie ou

l'obésité. Or les mêmes approches sont désormais envisageables pour toutes les prédispositions génétiques. Néanmoins, de vastes études épidémiologiques prenant en compte l'ensemble des facteurs sont désormais nécessaires pour assurer dans un avenir proche une véritable prévention basée sur une alimentation mieux adaptée à chacun, en fonction de ses gènes. Une alimentation adaptée au cas par cas pourra alors tenir compte des effets potentiels, non seulement vis-à-vis du gène porteur de la mutation causale, mais aussi vis-à-vis du ou des gènes modificateurs. En combinant les apports de l'étude du génome humain à ceux de la diététique et des biotechnologies, il n'est pas utopique d'espérer, à terme, une prévention par une alimentation adaptée et de considérer aujourd'hui la nutriginétique comme une véritable science émergente.

BIBLIOGRAPHIE

- Bailey L. B., & Gregory J. F. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes : metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J. Nutr.*, 1999, 129, 919-922.
- Beaudet A. L. Making genomic medicine a reality. *Am. J. Hum. Genet.*, 1998, 64, 1-13.
- Bérout C., Joly D., Gallou C., Staroz F., Orfanelli M.-T., & Junien C. Software and database for the analysis of mutations in the VHL gene. *N.A.R.*, 1998, 26, 256-258.
- Beutler E., Westwood B., Melemed A., Dal Borgo P., & Margolis D. Three new exon 10 glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations. *Blood Cells Mol. Dis.*, 1995, 21, 64-72.
- Brockmüller J., Cascorbi L., Kerb R., & Roots I. Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine-N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome p450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res.*, 1996, 56, 3915-3923.
- Chen J., Stampfer M., Hough H., Garcia-Closas M., Willett W., Hennekens C., Kelsey K., & Hunter D. A prospective study of N-acetyltransferase genotype, red meat intake, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res.*, 1998, 58, 3307-3311.
- Chow W., Gridley G., McLaughlin J., Mandel J., Wacholder S., Blot W., Niwa S., & Fraumeni J. J. Protein intake and risk of renal cell cancer. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1994, 86, 1131-1139.
- Cui H., Horon I., Ohlsson R., Hamilton S., & Feinberg A. Loss of imprinting in normal tissue of colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Nature Med.*, 1998, 4, 1276-1280.
- Delomenie C., Grant D., Krishnamoorthy R., & Dupret J. Les arylamine N-acétyltransférases : du polymorphisme génétique à la susceptibilité aux xénobiotiques. *Méd. Sci.*, 1998, 1, 27-36.
- Fahey J., Zhang Y., & Talalay P. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 10367-10372.
- Feinberg A., & Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 1983, 301, 89-92.
- Gallou C., Joly D., Méjean A., Staroz F., Martin N., Tarlet G., Orfanelli M. T., Bouvier R., Droz D., Chrétien Y., Maréchal J. M., Richard S., Junien C., & Bérout C. Mutations of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma. Definition of a

- risk factor of VHL Patients to develop a RCC. *Hum. Mut.*, 1999, 13, 464-475.
- Girre C., & Thomas G. Les médicaments et l'alcool. *Pour la Science*, 1997, 241, 138-144.
- Godley P. A., & Escobar M. A. Renal Cell Carcinoma. *Cur. Op. Oncol.*, 1998, 10, 261-265.
- Guignard E., Haillot O., Chautard D., Vannier J., Janin P., & Lanson Y. [Descriptive epidemiology of tumors of the renal parenchyma in adults, in Indre-et Loire from 1980 to 1987]. *J. Urol.*, 1990, 96, 65-72.
- Houlston R. S., & Tomlinson I. P. Modifier genes in humans : strategies for identification. *Eur. J. Hum. Genet.*, 1998, 6, 80-88.
- Huang M., Xie J., Wang Z., Ho C., Lou Y., Wang C., Hard G., & Conney A. Effects of tea, decaffeinated tea, and caffeine on UVB light-induced complete carcinogenesis in SKH-1 mice : demonstration of caffeine as a biologically important constituent of tea. *Cancer Res.*, 1997, 57, 2623-2629.
- Jang M., Cai L., Udeani G. O., Slowing K. V., Thomas C. F., Beecher C. W., Fong H. H., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D., Mehta R. G., Moon R. C., & Pezzuto J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 1997, 275, 218-220.
- Jankun J., Selman S., Swiercz R., & Skrzypczak-Jankun E. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature*, 1997, 387, 561.
- Kanharidis P., El-Osta A., deSilva M., Wall D. M., Hu X. F., Slater A., Nadalin G., Parkin J. D., & Zalcberg J. R. Altered methylation of the human MDR1 promoter is associated with acquired multidrug resistance. *Clin. Cancer Res.*, 1997, 3, 2025-2032.
- Kaplan M., Renbaum P., Levy-Lahad E., Hammerman C., Lahad A., & Beutler E. Gilbert syndrome and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency : a dose-dependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 12128-12132.
- Ledent C., Vaugeois J., Schiffmann S., Pedrazzini T., El Yacoubi M., Vanderhaeghen J., Costentin J., Heath J., Vassart G., & Parmentier M. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature*, 1997, 388, 674-678.
- Longueux S., Delomélie C., Gallou C., Méjean A., Vincent-Viry M., Bouvier R., Droz D., Krishnamoorthy R., Galteau M. M., Junien C., Bérout C., & Dupret J. M. Candidate genetic modifiers of individual susceptibility to renal cell carcinoma : a study of polymorphic human xenobiotic metabolizing enzymes. *Cancer Res.*, 1999, 2903-2908.
- Lown K., Bailey D., Fontana R., Janardan S., Adair C., Fortlage L., Brown M., Guo W., & Watkins P. Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J. Clin. Invest.*, 1997, 99, 2545-2555.
- Ma J., Stampfer M., Giovannucci E., Artigas C., Hunter D., Fuchs C., Willett W., Selhub J., Hennekens C., & Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res.*, 1997, 57, 1098-1102.
- Ma Y., Gaken J., McFarlane B., Foss Y., Farzaneh F., McFarlane I., Mieli-Vergani G., & Vergani D. Alcohol dehydrogenase : a target of humoral autoimmune response in liver disease. *Gastroenterol.*, 1997, 112, 483-492.
- McLaughlin J., Chow W., Mandel J., Mellemgaard A., McCredie M., Lindblad P., Schlehofer B., Pommer W., Niwa S., & Adami H. International renal-cell cancer study. VIII. Role of diuretics, other anti-hypertensive medications and hypertension. *Int. J. Cancer*, 1995, 63, 216-221.
- McMichael A. J., & Giles G. G. Cancer in migrants to Australia : extending the descriptive epidemiological data. *Cancer Res.*, 1988, 48, 751-756.
- Mellemgaard A., Lindblad P., Schlehofer B., Bergstrom R., Mandel J., McCredie M., McLaughlin J., Niwa S., Odaka N., Pommer W., & al e. International renal-cell cancer study. III. Role of weight, height, physical activity, and use of amphetamines. *Int. J. Cancer*, 1995, 60, 350-354.
- Nebert D. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes : what is their clinical relevance and why do they exist? *Am. J. Hum. Genet.*, 1997, 60, 265-271.
- Richards F. M., Payne S. J., Zbar B., Affara N. A., Ferguson-Smith M. A., & Maher E. R. Molecular analysis of de novo germline mutations in the von Hippel-Lindau disease gene. *Hum. Mol. Genet.*, 1995, 4, 2139-2145.
- Serafini M., Maiani G., & Ferro-Luzzi A. Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *The Journal of Nutrition*, 1998, 128, 1003-1007.
- Shibuya A., & Yoshida A. Genotypes of alcohol-metabolizing enzymes in Japanese with alcohol liver diseases : a strong association of the usual Caucasian-type aldehyde dehydrogenase gene (ALDH1(2)) with the disease. *Am. J. Hum. Genet.*, 1988, 43, 744-748.
- Smith G., Stanley L., Sim E., Strange R., & Wolf C. Metabolic polymorphisms and cancer susceptibility. *Cancer Surveys*, 1995, 25, 27-65.
- Soldner A., Christians U., Susanto M., Wachter V. J., Silverman J. A., & Benet L. Z. Grapefruit juice activates P-glycoprotein-mediated drug transport. *Pharm Res*, 1999, 16, 478-485.
- Wolk A., Gridley G., Niwa S., Lindblad P., McCredie M., Mellemgaard A., Mandel J., Wahrendorf J., McLaughlin J., & Adami H. International renal cell cancer study. VII. Role of diet. *Int. J. Cancer*, 1996, 65, 67-73.
- Yu M. C., Mack T. T., Hanisch R., Cicioni C., & Henderson B. E. Cigarette smoking, obesity, diuretic use, and coffee consumption as risk factors for renal cell carcinoma. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1986, 77, 351-.
- Zhu B., Lech J., Rosen R., & Conney A. Effect of dietary 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole on the metabolism and action of estradiol and estrone in female CD-1 mice. *Cancer Res.*, 1997, 57, 2419-2427.