

UNIVERSITE DE NANTES
U.F.R. DE MEDECINE ET TECHNIQUES MEDICALES

FACTEURS PRONOSTIQUES
ET
MARQUEURS TUMORAUX DE
L'ADENOCARCINOME DE L'ETHMOIDE

THESE DE DOCTORAT
Ecole Doctorale BIOLOGIE SANTÉ
Discipline Biologie Médecine Santé
Spécialité Médecine du Travail

Présentée et soutenue publiquement par

TRIPODI Dominique

Le 1^{er} juillet 2009, devant le jury ci-dessous

Président : Monsieur le Professeur Christian Géraut

Rapporteurs :

M. Christian Verger, Professeur à l'Université de Rennes

M. Jean-Dominique Dewitte, Professeur à l'Université de Brest

Examineurs :

M. Christian Géraut, Professeur à l'Université de Nantes

M. Alain Caubet, Maître de Conférence à l'Université de Rennes

Directeur de thèse : M. Khaled Meflah, Professeur à l'Université de Nantes

Co-directeur de thèse : Mme Catherine Gratas-Rabbia-Ré, Maître de Conférence
à l'Université de Nantes

Examineurs invités :

M. le Professeur Claude Beauvillain de Montreuil, Professeur à l'Université de
Nantes

Mme le Professeur Dominique Penneau-Fontbonne, Professeur à l'Université
d'Angers

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Monsieur le Professeur Christian Gérard qui m'a guidé tout au long de mes études et m'a dirigé il y a cinq ans vers Monsieur le Professeur Khaled Meflah afin de développer la recherche dans le domaine des cancers professionnels.

Je souhaite aussi remercier grandement Monsieur le Professeur Meflah de m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche, d'avoir accepté de diriger ma thèse et aussi d'avoir apporté des réponses précises à mes interrogations tout au long de l'avancée des travaux. Il a été d'un soutien constant et son aide méthodologique a été précieuse.

J'ai aussi été en permanence co-encadré par Madame Catherine Gratas-Rabbia-Ré qui m'a accueilli à l'unité INSERM 601, qui avec une grande patience, m'a formé aux techniques de biologie moléculaire. Avec Monsieur Meflah, elle m'a aidée à bâtir mon projet de recherche dès 2003 et nous avons décidé ensemble de diriger notre axe de recherche vers le cancer de l'ethmoïde car peu exploré sur le plan génétique jusque là. Notre étude a pu être initiée grâce à un Projet Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) soutenu par le CHU de Nantes. Véronique Sébille, responsable du Laboratoire de Biostatistiques de la Faculté de Médecine de Nantes nous a apporté son aide méthodologique et a encadré les analyses statistiques. Sylvia Quémener, étudiante en Master, a réalisé la technique des puces à ADN.

Ce projet n'aurait pu aboutir sans l'aide très soutenue de l'ensemble de l'équipe du Service de Chirurgie ORL du CHU de Nantes et en particulier de Monsieur le Professeur Claude Beauvillain de Montreuil et ses associés Monsieur le docteur Ferron et Monsieur le Professeur Malard. Ils ont participé activement au recueil des prélèvements tumoraux selon le protocole établi, et ont contribué au recueil des données opératoires de tous les patients inclus dans nos études. L'équipe d'Anatomie Pathologie du CHU a activement aussi contribué au succès de l'étude par sa participation au PHRC, et nous remercions en particulier Madame le Docteur Karine Renaudin et Monsieur le Professeur Christian Labois.

Monsieur le docteur Claude Roedlich et Madame Lucie Planche ont participé à l'analyse des données statistiques et je tiens à les remercier grandement.

Le Centre Antipoison de Rennes m'a permis d'acquérir les bases de la toxicologie clinique et j'ai en permanence bénéficié de l'aide et du soutien de son équipe, en particulier Monsieur le professeur Christian Verger et Monsieur, le Docteur Alain Caubet.

Je remercie aussi la direction du CHU de Nantes, les Services de Médecine du Travail et de Pathologie Professionnelle des CHU de Nantes, Rennes, Brest et Angers pour leur soutien appuyé depuis le début de ce travail.

Je tiens remercier Monsieur le professeur Dewitte et Monsieur le Professeur Verger rapporteurs de la Thèse dont les premières appréciations m'ont permis d'optimiser ce travail. Monsieur professeur Alain Botta, en tant qu'expert, responsable du Laboratoire de Biogénotoxicologie de La Timone, m'a fait parvenir un rapport détaillé qui m'a permis de donner un haut niveau à ce travail; je tiens à l'en remercier vivement.

Enfin, un grand merci à mes amis, ma famille, mon épouse Iulia qui ont contribué grâce par leur aide constante à la réussite de mes travaux.

Notre PHRC n'aurait pas pu être mené à son terme sans le complément de financement apporté par la Ligue contre le Cancer à qui nous avons soumis notre projet et que nous tenons à remercier vivement.

RESUME.....	6
ABSTRACT	8
ABREVIATIONS.....	10
INTRODUCTION.....	11
PREMIERE PARTIE : RAPPELS SUR LE CANCER ET LES MECANISMES DE LA CANCEROGENESE	14
I – LE CANCER	14
A - Définitions	14
1 - les gènes régulant la réparation de l'ADN	16
2 - les gènes régulateurs de l'apoptose	18
B - Les mécanismes acquis d'origine chimique	19
1 - Evolution des connaissances et tests de dépistage	19
2 - Mécanismes de la cancérogenèse chimique.....	24
2a - Mécanismes génétiques.....	24
La phase d'initiation.....	24
- Formation d'adduits	24
- Formation de radicaux libres.....	26
La phase de promotion	27
La phase de progression	27
2b - Mécanismes épigénétiques.....	27
II – FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET PROFESSIONNELS.....	29
A - Données épidémiologiques.....	29
1 - Données épidémiologiques générales	29
Facteurs de risque.....	30
2 - Données chiffrées relatives aux cancers professionnels en France.....	35
3 - Exemple de l'amiante et des cancers de l'ethmoïde	36
B - Facteurs environnementaux	37
1 - Substances retrouvées dans les aliments qui ont fait la preuve de leur cancérogénicité chez l'animal et l'homme.....	37
2 - Champs électromagnétiques	40
3 - Cancérogenèse physique	42
C - Facteurs professionnels.....	43
1 - Facteurs professionnels d'origine chimique	44
1a - Le Formaldéhyde	44
1b - Hydrocarbures aromatiques polycycliques	46
1c - Hydrocarbures aromatiques benzéniques.....	48
1d - Amines aromatiques.....	49
1e - Le styrène	51
2- Les poussières	52
2a - Définition	52
2b - Poussières inorganiques : les métaux.....	53
Le Nickel	53
Le Chrome et ses dérivés	54
2c - Poussières inorganiques : les fibres.....	56
2d - Poussières organiques : les poussières de bois	59

Composition de la poussière de bois	59
Les métiers du bois.....	60
La réglementation.....	61
Prévention primaire	62
Protection collective.....	62
DEUXIEME PARTIE : L'ADENOCARCINOME DE L'ETHMOÏDE	64
I – INCIDENCE	64
II – AGENTS CANCEROGENES	65
A - <i>La poussière de bois</i>	65
B - <i>Autres agents carcinogènes suspectés</i>	67
1 - Le cuir	67
2 - Les composés dérivés du nickel et du chrome.....	68
3 - Le Formaldéhyde	69
4 - Les textiles et poussières végétales.....	70
5 - Rôle des constituants du bois et caractère cancérigène.....	72
III – ANATOMIE	74
IV – HISTOLOGIE	78
V – ANATOMIE PATHOLOGIQUE	79
VI – PHYSIOPATHOLOGIE	83
VII – CLINIQUE.....	84
VIII – DIAGNOSTIC	84
IX – BILAN D'EXTENSION	86
X – PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE.....	88
A - <i>Chirurgie</i>	88
B - <i>Radiothérapie</i>	90
C - <i>Chimiothérapie</i>	90
XI – PRONOSTIC	90
A - <i>Etudes concernant l'adénocarcinome de l'ethmoïde tenant compte du type histologique</i>	91
B - <i>Etudes concernant l'adénocarcinome de l'ethmoïde tenant compte de l'extension de la tumeur</i>	92
XII – GENETIQUE DES ADENOCARCINOMES DE L'ETHMOÏDE DE TYPE INTESTINAL (ITAC).....	92
A - <i>Etudes comparant l'adénocarcinome du colon et l'adénocarcinome de l'ethmoïde</i> . 92	
B - <i>Etudes axées sur l'analyse globale de l'ADN génomique</i>	95
C - <i>Etudes recherchant des marqueurs de bon pronostic</i>	96
XXIII – SYNTHESE DES TRAVAUX DE LA HAS ET PROPOSITIONS.....	98
TROISIEME PARTIE : ANALYSE DES FACTEURS PRONOSTIQUES DE SURVIE DE 98 PATIENTS HOSPITALISES AU CHU DE NANTES POUR ADENOCARCINOME DE L'ETHMOÏDE DE TYPE INTESTINAL	102
I – OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	102
II – PATIENTS ET METHODES.....	102
A - <i>Variables colligées à partir des données du dossier d'hospitalisation</i>	103
B - <i>Analyse descriptive</i>	104
III – RESULTATS.....	106

<i>A - Données descriptives</i>	106
<i>B - Analyse de la survie</i>	109
1 - Analyse de la survie par la méthode de Kaplan-Meier	110
1 a- Analyse de la survie globale	111
- Analyse de la survie globale selon la classification TNM	111
Figure n° 29 : Survie globale après regroupement des classes T3-T4 et T1-T2	112
- Analyse de la survie globale selon le type histologique	112
1b - Analyse de la survie spécifique	113
- Analyse de la survie spécifique selon la classification TNM	114
- Analyse de la survie spécifique selon le type histologique	114
2 - Analyses univariées appliquées aux études n° 1, n° 2, n° 3	115
3 - Analyses multivariées	119
III – DISCUSSION	121
<i>Age au moment du diagnostic</i>	121
<i>Les professions</i>	121
<i>Antécédents de cancer</i>	122
<i>Symptômes</i>	123
<i>Bilan d'extension</i>	124
<i>Histologie des tumeurs</i>	124
<i>Survie globale et spécifique</i>	124
<i>Données histologiques et survie</i>	125
<i>Bilan d'extension et survie</i>	125
<i>Voie d'abord chirurgicale</i>	126
<i>Limites de l'étude</i>	127
IV – CONCLUSION DE LA 3 ^{EME} PARTIE	127

QUATRIEME PARTIE : RECHERCHE DE MARQUEURS MOLECULAIRES SPECIFIQUES

I – OBJECTIFS DE L'ETUDE	129
<i>A - Objectifs initiaux de l'étude</i>	129
<i>B - Caractéristiques de l'étude</i>	129
II – PRESENTATION DES PATIENTS	130
III – METHODES ET MODALITE DE REALISATION PRATIQUE	132
<i>Résumé</i>	132
<i>A - Puces à ADN</i>	132
1 - Principe général	132
2 - Protocole général pour l'étude du différentiel d'expression génétique	134
- Contrôle de l'histologie des tissus avant extraction de l'ARN	136
- Extractions d'ARN	137
- Amplification de l'ARN	137
- Marquage	138
- Hybridation	139
3 - Traitement des données	139
Résumé	139
- Lecture : acquisition des images	139
- Traitement des données brutes	140
- Normalisation	141
4 - Analyses	142
<i>B - Méthode de la PCR quantitative en temps réel (Q-RTPCR)</i>	143

1-Principe	143
2 - Méthode de la transcription « reverse »	144
3 - Quantitative – Polymerase Chain Reaction (Q – PCR)	145
C - Immunohistochimie	147
IV – RESULTATS	148
A - Extractions des ARNs des tissus sains et pathologiques	148
B - Puces à ADN.....	149
1 - Analyses non supervisées	149
2 - Analyses supervisées (two classed paired analysis)	150
C - RT-QPCR	154
D - Confirmation des résultats par immunohistochimie	156
Marquage sur tissu sain	157
E – Recherche d’une corrélation entre exposition à des facteurs environnementaux, survie et expression des marqueurs tumoraux	160
V – DISCUSSION	160
Puces à ADN	160
Q – RTPCR et IHC	161
Limites de l’étude	167
VI – CONCLUSION DE LA 4 ^{EME} PARTIE	168
CINQUIEME PARTIE : ARTICLE	170
Gene expression profiling in sinonasal adenocarcinoma	171
ABSTRACT.....	172
BACKGROUND	173
METHODS	174
RESULTS.....	180
DISCUSSION.....	182
CONCLUSIONS	186
AUTHORS’ CONTRIBUTIONS.....	186
SIXIEME PARTIE : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	208
CONCLUSION GENERALE	208
PERSPECTIVES	211
<i>Optimisation de la prévention et de la prise en charge des cancers nasosinusiens en médecine du travail</i>	211
Prévention primaire	211
Prévention secondaire	212
Prévention tertiaire	212
<i>Recherche épidémiologique</i>	213
<i>Recherche fondamentale</i>	214
SYNTHESE GENERALE : HYPOTHESES SUR LES MECANISMES ENTRANT EN JEU LORS DE LA CANCEROGENESE CHEZ DES SUJETS EXPOSES AUX POUSSIERES DE BOIS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE	215
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	216

ANNEXES

ANNEXE 1 : DATES DU DIAGNOSTIC, DIAGNOSTIC HISTOLOGIQUE , DATES DU DECES, SURVIE, CAUSE DU DECES.	230
ANNEXES 2 : PROFESSIONS ET DEGRE D'EXPOSITIONS AUX SUBSTANCES CANCEROGENES	232
ANNEXE 3 : PROFESSIONS, ANNEES D'EXPOSITION, DESCRIPTION DES SIGNES CLINIQUES AU MOMENT DU DIAGNOSTIC D'ADENOCARCINOME DE L'ETHMOÏDE.	234
ANNEXE 4 : ANTECEDENTS PERSONNELS ET FAMILIAUX DE CANCER	236
ANNEXE 5 : DECLARATIONS ET RECONNAISSANCE EN MALADIE PROFESSIONNELLE.....	238
ANNEXE 6 : RESULTATS DU BILAN D'EXTENSION ET CLASSIFICATION TNM UICC 1997.....	240
ANNEXE 7 : TYPE DE CHIRURGIE ET DOSES RADIOTHERAPIE	242
ANNEXE 8 : PROJET HOSPITALIER DE RECHERCHE CLINIQUE.....	244

Résumé

Titre : Facteurs pronostiques et marqueurs tumoraux de l'adénocarcinome de l'ethmoïde.

Résumé : L'adénocarcinome de l'ethmoïde est la deuxième cause de cancer professionnel reconnu en France. Un lien étroit avec l'exposition aux poussières de bois est bien établi. Il s'agit d'un cancer invalidant avec des séquelles anatomiques très lourdes lorsqu'il est dépisté tardivement. Classiquement, les études en terme de survie, font l'analyse des facteurs pronostics qui sont la taille de la tumeur, la notion d'envahissement ganglionnaire mais l'impact des facteurs personnels (consommation de tabac, alcool), et les expositions professionnelles ne sont pas analysées. D'un point de vue moléculaire très peu d'études ont été publiées. C'est pourquoi, pour mieux appréhender ce cancer, nous avons mené une étude rétrospective sur une série de 98 patients et une étude prospective transcriptomique sur 26 patients. Par l'approche rétrospective sur 98 patients hospitalisés pour adénocarcinome de l'ethmoïde entre 1988 et 2005 au CHU de Nantes, nous avons montré (méthode de Kaplan - Meier, tests de logrank) que la survie globale à 5 ans est de 61,69 % (IC 95 % [51,22 % ; 70,56 %]). Il existe un lien étroit entre survie à 5 ans et stade évolutif selon la classification TNM (UICC1997) ($p < 0,0001$), éléments cliniques (exophtalmie, diplopie) ($p < 0,001$), atteinte de la lame criblée, du sphénoïde et des méninges ($p < 0,001$), contrôle régional de la chirurgie première tant au point de vue macroscopique ($p = 0,0002$), que microscopique ($p < 0,001$), et chirurgie de la lame criblée ($p = 0,0294$). L'analyse multivariée (modèle de Cox) fait ressortir les quatre facteurs indépendants suivants : diplopie ($p = 0,0159$), extension locale à l'orbite ($p = 0,0113$), caractère bilatéral ($p = 0,00113$), classification TNM ($p < 0,001$). La durée d'exposition aux solvants ou la durée d'exposition aux poussières de bois ne semblent pas intervenir comme facteur pronostic de survie cependant nous avons mis en évidence que la durée cumulée d'exposition au tabac (paquets.années) interviendrait dans la survie à 5ans ($p = 0,0004$). L'analyse multivariée, après ajustement sur les variables cliniques et épidémiologiques, montre un lien significatif entre la survie et le stade de la tumeur au moment du diagnostic ($p = 0,0019$), l'exposition concomitante aux métaux ($p = 0,0307$), et l'atteinte uni ou bilatérale par la tumeur ($p < 0,0001$). Lorsque l'on s'en tient à la survie spécifique chez les patients dont le décès est lié à l'évolution de l'adénocarcinome de l'ethmoïde, la survie est meilleure : 74,23 % à 3 ans (IC 95 % [64,29; 81,78]) et 64,79 % à 5 ans (IC 95 % [54,38; 73,41]), les facteurs pronostiques significatifs en analyse multivariée étant l'uni-ou bilatéralité de l'atteinte initiale ($p = 0,0122$) ainsi que le choix de la voie d'abord chirurgicale ($p = 0,0137$).

L'étude transcriptomique a été réalisée sur les prélèvements (tumeurs et tissu sinusal périphérique sain) recueillis lors de l'exérèse chez 26 patients opérés entre 2003 et 2007. Nous avons, en utilisant des puces à ADN dédiées au cancer, individualisé 186 gènes sur ou sous exprimés parmi les 6864 testés. Nous avons sélectionné 7 gènes, *LGALS4*, *ACS5*, *CLU*, *BAX*, *PDGRF*, *SRI* et *CCT5* pour études complémentaires et avons validé le différentiel d'expression des puces par PCR quantitative. Par immunohistochimie, nous avons confirmé la surexpression significative de la *galectine 4*, en particulier dans les tumeurs différenciées et la perte d'expression de la *clusterine*. La surexpression de *ACS5* n'a par contre pas été confirmée par immunomarquage.

Nos résultats confirment l'existence d'un profil moléculaire spécifique aux adénocarcinomes de l'ethmoïde. Après validation sur un plus grand nombre de tumeurs, la *galectine 4* et la *clusterine* pourraient être utilisées pour développer un test de dépistage précoce chez les sujets à risque, en utilisant un frottis nasal.

Mots clés : adénocarcinome ethmoïde, bois, tannins, gènes, adduits de l'ADN, puces à ADN, *LGALS4*, *CLU*.

Discipline : Biologie Médecine Santé ; *Intitulé du Laboratoire*: Unité INSERM UMR U892, CHU NANTES

Abstract

Title: prognostic factors and tumoral markers of ethmoid adenocarcinoma.

Abstract: Ethmoid sinonasal adenocarcinoma is the second occupational cancer in France; it is strongly associated with wood dust exposure. Surgery and radiotherapy are the most important part of treatment however secondary effects are significant when it is late detected. Commonly, the survival rate surveys are significantly influenced by the size of the lesion (T4 TNM stage) and tumoral local extension; but personal (tobacco, alcohol), occupational (wood dust, solvents, metals) and environmental impact on survival rate or biological alterations are not analyzed. Although the aetiology of these tumors is well defined very little is known regarding the molecular basis of these tumours and no diagnostic tool exists for an early detection in high-risk workers.

So that, we made two original studies:

We collected epidemiological data on a retrospective study about 98 patients operated on for ethmoid adenocarcinomas from 1987 to 2004 at the University Hospital of Nantes, France. By Kaplan-Meier method we concluded that global survival rate was at 3 years 73,20 % (CI 95 % [63,19; 80,89]), and 61,69 % at 5 years (CI 95 % [51,22-70,56]). The survival rate was significantly influenced by symptoms such as exophthalmia, diplopia ($p < 0,001$), TNM stage ($p < 0,0001$), local extension to dura ($p = 0,0001$), sphenoid ($< 0,0001$), macroscopic ($p = 0,0002$), and microscopic ($p < 0,001$) control, cribriform plate surgery ($p = 0,0294$). Step by step Cox model isolated four factors influencing the survival rate: diplopia ($p = 0,0159$), orbit extension ($p = 0,00113$), bilateral extension ($p = 0,00113$), TNM stage ($p < 0,001$). Survival rate was not influenced by duration of exposure to wood dust, solvents, and alcohol exposure. Nevertheless, total tobacco consumption (pack. years) could influence survival rate ($p = 0,0004$). After adjustment on clinical and epidemiological data, global survival rate is influenced by TNM stage ($p = 0,0019$), metals exposure ($p = 0,0307$), and bilateral extension ($p < 0,0001$). Analysis of specific survival rate by step by step Cox model isolated two independent factors influencing the survival rate: bilateral extension ($p = 0,0122$) and surgery pattern ($p = 0,0137$).

The second study was prospective and the Clinical Board of the University Hospital of Nantes consented it in 2003, 26 patients who had presented ethmoid adenocarcinoma were analyzed. In an attempt to identify genes involved in this disease we proceeded to a gene expression profiling using cancer-dedicated microarrays, on nine matched samples of sinonasal adenocarcinomas and non-tumoral sinusal tissue. Among the genes with significant

differential expression we selected: *LGALS4*, *ACS5*, *CLU*, *BAX*, *PDGFR*, *SRI* and *CCT5* for further exploration by quantitative real-time reverse-transcription-PCR on a larger set of tumours and we confirmed the microarray data. Immunohistochemistry was performed for *LGALS4*, *ACS5*, and *CLU* proteins: *LGALS4* was highly up-regulated, particularly in the most differentiated tumours, and *CLU* was lost in all tumours. Regarding *ACS5* the expression was more dispersed and we did not find any correlation with the tumour type. Our results indicate that sinonasal adenocarcinomas have their own molecular pathway. After further evaluation, *LGALS4* and *CLU* might be useful as markers for a better characterization of these tumours and for an earlier detection of cancer in high-risk woodworkers, using sinonasal smear.

Key words: ethmoid, adenocarcinoma, wood dust, tannins, genes, adducts, microarrays, PCR, immunohistochemistry, *LGALS4* and *CLU*.

Abréviations

ACS 5 : Fatty Acyl CoA enzyme Ligase 5 = FACL5
BaP : benzo(a)pyrène
CEM : Champ électromagnétique
CGH : Hybridation génomique comparative
CMR : Cancérogène Mutagène Reprotoxique
CIN : Instabilité chromosomique
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer = IARC
CLU : Clusterine
CYAP : Enzymes dépendant du cytochrome P450
DMBA : diméthylbenzanthracène
2-4 D : Acide 2,4 dichloro-phénoxy-acétique
DRC : Direction de la Recherche Clinique
DDT : Dichloro-diphényl-trichloroéthane
Dioxine : 2,3,7,8-tétrachloridibenzoparadioxine
EPA : Environmental Protection Agency
FACL5 : Fatty Acyl CoA enzyme Ligase 5 = ACS5
GJIC : Gap Junction Inter Cellular
GETTEC : Groupe d'Etudes des Tumeurs de la Tête et du Cou
GST : Gluthathion-S-transférase
HAS : Haute Autorité de Santé
HAPs : Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCAs : Amines hétérocycliques
IHC : Immunohistochimie
IARC : International Agency for Research on Cancer = CIRC
LGALS4 : Galectine sous unité 4
OR : Odd ratio
NTP : National Toxicology Program
PCB : Polychlorobiphényle
PHRC : Projet hospitalier de recherche clinique
PNSE : Plan National Santé Environnement
RT-PCR : Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
Q RT-PCR : Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SAM : Significance Analysis Microarray
SEER : Surveillance Epidemiology and End Results
SFMT : Société française de médecine du travail
TCDD : Tetrachlorodibenzopara-dioxine
VLE : Valeur limite d'exposition

Introduction

Depuis 2004, le cancer est en France la première cause de mortalité, les maladies cardiovasculaires occupant cette place jusque là. On dénombrait 75 000 décès liés au cancer en 1950, 124 000 en 2001, 152 000 en 2004¹. Ceci a justifié la mise en place du plan national cancer. Selon les estimations, au moins 4% des cancers seraient liés aux expositions professionnelles. En France, l'adénocarcinome de l'ethmoïde est le deuxième cancer professionnel reconnu après les cancers bronchiques liés à l'amiante. C'est dans ce contexte que la Société Française de Médecine du Travail a souhaité établir en 2006 des recommandations concernant la surveillance médicale et le dépistage de l'adénocarcinome de l'ethmoïde chez les salariés exposés aux poussières de bois. Bien que le lien entre exposition professionnelle et adénocarcinome de l'ethmoïde soit parfaitement établi à ce jour, la compréhension des mécanismes de développement de ce cancer reste obscure. Nous avons donc souhaité au cours de nos travaux développer une analyse pouvant venir compléter les études et référentiels en cours d'élaboration.

¹ Aouba A, Péquignot F, Le Toullec A, Jouglu E. Les causes médicales de décès en France en 2004 et leur évolution 1980-2004. Numéro thématique In: Surveillance épidémiologique des causes de décès en France - *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*. Institut de Veille Sanitaire; *BEH* n° 35-36 du 18/09/2007:309-10,12p.

Les objectifs de mes travaux ont été triples :

- 1° faire un état des lieux des différents mécanismes de la cancérogenèse générale et en particulier des mécanismes chimiques afin de pouvoir les relier aux adénocarcinomes de l'ethmoïde.

- 2° savoir si les facteurs environnementaux et professionnels en terme de durée, fréquence d'exposition, associés à des facteurs de risque personnels (tabagisme, consommation d'alcool notamment) avaient une influence sur la survie globale de la population sachant que classiquement, les facteurs reconnus sont essentiellement la taille de la tumeur, l'atteinte ganglionnaire et le type histologique. Aucune étude jusqu'ici n'ayant pris en compte les facteurs environnementaux.

- 3° enfin, les données bibliographiques internationales ne faisant pas d'analyse globale du profil génétique de l'adénocarcinome de l'ethmoïde; une telle étude revêtait donc un double intérêt :

1) l'identification de marqueurs pouvant servir au diagnostic précoce de l'adénocarcinome de l'ethmoïde; ceci pouvant venir compléter la nasofibroscopie proposée aux salariés exposés aux poussières de bois suivant le référentiel de recommandations soumis à la HAS et présenté à la SFMT par Madame le Professeur Françoise Conso le 23 février 2009.

2) l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques puisque les molécules classiques de la chimiothérapie anticancéreuse sont inefficaces dans cette pathologie.

Dans la première partie, je rappellerai les hypothèses de la cancérogenèse, les mécanismes génétiques et épigénétiques connus puis les facteurs environnementaux et professionnels impliqués.

Dans la seconde partie, je ferai un état des lieux des connaissances sur l'adénocarcinome de l'ethmoïde puis dans les troisième et quatrième parties je présenterai les résultats de nos études :

- la première, épidémiologique, rétrospective concerne la recherche d'un lien entre la survie de ce cancer avec d'une part les facteurs classiques tels que l'extension de la tumeur, son type histologique, le type de traitement et d'autre part l'exposition à des substances cancérigènes au cours de la carrière professionnelle

- la deuxième partie concerne le profil génétique de 26 sujets présentant un adénocarcinome de l'ethmoïde.

La cinquième partie expose l'article actuellement soumis à la revue BMC Medical Genomics.

La sixième partie présente la discussion générale et les perspectives.

Première partie : rappels sur le cancer et les mécanismes de la cancérogenèse

I – LE CANCER

A - Définitions

Un cancer est caractérisé par une prolifération anarchique de cellules, provoquant des tumeurs dans différents organes. Il peut s'étendre localement en envahissant les tissus voisins, et/ou se disséminer par voie lymphatique et sanguine, ce qui crée des localisations secondaires. Le développement des cancers peut-être lié à des facteurs de risque environnementaux, professionnels ou héréditaires. Ces derniers ne font pas l'objet de ce travail.

La cancérogenèse est un processus multiphasique aussi bien sur le plan phénotypique que génétique. Une tumeur maligne présente plusieurs anomalies phénotypiques telles qu'une croissance excessive, un potentiel d'envahissement local et une capacité à métastaser. Ces caractéristiques apparaissent progressivement au sein de la cellule, étape par étape, associant des mutations qui réalisent l'initiation cellulaire et des mécanismes épigénétiques tels que la promotion qui favorise l'expansion clonale des cellules initiées.

L'évolution de l'état cellulaire depuis l'état physiologique jusqu'à l'état malin peut aussi être schématisée suivant les niveaux relatifs d'expression des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur : à l'état physiologique la balance est équilibrée ; au cours de la mutagenèse, la balance est déséquilibrée en faveur de la fonction oncogénique.

Un exemple est fourni par l'étude des carcinomes du colon. Les lésions évoluent en passant par différents stades morphologiques : hyperplasie épithéliale, formation d'adénomes et transformation maligne. Les corrélations moléculaires dans la séquence adénome-carcinome sont les suivantes : l'inactivation du gène *APC* est la première étape, suivie de l'activation de *ras*, puis la perte d'un gène suppresseur de tumeur non identifié situé en 18q, en dernier lieu la lésion du gène *p53* situé sur le chromosome 7 (figures n° 1 et n° 2).

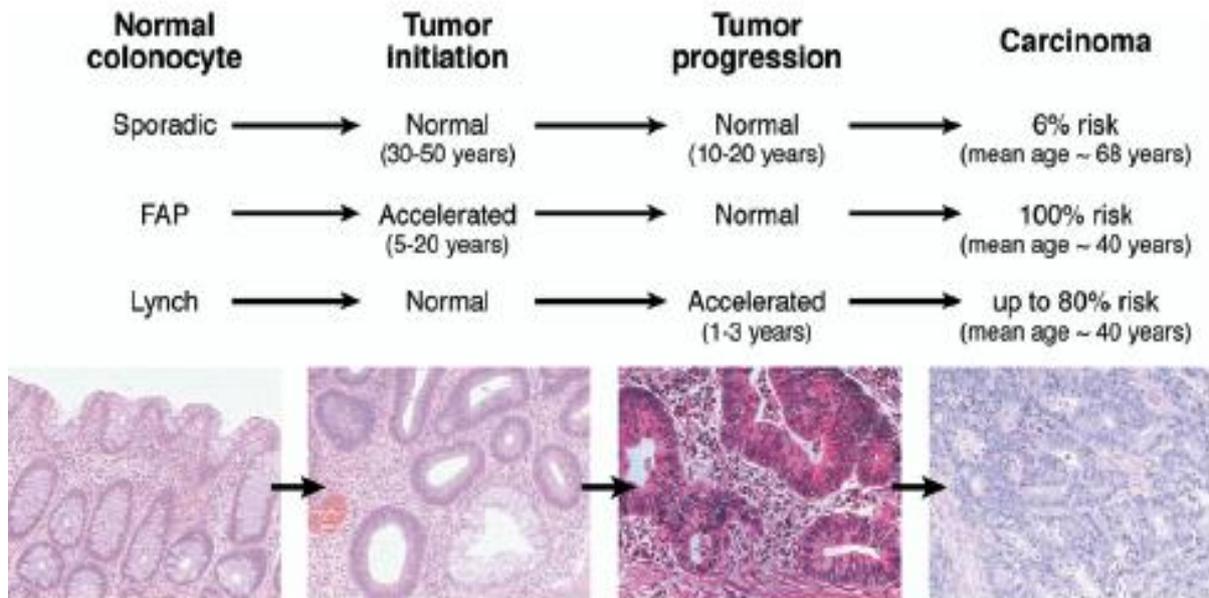


Figure n° 1 : Anomalies histologiques et différentes vitesses de progression tumorale selon le type de cancer².

(Sporadic = cancer colique sporadique, FAP = Polypose Adénomateuse Familiale, Lynch = syndrome héréditaire Lynch)

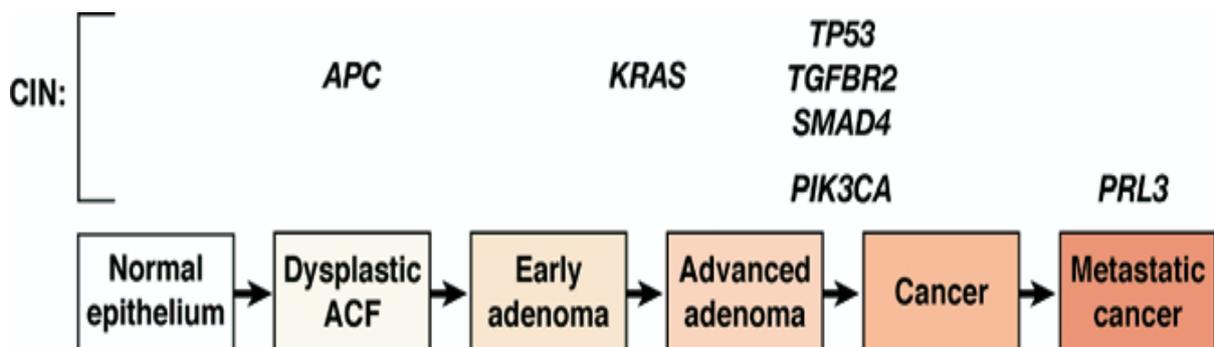


Figure n° 2 : Progression des cellules tumorales en fonction des instabilités chromosomiques (CIN) apparaissant au cours des différents stades évolutifs des cancers colorectaux. La mutation précoce du gène *APC* avec perte d'hétérozygotie est un facteur important dans l'initiation de la polypose adénomateuse familiale³.

² Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis.

Gastroenterology 2008;**135**:1079-99

³ Id. p.1087

Les événements survenant au cours de la cancérogenèse sont l'activation d'un proto-oncogène, l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur, l'atteinte des gènes régulant la réparation de l'ADN et l'atteinte des gènes intervenant dans l'apoptose. Les différents modes d'activation des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur sont décrits dans les tableaux n°1 et n°2.

Les autres gènes impliqués à coté des protooncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur sont :

1 - les gènes régulant la réparation de l'ADN

Bien que l'exposition à des agents qui naturellement conduisent à des lésions de l'ADN (radiations ionisantes, rayonnement solaire, cancérogènes chimiques ou alimentaires) soit fréquente, le développement d'un cancer est une conséquence relativement rare bien qu'en augmentation. En plus des altérations de l'ADN secondaires à des agents environnementaux, l'ADN des cellules normales, peut être lésé par des erreurs survenant spontanément. Au cours de l'existence, chaque gène à 10^{10} occasions de muter spontanément. On estime que la probabilité de mutation par mitose est de 10^{-6} après réparations des mésappariements. En cas de déficit héréditaire des mécanismes de mésappariements, cette probabilité augmente.

Tableau n° 1 : Mode d'activation d'oncogènes et tumeurs dans lesquels ils sont impliqués

Catégorie	Famille de gène	Protooncogène	Mécanisme	Tumeur humaine associée
Facteurs de croissance	PDGF- β	<i>sis</i>	surexpression	Astrocytome Ostéosarcome
	Facteurs de croissance fibroblastique	<i>hst-1</i> <i>int-2</i>	surexpression amplification	Cancer de l'estomac Cancer de vessie Cancer de sein Mélanome
Récepteurs de facteurs de croissance	Famille des récepteurs à l' <i>EGF</i>	<i>erb-B1</i> <i>erb-B2</i>	surexpression amplification	Carcinome épidermoïde du poumon Cancers du sein, poumon, ovaire et de l'estomac
	Récepteurs au CSF-1	<i>erb-B3</i> <i>fms</i> <i>ret</i>	Surexpression Mutation ponctuelle Mutation ponctuelle	Cancer du sein Leucémie NEM types 2A et 2B, forme familiale du cancer médullaire de la thyroïde
Protéines impliquées dans la transduction du signal	Liaison au GTP	<i>ras</i>	Mutations ponctuelles	Cancers du poumon, côlon, pancréas, leucémies
	Tyrosine kinase	<i>abl</i>	Translocation	LMC, LAL
Protéines régulatrices nucléaires	Activateurs transcriptionnels	<i>Myc</i> <i>N-myc</i>	Translocation Amplification	Lymphome de Burkitt Neuroblastome, carcinome du poumon à petites cellules Carcinome du poumon à petites cellules, LAL
		<i>L-myc</i> , <i>c-myc</i>	Amplification	
Régulateurs du cycle cellulaire	Cyclines	<i>Cycline D</i>	Translocation Amplification	Lymphome Cancers du sein, du foie, de l'oesophage
	Kinases dépendant de cyclines	<i>CDK4</i>	Amplification ou mutation ponctuelle	Glioblastome, mélanome, sarcome

Tableau n° 2 : Gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans la genèse des cancers humains

Localisation cellulaire des transcrits	Gène	Fonction	Tumeurs associées avec mutations somatiques	Tumeur humaine associée avec mutations héréditaires
Surface cellulaire	Récepteur au <i>TGF-β</i>	Inhibition de la croissance	Carcinomes du colon	inconnues
	Ecadhérine	Adhérence cellulaire	Carcinomes de l'estomac et du sein	Cancer gastrique familial
Sous membranaire	<i>NF-1</i>	Inhibition de la transduction du signal de ras	Schwannomes	Neurofibromatoses de type I et sarcomes
Cytosquelette	<i>NF-2</i>	inconnue	Schwannomes et méningiomes	Neurofibromatoses de type II, Schwannomes et méningiomes
Cytosol	<i>APC</i>	Inhibition de la transduction du signal	Carcinomes de l'estomac, du côlon, du pancréas, mélanomes	Polypose familiale rectocolique, cancer du côlon
Noyau	<i>Rb</i>	Régulation du cycle cellulaire	Rétinoblastome, ostéosarcome, carcinomes du sein, du côlon, du poumon	Rétinoblastomes, ostéosarcomes
	<i>p53</i>	Régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose	La plupart des cancers humains	Syndrome de Li-Fraumeni, carcinomes et sarcomes multiples
	<i>WT-1</i>	Transcription nucléaire	Tumeur de Wilms	Tumeur de Wilms
	<i>p16 (INK4a)</i>	Régulation du cycle cellulaire par inhibition des kinases dépendant des cyclines	Cancers du pancréas, de l'œsophage	Mélanome malin
	<i>BRCA-1</i> <i>BRCA-2</i>	Réparation de l'ADN Réparation de l'ADN		Carcinomes du sein chez la femme et de l'ovaire Carcinome du sein chez l'homme et la femme

2 - les gènes régulateurs de l'apoptose

On estime aussi, en dehors des gènes suppresseurs et des oncogènes, que les gènes qui empêchent ou induisent la mort cellulaire programmée sont également des variables importantes. *bcl-2* est le premier gène anti-apoptotique identifié. Dans cette famille, certains gènes inhibent l'apoptose telle que *bcl-2* et *bcl-xL*, tandis que d'autres favorisent la mort cellulaire programmée telle que *bax*, *bad*, *bid*, *bcl-Xs*.

La découverte de *bcl-2* a commencé en constatant que 85 % des lymphomes à cellule B de type folliculaire sont porteurs de translocation t (14,18) (q32 ; q21). Ceci est responsable d'une surexpression de *bcl-2* qui induit une survie prolongée des lymphocytes. La famille des protéines *bcl-2* contrôle l'activation d'enzymes protéolytiques (caspases). Les mécanismes précis par lesquels les membres de la famille *bcl-2* jouent un rôle fait toujours l'objet d'actives recherches. Le rapport entre les antagonistes de la mort cellulaire (*bcl-2* et *bcl-xL*) et les agonistes de la mort (*bax*, *bad*, *bid*, *bcl-Xs*) déterminerait la réponse de la cellule à un stimulus apoptotique. Le gène suppresseur de tumeur *p53* stimulerait la synthèse de *bax*.

Les mécanismes de la cancérogenèse font donc intervenir de nombreux gènes. Bien qu'il existe un certain nombre de cancers héréditaires, les causes invoquées le plus souvent sont liées aux expositions environnementales. Je traiterai par la suite uniquement des mécanismes de cancérogenèse acquis d'origine chimique.

B - Les mécanismes acquis d'origine chimique

1 - Evolution des connaissances et tests de dépistage

Les premiers rapports concernant la carcinogenèse chimique ont été attribués à Paracelsus. Dès le XVI^e siècle, il identifie que des mineurs européens développent une maladie chronique nommée « Bergkrankheiten ». Cette maladie vraisemblablement due à l'exposition aux produits dérivés de l'uranium était un cancer du poumon.

Percival Pott a décrit en 1775 le cancer du scrotum chez des ramoneurs anglais⁴. La cause de ces cancers a été attribuée plus tard aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ces substances sont identifiées maintenant en tant que carcinogènes humains par une série d'organismes dans le monde entier. L'évaluation du potentiel cancérigène pour l'homme d'un agent prend en compte les résultats issus de différents types d'études, expérimentales et/ou épidémiologiques. La démonstration scientifique d'une relation directe entre exposition à une substance chimique et cancer est plus récente ; elle repose sur deux types d'arguments :

- des modèles expérimentaux animaux : il est possible de faire un lien direct entre un agent chimique et un type de cancer. Ce type d'approche est scientifiquement irréprochable mais n'est pas toujours extrapolable à l'homme. Ces modèles ont permis de bien connaître les mécanismes de la cancérogenèse chimique. Quelques exemples peuvent illustrer l'efficacité de cette démarche : le badigeonnage de peau de souris avec des hydrocarbures aromatiques comme le diméthylbenzanthracène (DMBA) ou le benzo(a)pyrène (BaP), entraîne des tumeurs de la peau dans lesquelles des mutations de l'oncogène *k-ras* ont été retrouvées. L'administration d'aflatoxine B1 ou de nitrosamines à des rats entraîne des carcinomes hépatocellulaires dont les caractéristiques, dans le cas de l'aflatoxine au moins, ont pu être comparées à celles rencontrées chez l'homme.

- des enquêtes épidémiologiques : elles ont clairement montré l'augmentation de certains types de cancer lors de l'exposition à des produits chimiques (pollution, consommation tabagique, pesticides, alimentation par exemple). À la suite des exemples de Pott et Hill, de nombreuses publications ont rapporté le rôle de la fumée de tabac dans les cancers du poumon, des voies aérodigestives supérieures (en association avec l'alcool), de la

⁴ Pott P. Cancer scroti. In: *Chirurgical Observations*. London: Hawes, Clark and Collins; 1775:63-68,465p.

vessie. Pour l'aflatoxine également, les analyses épidémiologiques ont clairement montré une corrélation entre adduits d'aflatoxine et risque de carcinome hépatocellulaire. Enfin le rôle de l'alimentation dans le développement de divers types de cancers a été largement évoqué. Les mécanismes par type d'agent cancérigène seront développés dans les chapitres suivants.

Les relations entre génotoxicité et mutagenèse ont été établies sur des arguments scientifiques renforcés depuis l'avènement et l'application systématique de tests de génotoxicité et de mutagenèse (tableau n° 3) mettant en évidence les effets précoces sur le matériel génétique, les capacités de mise en œuvre des systèmes de réparation et les éventuelles mutations résultantes. Nous présentons ici les tests plus communément usités.

- Le test de mutation reverse sur *Salmonella typhi murium* (test d'Ames) a été élaboré en 1973. C'est le test de mutations géniques sur cellules procaryotes le plus utilisé pour le dépistage précoce de substances génotoxiques. Le principe du test consiste à évaluer la capacité d'un produit à induire des mutations reverses (his-) sur les *Salmonella typhi* (his+). Sa sensibilité est de 56 à 90%. Sa spécificité de 57 à 97%. Les cancérigènes épigénétiques comme l'amiante, les hormones, les promoteurs ne sont donc pas détectables par cette méthode.
- La détection des lésions primaires de l'ADN peut se faire par le test des comètes et le test de synthèse non programmée de l'ADN. Le test des comètes est une technique simple qui permet de détecter *in vitro* ou *in vivo* des cassures chromosomiques simple ou double brin. Le principe repose sur l'extraction des noyaux des cellules et leur observation au microscope après migration dans un champ électrique. Les noyaux sans ADN lésé apparaissent sphériques, les noyaux avec ADN lésé prennent la forme d'une comète. Sa sensibilité serait de 88% et la spécificité de 64%. Il s'agit d'un test simple à mettre en œuvre mais délicat à interpréter : les effets cytotoxiques mais aussi apoptotiques peuvent produire des comètes⁵.

⁵ Botta A – Contribution des tests à court terme. In : Pairon JC, Brochard P, Le Bourgeois JP, Ruffié P- Les cancers professionnels. Tome I. Paris : Ed. Margaux Orange; 2005:146-52,688p.

Tableau n° 3 : Tests de génotoxicité et de mutagenèse

<p>A. Tests pouvant être utilisés pour la détermination du pouvoir mutagène ou cancérogène</p> <ul style="list-style-type: none">-Test de mutation réverse avec <i>Salmonella typhimurium</i>-Test de mutation réverse avec <i>Escherichia coli</i>-Test de mutation génique avec des cellules de mammifères en culture-Test de mutation génique avec <i>Saccharomyces cerevisiae</i>-Tests cytogénétiques <i>in vitro</i>-Synthèse non programmée d'ADN <i>in vitro</i>-Test d'échange de chromatides sœurs <i>in vitro</i>-Recombinaison mitotique avec <i>Saccharomyces cerevisiae</i>-Tests cytogénétiques <i>in vivo</i>-Test du micro-nucleus-Test de récessivité létale liée au sexe chez <i>Drosophila melanogaster</i> <p>B. Tests confirmant l'activité <i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none">-Tests cytogénétiques <i>in vivo</i>-Test du micro-nucleus-Test « spot » chez la souris-Test de récessivité létale liée au sexe chez <i>Drosophila melanogaster</i> <p>C. Tests confirmant l'effet sur des cellules germinales et applicables pour l'estimation d'un risque au niveau génétique</p> <ul style="list-style-type: none">-Test de dominance létale-Test de translocation héréditaire-Test de cytogénétique sur des cellules germinales de mammifères. <p>Source :OECD (OCDE), 1987</p>
--

- La détection des lésions chromosomiques peut se faire par le test de numération des micronoyaux. Il est adapté à la mise en évidence de processus épigénétiques se traduisant par des anomalies chromosomiques quantitatives, des remaniements génomiques complexes résultants de cassures chromosomiques. Le principe consiste à déterminer au sein d'une cellule bloquée en interphase les cellules présentant des entités nucléaires (fragments ou chromosomes entiers) indépendants du noyau principal. Ce test suppose d'avoir un support cellulaire apte à proliférer. Les lymphocytes, les fibroblastes pulmonaires, les cellules ovariennes de hamster sont couramment utilisées par cette méthode. Le test est utilisé *in vivo* chez l'animal sur des cellules de moelle osseuse, les lymphocytes et les érythrocytes. Ce test est applicable pour la mise en évidence d'évènements clastogènes (lésions portant sur plusieurs kilobases) et aneugènes (atteinte du matériel protéique intervenant dans la division cellulaire) mais ne permet pas de déterminer la nature des lésions chromosomiques ni le site d'action génotoxique.

- La détection des adduits de l'ADN peut venir compléter ce test. Son principe repose sur la digestion enzymatique de l'ADN en nucléotides, suivi de leur marquage en 5' à l'aide d'un isotope radioactif du phosphore (^{32}P). La quantification des adduits repose sur une séparation par chromatographie et une autoradiographie. C'est la technique la plus sensible connue à ce jour pour déceler un nucléotide modifié sur 10^8 nucléotides avec une quantité faible d'ADN (10 μg). Le potentiel cancérigène de composés tels que les amines aromatiques, les dérivés aliphatiques, les goudrons de houille, les hormones, a été révélé par cette technique. Celle-ci nécessite néanmoins encore d'être standardisée afin de pouvoir comparer des populations exposées-non exposées sur une plus grande échelle.
- En outre, le développement récent des techniques de toxicogénomique (puces à ADN, RT-PCR en temps réel)- devrait permettre d'améliorer la détection et la quantification des niveaux d'expression coordonnée des gènes en présence de cancérigènes physiques ou chimiques introduits *in vitro* ou *in vivo* et donc de mesurer les conséquences des mutations et/ou des interactions produites par les toxiques vis-à-vis du génome humain. Ces approches innovantes intègrent non seulement la quantification de l'expression génique mais également l'état des processus de régulation et les divers stades de coopération et de coordination de l'expression de groupes de gènes.

De nombreuses sociétés savantes se sont développées dans le monde ayant pour objectif la classification des substances cancérigènes. La première d'entre elle, le Centre International de Recherche pour le Cancer (CIRC) ou International Agency for Research on Cancer (IARC), a été créée en mai 1965, par une résolution le désignant comme une prolongation de l'Organisation Mondiale de la Santé, après une initiative française. Les membres fondateurs sont la République Fédérale d'Allemagne, la France, l'Italie, le Royaume-Uni et les Etats-Unis d'Amérique. Le siège de l'agence est situé à Lyon. Ainsi, le Centre International pour la Recherche sur le Cancer (CIRC) publie des monographies et a classé environ 700 composés, mélanges et circonstances d'exposition en divers groupes avec des niveaux de preuve (tableaux n° 4 et n° 5).

Tableau n° 4 : Classification des cancérogènes

Classification des cancérogènes			
Agence internationale de recherche sur le cancer (IARC)			
		Degré de preuve	
		Humain	Animal
Groupe 1	Cancérogène chez l'humain	Suffisant	-----
Groupe 2A	Cancérogène probable chez l'humain	Limité	Suffisant
Groupe 2B	Cancérogène possible chez l'humain	Limité	< Suffisant
Groupe 3	Non classifiable	< Limité	Suffisant
Groupe 4	Probablement non cancérogène chez l'humain	< Limité	< Suffisant

Aux Etats-Unis, se sont développées l'Environmental Protection Agency (EPA), le National Toxicology Program (NTP) et le SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) qui fournissent des statistiques sur l'incidence des cancers, la prévalence, la survie. Chacune de ces agences a sa propre classification des substances cancérogènes (tableau n° 5) :

Tableau n° 5 : Classification des substances cancérogènes selon l'EPA, le CIRC et le NTP.

Substance chimique	EPA (2003)	CIRC (2003)	NTP (2003)
Aflatoxine	-	1	A
4-Aminobiphenol	-	1	A
Arsenic	A	1	A
Asbestose	A	1	A
Benzene	A	1	A
Benzidine	A	1	A
Bis(chloroethyl)ether	A	1	A
Coal tars	-	1	A
Coke Production	-	1	A
Chromium (VI)	A	1	A
Diethylstilbestrol	A	1	A
Direct black 38	A	-	B
Direct blue 6	A	-	B
Direct brown 95	A	-	-
Estrogens	-	1	A
Methyl hydrazine	A	-	-
2-Naphtylamine	-	1	A
Nickel	A	1	A
Tabac	-	1	-
Vinyl chloride	A	1	A

2 - Mécanismes de la cancérogenèse chimique

La grande majorité des cancers sont liés à des comportements individuels ou à des expositions environnementales. Le mécanisme peut être de type génétique ou épigénétique.

2a - Mécanismes génétiques

La phase d'initiation

Elle fait intervenir la formation d'adduits ou des espèces activées de l'oxygène.

- Formation d'adduits

L'agent carcinogène agit le plus souvent par l'intermédiaire de ses métabolites électrophiles (carcinogène activé) pour former des adduits sur les bases nucléotidiques de l'ADN (figure n°3).

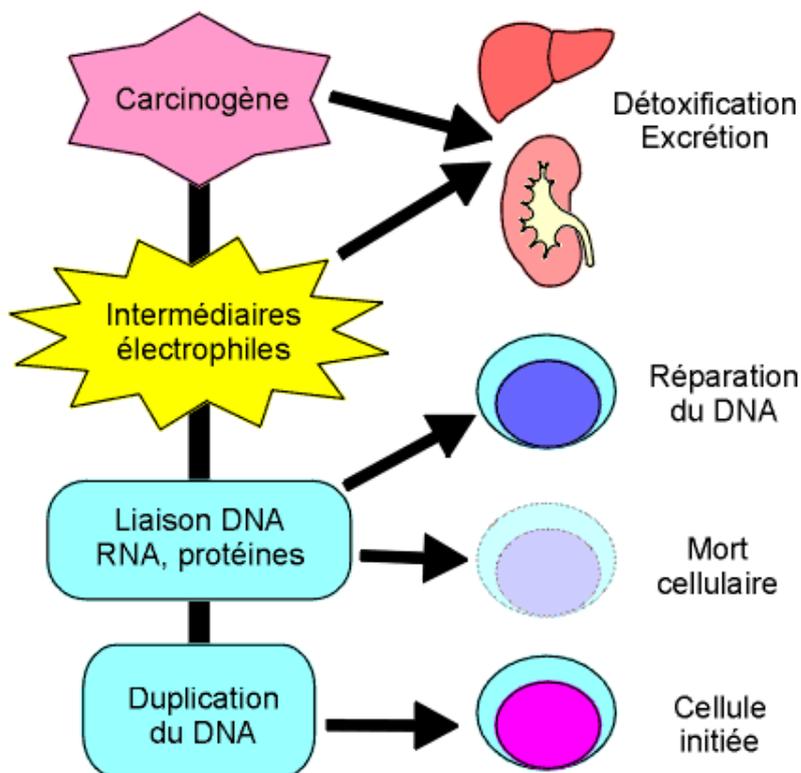


Figure n°3 : mécanisme de la formation des adduits au cours de l'initiation cellulaire

La phase d'activation des carcinogènes fait appel aux enzymes dépendant du cytochrome P450. Le carcinogène activé peut être éliminé par conjugaison par la famille des glutathion-

S-transférases, et N-acétyl-transférases : on comprend à ce stade que le polymorphisme génétique, la présence ou absence de ces enzymes métabolisant des xénobiotiques, vont pouvoir influencer sur l'élimination ou la rémanence des carcinogènes activés (figure n°4).

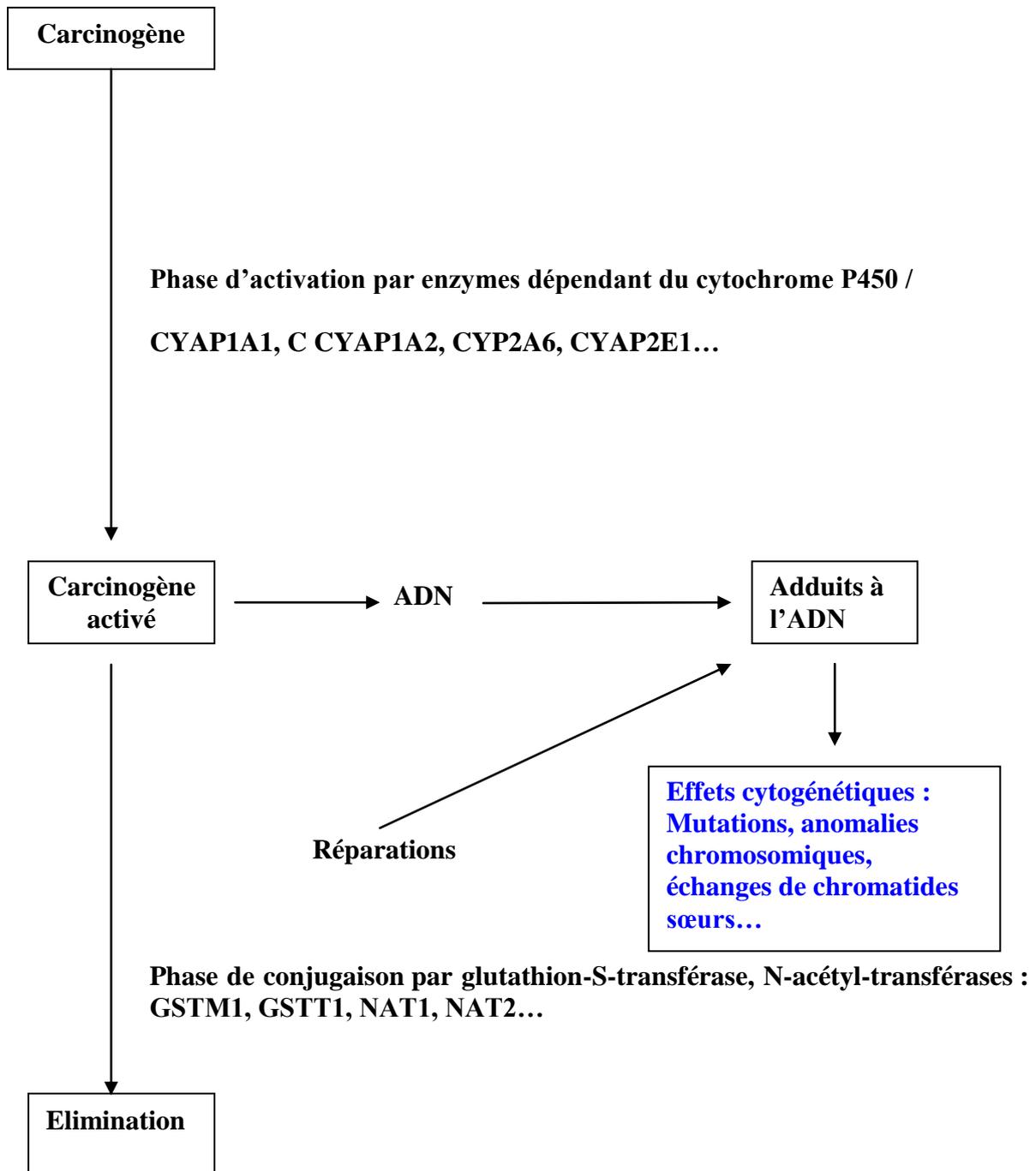


Figure n°4 : mécanismes entrant en jeu dans le métabolisme des cancérrogènes chimiques conduisant à la formation d'adduits ou à leur élimination.

- Formation de radicaux libres

Il s'agit d'un autre type de mécanisme qui conduit aussi à l'initiation des cellules tumorales. On estime que le génome d'une cellule humaine subit environ 200 000 lésions oxydatives par jour qui sont réparées. Les radicaux libres interviennent dans des processus variés tels que les lésions chimiques et d'irradiation, la toxicité de l'oxygène et d'autres gaz, le vieillissement cellulaire, la destruction microbienne par les phagocytes, les lésions inflammatoires, la destruction de cellules tumorales par les macrophages.

Schématiquement, la formation de radicaux libres peut résulter de *l'absorption d'énergie ionisante*, lumière ultraviolette, rayons X (les radiations ionisantes peuvent ainsi hydrolyser l'eau en radicaux libres hydroxyles (OH[•]) et hydrogène (H[•])), du *métabolisme enzymatique de produits chimiques exogènes ou de médicaments* et de *réactions d'oxydoréduction* qui surviennent au cours de processus métaboliques normaux.

Les effets de ces réactifs sont extrêmement nombreux, trois réactions peuvent être retenues :

- *La peroxydation des lipides membranaires*
- *Les lésions oxydatives des protéines*
- *Les lésions de l'ADN*

Les réactions des radicaux libres avec la thymine dans l'ADN nucléaire et mitochondrial provoquent des cassures des brins d'ADN. Ces lésions de l'ADN sont impliquées dans l'acquisition d'un phénotype malin des cellules. Lorsqu'elles atteignent les protéines entourant l'ADN, elles peuvent conduire lors de la mitose ou de la méiose à une perte de chromosome.

A titre d'exemple, les fibres d'amiante agissent essentiellement par production de radicaux libres.

La phase de promotion

Les cellules initiées peuvent rester longtemps quiescentes du fait de notamment de la répression exercée par des cellules normales voisines par le biais de médiateurs de la communication intercellulaire. La transformation et la prolifération sont sous la dépendance de facteurs promoteurs qui ne sont pas génotoxiques et qui ont des mécanismes d'action tels que : effets mitogènes, interactions avec les enzymes de la phase I du métabolisme, mécanismes d'inhibition de la communication intercellulaire, phénomènes inflammatoires, perturbations hormonales. La promotion permet ainsi l'expression de la mutation sous forme de clones de cellules transformées. On peut citer dans ce cadre, les hormones naturelles, la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine, les esters de phorbol. Certains composés sont à la fois initiateurs et promoteurs tels que la N-nitroso-nor-nicotine, la β -naphthylamine, l'aminostilbène, l'aministilbène, l'o-toluidine, l'o-nitrotoluène et la di-n-butylnitrosamine.

La phase de progression

Elle concerne l'extension locale de la tumeur puis la formation de métastases à distance.

2b - Mécanismes épigénétiques

Le mécanisme principal de transformation des cellules normales en cellule néoplasique est génétique. Mais il existe aussi des mécanismes n'affectant pas la séquence de l'ADN. Il peut s'agir de modification de conformation géométrique de l'ADN, des protéines l'entourant (histones), de modification de forme des protéines du cytosol ou des membranes. Nous citerons un exemple identifié en cancérologie générale (méthylation de l'ADN) et un exemple concernant la biogénotoxicologie (modification des protéines de jonction intercellulaires).

- La **méthylation** de l'ADN est impliquée dans le développement embryonnaire qui nécessite l'activation et la désactivation séquentielle de différentes classes de gènes. Dans les cellules humaines 2 à 5 % des résidus cytosine de l'ADN génomique sont méthylés sous forme de 5-methyl cytosine. La méthylation des séquences régulatrices des gènes inhibe leur transcription. Les tissus cancéreux sont globalement

hypométhylés, mais l'hyperméthylation est un processus très répandu d'inactivation de gènes spécifiques au cours de l'oncogenèse. Parmi les gènes fréquemment inactivés par méthylation, figure le gène suppresseur de tumeur p16 qui joue un rôle important dans le contrôle de la transition G1-S du cycle. L'expression de p16 est abolie dans près de 40 % des cancers humains, son inactivation peut faire appel à des mutations et à des délétions par perte d'hétérozygotie, mais également à des méthylations comme c'est le cas dans 25 % environ des cancers bronchiques, 30 % des cancers du sein et 40 % des cancers du colon.

- Certains cancérogènes épigénétiques réduisent la **GJIC** : ce sont le TCDD (tetrachlorodibenzopara-dioxine), les PCB (polychlorobiphényles), et en particulier le 3, 4, 5,3',4'-pentachlorobiphényl et le lindane⁶.

Les cancérogènes solides tels que l'amiante, les métaux, les hormones agiraient principalement par des mécanismes épigénétiques.

⁶ Loch-Caruso R, Galvez MM, Brant K, Chung D. Cell and toxicant specific phosphorylation of connexin 43: effects of lindane and TPA on rat myometrial and WB-F344 liver cell gap junctions. *Cell Biol Toxicol* 2004;**20**:147-69

II – FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET PROFESSIONNELS

A - Données épidémiologiques

1 - Données épidémiologiques générales

La Commission d'Orientation sur le Cancer, dans son rapport daté du 16 janvier 2003 donne une estimation de la part des différents facteurs intervenant dans la survenue des cancers (tableau n° 6). D'autres données sont citées dans le rapport final de la Commission d'Orientation de 12 février 2004, document préliminaire pour le Plan national Santé Environnement (PNSE). Dans les pays industrialisés, 7 à 20 % des décès par cancer seraient imputables à des facteurs environnementaux non liés à des comportements individuels. Ces facteurs dits « environnementaux » comprennent les expositions liées à une activité professionnelle (tableau n° 7). Toutes ces données montrent que la part imputable à l'activité professionnelle dans la survenue des cancers est de 4 à 8,5 %. Cependant, la part héréditaire reste difficile à préciser pour la plupart des cancers.

Higginson et Muir, en 1977, estimaient la part des cancers liés à l'environnement et aux expositions professionnelles à 80 %⁷. Dans un rapport publié dans le Journal of the National Cancer Institute, Doll et Peto font une synthèse de la littérature scientifique et estiment que 2 % (1 à 5 %) des décès par cancer sont liés à la pollution, 4 % (2 à 8 %) à l'activité professionnelle⁸. La part du tabac est estimée à 30 % des décès par cancer. La part attribuable, si l'on additionne les autres facteurs de risque (alcool, alimentation, comportement sexuel, exposition aux produits de l'industrie, origine géographique, infections) atteindrait 97 %. Selon ces auteurs, il ne resterait donc que 3 % des cancers sans cause apparente. En 2005, l'American Cancer Society note que la part du cancer dans la mortalité devient prépondérante au USA dès 1999 et fait part d'une augmentation de l'incidence des cancers de 85 % entre 1950 et 2001, Entre 1973 et 1992, l'incidence des cancers passe de 385 à 510/100 000 et se stabilise à 477/100 000 en 2000 aux USA. En France, on dénombrait 170 000 nouveaux cas de cancer en 1980, 280 000 en 2000 soit 500 /100 000 habitants (tableau n° 8). Richard Clapp, Geneviève Howe et Molly Jacobs Lefevre publient en 2005, une étude à partir des données du NCIS (National Cancer Institute

⁷ Higginson J, Muir CS. Determination of the importance of environmental factors in human cancer: the role of epidemiology. *Bull Cancer* 1977;**64**:365-84

⁸ Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981;**66**:1191-308

Surveillance) qui estime l'augmentation d'incidence, la part des facteurs héréditaires et environnementaux dans la survenue de chaque type de cancer⁹.

Concernant le cancer du sein l'incidence a cru de 99 à 135/100 000 entre 1972 et 2000, Les facteurs incriminés sont endogènes et exogènes : facteurs génétiques héréditaires (27 % des cas), environnementaux (6 % des cas), rayonnements ionisants, xeno-œstrogènes compris dans les pesticides, les hydrocarbures, et certains médicaments (le diethylstilbestrol). Le bisphénol A contenu dans les résines époxy, le polychlorure vinyle (contenu aussi dans la fumée du tabac), le p-nonyl phénol additif du styrène dans l'industrie du plastique, sont incriminés; ceux-ci agiraient comme des xéno-œstrogènes ou œstrogènes naturels. Les expositions à la dieldrine, au DDT, aux PCB, à l'hexachlorobenzène (lindane), à l'heptachlore époxyde, à la triazine sont aussi soupçonnées d'augmenter le risque de cancer du sein¹⁰. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les dioxines sont aussi incriminés¹¹.

Tableau n°6 : Mortalité par cancer en France : fréquences des principaux facteurs de risque selon le Rapport de la Commission d'Orientation sur le Cancer, du 16 janvier 2003 disponible sur <http://www.ladocumentationfrancaise.fr/rapportspublics/034000017/index.shtml>, consulté le 23/03/09.

Facteurs de risque	Mortalité (%)
Régime alimentaire	35 %
Tabagisme	30 %
Alcool	10 %
Infections	10 %
Habitudes sexuelles et de reproduction	5 %
Expositions professionnelles	4 %
Pollution	2 %
Actes médicaux	1 %
Produits industriels (hors expositions)	Moins de 1 %

⁹ Clapp RW, Howe G, Jacobs Lefevre M. Environmental and occupational causes of cancer. A review of Recent Scientific Literature. Massachusetts : Lowell Center, 2005:46p.

¹⁰ Breast Cancer Fund and Breast Cancer Action. *State of the Evidence: What is the connection between the environment and breast cancer?* Fourth edition 2006: edited by Nancy Evans, Accessed January 14, 2009 at <http://www.bcaction.org/PDF/StateofEvidence.pdf>, 86p.

¹¹ Brody JG, Rudel RA. Environmental pollutants and breast cancer. *Environ Health Perspect* 2003;**111**:1007-19

Tableau n° 7: Proportion de cancers imputables à des facteurs non liés à des comportements individuels selon le Plan National Santé Environnement du 21 juin 2004, rapport disponible sur <http://sante.gouv.fr/htm/dossiers/pnse/rapport.pdf>, consulté le 23/03/09.

Facteur de risque	Mortalité (%)
Activités professionnelles	4 à 8,5 %
Contaminants environnementaux présents dans l'air, l'eau ou les sols	1 à 5 %
Facteurs géophysiques (radiations ionisantes, ultraviolets)	2 à 4 %
Produits industriels de consommation	1 à 2 %
Contaminants environnementaux présents dans l'alimentation	Moins de 1 %

Tableau n° 8 : Synthèse de l'incidence des cancers en 2000 selon le type de localisation et nombre de cas de décès en France par type de cancer

	FRANCE	USA
■ Sein :	42 000 (70/100 000)	135/100 000
■ Prostate :	40 000 (66/100 000)	179/100 000
■ Colon – rectum :	36 000 (60/100 000)	53/100 000
■ Poumon :	28 000 (46/100 000)	55/100 000
■ ORL :	15 000 (25/100 000)	12/100 000
■ Vessie :	11 000 (18/100 000)	21/100 000
■ LNH :	9 900 (16/100 000)	20/100 000
■ Rein :	8 200 (13/100 000)	12/100 000

Nombre de cas de décès en France par type de cancer en 2000

■ Poumon :	27 000
■ Côlon – rectum :	16 000
■ Sein :	12 000
■ Prostate :	10 000

L'incidence du cancer du poumon a cru de 49/100 000 à 63/100 000 entre 1973 et 2000. Les facteurs environnementaux reconnus sont les poussières de minerai (plomb, cuivre, étain) contenant de l'arsenic, les pesticides contenant de l'arsenic. Les métaux tels que le béryllium, le chrome, le cobalt et plus récemment le cadmium ont été inscrits dans les tableaux de maladie professionnelle en France. L'exposition aux rayonnements ionisants ne fait pas de doute dans la genèse des cancers pulmonaires, elle apparaît au tableau n° 6 des maladies professionnelles en France (dernière mise à jour par décret du 22 juin 1984).

L'incidence du cancer de vessie a progressé entre 1973 et 2000 de 18/100 000 à 21,5/100 000. Les facteurs environnementaux reconnus sont les amines aromatiques incluant la 2-naphtylamine, la benzidine, le 4-aminobiphenyl, la chlornaphazine, utilisés dans la fabrication de colorants, teintures tels que l'auramine, le magenta, l'arsenic inorganique présent dans l'eau ou des médicaments tels que la solution de Fowler¹². L'industrie du caoutchouc serait aussi à risque pour le cancer de vessie, le risque relatif (RR) variant de 1,6 à 5,2 selon 6 études de cohortes et l'odds ratio (OR) variant de 1,5 à 5,7 selon 11 études cas témoins¹³. L'industrie du pétrole, la pétrochimie, et la combustion des dérivés sont aussi suspectées lors de l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) des carburants ou des goudrons.

L'incidence des cancers du colon semble stable entre 1973 et 2000 : 39,9 à 38,8/100 000. Les facteurs alimentaires ont largement été décrits en particulier la production d'amines hétérocycliques et de benzo(a) pyrène dans les produits de la pyrolyse lors de la cuisson de viandes ou huiles à haute température. Un lien avec des facteurs d'exposition professionnelle n'est pas établi.

L'incidence des lymphomes non Hodgkiniens a cru de 10 à 20/100 000 entre 1973 et 2000, Davis *et al.* notent une augmentation de l'incidence et de mortalité dans la population générale, quelque soit la classe d'âge, aux USA et en Grande Bretagne entre 1969 et 1986¹⁴. Steinmaus *et al.* mettent en évidence un risque relatif à 1,22 (IC 95 % [1,02-1,47]) dans une méta-analyse de 22 études de cohortes de salariés exposées au benzène (raffineries). Le risque

¹² Siemiatycki J, Richardson L, Straif K, Latreille B, *et al.* Listing occupational carcinogens. *Environ Health Perspect* 2004;**112**:1447-59

¹³ Ward EM, Burnett CA, Ruder A, Davis-King K. Industries and cancer. *Cancer Causes Control* 1997;**8**:356-70

¹⁴ Davis DL, Blair A, Hoel DG. Agricultural exposures and cancer trends in developed countries. *Environ Health Perspect* 1993;**100**:39-44

relatif passe à 1,49 lorsque les auteurs excluent les études où des sujets non exposés avaient été inclus dans les groupes exposés et le risque relatif passe à 2,12 lorsque l'on exclut les études qui ne tiennent compte que des facteurs professionnels¹⁵.

Parmi les pesticides : les composées phénoxy-, les chlorophénols (xyloprotecteurs), les organophosphorés, le méthyl bromide, l'éthylène dibromide sont en cause mais les résultats des études parfois contradictoires¹⁶. Le rôle du 2-4 D (acide 2,4 dichloro-phénoxy-acétique) et de la dioxine (2,3,7,8-tétrachloridibenzoparadioxine) est controversé¹⁷.

Le rôle du trichloréthylène est relaté par Wartenberg *et al.* dans le cadre d'une revue la littérature faisant la synthèse de 80 études de cohorte (RR = 1,5 ; IC 95 % [0,9-2,3])¹⁸.

Concernant la maladie de Hodgkin, l'incidence entre 1973 et 2000 décroît de 3,4/10000 à 2,8/100 000 ; les solvants tel le trichloréthylène ou les pesticides (phénoxy-acides, chlorophénols) ont été incriminés sans augmentation significative des risques.

L'incidence des leucémies semble être aussi en hausse de 12,5/100 000 à 13,4/100 000 entre 1973 et 2000 aux USA. Les facteurs retrouvés sont essentiellement les solvants¹⁹. Il a ainsi été démontré que l'exposition à un ppm de benzène pendant 40 ans doublerait de risque de décès par leucémie. Il est fortement suspecté que l'exposition parentale aux pesticides (12 études vont dans ce sens) augmente le risque chez l'enfant à naître ou si l'exposition se fait durant l'enfance, l'odd ratio variant de 0,4 à 6 suivant la durée d'exposition pendant la grossesse^{20, 21}. Si le lien entre leucémie et rayonnements ionisants est bien démontré, l'effet des rayonnements non ionisant et des CEM est controversé. Peu d'études ont montré un lien leucémie et rayonnements non ionisants car la plupart des études souffrent de biais méthodologique dans le recueil de l'information²².

¹⁵ Steinmaus C, Smith AH, Jones RM, Smith MT. Meta-analysis of benzene exposure and non-Hodgkin lymphoma: biases could mask an important association. *Occup Environ Med.* 2008;**65**:371-8

¹⁶ Dich J, Zahm SH, Hanberg A, Adami H. Pesticides and cancer. *Cancer Causes Control* 1997;**8**:420-43

¹⁷ Garabrant DH, Philbert MA. Review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) epidemiology and toxicology. *Crit Rev Toxicol* 2002;**32**:233-57

¹⁸ Wartenberg D, Reyner D, Scott CS. Trichloroethylene and cancer: epidemiologic evidence. *Environ Health Perspect* 2000;**108**(Suppl 2):161-76

¹⁹ Lynge E, Anttila A, Hemminki K. Organic solvents and cancer. *Cancer Causes Control* 1997;**8**:406-19

²⁰ Daniels JL, Olshan AF, Savitz DA. Pesticides and childhood cancers. *Environ Health Perspect* 1997;**105**:1068-77

²¹ Colt JS, Blair A. Parental occupational exposures and risk of childhood cancer. *Environ Health Perspect* 1998;**106**(Suppl 3):909-25

²² Ahlbom A, Green A, Kheifets L, Savitz D, *et al.* Epidemiology of health effects of radiofrequency exposure. *Environ Health Perspect* 2004;**112**:1741-54

L'incidence du cancer du rein a cru de 7,9 à 12,3/100 000. En terme de facteurs de risques on retient : les métaux : arsenic, cadmium²³, les solvants tels le trichloréthylène, ou le tetrachlorethylène²⁴, les pesticides avec des cas de tumeur de Wilm's chez les enfants dont le père a été exposé²⁵. Les professionnels de la distribution du gazole auraient aussi un risque plus élevé de cancer du rein²⁶.

Les cancers ORL seraient en décroissance aux USA de 17,2/100 000 à 7,9/100 000 entre 1973 et 2000. Les substances suspectées sont les solvants (trichloréthylène, tetrachlorethylène)^{13,19}. En France, le carcinome du nasopharynx provoqué par l'aldéhyde formique est désormais indemnisé au titre du tableau 43bis suite au décret n°2009-56 du 15 janvier 2009.

Concernant les tumeurs cérébrales, l'incidence est en hausse de 5,3/100 000 à 6,7/100 000 de 1973 à 2000. Les facteurs évoqués sont le plomb^{27,28}, les pesticides en particulier chez les enfants de parents exposés²⁹, et chez les enfants ayant été exposés in utero aux dérivés nitrosourés³⁰. Les ondes électromagnétiques de basse fréquence sont en cause chez les enfants de salariés exposés³¹. Plusieurs études sont en cours relatant un risque probable pour les expositions prolongées plusieurs années (risque certain pour une exposition plus de 20h/mois selon publication de l'AFSSET en 2008).

²³ Landrigan PJ, Boffetta P, Apostoli P. The reproductive toxicity and carcinogenicity of lead: a critical review. *Am J Ind Med* 2000;**38**:231-43

²⁴ Wartenberg D, Reyner D, Scott CS. Trichloroethylene and cancer: epidemiologic evidence. *Environ Health Perspect* 2000;**108**(Suppl 2):161-76

²⁵ Bunin GR. Non genetic causes of childhood cancers: evidence from international variation, time trends, and risk factor studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;**199**:91-103

²⁶ Ward E, Burnett C, Ruder A, Davis-King K. Industries and cancer. *Cancer Causes Control* 1997;**8**:356-70

²⁷ Cocco P, Heineman EF, Dosemeci M. Occupational risk factors for cancer of the central nervous system (CNS) among US women. *Am J Ind Med* 1999;**36**:70-4

²⁸ Navas-Acien A, Pollan M, Gustavsson P, Plato N. Occupation, exposure to chemicals and risk of gliomas and meningiomas in Sweden. *Am J Ind Med* 2002;**42**:214-27

²⁹ Zahm SH, Ward MH. Pesticides and childhood cancer. *Environ Health Perspect* 1998;**106**(Suppl 3):893-908

³⁰ Bunin GR. Non genetic causes of childhood cancers: evidence from international variation, time trends, and risk factor studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;**199**:91-103

³¹ Baldwin RT, Preston-Martin S. Epidemiology of brain tumors in childhood -a review. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;**199**:118-31

2 - Données chiffrées relatives aux cancers professionnels en France

On assiste, en France, à une augmentation régulière des maladies professionnelles reconnues depuis 1990 : les cancers professionnels reconnus en dehors de ceux liés à l'amiante occupent une part infime. A titre d'exemple, sur 41347 maladies professionnelles (MP) reconnues en 2005³² : - 73 % sont des affections péri-articulaires, - 14 % sont des maladies dues à l'amiante (6536 cas dont 821 cancers), 5 % sont des affections chroniques du rachis lombaire. Les cancers professionnels autres que ceux liés à l'amiante représentent moins de 1 % des cas reconnus.

Au titre du Tableau n°4 des Maladies Professionnelles, qui concerne les affections hématologiques acquises, isolées ou associées, de type hypoplasique, aplasique ou dysplasique liées à une exposition au benzène, le nombre de cas reconnu en France en 2005 est de 7 cas pour les « anémie, leuconéutropénie, thrombopénie », 2 cas pour les hypercytoses d'origine myélodysplasique, 10 cas pour les syndromes myéloprolifératifs et 24 cas pour les leucémies (sous réserve d'une durée d'exposition d'au moins un an). Au titre du Tableau n°6 des maladies professionnelles qui concerne les salariés exposés aux rayonnements ionisants, le nombre de cas reconnus en 2005 est le suivant : leucémies : 7 cas, cancer bronchique pulmonaire par inhalation : 5 cas, sarcome osseux : 1cas, leucopénie : 1cas.

Au total, on ne retrouve que très peu de cas reconnus en maladie professionnelle alors que l'incidence des leucémies a progressé de 1980 à 2005 de 3,6 à 4,5/100 000 chez les hommes et de 2,8 à 3,5/100 000 chez les femmes. Concernant les lymphomes non hodgkiniens, l'incidence a doublé en France entre 1980 et 2005 (6,2 à 12,1/100 000 chez les hommes, 4,5 à 8,2 chez les femmes) sans qu'aucun cas ne soit reconnu en maladie professionnelle, à noter de surcroît l'absence de Tableau maladie professionnelle concernant les lymphomes malgré les publications faisant état de cette augmentation depuis 1969 en particulier chez les agriculteurs mettant en cause les pesticides qui agiraient selon un mécanisme génétique et épigénétique sur le système immunitaire³³.

³² Source : Statistiques Technologiques des Maladies Professionnelles, Caisse Nationale de l'Assurance Maladie, Direction des Risques Professionnels, année 2005

³³ Davis DL, Blair A, Hoel DG. Agricultural exposures and cancer trends in developed countries. *Environ Health Perspect* 1993;**100**:39-44

3 - Exemple de l'amiante et des cancers de l'ethmoïde

En France, l'INVS estime que le nombre annuel des cancers incidents liés à des expositions professionnelles dans une fourchette allant de 2400 à 5400 dont 1870 à 3700 pour le seul amiante. Le CIRC ne propose pas de fourchette et estime à 2610 le nombre de cas incidents dont 969 liés à l'amiante. Selon Marcel Goldberg, cette différence n'est pas due au choix du risque relatif (RR) qui est de 1,48 pour le CIRC et 1,50 selon les résultats d'une méta-analyse de 69 cohortes³⁴. La publication utilisée par le CIRC retient une prévalence de 9,4 % pour les expositions à des niveaux moyens ou élevés et 9,4 % de la population exposée à des niveaux faibles³⁵. La différence est due au fait que le CIRC n'a retenu dans son calcul de la fraction attribuable que les sujets considérés moyennement ou très exposés. Il ressort, selon Marcel Goldberg, une sous-estimation de 50 % des cas attribuables.

Selon l'INVS, on ne peut pas non plus retenir le nombre de cas reconnus en maladie professionnelle pour estimer la fraction attribuable des adénocarcinomes de l'ethmoïde dus à la poussière de bois. En effet l'indemnisation ne concerne que le régime général, qui couvre en France, 80 % des salariés. Or dans le cas des adénocarcinomes de l'ethmoïde, la grande majorité des salariés sont des artisans, non affiliés au régime général de la sécurité sociale, ceux-ci ne bénéficient donc pas de la reconnaissance en maladie professionnelle.

En France, l'adénocarcinome de l'ethmoïde est reconnu au titre du tableau 47B en maladie professionnelle par décret du 22 janvier 1982. Le tableau 47B des maladies professionnelles en lien avec l'inhalation de poussière de bois (travaux d'usinage du bois tels que sciage, fraisage, rabotage, perçage et ponçage ou de travaux effectués dans les locaux où sont usinés les bois) a été élaboré par Monsieur le Professeur Curtès et Monsieur le Professeur Bourdinière à Rennes. En 2005, la Caisse Nationale d'Assurance Maladie a reconnu 62 cas au titre du Tableau 47 B. C'est donc le deuxième cancer professionnel reconnu en terme d'incidence après les cancers liés à l'amiante (mésothéliome et cancer broncho-pulmonaire) où 821 cas ont été reconnus en maladie professionnelle en France en 2005. En Loire

³⁴ Goodman M, Morgan RW, Ray R, Malloy CD, *et al.* Cancer in asbestos-occupational cohorts: a meta-analysis. *Cancer Causes Control* 1999;**10**:453-65

³⁵ Iwatsubo Y, Pairon JC, Boutin C, Ménard O, *et al.* Pleural mesothelioma: dose-response relation at low level of asbestos exposure in a French population-based case control study. *Am J Epidemiol* 1998;**148**:133-42

Atlantique, l'incidence de l'adénocarcinome de l'ethmoïde est d'environ 20 nouveaux cas par an pour 1 770 000 habitants soit 1,07/100 000 habitants³⁶.

Au total, il semble que la part attribuable aux cancers professionnels est fortement sous-estimée en France par le seul recensement du nombre de maladies professionnelles déclarées. L'estimation à partir des études de cohorte et du risque relatif semble plus pertinente à condition d'établir une matrice emploi-exposition fiable, ce qui est peu développé ce jour pour l'ensemble des cancers. Les matrices existantes élaborées par l'INVS à ce jour concernent l'amiante et le cuir. Il nous semblera donc intéressant de proposer un modèle de mesure plus simple ou « indice d'exposition » permettant de préciser le degré d'imputabilité des facteurs professionnels au terme de notre travail.

B - Facteurs environnementaux

Nous présenterons les molécules ou agents physiques faisant partie de notre environnement quotidien et fortement suspectés dans la genèse des cancers chez l'homme, afin de retenir ceux d'entre eux qui participent, par leur mécanisme d'action, à la genèse des cancers nasosinusiens ou ceux dont des métabolites entrent dans la composition du bois.

1 - Substances retrouvées dans les aliments qui ont fait la preuve de leur cancérogénicité chez l'animal et l'homme

- le premier cas est illustré par la production d'HAPs tels que le **benzo(a)pyrène** (figure n°5) et **d'amines hétérocycliques (HCAs)** à partir de viandes fumées ou grillées.

On estime que notre régime alimentaire fournit 3 μg HAPs /jour³⁷, ce qui correspond à la consommation d'un paquet de cigarettes par jour (2-5 μg HAP /jour). Ainsi l'exposition alimentaire peut être significative chez des non-fumeurs et même dépasser le niveau des fumeurs réguliers.

³⁶ Le Bodic MF, Barreau L, Champion L. Incidence des cancers en Loire Atlantique. Années 1998-1999-2000. Registre des cancers de Loire-Atlantique. Nantes : ARCLA, Association du Registre des Cancers de Loire Atlantique; 2002:77p.

³⁷ Liroy PJ, Greenberg A. Factors associated with human exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Ind Health* 1990;6:209-23

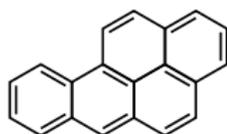


Figure n° 5 : Hydrocarbure aromatique polycyclique : le benzopyrène

- Les amines hétérocycliques (figure n°6) sont formées pendant la cuisson à hautes températures par la pyrolyse des protéines, des acides aminés ou de la créatine et peuvent être présentes dans le régime humain dans des concentrations substantielles selon les habitudes de cuisson³⁸. Il existe une corrélation entre la consommation de nourriture contenant des amines hétérocycliques avec l'apparition de cancer du colon^{39,40,41} bien que cette corrélation ne soit pas confirmée par toutes les études⁴².

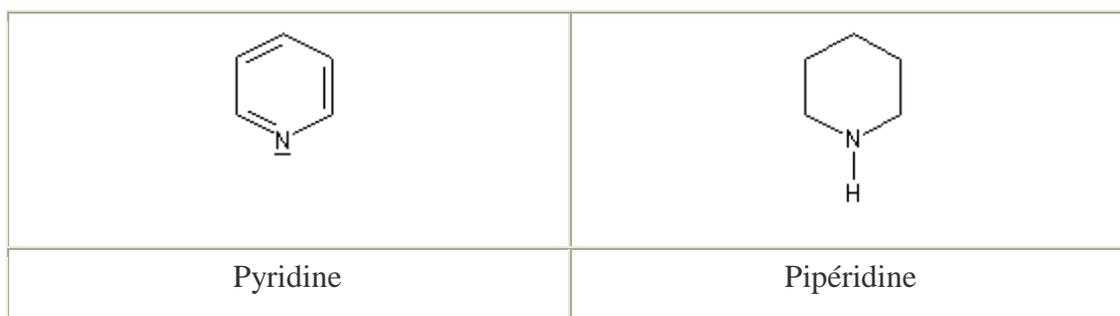


Figure n°6 : Amine hétérocyclique : l'atome d'azote est engagé dans un cycle qui peut être ou non aromatique.

Récemment Shozo Takayama *et al.* ont réalisé une synthèse d'une étude prospective réalisés par l'Institut National contre le Cancer aux États-Unis, et à l'institut national de recherche sur le cancer au Japon portant sur la carcinogénèse chimique chez les primates et les rongeurs⁴³. L'étude a consisté à évaluer l'effet après ingestion de faibles doses de substances cancérigènes potentiellement retrouvées dans la nourriture. L'effet de 13

³⁸ Keating GA, Layton DW, Felton JS. Factors determining dietary intakes of heterocyclic amines in cooked foods. *Mutat Res* 1999;**443**:149-56

³⁹ Zheng W, Gustafson DR, Sinha R, Cerhan JR, *et al.* Well-done meat intake and the risk of breast cancer. *J. Natl Cancer Inst* 1998;**90**:1724-9

⁴⁰ Schiffman MH, Felton JS. Re: Fried foods and the risk of colon cancer. *Am. J. Epidemiol.* 1990;**131**:376-8

⁴¹ Ward MH, Sinha R, Heineman EF, Rothman N, *et al.* Risk of adenocarcinoma of the stomach and esophagus with meat cooking method and doneness preference. *Int J Cancer* 1997;**71**:14-9

⁴² Augustsson K, Skog K, Jagerstad M, Dickman PW, *et al.* Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: a population-based study. *Lancet* 1999;**353**:703-7

⁴³ Takayama S, Thorgeirsson UP, Adamson RH. Chemical carcinogenesis studies in nonhuman primates. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2008;**84**:176-88

composés comprenant des additifs et contaminants de la nourriture, des pesticides, des nitroso-composés, des amines hétérocycliques ont été examinées pendant les 34 années. Une cancérogénicité claire a été démontrée pour la 2-amino-méthylimidazo (4,5-f) quinoléine, le méthylnitrosourée et la diethylnitrosamine. En outre, les résultats négatifs pour la saccharine et le cyclamate étaient en conformité avec des résultats trouvés dans d'autres espèces. Concernant les agents mutagènes et carcinogènes cuits, trois types d'amines hétérocycliques (HCAs) : la 2-amino-méthylimidazo (4,5-f) quinoléine (Q.I.), 2 amino-3,8-diméthylimidazo (4,5-f) quinoxaline (MeIQx), et la 2 amino-1-méthyl-6-phénylimidazo (4,5-b) pyridine (PhIP) ont été évaluées chez les primates par ingestion aux doses de 10 et 20 mg/kg, 7 jours par semaine. Des trois HCAs, le Q.I. s'est avéré un carcinogène hépatique efficace chez des singes de cynomolgus. Des tumeurs de foie ont été ainsi trouvées chez 9 des 20 animaux (45 %) dans le groupe 10 mg/kg et chez 17 parmi 20 animaux (85 %) dans le groupe 20 mg/kg. Les doses cumulatives moyennes étaient 38,2 g et 43,9 g, respectivement, et les périodes de latence moyennes étaient de 59,1 et 44,8 mois. La synthèse des résultats de ces études est donnée dans le tableau n°9.

Tableau n° 9 : Synthèse comparative des effets de cancérogènes « alimentaires » chez l'homme selon l'IARC (groupe 1 : cancérogène certain, 2A : indices limités de cancérogénicité chez l'homme et suffisants chez l'animal, 2B : indices de cancérogénicité limité chez l'homme et pas suffisant chez l'animal), les primates et les rongeurs.

Agents	Homme (évaluation IARC)	Primates	Rongeurs
Chlorhydrate de doxorubicine	Probablement oui (2A)	non concluant	oui
Cyclophosphamide	1	non concluant	oui
Merphalan	2B	non concluant	oui
Procarbazine	1	oui	oui
N-N-méthyl-N-nitrosourée	2A	oui	oui
Saccharine	non	non	oui
Cyclamate	non	non	oui
DDT	1	non concluant	oui
Q.I. quinoléine (HCAs)	2A	oui	oui
MeIQx (HCAs)	2B	non	oui
PhIP (HCAs)	2B	non	oui
4-Diméthylaminoazobenzène	2B	non	oui
2 Acéthylaminofluorene	non disponible	non	oui
2,7-Bisacéthylaminofluorene	non disponible	non	oui

- Les nitrosamines : nous pouvons être exposés à des *N-nitroso* composés lors de régimes riches en viandes et en produits de la pêche salés⁴⁴. En effet, les *n-nitrosamines* peuvent être formées in vivo pendant l'ingestion simultanée de nitrites ou d'azote et d'un substrat nitrosable tel qu'une amine secondaire⁴⁵. Les *n-nitrosamines* ont été liées aux cancers oesophagiens et gastro-intestinaux⁴⁶.

- L'aflatoxine a été identifiée la première fois au Royaume-Uni en 1965. Les jours précédant Noël, 100 000 jeunes dindes sont mortes inopinément. Ces dindes avaient été alimentées à partir de cacahuètes provenant du Brésil. La cause retrouvée était un cancer de foie. Les scientifiques du Massachusetts Institute of Technology ont isolé plus tard l'aflatoxine B1. Les données épidémiologiques confirmèrent plus tard le rôle de l'aflatoxine dans la carcinogenèse hépatique⁴⁷. L'exposition de l'aflatoxine B1 se produit par consommation de l'alimentation à partir d'animaux nourris de maïs souillé par un *Aspergillus Flavus*⁴⁸, qui peut être communiquée par voie transplacentaire à des nouveau-nés par l'intermédiaire de l'allaitement⁴⁹. Le mécanisme de l'action pour la mutagénicité de l'aflatoxine B1 commence par l'activation métabolique des enzymes CYP3A4, CYP3A5 et/ou CYP1A2⁵⁰ ce qui forme une fonction *exo-8,9-epoxide*, adduit d'ADN.

2 - Champs électromagnétiques

L'impact sur la santé des champs électromagnétiques présents dans l'environnement et en milieu professionnel est controversé et les risques potentiels de cancers induits par les téléphones mobiles font l'objet de nombreuses études. Si les champs électromagnétiques d'extrêmement basse fréquence dits ELF (0 à 300 Hz) ont été classés comme possiblement cancérigènes par le Centre international de recherche sur le cancer, sur le fondement

⁴⁴ Fiddler W. The occurrence and determination of *N-nitroso* compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975;**31**:352-60

⁴⁵ Wogan GN, Tannenbaum SR. Environmental *N-nitroso* compounds: implications for public health. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975;**31**:375-83

⁴⁶ Mirvish SS. 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* 1995;**93**:17-48

⁴⁷ Bulatao-Jayme J, Almero EM, Castro MC, Jardeleza MT, *et al.* A case-control dietary study of primary liver cancer risk from aflatoxin exposure. *Int J Epidemiol* 1982;**11**:112-9

⁴⁸ Wogan GN. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Res* 1992;**52**(Suppl. 7):2114-8

⁴⁹ Denning DW, Allen R, Wilkinson AP, Morgan MR. Transplacental transfer of aflatoxin in humans. *Carcinogenesis* 1990;**11**:1033-5

⁵⁰ Wang H, Dick R, Yin H, Licad-Coles E, *et al.* Structure-function relationships of human liver cytochromes P450 3A: aflatoxin B1 metabolism as a probe. *Biochemistry* 1998;**37**:12536-45

d'arguments épidémiologiques relatifs à la fréquence de la leucémie aiguë chez l'enfant⁵¹, les téléphones mobiles communiquent sur des gammes de fréquences (radiofréquence ou RF), beaucoup plus élevées (400 à 2100 MHz). Les champs RF pénètrent dans les tissus exposés à une profondeur qui dépend de la fréquence, jusqu'à un centimètre aux fréquences utilisées par les téléphones mobiles. Depuis, un grand nombre d'études ont été conduites sur cette question, surtout auprès d'enfants habitant à proximité d'une ligne à haute tension. Sur cette base, le CIRC a conclu, selon sa classification, que les champs magnétiques ELF sont possiblement cancérogènes pour l'homme⁵². Une étude danoise⁵³ ne met pas en évidence une augmentation du risque de développer un neurinome associé à l'usage du mobile quel que soit l'indicateur d'exposition utilisé. Toutefois, elle note une taille moyenne supérieure des tumeurs situées du côté où le mobile est utilisé ce qui pourrait être en accord avec un rôle de facilitateur de la progression des tumeurs. Une étude suédoise⁵⁴ a suivi la même méthodologie. Elle conclut que globalement, il n'y a pas d'excès de risque d'avoir un neurinome. Néanmoins, bien qu'il ne soit pas significatif, il semble y avoir un léger accroissement du risque quand la durée et/ou la latence d'exposition augmentent au-delà de 10 ans chez les utilisateurs de téléphones analogiques d'anciennes générations qui conduisent à des niveaux d'exposition très élevés.

Le Rapport d'expertise de l'AFSSET (2005) préconise une attitude de précaution compte tenu de l'existence d'un risque potentiel pour ce qui concerne les téléphones mobiles. Le Rapport du Mobile Telecommunications and Health Research rendu public en septembre 2007 ne retrouve aucune association épidémiologique entre l'exposition aux radiofréquences des téléphones mobiles depuis moins de dix ans, et les cancers du cerveau ou du système nerveux. Il indique cependant que compte tenu des longs délais d'apparitions tumeurs malignes après l'événement qui les a provoquées, il est trop tôt pour conclure.

L'étude internationale multicentrique interphone, coordonnée par le CIRC, mise en place en 1999 et conduite dans 13 pays, est terminée depuis 2003. L'étude n'a pas montré

⁵¹ Wertheimer N, Leeper E. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Am J Epidemiol* 1979;**109**:273-84

⁵² IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Non-ionizing radiation. Part 1: static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2002;**80**:1-395

⁵³ Christensen HC, Schüz J, Kosteljanetz M, Poulsen HS, *et al.* Cellular phone a risk of neurinoma. *Am J Epidemiol* 2004;**159**:277-83

⁵⁴ Lönn S, Ahlbom A, Hall P, Feychting M. Mobile phone use and the risk of acoustic neuroma. *Epidemiology*. 2004;**15**: 653-9

d'excès de risque statistiquement significatif mais ses auteurs suggèrent la possibilité d'un risque pour des utilisations de 10 ans ou plus. Seule l'étude menée en Allemagne trouve, pour une utilisation à long terme, une élévation du risque non significative, pour les gliomes : Rapport de côte (RC) = 2,2 (IC95 % [0,94 – 5,11]). L'étude réalisée au Royaume-Uni trouve quant à elle une augmentation significative du risque de développer un gliome ipsilatéral avec une utilisation régulière : RC=1,24 (IC95 % [1,02 – 1,52]).

3 - Cancérogenèse physique

- Radiations ionisantes

Les radiations ionisantes occasionnent plusieurs types de dommages à l'ADN tels que cassures simple brin ou double brin, altérations ou pertes de bases, formations de liaisons ADN-ADN ou de ponts entre ADN et protéines chromosomiques. Elles génèrent par radiolyse de l'eau la formation de radicaux oxygénés OH• très réactifs. Il se produit environ 105 ionisations par cellule et par Gray de dose absorbée, conduisant à environ 200 cassures simples brins et 25 à 50 cassures doubles brins de l'ADN, ces dernières ayant un impact prépondérant dans la mortalité cellulaire induite par les radiations ionisantes. La majorité des lésions génétiques observées sont de grosses altérations chromosomiques (délétions, inversions, translocations, amplifications) plutôt que des mutations ponctuelles. Les mécanismes de la carcinogenèse induite par les radiations passent par l'induction d'une instabilité chromosomique responsable lors des cycles ultérieurs de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et de l'activation d'oncogènes.

- Rayons ultraviolets

La corrélation entre le degré d'exposition solaire et la survenue de cancers cutanés spino- et basocellulaires chez l'homme est bien connue. Les rayons UV induisent des lésions spécifiques au niveau de l'ADN qui sont la formation de liaisons covalentes entre 2 molécules pyrimidiques adjacentes sous forme de dimères de pyrimidine et de 6-4 photolésions, provoquant la rupture des liaisons hydrogène avec les bases opposées et, en l'absence de réparation, l'incorporation de bases erronées lors de la réplication suivante. Plus de 50 % des cancers cutanés (spinocellulaires et basocellulaires) chez l'homme portent des mutations inactivatrices de p53 consistant en de doubles transitions CC.TT. Les mélanomes de

Dubreuilh sont également liés à l'exposition solaire cumulée au cours de la vie. Les autres mélanomes sont plus en rapport avec des antécédents d'exposition intensive au soleil. De plus, les UV exercent également un profond déficit immunitaire au niveau cutané qui peut diminuer les défenses de l'hôte contre les tumeurs induites par les UV.

C - Facteurs professionnels

La plupart des substances présentes en milieu professionnel font l'objet d'une métabolisation lorsqu'elles arrivent dans l'organisme. Ces processus de biotransformation surviennent essentiellement au niveau du foie, mais d'autres tissus sont également susceptibles de métaboliser ces xénobiotiques, que ce soit au niveau des voies d'entrée de l'organisme (poumons, peau, tube digestif) ou au niveau des organes ou tissus de stockage (moelle osseuse dans le cas du benzène) ou des organes d'élimination.

Les processus mis en route sont généralement multi-étapes et font appel à des réactions préliminaires d'oxydation pour rendre les molécules plus polaires (réactions de phase I) et à des réactions de conjugaison avec un ligand comme les sulfates, l'acide glucuronique, l'acétate ou le glutathion (réactions de phase II).

Le mécanisme exact de la cancérogénèse des poussières de bois n'étant pas connu, nous donnerons plusieurs exemples de métabolismes en rapport avec des carcinogènes que l'on peut rencontrer dans de nombreuses professions mais qui peuvent aussi se rencontrer dans les métiers du bois et de la chaussure qui sont l'objet de ce travail. D'autres carcinogènes sans lien avec les métiers de bois seront explicités en raison de leur mécanisme d'action particulier. En effet, tous les mécanismes de cancérogénèse ne passent par la formation de métabolites actifs avec formation d'adduits de l'ADN. Certaines substances, comme les métaux, ont des interactions particulières avec l'ADN et les protéines. D'autres, comme les fibres d'amiante, font intervenir d'autres mécanismes d'action comme le stress oxydatif et agissent par une composante épigénétique, ce cas de figure sera aussi abordé.

1 - Facteurs professionnels d'origine chimique

1a - Le Formaldéhyde

Aldéhyde le plus simple, le formaldéhyde a une très forte réactivité chimique qui est à l'origine de ses utilisations industrielles, mais aussi de ses effets sur l'organisme. Le formaldéhyde est cancérogène chez l'animal, mais les études épidémiologiques sont équivoques, c'est pourquoi il avait été initialement classé en 1995 comme probablement cancérogène pour l'homme (2A) par le CIRC. Depuis 2006, le formaldéhyde est classé dans le groupe 1. Un nouveau tableau de maladie professionnel est paru en France le 17 janvier 2009 reliant le cancer du nasopharynx à l'exposition au formol.

Les professions les plus à risque sont celles impliquées dans la fabrication du formaldéhyde par oxydation du méthanol, dans la synthèse de résines urée formol, de mélanine, de résines acétal utilisées comme colles et adhésifs (élaboration des agglomérés à base de bois). La fabrication des mousses polyuréthane et la synthèse chimique en utilisent des quantités importantes. Les propriétés antimicrobiennes du formaldéhyde lui valent d'avoir été largement utilisé pour la désinfection dans les hôpitaux, dans la formulation de produits cosmétiques et pharmaceutiques. En anatomo-pathologie, il entre dans la formulation de produits de conservation des tissus biologiques. Les professions les plus fréquemment exposées sont celles de la chimie, du bois (**colles, vernis urée-formol**), du papier, des hôpitaux. Mais il existe aussi des sources environnementales comme les gaz d'échappement des véhicules, les fumées d'incinération y compris la fumée du tabac, les émanations domestiques de formol à partir des résines isolantes et même à partir des apprêts présents sur les tissus lors du repassage. Le formol peut aussi se former au cours des opérations de fonderie des métaux. La vitrification des parquets représente une source non négligeable d'exposition professionnelle et domestique.

Le formaldéhyde, qui est très soluble dans l'eau et très réactif, se dépose essentiellement au niveau des voies respiratoires supérieures, nez et rhinopharynx, qui sont précisément les localisations des cancers en rapport avec l'exposition à ce produit. À ce niveau, deux mécanismes vont limiter la toxicité du formol, d'une part la « clairance muqueuse », d'autre part sa métabolisation. Le formol réagit d'abord avec les protéines et les polysaccharides de la couche muqueuse, ce qui diminue d'autant l'exposition des cellules épithéliales. Mais, à forte dose, le formol inhibe la fonction muco-ciliaire. Dans la cellule

épithéliale, il réagit avec les protéines et les acides nucléiques au niveau des fonctions – NH₂ ou en faisant des pontages méthyléniques entre les protéines et les acides nucléiques (cross links) et en provoquant des cassures mono et double brin de l'ADN. Une protection contre la formation d'adduits et de pontages est la réaction avec le glutathion et sa transformation par l'intermédiaire de la formaldéhyde déshydrogénase en acide formique qui soit est éliminé dans les urines, soit est métabolisé dans le pool CH₃ via la voie dépendante du tétrahydrofolate (figure n° 7).

Le formol est donc un cancérigène direct par action sur l'ADN et sur la prolifération cellulaire. Il provoque des mutations ponctuelles du gène p53 dans les cellules nasales de rat. L'effet toxique du formaldéhyde est dû à sa forte réactivité chimique plus qu'à une transformation métabolique. Une exacerbation des effets mutagènes peut se produire en cas de déplétion en glutathion.

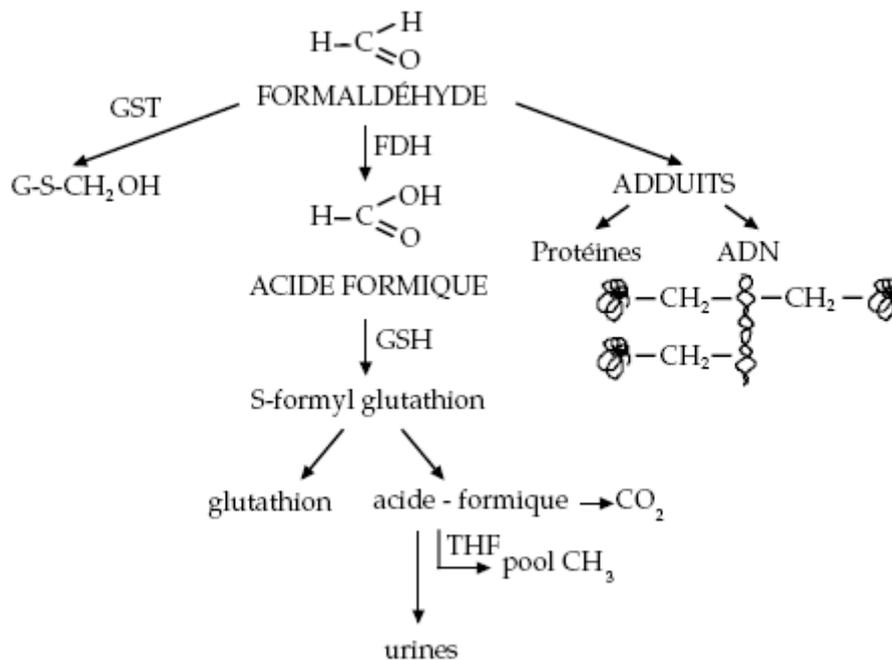


Figure n° 7 : Métabolisme du formaldéhyde

Métabolisme et mécanisme d'action des substances cancérigènes d'origine professionnelle: http://ist.inserm.fr:3200/basisrapports/suscept/SG_chap2.pdf, p.42. Source consultée le 02/03/09.

1b - Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les populations à risque sont celles exposées aux produits de combustion. Ainsi, les premiers cancers professionnels caractérisés sont ceux du scrotum décrits chez les ramoneurs par Percival Pott en 1775, Les études épidémiologiques ont montré que certains hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) étaient responsables de cancers respiratoires, de la vessie, de la peau, des voies aérodigestives supérieures, des systèmes lymphatique et hématopoïétique et des voies digestives. Les principales industries concernées sont les cokeries, la fabrication de l'aluminium, la fabrication d'électrodes au carbone, les raffineries de pétrole, les usines à gaz, les couvreurs de toitures. De nombreux autres travaux professionnels exposent également aux HAPs, notamment l'utilisation d'huiles de coupe, l'exposition aux gaz d'échappement de moteurs à essence ou gazole, le travail dans les fonderies de métaux et l'asphaltage des routes. Parmi les expositions environnementales aux HAP les plus fréquentes, la pollution urbaine d'origine automobile ou industrielle et le tabagisme passif sont les sources les plus importantes après le tabagisme actif.

Les HAP comme le benzo[a]pyrène font l'objet de réactions d'oxydation de phase I qui peuvent conduire à des composés oxygénés mutagènes et cancérigènes selon le niveau d'attaque sur la molécule. Pour être cancérigène, la molécule d'HAP doit posséder une région baie et être dissymétrique, comme le montre la figure n° 8.

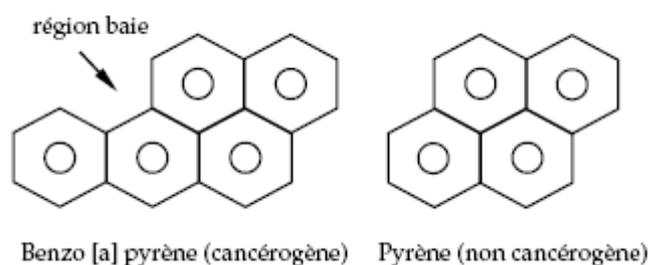


Figure n° 8 : Structure chimique du benzo[a]pyrène (cancérigène) et du pyrène (non cancérigène). Métabolisme et mécanisme d'action des substances cancérigènes d'origine professionnelle: http://ist.inserm.fr:3200/basisrapports/suscept/SG_chap2.pdf, p.26. Source consultée le 02/03/09.

Cette configuration gouverne les modalités d'oxydation de la molécule en raison des zones de concentration en électrons. Si on prend la voie qui passe par le BP 7,8-diol 9,10 époxyde qui est le cancérigène ultime, chez les individus GSTM1 nul, la métabolisation est détournée vers la formation d'adduits à l'ADN, comme le montre la figure n° 9.

De plus, le métabolisme du benzo[a]pyrène peut être influencé par le métabolisme oxydatif. En effet, il a été observé expérimentalement que la peroxydation lipidique pouvait initier l'époxydation du 7,8-dihydroxy-7,8dihydrobenzo[a]pyrène⁵⁵. Une telle interaction a été observée avec des générateurs de radicaux libres comme l'amiante, le dioxyde de soufre ou le vanadium réduit. Cela montre qu'il existe probablement des mécanismes de co-cancérogénèse qui interviennent en dehors des réactions enzymatiques pour la production de cancérigènes ultimes, ce qui pourrait expliquer la potentialisation de ces effets cancérigènes entre par exemple l'amiante et les HAPs⁵⁶.

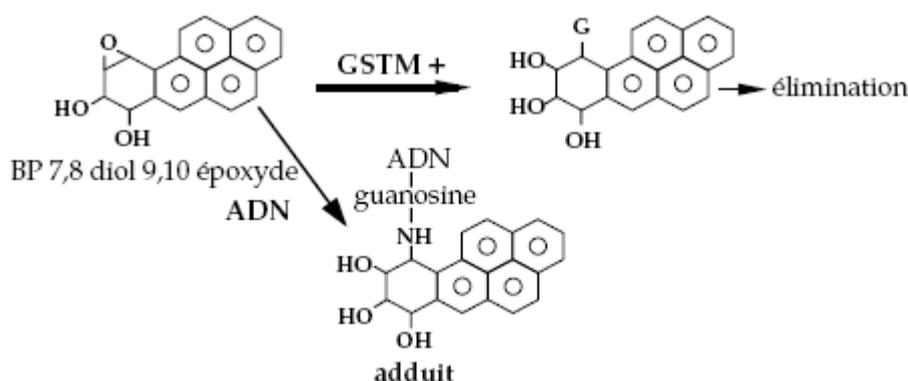


Figure n° 9 : Formations d'adduits à partir du benzo-a-pyrène.

Métabolisme et mécanisme d'action des substances cancérigènes d'origine professionnelle : http://ist.inserm.fr:3200/basisrapports/suscept/SG_chap2.pdf, p.28. Source consultée le 02/03/09.

⁵⁵ Dix TA, Marnett LJ. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives to ultimate carcinogens during lipid peroxidation. *Science* 1983;**221**:77-9

⁵⁶ Byczkowski JZ, Kulkarni AP. Lipid peroxidation and benzo(a)pyrene derivative co-oxygenation by environmental pollutants. *Bull Environ Contam Toxicol* 1990;**45**:633-40

1c - Hydrocarbures aromatiques benzéniques

Le chef de file de ces hydrocarbures est le benzène, constitué uniquement d'un noyau aromatique. Les populations exposées sont celles de l'industrie pétrolière, des raffineries au transport des produits, en passant par l'échantillonnage, la distribution et l'utilisation des produits (l'essence sans plomb contient 1 % de benzène). Les ouvriers du caoutchouc utilisaient le benzène comme solvant et étaient exposés aussi bien par voie cutanée que pulmonaire. L'utilisation du benzène comme solvant est interdite en France depuis 1996. Il a été utilisé notamment dans les colles dans **l'industrie de la chaussure** et dans la fabrication des peintures. Le CYP2E1 transforme le benzène en époxy benzène qui est spontanément réarrangé en phénol, lui-même métabolisé ultérieurement par le CYP2E1 en hydroquinone⁵⁷.

L'hydroquinone et ses métabolites hydroxylés sont convertis dans la moelle osseuse par la myéloperoxydase en benzoquinones⁵⁸, qui sont des substances hématotoxiques et génotoxiques. En 1997 il a été démontré que les individus présentant une toxicité hématologique au benzène avaient une activité CYP2E1 forte et une activité quinone oxydoréductase (NQO1) faible. Le benzène n'est pas myélotoxique par lui-même. Ce sont ses métabolites, en particulier la **benzoquinone** et l'acide transmuconique qui peuvent réagir avec l'ADN pour former des adduits⁵⁹ (figure n° 10). **Nous verrons plus loin que la méthoxybenzoquinone est un constituant propre du bois.**

A noter qu'on ne peut donc pas faire d'extrapolation linéaire de risque de syndrome myélodysplasique, de leucémie ou d'anémie à partir des doses fortes, qui pourraient sous-estimer le risque des expositions à faibles doses⁶⁰.

⁵⁷ Koop DR, Laethem CL, Schnier GG. Identification of ethanol-inducible P450 isozyme as a benzene and phenol hydroxylase. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989;**98**:278-88

⁵⁸ Eastmond DA, Smith MT, Irons RD. An interaction of benzene metabolites reproduces the myelotoxicity observed with benzene exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987;**91**:85-95

⁵⁹ Rothman N, Smith MT, Hayes RB, Traver RD, *et al.* Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1 609C-->T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone. *Cancer Res* 1997; **57**:2839-42

⁶⁰ Henderson RF. Species differences in the metabolism of benzene *Environ Health Perspect* 1996;**104** (Suppl 6):1173-5

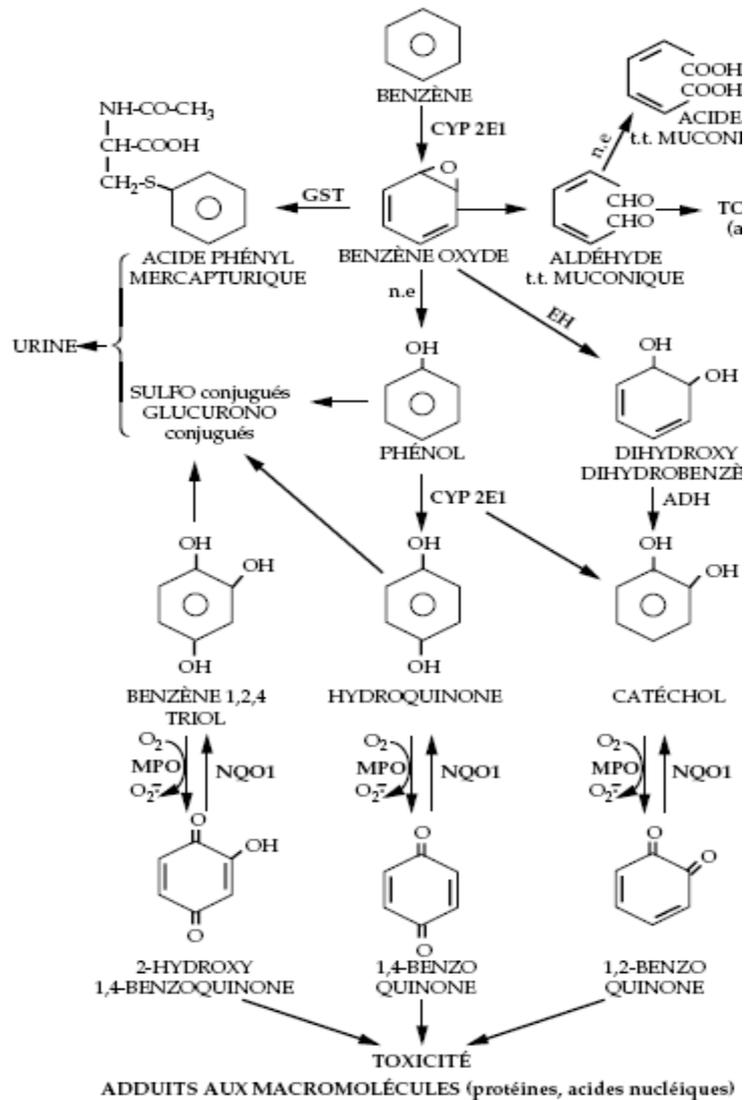


Figure n° 10 : Métabolisme du benzène et formations des adduits de l'ADN :

Métabolisme et mécanisme d'action des substances cancérogènes d'origine professionnelle: http://ist.inserm.fr:3200/basisrapports/suscept/SG_chap2.pdf, p.32. Source consultée le 02/03/09.

1d - Amines aromatiques

C'est un chirurgien allemand, Rehn, qui en 1895, fut le premier à faire le lien entre cancers de la vessie et ouvriers travaillant dans l'industrie des colorants à base de magenta. En dehors de l'industrie des colorants, les principales sources d'exposition aux amines aromatiques cancérogènes sont l'industrie du caoutchouc, du textile, **du cuir** et du papier, la production de mousses polyuréthane, de résines époxy, l'industrie chimique, la coiffure, la

photographie. Enfin, il ne faut pas oublier la fumée de tabac. La connaissance du rôle cancérigène des amines aromatiques a conduit à une réduction de l'exposition et des utilisations. Le CIRC a classé comme cancérigènes dans le groupe 1 les amines suivantes : 4-aminobiphényle, 2-naphtylamine (figure n° 11), benzidine. La 3,3'-diméthoxybenzidine, 3,3'-diméthylbenzidine, la 2,2'-dichloro-4,4'-méthylènedianiline (MOCA), la 4,4'-diaminodiphénylméthane, et la 4-chloroaniline, 4,4' bis-O-toluidine sont dans le groupe 2.

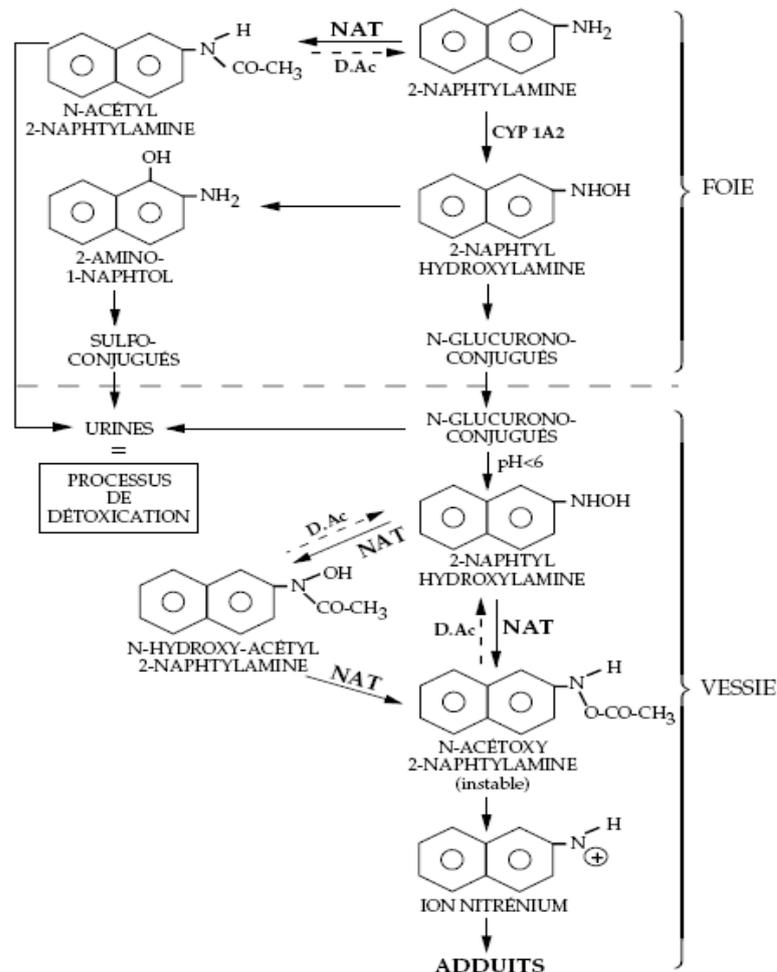


Figure n° 11 : Métabolisme des amines aromatiques.

Métabolisme et mécanisme d'action des substances cancérigènes d'origine professionnelle: http://ist.inserm.fr:3200/basisrapports/suscept/SG_chap2.pdf, p.39. Source consultée le 02/03/09.

1e - Le styrène

Si le styrène est classé en groupe 2B par le CIRC, le styrène oxyde est classé dans le groupe 2A. Il est utilisé en synthèse chimique. Par réduction, il donne du phényl 2-éthanol connu en parfumerie sous le nom d'« huile de roses ». Avec l'éthanolamine, il donne un intermédiaire d'un antihelminthique, le tétramisole.

On trouve le styrène (figure n°12) comme diluant de résines époxy, dans la fabrication de résines de polyuréthane-polyester. C'est un piègeur d'acide utilisé pour stabiliser les liquides hydrauliques. Il peut être polymérisé ou copolymérisé avec d'autres époxy mais aussi avec des fibres textiles. Il peut aussi se former lorsque les résines de polystyrène sont mises en présence de peroxydes. Les industries concernées sont l'industrie des polymères, la fabrication des bateaux en résine, l'industrie textile.

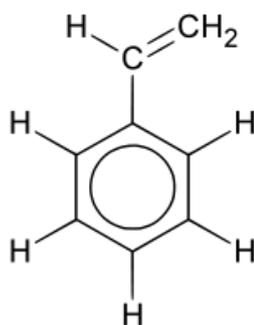


Figure n° 12 : composition du styrène

Le styrène est métabolisé en styrène oxyde qui donne des adduits à l'ADN, le plus important étant la 7-alkylguanine ; les autres sites de fixation sont les N2 et O6 de la guanine, les N1 et N6 de l'adénine, les N3, N4 et O2 de la cytosine et le N3 de la thymine.

Le styrène oxyde forme également des adduits aux protéines, notamment l'hémoglobine et l'albumine au niveau des histidines. **Nous ferons le lien, en conclusion de ce travail, entre ce mécanisme d'action et celui des constituants des poussières de bois.**

2- Les poussières

2a - Définition

On appelle poussière toute particule fine qui se détache de matériaux divers sous l'effet de chocs ou de mouvement d'air, se trouvant à l'état libre sur une surface ou dans l'atmosphère. Sur le plan physique, elle se caractérise donc par son diamètre, son poids et sa vitesse de chute. Selon l'article R. 4222-3 du Code du Travail, une poussière de bois est une particule solide d'un diamètre aérodynamique d'au plus 100 µm ou dont la vitesse de chute, dans les conditions normales de température est au plus égale à 0,25 mètres par seconde.

Les particules de poussière sont absorbées par l'appareil respiratoire. Seule la partie constituée des particules les plus fines (< 3 µm) peut atteindre les alvéoles (fraction alvéolaire). Ces particules agiront donc principalement sur les parois alvéolaires et pourront aussi pénétrer dans le système sanguin. Les particules dont le diamètre est compris entre 3 et 10µm (fraction thoracique) se déposent au niveau de l'arbre respiratoire (trachéo-bronchique) d'où elles seront éliminées par des phénomènes naturels (toux, filtration par les cils de l'arbre respiratoire...). Leur effet est donc beaucoup plus localisé (trachée, voies respiratoires supérieures)(tableau n° 10).

Les particules de poussière peuvent donc être classées suivant leurs caractéristiques physiques mais aussi leur composition qui joue un rôle fondamental dans le domaine de la physiopathologie. On distingue ainsi les poussières organiques d'origine végétale (blé, avoine, orge, bois...) ou d'origine animale (acariens, pollens...) responsables essentiellement de pathologies immuno-allergiques des poussières inorganiques d'origine minérale (fibres, quartz, corindon, talc...) ou métalliques (chrome, cobalt, nickel...). Certaines d'entre elles ont un rôle cancérigène certain après inhalation prolongée.

Tableau n° 10 : pénétration des poussières dans l'organisme et site d'action en fonction de la taille

TAILLE DES POUSSIÈRES	SITE D'ACTION DES POUSSIÈRES
De 10 à 100 µm	« poussières totales » retenues au niveau des fosses nasales
De 5 à 10 µm	Trachée, bronches, bronchioles, œsophage. Si empoussièrément massif, vont jusqu'aux alvéoles
0,5 µm	Poussières très fines qui se déposent sur les alvéoles pulmonaires. En dessous de 0.5 µm, les poussières se comportent comme un gaz et suivent la ventilation pulmonaire.

2b - Poussières inorganiques : les métaux

Le cancer primitif de l'ethmoïde et des sinus de la face a été inscrit au Tableau 37 ter par le décret du 22 juillet 1987. Il concerne les salariés exposés au grillage de mattes de Nickel.

Le cancer des cavités nasales causé par l'acide chromique, les chromates, les bichromates et le chromate de zinc a été inscrit au Tableau 10 B des maladies professionnelles le 11 février 2003. La liste indicative des travaux comprenant la fabrication, la manipulation, et le conditionnement de l'acide chromique, des chromates et bichromates alcalins et la fabrication du chromate zinc.

Le Nickel

Les dérivés du nickel sont très largement utilisés. Les sources d'exposition sont le travail dans les mines, la métallurgie du nickel (où l'on trouve du sous-sulfure Ni_3S_2 et des oxydes comme NiO), la production d'aciers inoxydables et d'aciers au nickel, la fabrication des batteries au nickel, la production et l'usage de catalyseurs, le nickelage électrolytique, le soudage des aciers au nickel et inox, la production de peintures.

À côté de ces expositions professionnelles qui se font surtout par voie pulmonaire et éventuellement cutanée, il existe une exposition environnementale autour des sites industriels ou par l'eau de boisson. Les aliments, en particulier les végétaux en apportent des quantités notables augmentées par l'utilisation d'ustensiles en inox.

Le CIRC a classé les dérivés du nickel dans le groupe 1 des cancérogènes pour l'homme, mais le nickel métal est classé en 1990 dans le groupe 2B. Les dérivés du nickel, en particulier les mattes de nickel, les oxydes, les sulfures et les sels solubles peuvent en effet provoquer des cancers du poumon et des cavités nasales.

Sur le plan métabolique, le nickel qui parvient au niveau pulmonaire a tendance à persister au niveau des poumons. La rétention dépend notamment de la solubilité des composés et du captage cellulaire. La muqueuse nasale peut retenir du Nickel pendant de nombreuses années. Les formes insolubles, après phagocytose par les macrophages, peuvent

généraliser des quantités très importantes d'espèces réactives de l'oxygène, surtout avec le sous-sulfure Ni_3S_2 , ce qui doit être pris en considération dans les effets toxiques et cancérogènes⁶¹.

Le mécanisme de la cancérogenèse dépend d'abord de la solubilisation du Ni. Une fois entré dans la cellule, les effets dépendent des doses présentes d'ions Ni^{2+} , quel que soit le produit d'origine. La capacité de captage par les cellules est directement corrélée à la capacité des dérivés du nickel d'élever les taux intracellulaires. Les structures cristallines de NiS sont accumulées dans les vacuoles cytoplasmiques en périphérie du noyau où il se produit une acidification progressive avec dissolution puis relargage de Ni^{2+} à la périphérie du noyau où ont lieu des interactions préférentielles avec les régions hétérochromatiques. Il se forme alors des complexes ADN-protéines et des cassures de brins d'ADN⁶². Une autre interaction est l'inhibition de la transcription des gènes suppresseurs de tumeurs consécutive à la méthylation de l'ADN et aux modifications structurales de la chromatine⁶³.

Le Chrome et ses dérivés

Le chrome provient d'un minerai, la chromite, qui est à la base de la métallurgie et de la fabrication des briques réfractaires. Les professions exposées au chrome métal sont les ouvriers employés dans la fabrication des aciers au chrome ou aciers inoxydables, des ferrochromes et d'autres alliages spéciaux. Les professions dans l'industrie chimique exposées au Cr (III) sont celles impliquées dans la préparation des sels de chrome. L'oxyde Cr_2O_3 est utilisé comme pigment vert dans l'industrie du verre ou de la céramique, comme catalyseur, comme abrasif ou pour la fabrication de réfractaires. Certains sels sont utilisés dans le **tannage des cuirs**, le mordantage des textiles. Les dérivés du Cr (VI) sont utilisés dans le tannage des peaux, en gravure, en photographie. Le trioxyde CrO_3 est très employé dans le chromage électrolytique, dans la **préservation des bois** et comme inhibiteur de corrosion. Les chromates solubles de sodium, potassium sont des mordants en teinturerie pour les textiles naturels et artificiels. Les bichromates de sodium et potassium, également hydrosolubles, sont les bases de la chimie du chrome. La fabrication des chromates et bichromates expose à des teneurs importantes en Cr (VI). Les chromates peu solubles (de

⁶¹ Huang X, Zhuang Z, Frenkel K, Klein CB, *et al.* The role of nickel and nickel-mediated reactive oxygen species in the mechanism of nickel carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1994;**102**:281-4

⁶² Snow ET, Costa M. Nickel toxicity and carcinogenesis. In: Rom WN (ed) - Environmental and Occupational Medicine. 3^{ed}. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998:1057-64

⁶³ Lee YW, Klein CB, Kargacin B, Salnikow K, *et al.* Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation. A new model for epigenetic carcinogens. *Mol Cell Biol* 1995;**15**:2547-57

plomb, calcium, strontium, baryum, zinc) sont utilisés comme pigments pour peintures, encres et en pyrotechnie.

Les composés Cr (VI) sont des oxydants en particulier de la matière organique qu'ils détruisent. La forme stable du Chrome est la forme Cr (III). Les professions exposées sont celles impliquées dans la fabrication des chromates et bichromates, à la fabrication des pigments à base de chromates, les soudeurs d'aciers au chrome en particulier avec le procédé MMA (Manual Metal Arc), le chromage électrolytique, **le tannage des cuirs**. Le CIRC a classé les dérivés du Cr (VI) dans le groupe 1 des substances cancérigènes pour l'homme en raison d'un excès de risque de cancers du poumon, et secondairement de cancers naso-sinusiens. Les dérivés Cr (III) sont classés dans le groupe 3.

Sur le plan métabolique, les dérivés du chrome sont absorbés par voie pulmonaire avec une clairance décroissante des dérivés hexavalents solubles, aux dérivés hexavalents insolubles et aux dérivés trivalents. Il en est de même au niveau cutané et digestif. Le Cr (VI) pénètre dans les cellules où il peut être réduit en Cr (III) avec formation d'espèces intermédiaires.

Le mécanisme d'action du Cr (VI) réside dans sa métabolisation, c'est-à-dire la formation d'espèces Cr (V), Cr (IV) et Cr (III). Ces réductions nécessitent du glutathion, du NADH et du NADPH, mais des protéines à groupement thiol, la cystéine ou l'eau oxygénée peuvent jouer ce rôle redox⁶⁴. Étant donné leur nature anionique (charge négative CrO_4^{--}), les chromates ne réagissent pas directement avec l'ADN. En revanche, il est probable que les produits de réduction Cr (V), Cr (IV) et Cr (III), mais aussi les espèces activées de l'oxygène, puissent jouer un rôle de génotoxiques ultimes.

Il semble que des CYP450 soient impliqués dans la production des formes Cr (V) et Cr (VI). Les chaînes de transport d'électrons et le complexe ferricytochrome c : O₂-oxydo réductase activent la réduction du Cr (VI). Au cours de la réduction du Cr (VI), des espèces réactives de l'oxygène et du soufre se forment. Une réaction de détoxification a lieu si ces mécanismes surviennent au niveau extracellulaire et même intracellulaire à distance des sites

⁶⁴ Shi XG, Dalal NS. On the hydroxy radical formation between hydrogen peroxide and biological generated chromium (V) species. *Arch Biochem Biophys* 1990;277:342-50

cibles, mais s'ils se produisent à proximité du noyau, il s'agit d'un processus toxique et cancérogène⁶⁵.

Le Cr (III) finalement produit peut réagir très facilement et se lier aux nucléosides puriques, mais aussi à l'oxygène des riboses et aux groupements phosphates. Des ponts ADN-ADN intra-et inter-brins sur l'ADN peuvent se former entraînant une instabilité de l'ADN⁶⁶. Ces ponts altèrent l'efficacité de l'ADN polymérase qui peut aussi être inhibée par action directe des ions Cr (VI) surtout au niveau des groupements thiols ou par action des espèces réactives de l'oxygène libérées.

2c - Poussières inorganiques : les fibres

De nombreuses fibres naturelles, en particulier l'amiante, ont été utilisées dans l'industrie et le bâtiment à des fins d'isolation thermique ou phonique. Les principales fibres naturelles sont l'amiante avec ses deux formes : la serpentine (chrysotile) et les amphiboles (actinolite, amosite, antophyllite, crocidolite, trémolite) ainsi que des fibres asbestiformes, soit des argiles fibreuses comme l'attapulgite et la sépiolite, soit d'autres silicates comme le talc, la wollastonite, la némalite ou des zéolites (ériorite et mordénite). À côté des fibres naturelles, d'autres fibres ont été fabriquées industriellement. Elles peuvent être classées en fibres vitreuses (laine de verre, laine de roche, fibres céramiques), en fibres cristallines (alumine, graphite, carbure de silicium, zéolithes synthétiques) et en fibres organiques (para-amide, cellulose). Les éléments à prendre en considération pour évaluer le potentiel cancérogène de ces fibres sont résumés ici à partir d'un travail de Kane *et al.*, 1996⁶⁷ :

- la longueur et le diamètre : les fibres les plus longues sont incomplètement phagocytées, génèrent une plus grande quantité d'espèces réactives de l'oxygène et interfèrent plus directement avec la mitose et la ségrégation des chromosomes ;
- la composition chimique, en particulier la teneur en fer et en magnésium, notamment à la surface des fibres ;

⁶⁵ De Flora S, Wetterhahn KE. Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity. *Life Chem Resp* 1990;2:78-84

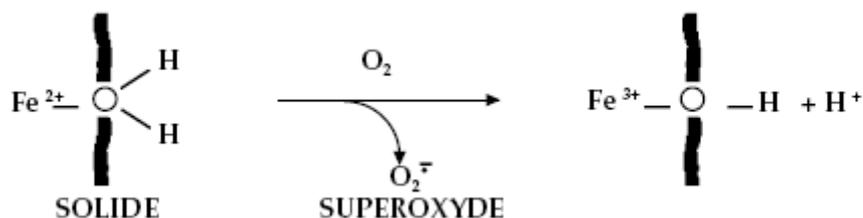
⁶⁶ Cohen M, Latta D, Coogan T, Costa M. Mechanisms of metal carcinogenesis: the reaction of metals with nucleic acids. In: Foulkes EC (ed) - Biological effects of heavy metals. Vol II, Metal Carcinogenesis. Floride CRC Press: Boca Raton; 1990:19-76

⁶⁷ Kane AB. Mechanisms of mineral fibre carcinogenesis. In: IARC Sci Publ 1996;(140):11-34

- la réactivité de surface, en particulier capacités d'adsorption, par exemple des hydrocarbures aromatiques polycycliques ou de macromolécules biologiques (surfactant, immunoglobulines, ADN) ;
- la durabilité, fonction de la solubilité in vitro ;
- et la biopersistance, fonction des phénomènes de clairance, de la solubilité in vivo et du phénomène de leaching (solubilisation intracellulaire).

Plusieurs hypothèses ont été émises quant au mécanisme de cancérogenèse des fibres. L'une d'entre elles est la génération de radicaux libres par des réactions de type Fenton, qui lèsent l'ADN (figure n° 13).

Figure n° 13 : Génération de radicaux libres par des réactions de type Fenton, qui lèsent l'ADN



La susceptibilité individuelle au stress oxydant et aux mécanismes de réparation de l'ADN dépend de nombreux facteurs endogènes et exogènes (vitamines antioxydantes de l'alimentation par exemple) et endogènes telle la susceptibilité génétique liée à un défaut de réparation de l'ADN, à une absence de GSTM1 chez les individus déficitaires, puisque l'un des mécanismes de défense passe par la réduction des hydroperoxydes par le glutathion⁶⁸ (figure n° 14).

Il a été montré que les fibres de crocidolite ou de chrysotile augmentent l'activation métabolique du benzo[a]pyrène par l'intermédiaire du stress oxydatif, mais aussi en augmentant la pénétration dans l'épithélium pulmonaire. Si la formation d'espèces réactives de l'oxygène représente l'un des mécanismes d'action des fibres, le facteur génétique de susceptibilité qui semble le plus important est la présence d'un génotype GST actif ou non. Les GST peuvent être incriminées dans le métabolisme de l'acide arachidonique par la voie

⁶⁸ Pelin K, Hirvonen A, Taavitsainen M, Linnainmaa K. Cytogenetic response to asbestos fibers in cultured human primary mesothelial cells from 10 different donors. *Mut Res* 1995;**334**:225-33

de la 5-lipoxygénase, et participer ainsi à la médiation de la réponse inflammatoire par formation de leucotriènes. Dans les poumons, le GSTM3 peut être induit par l'amiante chez les sujets GSTM1 nuls (mais pas chez les GSTM1+). Les hydroperoxydes organiques sont des substrats des GSTM, mais ils peuvent avoir aussi l'eau oxygénée comme substrat⁶⁹. Ces enzymes ont une activité glutathion peroxydase avec l'ADN hydroperoxydé.

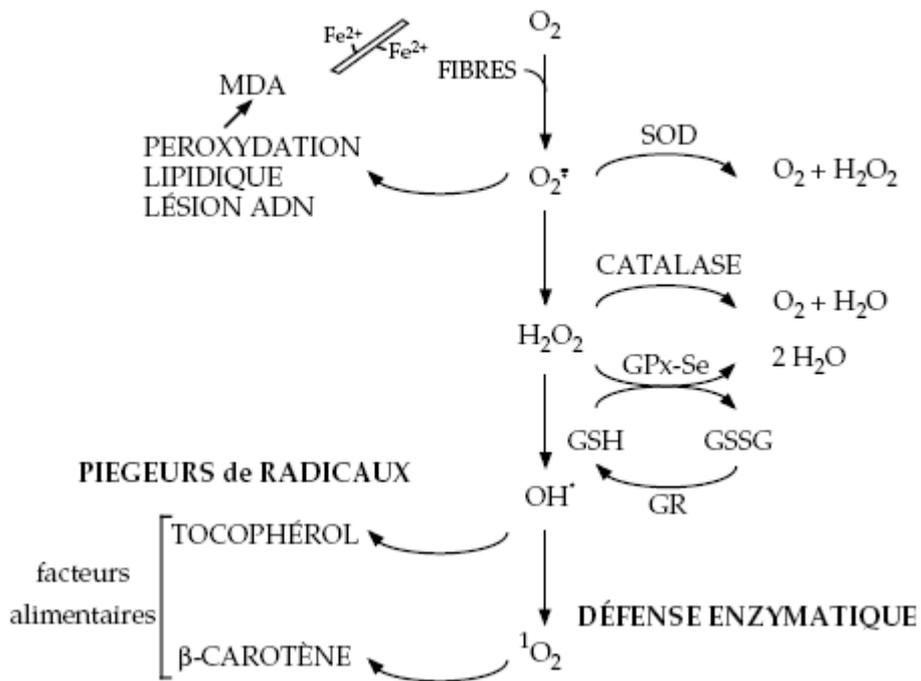


Figure n° 14 : Mécanismes de défense contre la présence de radicaux libres.

⁶⁹ Comstock KE, Widersten M, Hao XY, Henner WD, *et al.* A comparison of the enzymatic and physicochemical properties of human glutathione transferase M4-4 and three other human mu class enzymes. *Arch Biochem Biophys* 1994;**311**:487-95

Les métiers du bois

La production annuelle du bois en France est importante (quatrième producteur européen) :

- 20 millions de m³ de résineux
- 5,5 millions de m³ de feuillus
- 12 millions de m³ de panneaux dérivés du bois.

En France, 500 000 travailleurs sont exposés ou ont été exposés: 300 000 actifs et 200 000 retraités. m³

Tableau n° 12 : Les métiers du bois et le degré d'exposition aux poussières de bois selon les bases de données Colchic 2002, Woodex 2004.

Filière du bois	Activités	Nombre de salariés exposés (Woodex, 2004)	Degré d'empoussièrement en mg/m ³		
			- de 1	1 à 5	+ de 5
Sylviculture	Reboisement	15 000	98%	2%	0%
Exploitation forestière	Abattage				
		Débardage			
Première transformation	Transport de grumes	NC	NC	NC	NC
	Séchage				
	Ecorçage				
	Sciage	15 510	58%	34%	8%
	Placage	NC	NC	NC	NC
	Panneaux dérivés du bois	7736	47%	40%	13%
	Pâte à papier	NC	NC	NC	NC
	Préservation				
	Carbonisation				
Deuxième transformation	Menuiserie industrielle	17271	52%	42%	6%
	Charpente				
	Bâtiment	141 577	22%	56%	22%
	Construction navale	9622	15%	55%	30%
	Ameublement	42 965	49%	41%	10%
	Emballage, papier, cartons	12272	42%	45%	13%
	Fabrication d'objets en bois	4386	32%	49%	19%
Autres activités		41 405	60%	34%	6%
TOTAL		307 743	39%	45%	16%

On estime le nombre de salariés exposés aux poussières de bois à 26 500 dans les Pays de Loire soit environ de 29/1000 salariés alors que la moyenne nationale est de 22/1000 salariés.

La réglementation

L'arrêté du 5 janvier 1993 fixait la liste des substances, préparations et procédés cancérogènes au sens du deuxième alinéa de l'article R. 231-56 du code du travail. L'arrêté du 18 septembre 2000 a complété celui du 5 janvier 1993, en ajoutant « les travaux exposant aux poussières de bois inhalables » à la liste des « procédés cancérogènes ».

Les articles R. 4412-1 à R. 4412-3 (anciens articles R. 231-54-1 à R. 231-54-6) donnent une définition d'un agent chimique dangereux.

Pour les travaux exposant aux poussières de bois inhalables, s'applique la réglementation CMR : décret 2001-97 du 01/02/2001 dit décret CMR codifié aux articles R. 4412-59 et suivants du Code du travail.

L'article R. 717-85-6 créé par décret n°2008-1053 du 10 octobre 2008 précise que lorsqu'elles sont exposées ou susceptibles d'être exposées à des agents chimiques dangereux cancérogènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction, les personnes mentionnées à l'article R. 717-85-1 (travailleurs indépendants, employeurs) sont soumises aux dispositions du code du travail suivantes :

- 1° Article R. 4412-59 et article R. 4412-60 définissant le champ d'application des mesures de prévention des risques chimiques particulières aux agents chimiques dangereux cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction.
- 2° Articles R. 4412-61 à R. 4412-63 et R. 4412-65 relatifs à l'évaluation des risques.
- 3° Articles R. 4412-66 à R. 4412-74 relatifs aux mesures et moyens de prévention.

Les personnes mentionnées à l'article R. 717-85-1 (travailleurs indépendants, employeurs) tiennent à la disposition de l'inspection du travail et des agents des services de prévention des organismes de sécurité sociale, les éléments ayant servi à l'évaluation des risques, qu'elles consignent par écrit. En cas d'incident ou d'accident susceptible d'entraîner

une exposition anormale à des agents chimiques cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction, afin de maintenir ou restaurer les conditions de salubrité dans la zone ainsi affectée, les personnes mentionnées à l'article R. 717-85-1 procèdent à l'élimination de ces agents chimiques de façon à ne pas créer de nouveaux risques pour d'autres travailleurs.

L'obligation pour l'employeur de procéder à l'évaluation des risques et précisée dans l'article R. 4412-61 (ancien article R. 231-56-1) à R. 4412-65. En cas de risque d'exposition, la première mesure à mettre en place est la substitution (article R. 4412-66) ; si la suppression impossible, il y a nécessité de travailler en vase clos (article R. 4412-68) ; si le vase clos est impossible, le niveau d'exposition doit être réduit au plus bas (article R. 4412-69).

La réglementation européenne impose aux entreprises une VLEP à 5 mg/m^3 , en France, le décret 2006-133 du 9 février 2006 a fixé la VLEP à 1 mg/m^3 sur 8 heures. L'article R. 4412-149 créé par décret du 7 mars 2008 donne la même VLEP. Selon l'article R. 4412-78, le dépassement des VLEP contraignantes entraîne sans délai un nouveau contrôle dans les mêmes conditions. Si le dépassement est confirmé, le travail est arrêté aux postes de travail concernés jusqu'à la mise en oeuvre des mesures propres à remédier à la situation. L'inspecteur du travail peut faire procéder à la cessation des travaux.

Prévention primaire

Protection collective

Il faut conseiller d'organiser le travail par zones en fonction du type d'exposition : usinage, montage, ponçage, vernissage, et expédition. L'utilisation de la soufflette est à proscrire. Les salariés doivent être formés et informés, le médecin du travail et l'employeur doivent y concourir. Le système d'aspiration doit comporter classiquement un système de captage, de transport, d'épuration, de rejet et de compensation. Concernant le captage, il existe maintenant des systèmes portatifs haute dépression avec un débit minimal de $80 \text{ m}^3/\text{h}$. L'installateur doit vérifier périodiquement (une fois par an) l'efficacité du système et doit engager sa responsabilité sur les résultats. Un système de transport de la poussière aspirée ($v=20 \text{ m/s}$), un système d'épuration avec filtre et un stockage de la poussière doivent être prévus dans le cahier des charges. Le stockage doit être placé à l'extérieur de l'entreprise. L'arrêté du 08/10/1987 fixe le descriptif de l'installation, le dossier des valeurs de référence, les débits et pressions statiques pour chaque dispositif de captage, le débit global, l'efficacité de captage minimale et les caractéristiques des systèmes de surveillance et contrôle.

Protection individuelle

Lorsque l'utilisation de protections collectives est impossible ou insuffisante, les opérateurs doivent être équipés de protections individuelles et notamment de masques respiratoires dotés de filtres appropriés. Pour limiter l'émission de poussières au niveau le plus bas possible, il faut :

- travailler par voie humide (arrosage, humidification),
- travailler en vase clos (appareils hermétiques, boîtes à gant),
- recourir à des procédures d'ouverture des sacs ou de déchargement des véhicules évitant la dissémination,
- utiliser un aspirateur industriel équipé d'un filtre de haute efficacité (interdire le recours à la soufflette pour chasser la poussière).

Les prélèvements et mesures annuels des taux d'empoussièrement au poste de travail doivent être réalisés à la demande du médecin du travail ou de l'employeur avec discussion des mesures correctives en cas de dépassement des normes en vigueur.

Deuxième partie : l'adénocarcinome de l'ethmoïde

I – INCIDENCE

Les adénocarcinomes de type sino-nasal sont des tumeurs épithéliales des cavités nasales et des sinus paranasaux ; leur apparition est fortement liée à l'exposition aux poussières de bois. Il s'agit d'une tumeur rare représentant selon les études 3 à 8 % de l'ensemble des tumeurs malignes des sinus^{70,71,72}.

L'incidence estimée par le CIRC, varie entre 0,7/100 000 en Chine, 1,4/100 000 aux USA et 1,5/100 000 en France. Dans le nord de l'Espagne, l'incidence est de 0,19 cas/100 000 par an⁷³, et de 1/100 000 en Loire Atlantique.

La présence de localisation secondaire ou métastatique est rare, alors que les récurrences locales représentent le plus souvent la cause des décès^{74,75}. L'âge médian de survenue varie

⁷⁰ Barnes L. Intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Am J Surg Pathol* 1986;**10**:192-202

⁷¹ Dulguerov P, Jacobsen MS, Allal AS, Lehmann W, *et al.* Nasal and paranasal sinus carcinoma: are we making progress? A serie of 220 patients and a systematic review. *Cancer* 2001;**92**:3012-29

⁷² Luce D, Leclerc A, Bégin D, Demers PA, *et al.* Sinonasal cancer and occupational exposures: a pooled analysis of 12 case-control studies. *Cancer Causes Control* 2002;**13**:147-57

⁷³ Nunez F, Suarez C, Alvarez I, Losa JL, *et al.* Sino-nasal adenocarcinoma ; epidemiological and clinico-pathological study of 34 cases. *J Otolaryngol* 1993;**22**:86-90

⁷⁴ Suarez C, Llorente JL, Fernandez de Leon R, Cabanillas R, *et al.* Anterior craniofacial resection: oncologic outcome and complications in a series of 111 cases. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2004;**55**:27-33

⁷⁵ Choussy O, Ferron C, Védrine PO, Toussaint B, *et al.* GETTEC Study Group. Adenocarcinoma of ethmoid: a GETTEC retrospective multicenter study of 418 cases. *Laryngoscope* 2008;**118**:437-43

entre 50 et 60 ans. Les hommes sont atteints quatre fois plus que les femmes. Ceci est en rapport avec la plus forte proportion d'hommes exposés aux métiers du bois.

II – AGENTS CANCEROGENES

A - La poussière de bois

L'association entre exposition aux poussières de bois et survenue de cancers naso-sinusiens a été mise en évidence dans de très nombreuses études. Une synthèse est réalisée par la monographie du Centre International de Recherche sur le Cancer qui reconnaît la poussière de bois en tant qu'agent cancérigène certain⁷⁶.

Sur un ensemble de 5 cohortes exposées aux poussières de bois, Demers *et al.* démontrent en 1995 un excès significatif de décès par cancer naso-sinusien (SMR = 310 ; IC 95 % [160-560])⁷⁷. Le SMR augmente nettement avec la probabilité d'exposition (exposition possible : 80 ; exposition probable 180 ; exposition certaine 840). Le risque augmente également avec le temps écoulé depuis la première exposition. Le SMR le plus élevé est observé chez ceux qui ont débuté leur exposition au moins 30 ans auparavant et semble limité aux travailleurs embauchés avant 1940.

Une autre méta-analyse regroupant les données de 12 études cas-témoins a été réalisée par Demers *et al.* pour évaluer la relation entre exposition au bois et cancer naso-sinusien. Sept catégories de professions ont été utilisées⁷⁸. L'exposition à la poussière de bois avait été estimée à l'aide d'une matrice emploi-exposition, chaque emploi étant classé en fonction du niveau d'exposition à la poussière en 4 catégories (non exposé, exposition faible, modérée, élevée). Les concentrations correspondant aux niveaux faibles, modéré et élevé, étaient respectivement : «inférieur à 1 mg/m³», «de 1 à 5 mg/m³», «supérieur à 5 mg/m³ ». Chez les hommes, le risque d'adénocarcinome augmente très nettement avec le niveau d'exposition, (OR = 45,5 ; IC 95 % [28,3-72,9]) pour le niveau le plus élevé, et augmente également significativement avec la durée d'exposition (tableau n° 13).

⁷⁶ IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. Wood dust and formaldehyde. 1995;62:1-440

⁷⁷ Demers PA, Boffetta P, Kogevinas M, Blair A, *et al.* Pooled reanalysis of cancer mortality among five cohorts of workers in wood-related industries. *Scand J Work Environ Health* 1995;21:179-90

⁷⁸ Demers PA, Kogevinas M, Boffetta P, Leclerc A, *et al.* Wood dust and sino-nasal cancer: pooled reanalysis of twelve case-control studies. *Am J Ind Med* 1995;28:151-66

Tableau n° 13 : Risque de développer un adénocarcinome de l'ethmoïde selon le niveau d'exposition aux poussières de bois.

	Catégorie d'exposition	Cas (%)	Témoins (%)	OR (IC 95 %)
Carcinomes épidermoïdes				
Hommes	Faible	6 (2)	83 (4)	0,51 (0,2-1,2)
	Modérée	42 (13)	402 (17)	0,97 (0,7-1,4)
	Elevée	11 (3)	82 (3)	0,81 (0,4-1,6)
Femmes	Faible	2 (2)	11 (1)	1,46 (0,29-7,31)
	Modérée	2 (2)	10 (1)	4,51 (0,87-3,5)
	Elevée	2 (2)	6 (1)	1,63 (0,31-8,59)
Adénocarcinomes				
Hommes	Faible	1 (1)	83 (4)	0,6 (0,1-4,7)
	Modérée	14 (8)	402 (17)	3,1 (1,6-6,1)
	Elevée	104 (62)	82 (3)	45,5 (28,3-72,9)
Femmes	Faible	2 (8)	11 (1)	7,7 (1,3-44,8)
	Modérée	0 (0)	10 (1)	0
	Elevée	0 (0)	6 (1)	0

Pesch B. *et al.* confirment dans une étude cas-témoin publiée en 2007 l'existence d'un risque élevé (OR = 48,47 ; IC 95 % [13,30-176,63]) pour des expositions supérieures à 5 mg/m³. Pour des expositions comprises entre de 3,5 et 5 mg/m³, l'odd ratio est retrouvé plus élevé par rapport à l'étude de Demers *et al.* (OR = 10,54 ; IC 95 % [3,34-33,27])⁷⁹.

Un risque très élevé d'adénocarcinome naso-sinusal est observé pour les hommes employés dans les professions du bois (OR = 13,5 ; IC 95 % [9,0-20,0]). Le risque est particulièrement élevé pour les ébénistes et les personnes travaillant dans la fabrication de meubles (OR = 41 ; IC 95 % [24,5-68,7]). En revanche, aucune augmentation du risque d'adénocarcinome n'est observée pour les bûcherons, les travailleurs forestiers ou ceux travaillant dans la fabrication de pâte à papier. Aucune association n'est observée pour les

⁷⁹ Pesch B, Pierl CB, Gebel M, Gross I, *et al.* Occupational risks for adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses in the German wood industry. *Occup Environ Med* 2008;**65**:191-6

carcinomes épidermoïdes : pour l'ensemble des professions du bois, chez les hommes, et chez les femmes.

Dans une étude française, l'odd ratio associé à un niveau d'exposition élevé aux poussières de bois dur est de 530 (IC 95 % [104-2696]). Le risque augmente également avec la durée d'exposition. Ces résultats sont confirmés par d'autres études, dans lesquelles le type de bois n'est pas pris en compte dans l'analyse, mais où une exposition prédominante aux bois durs est signalée⁸⁰. Si l'association entre adénocarcinome et poussières de bois durs est particulièrement forte, rien ne permet cependant d'exclure le rôle de l'exposition aux bois tendres car souvent on trouve une co-exposition⁸¹.

Il semble que les augmentations de risque de cancer naso-sinusiens soient bien attribuables à la poussière de bois elle-même, l'association étant observée à différentes périodes, dans des groupes professionnels variés mais ayant toujours comme facteur commun l'exposition à la poussière de bois, c'est pourquoi le CIRC a classé, en 1995, les poussières de bois comme étant cancérigènes pour l'homme.

En France, le cancer primitif de l'ethmoïde et des sinus de la face avait été inscrit au tableau 47B des maladies professionnelles le 22 janvier 1982.

B - Autres agents carcinogènes suspectés

1 - Le cuir

Les poussières de bois sont à l'origine de 90 % des cancers, mais le cuir contenant des tanins pourrait aussi intervenir car les tanins ont un rôle carcinogène expliqué par un effet de précipitation des protéines et des ribosomes⁸².

Un excès de cancers naso-sinusiens chez les travailleurs du cuir, particulièrement dans la fabrication et la réparation de chaussures a été mis en évidence dans de nombreuses études

⁸⁰ Leclerc A, Martinez CM, Genin M, Luce D, *et al.* Sinonasal cancer and wood dust exposure. Results from a case-control study. *Am J Epidemiol* 1994;**140**:340-9

⁸¹ IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. Wood dust and formaldehyde. 1995;62:1-440

⁸² IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. Leather industries: boot and shoe manufacture and repair. In : Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. 1987;(Suppl)**7**:232-7

au Royaume-Uni, dans les pays scandinaves⁸³, et en Italie⁸⁴. La fabrication et la réparation de chaussures sont considérées comme cancérogènes pour l'homme par le CIRC, sans que l'agent responsable ne soit clairement identifié⁸².

Ces excès concernent principalement les adénocarcinomes, mais certains résultats suggèrent que les autres types histologiques puissent aussi être concernés. Le rôle de la poussière de cuir a été suggéré par l'observation de risques plus élevés dans les postes exposant à la poussière. Merler *et al.* montrent une relation très nette entre le niveau d'exposition à la poussière de cuir et le risque d'adénocarcinome pour des expositions modérées (OR = 20,4 ; IC 95 % [2,7-152]), et pour des expositions fortes (OR = 88 ; IC 95 % [12 - 642])⁸⁵. Pour les autres types histologiques l'odd ratio associé à l'exposition à la poussière de cuir est plus faible (OR = 6,9 ; IC 95 % [1,4-34,4]).

Bonnetere *et al.* ont montré en 2007 un excès d'adénocarcinomes de l'ethmoïde chez les professionnels exposés au cuir ayant consulté en France dans les Centres de Pathologie Professionnels et dont le dossier avait été inclus dans la base de données du Réseau National de Vigilance des centres de Pathologie Professionnelle (RNVPP)⁸⁶.

À ce jour, l'adénocarcinome de l'ethmoïde en lien avec une exposition au cuir n'est pas inscrit aux tableaux des maladies professionnelles.

2 - Les composés dérivés du nickel et du chrome

L'association entre la survenue de cancer naso-sinusien et l'exposition aux composés du nickel rencontrés dans le raffinage de ce métal est bien connue. Des excès de cancers naso-sinusiens ont également été observés dans des cohortes de travailleurs exposés au chrome hexavalent⁸⁷. Dans les études cas-témoins, les expositions au nickel et au chrome (souvent simultanées) proviennent essentiellement du soudage sur acier inoxydable ou de la peinture au pistolet, et les niveaux sont faibles, ce qui explique peut-être les résultats dans l'ensemble négatifs. Hernberg *et al.*, étudiant ce type d'exposition ont cependant observé un odd ratio de

⁸³ Andersen A, Barlow L, Engeland A, Kjaerheim K, *et al.* Work-related cancer in the Nordic countries. *Scand J Work Environ Health* 1999;**25**(Suppl 2):1-116

⁸⁴ Merler E, Baldasseroni A, Laria R, Faravelli P, *et al.* On the causal association between exposure to leather dust and nasal cancer: further evidence from a case-control study. *Br J Ind Med* 1986;**43**:91-5

⁸⁵ Merler E, Baldasseroni A, Laria R, Faravelli P, *et al.* On the causal association between exposure to leather dust and nasal cancer: further evidence from a case-control study. *Br J Med* 1986;**43**:91-5

⁸⁶ Bonnetere V, Deschamps E, Persoons R, Bernardet C, *et al.* Sino-nasal cancer and exposure to leather dust. *Occup Med (Lond)* 2007;**57**:438-43

⁸⁷ IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. Chromium, nickel and welding. 1990;**49**:1-648

2,7 (OR = 2,7 ; IC 95 % [1,1-6,6]) pour l'exposition au chrome, de 2,4 (OR = 2,4 ; IC 95 % [0,9-6,6]) pour l'exposition au nickel et un odd ratio de 2,8 (OR = 2,8 ; IC 95 % [1,2-6,9]) pour les fumées de soudage⁸⁸.

L'adénocarcinome de l'ethmoïde en lien avec une exposition au nickel a été inscrit dans le tableau 37 ter des maladies professionnelles le 28 juillet 1987 en France pour les opérations de grillage de matras de nickel.

3 - Le Formaldéhyde

Les études de cohorte portant sur des travailleurs exposés au formaldéhyde ne mettent pas dans l'ensemble en évidence d'excès de cancers naso-sinusiens^{89,90}.

Olsen JH *et al.* montrent un risque significativement élevé de cancer naso-sinusien, tous types histologiques confondus, chez les hommes exposés au formaldéhyde (OR = 2,8 ; IC 95 % [1,8-4,3])⁹¹. Le risque était légèrement augmenté pour les hommes exposés au moins 10 ans auparavant (OR = 3,1 ; IC 95 % [1,8-5,3]). Cependant, après ajustement sur l'exposition à la poussière de bois, l'odd ratio n'était plus significatif (OR = 1,6 ; IC 95 % [0,7-3,6]).

Vaughan *et al.*, Roush *et al.*, n'observent pas d'odd ratio significativement élevé, quelque soit la variable d'exposition étudiée^{92,93}.

Dans une étude réalisée aux Pays-Bas, l'exposition au formaldéhyde a été évaluée indépendamment par deux experts en hygiène industrielle, à partir des intitulés d'emploi⁹⁴. Pour les hommes non exposés au bois ou exposés à des niveaux faibles, un risque élevé de cancer naso-sinusien est associé à l'exposition au formaldéhyde. Une augmentation modérée

⁸⁸ Hernberg S, Westerholm P, Schultz-Larsen K, Degerth R, *et al.* Nasal and sinonasal cancer. Connection with occupational exposures in Denmark, Finland and Sweden. *Scand J Work Environ Health* 1983;**9**:315-26

⁸⁹ Partanen T. Formaldehyde exposure and respiratory cancer-a meta-analysis of the epidemiologic evidence. *Scand J Work Environ Health* 1993;**19**:8-15

⁹⁰ Collins JJ, Acquavella JF, Esmen NA. An updated meta-analysis of formaldehyde exposure and upper respiratory tract cancers. *J Occup Environ Med* 1997;**39**:639-51

⁹¹ Olsen JH, Jensen SP, Hink M, Faurbo K, *et al.* Occupational formaldehyde exposure and increased nasal cancer risk in man. *Int J Cancer* 1984;**34**:639-44

⁹² Vaughan TL, Strader C, Davis S, Daling JR. Formaldehyde and cancers of the pharynx, sinus and nasal cavity: I. Occupational exposures. *Int J Cancer* 1986;**38**:677-83

⁹³ Roush GC, Walrath J, Stayner LT, Kaplan SA, *et al.* Nasopharyngeal cancer, sinonasal cancer, and occupations related to formaldehyde: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 1987;**79**:1221-4

⁹⁴ Hayes RB, Raatgever JW, de Bruyn A, Gerin M. Cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses and formaldehyde exposure. *Int J Cancer* 1986;**37**:487-92

du risque avec celle du niveau d'exposition est également observée (tendance significative seulement avec l'évaluation d'un des experts). Lorsque l'analyse est restreinte aux carcinomes épidermoïdes, les risques sont plus élevés et significatifs (OR = 3,0 ; IC 95 % [1,3-6,4] ou OR = 1,9; IC 95 % [1,0-3,61]) selon les deux experts et augmentent significativement avec le niveau d'exposition. Une autre étude suggère une association entre exposition au formaldéhyde et cancer naso-sinusien particulièrement pour les carcinomes épidermoïdes⁹⁵.

Luce D. *et al.* ont examiné la relation entre exposition au formaldéhyde et cancer naso-sinusien. Le risque d'adénocarcinome associé à l'exposition au formaldéhyde est significativement augmenté pour les catégories les plus exposées selon le niveau (OR = 5,3 ; IC 95 % [1,3-22,2]) et la durée (OR = 6,9 ; IC 95 % [1,7-27,8]). Ces résultats suggèrent que l'exposition conjointe au formaldéhyde et au bois puisse augmenter le risque d'adénocarcinome⁹⁶.

Plus récemment, Pesch B. *et al.* ne retrouvent pas d'augmentation de risque d'adénocarcinome pour les professionnels exposés au formaldéhyde⁹⁷.

En raison de la forte association entre adénocarcinome naso-sinusien et exposition au bois, il est très difficile d'évaluer un effet propre du formaldéhyde sur ce type de cancer, la plupart des sujets exposés au formaldéhyde l'étant aussi au bois.

4 - Les textiles et poussières végétales

Le travail du textile a été régulièrement associé à un risque élevé de cancer naso-sinusien dans différents pays, en particulier aux Etats-Unis⁹⁸, au Royaume-Uni⁹⁹, en Suède¹⁰⁰, au Danemark¹⁰¹, en Italie¹⁰², et en France¹⁰³.

⁹⁵ Olsen JH, Asnaes S. Formaldehyde and the risk of squamous cell carcinoma of the sinonasal cavities. *Br J Ind Med* 1986;**43**:769-74

⁹⁶ Luce D, Gerin M, Leclerc A, Morcet JF, *et al.* Sinonasal cancer and occupation exposure to formaldehyde and other substances. *Int J Cancer* 1993;**53**:224-31

⁹⁷ Pesch B, Pierl CB, Gebel M, Gross I, *et al.* Occupational risks for adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses in the German wood industry. *Occup Environ Med* 2008;**65**:191-6

⁹⁸ Brinton LA, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. Nasal cancer in the textile and clothing industries. *Br J Ind Med* 1985;**42**:469-74

⁹⁹ Acheson ED, Cowdell RH, Rang EH. Nasal cancer in England and Wales: an occupational survey. *Br J Ind Med* 1981;**38**:218-24

¹⁰⁰ Magnani C, Comba P, Ferraris F, Ivaldi C, *et al.* A case-control study of carcinomas of the nose and paranasal sinuses in the woolen textile manufacturing industry *Arch Environ Health* 1993;**48**:94-7

¹⁰¹ Olsen JH. Occupational risks of sinonasal cancer in Denmark. *Br J Ind Med* 1988;**45**:329-35

Dans d'autres études aucune association n'a été observée^{104,105}. La plupart de ces études sont fondées sur les intitulés d'emploi et concernent différentes professions dans l'industrie textile.

Leclerc *et al.*¹⁰⁶ ont mis en évidence un risque chez les femmes employées dans l'industrie textile (OR = 2,6 ; IC 95 % [1,0-6,6]), et un risque élevé de carcinome épidermoïde pour les hommes préparateurs de fibres (OR = 5,1 ; IC 95 % [1,3-19,2]) ou finisseurs de produits textiles (OR = 3,0 ; IC 95 % [1,0-9,1]).

Brinton *et al.* observent un risque plus élevé chez les travailleurs exposés à la poussière de textile, qui a été considérée comme un agent causal plausible. Le risque ne semble pas limité à un type histologique, plusieurs études mettant en évidence des excès à la fois d'adénocarcinomes et de carcinomes épidermoïdes. Un rôle possible de la poussière de coton a été suggéré par Brinton *et al.* qui observent que la prise en compte du formaldéhyde ne modifiait pas les résultats concernant le textile¹⁰⁷.

D'autres expositions professionnelles ont été associées au risque de cancer nasosinusien, comme les peintures¹⁰⁸, les colles¹⁰⁹, et les chlorophénols¹¹⁰. Cependant récemment, Pesch *et al.* ne retrouvent pas d'association avec l'exposition au vernis, aux produits de traitement du bois et aux pigments de la peinture sauf pour des expositions antérieures à 1970¹¹¹. Des cancers des sinus de la face et des cellules mastoïdiennes ont été diagnostiqués chez des ouvrières américaines ayant travaillé avant 1930 à la peinture des cadrans lumineux de réveil et de montres. La peinture utilisée contenait du radium (226Ra et 228Ra) et les

¹⁰² Comba P, Battista G, Belli S, de Capua B, *et al.* A case-control study of cancer of the nose and paranasal sinuses and occupational exposures. *Am J Ind Med* 1992;**22**:511-20

¹⁰³ Luce D, Leclerc A, Morcet JF, Casal-Lareo A, *et al.* Occupational risk factors for sino-nasal cancer a case-control study in France. *Am J Ind Med* 1992;**21**:163-75

¹⁰⁴ Hayes RB, Gerin M, Raatgever JW, de Bruyn A. Wood-related occupations, wood dust exposure. and sinonasal cancer. *Am J Epidemiol* 1986;**124**:569-77

¹⁰⁵ Zheng W, Blot WJ, Shu XO, Diamond EL, *et al.* A population-based case-control study of cancers of the nasal cavity and paranasal sinuses in Shanghai. *Int J Cancer* 1992;**52**:557-61

¹⁰⁶ Leclerc A, Luce D, Demers PA, Boffetta P, *et al.* Sinonasal cancer and occupation. Results from the reanalysis of twelve case-control studies. *Am J Ind Med* 1997;**31**:153-65

¹⁰⁷ Brinton LA, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. Nasal cancer in the textile and clothing industries. *Br J Ind Med* 1985;**42**:469-74

¹⁰⁸ Olsen JH, Jensen JF, Hink M, Faurbo K, *et al.* Occupational formaldehyde exposure and increased nasal cancer risk in man. *Int J Cancer* 1984;**34**:639-44

¹⁰⁹ Luce D, Gerin M, Leclerc A, Morcet JF, *et al.* Sinonasal cancer and occupational exposure to formaldehyde and other substances. *Int J Cancer* 1993;**53**:224-31

¹¹⁰ Hardell L, Johansson B, Axelson O. Epidemiological study of nasal and nasopharyngeal cancer and their relation to phenoxy acid or chlorophenol exposure. *Am J Ind Med* 1982;**3**:247-57

¹¹¹ Pesch B, Pierl CB, Gebel M, Gross I, *et al.* Occupational risks for adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses in the German wood industry. *Occup Environ Med* 2008;**65**:191-6

femmes affinaient le pinceau en le pinçant entre leurs lèvres. La majorité de ces cancers sont des carcinomes épidermoïdes (56 %), 34 % sont des tumeurs muco-épidermoïdes et 10 % sont des adénocarcinomes. Des sarcomes osseux ont également été diagnostiqués chez ces ouvrières. Les études portant sur ces travailleurs ont joué un rôle historique dans la mise en place de mesures de protection contre les radiations et dans la compréhension des mécanismes de la cancérogenèse.

Un risque de cancer naso-sinusien a été observé par Holsen dans d'autres professions notamment chez des agriculteurs, dans l'industrie alimentaire (fabrication de cacao, chocolat, cuisiniers manipulant fruits et végétaux et ouvriers travaillant dans la conserverie)¹¹² sans que le mécanisme n'ait été expliqué par la suite.

5 - Rôle des constituants du bois et caractère cancérogène

Lorsque l'on reprend la composition du bois comme l'a présenté B. Fontaine¹¹³, on peut d'emblée faire ressortir les composés cancérogènes du bois. Ceux qui ont un caractère cancérogène fortement suspectés sont indiqués tableau n° 14. A noter qu'ils n'apparaissent pas tous dans les monographies de l'IARC. Au 1^{er} avril 2008, l'IARC classe la benzoquinone et le tannage du cuir dans le groupe 3 (inclassables quant à leur cancérogénicité chez l'homme). Les colles urée-formol encore utilisées dans les bois (panneaux, contreplaqués) sont reconnues cancérogènes.

Les tannins que l'on trouve dans le bois mais aussi dans le cuir, jouent un rôle particulier. Nous rappelons ici leurs principales fonctions et mécanismes d'action au niveau cellulaire : Les tannins (généralement désignés sous le nom d'acide tannique) sont des polyphénols hydrosolubles qui sont présents en beaucoup d'aliments végétaux. On a rapporté que l'incidence de certains cancers, tels que le cancer œsophagien, sont liés à la consommation des nourritures riches en tannins telles que des noix de bétel, les thés, suggérant que les tannins puissent être cancérogènes. Cependant, d'autres rapports ont indiqué que l'activité cancérogène des tannins pourrait être due aux composants liés aux tannins plutôt

¹¹² Olsen JH. Occupational risks of sinonasal cancer in Denmark. *Br J Ind Med* 1988;**45**:329-35

¹¹³ Fontaine B – L'industrie du bois. In : Pairon JC, Brochard P, Le Bourgeois JP, Ruffié P- Les cancers professionnels. Tome II. Paris : Margaux Orange; 2005:262-75,580p.

Tableau n° 14 : Composition du bois et agents cancérigènes (* = risque cancérigène).

Selon Fontaine B – L'industrie du bois. In : Pairon JC, Brochard P, Le Bourgois JP, Ruffié P- Les cancers professionnels. Tome II. Paris : Ed. Margaux Orange ; 2005: 262-75

Famille chimique	Bois tendres	Bois durs tempérés	Bois durs tropicaux
	Sapin, cèdre, cyprès, mélèze, épicéa, pin, séquoia...	Erable, aulne, bouleau, châtaignier, chêne, hêtre, frêne, noyer, orme, peuplier, cerisier, saule, tilleul...	Teck, palissandre, pesé, iroko, sipo okoumé....
Cellulose	+++	+++	+++
Hémicelluloses	+ nombreuses unités de mannose et galactose	++ nombreuses unités de xylose	++ nombreuses unités de xylose
Lignine	+ Guaiacyl-lignine Essentiellement	+ composition variable	+ composition variable
Huiles, graisses, cires	+	+ surtout triglycérides	+ surtout triglycérides
Terpènes	++ Toutes classes en particulier α et β pinènes, acides abiétique, pimarique et palustrique	Triterpènes stéroïdiens (sitostérol)	Monoterpènes, sesquiterpènes, triterpènes stéroïdiens
Composés phénoliques	Aldéhydes Tannins condensés+/- * Lignanes 2,6-diméthoxybenzoquinone	Acides et aldéhydes* Tannins hydrolysables+* (chêne et châtaignier++) Tannins condensés+* Lignanes (aulne, chêne, orme) 2-6 diméthoxybenzoquinone*	Acides et aldéhydes* Tannins condensés+++* Composés quinoniques++* 2-6 diméthoxybenzoquinone*

qu'aux tannins eux-mêmes. Plusieurs rapports ont indiqué l'association négative entre la consommation de thé et les incidences des cancers. Les polyphénols de thé ont aussi été suggérés pour être anticarcinogéniques. Les potentiels anticarcinogènes et antimutagènes des tannins pourraient être liés à leur propriété antioxydante, qui est importante en protégeant des dommages oxydants cellulaires, y compris la peroxydation lipidique. On a rapporté que la formation des radicaux de superoxyde est empêchée par des tannins et de ses composés connexes.

Les mécanismes toxicologiques des tannins sont rappelés ci-après (l'ensemble des données a été obtenu à partir du logiciel de recherche du Centre-Antipoison de Rennes : Micromedex, Healthcare Series : Products Thomson Reuters, 2008).

L'acide tannique est un astringent qui agit localement en précipitant des protéines. Habituellement seulement la surface de la cellule est affectée, par conséquent, la perméabilité de la membrane de la cellule est considérablement réduite mais la cellule elle-même demeure viable¹¹⁴. L'acide tannique exerce peu d'effet (excepté la décoloration possible) sur une peau

¹¹⁴ Osol A, Farrar GE. The Dispensary of the United States of America. 25^{éd}. Philadelphia: JB Lippincott; 1955,2139p.

intacte ; cependant, il coagule les protéines de surface cellulaire¹¹⁵. L'acide tannique exerce une action astringente sur les muqueuses de l'appareil gastro-intestinal, mais il est peu absorbé¹¹⁶. Il forme également des précipités insolubles avec beaucoup d'ions, d'alcaloïdes et de glycosides de métaux lourds¹¹⁷. L'acide tannique a été classifié parmi les agents cytotoxiques qui interfèrent des voies métaboliques essentielles causant de ce fait nécrose et/ou les dommages de type cholestatique au foie¹¹⁸. L'hépatocarcinogénicité de l'acide tannique a été attribuée à sa capacité de désagréger des polysomes et des membranes microsomiales par dégranulation in vivo et in vitro^{119,120}. Par inhalation, il est tenu pour responsable de rhinite inflammatoire et de fibrose. On peut donc supposer que l'acide tannique agit essentiellement sur la muqueuse nasale avec un mécanisme « irritatif » responsable d'une inflammation chronique. Par ses fonctions phénols, il a aussi un caractère électrophile. Les autres composants du bois : benzoquinones, aldéhydes, produits de traitements du bois tels (pentachlorophénols, xylènes), colles urée-formol, ceux-ci ont en commun leur caractère électrophile qui peut les conduire à former des adduits avec la guanine au niveau des gènes (donneuse d'électrons sur ses fonctions -NH) comme nous l'avons vu dans la première partie.

Au total, on peut faire les hypothèses suivantes : les constituants de la poussière de bois, notamment la 2-6 dimethoxybenzoquinone, le formol sont susceptibles de former des adduits sur l'ADN et leur action synergique qui peut expliquer le caractère cancérigène des poussières de bois. Concernant le cuir, il est souvent évoqué la présence des tannins en tant qu'agent cancérigène commun avec la poussière de bois, or nous l'avons vu, les sels de chrome peuvent être utilisés dans le tannage du cuir, et des amines aromatiques ont pu être utilisés en tant que colorant.

¹¹⁵ Budavari S. The Merck Index. 12^{éd}. White House Station, New Jersey: Merck & Co Inc; 1996,2300p.

¹¹⁶ Gosselin RE, Smith RP, Hodge HC. Clinical toxicology of commercial products. 5^{éd}. Baltimore: Williams & Wilkins; 1984

¹¹⁷ Stollmann T. A manual of pharmacology and its applications to therapeutics and toxicology. 8^{éd}. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1957

¹¹⁸ Ellenhorn MJ, Barceloux DG. Medical toxicology: diagnosis and treatment of human poisoning. New York: Elsevier; 1988, 1512p.

¹¹⁹ Gupta MM, Dani HM. Characterization of tannic acid metabolites formed in vitro by rat liver microsomes and assay of their carcinogenicity by the microsomal degranulation technique. *Chem Biol Interact* 1987;**63**:39-45

III – ANATOMIE

L'ethmoïde est constitué de quatre parties (figures n° 15-17) :

- la lame verticale,
- la lame horizontale,
- deux masses latérales appendues à la lame horizontale.

La lame verticale est divisée en deux par la lame horizontale. À sa partie supérieure on trouve l'apophyse crista galli, qui est intracrânienne. Elle sépare les deux gouttières olfactives et reçoit l'insertion de la faux du cerveau. A sa partie inférieure, la lame perpendiculaire qui est endonasale. Elle participe à la formation de la cloison nasale.

La lame horizontale ou lame criblée est grossièrement rectangulaire et sépare les fosses nasales de la cavité crânienne. Elle forme par sa face supérieure, les gouttières olfactives et, par sa face endonasale, la voûte des fosses nasales. Elle est criblée d'orifices livrant le passage aux filets olfactifs.

Les masses latérales sont appendues aux bords externes de la lame horizontale et s'interposent entre fosses nasales et les cavités orbitaires. Elles sont pneumatisées par les cellules ethmoïdales, constituant le labyrinthe ethmoïdal qui s'ouvre dans les fosses nasales au niveau s méats supérieur et moyen. Elles mesurent 30- 40 mm de long, 25 mm de haut, 5- 10 mm de large en avant et 15-20 mm en arrière.

Elles sont délimitées par six faces :

- une face antérieure ou maxillo-unguéale, répondant à l'unguis et au processus frontal du maxillaire supérieur,
- une face latérale ou orbitaire, constituant une partie de la lame papyracée ou lame orbitaire ou os planum,
- une face supérieure ou cranio-frontale qui constitue le toit de l'ethmoïde,
- une face médiale ou endonasale. Elle présente des saillies osseuses correspondant à la lame des cornets et à l'apophyse unciforme,
- une face inférieure ou maxillaire,
- une face postérieure ou sphénoïdale.

Figure n° 15 : Anatomie générale de l'ethmoïde

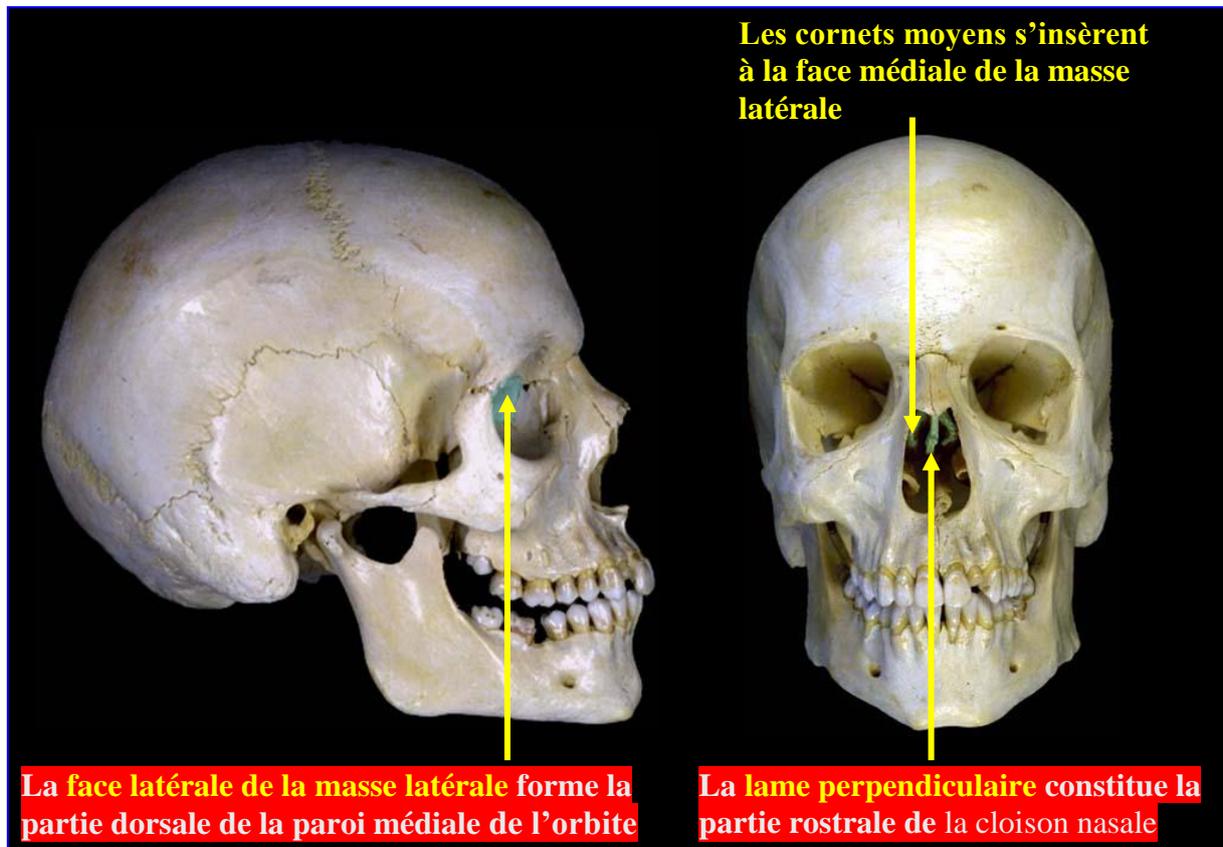


Figure n° 16 : Ethmoïde, coupe sagittale avec l'aimable autorisation de M. le Professeur Beauvillain de Montreuil



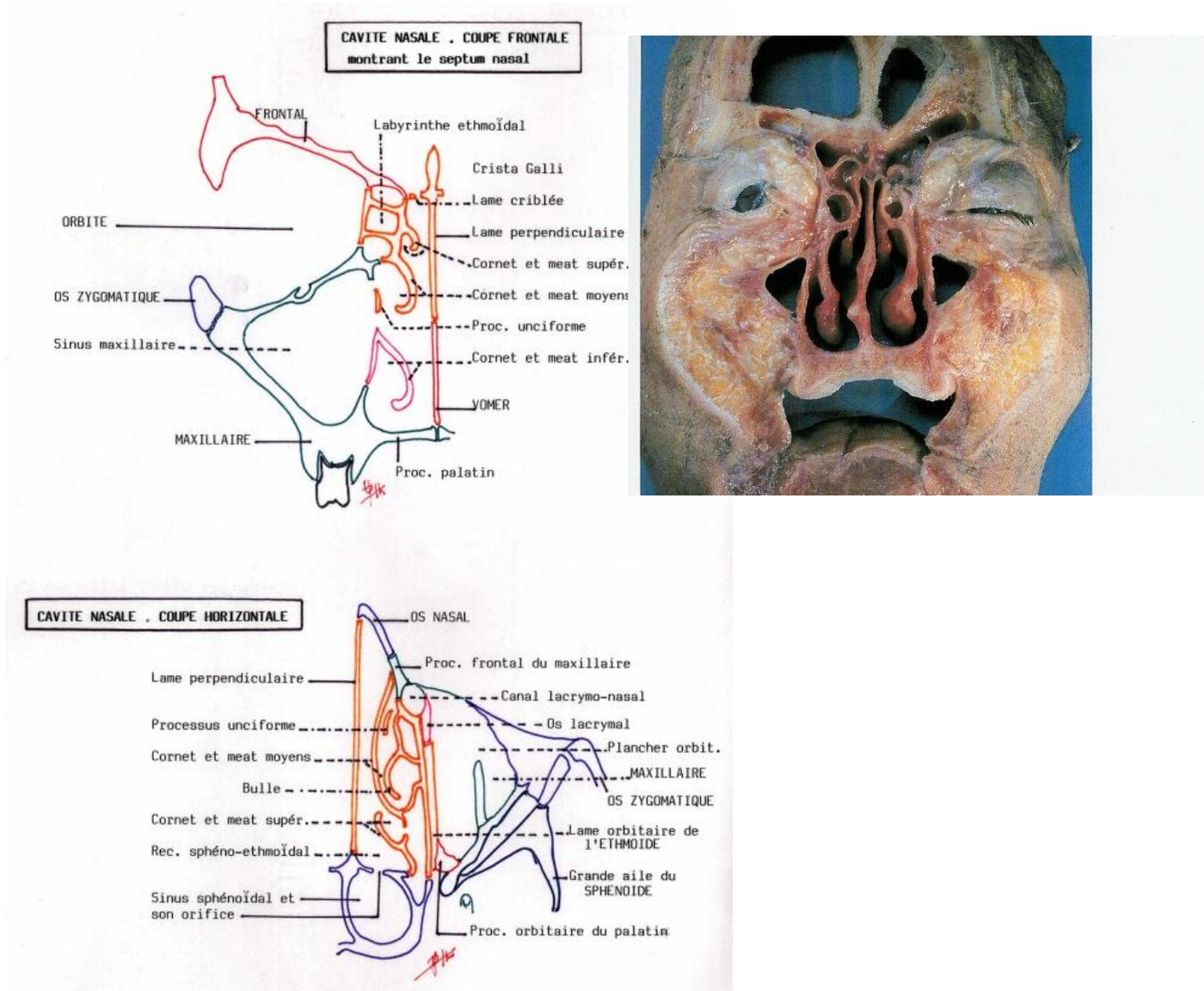


Figure n° 17 : Coupes frontales et horizontales de l'ethmoïde. Source consultée le 2/03/09 : http://moodle.univ-brest.fr/medecine/public/documents/Anat/Osteologie/Os_crane_face/

IV – HISTOLOGIE

Les fosses nasales sont composées de trois types d'épithélium (figures n° 18-19)

- respiratoire, pseudostratifié, cilié
- olfactif
- vestibulaire

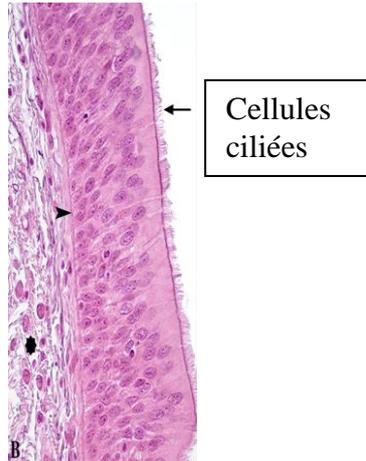


Figure n° 18 : Épithélium respiratoire pseudostratifié (flèche : épithélium pseudostratifié reposant sur la membrane basale).

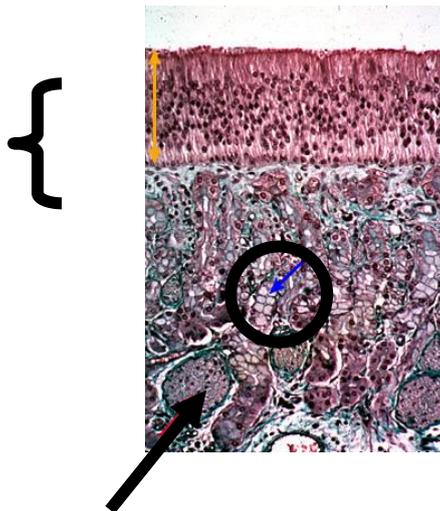


Figure n° 19 : Coupe de la muqueuse olfactive
(Accolade : limites de l'épithélium, flèche : filet du nerf olfactif, cercle : glande de Bowman)

V – ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Plusieurs classifications de l'adénocarcinome de l'ethmoïde ont été proposées tenant compte du degré de différenciation de la tumeur (tableau n° 15). Celles de Barnes et Klensseisser sont actuellement les plus usitées.

Tableau n° 15 : Classifications histologiques de l'adénocarcinome de l'ethmoïde¹²¹.

OMS		<ul style="list-style-type: none"> • structure glandulaire • très différencié • type particulier, mucosécrétant et pseudo colique
BRUX LEROUX- ROBERT	1969	<ul style="list-style-type: none"> • Papillaire • Trabéculaire • Colloïde muqueux • Peu différencié ou cribriforme • Formes rares
ATSAKIS	1963	<ul style="list-style-type: none"> • papillaires • sessiles • mucoïdes alvéolaires (mucineux)
GAMEZ- ARAJO	1975	<ul style="list-style-type: none"> • bien différenciés (PAS +) • peu différenciés (PAS -)
GORGUET	1982	<ul style="list-style-type: none"> • formes mucipares (orthoplasiques, plus ou moins orthoplasiques et anaplasiques) • les formes non mucipares • les cylindromes (carcinomes adénoïdes kystiques)
HEFFNER	1982	<ul style="list-style-type: none"> • Bas grade à structure tubulo-papillaires (à partir de glandes annexes) • Haut grade à structure glandulaire (à partir de l'épithélium)
BARNES	1986	<ul style="list-style-type: none"> • papillaire • colloïde • solide • mucineux
KLEINSASSER	1988	<ul style="list-style-type: none"> • à cellules cylindriques, de structure papillaire et tubulaire • à cellules caliciformes, de structure alvéolaire • à cellules en bague à chaton, de structure pleine • formes intermédiaires
ATSAKIS ET HYAMS	1988	<ul style="list-style-type: none"> • Associe les critères des classifications de Batsakis et de Heffner

¹²¹ Jegoux F. Adénocarcinomes de l'ethmoïde : expérience nantaise (80 cas). Place de la résection de la base du crâne par voie transfaciale, Thèse médecine Nantes, 2002, p.23

Barnes *et al.* dans une étude descriptive des adénocarcinomes de l'ethmoïde en 1986, définissent le type intestinal (ITAC) lié à une exposition aux poussières de bois et le type non intestinal¹²². Les adénocarcinomes de type non intestinal ne sont pas liés à une exposition professionnelle. Le type intestinal atteint préférentiellement la cavité nasale ou les sinus paranasaux. Il peut se produire sporadiquement mais plus particulièrement lors d'expositions prolongées aux poussières en bois. Barnes a individualisé les adénocarcinomes de type intestinal (ITAC) des adénocarcinomes de type non intestinal. Les ITAC comprennent cinq sous types : papillaire, colique, solide, mucineux, et mixte. Le type papillaire est bien différencié avec un stroma fibreux entouré par des colonnes papillaires avec peu de mitoses cellulaires. Le type colique est moyennement différencié avec un aspect tubulo-papillaire et plus de mitoses intracellulaires. Le type mucineux comprend de larges plages de mucus. Le type solide est fait d'amas cellulaires sans structure organisée. Le type mixte associe à degrés divers ces sous-types. C'est cette classification que nous avons retenue pour classer les patients inclus dans nos études (figure n°20).

Kleinsasser et Schroeder. définissent en 1988 une classification des adénocarcinomes de l'ethmoïde avec cinq sous-types que l'on peut rapprocher de la classification de Barnes : PTCC (Papillar Tubular Cylinder Cell) type I = bien différencié, PTCC II = moyennement différencié, PTCC III = indifférencié, «alveolar globet, signet ring » = avec cellules en bagues à chaton correspondant au sous type mucineux et « tansitional » correspondant au sous-type mixte de la classification de Barnes^{123,124}. On retrouve la aussi une analogie avec la description anatomopathologique du cancer du colon (figures n° 21-23). Selon la classification de la Word Histologie Organisation¹²⁵, deux types histologiques sont aussi reconnus :

¹²² Barnes L, Johnson JT. Clinical and pathological considerations in the evaluation of major head and neck specimens resected for cancer. Part II. *Pathol Annu* 1986;**21**:83-110

¹²³ Kleinsasser O, Schroeder HG. Adenocarcinomas of the inner nose after exposure to wood dust. Morphological findings and relationships between histopathology and clinical behavior in 79 cases. *Arch Otorhinolaryngol* 1988;**245**:1-15

¹²⁴ Kleinsasser O, Schroeder HG. What's new in tumours of the nasal cavity? Adenocarcinomas arising after exposure to wood dust. *Pathol Res Pract* 1989;**184**:554-8

¹²⁵ Franchi A, Santucci M, Wenig B. Adenicarcinoma. In: Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D (eds) - World Health Organisation classification of tumours. Pathology and genetics of head and necks tumours. Lyon: IARC; 2005:20-3

- les adénocarcinomes de type intestinal (ITAC) par analogie au cancer colique (figures n° 20-24). Le plus fréquent est le type colique (40 %), puis viennent les types mucineux et mixte (22 %), solide (20 %), et papillaire (18 %) ;
- les adénocarcinomes de type non intestinal, ces derniers ne sont pas liés à une exposition aux poussières de bois.

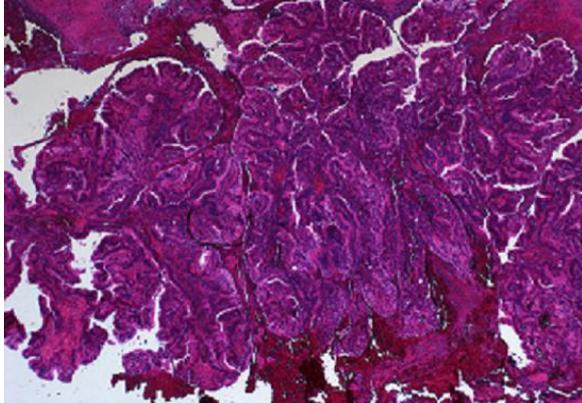
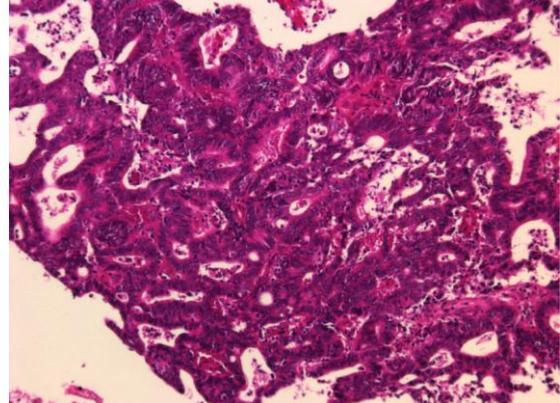
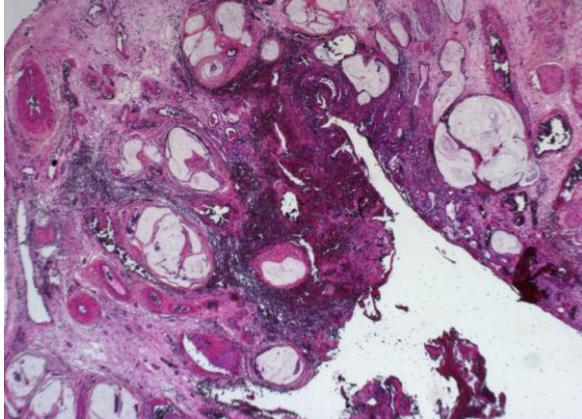
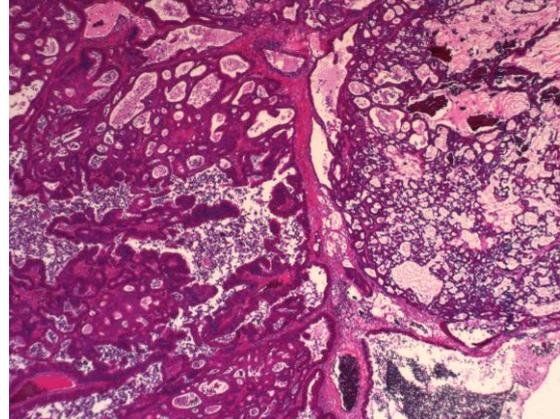
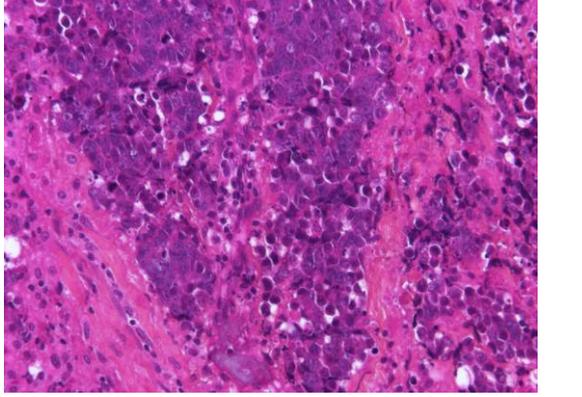
Adénocarcinome de l'ethmoïde de type intestinal sous- type papillaire	Adénocarcinome de l'ethmoïde de type intestinal sous- type colique
	
Adénocarcinome de l'ethmoïde de type intestinal sous- type mucineux	Adénocarcinome de l'ethmoïde de type intestinal type mixte
	
Adénocarcinome de l'ethmoïde de type non intestinal	
	<p>Figure n°20 : Les différents sous-types d'adénocarcinome de l'ethmoïde selon la classification de Barnes.</p> <p>Source : D. Tripodi <i>et al.</i> PHRC « marqueurs tumoraux de l'adénocarcinome de l'ethmoïde », CHU Nantes, 2008. Avec l'aimable autorisation de Madame le docteur Renaudin, Service d'Anatomie Pathologique, CHU Nantes.</p>

Figure n° 21 :

Polype colique (dysplasie légère), La prolifération glandulaire forme des tubes bordés de cellules dédifférenciées mais avec une mucosécrétion persistante. Les atypies cytonucléaires sont peu marquées. La membrane basale est partout respectée.

Source : <http://anapath-paris7.aphp.fr/imagerie/images/diapo454.html>
consultée le 02/03/09.

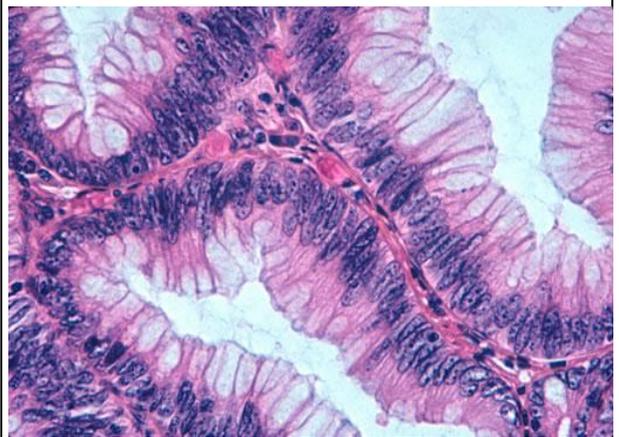


Figure n° 22 :

Adénome colique de type vilieux (dysplasie sévère). Les cellules bordant les villosités sont très irrégulières. On note des inversions de polarité sécrétoire (flèche).

Source : <http://anapath-paris7.aphp.fr/imagerie/images/diapo554.html>
consultée le 02/03/09.

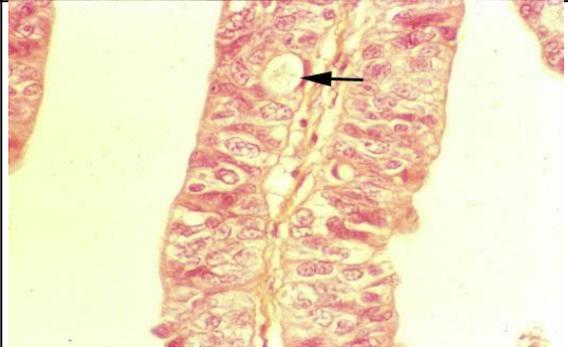
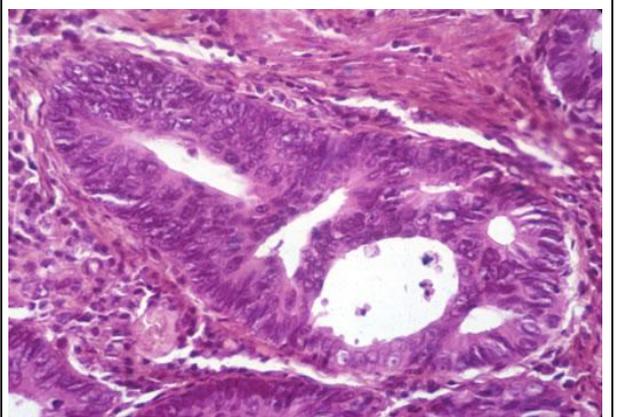
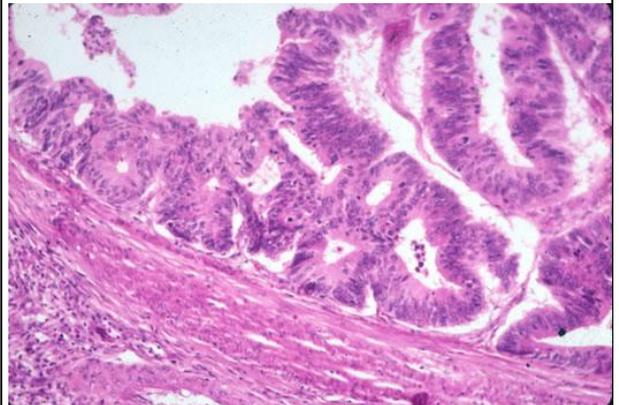


Figure n° 23 :

Adénocarcinome colique : formations tubulaires ou acineuses, avec amas creusés de plusieurs cavités qui sont séparés par une ou plusieurs couches de cellules épithéliales, réalisant l'aspect polyadénoïde.

Adénocarcinome colique : aspect polyadénoïde

Source : <http://anapath-paris7.aphp.fr/imagerie/images/diapo463.html>
consultée le 02/03/09



VI – PHYSIOPATHOLOGIE

On estime que les travailleurs du bois ont 900 fois plus de risques que la population générale et 500 fois plus que la population masculine de développer un adénocarcinome de l'ethmoïde¹²⁶. Malgré le lien étroit entre adénocarcinome de l'ethmoïde et poussière de bois, on connaît mal les mécanismes impliqués dans le développement de l'adénocarcinome.

Le modèle actuel retient que les cellules de la muqueuse nasale ont un turn-over important et les cellules sont éliminées vers le pharynx avec le flux de mucine. Les particules inhalées de moins de cinq microns sont retenues par la muqueuse. Jankowski *et al.* considèrent que l'adénocarcinome se développe préférentiellement sur les faces exo-sinusiennes de la masse latérale de l'ethmoïde et sur les parois de la fente olfactive, qui sont par ailleurs les zones préférentielles de dépôt des particules inférieures à 5 µm. Il s'agit en pratique de la lame des cornets (cornets moyens, supérieurs et racine d'insertion), de la face exo-sinusienne des cellules ethmoïdales au niveau du méat moyen, de la muqueuse en regard de la lame criblée et du septum en regard de la lame des cornets¹²⁷.

Ces particules perturbent la fonction d'élimination des cellules ciliées, ce qui prolongent le contact et ainsi prédispose à l'effet carcinogène. Sur le site où les particules de bois se sont déposées, se développe une hyperplasie et une métaplasie précurseur possible du cancer¹²⁸. La latence est comprise entre 20 et 30 ans.

Sur le plan expérimental, la poussière de bois n'a pas fait la preuve de son caractère carcinogène, l'hypothèse retenue actuellement est l'effet irritatif qui stimule le turn-over cellulaire par un phénomène inflammatoire chronique. En effet, récemment, Holmila *et al* ont montré que les cellules tumorales de l'adénocarcinome de l'ethmoïde ont des niveaux élevés du gène *COX 2* tel ce que l'on rencontre dans les carcinomes épidermoïdes liés au tabac ce qui peut conforter l'idée du rôle de l'inflammation chronique dans l'initiation tumorale¹²⁹.

Il est par ailleurs reconnu que l'inflammation chronique est un mécanisme d'irritation et de promotion tumorale dans différents cancers : cancer colorectal (recto-colite

¹²⁶ Acheson ED, Codwell RH, Hadfield E, Macbeth RG. Nasal cancer in the woodworkers in the furniture industry. *Br Med J* 1968;**2**:587-96

¹²⁷ Jankowski R, Georgel T, Vignaud JM, Hemmaoui B, *et al.* Endoscopic surgery reveals that woodworkers' adenocarcinomas originate in the olfactory cleft. *Rhinology* 2007;**45**:308-14

¹²⁸ Bussi M, Gervasio CF, Riontino E, Valente G, *et al.* Study of ethmoidal mucosa in a population at occupational high risk of sinonasal adenocarcinoma. *Acta Otolaryngol* 2002;**122**:197-201

¹²⁹ Holmila R, Cyr D, Luce D, Heikkilä P, *et al.* COX-2 and p53 in human sinonasal cancer: COX-2 expression is associated with adenocarcinoma histology and wood-dust exposure. *Int J Cancer* 2008;**122**:2154-9

hémorragique), cancer de l'estomac (gastrite chronique), cancer de l'œsophage (syndrome de Barrett)^{130,131,132}.

VII – CLINIQUE

Il s'agit de tumeurs à croissance lente, asymptomatique au départ. Les signes les plus fréquents peuvent ne pas attirer l'attention (rhinorrhée, obstruction nasale, épistaxis¹³³. Parfois ils sont attribués à une rhinite ou une sinusite. Le délai d'évolution des symptômes avant le diagnostic est de 6 à 8 mois. D'emblée, on peut rencontrer une extension orbitale, intracrânienne ou faciale.

Les symptômes sont alors différents : diplopie, exophtalmie, céphalées ou autres déficits neurologiques.

VIII – DIAGNOSTIC

Le diagnostic est réalisé par un prélèvement biopsique suite à une nasofibroscopie. C'est l'examen de choix pour le suivi et le dépistage de la population salariée exposée aux poussières de bois (3,6 millions de salariés concernés en Europe, 307 000 en France, dont 140 000 dans la construction et 42 000 dans la fabrication du meuble).

La nasofibroscopie être proposée tous les trois ans, on préconise une nasofibriscopie annuelle si le salarié est exposé de façon continue à des niveaux supérieurs à $1\text{mg}/\text{m}^3$, dans le cadre d'une surveillance médicale renforcée (article L. 4111-6 du Code du Travail).

Frimat P. *et al.*, ont réalisé en 2005 une étude visant à évaluer l'intérêt du scanner comparativement à la rhinoscopie dans le diagnostic précoce des pathologies naso-sinusiennes chez les salariés exposés à la poussière de bois. 940 salariés appartenant à 150 entreprises ont été inclus. 70% des sujets présentaient une muqueuse anormale. Un polype a été dépisté à la rhinoscopie postérieure. 304 scanners ont été réalisés aux sujets exposés depuis plus de quatre ans. 51% des scanners ont révélé des anomalies de type inflammatoire. Aucun cancer n'a été

¹³⁰ Chen R, Rabinovitch PS, Crispin DA, Emond MJ, *et al.* The initiation of colon cancer in a chronic inflammatory setting. *Carcinogenesis* 2005;**26**:1513-9

¹³¹ Clevers H. At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell* 2004;**118**:671-4

¹³² Van der Woude CJ, Kleibeuker JH, Jansen PL, Moshage H. Chronic inflammation, apoptosis and (pre)malignant lesions in the gastro-intestinal tract. *Apoptosis* 2004;**9**:123-30

¹³³ Choussy O, Ferron C, Védrine PO, Toussaint B, *et al.* GETTEC Study Group. Adenocarcinoma of ethmoid: a GETTEC retrospective multicenter study of 418 cases. *Laryngoscope* 2008;**118**:437-43

dépisté¹³⁴ (source : www.gnmbtp.org/references_documentaires/congres_2005/14.diaporama-boislille-frimat.pdf).

La Haute Autorité de la Santé a défini comme prioritaire la surveillance des salariés exposés aux poussières de bois et mène actuellement une réflexion afin d'établir un protocole national de bonnes pratiques de surveillance et dépistage de la population exposée. Considérant que l'adénocarcinome se développe préférentiellement sur les faces exosinusiennes de la masse latérale de l'ethmoïde et sur les parois de la fente olfactive¹³⁵, ceci nous a conduit à axer notre recherche sur les marqueurs de surface cellulaire.

¹³⁴ Laroque G, Fontaine B, Lemaître L, Frimat P- Le dépistage des pathologies naso-sinusiennes chez les salariés exposés aux poussières de bois : expérience lilloise. In : 28^{ème} Journées du BTP – Nice, 2005

¹³⁵ Jankowski R, Georgel T, Vignaud JM, Hemmaoui B, *et al.* Endoscopic surgery reveals that woodworkers' adenocarcinomas originate in the olfactory cleft. *Rhinology* 2007;**45**:308-14

IX – BILAN D'EXTENSION

Le bilan d'extension est réalisé à partir des données de l'examen clinique, radiologique IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) et scanner cérébral mais aussi par les données macroscopiques chirurgicales et les résultats des recoupes anatomopathologiques. L'IRM et le scanner cérébral sont très utiles pour visualiser les limites de la tumeur. Le scanner est supérieur à l'IRM pour visualiser l'extension à l'orbite, la cavité nasale et la base du crâne. L'IRM est supérieure pour évaluer les tissus mous et en particulier faire la différence entre tumeur et œdème péritumoral (figures n° 24a et n° 24b). La classification UICC 1997 (Union Internationale Contre le Cancer) est la plus usitée au moment de notre étude. Elle a été modifiée en 2003 en redéfinissant les stades T3, T4a, T4b (tableaux n° 16 et n°17).

Tableau n° 16 : Classification TNM de l'UICC 1997

T	T1 : Tumeur limitée à l'ethmoïde avec ou sans érosion osseuse. T2 : Tumeur étendue à la cavité nasale. T3 : Tumeur étendue à la partie antérieure de l'orbite ou au sinus maxillaire. T4 : Tumeur avec extension intracrânienne, orbitaire incluant le sommet, envahissant de l'os sphénoïde, ou frontal, ou la peau du nez.
N	N0 : pas de ganglion palpable. N1 : un seul ganglion homolatéral de 3 cm maximum. N2 : a- un seul ganglion homolatéral entre 3 et 6 cm b- plusieurs ganglions homolatéraux de moins de 6 cm c- ganglions bilatéraux ou ganglion controlatéral de plus de 6 cm. N3 : ganglion de plus de 6 cm.
M	M0 : pas de métastase à distance. M1 : présence de métastase à distance.

Tableau n° 17 : Classification TNM de l'UICC 2003 ¹³⁶.

T	T1 : Tumeur limitée avec une seule localisation ethmoïdale, avec ou sans invasion osseuse. T2 : Tumeur avec deux localisations sans dépasser la région ethmoïdale, avec ou sans invasion osseuse. T3 : Tumeur étendue au plancher de l'orbite, au sinus maxillaire, au palais ou la lame criblée. T4a : Tumeur avec une extension à l'étage antérieur de la base du crâne, aux fosses ptérygoïdes, aux sinus sphénoïdes ou frontaux ou à la partie antérieure de l'orbite : la peau, le nez, ou la joue. T4b : Tumeur envahissant les régions suivantes : partie antérieure de l'orbite, le cerveau, la base du crâne, les nerfs crâniens autres que le V ₂ , ou le nasopharynx.
N	Non modifiée
M	Non modifiée

¹³⁶ Patel SG, Shah JP. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA Cancer J Clin* 2005;**55**:242-58

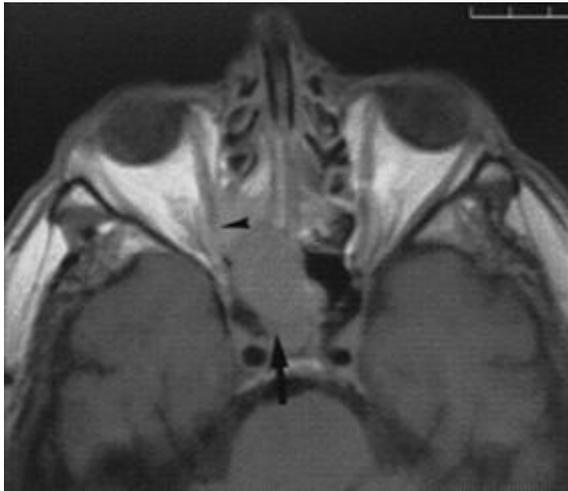


Figure n°24a :Scanner (coupe axiale)montrant respectivement l’extension de la tumeur au sinus sphénoïde et à l’orbite la classant T4 selon la classification TNM UICC 1997.



Figure n°24b : IRM (coupe coronale) montrant respectivement l’extension de la tumeur à l’orbite et au lobe frontal la classant T4 selon la classification TNM UICC 1997.

Source : http://www.amico13.com/base_donnees/datas_presentation/rhinologie/AdenoK.ppt
Consultée le 01/03/09.

X – PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE

Le traitement le plus communément admis est l'association de la chirurgie suivie de radiothérapie complémentaire. Cette stratégie dépend :

- de l'extension tumorale (et son extirpabilité),
- de l'opérabilité du patient,
- des habitudes de l'équipe.

Le traitement chirurgical radical associé à la radiothérapie reste le traitement de choix. Les patients inopérables sont parfois traités par chimiothérapie afin de diminuer la taille de la tumeur avant chirurgie ou radiothérapie. Les progrès ont fait que la grande majorité des tumeurs sont opérées en première intention. Lorsqu'il y a atteinte des sinus caverneux, du chiasma optique ou une infiltration cérébrale, la chirurgie n'est pas radicale.

Le type de geste chirurgical dépend de la localisation et de la taille des tumeurs. L'approche neurochirurgicale a ses indications : l'abord cranio-facial est choisi en cas d'envahissement de la base du crâne, l'abord subcranial est choisi en cas d'atteinte bilatérale.

Le traitement le plus communément admis est l'association de la chirurgie suivie de radiothérapie complémentaire. Cette stratégie dépend :

- de l'extension tumorale (et son extirpabilité),
- de l'opérabilité du patient,
- des habitudes de l'équipe.

A - Chirurgie

La voie paralatéronasale : l'intervention princeps est celle décrite par Moure en 1902, L'incision suit le sillon alonien puis le sillon naso-génien. Elle remonte verticalement en paranasal jusqu'en dessous du sourcil en passant en avant du canthus interne. Cette incision est d'emblée transfixiante en bas et jusqu'au plan osseux.

La voie mixte combinée trans-faciale et sous-frontale. Elle est réalisée par deux équipes simultanément ORL et neurochirurgien. L'incision est celle de Cairns-Unterberger associée à celle de Moure. Il y a donc une craniotomie avec réalisation d'un volet osseux bifrontal, puis décollement de la méninge, section des filets olfactifs. L'abord transfacial est

celui décrit ci-dessus. Plus récemment (1998), l'équipe nantaise a proposé la voie transfaciale avec une incision prolongée vers l'os frontal, appelée voie d'abord transfaciale avec extension de la résection à la base de crâne ou avec résection de la base du crâne.

Les T1 et T2 ne nécessitent classiquement pas de résection la base du crâne et peuvent être traitées par voie transfaciale paralatéronasale ou déglouving (abord par les fosses nasales).¹³⁷

Le traitement des T3 dépend du degré de certitude de l'absence d'envahissement de la lame criblée. Le bilan radiologique a ici une importance capitale. En cas de constatation peropératoire d'une érosion de la lame criblée ou du toit de l'ethmoïde, une résection de la base crâne s'impose. L'envahissement de la lame criblée fait passer la tumeur en stade T4a (ROUX) ou T4 (UICC 1997). Selon le site envahi, la technique chirurgicale peut aussi varier :
- l'atteinte de l'orbite: la tendance se fait vers la préservation de l'œil. Une érosion du périoste orbitaire peut-être réséquée et réparée par n'importe laquelle des voies précédemment décrites.

L'atteinte de la cloison nasale justifie son ablation. Elle peut-être réalisée par toutes les voies. Elle est réalisée de façon systématique par certaines équipes. L'atteinte de l'infrastructure du maxillaire ou du palatin peut-être traitée par la voie de degloving ou par un prolongement de la voie paralatéronasale dans le vestibule buccal. Les contre-indications à la chirurgie sont :

- l'envahissement de certains sites : l'apex orbitaire, le cavum, la fosse ptérygo-palatine, la partie postérieure du corps du sphénoïde ou le sinus caverneux ;
- l'inopérabilité du fait du terrain (contre-indications à l'anesthésie générale)
- l'extension majeure aux lobes frontaux et l'envahissement des deux contenus orbitaires¹³⁸.

L'envahissement ganglionnaire est rare pour les adénocarcinomes de l'ethmoïde. Tout diagnostic d'adénopathie cervicale à la palpation (en particulier dans le territoire sous-digastrique) ou en tomodensitométrie (territoire rétro-pharyngé) doit faire pratiquer un curage cervical fonctionnel homolatéral suivi d'une irradiation complémentaire sur les aires correspondantes.

¹³⁷ Jegoux F. Adénocarcinomes de l'ethmoïde : expérience nantaise (80 cas). Place de la résection de la base du crâne par voie transfaciale, Thèse médecine Nantes, 2002,p.49

¹³⁸ Id. p.50

B - Radiothérapie

Les adénocarcinomes, sont des tumeurs peu radiosensibles. Le meilleur contrôle local n'est pas obtenu par une radiothérapie exclusive dont les résultats sont moins bons que la chirurgie seule. La radiothérapie est le plus souvent complémentaire et réalisée en post-opératoire à la dose de 60 à 70 Gray. Selon les auteurs, elle est soit réalisée de façon systématique quel que soit le stade tumoral, soit réservée aux tumeurs dont l'exérèse a été insuffisante ou avec envahissement de la lame criblée ou de la dure-mère.

C - Chimiothérapie

La chimiothérapie donne des résultats décevants. Certains auteurs proposent une chimiothérapie néo adjuvante ou adjuvante¹³⁹.

Une approche par chimiothérapie locale par Cysplatil après chirurgie semble augmenter le pronostic vital (87 % à 5 ans, 74 % à 10 ans).

XI – PRONOSTIC

Nous relatons ici les études de survie les plus significatives. La première est une étude générale sur le pronostic selon la localisation de la tumeur, le type histologique et son extension. Les autres, concernent plus particulièrement l'adénocarcinome de l'ethmoïde et nous verrons que le pronostic a été analysé soit en fonction du type histologique, soit de l'extension de la tumeur mais les deux facteurs ne pas pris en compte simultanément.

Dans une série rétrospective couvrant le Danemark, concernant 315 patients vus dans une période de dix ans à partir du 1er janvier 1982 au 31 décembre 1991 dans cinq centres d'oncologie, Grau *et al.* ont montré que les localisations des tumeurs sont la cavité nasale (156 cas), sinus maxillaire (139), sinus ethmoïde (14), sinus sphénoïde (5 cas) et sinus frontal (1 cas)¹⁴⁰. Les types histologiques les plus communs étaient le carcinome cellulaire de type épidermoïde (126 cas), l'adénocarcinome (41), le mélanome malin (38) et lymphome malin

¹³⁹ Licitra L, Suardi S, Bossi P, Locati LD, *et al.* Prediction of *TP53* status for primary cisplatin, fluorouracil, and leucovorin chemotherapy in ethmoid sinus intestinal-type adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2004;**22**:4901-6

¹⁴⁰ Grau C, Jakobsen MH, Harbo G, Svane-Knudsen V, *et al.* Sino-nasal Cancer in Denmark 1982-1991-a nationwide survey. *Acta Oncol* 2001;**40**:19-23

(34). Au total 284 patients (90 %) ont un traitement à visée curative ; traitement chirurgical seul (120 patients) en association avec la radiothérapie (111 patients). Les résultats ont montré que l'histologie, localisation et l'envahissement ganglionnaire étaient des facteurs pronostiques principaux pour la survie et le contrôle locorégional. Les patients présentant un carcinome épidermoïde ont un plus mauvais pronostic comparés aux patients présentant un adénocarcinome. Cependant, l'analyse multivariée a indiqué que le pronostic était essentiellement lié à la localisation primaire de la tumeur.

A - Etudes concernant l'adénocarcinome de l'ethmoïde tenant compte du type histologique

Pour Alvarez *et al.*, la survie globale à 5 ans selon le type histologique varie entre 20 et 50% selon les séries : 50 % pour les adénocarcinomes liés au bois de type ITAC, 20 à 40 % pour les non-ITAC. La survie est meilleure pour les types papillaires et coliques par rapport aux types solides ou mucineux¹⁴¹.

Barnes *et al.* constatent que chez les travailleurs du bois, la tumeur se localise préférentiellement dans la cavité nasale ou l'ethmoïde, touche surtout les hommes, et a un meilleur pronostic par rapport aux autres localisations¹⁴². Les données mises en commun de 213 cas d'ITAC indiquent que 53 % de patients ont eu des récurrences locales après thérapie, 8 % ont développé des adénopathies cervicales, 13 % des métastases et 60 % sont décédés de leur maladie dont 80 % dans un délai de 3 ans.

Pour Kleinsasser *et al.*, la survie à trois ans est de 82 % pour les PTCC-I (sous-type papillaire de Barnes), 54 % pour les PTCC II (moyennement différencié correspondant au sous type colique de Barnes), 36 % pour les PTCC III (indifférencié correspondant au type

¹⁴¹ Alvarez I, Suarez C, Rodrigo JP, Nunez F, *et al.* Prognostic factors in paranasal sinus cancer. *Am J Otolaryngol* 1995;**16**:109-14

¹⁴² Barnes L. Intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Am J Surg Pathol* 1986;**10**:192-202

solide), 0 à 48 % pour la classe «alveolar globet» correspondant au sous type mucineux et 71 % pour le sous type «transitional» (correspondant au sous-type mixte de Barnes)¹⁴³.

B - Etudes concernant l'adénocarcinome de l'ethmoïde tenant compte de l'extension de la tumeur

En cas d'invasion intracrâniale, la survie est nulle à 5 ans. La principale cause de décès est la récurrence locale (40-50 % des patients)¹⁴⁴. La présence de métastases est rare du fait d'un drainage lymphatique pauvre de la région. Dans une série de 75 cas, Llorente, note, en analyse univariée, que l'atteinte de la dure-mère, la lame criblée, l'existence d'une récurrence ou de métastase sont de mauvais pronostic¹⁴⁵. L'analyse multivariée a identifié la récurrence après chirurgie, et l'atteinte de la dure-mère comme facteur de mauvais pronostic. Au total, la survie globale à 5 ans chez les patients atteints d'adénocarcinome de l'ethmoïde varie de 80 % à 20 % selon le stade T1-T4¹⁴⁶.

XII – GENETIQUE DES ADENOCARCINOMES DE L'ETHMOÏDE DE TYPE INTESTINAL (ITAC)

Alors que les études épidémiologiques sur des adénocarcinomes de l'ethmoïde sont très nombreuses, très peu jusqu'à présent s'intéressent au profil génétique de ces tumeurs.. Seuls quelques travaux, principalement sur des gènes décrits dans d'autres cancers, ou connus pour avoir un lien avec un cancérigène, ont été réalisés. J'en présente ici la synthèse la synthèse.

A - Etudes comparant l'adénocarcinome du colon et l'adénocarcinome de l'ethmoïde

¹⁴³ Franchi A, Santucci M, Wenig B. Adenicarcinoma. In: Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D (eds) - World Health Organisation classification of tumours. Pathology and genetics of head and necks tumours. Lyon: IARC; 2005:20-3

¹⁴⁴ Choussy O, Ferron C, Védrine PO, Toussaint B, *et al.* GETTEC Study Group. Adenocarcinoma of ethmoid: a GETTEC retrospective multicenter study of 418 cases. *Laryngoscope* 2008;**118**:437-43

¹⁴⁵ Llorente JL, Nunez F, Rodrigo JP, Fernandez Leon R, *et al.* Sinonasal adenocarcinoma. Our experience. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2008;**59**:235-8

¹⁴⁶ Choussy O, Ferron C, Védrine PO, Toussaint B, *et al.* GETTEC Study Group. Adenocarcinoma of ethmoid: a GETTEC retrospective multicenter study of 418 cases. *Laryngoscope* 2008;**118**:437-43

En raison d'une ressemblance histologique avec l'adénocarcinome du colon¹⁴⁷, de nombreuses études ont recherché s'il y avait des modifications identiques dans l'adénocarcinome de l'ethmoïde de type intestinal : *K-ras* (proto-oncogène, lésion par mutation du gène *ras*), *p53* (gène régulant le cycle cellulaire et l'apoptose, lésion par délétion du chromosome 17p), *APC* (gène suppresseur de tumeur, délétion 5q21), *β caténine* (gène codant pour une protéine de contact intercellulaire, lésion par délétion), *hMLH1* et *hMSH2* (gènes codant pour des protéines impliquées dans la reconnaissance et la réparation de l'ADN, délétion des bras 3p et 2p) sont les gènes les plus étudiés jusqu'ici.

On retrouve selon les études, une mutation de K-ras dans 0 à 15 % des adénocarcinomes de l'ethmoïde de type intestinal alors qu'elle est de 50% dans les cancers coliques^{148,149}.

Dans l'adénocarcinome de l'ethmoïde de type intestinal, les mutations de *p53* varient entre 18 et 57 %^{150, 151} et 50 % de pertes de brins d'ADN ont été détectés sur le chromosome 17p13, locus du gène *p53*. En revanche, on retrouve la mutation du gène *p53* dans 75% des cancers colorectaux.

Bornholdt J *et al.* ont analysé par le polymorphisme de restriction 174 cas de cancers de la cavité sinonasale diagnostiqués au Danemark dans la période de 1991 à 2001. Il s'agissait de 58 adénocarcinomes, 109 carcinomes épidermoïdes et 7 « autres carcinomes ». L'information sur les sources d'exposition professionnelle a été obtenue à partir d'entretiens téléphoniques et à partir des données du dossier médical. Dans cette étude, l'exposition à la poussière de bois a été associée à un risque 21 fois plus grand de développer un adénocarcinome qu'un carcinome épidermoïde chez les exposés au bois comparativement aux sujets non exposés. L'étude a montré que le gène *K-ras* présentait une mutation dans

¹⁴⁷ McKinney CD, Mills SE, Franquemont DW. Sinonasal intestinal-type adenocarcinoma: immunohistochemical profile and comparison with colonic adenocarcinoma. *Mod Pathol* 1995;**8**:421-6

¹⁴⁸ Saber AT, Nielsen LR, Dictor M, Hagmar L, *et al.* K-ras mutations in sinonasal adenocarcinomas in patients occupationally exposed to wood dust or leather dust. *Cancer Lett* 1998;**126**:59-65

¹⁴⁹ Yom SS, Rashid A, Rosenthal DI, Elliott DD, *et al.* Genetic analysis of sinonasal adenocarcinoma phenotypes : distinct alterations of histogenetic significance. *Mod Pathol* 2005;**18**:315-9

¹⁵⁰ Wu TT, Barnes L, Bakker A, Swalsky PA, *et al.* K-ras 2 and P53 genotyping of intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Mod Pathol* 1996;**9**:199-204

¹⁵¹ Licitra L, Suardi S, Bossi P, Locati LD, *et al.* Prediction of *TP53* status for primary cisplatin, fluorouracil, and leucovorin chemotherapy in ethmoid sinus intestinal-type adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2004;**22**:4901-6

13 % des adénocarcinomes (sept patients) et dans 1 % de carcinomes épidermoïdes¹⁵².

Frattoni *et al.* ont réalisé une étude des marqueurs tumoraux des adénocarcinomes de la cavité nasale de type intestinal afin de vérifier si les ressemblances morphologiques de ce cancer avec le cancer du colon reflétaient des similitudes génétiques¹⁵³. 20 sujets atteints d'adénocarcinome ont été inclus dans cette étude et les gènes analysés ont été *p16 (INK4a)*, *TP53*, *hMLH1*, *hMSH2*, *bêta-catenine*, et *K-ras*. 12 tumeurs (40%) ont montré une hyper expression marquée du gène de la bêta-catenine tandis que des mutations de K-ras ont été détectées pour 9 ITACs (50%). Les auteurs estiment qu'une exposition prédominante aux bois durs dans la population étudiée (nord de l'Italie) expliquerait un taux de mutation plus fréquent de K-Ras par rapport aux autres études. La présence d'une mutation de *K-ras* est un facteur de mauvais pronostic. Ces données confirment, pour les auteurs, des similitudes phénotypiques au niveau génétique entre le cancer colorectal et l'adénocarcinome de l'ethmoïde en montrant une dysrégulation de *K-Ras/BRAF* et la perte d'hétérozygotie (LOH) du chromosome 18q. En revanche, le taux de fréquence des mutations et l'inactivation de la RPA-bêta-catenine diffèrent dans les 2 tumeurs, suggérant des mécanismes différents dans le développement précoce de la tumeur avec mutation initiale des gènes *INKA4a* et *TP53* dans les adénocarcinomes de l'ethmoïde, du gène APC dans le cancer colo-rectal¹⁵⁴.

Yom *et al.* étudient les mutations de *K-ras*, *hMLH1* et *hMSH2*, *P53*, et de la *bêta-catenine* dans une cohorte de 15 ITAC comportant deux sous-types principaux (7 de type entérique et 8 de type seromucineux)¹⁵⁵. Les patients sont composés de 13 hommes et de deux femmes âgés de 50 à 87 ans. Neuf patients étaient des fumeurs et quatre étaient des non-fumeurs; aucune information n'était disponible pour deux patients. Dans chaque sous groupe, on trouve seulement deux patients avec des mutations de *K-ras* et *P53*.

¹⁵² Bornholdt J, Hansen J, Steiniche T, Dictor M, *et al.* K-ras mutations in sinonasal cancers in relation to wood dust exposure. *BMC Cancer* 2008;**8**:53

¹⁵³ Frattoni M, Perrone F, Suardi S, Balestra D, *et al.* Phenotype-genotype correlation: challenge of intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Head Neck* 2006;**28**:909-15

¹⁵⁴ Pérez P, Dominguez O, Gonzalez S, Trivino A, *et al.* Ras gene mutations in ethmoid sinus adenocarcinoma: prognostic implications. *Cancer* 1999;**86**:255-64

¹⁵⁵ Yom SS, Rashid A, Rosenthal DI, Elliott DD, *et al.* Genetic analysis of sinonasal adenocarcinoma phenotypes: distinct alterations of histogenetic significance. *Mod Pathol* 2005;**18**:315-9

Perrone *et al* ont montré la forte prévalence de la méthylation des promoteurs *p14 (ARF)* et *p16 (INKA4 a)* et la perte d'hétérozygotie (LOH) du gène 9p21 dans l'adénocarcinome de l'éthmoïde de type intestinal¹⁵⁶.

Ces résultats suggèrent que l'adénocarcinome de l'éthmoïde et le cancer du colon aient des voies génétiques différentes tant dans l'initiation que dans la progression. Mais il faut souligner que toutes ces études ont inclus peu de patients.

B - Etudes axées sur l'analyse globale de l'ADN génomique

Götte *et al.* ont analysé 19 marqueurs par la technique du LOH (recherche de perte d'hétérozygotie). Ils ont mis en évidence des délétions sur les chromosomes 3p25, 3p14, 4p25, 5p14, 8p23, 10p25, 11p13, 17p13, et 18p21¹⁵⁷.

L'analyse par hybridation génomique comparative (CGH) a été réalisée pour la première fois par Ariza *et al*¹⁵⁸. Des gains ont été mis en évidence sur les chromosomes 3q, 5p, 7q, 8 q, 12p et 20p et des pertes sur les bras 4, 5q, 8p, 17p et 18q. A noter que des gains sur les bras 8q, 20p et des pertes sur les bras 8p et 18q ont aussi été décrits dans le cancer colo-rectal^{159,160,161}.

Korinth D. *et al* par CGH constatent aussi sur 42 patients ITAC des gains fréquents sur les chromosomes 12p (83%), 7q (74%), 8q (71%), 20q (71%), 11q (61%), 22 (59%), et 1q (52%). Des pertes sont rapportées sur les chromosomes 5q (81%), 18q (76%), 4 (74%), 8p (61%), 9p (60%), 6q et 17p (52%). Alors que les tissus bien différenciés (PTCC-1 selon la classification de Kleinsasser) montrent peu d'altérations (gains sur les chromosomes 7 et 17, pertes sur les chromosomes 4 et 13, les tumeurs de grade plus élevé (PTCC-2, PTCC-3) montrent plus de gains (chromosomes 7q, 8q, 12p) et plus de pertes sur les chromosomes 8p and 17p. Ces

¹⁵⁶ Perrone F, Oggionni M, Birindelli S, Suardi S, *et al.* TP53, p14ARF, p16INK4a and H-ras gene molecular analysis in intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Int J Cancer* 2003;**105**:196-203

¹⁵⁷ Götte K, Riedel F, Schäfer C, Coy J, *et al.* Cylindrical cell carcinomas of the paranasal sinuses do not show p53 alterations but loss of heterozygosity at 3p and 17p. *Int J Cancer* 2000;**85**:740-2

¹⁵⁸ Ariza M, Llorente JL, Alvarez-Marcas C, Baragano L, *et al.* Comparative genomic hybridization in primary sinonasal adenocarcinomas. *Cancer* 2004;**100**:335-41

¹⁵⁹ Douglas EJ, Fiegler H, Rowan A, Halford S, *et al.* Array comparative genomic hybridization analysis of colorectal cancer cell lines and primary carcinomas. *Cancer Res* 2004;**64**:4817-25

¹⁶⁰ Hermsen M, Postma C, Baak J, Weiss M, *et al.* Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* 2002;**123**:1109-19

¹⁶¹ Nakao K, Mehta KR, Fridlyand J, Moore DH, *et al.* High-resolution analysis of DNA copy number alterations in colorectal cancer by array-based comparative genomic hybridization. *Carcinogenesis* 2004;**25**:1345-57

résultats suggèrent que les aberrations chromosomiques surviennent à différents stades de la progression tumorale sans qu'on puisse encore définir leur signification exacte.¹⁶²

On peut déduire de ces études que les adénocarcinomes de l'ethmoïde ont leurs propres anomalies chromosomiques et probablement leurs propres mécanismes de développement et de progression associant des mécanismes génétiques et épigénétiques.

Rekhadevi P.V. *et al.* ont récemment montré un lien direct entre exposition aux poussières de bois et lésions génétiques en appliquant le test des comètes, le test des micronoyaux et la recherche d'aberrations chromosomiques à 64 sujets exposés aux poussières de bois (charpentiers) comparés à un groupe témoin non exposé¹⁶³. Les résultats ont montré une augmentation des lésions de l'ADN par le test des comètes et des micronoyaux au niveau des cellules buccales et sur les lymphocytes circulants. Cette augmentation est plus marquée chez les sujets tabagiques et exposés aux poussières de bois. Le tabac et l'alcool ne semblent pas augmenter les aberrations chromosomiques. Le dosage des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase) est diminué dans le groupe exposé mais notamment chez les sujets tabagiques. Il émet donc le rôle du stress oxydatif dans la cancérogenèse.

C -Etudes recherchant des marqueurs de bon pronostic

Gallo *et al.* constatent un lien entre l'expression du gène *c-erbB-2*, protéine transmembranaire de structure proche des récepteurs au facteur de croissance, et, l'agressivité de certains adénocarcinomes tels que ceux du sein, des ovaires, de la thyroïde et plus récemment du colon. Aussi, ils réalisent une étude rétrospective sur 28 patients présentant un adénocarcinome de l'ethmoïde de type intestinal, et montrent un lien entre survie sans rechute et hyper expression de *c-erbB-2*, la survie à 5 ans étant plus élevée dans le groupe où le marqueur n'est pas exprimé (OR = 2,75, IC95 % [0,85-8,94]). Dans cette étude la présence du marqueur est confirmée par immunohistochimie et le marquage est membranaire plus que

¹⁶² Korinth D, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Hattenberger S, *et al.* Chromosomal imbalances in wood dust-related adenocarcinomas of the inner nose and their associations with pathological parameters. *J Pathol* 2005;**207**:207-15

¹⁶³ Rekhadevi PV, Mahboob M, Rahman MF, Grover P. Genetic damage in wood dust-exposed workers. *Mutagenesis* 2009;**24**:59-65

cytosolique. Le mécanisme évoqué est une action activatrice oncogène similaire aux récepteur du facteur de croissance EGF¹⁶⁴.

Nazar *et al.* ne confirment pas ces résultats dans une étude d'amplification génique concernant les gènes *CCND1*, *EMS1*, *PIK3CA*, *ERBB1*, et *ERBB2*¹⁶⁵.

¹⁶⁴ Gallo O, Franchi A, Fini-Storchi I, Cilento G, *et al.* Prognostic significance of c-erbB2 oncoprotein expression in intestinal-type adenocarcinoma of the sinonasal tract. *Head Neck* 1998;**20**:224-31

¹⁶⁵ Nazar G, Gonzalez MV, Garcia JM, Llorente JL, *et al.* Amplification of CCND1, EMS1, PIK3CA and ERBB oncogenes in ethmoid sinus adenocarcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;**135**:135-9

XXIII – SYNTHÈSE DES TRAVAUX DE LA HAS ET PROPOSITIONS

Le groupe de travail mis en place par la HAS en 2006 a donné les conclusions suivantes à la SFMT le 26 janvier 2009 en fonction du niveau de preuve scientifique (Evidence Based Medicine) fourni par la littérature (tableau n° 18) :

Tableau n° 18 : Niveau de preuve scientifique fourni par la littérature Grade des recommandations

Niveau de preuve scientifique fourni par la littérature	Grade des recommandations
Niveau 1 Essais comparatifs randomisés de forte puissance Méta analyse d'essais comparatifs randomisés Analyse de décision basée sur des études bien menées	A Preuve scientifique établie
Niveau 2 Essais comparatifs randomisés de faible puissance Etudes comparatives non randomisées bien menées Etudes de cohorte	B Présomption scientifique
Niveau 3 Études cas témoin Niveau 4 Études comparatives comportant des biais importants Études rétrospectives Etudes épidémiologiques descriptives (transversale, longitudinale) Études de cas clinique	C Faible niveau de preuve scientifique

a- Pathologies cancéreuses imputables à l'exposition à des poussières de bois

L'association entre l'exposition aux poussières de bois et l'apparition d'adénocarcinome naso-sinusal est forte (niveau de preuve 2).

Pour les cancers naso-sinusiens de type épidermoïde, le lien de causalité n'est à ce jour pas clairement établi (niveau de preuve 4).

b- Identification d'un ou des types de poussières de bois (essences, granulométrie), exclusivement ou plus fréquemment en cause :

Du fait des connaissances actuelles, il n'est pas pertinent de distinguer, en termes de risque de cancers associés, ni la nature du bois (dur ou tendre) ni la répartition granulométrique des poussières (niveau de preuve 3).

c- Relation dose-effet, identification des seuils d'effet pour l'intensité moyenne de l'exposition, pour la valeur des pics d'exposition, pour la durée de l'exposition ou pour l'exposition cumulée :

Le risque d'apparition d'adénocarcinome naso-sinusien augmente avec la durée et l'intensité de l'exposition aux poussières de bois ainsi qu'avec la latence (délai écoulé depuis le début de l'exposition) (niveau de preuve 1).

d- Histoire naturelle de ces tumeurs, délai de survenue après le début de l'exposition, premières manifestations, évolution :

L'histoire naturelle de l'adénocarcinome de l'ethmoïde est encore mal connue (avis d'experts).

Par rapport aux autres cancers naso-sinusiens, l'évolution de l'adénocarcinome naso-sinusien semble longtemps locale. Elle s'accélère lors de l'extension à distance (avis d'experts).

L'âge moyen du diagnostic se situe autour de 60 ans avec une latence moyenne de 40 ans (niveau de preuve 2).

e- Les traitements de ces tumeurs, leurs capacités à modifier l'évolution de la maladie et le bénéfice attendu d'un diagnostic précoce.

Il existe un faisceau d'arguments en faveur d'un bénéfice individuel apporté par un diagnostic précoce (traitement moins invalidant, limitation des risques de récurrence pour les tumeurs de bas grade), ce qui justifie la mise en place d'un dépistage ciblé (avis d'experts).

f- Les outils du dépistage des tumeurs ORL dues à l'exposition professionnelle aux poussières de bois.

La recherche de signes fonctionnels ORL est utile lors de la consultation, leur spécificité étant accrue s'ils sont unilatéraux et d'aggravation progressive. Cependant, une politique de dépistage ne peut pas reposer sur ces signes compte tenu de leur caractère tardif et aspécifique (niveau de preuve 1).

La radiographie standard des sinus de la face n'est pas un examen de dépistage à retenir (niveau de preuve 1).

La tomodensitométrie (TDM) des sinus de la face n'est pas assez spécifique : elle entraînerait l'apparition d'un trop grand nombre de faux positifs avec leurs conséquences (niveau de preuve 3). C'est un examen irradiant et son coût est assez élevé (niveau de preuve 1).

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) apparaît être plus spécifique et sensible que la TDM (niveau de preuve 3). C'est un examen non irradiant mais son utilisation est limitée par son coût élevé et par sa disponibilité faible sur l'ensemble du territoire français à ce jour. L'IRM devrait être réservée comme test de référence pour évaluer la spécificité et la sensibilité des autres examens de dépistage.

Dans l'attente d'une évaluation de la sensibilité et de la spécificité en situation de dépistage, la nasofibroskopie rassemble plusieurs critères exigés pour un test de dépistage d'un processus tumoral (simplicité, disponibilité, faible coût) (avis d'experts).

g- Propositions du groupe de travail de la HAS :

Des études complémentaires sont nécessaires :

- pour la recherche de marqueurs plus spécifiques de l'adénocarcinome naso-sinusien ayant une forte valeur prédictive positive.

- pour améliorer les connaissances épidémiologiques de la maladie afin notamment de pouvoir mieux cibler les populations à risque et aider à l'évaluation de l'efficacité du dépistage, cela en termes de :

- fréquence, prévalence, incidence et mortalité de la maladie
- identification des déterminants de l'exposition aux poussières de bois (catégories socioprofessionnelles, métiers, durée, intensité)
- facteurs de risque de l'adénocarcinome de l'ethmoïde (durée, latence, intensité de l'exposition aux poussières de bois)
- histoire « naturelle » de la maladie (évolution selon les stades, traitements, survie).

Au terme de cette analyse, il nous a semblé important de réaliser deux types d'études venant en complément de ces recommandations : une première classique, sur les analyses de survie par une analyse de l'impact des facteurs environnementaux et une seconde comprenant l'analyse du profil d'expression génique des adénocarcinomes par la mise en place d'un Projet Hospitalier Régional de Recherche Clinique (PHRC).

L'objectif principal étant la recherche de marqueurs tumoraux spécifiques de l'adénocarcinome de l'ethmoïde de type intestinal à des fins de dépistage précoce, l'objectif secondaire de proposer des hypothèses mécanistiques dans la genèse de ce cancer.

Troisième partie : analyse des facteurs pronostiques de survie de 98 patients hospitalisés au CHU de Nantes pour adénocarcinome de l'éthmoïde de type intestinal

I – OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'ensemble des études publiées jusqu'ici, comme nous l'avons montré au chapitre précédent, a recherché et confirmé le lien entre exposition aux poussières de bois et adénocarcinome de l'éthmoïde. D'autres facteurs sont fortement suspectés, notamment l'exposition aux poussières de cuir, aux colles ou agents de préservation du bois contenant du formol, d'autres facteurs sont admis notamment l'exposition aux métaux tels que le chrome. Nous avons aussi montré que l'analyse des facteurs pronostics pour ce cancer prenait en compte jusqu'ici l'histologie ou le stade de la tumeur, mais pas les deux facteurs associés, ni les facteurs environnementaux. C'est donc l'objectif que nous nous sommes fixé.

II – PATIENTS ET METHODES

Nous avons réalisé une étude rétrospective sur 98 patients hospitalisés pour un adénocarcinome de l'éthmoïde de type intestinal dans le Service de Chirurgie ORL et Cervico-faciale du CHU de Nantes et pour lesquels le diagnostic avait été porté entre 1988 et 2004.

A - Variables colligées à partir des données du dossier d'hospitalisation

Données cliniques : date de naissance, âge au moment du diagnostic, date du diagnostic (premier prélèvement anatomopathologique), date de chirurgie, signes cliniques lors de la première consultation (obstruction nasale, rhinorrhée, épistaxis, diplopie, céphalée), la durée des symptômes avant la première consultation, le type histologique (classification de Barnes).

Examens complémentaires : tomodensitométrie crâniofaciale (TDM), imagerie par résonance nucléaire cérébrale (IRM), biologie hépatique, scintigraphie osseuse.

Extension de la tumeur suite aux examens complémentaires : orbite, méninges, endocrâne, sphénoïde, sinus maxillaire, lame criblée.

Voie d'abord chirurgicale : voie transfaciale, mixte, transfaciale avec résection de la base du crâne.

Bilan de la résection :

- macroscopiquement suffisante : oui-non
- microscopiquement suffisante : oui-non

Récidive :

- oui/non,
- si oui : récurrence locale, ganglionnaire, ou métastatique.

Un questionnaire a été réalisé afin de préciser les antécédents personnels et familiaux de cancer, le parcours professionnel des patients. Les expositions ont été quantifiées en nombre d'années pour la poussière de bois, en fréquence par an multipliée par le nombre d'année d'exposition pour les solvants, en paquets années pour le tabac, et en nombre de verres par jour pour la consommation d'alcool. La présence de système d'aspiration efficace ou le port de masque a été systématiquement demandé.

Les patients survivants ont tous pu être contactés ; les informations concernant les sujets décédés ont été colligées en contactant la famille, le médecin traitant ou le médecin

ORL (coordonnées dans dossier médical et/ou dossier patient informatisé CLINICOM^o). Pour 1 patient, l'information «décès» n'a pu être collectée (changement d'adresse de la famille, médecin traitant et spécialiste ne possédant pas l'information). Pour chaque variable cela est précisé dans la catégorie «données manquantes». Pour 15 patients dont les coordonnées ne figuraient pas dans CLINICOM, et qui étaient « perdus de vue » par le médecin traitant, la proche famille a été contactée en fonction des informations fournies par le médecin traitant.

Les données concernant les paramètres de l'intervention chirurgicale (classification TNM UICC 1997, le type d'intervention chirurgicale, la reprise chirurgicale) ont été validées par Monsieur le Docteur Ferron, chirurgien ORL dans le Service de Monsieur le Professeur Beauvillain. Les données de l'analyse histologique ont été colligées à partir des comptes-rendus anatomo-pathologiques de la pièce opératoire réalisés par les anatomo-pathologistes du CHU de Nantes.

Les patients ont bénéficié de deux types d'intervention : soit une voie transfaciale paralatéronasale, soit une voie mixte : initialement en 1988, voie d'abord double avec abord transfacial et frontal puis à partir de 1998, voie d'abord transfaciale étendue à la base du crâne.

Tous les patients ont bénéficié d'une radiothérapie complémentaire (60 à 80 Grays).

B - Analyse descriptive

Une **analyse descriptive** des variables a été réalisée dans un premier temps avec le nombre des observations, la moyenne, l'écart type, la médiane, les minimums et maximums pour chaque variable continue, et les pourcentages par catégorie pour les variables qualitatives.

Les courbes de survie globale et spécifique ont été initialement réalisées. Puis trois types d'analyses en régression univariée selon le modèle de Kaplan-Meier et en régression multivariée ont été effectués afin de déterminer les facteurs pouvant influencer la survie.

Une première analyse (étude n°1) a porté sur le groupe N=98 sans tenir compte de la cause du décès, il s'agit d'une analyse de survie globale : méthodologie habituellement adoptée selon les études décrites dans la littérature sur ce sujet^{166,167,168,169}.

Les variables analysées ont été les données cliniques, chirurgicales, histologiques, l'extension de la tumeur et l'exposition au tabac ou l'alcool.

Une deuxième étude (étude n°2), analyse en survie globale, a porté sur le groupe N=98 en tenant compte des facteurs de risque personnels (tabac, alcool), et professionnels (solvants, métaux et poussière de bois) afin de préciser leur éventuel impact. Pour chaque variable, un indice d'exposition est créé : bois = durée d'exposition, solvants = nombre de jours d'exposition déclarés (traitement de surface du bois, vernissage), métaux = nombre de jours d'exposition, tabac = consommation en paquets.années, alcool = consommation en nombre de verres par jour. A noter que la variable « protection collective ou individuelle » au poste de travail n'apparaît pas car l'ensemble des sujets interrogés déclare ne pas en avoir bénéficié de façon efficace tout au long de leur carrière.

Enfin la troisième analyse (étude n°3) porte spécifiquement sur le groupe de patients décédés de leur cancer de l'ethmoïde (survie spécifique) et prend en compte aussi tous les facteurs de risque afin d'éliminer les facteurs confondants éventuels.

Après une sélection descendante pas à pas des variables (variables dont le $p < 0,2$), une analyse multivariée selon le modèle de Cox a été réalisée. Un $p < \text{ou} = 0,05$ est considéré comme statistiquement significatif.

Toutes les analyses ont été réalisées dans un premier temps sur EPI-INFO 2000 version 1.0 et KMWIN version 6.5 puis validées sur SAS 9.1.

¹⁶⁶ Dulguerov P, Jacobsen MS, Allal AS, Lehmann W, *et al.* Nasal and paranasal sinus carcinoma: are we making progress? A series of 220 patients and a systematic review. *Cancer* 2001;**92**:3012-29

¹⁶⁷ Liétin B, Mom T, Avan P, Llompert X, *et al.* Adenocarcinomas of the ethmoid sinus: retrospective analysis of prognostic factors. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac.* 2006;**123**:211-20

¹⁶⁸ Fontana L, Liétin B, Catilina P, Devif C, *et al.* Occupational exposure to wood dust and nasal sinus cancer. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac.* 2008;**125**:65-71

¹⁶⁹ Choussy O, Ferron C, Védrine PO, Toussaint B, *et al.* GETTEC Study Group. Adenocarcinoma of ethmoid: a GETTEC retrospective multicenter study of 418 cases. *Laryngoscope* 2008;**118**:437-43

III – RESULTATS

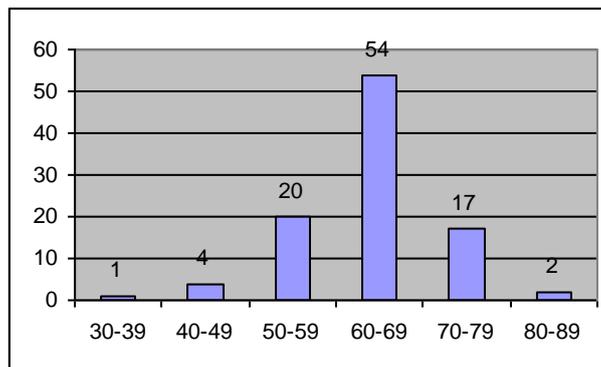
A - Données descriptives

L'ensemble des données brutes est reporté en annexes 1-7, pages 231 à 243.

Population

L'âge moyen au moment du diagnostic est de 63,5 ans. La population est composée de 96 hommes et deux femmes. La distribution du nombre de cas diagnostiqués en fonction de l'âge se rapproche d'une loi normale (figure n° 25). La moyenne étant à 63,51 et la médiane à 63,09 ans (IC 95 % [54,65-72,35]).

Figure n°25 : Histogramme représentant le nombre d'adénocarcinome en fonction des classes d'âge.



Professions

Les professions sont représentées essentiellement par des menuisiers (54), menuisiers-ébénistes (24), et charpentiers (6). A noter 3 professionnels de la fabrication de chaussures, 1 agriculteur, 1 boulanger, 1 boucher, 1 dessinateur et 1 professionnel de l'encartonnage chez qui aucune exposition professionnelle n'a été retrouvée. A noter aussi dans notre population, une femme âgée de 31 ans, agent de bureau. Pour 4 patients nous n'avons pu obtenir l'information. **85,7 % de notre population a été exposé de façon continue aux poussières de bois.**

Ancienneté de l'exposition professionnelle aux poussières de bois

Elle est de 30 ans en moyenne (écart type de 14 ans). La répartition par métiers est donnée dans le tableau n° 19.

Tableau n° 19 : Ancienneté de l'exposition professionnelle selon la profession

Exposition aux poussières de bois	N = 84	Ancienneté	Ecart-type
Charpentier	6	36,1	15,6
Menuisier ébéniste	24	30,9	14,0
Menuisier	54	35,0	12,2

Autres expositions professionnelles

Exposition aux solvants (N = 43 sujets) : 44,7 % de la population a été exposé aux solvants (produits de traitement du bois : pentachlorophénol, xylène, vernis, peintures essentiellement). Pour chaque sujet, nous avons estimé le nombre de jours d'exposition (application des produits par pulvérisation). Pour les personnes décédées, les données ont été collectées par interrogatoire de l'entourage proche, famille (épouse en particulier connaissant l'activité d'artisan), et médecin traitant. Les données ont été croisées avec celles des dossiers de la Consultation de Pathologie Professionnelle du CHU de Nantes. On totalise un nombre moyen de jour d'exposition aux solvants : 1768 jours/sujets pour 43 sujets ayant déclaré une exposition (écart type = 3124 jours ; max. = 15 330 jours).

Exposition aux métaux (N = 10 sujets) : la moyenne d'exposition par sujet est d'un an (écart type = 5 ans, max = 36 ans) : ils avaient tous travaillé dans les métiers du bois sauf pour l'un d'entre eux qui avait travaillé 13 ans dans la fabrication de chaussures. L'exposition aux poussières de métaux (fer, nickel, chrome, cobalt...) se faisait lors d'opérations de découpe et de soudure (menuiserie aluminium).

Facteurs de risque personnels

Tabac : 40 sujets sur 95 réponses recueillies (42%) ont été exposés à la fumée de tabac. La consommation moyenne est de 6,76 paquets années (écart type : 11,56 ; max : 55 paquets années).

Alcool : Neuf patients seulement répondent consommer plus de deux verres d'alcool par jour. (données manquantes : 2).

Antécédents familiaux de cancer

- 89 patients parmi 97 (2 données manquantes) n'ont aucun antécédent familial de cancer.
- 6 patients ont un antécédent familial de cancer : cancer colique (1), maladie de Hodgkin (1), cancer pulmonaire (1), cancer prostatique(1) ; cancer osseux (1), un cancer non étiqueté (1).
- 2 patients ont deux antécédents familiaux de cancer : l'un d'entre eux présente deux antécédents familiaux de cancer gastrique (frère, oncle), l'autre présente un antécédent familial de cancer colique (frère) et un familial de cancer gastrique (père).

Antécédents personnels de cancer

20 patients parmi 95 (3 données manquantes) ont présenté ou présentent un deuxième cancer. A noter qu'un patient a développé deux autres cancers épithéliaux en plus de l'adénocarcinome de l'ethmoïde : un cancer colique et un cancer bronchique alors qu'il n'était pas tabagique. Les autres antécédents personnels retrouvés sont : cancer de la prostate (6 cas), cancer pulmonaire (3 cas), cancer colique (3cas), adénomes coliques réséqués (3 cas), glioblastome (1 cas), cancer cutané (1 cas), séminome (1 cas), un cancer vésical chez un sujet tabagique à 40 paquets années et un cancer non étiqueté.

Données sémiologiques

La durée d'évolution des symptômes avant diagnostic est la suivante : 3 à 6 mois : 27 cas (27,55 %), inférieure à 3 mois 13 cas (13 %) supérieure à 6 mois 56 cas (57%). Le coté de l'atteinte au moment du diagnostic est le suivant : bilatérale 8 cas (8,16 %), coté droit 48 cas, et coté gauche : 42 cas (42,86 %). Par ailleurs, 80 sujets présentent une obstruction nasale, 50 sujets présentent une épistaxis, 23 sujets présentent une rhinorrhée, 15 sujets présentent des céphalées au moment du diagnostic, 14 sujets présentent une exophtalmie et 11 sujets présentent une diplopie.

Résultats du bilan d'extension (tableau n° 20)

Les examens complémentaires montrent :

- une extension certaine à la lame criblée dans 35 cas (35,71 %), incertaine dans 9 cas, pas d'extension (35 cas),
- une extension méningée (20 cas),
- une extension à l'orbite (20 cas),

- une extension endocrânienne (17 cas),
- une extension au sinus maxillaire (41 cas),
- une extension au sphénoïde (23 cas).

Tableau n° 20: Nombre de sujets selon le stade évolutif de la tumeur lors du premier diagnostic

(Classification TNM selon UICC 1997)

T 1	1 (1,02 %)
T 2	36 (36,73 %)
T 3	28 (28,57 %)
T 4	33 (33,67 %)

Type de chirurgie

91 patients ont bénéficié d'un traitement curatif (chirurgie et radiothérapie), 7 d'un traitement palliatif en raison du caractère trop expansif de la tumeur. La voie d'abord a été transfaciale pour 41 cas, mixte pour 18 cas, transfaciale avec résection de la base du crâne pour 30 cas. Le contrôle chirurgical locorégional a été jugé satisfaisant dans 31 cas, insuffisant dans 61 cas. Le contrôle microscopique a été jugé suffisant (53 cas), limite (22 cas), insuffisant (9 cas), incomplet (4 cas) (3 données manquantes). Il y a eu 42 récurrences et les patients ont été réopérés dans 29 cas.

Histologie des tumeurs

Les types histologiques retrouvés selon la classification de Barnes sont : - mucineux 33 (33,67 %), - coliques 23 (23,47 %), - papillaires 21 (21,43 %), mixtes 14 (14,29 %), solides ou indifférenciés 5 (5,10 %), données manquantes 2 (2,04 %).

B - Analyse de la survie

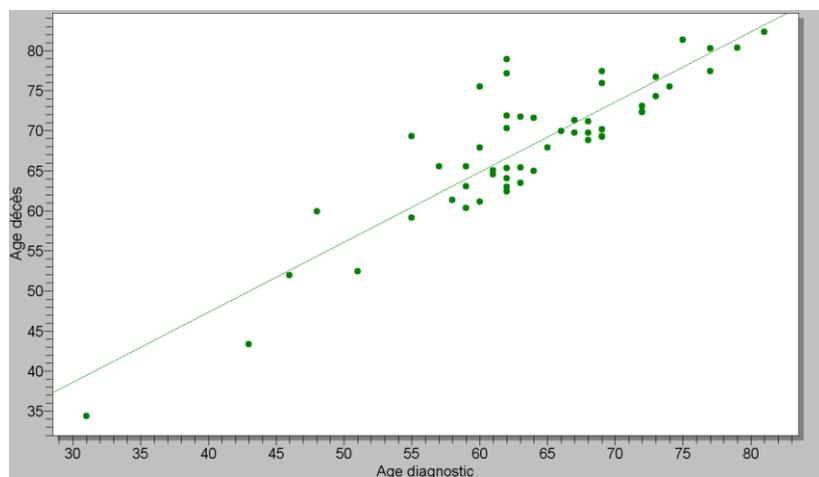
Evènement décès

L'âge moyen du décès est de 68 ans (écart type : 10 ans, (min, max) = [34-98]ans). 58 patients sont décédés à la date du 30 mai 2008. 47 patients sont décédés de cancer de l'ethmoïde. Les autres causes de décès sont : - cancer pulmonaire 3 cas (5,37 %), - cancer du

colon 1 cas, accident vasculaire cérébral 1 cas, cause cardiaque 1 cas, accident de la voie publique 1 cas, maladie de Alzheimer 1 cas (2 données manquantes).

Nous avons montré qu'il existe une corrélation très étroite entre âge du diagnostic et âge du décès ($\rho = 0,8$; $p < 0,005$). Il conviendrait de proposer un diagnostic précoce à partir de 40 ans selon nos résultats, ceci pourrait venir compléter les recommandations de la HAS (figure n° 26).

Figure n° 26 : analyse de l'âge du décès en fonction de l'âge du diagnostic d'adénocarcinome de l'ethmoïde.



1 - Analyse de la survie par la méthode de Kaplan-Meier

Définitions :

Evènement : la date du décès

Durée de survie :

- délai entre la date de diagnostic et la date de dernières nouvelles (fixée au 31/05/08)
- Délai entre la date de diagnostic et la date de décès pour les patients décédés.

Survie globale : elle est fixée au 31 mai 2008 ; la date événement = date de décès

Survie spécifique : elle ne tient compte que des décès liés à l'adénocarcinome de l'ethmoïde.

1a- Analyse de la survie globale

Le taux de survie globale est à 3 ans de 73.20 % (IC 95% [63,2 - 80,9]) à 5 ans de 61,7% (IC 95% [51,22 % ; 70,56 %]) (figure n° 27).

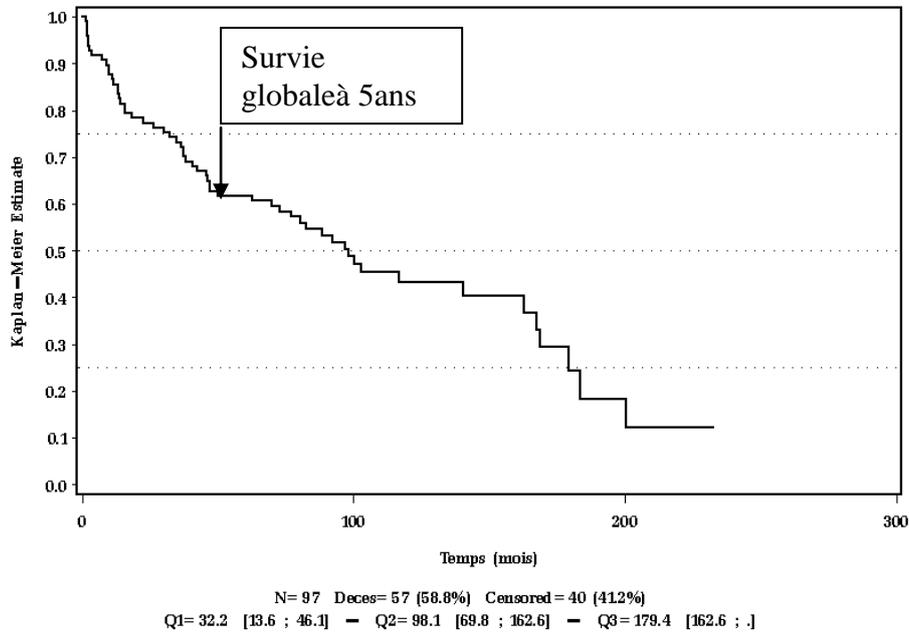


Figure n° 27 : courbe de la survie globale selon le modèle de Kaplan-Meier

- Analyse de la survie globale selon la classification TNM

Nous n'avons pas trouvé de différence significative de survie entre les classes T1 et T2 selon la classification TNM UICC 1997 ; ces classes ont donc été regroupées (figure n°28).

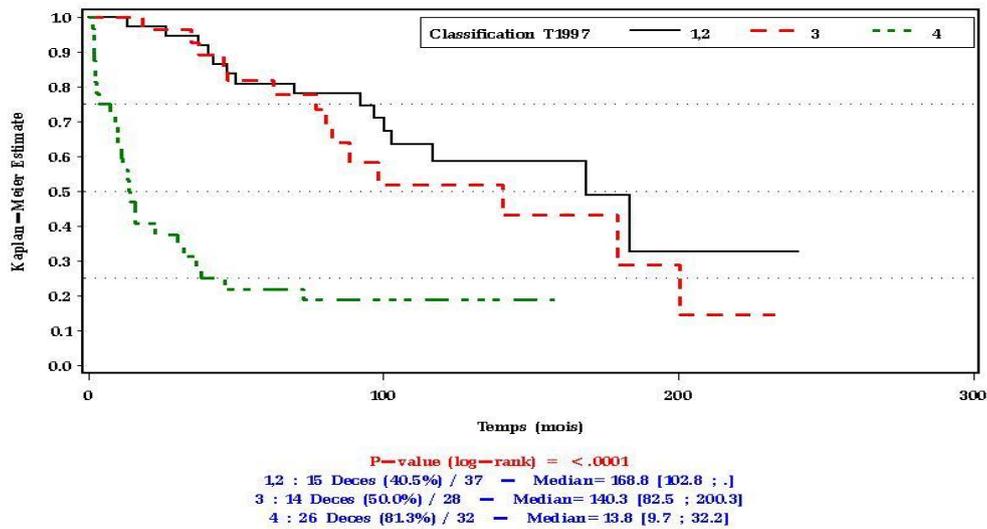


Figure n° 28 : Survie globale selon le stade TNM

Après regroupement, des classes T3-T4 et T1-T2, on trouve une différence significative dans la survie ($p < 0,01$ %) (tableau n° 21 et figure n° 29).

Tableau n° 21 : Le taux de survie globale selon la classification TNM

Survie à	Stades TNM 1-2	Stades TNM 3-4
3 ans	94,59 % [80,07 % ; 98,62 %]	60,00 % [46,51 % ; 71,11 %]
5 ans	80,91 % [64,06 % ; 90,41 %]	49,84 % [36,66 % ; 61,69 %]

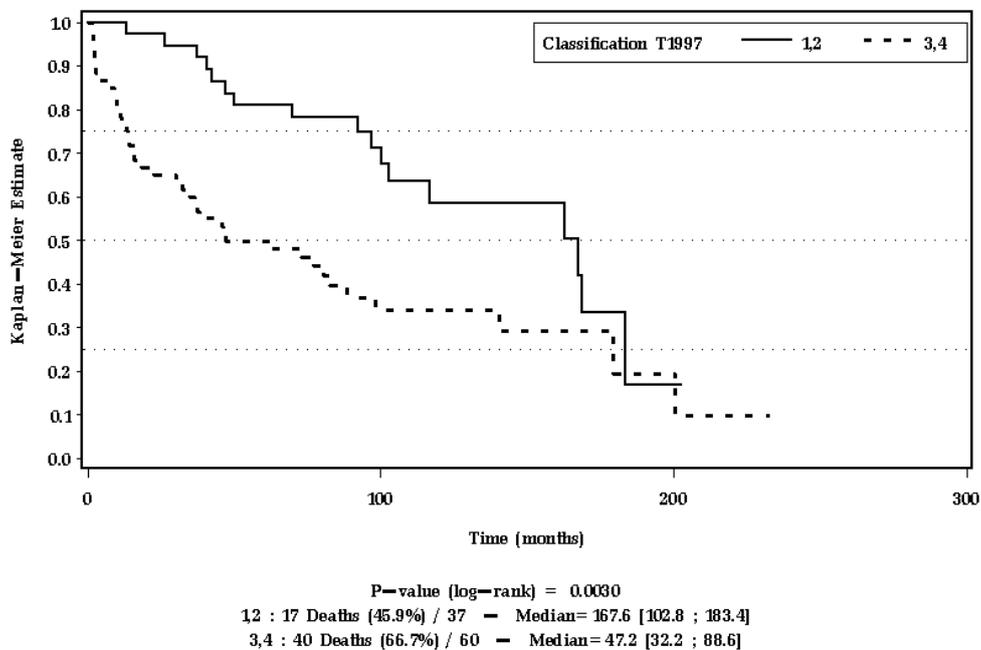


Figure n° 29 : Survie globale après regroupement des classes T3-T4 et T1-T2

- Analyse de la survie globale selon le type histologique

Les cancers du type papillaire semblent avoir la meilleure survie à 3 ans (85,71%), et à 5 ans (76,19%). Les cancers de type colique ont une survie de 78,26% à 3 ans, 47,83% à 5 ans. Les cancers solides sont ceux de plus mauvais pronostic (40% à 3 et 5 ans). (tableau n° 22, figure n° 30).

Tableau n°22 : Taux de survie selon le type histologique dans le cadre d'une analyse de survie globale

Taux de survie	ITAC type colique	ITAC type mixte	ITAC type mucineux	ITAC type papillaire	ITAC type solide
3 ans	78,26 % [55,42 % ; 90,32 %]	78,57 % [47,25 % ; 92,54 %]	62,50 % [43,52 % ; 76,68 %]	85,71 % [61,97 % ; 95,16 %]	40,00 % [5,20 % ; 75,28 %]
5 ans	47,83 % [26,83 % ; 66,13 %]	71,43 % [40,63 % ; 88,19 %]	59,21 % [40,30 % ; 73,92 %]	76,19 % [51,94 % ; 89,33 %]	40,00 % [5,20 % ; 75,28 %]

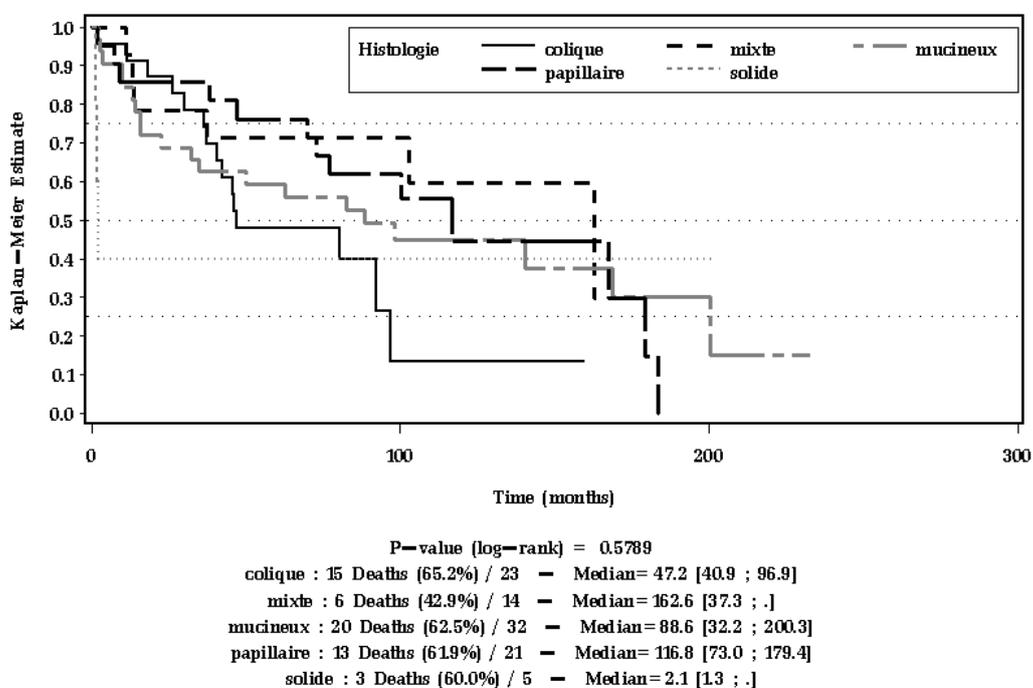


Figure n° 30 : Survie globale des patients suivant le type histologique de la tumeur

1b - Analyse de la survie spécifique

Lorsque l'on ne prend en compte que les patients décédés de cancer de l'ethmoïde (DC KE), le score de survie est amélioré à 3 ans (74,23 %), et à 5 ans (64,79 %) par rapport à l'analyse en survie globale; cependant cette augmentation n'est pas statistiquement significative.

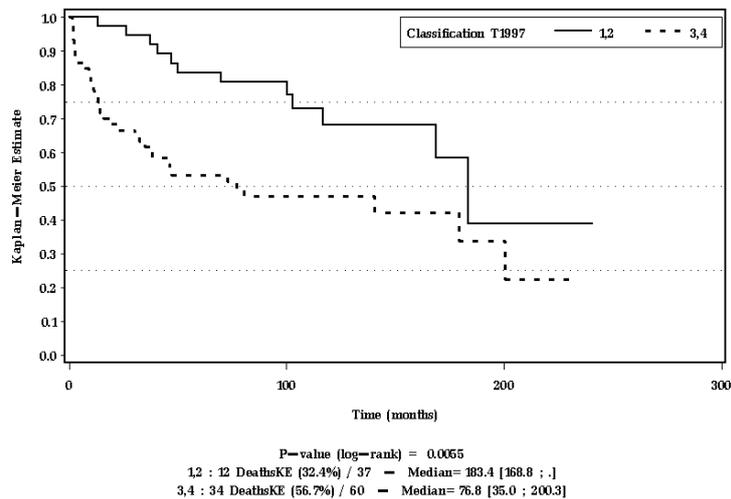
- Analyse de la survie spécifique selon la classification TNM

L'analyse du taux de survie spécifique selon le stade tumoral montre des taux de survie plus élevés à 5 ans lorsque l'on compare à la survie globale (tableau n° 23, figure n° 31), la aussi sans caractère significatif statistique.

Tableau n° 23 : survie spécifique de notre population selon le stade TNM

Survie à	Stades TNM 1-2	Stades TNM 3-4
3 ans	94,59 % [80,07 % ; 98,62 %]	61,67 % [48,17 % ; 72,62 %]
5 ans	83,61 % [67,10 % ; 92,29 %]	53,19 % [39,83 % ; 64,85 %]

Figure n° 31 : courbe de Kaplan-Meier selon le stade de la tumeur au moment du diagnostic chez les patients atteints d'adénocarcinome de l'ethmoïde



- Analyse de la survie spécifique selon le type histologique

En revanche, les taux de survie selon le type histologiques ne varient pas sauf pour le cancer de type colique où le taux de survie est amélioré à 5 ans (tableau n° 24, figure n° 33).

Tableau n° 24 : taux de survie spécifique selon le type histologique de la tumeur

Taux de survie à :	colique	mixte	mucineux	papillaire	solide
3 ans	78,26 % [55,42 % ; 90,32 %]	78,57 % [47,25 % ; 92,54 %]	65,63 % [46,58 % ; 79,27 %]	85,71 % [61,97 % ; 95,16 %]	40,00 % [5,20 % ; 75,28 %]
5 ans	56,52 % [34,32 % ; 73,76 %]	71,43 % [40,63 % ; 88,19 %]	62,34 % [43,30 % ; 76,59 %]	76,19 % [51,94 % ; 89,33 %]	40,00 % [5,20 % ; 75,28 %]

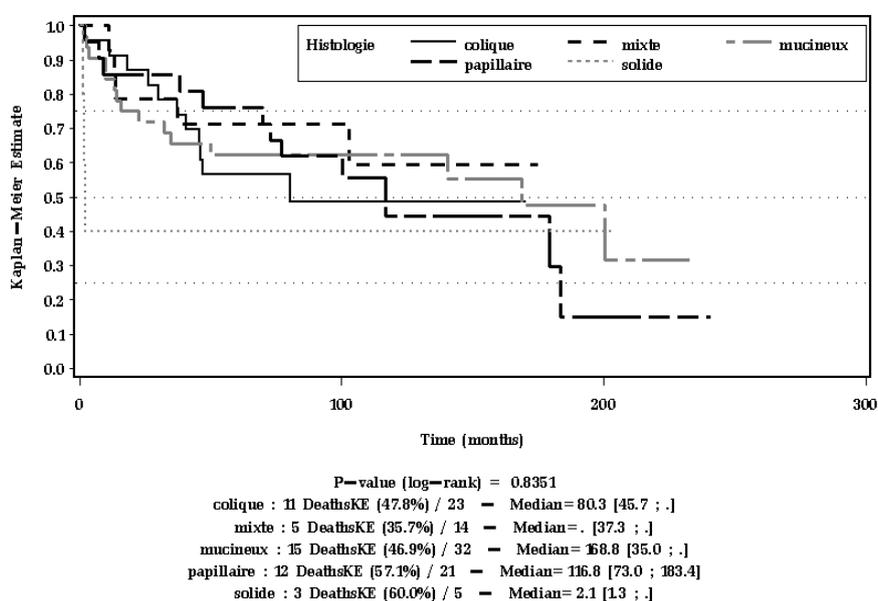


Figure n° 33 : Survie spécifique selon le type histologique

2 - Analyses univariées appliquées aux études n° 1, n° 2, n° 3

Les résultats détaillés de l'analyse univariée sont rapportés dans les tableaux n° 25, 26, et 27. Les variables significatives ($<0,001$) et les variables d'intérêt (cliniques et épidémiologiques) avec un $p < 0.2$ ont été retenues pour l'analyse multivariée afin de déterminer à chaque fois les variables indépendantes et éliminer les facteurs confondants.

Tableau n° 25 : Analyse univariée sur la survie globale :

variables	Coefficient	Ecart-type	RR	IC (RR)	p-value
Age au moment du diagnostic	0.01	0.02	1.01	[0.98;1.05]	0.5598
Alcool	0.24	0.48	1.27	[0.49; 3.27]	0.6241
Métastases présentes	2.06	0.56	7.88	[2.63; 23.6]	0.0002
Années d'exposition au bois	0.00	0.01	1.00	[0.98; 1.02]	0.8986
Cause_locale de récurrence	0.28	0.40	1.33	[0.61; 2.89]	0.4720
Extension cérébrale de la tumeur	2.56	0.50	12.94	[4.85; 34.5]	<.0001
Contrôle local chirurgical	-1.84	0.29	0.16	[0.09; 0.28]	<.0001
Douleur lors diagnostic	0.69	0.33	1.99	[1.05; 3.79]	0.0361
Diplopie	1.43	0.38	4.17	[1.99; 8.75]	0.0002
Extension endocrânienne	1.40	0.33	4.06	[2.13; 7.73]	<.0001
Epistaxis	-0.15	0.27	0.86	[0.51; 1.47]	0.5852
Exophtalmie 2	1.50	0.34	4.47	[2.30; 8.72]	<.0001
Extension à l'orbite	0.86	0.32	2.35	[1.26; 4.38]	0.0069
Extension à la lame criblée	0.71	0.32	2.03	[1.07; 3.82]	0.0294
Chirurgie méningée	1.26	0.32	3.52	[1.90; 6.54]	<.0001
Extension aux méninges	0.78	0.32	2.18	[1.18; 4.05]	0.0133
Obstruction nasale	-0.32	0.32	0.72	[0.39; 1.36]	0.3126
Atteinte de l'orbite I	1.20	0.73	3.33	[0.79; 14.0]	0.1005
Chirurgie de la récurrence	1.04	0.35	2.82	[1.41; 5.64]	0.0034
Rhinorrhée	0.27	0.32	1.31	[0.70; 2.45]	0.4048
Radiothérapie	-0.69	0.54	0.50	[0.17; 1.45]	0.2021
Extension sinus maxillaire	0.25	0.27	1.28	[0.75; 2.18]	0.3637
Exposition aux solvants	0.21	0.31	1.23	[0.67; 2.26]	0.5058
Atteinte du sphénoïde	1.95	0.31	7.02	[3.81; 13.0]	<.0001
Tabac en paquets années	0.04	0.01	1.04	[1.02; 1.06]	0.0004
Traitement de la récurrence	-1.04	0.38	0.35	[0.17; 0.75]	0.0064
Atteinte bilatérale	1.32	0.33	3.74	[1.96; 7.13]	<.0001
Histologie = mixte (réf.=colique)	-0.88	0.52	0.42	[0.15 ; 1.15]	0.4525
= mucineux (réf. = colique)	-0.32	0.35	0.73	[0.37 ; 1.45]	
= papillaire (réf.=colique)	-0.55	0.40	0.58	[0.27 ; 1.26]	
= solide (réf.=colique)	-0.20	0.66	0.82	[0.23 ; 2.97]	
Résection macro = limite	0.81	0.38	2.26	[1.07 ; 4.75]	0.0002
= insuffisante (réf = large, suffisante)	2.18	0.57	8.84	[2.91 ; 26.83]	
Délai d'évolution = 3 à 6 mois	-0.33	0.44	0.72	[0.31; 1.69]	0.2672
= > 6 mois (réf= < à 3 mois)	-0.62	0.40	0.54	[0.25; 1.19]	
TNM stade 3 (réf.=1,2)	0.31	0.37	1.36	[0.65 ; 2.82]	<.0001
stade 4 (réf.=1,2)	1.83	0.34	6.26	[3.20 ; 12.21]	
Voie abord = transfaciale	-1.10	0.35	0.33	[0.17 ; 0.67]	0.0060
= transfaciale étendue à la base (réf.= mixte)	-0.90	0.41	0.41	[0.18 ; 0.91]	
Exérèse Microscopique = limite	0.83	0.38	2.30	[1.10 ; 4.81]	<.0001
= incomplète (réf.=suffisante)	1.89	0.39	6.59	[3.04 ; 14.27]	

RR : risque relatif

IC : intervalle de confiance à 95% réf. : référence pour le calcul de RR

..... Variables sélectionnées pour l'analyse multivariée

Tableau n° 26 : Analyse univariée des variables sans tenir compte de la cause du décès :

Variable étudiée	Coefficient	Ecart-type	RR	IC (RR)	p-value
ATCD familial (réf.=Pas ATCD Familial)	-0,15	0,53	0,86	[0,31 ; 2,42]	0,7817
ATCD personnel (réf.=Pas ATCD Personnel)	-0,26	0,33	0,77	[0,41 ; 1,47]	0,4291
Age au diagnostique (en années)	0,01	0,02	1,01	[0,98 ; 1,05]	0,4063
Alcool 2v/j (réf.=Non)	0,33	0,47	1,39	[0,55 ; 3,53]	0,4846
Délai d'évolution sup. à 6mois (réf.=Inf à 6 mois)	-0,47	0,27	0,63	[0,37 ; 1,07]	0,0870
Exposition au bois (réf.=Non)	0,44	0,52	1,55	[0,56 ; 4,31]	0,4025
Exposition aux métaux Oui (réf.=Non)	-0,78	0,60	0,46	[0,14 ; 1,47]	0,1894
Reconnaissance MP (réf.=Non)	-0,40	0,28	0,67	[0,39 ; 1,15]	0,1431
TNM UICC 1997(1,2) (réf.= T1997(3,4))	0,84	0,29	2,32	[1,31 ; 4,12]	0,0039
Durée métier (en années)	0,00	0,01	1,00	[0,98 ; 1,02]	0,9264
Consultation pour céphalée (réf.=Non)	0,63	0,33	1,88	[0,99 ; 3,57]	0,0554
Consultation pour diplopie (réf.=Non)	1,43	0,38	4,17	[1,99 ; 8,75]	0,0002
Consultation pour épistaxis (réf.=Non)	-0,06	0,27	0,94	[0,56 ; 1,58]	0,8115
Exophtalmie (réf.=Non)	1,50	0,34	4,47	[2,30 ; 8,72]	<.0001
Indice solvant	0,00	0,00	1,00	[1,00 ; 1,00]	0,3467
Lame criblée atteinte au bilan d'extension	0,63	0,31	1,89	[1,02 ; 3,49]	0,0432
Métaux (en indice)	-0,12	0,09	0,88	[0,74 ; 1,05]	0,1699
Obstruction nasale (réf.=Non)	-0,20	0,32	0,82	[0,43 ; 1,54]	0,5364
Rhinorrhée (réf.=Non)	0,24	0,32	1,27	[0,68 ; 2,37]	0,4551
Solvants (réf.=Non)	0,12	0,28	1,12	[0,65 ; 1,93]	0,6745
Tabac (réf.=Non)	0,63	0,27	1,87	[1,10 ; 3,20]	0,0219
Tabagisme en paquets années	0,03	0,01	1,03	[1,01 ; 1,05]	0,0012
Atteinte tumorale bilatérale	1,32	0,33	3,74	[1,96 ; 7,13]	<.0001
Voie Abord tranf (réf.=mixte)	-0,56	0,30	0,57	[0,31 ; 1,03]	0,0131
Voie Abord transresec (réf.=mixte)	-0,14	0,36	0,87	[0,43 ; 1,75]	

RR : risque relatif

IC : intervalle de confiance à 95%

Réf. : référence pour le calcul de RR

Variables sélectionnées pour l'analyse multivariée

Tableau n° 27 : Analyse univariée sur le groupe décédé du cancer de l'ethmoïde

Variable étudiée	Coefficient	Ecart-type	RR	IC (RR)	p-value
ATCD familial (réf.=Pas ATCD Familial)	-0,17	0,60	0,84	[0,26 ;2,73]	0,7731
ATCD personnel (réf.=Pas ATCD)	-0,47	0,39	0,62	[0,29 ;1,34]	0,2273
Age au diagnostique (en années)	-0,01	0,02	0,99	[0,96 ;1,03]	0,7281
Alcool 2v/j (réf.=Non)	-0,12	0,60	0,89	[0,27 ;2,88]	0,8427
Délai sup à 6mois (réf.=Inf à 6 mois)	-0,07	0,31	0,93	[0,51 ;1,69]	0,8161
Exposition au bois (réf.=Non)	0,48	0,60	1,61	[0,50 ;5,22]	0,4236
Exposition aux métaux (réf.=Non)	-0,95	0,72	0,38	[0,09 ;1,59]	0,1872
Reconnaissance MP Oui (réf.=Non)	-0,29	0,31	0,75	[0,41 ;1,36]	0,3412
TNM UICC1997(1,2) (réf.= (3,4))	0,91	0,34	2,47	[1,28 ;4,79]	0,0072
Durée métier 1 (en années)	-0,00	0,01	1,00	[0,98 ;1,01]	0,6554
Cs Douleur (réf.=Non)	0,41	0,38	1,50	[0,72 ;3,14]	0,2795
Diplopie (réf.=Non)	1,24	0,40	3,46	[1,59 ;7,53]	0,0018
Epistaxis (réf.=Non)	-0,17	0,30	0,85	[0,47 ;1,52]	0,5746
Exophtalmie (réf.=Non)	1,39	0,35	4,02	[2,01 ;8,06]	<.0001
Indice solvant	0,00	0,00	1,00	[1,00 ;1,00]	0,8708
Lame criblée (réf.=Non)	0,89	0,38	2,43	[1,15 ;5,13]	0,0196
Métaux (en indice)	-0,10	0,09	0,91	[0,76 ;1,08]	0,2651
Obstruction (réf.=Non)	-0,25	0,35	0,78	[0,39 ;1,55]	0,4800
Rhinorrhée (réf.=Non)	0,03	0,36	1,03	[0,51 ;2,08]	0,9303
Solvants (réf.=Non)	-0,12	0,31	0,88	[0,49 ;1,61]	0,6864
Tabac (réf.=Non)	0,50	0,30	1,65	[0,91 ;2,99]	0,0959
Tabac paquets années	0,02	0,01	1,02	[0,99 ;1,04]	0,1418
Bi (réf.=uni)	1,31	0,35	3,71	[1,88 ;7,31]	0,0002
Voie Abord tranf (réf.=mixte)	-0,68	0,35	0,51	[0,25 ;1,01]	0,0030
Voie Abord transresec (réf.=mixte)	-0,31	0,41	0,73	[0,33 ;1,63]	

RR : risque relatif

IC : intervalle de confiance à 95%

Réf : référence pour le calcul de RR

..... Variables sélectionnées pour l'analyse multivariée

3 - Analyses multivariées

Méthode suivie :

- Sélection des variables significatives à 0,20 en univariée.
- Exclusion des variables où le nombre de patients est très faible
- Sélection des variables d'un point de vue « clinique » par rapport à l'objectif :
- Sélection de variables pas à pas automatique : méthode backward (élimine les variables les moins significatives).

Etude n°1

Les résultats de la survie globale des patients ne tenant pas compte de la cause de décès et des cofacteurs environnementaux sont donnés dans le tableau n° 28.

Tableau n° 28 : Résultats de l'analyse multivariée des facteurs pronostics de survie globale

Variables indépendantes	Coefficient	Ecart-type	RR	IC (RR)	p-value
Diplopie	1,11	0,46	3,05	[1,23 ; 7,55]	0,0159
Extension orbite	-1,17	0,46	0,31	[0,13 ; 0,77]	0,0113
Atteinte bilatérale	0,88	0,35	2,40	[1,20 ; 4,81]	0,0134
TNM UICC 1997 = stade 3	0,31	0,38	1,37	[0,65 ; 2,86]	<.0001
stade 4	2,29	0,43	9,88	[4,26 ; 22,92]	

Interprétation : -les quatre facteurs qui ressortent comme facteurs indépendants influençant la survie sont des facteurs cliniques, au moment du diagnostic : -présence d'une diplopie, extension à l'orbite, atteinte bilatérale et stade de la tumeur selon la classification TNM.

Etude n°2

Les résultats de l'analyse de survie globale sans tenir compte de la cause des décès mais incluant l'ensemble des facteurs environnementaux sont donnés dans le tableau n° 29.

Tableau n° 29 : Résultats de l'analyse multivariée sans tenir compte de la cause des décès mais incluant l'ensemble des facteurs environnementaux

Variabiles indépendantes	Coefficient	Ecart-type	RR	IC (RR)	p-value
Exposition aux métaux (réf.=non exposé)	-1,34	0,62	0,26	[0,08 ;0,88]	0,0307
TNM stades (3,4) (réf. = stades (1,2))	0,96	0,31	2,62	[1,43 ;4,80]	0,0019
Tabac (réf.=non exposé)	0,83	0,28	2,30	[1,33 ;4,00]	0,0031
Atteinte bilatérale (réf.=uni)	1,41	0,35	4,11	[2,06 ;8,21]	<.0001

Interprétation :

- les patients exposés aux métaux ont moins de risque de décéder,
- les patients classés stade = 3 ou 4 ont plus de risque de décéder que les patients avec T1997 = 1 ou 2 avec un Risque Relatif de 2,62 (IC 95% [1,43 ;4,80]),
- les patients fumeurs ont plus de risque relatif de 2,3 par rapport aux non-fumeurs,
- les patients avec atteinte bilatérale initiale ont beaucoup plus de risque de décéder que patients avec une atteinte unilatérale (RR= 4,11).

Etude n°3

Les résultats de l'analyse multivariée de la survie spécifique (décès par cancer de l'ethmoïde) et tenant compte de l'ensemble des facteurs de risque environnementaux sont donnés dans le tableau n° 30.

Tableau n°30 : Résultats de l'analyse multivariée de la survie spécifique

Variabiles indépendantes	Coefficient	Ecart-type	RR	IC (RR)	p-value
Atteinte bilatérale (réf.=unilatérale)	1,05	0,42	2,85	[1,26 ;6,46]	0,0122
Voie d'abord transfaciale (réf.=mixte)	-1,08	0,40	0,34	[0,16 ;0,74]	0,0137
Voie d'abord transfaciale avec résection de la base du crâne (réf.=mixte)	-1,00	0,46	0,37	[0,15 ;0,91]	

Interprétation :

- l'atteinte bilatérale est le facteur majeur de mauvais pronostic
- les patients opérés par une voie d'abord transfaciale ou un abord transfacial avec résection de la base du crâne ont moins de risque de décéder que les patients opérés par une voie d'abord mixte avec des risques relatifs respectivement de $RR = 0,34$ et $RR = 0,3$.

III – DISCUSSION

Age au moment du diagnostic

L'âge moyen au moment du diagnostic (63,5 ans) et la répartition homme-femmes sont concordants avec les données de la littérature; cependant nous avons pu mettre en évidence une distribution gaussienne de l'âge au moment du diagnostic, ainsi qu'une corrélation étroite avec l'âge du décès ($\rho = 0,8$, $p < 0,005$). Nos résultats nous conduisent à proposer un test de dépistage spécifique à partir de 40 ans, ceci pouvant venir compléter les recommandations de la HAS.

Les professions

La répartition des professions dans notre étude est aussi celle retrouvée dans l'ensemble des études réalisées jusqu'ici, à savoir essentiellement des menuisiers (54), menuisier-ébénistes (24), et charpentiers (6). Notre étude confirme le lien étroit entre adénocarcinome de l'ethmoïde et exposition aux poussières de bois (85,7% de notre population a été exposée). La présence de 3 professionnels de la fabrication de chaussures doit nous inciter à faire une déclaration de maladie professionnelle, même en l'absence de tableau de maladie professionnelle, celle-ci pourrait être reconnue par le Comité Régional de Reconnaissance des Maladies Professionnelles. Un boulanger non exposé aux poussières de bois (après interrogatoire de la famille) a présenté un adénocarcinome de l'ethmoïde dans notre série; on peut s'interroger sur le rôle propre des poussières de farine inhalées. On trouve dans la littérature une seule étude mettant en évidence un nombre de cas élevé de cancer sinusal chez des salariés exposés dans l'industrie alimentaire (fabrication de cacao, chocolat, sucre, fruits et végétaux en conserverie) Il s'agit d'une étude rétrospective danoise basée sur

le registre national des cancers recensant tous les cas de 1970 à 1984. Dans cette étude 382 cas de cancers sinonasaux sont répertoriés parmi 164 605 cancers diagnostiqués : un excès de cancers sinonasaux a été retrouvé dans l'industrie du bois, du cuir et des métaux mais aussi dans les professions exposant à la poussière de cacao, chocolat et sucre). Aussi, les auteurs s'interrogent sur le rôle possible des poussières d'origine végétale dans la genèse de l'adénocarcinome de l'ethmoïde. Ils concluent à la nécessité d'études complémentaires pour expliquer la genèse du cancer sinonasal¹⁷⁰.

Antécédents de cancer

Nous sommes aussi surpris de la forte proportion d'antécédents personnels d'adénocarcinome colique (4%) et d'adénome colique (3%) dans notre population, ce d'autant que la prévalence dans la population générale en France pour le cancer du colon est de 20 à 30 /100 000 (soit 0,2 à 0,3%) et l'incidence de 60/100 000. Notre taux est significativement plus élevé ($p < 0,0001$), ceci doit nous conduire à rechercher un lien avec l'exposition aux poussières de bois ou ses constituants dans la genèse de ces tumeurs ce d'autant qu'il n'y avait pas d'antécédent familial de cancer retrouvé et que d'autre part nous avons montré les similitudes anatomo-pathologiques des ces tumeurs. Peters RK *et al.* ont publié en 1989 dans la revue *Cancer Research* une étude cas-témoin incluant 147 patients âgés de moins de 45 ans présentant un cancer colorectal. Ils confirment un lien entre cancer rectal et exposition aux poussières organiques (OR = 5,2 ; IC 95 % [1,2-22,1]), et poussières de bois (OR = 9,4 ; IC 95 % [2,0-44,7])¹⁷¹. Ils ne trouvent pas de lien avec l'exposition aux poussières métalliques ou minérales. Par ailleurs, ils mettent en évidence un rôle protecteur de la consommation de fruits et légumes pour le cancer du colon mais pas du rectum. La consommation de corps gras d'origine animale augmente le risque de cancer du colon droit et du rectum. L'activité physique diminuerait le risque. Les résultats ne sont pas modifiés en excluant les sujets présentant des antécédents familiaux de cancer colorectal. Concernant le rôle de la poussière, les auteurs émettent l'hypothèse que le rectum jouant un rôle de réservoir, il serait plus exposé aux constituants cancérogènes de la poussière. Le colon transverse serait mieux protégé par l'effet du péristaltisme qui diminue le temps de contact entre poussière et muqueuse. Par ailleurs, il est intéressant de constater que 18% de notre population présente un deuxième cancer (cancer de la prostate, cancer broncho-pulmonaire, cancer colique, glioblastome,

¹⁷⁰ Olsen JH. Occupational risks of sinonasal cancer in Denmark. *Br J Ind Med* 1988;45:329-35

¹⁷¹ Peters RK, Garabrant DH, Yu MC, Mack TM. A case-control study of occupational and dietary factors in Colorectal Cancer in Young men by Subsite. *Cancer Res* 1989; 49:5459-68

cancer cutané, séminome, un cancer vésical) et que 64% de ces patients sont non tabagiques. A noter aussi, qu'un patient non tabagique, a développé de façon concomitante un adénocarcinome de l'ethmoïde, du colon et un carcinome bronchique (non biopsié). L'exposition aux poussières de bois, l'exposition concomitante aux métaux (10%) et aux solvants (44,7 %) doit donc faire suspecter le rôle des facteurs environnementaux dans la genèse de ces cancers même si nous n'avons pu mettre en évidence de lien statistiquement significatif en raison d'effectifs trop faibles. Pour l'heure, nous n'avons pas retrouvé d'étude soulevant cette question : une étude cas-témoin (exposés-non exposés) sur une plus grande population serait utile afin de confirmer le rôle des facteurs environnementaux dans l'apparition d'un deuxième cancer chez le même individu.

Il faut souligner que nos résultats sont basés sur la mise en place d'indices d'exposition accessibles de façon simple à l'interrogatoire du patient ou de ses proches : nous avons retenu la durée d'exposition aux poussières de bois : en effet notre population est composée en grande majorité d'artisans exposés depuis l'apprentissage (14 ans), le plus âgé étant né en 1921, le plus jeune en 1960. La totalité des personnes interrogées ayant confirmé l'absence de prévention collective efficace au cours la plus grande partie de leur carrière. Par conséquent, cette variable n'a pas été incluse dans l'indice. Il eut été intéressant d'inclure la variable « prélèvement atmosphérique ». Concernant les métaux et les solvants la variable retenue a été le nombre de jours d'exposition (fréquence annuelle).

Symptômes

Les symptômes les plus fréquents sont l'obstruction nasale et la rhinorrhée ce qui peut faire retarder le diagnostic (57% des sujets ont une évolution supérieure à 6 mois avant diagnostic). La durée d'évolution des symptômes avant diagnostic n'influe pas sur la survie. Ces résultats rejoignent les différentes données de la littératures. 8% de nos patients ont une atteinte bilatérale lors du diagnostic. Llorente *et al.* retrouvent le même pourcentage dans une série de 79 patients¹⁷².

¹⁷² Llorente JL, Pérez-Escuredo J, Alvarez-Marcos C, Suárez C, *et al.* Genetic and clinical aspects of wood dust related intestinal-type sinonasal adenocarcinoma: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009;**266**:1-7

Bilan d'extension

Llorente *et al.* retrouvent dans leur série des pourcentages différents : lame criblée (53%), méninges (24%), orbite (21%), et extension endocrânienne (22%)¹⁶⁶. Nous avons eu seulement 5 patients avec atteinte de type métastatique dans notre étude, ce qui est inférieur aux données de la littérature¹⁷³.

Histologie des tumeurs

Les types histologiques retrouvés ont été : - mucineux 33 (33,67 %), - coliques 23 (23,47 %), - papillaires 21 (21,43 %), mixtes 14 (14,29 %), solides ou indifférenciés 5 (5,10 %), données manquantes 2 (2,04 %). Franchi *et al.*¹⁷⁴ retrouvaient dans leur série, d'abord le type colique (40%), puis papillaire (18%), et enfin les types mixtes et mucineux (22%).

Survie globale et spécifique

Percodani *et al.*¹⁷⁵ trouvent une survie globale de 68 % à trois ans. L'étude du GETTEC¹⁷⁶ trouve une survie à 3 ans de 72%, à 5 ans de 64%. Dans notre étude, le taux de survie global est de 73 % à 3 ans, et de 62 % à 5 ans. Lorsque l'on ne prend en compte que les patients décédés de cancer de l'ethmoïde (survie spécifique), la survie à 3 ans est de 74%, et à 5 ans de 65 % (tableau n° 31).

Selon les études, la survie à 5 ans varie entre 37% et 77% dans les protocoles associant chirurgie et radiothérapie¹⁷⁷.

Tableau n° 31 : analyse comparative des taux de survie selon 3 études.

Survie	CHU Nantes Survie globale	CHU Nantes Survie spécifique	GETTEC Survie globale	Percodani <i>et al.</i> Survie globale
à 3 ans	73%	74%	72%	68%
à 5 ans	62%	65%	64%	-

¹⁷³ Barnes L. Intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Am J Surg Pathol* 1986;**10**:192-202

¹⁷⁴ Franchi A, Santucci M, Wenig B. Adenicarcinoma. In: Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D (eds) - World Health Organisation classification of tumours. Pathology and genetics of head and necks tumours. Lyon: IARC; 2005:20-3

¹⁷⁵ Percodani J, Rose X, Folia M, Woisard V, *et al.* Les adénocarcinomes de l'ethmoïde : à propos de 46 patients. *Fr ORL* 2005;**89**:146-54

¹⁷⁶ Choussy O, Ferron C, Védrine PO, Toussaint B, *et al.* GETTEC Study Group. Adenocarcinoma of ethmoid: a GETTEC retrospective multicenter study of 418 cases. *Laryngoscope* 2008;**118**:437-43

¹⁷⁷ Id. p.441

Nous avons donc montré que l'analyse de la survie spécifique modifie les résultats et les optimise en terme de pronostic vital mais sans que cette différence soit statistiquement significative dans notre étude.

Données histologiques et survie

Pour Kleinsasser *et al*, l'analyse de survie donne à 3 ans : 82 % de survie pour les PTCC-I (sous-type papillaire de Barnes), 54 % pour les PTCC II (moyennement différencié correspondant au sous type colique de Barnes), 36 % pour les PTCC III (indifférencié correspondant au type solide), 0 à 48 % pour la classe «alveolar globet» correspondant au sous type mucineux et 71 % pour le sous type «transitional» correspondant au sous-type mixte de Barnes¹⁷⁸. Ceux-ci permettant de valider nos résultats qui sont du même ordre tant en analyse de survie globale que spécifique.

Bilan d'extension et survie

La plupart des études montrent que l'envahissement de la lame criblée et de la dure mère sont des facteurs de mauvais pronostic^{179,180,181} : ceci concorde avec nos résultats en analyse univariée.

Dans une série de 75 cas, Llorente avait noté, en analyse univariée, que l'atteinte de la dure-mère, la lame criblée, l'existence d'une récurrence ou de métastases sont de mauvais pronostic¹⁸². L'analyse multivariée avait identifié la récurrence après chirurgie, et l'atteinte de la dure-mère comme facteur de mauvais pronostic. L'étude du GETTEC¹⁸³, rétrospective multicentrique portant sur 418 cas a mis en évidence trois facteurs indépendants significatifs

¹⁷⁸ Franchi A, Santucci M, Wenig B. Adenocarcinoma. In: Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D (eds) - World Health Organisation classification of tumours. Pathology and genetics of head and necks tumours. Lyon: IARC; 2005:20-3

¹⁷⁹ Kraus DH, Serman BM, Levine HL, Wood BG, *et al*. Factors influencing survival in ethmoid sinus cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;**118**:368-72

¹⁸⁰ Lund VJ, Howard DJ, Wei WI, Cheesman AD. Craniofacial resection for tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses. A 17 years experience. *Head Neck* 1998;**20**:97-105

¹⁸¹ Salvan D, Julieron M, Marandas P, Janot F, *et al*. Combined transfacial and neurochirurgical approach to malignant tumours of the ethmoid sinus. *J Laryngol Otol* 1998;**112**:446-50

¹⁸² Llorente JL, Nunez F, Rodrigo JP, Fernandez Leon R, *et al*. Sinonasal adenocarcinoma. Our experience. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2008;**59**:235-8

¹⁸³ Choussy O, Ferron C, Védrine PO, Toussaint B, *et al*. GETTEC Study Group. Adenocarcinoma of ethmoid: a GETTEC retrospective multicenter study of 418 cases. *Laryngoscope* 2008;**118**:437-43

en analyse multivariée : la taille de la lésion (TNM), l'extension à la dure-mère ou au cerveau, l'envahissement ganglionnaire.

Dans notre première étude (survie globale), nous avons mis en évidence que ces mêmes variables influencent la survie en analyse univariée à l'exception de la variable « métastase ». Ceci est probablement dû au fait que nous avons peu de sujets ayant présenté des métastases (5 cas). En analyse multivariée, nous avons montré que la taille de la tumeur (classification TNM) mais aussi l'extension à l'orbite et l'atteinte bilatérale sont des facteurs de mauvais pronostic.

Cependant nous avons montré qu'en faisant intervenir les facteurs environnementaux par une analyse multivariée, les résultats étaient différents de ceux publiés jusqu'ici et en particulier nous avons montré que la consommation de tabac (quantité cumulée) diminuait de façon significative la survie globale. L'exposition aux métaux aurait un impact positif sur la survie : cette hypothèse doit être confirmée sur un échantillon plus large; par ailleurs une explication pourrait être le rôle protecteur de certains métaux tels le cobalt qui induit la superoxyde dismutase qui tend à éliminer les radicaux libres¹⁸⁴.

Aussi, nous ne retrouvons pas les mêmes conclusions que l'étude du GETTEC¹⁸⁵ qui indique que l'exposition aux poussières de bois ou de cuir améliore le pronostic vital mais celle-ci n'a pas tenu compte comme nous l'avons fait d'autres facteurs explicatifs possibles, notamment l'exposition aux solvants, aux métaux et au tabac ce qui peut expliquer ces résultats divergents.

Voie d'abord chirurgicale

Enfin, nous avons montré que la voie d'abord chirurgicale influence la survie spécifique ce que ne retrouvent pas toutes les études publiées jusqu'ici.

Stoll D, Bebear JP *et al* dans une série de 76 patients atteints d'adénocarcinome de l'ethmoïde, ne trouvent pas de différence entre voie d'abord transfaciale et mixte¹⁸⁶.

Llorente et Choussy retrouvent ce résultat dans leur étude. En revanche, nos résultats confirment la thèse de Jegoux F¹⁸⁷. Il inclut 78 cas dans une étude rétrospective et conclut à

¹⁸⁴ Li M, Zhu Q, Hu CW, Chen L, Liu ZL *et al*. Cobalt and manganese stress in microalga *Pavlova viridis*

(Prymnesiophyceae): effects on lipid peroxidation and antioxidant enzymes. *J Environ Sci*. 2007; **19**:1330-5

¹⁸⁵ Choussy O, Ferron C, Védrine PO, Toussaint B, *et al*. GETTEC Study Group. Adenocarcinoma of ethmoid: a GETTEC retrospective multicenter study of 418 cases. *Laryngoscope* 2008;**118**:442

¹⁸⁶ Stoll D, Bébéar JP, Truilhé Y, Darrouzet V, *et al*. Ethmoid adenocarcinomas: retrospective study of 76 patients. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 2001;**122**:21-9

un meilleur pronostic pour la voie d'abord transfaciale ou transfaciale avec résection étendue à la base du crâne par rapport à la voie mixte. Jegoux F. conclut que les stades T1 et T2 peuvent être traités par voie paralatéronasale avec conservation de la base du crâne, et que toutes les autres tumeurs doivent être traitées par voie transfaciale avec résection étendue à la base du crâne. Nos résultats vont dans ce sens et valident la pratique mise en place au CHU de Nantes à partir de 1998.

Limites de l'étude

Concernant le recueil des données, il est indéniable que les informations concernant les niveaux d'exposition prises auprès des salariés voire des familles quand ceux-ci étaient décédés peuvent présenter des biais. Néanmoins les données ont été croisées avec le dossier de pathologie professionnelle, les informations du médecin traitant voire du médecin ORL.

Le fait qu'on ne dispose pas des mesures d'empoussièrement au poste de travail peut aussi être considéré comme une limite à nos résultats; il aurait aussi été intéressant de contacter tous les médecins du travail des salariés afin de colliger ces informations.

IV – CONCLUSION DE LA 3^{ème} PARTIE

Le cancer de l'ethmoïde est diagnostiqué vers l'âge de 63 ans (plus de 50 % des cas entre 60 et 69 ans, plus de 74 % entre 60 et 85 ans). Il faut donc souligner l'importance du suivi post-professionnel tout particulièrement chez les sujets retraités. La répartition de l'âge du diagnostic est d'allure gaussienne, nous avons montré un lien étroit entre âge du diagnostic et âge de décès, cela doit conduire à proposer un dépistage précoce dès l'âge de 40 ans.

L'analyse univariée de notre étude a mis en évidence comme facteurs influant la survie globale à 5 ans : la quantité cumulée de consommation de tabac avant le diagnostic, - la classification TNM, la voie d'abord chirurgicale, les éléments cliniques (exophtalmie, diplopie), l'atteinte de la lame criblée, du sphénoïde et des méninges, le contrôle régional de la chirurgie première, la chirurgie d'une récurrence.

¹⁸⁷ Jegoux F. Adénocarcinomes de l'ethmoïde : expérience nantaise (80 cas). Place de la résection de la base du crâne par voie transfaciale, Thèse médecine Nantes, 2002, p.101

L'analyse multivariée a montré un lien significatif entre durée de survie, le stade de la tumeur au moment du diagnostic, la consommation de tabac, la voie d'abord chirurgicale et de façon paradoxale, l'exposition aux métaux semblerait « protectrice ». Ceci pourrait être lié à un effet antioxydant.

Lorsque l'on a restreint l'analyse au groupe décédé de cancer de l'ethmoïde, le facteur pronostic principal est devenu la voie d'abord chirurgicale et l'atteinte unie ou bilatérale initiale. La durée d'exposition au bois n'influence pas la survie.

Nous avons montré qu'il y avait une corrélation étroite linéaire entre l'âge du diagnostic et l'âge du décès, que l'âge du diagnostic avait une répartition gaussienne avec une moyenne à 67,8 ans, un écart type de 10,3 ans, et un âge minimum de 34 ans. Ceci doit conduire à proposer un dépistage systématique dès l'âge de 35 ans selon nous.

La prévalence de cancer du colon dans notre population (4%) est significativement supérieure ($p < 0,001$) à la prévalence dans la population générale (25 à 30/100 000 habitants). Le rôle des poussières de bois dans les cancers digestifs n'est pas clairement établi, des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer un lien. La similitude anatomopathologique de ces tumeurs pose aussi question sur le rôle de la poussière de bois dans la différenciation tissulaire et la transformation d'une muqueuse de type respiratoire en muqueuse de type colique. Une piste possible est l'origine commune de ces tissus, lors de l'embryogénèse, qui dérivent de l'entoblaste.

Quatrième partie : recherche de marqueurs moléculaires spécifiques

I – OBJECTIFS DE L'ETUDE

A - Objectifs initiaux de l'étude

L'objectif principal du PHRC était d'identifier des marqueurs moléculaires spécifiques chez des patients présentant un adénocarcinome de l'ethmoïde. L'objectif secondaire était d'étudier la relation qui existe entre l'expression de ces gènes et la survie sans rechute à 2 ans.

B - Caractéristiques de l'étude

Il s'agit d'une étude ouverte, prospective, sans bénéfice individuel direct.

Plusieurs éléments nous ont incité à promouvoir ce type d'étude : les données épidémiologiques indiquent un accroissement constant des cancers liés au tabac ou à l'alcool, mais on trouve peu de données sur l'expression génétique des cancers professionnels et leur lien avec une exposition à des carcinogènes environnementaux ; concernant l'adénocarcinome de l'ethmoïde, étroitement lié à l'exposition aux poussières de bois, aucune publication n'a été recensée jusqu'à ce jour sur les marqueurs génétiques spécifiques de cette tumeur. Les premières techniques développées dans les années 80 telles que la PCR, permettent l'analyse quantitative de l'expression, gène par gène. La technique des puces à ADN permet actuellement une analyse quasi immédiate de plus de 10000 gènes. Des puces dédiées comprenant les principaux gènes intervenant dans les cancers, et mises au point dans le laboratoire de la Plateforme du Génopôle Ouest dirigé par Jean Léger, ont été retenues.

Celles-ci permettent d'isoler une famille de gènes de fonction altérée et spécifique d'un cancer donné. Nous avons rédigé un PHRC en ce sens et l'avons soumis à la DRC du CHU de Nantes (annexe 8, page 245). L'objet principal a été de rechercher dans les cancers de l'ethmoïde une ou plusieurs familles de gènes avec une modification d'expression comparativement au même tissu prélevé en zone saine (technique des puces à ADN).

L'objectif secondaire de notre étude a été d'étudier la valeur pronostique des gènes identifiés en terme de survie à deux ans, en tenant compte des données histologiques, de l'extension de la tumeur et de l'influence des facteurs environnementaux sur l'expression des gènes.

28 sujets, ayant donné un consentement libre et éclairé, ont été inclus entre 2004 et 2007 dans notre étude (Nantes, Rennes). Chaque tissu pathologique et sain (cornet inférieur controlatéral) prélevé, a été adressé au Service d'Anatomie Pathologique du CHU de Nantes pour confirmation diagnostique et congélation des tissus. Chaque sujet inclus a bénéficié dans les Centres de Consultation de Pathologie Professionnelle d'un interrogatoire précis sur les expositions professionnelles et environnementales durant sa carrière professionnelle. L'Unité INSERM U892, a participé au développement des techniques microarrays (puces à ADN) et à la PCR Quantitative. L'analyse biostatistique des résultats a été réalisée par le Laboratoire de Biostatistiques et Biomathématiques de la Plateforme du Génopôle Ouest.

II – PRESENTATION DES PATIENTS

Parmi les 28 patients inclus dans le PHRC, deux d'entre eux n'ont pu bénéficier de l'étude en raison d'un tissu tumoral ne répondant pas aux critères d'inclusion (un tissu de type myoépithélial et l'autre dysplasique). La moyenne d'âge de la population est de 72 ans (écart type 9 ans), 23 patients ont régulièrement été exposés aux poussières de bois, deux patients ont été exposés aux poussières du cuir, un patient n'a eu aucune exposition professionnelle aux poussières de bois ou à un autre cancérogène chimique. La durée moyenne d'exposition aux poussières de bois dans ce groupe est de 29 ans (écart type de 12 ans). L'exposition cumulée aux solvants et produits de traitement du bois est de 2920 jours par salarié en moyenne (écart type 4015 jours). A noter également que 3 patients ont des antécédents de cancer colique, et que 6 patients parmi les 28 inclus ont présenté un deuxième cancer : cancer du colon (3), maladie de Waldenström (1), cancer de prostate (1), mélanome (1).

2 autres patients ont eu une exérèse de polypes adénomateux du colon. Ces données sont superposables à celles trouvées dans notre première étude en dehors de l'exposition aux métaux non retrouvée dans cette série. 11 patients sont tabagiques, et le tabagisme est à estimer à 4,2 paquets.années par patient (écart type 6,8 années). Les données brutes des 26 patients retenus pour l'analyse moléculaire sont rapportées dans le tableau n° 32 ci-dessous.

Tableau n° 32 : Données descriptives des 26 patients inclus dans le PHRC

<i>Patients</i>	<i>Age</i>	<i>Exposition poussière^a</i>	<i>Tabac</i>	<i>Autres^b</i>	<i>Stade TNM UICC2003^c</i>	<i>Traitement^d</i>	<i>Devenir^e</i>	<i>Micro- array</i>	<i>q RT PCR</i>	<i>IHC</i>
1	69	B (42)	+	+	T2N0M0	S, R	V	-	+	+
2	79	B (45)	-	-	R4bN0M0 ^c	S, R	D	-	-	+
3	72	B (25)	+	+	R3N0M0	S, R	V	-	-	+
4	55	B (17)	+	+	T3N0M0	S, R	V	-	+	+
5	62	B (3)	-	+	T4bN0M0	S	D	+	+	+
6	71	B (37)	+	+	R3N0M0	S, R	V	+	+	+
7	83	C (5)	+	+	T4aN0M0	S, R	D	-	-	+
8	66	B (43)	-	-	T4bN0M0	S	D	+	+	+
9	76	B (27)	+	+	R3N0M0	S, R	V	+	+	+
10	50	-	+	-	T4aN0M0	S, R	V	+	+	+
11	75	B (43)	-	+	T3N0M0	S, R	V	-	+	+
12	81	B (41)	-	+	T4aN0M0	S, R	D	+	+	+
13	71	B (30)	-	+	T3N0M0	S, R	V	-	+	+
14	60	B (25)	+	+	T2N0M0	S, R	V	+	+	+
15	73	B (6)	+	-	T2N0M0	S, R	V	-	-	+
16	68	B (32)	+	-	T2N0M0	S, R	V	+	+	+
17	70	B (25)	-	-	T2N0M0	S, R	V	-	+	+
18	79	B (20)	-	-	T2N0M0	S, R	D*	-	+	+
19	77	C (12)	+	+	T4aN0M0	S, R	V	+	+	+
20	65	B (35)	-	+	T2N0M0	S, R	V	-	-	+
21	90	B (30)	+	-	T3N0M0	S, R	V	-	-	+
22	54	B (42)	-	-	T2N0M0	S, R	V	-	-	+
23	68	B (31)	+	+	T3N0M0	S, R	V	-	-	+
24	71	B (41)	+	+	T2N0M0	S, R	V	-	-	+
25	73	B (30)	-	+	T4aN0M0	S, R	V	-	-	+
26	75	B (9)	-	+	T4bN0M0	S, R	D	-	-	+

a: Exposition aux poussières : B= bois, C= cuir. () : années

b: Autres expositions : pesticides (xylophène), solvants (acétone, formaldéhyde)

c: R = récurrence tumorale

d: Traitement : C = Chirurgie, R = radiothérapie complémentaire

e: D = décès en lieu avec une rechute de l'adénocarcinome de l'ethmoïde, D* = décès non en lien avec l'adénocarcinome de l'ethmoïde. V= vivant au 30/05/08

III – METHODES ET MODALITE DE REALISATION PRATIQUE

Résumé

Entre juillet 2004 et janvier 2006, 19 patients (P1-P19) avaient été inclus dans le PHRC : sur ce groupe ont été débutées les analyses en vue des puces à ADN. 10 prélèvements présentant un tissu tumoral nécrotique à plus de 50% n'ont pas été retenus pour les puces à ADN. L'extraction en ARN du patient P2 étant non satisfaisante, celui-ci a été exclu de l'analyse. Au total, les tissus P5, P6, P8, P9, P10, P12, P14, P16, et P19 ont été inclus dans l'analyse des puces à ADN (tableau n°32 page 132). Les puces à ADN ont été complétées lorsque l'ARN avait pu être extrait en qualité et quantité suffisante par une RTQPCR quantitative; elle a été conduite sur 15 patients (P1, P4, P5, P6, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P16, P17 et P19). L'analyse immunohistochimique réalisée en 2008 a porté sur l'ensemble des 26 patients inclus (tableau n°32 page 132).

A - Puces à ADN

1 - Principe général

L'ADN est présent dans la cellule sous forme d'un double brin, la séquence de chaque brin (c'est-à-dire la succession des nucléotides) étant parfaitement complémentaire de la séquence du brin en vis-à-vis (figure n°34).

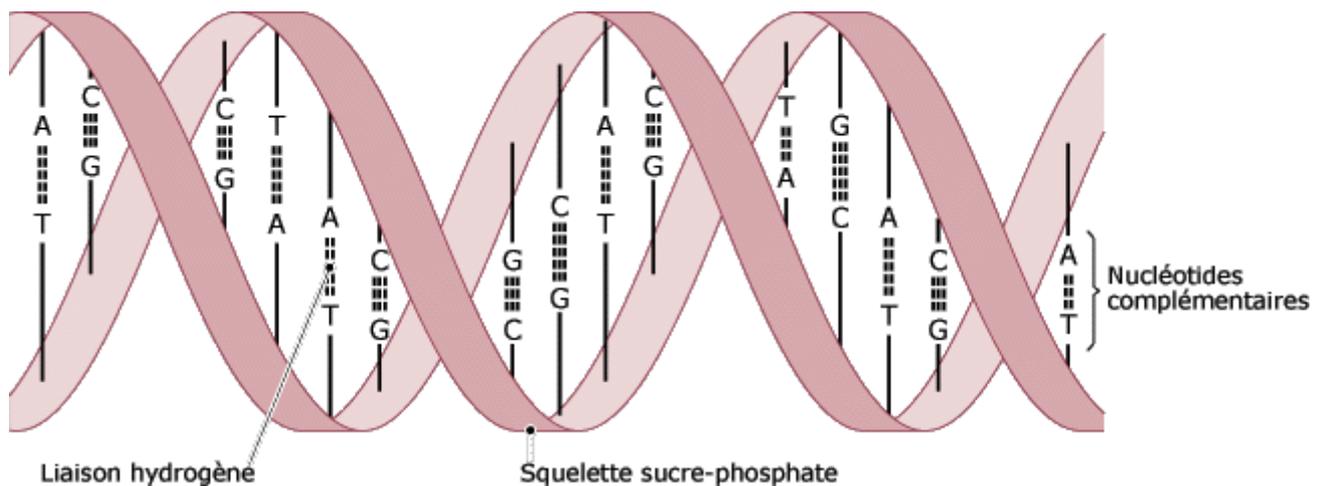


Figure n°34 : principe d'appariement des brins d'ADN selon la complémentarité : A-T, C-G.

Il s'agit de ce principe-ci qui sert au concept des puces à ADN. En effet, les puces à ADN sont des supports fonctionnalisés en verre ou en silicium, de petite taille (la taille d'une lame de microscope : 25 mm × 75 mm) sur lesquels vont être greffées après synthèse, des milliers de séquences d'ADN nucléiques, appelées sondes, caractéristiques d'autant de gènes (entre 5 000 et 12 000). Nous avons utilisé dans notre étude des puces spécifiques des cancers humains (cancerochips) élaborées par la plateforme du Génomus Ouest¹⁸⁸.

A un instant donné, des milliers d'ARN transcrits sont présents dans les cellules. Leur abondance est révélatrice de l'activité cellulaire à un instant t. Afin d'analyser l'ensemble de ces transcrits qui serviront de cibles pour l'étape d'hybridation, il faut les extraire, puis leur incorporer un marqueur fluorescent qui permettra d'évaluer et de quantifier l'appariement de la sonde (ARN du sujet) sur la cible (ADN complémentaire fixé sur la puce). Dans notre étude, nous avons travaillé à partir de cellules provenant de tumeurs ethmoïdales (environ 4 cm³) et de tissu sain provenant du même sujet (environ 1 cm³). L'extraction de ces transcrits s'est faite par les techniques physico-chimiques classiques de séparation (lyse de la cellule et séparation sélective des ARN totaux).

Le marquage de ces derniers à l'aide de marqueurs fluorescents nécessite une étape supplémentaire : on effectue une transcription inverse pour revenir de l'ARN messager à la séquence nucléotidique du gène de départ. C'est durant cette réaction de synthèse inverse que sont incorporés les marqueurs fluorescents (rouge Cy5 sur cellules tumorales ou vert Cy3 sur pool de tissu sain). On obtient ainsi un mélange de **cibles marquées** qui seront ensuite mises en contact avec les cibles greffées sur la puce pour l'étape d'hybridation.

Après hybridation, les hybrides cibles/sondes, sont repérés et quantifiés grâce à leur fluorescence. On peut donc, grâce aux puces à ADN, analyser en un même temps un nombre considérable de séquences, l'utilisation de deux fluorochromes différents [un rouge (Cy5) et un vert (Cy3) par exemple] permet de comparer les niveaux d'expression relatifs de deux transcriptomes différents sur une même puce. On obtient alors, en une seule étape et donc dans des conditions rigoureusement identiques d'hybridation, 2 images : une rouge et une verte représentatives chacune d'un transcriptome. Ces 2 images sont ensuite superposées

¹⁸⁸ Le Meur N, Lamirault G, Bihouée A, Steenman M, *et al.* A dynamic web-accessible resource to process raw microarray scan data into consolidated gene expression values: importance of replication. *Nucleic Acids Res* 2004;**32**:5349-58

« in silico » pour analyser le différentiel d'expression (variables quantitatives) entre tissu pathologique et tissu sain (figure n° 35).

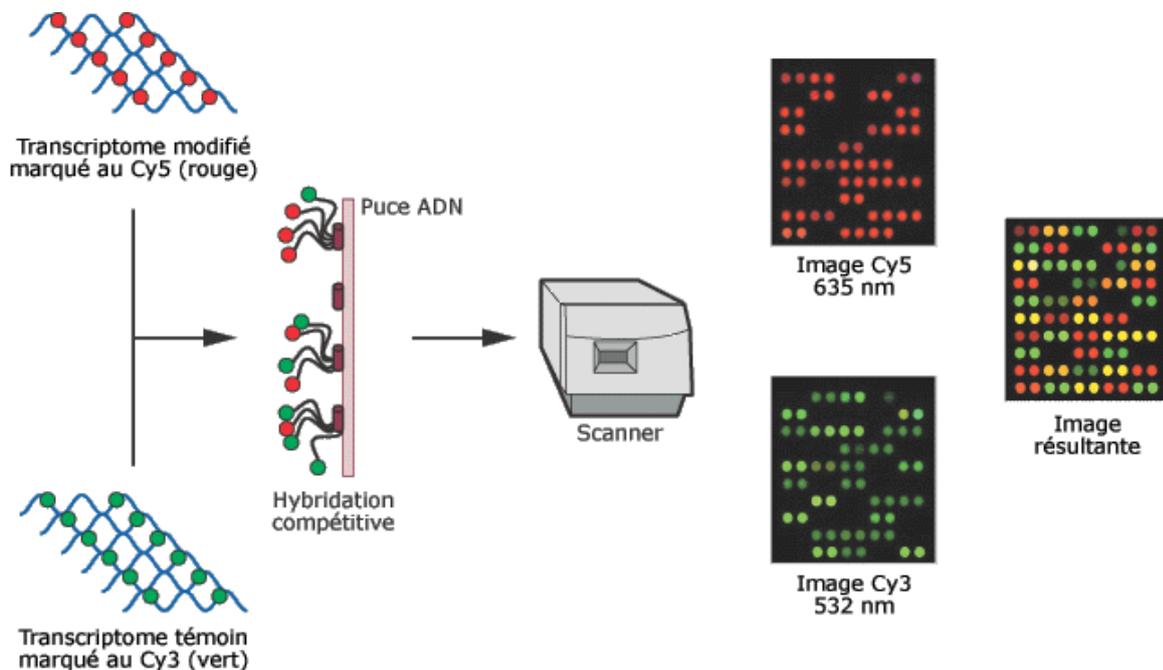


Figure n°35 : principe général de réalisation des puces à ADN

2 - Protocole général pour l'étude du différentiel d'expression génétique

Le protocole a été mis en place avec l'équipe du Docteur Léger à la Plateforme du Génopôle Ouest. Le principe est de comparer l'expression génétique des tissus pathologiques comparativement à un pool de tissus sains ou pool de référence marqué à la cyanine 5 (Cy 5). Pour chaque échantillon de tissu pathologique et de tissu sain adressé par le chirurgien, les étapes suivantes ont été réalisées et seront détaillées par la suite (figure n°36) :

- Contrôle histologique du tissu.
- Contrôle qualité des tumeurs (exclusion des tissus avec plus de 50% de nécrose).
- Extraction de l'ARN.
- Amplification de l'ARN.
- Marquage de l'ARN des tissus sains (TS) et des tissus pathologiques (TP) à la cyanine 3 (Cy 3 = cible marquée en rouge).
- Marquage d'un pool de référence qui correspond à la moyenne d'expression des tissus sains : marquage à la cyanine 5 (Cy 5 = cible marquée en bleu).
- Traitement statistique des données : un scanner va mesurer le différentiel de couleur émise par les fluorochromes (TS/pool et TP sur pool) et finalement produit une matrice (fichier Excel) comprenant les 6800 gènes avec pour chaque gène

l'expression moyennée dans le tissu pathologique et le tissu sain. Une normalisation des données (élimination du bruit de fond) est ensuite réalisée afin de retenir les différences significatives.

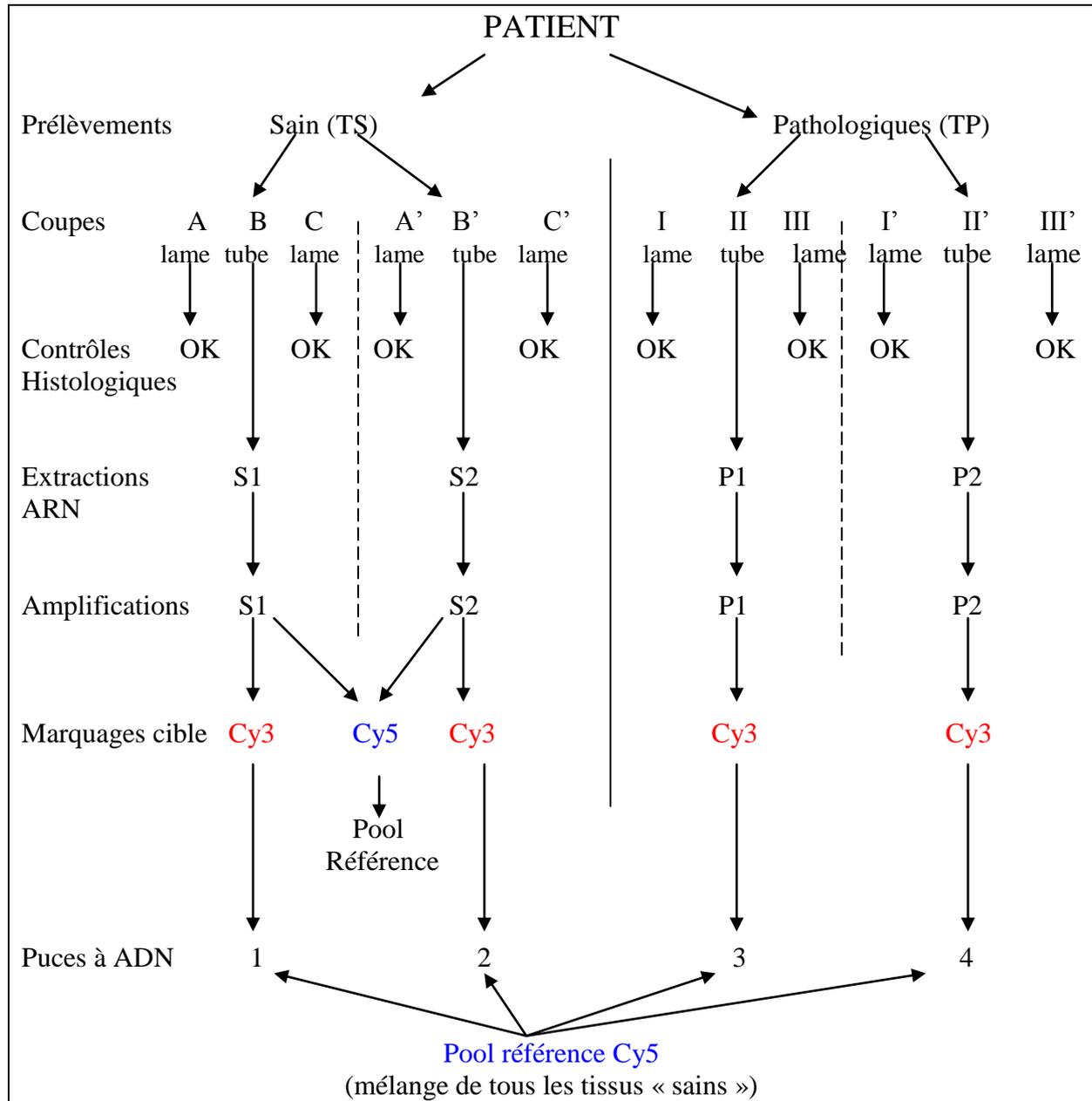


Figure n° 36 : Schéma récapitulatif du protocole d'étude

- Contrôle de l'histologie des tissus avant extraction de l'ARN

Les ARNs totaux ont été extraits à partir de coupes congelées en faisant des contrôles histologiques hématoxyline-éosine de part et d'autre du matériel retenu pour l'analyse (figure n° 37).

Pour chaque tissu (sain et pathologique), nous avons fait la manipulation aux deux extrémités du prélèvement. Les tubes ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Si les contrôles histologiques 1, 2 et 3 étaient satisfaisants, nous avons extrait l'ARN du tube B ou C. 15 patients ont ainsi pu être retenus.

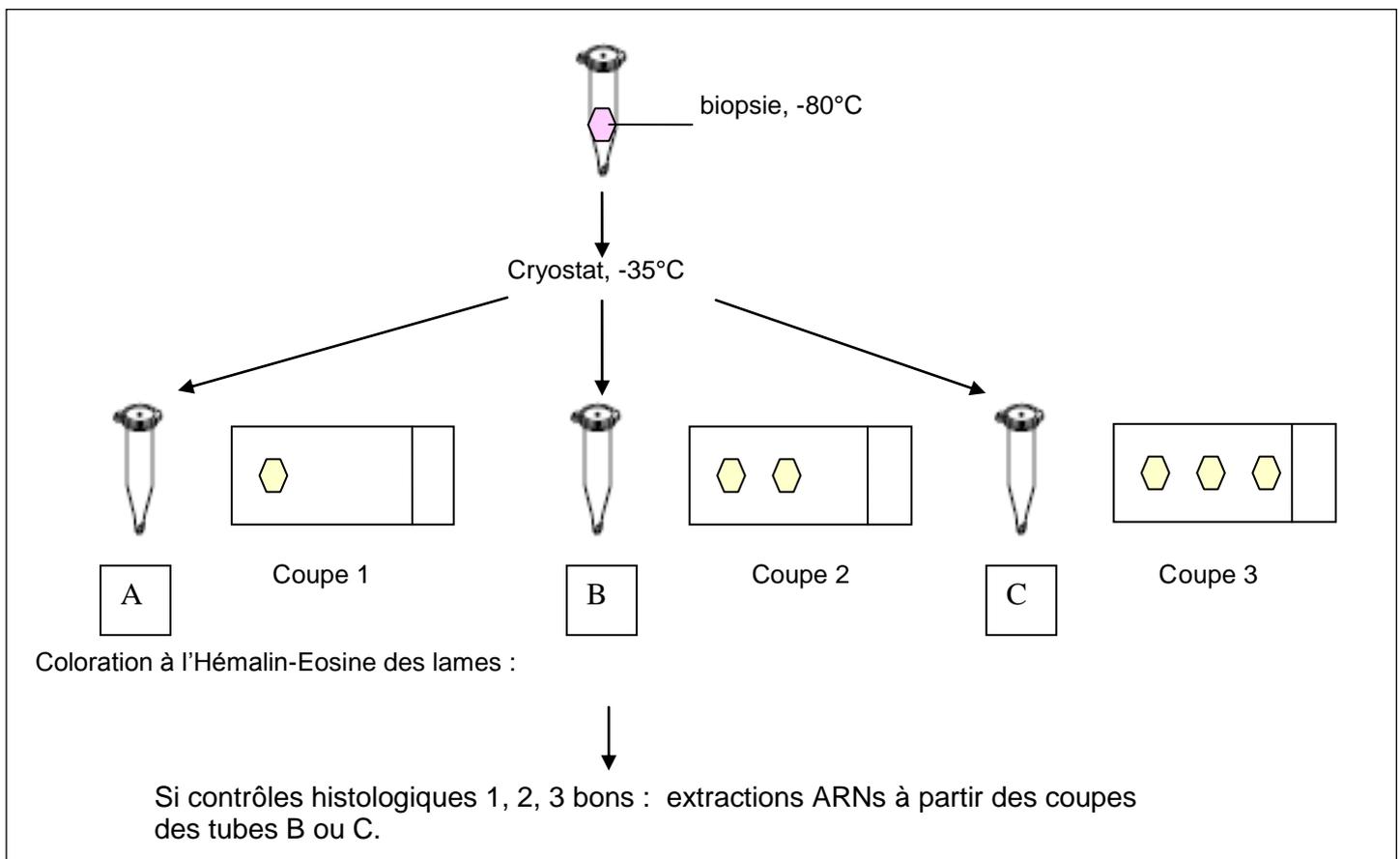


Figure n 37 : Protocole de contrôle de la validité des tissus avant extraction de l'ARN

- Extractions d'ARN

L'extraction des ARNs totaux a été faite avec le kit Total RNA and Protein Isolation (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Les ARNs obtenus sont quantifiés sur le NanoDrop[®] ND-1000, spectrophotomètre permettant de quantifier de faibles concentrations en acides nucléiques à partir d'un petit volume. Les résultats donnent la concentration en ng/ μ l, les ratios 260/280 pour la pureté de l'échantillon et 260/230 pour les éventuels contaminants tels que l'alcool. La qualité des ARNs (degré de dégradation et pureté) est quant à elle obtenue sur l'Agilent 2100 Bioanalyser dont le principe est une électrophorèse capillaire. Le kit Nano LabChip (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) permet de comparer facilement les échantillons grâce au ratio 28S/18S et au RNA Integrity Number (RIN), nombre compris entre 1 et 10, où 10 représente un ARN intact¹⁸⁹. La quantité d'ARN étant faible, celui-ci est ensuite amplifié.

- Amplification de l'ARN

Cette amplification se fait à l'aide du kit Amino Allyl MessageAmp[™]II aRNA Amplification (Ambion, Austin, TX). La réaction se fait en plusieurs étapes (figure n° 38) :

- la première étape est une Reverse Transcription (RT) en présence d'Oligo dT pour ne sélectionner que les ARNm et pour former l'ADN complémentaire (ADNc).

- la seconde correspond à la synthèse d'ARN amplifié (ARNa) à partir de l'ADNc. Pendant cette réaction, un nucléotide modifié est incorporé : le 5-(3-aminoallyl)-UTP. Il contient un groupement amine réactif pouvant réagir avec les N-hydroxysuccinimidyl esters (NHS esters) des cyanines Cy3 et Cy5 lors de la réaction de marquage. Au bout de 16h, nous avons obtenu approximativement 50 μ g d'ARN dans 100 μ l à partir de 500 ng d'ARN. A chaque étape, des purifications sur colonnes sont nécessaires afin d'éliminer les primers, sels, enzymes, nucléotides et les ARNs initiaux pouvant interférer avec la suite du protocole.

¹⁸⁹ Mueller O, Lightfoot S, Schroeder A. RNA integrity Number (RIN)- Standardisation of RNA Quality Control. Publication Number 5989-1165EN

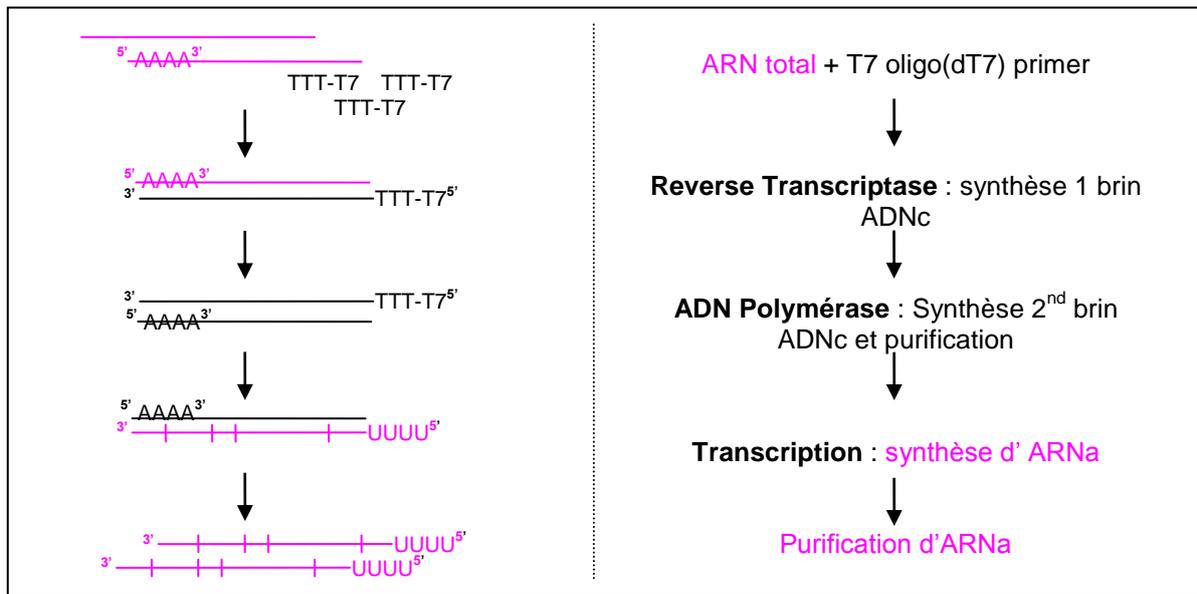


Figure n° 38 : Principe de l'amplification de l'ARN

Le bon déroulement de l'amplification est suivi sur le NanoDrop pour avoir les concentrations en ARNa puis au Bioanalyseur Agilent afin de vérifier que l'amplification s'est effectivement réalisée à partir de l'ARNm.

- Marquage

Sachant qu'il faut environ 10 µg d'ARNa par marquage, la quantification au NanoDrop permet d'aliqoter chaque échantillon, sain et pathologique, à 10 µg par tube en vue du marquage à la Cy3 et Cy5. Tous les aliqots d'ARNa sont lyophilisés au speed vacuum et repris dans 9 µl de tampon de couplage.

Les ARNa marqués sont à nouveau quantifiés au NanoDrop afin de vérifier leur concentration d'une part, et d'évaluer le taux d'incorporation en cyanine d'autre part. Pour la Cy5, la Densité Optique est lue à 650 nm et pour la Cy3, à 550 nm. La concentration attendue en cyanine est généralement située entre 15 et 20 pmol/µl. A ce stade, les échantillons sont passés au speed vacuum, puis fragmentés dans un tampon, à 70°C afin d'améliorer les hybridations.

- Hybridation

Les cibles sont constituées d'8 µg d'ARNa du pool de référence marqué à la Cy5 mélangé à 8 µg de chacun des ARNa marqué à la Cy3 dans 40 µl de tampon d'hybridation à 42°C. Ce tampon est composé d'un détergent comme le SDS qui réduit les liaisons aspécifiques des sondes marquées pendant l'hybridation, de Yeast RNA, un acide nucléique non homologue qui permet de saturer les séquences répétées afin de diminuer le bruit de fond et les hybridations croisées avec de l'ARN ribosomal par exemple.

Avant l'hybridation, les cibles sont dénaturées 2 minutes à 100°C pour éliminer les structures secondaires des ARNa puis mises 30 minutes à 37°C, température optimale pour l'action du Yeast RNA. Les sondes et les cibles sont ensuite placées dans une chambre d'hybridation (Telechem International, Sunnyvale, CA) et immergée dans un bain-marie, à 42°C, à l'obscurité, pendant une nuit.

Après l'incubation, des lavages successifs permettent, d'une part, d'éliminer les hybridations aspécifiques et l'excès de sonde pour diminuer le bruit de fond et, d'autre part, de stabiliser les hybrides.

3 - Traitement des données

Résumé

Les images brutes des signaux Cy3 et Cy5 ont été obtenues en lisant les lames dans un scanner. La lecture a été réalisée par un scanner composé d'un microscope confocal couplé à trois lasers (ScanArray 4000 GSI LUMONICS-USA) avec une résolution spatiale de 10 µm.

Ces images ont ensuite été traitées par le logiciel Genepix et les données d'expression brutes issues de cette analyse ont été filtrées et normalisées en utilisant une méthode développée dans la plateforme du Génopôle Ouest. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SAM software développé spécifiquement pour l'analyse des données de puces à ADN.

- Lecture : acquisition des images

L'acquisition des images se réalise par une **lecture au scanner ScanArray® ExpressHT** (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA). Le scanner est composé

d'un laser qui émet à 532 nm. Puis à 635 nm, analysant chaque fluorochrome séparément. Ainsi, il détecte chaque ADN marqué en simple fluorescence puis superpose les deux. Cette lecture se fait à 10 µm (taille d'un pixel) avec une vitesse de balayage faible pour une bonne résolution. Deux paramètres importants interviennent dans la capture des images : le laser power et le PhotoMultiplier Tube (PMT). Le premier doit être équivalent pour les deux fluorochromes afin d'avoir des données homogènes. Le second est une sorte de diaphragme qui peut être plus ou moins ouvert en fonction de l'intensité lumineuse voulue. Les images obtenues sont colorées artificiellement, vert pour la Cy3 et rouge pour la Cy5, A la fin de la lecture, la couleur dominante de l'image composite est jaune (superposition du vert et du rouge) car un spot jaune indique que l'expression de ce gène est équivalente entre la référence et le test. A l'inverse, un spot rouge est le résultat d'une sous-expression du gène dans la condition test et un spot vert correspond à une surexpression de cette condition par rapport à la référence.

- Traitement des données brutes

La seconde étape est une retranscription des images brutes en données numériques par le **logiciel GenePix Pro version 5,1** (Axon Instruments, Union City, CA). Il localise chaque spot grâce à une grille d'identification. Cette grille comprend le nom et le descriptif des gènes ainsi que leur taille et position exacte. Il suffit de positionner les cercles de la grille sur les spots du scan pour faire correspondre chaque gène avec l'intensité de son signal dans la condition testée. L'intensité de chaque spot est définie par une moyenne, une médiane et une déviation standard calculées à partir des intensités de chaque pixel qui le compose. Ces intensités peuvent alors être quantifiées à l'aide de ratios qui permettront de les analyser en terme d'expression. Nous avons utilisé les ratios de médiane calculés selon l'équation suivante car la médiane tient compte des valeurs extrêmes contrairement à la moyenne :

$$\text{Ratio médiane} = \frac{\text{Intensité médiane spot à 532 nm} - \text{bruit de fond}}{\text{Intensité médiane spot à 635 nm} - \text{bruit de fond}}$$

Le bruit de fond des spots a été calculé (auto-fluorescence, liaisons non-spécifiques) dans un cercle dont le diamètre est 3 fois supérieur à celui du spot. Ceci permet d'éliminer les spots non analysables (poussières, tâches...). Finalement, toutes ces données ont été regroupées dans un tableau servant de matrice pour la suite des analyses.

- Normalisation

Compte-tenu de toutes les sources de variations de la technique, les résultats de GenePix Pro ont été ensuite normalisés par un autre logiciel appelé MADSCAN (<http://cardioserve.nantes.inserm.fr/mad/madscan/>)¹⁹¹. MADSCAN fait un contrôle qualité des lames, corrige les biais par une étape de normalisation et valide statistiquement les niveaux d'expression de chaque gène. L'analyse réelle de l'expression se fait sur les deux extractions d'ARN d'un même tissu (« sain » ou pathologique) en même temps afin d'homogénéiser les résultats et de réduire les variabilités entre chaque condition. MADSCAN procède en 5 phases pour donner ses résultats d'expression. La filtration permet de détecter les spots à intensité extrême (proche du bruit de fond ou saturés) afin de les garder ou de les éliminer selon les critères donnés par GenePix Pro. La normalisation sert à diminuer les biais expérimentaux relatifs à la technique des puces pour ne garder que ceux liés aux sources biologiques. Ainsi, un pool de gènes de ménage (gènes témoins) est utilisé afin de normaliser les données grâce à des algorithmes. Cela centre chaque médiane autour de zéro (figure n° 39).

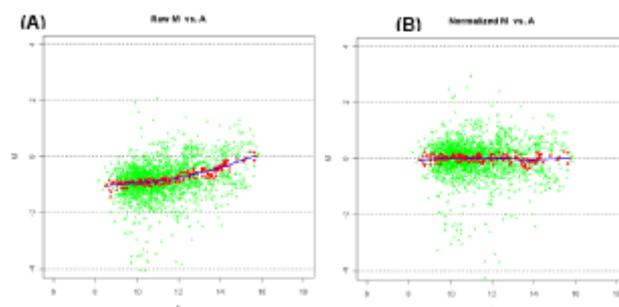


Figure n° 39 : Normalisation dans MADSCAN

- (A) Gènes invariants (en rouge) utilisés pour la normalisation des autres gènes (vert).
(B) Résultats de la normalisation.

La mise à l'échelle ou scaling des variances à l'intérieur et entre des lames sert à réduire et à mettre au même niveau les déviations absolues des médianes (Figure n° 40).

¹⁹¹ Le Meur N, Lamirault G, Bihouée A, Steenman M, *et al.* A dynamic, web accessible resource to process raw microarray scan data into consolidated gene expression value : importance of replication. *Nucl Acids Res* 2004;**32**:5349-58

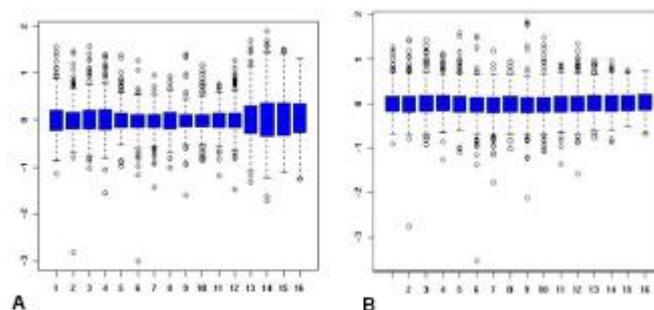


Figure n° 40 : Etape de scanning
 (A) 16 répliquats normalisés avec des variances différentes.
 (B) Même échelle de variances.

Le logiciel MADSCAN recherche ensuite les valeurs extrêmes afin de valider les triplicate au sein d'une puce mais aussi les six répliquats entre les deux extractions d'une même condition. Si une valeur est extrême, elle révèle une erreur technique.

Enfin, l'intégration des données se fait sous la forme d'un tableau Excel regroupant le nom des gènes ainsi que différentes valeurs : la médiane (M) des ratios en $\log(2)$, le coefficient de variation pour chaque lame et entre les deux lames d'une même condition et la moyenne (A) des intensités. Ce fichier est la base pour le traitement statistique des données et du clustering. Toutes ces étapes se font directement par le logiciel et l'utilisateur obtient un tableau récapitulatif servant de contrôle qualité des puces.

4 - Analyses

Pour commencer les analyses, les résultats d'Excel ont été répertoriés de façon ordonnée grâce à un programme (ou macro) développé par la Plateforme Ouest Génopôle. Son rôle est de moyenniser les 3 répliquats de chaque gène sur une puce et d'obtenir la moyenne globale des 2 puces par condition (sain ou pathologique). Ceci a permis de classer les gènes intéressants en fonction d'un score 1 ou 0 donné suivant le nombre de valeurs obtenues. A cette étape nous avons éliminé les gènes pour lesquels nous n'avons pas assez de valeurs et qui étaient inutilisables statistiquement. Deux types d'analyses ont ensuite été réalisés :

- les analyses non supervisées qui permettent de mettre en évidence des clusters de gènes dont l'expression est significativement différente à partir des données brutes sorties de MADSCAN. Son principe est de vérifier comment se classent

directement les échantillons et les gènes. Il existe différentes méthodes telles que par exemple le clustering hiérarchique¹⁹².

- les analyses supervisées qui reposent sur la connaissance de deux groupes d'échantillons au départ (« sains »/pathologiques par exemple), et dont le but est de voir les gènes différentiellement exprimés. Pour cela, le logiciel SAM software a été utilisé.

Ces valeurs sont ensuite moyennées pour chaque gène avec les 50 gènes les plus proches afin de faire un lissage de la courbe, rendant ainsi les clusters plus visibles. A partir de ces groupes de gènes, l'intérêt est de leur trouver une fonction globale grâce au logiciel GoMiner¹⁹³.

A partir des fichiers Excel produits par MADSCAN, la méthode supervisée que nous avons utilisé repose sur le logiciel SAM (Significance Analysis Microarray) afin de mettre en évidence les gènes différentiellement exprimés entre les tissus « sains » et les pathologiques. Cluster et TreeView ont aussi été utilisés afin de classer les gènes mis en évidence.

Sur les valeurs numériques, un test de Student entre la moyenne des valeurs des tissus « sains » et celle des tissus pathologiques permet de révéler les gènes discriminants. Le calcul du logarithme base 10 du résultat de Student permet de représenter les résultats sous forme de graphique mais aussi de donner un signe positif aux gènes sur exprimés et négatif dans le cas contraire.

Nous avons ensuite validé nos résultats en PCR Quantitative en temps réel (Q-RTPCR) sur un échantillon plus large.

B - Méthode de la PCR quantitative en temps réel (Q –RTPCR)

1-Principe

Les ARN de tissus péri-tumoraux et tumoraux ont été extraits puis traités par une transcriptase reverse pour obtenir des ADNc qui sont analysés par PCR quantitative.

¹⁹² Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**:14863-8

¹⁹³ Zeeberg BR, Feng W, Wang G, Wang MD, *et al.* GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol* 2003;**4**:R28

La PCR (polymerase Chain Réaction) en temps réel, est une technique développée dans les années 90. Elle est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction et par conséquent à la quantité initiale de matrice.

La PCR en temps réel réalise le suivi de la fluorescence à chaque cycle contrairement à la PCR classique où les amplicons ne sont détectés qu'à la fin du processus. La fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité d'amplicons. Cette technique permet une analyse quantitative précise basée sur le concept de « cycle seuil (Ct) ». Ce cycle peut-être comparé aux Ct obtenus dans les mêmes conditions avec des concentrations connues d'amplicons (courbes standards) et permet ainsi de connaître le nombre de copies initiales du gène dans l'échantillon. Pour calibrer le système, les gènes d'intérêt ont été quantifiés par rapport à l'expression d'un gène « témoin », tel que la GAPDH. La différence d'expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) des gènes entre le tissu pathologique et le tissu sain a été calculée en utilisant la méthode du $\Delta\Delta Ct$, décrite ci-dessous :

$$R = \frac{\text{Eff}^{(\text{Ct contrôle}-\text{Ct échantillon})} \text{gène test}}{\text{Eff}^{(\text{Ct contrôle}-\text{Ct échantillon})} \text{gène de ménage}}$$

Eff = Efficacité de la PCR

2 - Méthode de la transcription « reverse »

C'est une technique qui permet à partir d'une séquence amorce spécifique du gène étudié (séquence Primer) de synthétiser par une enzyme, la Reverse Transcriptase, un brin d'ADN complémentaire à partir de l'ARN tissulaire extrait (tissu sain ou pathologique) dont on veut estimer la concentration. La quantité d'ADNc total obtenu dépend de la quantité d'ARN présent dans la cellule.

Les ADNc sont obtenus avec le kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) et suivant le protocole décrit figure n° 41.

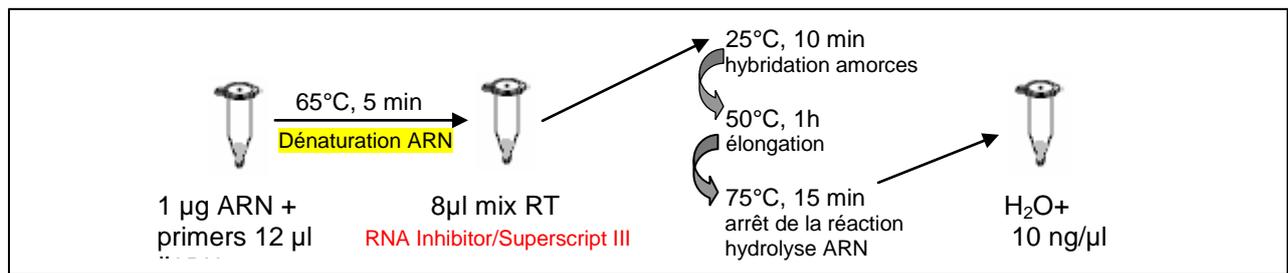


Figure n° 41: Protocole de synthèse des ADNc par la Reverse Transcriptase (RT).

3 - Quantitative – Polymerase Chain Reaction (Q – PCR)

Le mix de la PCR est préparé selon le protocole du kit SYBR Green QPCR Core Reagent Kit (Stratagene, La Jolla, CA), puis il est mélangé avec 2 µl d'ADNc à 10 ng/µl. Ensuite, le schéma général de la PCR se déroule pendant 40 cycles selon le schéma suivant :

- dénaturation des ADNc pendant 30 secondes à 95°C
- hybridation avec les primers pendant 30 secondes
- élongation à 72° C pendant 30 secondes où sont incorporés les fluorochromes (figure n° 42).

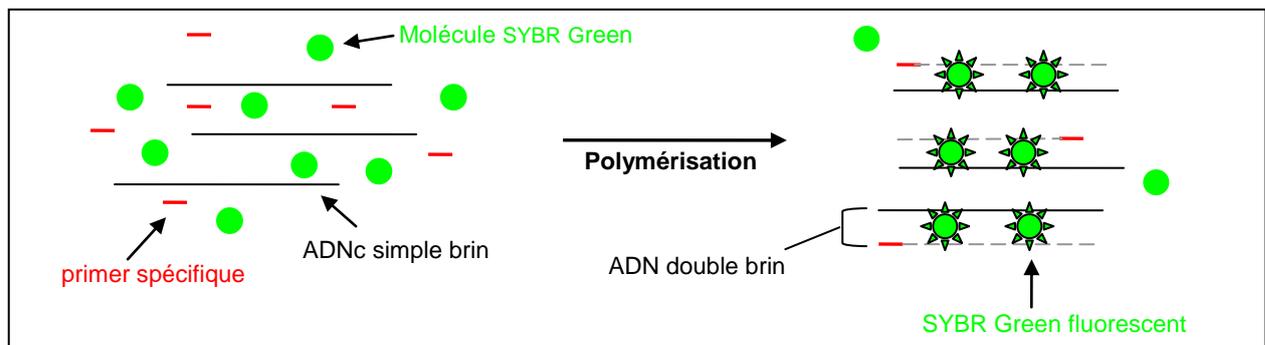


Figure n° 42 : méthode du SYBR Green

La fluorescence augmente de façon exponentielle en fonction du nombre de copies du gène (proportionnel à la quantité d'ARN initial dans la cellule) jusqu'à atteindre un plateau indiquant la diminution des réactifs et la présence d'inhibiteurs. Pour chacun des gènes, l'efficacité et la linéarité de la PCR sont vérifiées en effectuant des gammes standard de 20 à 10⁻³ ng d'ADNc.

Les échantillons d'ADN sont dénaturés 30 secondes à 95°C, l'hybridation s'effectue 30 secondes à une température définie par les primers utilisés et l'élongation se fait à 72°C

pendant 30 secondes. La fluorescence est mesurée à chaque cycle, elle est représentée sous forme d'un graphique donnant le log de la fluorescence en fonction du nombre de cycles (figure n° 43). Ce type de graphe permet d'obtenir le Ct (Cycle threshold) qui est le nombre de cycles minimum nécessaire pour que la fluorescence soit considérée significative (au dessus du bruit de fond). Le Ct dépend d'une limite arbitraire appelée Threshold.

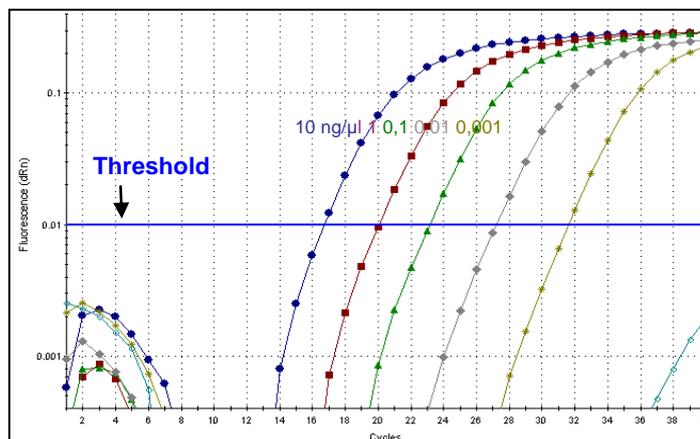


Figure n° 43 : Amplifications d'une gamme d'ARN Universel

La particularité de la Q-PCR avec le SYBR Green est qu'il est nécessaire d'effectuer une courbe de dissociation à la fin de la PCR. Pour ce faire, une nouvelle dénaturation est effectuée à 95°C (ADNc simple brin). La température est ensuite descendue à celle d'hybridation (ADNc double brin) puis elle augmente de 0,5°C toutes les 30 secondes jusqu'à atteindre 95°C. La fluorescence est mesurée à chaque cycle ce qui permet d'obtenir la courbe de dissociation de l'ADNc (figure n° 44), afin de mettre en évidence le Tm (Temperature melting), température à laquelle la majorité des brins de l'ADNc sont en simple brin. Ce Tm est spécifique du produit de PCR.

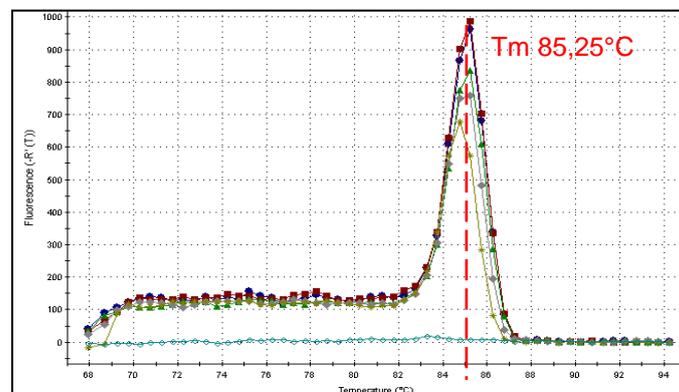


Figure n° 44 : Courbe de dissociation

Lors de chaque mise au point d'un gène, il est nécessaire de faire un gel afin de vérifier qu'un seul amplicon est obtenu et qu'il est à la taille attendue.

L'analyse des résultats se fait à partir d'une quantification relative des expressions des gènes d'intérêt en fonction des gènes de ménage RPLPO (Ribosomal Protein, Large, PO), UBC (Ubiquitine C), GAPDH (Glyceraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase), β -2 M (Beta-2 microglobuline). Cette quantification repose sur l'équation de Pfaffl¹⁹⁴ :

$$R = \frac{\text{Eff}^{(\text{Ct contrôle}-\text{Ct échantillon})} \text{ gène test}}{\text{Eff}^{(\text{Ct contrôle}-\text{Ct échantillon})} \text{ gène de ménage}}$$

Eff = Efficacité de la PCR

Ce ratio est calculé pour chaque patient en prenant le Ct du tissu « sain » comme contrôle et celui du tissu pathologique comme échantillon. Il représente le changement d'expression relative du gène test en fonction du gène de ménage, pris comme référence. Auparavant, le logiciel Best Keeper est utilisé pour s'assurer que l'expression des gènes de ménage utilisés ne varie pas significativement entre les échantillons. C'est le Best Keeper index (moyenne des Ct des gènes de ménage validés) qui est utilisé dans le calcul. Le logiciel REST a ensuite été employé afin de conclure, ou non, sur une différence d'expression significative de chaque gène¹⁹⁵.

C - Immunohistochimie

L'expression des protéines synthétisées par les gènes individualisés a été réalisée sur les extraits de tissus tumoraux et sains. Les extraits de tissus tumoraux des **26 patients** ont été fixés dans le formol et déparaffinés sur des sections de 5- μ m. Des anticorps monoclonaux dirigés contre la clusterine (clone CLI-9, Alexis Corporation Lausen, Switzerland, dilution au 1:500), l'acyl CoA synthetase 5 (ACS5) (Abnova, Jhongli City, Taiwan dilution au 1:200), la galectine-4 (Santa Cruz, Heidelberg, Germany, dilution au 1:500) ont été utilisés.

¹⁹⁴ Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in rel-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;**29**: e45

¹⁹⁵ Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;**30**:e36

L'analyse des résultats a été réalisée sur kit de détection spécifique EnVision Detection Kit (DAKOCYTOMATION, Trappes, France), sauf pour le marquage de LGALS4 réalisé avec le kit ABC VECTASTAIN Elite ABC Kit (Burlingame, CA). Les chromatogènes utilisés ont été la 3,3'-diaminobenzidine as chromatogène et le fixateur l'hématoxyline. Pour chaque mesure, des contrôles témoins négatifs ont été réalisés.

IV – RESULTATS

A - Extractions des ARNs des tissus sains et pathologiques

Les ARNs extraits à partir des 10 patients retenus pour les puces à ADN ont été quantifiés au NanoDrop® ND-1000 (tableau n° 34).

Tableau n° 34 : Quantifications des ARNs au NanoDrop® ND-1000

patient	Tissu	extraction 1	extraction 2
		C ¹ en ng/µl	C en ng/µl
2	S	7	N/A
	P	680	N/A
5	S	56	224
	P	59	87
6	S	31	130
	P	74	74
8	S	29	30
	P	65	165
9	S	179	71
	P	430	N/A
12	S	28	77
	P	98	23
14	S	54	24
	P	28	352
16	S	32	100
	P	157	N/A
10	S	113	540
	P	221	248
19	S	11	N/A
	P	414	N/A

¹ C : concentration. S : sain ; P : pathologique. N/A : Non Analysable

²Le patient 2 est exclu suite à une extraction insuffisante.

Les résultats ont été validés par la technique d'Agilent (figure n° 45).

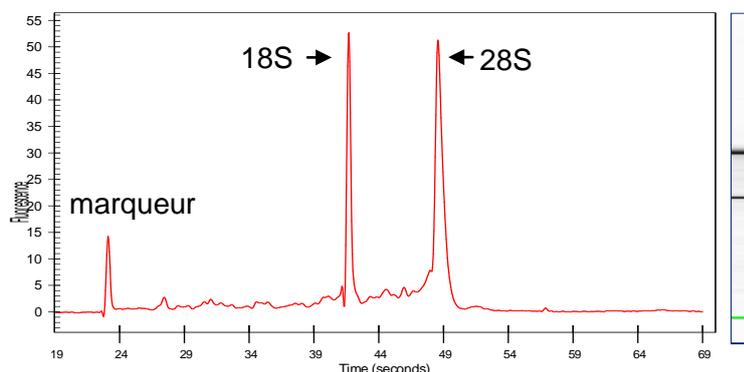


Figure n° 45 : méthode Agilent appliquée à l'extraction de ARN du patient 16, tissu pathologique : confirmation de la présence de fluorescence spécifique de l'ARN à 260 nm.

B - Puces à ADN

Sur les 6864 gènes présents sur les puces, nous avons obtenu 3114 gènes exploitables (environ 50 %) pour les deux types d'analyses.

1 - Analyses non supervisées

Nous avons utilisé le logiciel Cluster sur les 3114 gènes. Parmi les 10 patients inclus dans l'analyse des puces, 3 patients (2, 6, et 19) avaient un profil particulier sans famille de gène individualisable. Les sept autres patients (10, 16, 8, 12, 5, 9 et 14) avaient un profil individualisable avec des variations communes par groupes ou clusters de gènes.

Sur la figure n° 46 sont individualisés les gènes sur exprimés en rouge et les gènes sous exprimés en vert. le noir, indique aucune différence d'expression entre tissu pathologique et tissu sains. Il s'agit donc d'une cartographie de 3114 gènes, chaque ligne correspondant à l'expression d'un gène, chaque « colonne » au tissu tumoral (T) ou sain (S). A gauche de la figure (scanner), sont regroupés les résultats des fluorochromes des tissus pathologiques (T10, T16, T8, T12, T5, T9 et T14) et droite les résultats des tissus sains (S8, S5, S10, S16, S9, S12, S14). Le rouge indique un haut niveau d'expression de l'ARNm du gène dans l'échantillon comparé à la valeur moyenne de ce gène, le vert indique une sous-expression du gène, le noir une absence de différence d'expression entre tissu pathologique et

tissu sain. Au centre de la figure sont individualisés les clusters (groupes de gènes ayant une fonction cellulaire commune) et leur fonction. A droite de la figure sont précisés la fonction des gènes par cluster et le degré de significativité statistique des résultats (p-value).

Au total, cinq clusters ont été mis en évidence par cette méthode. 2 clusters indiquent une augmentation d'activité de gènes intervenant dans le cycle cellulaire et dans le métabolisme cellulaire des tumeurs par rapport aux tissus sains. Les 3 autres indiquent une diminution de la transcription, de l'activité des mitochondries, de la signalisation et de l'angiogénèse.

2 - Analyses supervisées (two classed paired analysis)

Les différentes combinaisons testées avec le logiciel SAM (Significance Analysis Microarray) ont amené à repérer 186 gènes dont l'expression est différente entre les tissus sains et les tissus pathologiques (150 sur exprimés, 36 sous exprimés). Sur ces 186 gènes, nous avons retenu ceux dont l'écart d'expression est > 1 ou < -1 en $\log(2)$.

Au total, 51 gènes avec une différence d'expression génétique significative entre tissu tumoral et tissu sain ont été mis en évidence : 14 gènes sous exprimés et 37 gènes sur exprimés. Le résultat a été contrôlé par les logiciels Cluster et TreeView (tableau n°35 et figure n°47).

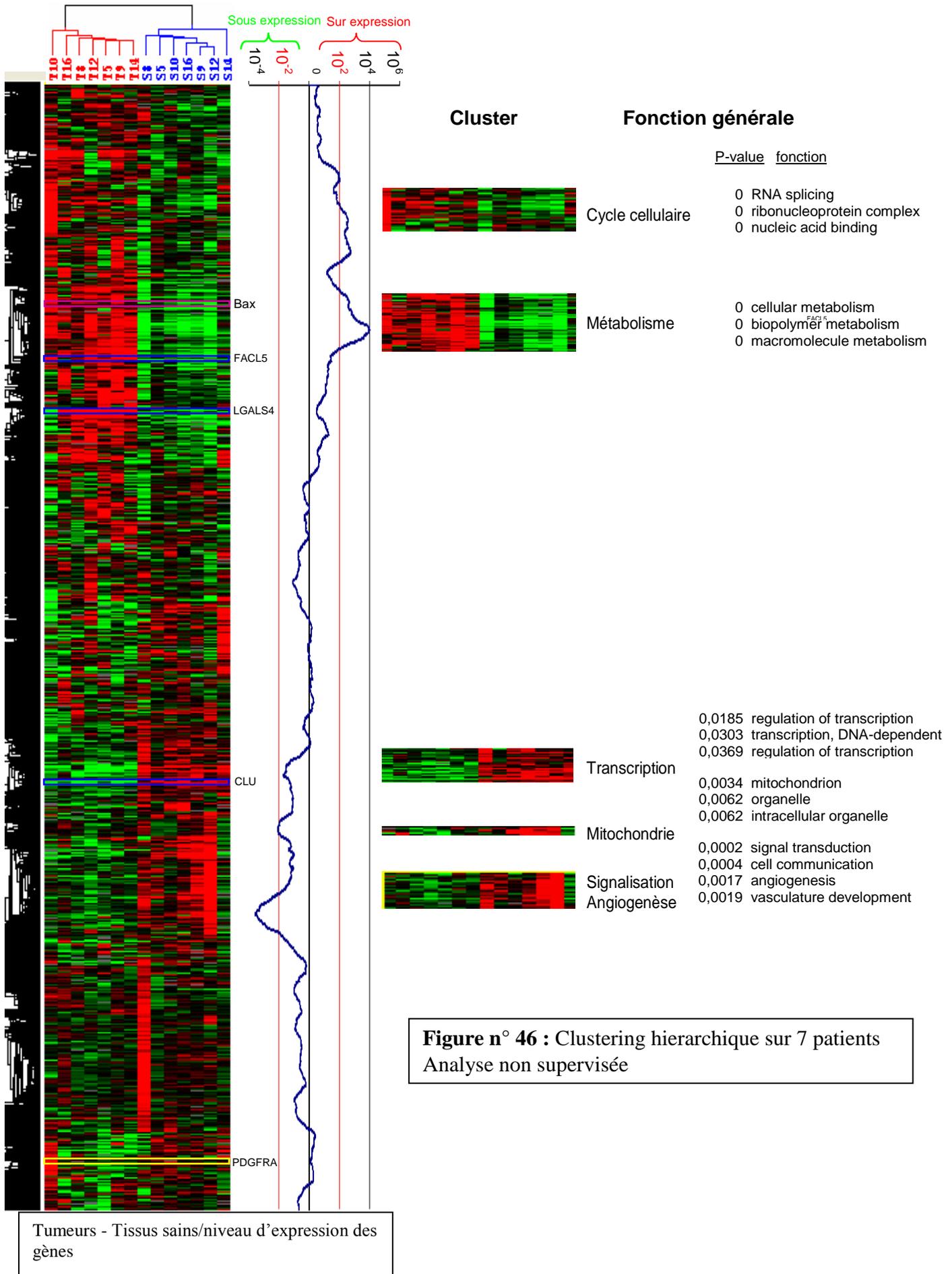


Tableau n° 35 : Résultats des puces à ADN : liste des 59 gènes significativement sur ou sous exprimés retrouvés par l'analyse supervisée (14 sous exprimés, 49 sur exprimés)

Numéro de gène	Gène Symbol	Gène	Fold change (log2)
Gènes hyper exprimés			
			3,084
NM_006149	LGALS4	lectin, galactoside-binding, soluble, 4 (galectin 4)	
NM_016234	ACS5	fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 5	2,621
NM_001845	COL4A1	Collagen, type IV, alpha 1	1,779
NM_002228	JUN	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	1,758
NM_001816	CEACAM8	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8	1,732
NM_001122	ADFP	adipose differentiation-related protein	1,628
XM_067746		similar to 60 kDa heat shock protein, mitochondrialprecursor (Hsp60) (60 kDa chaperonin) (CPN60) (Heat shock protein60) (HSP-60)	1,617
NM_004591	CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	1,560
BC000097	TGFB1	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	1,493
NM_000393	COL5A2	Collagen, type V, alpha 2	1,461
NM_003130	SRI	sorcin	1,456
NM_001153	ANXA4	annexin A4	1,434
NM_005566	LDHA	lactate dehydrogenase A	1,416
NM_005563	STMN1	stathmin 1/oncoprotein 18	1,414
NM_017958	PLEKHB2	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 2	1,409
XM_092196		similar to Cytochrome c, somatic (LOC164837), mRNA.	1,387
AF112214	MRPL13	mitochondrial ribosomal protein L13	1,370
AJ250915	HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	1,346
BC003623	YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	1,342
NM_006111	ACAA2	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)	1,335
NM_021821	MRPS35	mitochondrial ribosomal protein S35	1,329
NM_002592	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	1,319
NM_001827	CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	1,278
AB062125	TPM3	tropomyosin 3	1,224
NM_016245	DHRS8	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 8	1,206
NM_001226	CASP6	caspase 6, apoptosis-related cysteine protease	1,194
NM_004670	PAPSS2	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	1,172
XM_088293		similar to cytochrome c (LOC157317), mRNA.	1,164
NM_001428	ENO1	enolase 1, (alpha)	1,145
XM_060849		similar to cytochrome C, expressed in somatic tissues(LOC128146), mRNA.	1,133
AF135381	CKLF	chemokine-like factor	1,133
X84907	ENO1	enolase 1, (alpha)	1,121
NM_005720	ARPC1B	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa	1,114
NM_021130	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	1,110
NM_001288	CLIC1	chloride intracellular channel 1	1,095
BC015130	CYCS	cytochrome c, somatic	1,081
NM_012255	XRN2	5'-3' exoribonuclease 2	1,068
M34664	HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	1,066
AF054185	PSMA7	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7	1,044
NM_006601	TEBP	inactive progesterone receptor, 23 kD	1,037
Gènes sous exprimés			
NM_001831	CLU	clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)	-3,606
NM_005978	S100A2	S100 calcium binding protein A2	-2,152
S68290	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1 ; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	-2,102
NM_003713	PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B	-1,966
AB000889	PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B	-1,936
NM_001321	CSRP2	cysteine and glycine-rich protein 2	-1,916
NM_006485 /	FBLN1	fibulin 1	-1,799
AF007162	CRYAB	crystallin, alpha B	-1,590
NM_002825	PTN	pleiotrophin (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)	-1,405
NM_001063	TF	transferrin	-1,256
NM_004186	SEMA3F	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F	-1,246
NM_000424	KRT5	keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types)	-1,207
AF059617	PLK2	polo-like kinase 2 (Drosophila)	-1,186
NM_005596	NFIB	nuclear factor I/B	-1,149
NM_006206	PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	-1,090
NM_005900	MADH1	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 1 (Drosophila)	-1,047

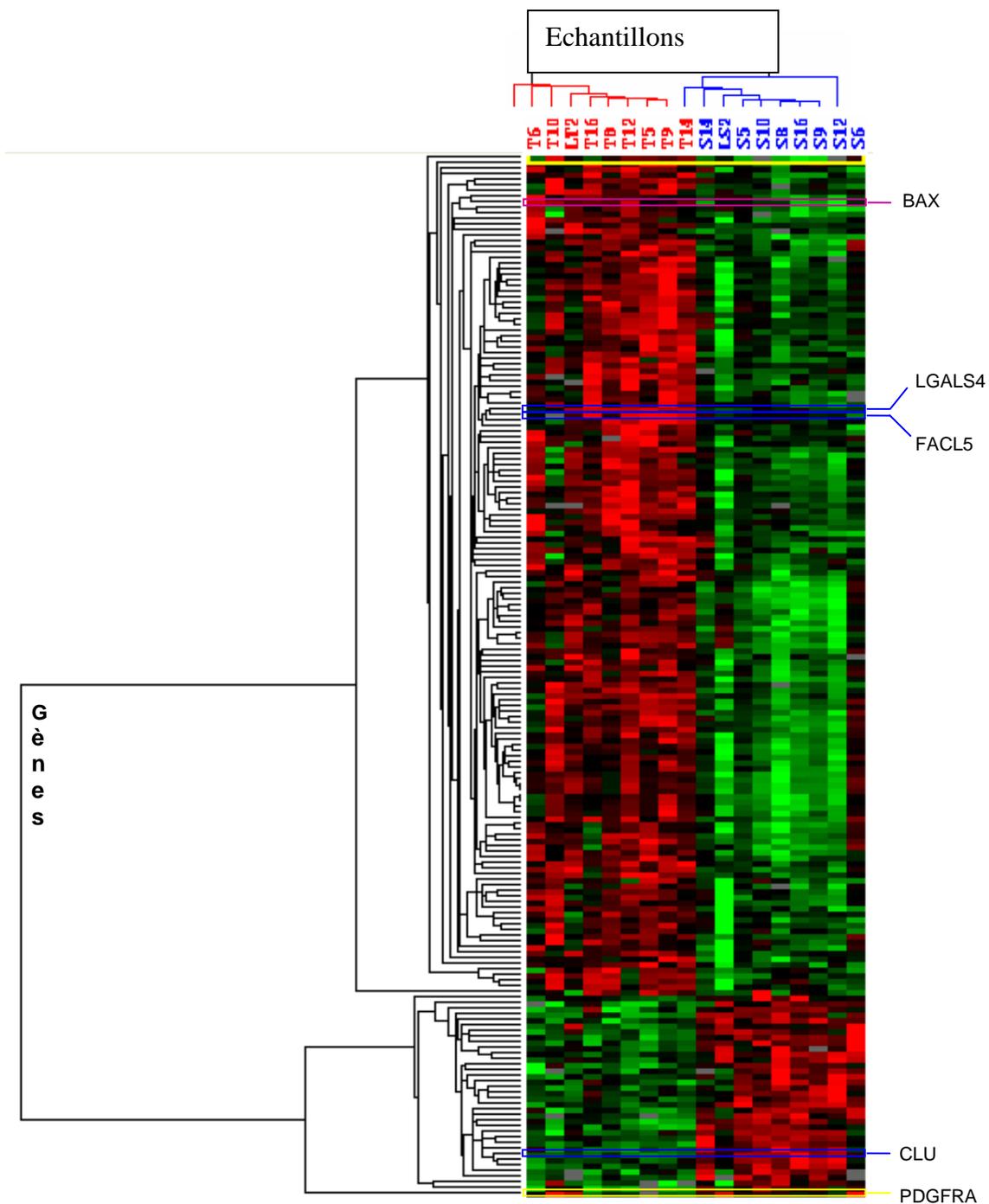


Figure n° 47 : Résultats du logiciel SAM avec TreeView concernant les 9 patients ayant bénéficié de puces à ADN : P5, P6, P8, P9, P10, P12, P14, P16, P19 (LT2, LS2 = P19).

S = tissus sains

T = tissus tumoraux

■ : gènes sous exprimés

■ : gènes sur exprimés

C - RT-QPCR

Les résultats des puces à ADN, nous ont amené à valider 5 gènes par la technique Q-RTPCR.

➤ D'abord 2 des gènes plus différenciellement exprimés ont retenu notre attention car il s'agit de gènes codant pour des protéines de surface cellulaire (matrice extracellulaire avec fonctions d'adhésion). Il s'agit de :

- *LGALS4* (*Galectine 4*), un composant majeur des membranes résistantes aux détergents (DRM) qui joue un rôle sur l'adhésion cellulaire.

- *CLU* (*Clusterine*) intervient aussi dans de nombreux processus biologiques comme le cycle cellulaire et semble participer au phénomène d'apoptose.

➤ Trois autres gènes ont retenu notre attention car ils interviennent soit dans le cycle cellulaire, soit dans l'apoptose, soit dans les phénomènes d'angiogénèse :

- *FACL5* (*Fatty Acyl CoA Ligase, long chain 5*) participe au métabolisme des acides gras (dégradation) et des lipides (biosynthèse) et contribue à la prolifération cellulaire.

- Le gène *BAX* semble sur exprimé dans nos tumeurs, or on connaît son rôle favorisant l'apoptose dans la cellule normale.

- Enfin, *PDGFR α* (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor, Alpha polypeptide*) a été mis en évidence en testant les patients exposés au bois contre les non exposés au bois. Il est surtout connu pour participer à la signalisation intracellulaire et à l'angiogénèse dans les cellules tumorales.

Les figures n° 48 et n°49 montrent les ratios des expressions de l'ARNm des gènes sélectionnés des tissus tumoraux des 15 patients dont l'ARN a pu être extrait après utilisation des tissus pour la technique des puces à ADN.

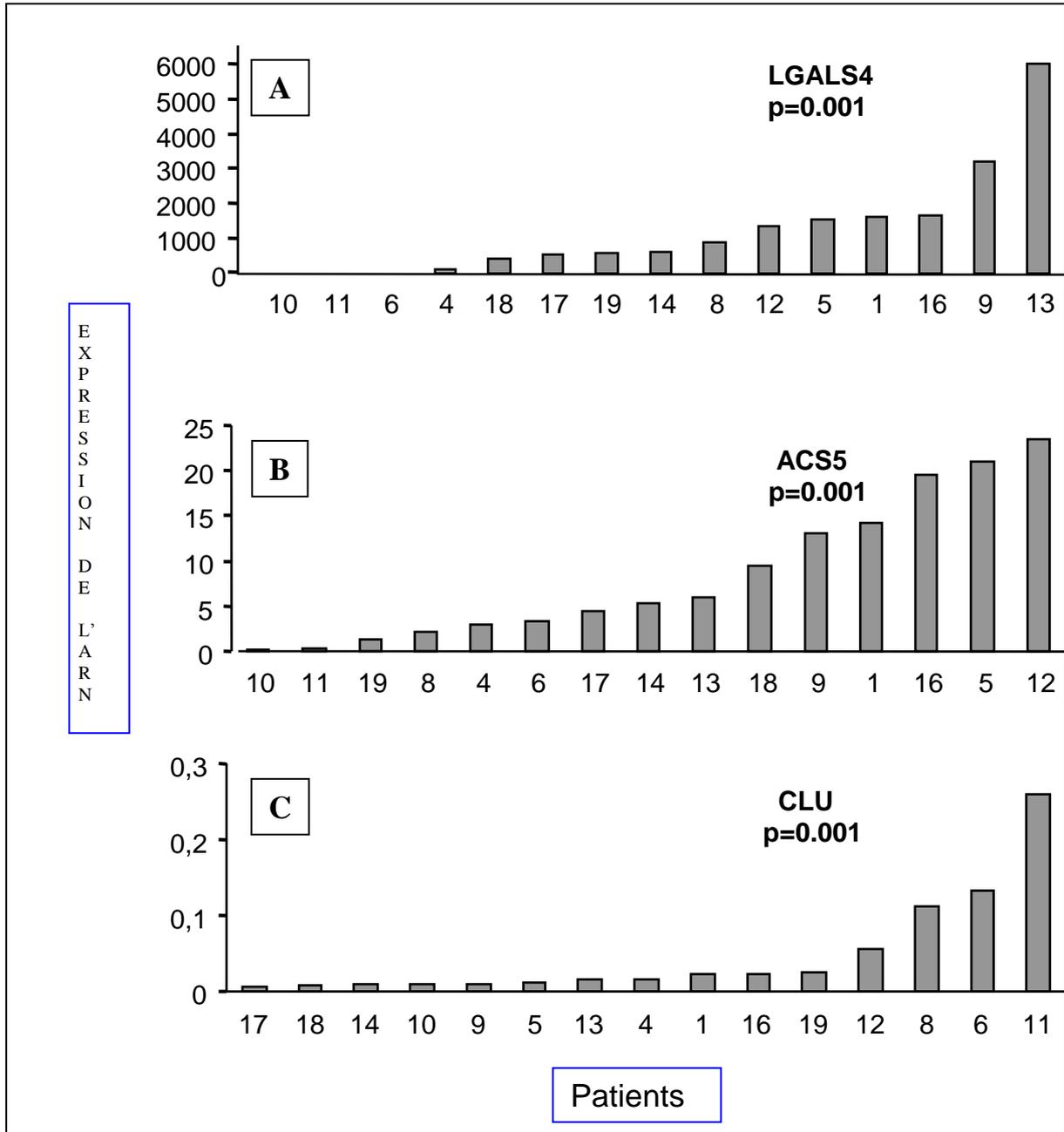


Figure n°48: Résultats obtenus par RT-QPCR pour les gènes *galectine (LGALS4)*, *Fatty Acyl Coenzyme A Ligase(ACS5)*, et *Clusterine(CLU)*.

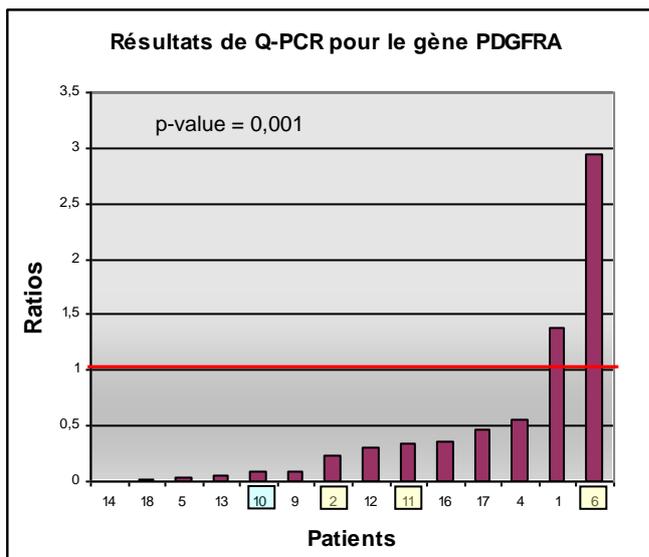
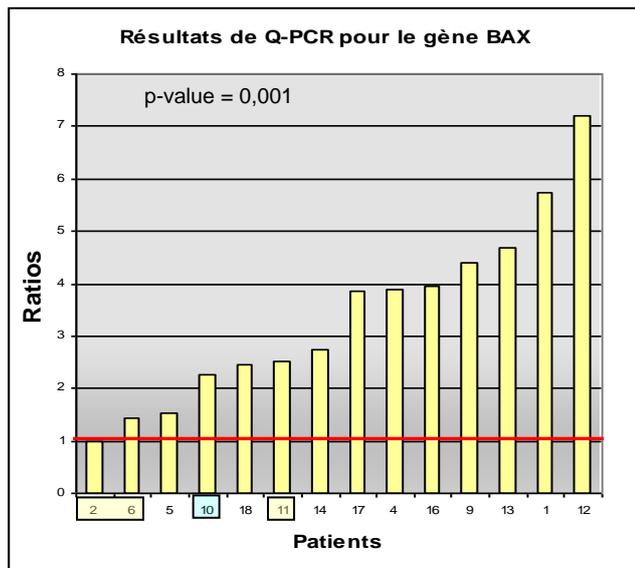


Figure n° 49 : Résultats obtenus par RT-QPCR pour les gènes *bax* et *PDGFR*.

Les gènes *LGALS4* et *FACL5* sont très fortement exprimés avec des ratios compris entre $56,3 < R < 2862,6$ et $1,8 < R < 21$ respectivement mais sont sous-régulés pour le patient 10 et le patient 11.

Le gène *CLU* est sous-exprimé dans toutes les tumeurs de l'ethmoïde ($0,005 < R < 3,214$).

Les variations d'expression des gènes *bax* et *PDGFRα* sont moins importants, toutefois, il y a une sur expression de *bax* ($0,98 < R < 7,21$) et une sous-expression de *PDGFRα* ($0,00 < R < 2,93$).

D - Confirmation des résultats par immunohistochimie

Afin de confirmer nos résultats à l'échelle protéique, une étude immunohistochimique ciblée sur les protéines galectine, clusterine et ACS5 a été réalisée sur les 26 tissus. L'ensemble des lames a bénéficié d'une relecture : 24 adénocarcinomes sont de type intestinal (ITAC) dont 7 de type « papillaire », 2 de type « colique », 8 de type « mucineux », 7 de type « mixte » et 2 adénocarcinomes ont été qualifiés de type non intestinal, tous deux de haut grade (tableau n° 36, figures n° 50 et n° 51).

Tableau n° 36 : Résultats du marquage par anticorps monoclonaux

Patients	Résultats de l'histologie	CLU	FACL5	GALECTINE
1	ADK ITAC mixte (papillaire et mucineux)	-	-	+++
2	ADK ITAC mucineux	-	-	+++
3	ADK ITAC mucineux	-	-	+++
4	ADK ITAC colique	-	+	+++
5	ADK ITAC mixte (colique et solide)	-	++	-/+++
6	ADK ITAC mucineux	-	+	+++
7	ADK ITAC mucineux	-	-	+++
8	ADK ITAC mucineux	-	-	+++
9	ADK ITAC mixte (papillaire et mucineux)	-	+++	+++
10	ADK non ITAC de haut grade	-	-	-
11	ADK non ITAC de haut grade	+++ (cytoplasme)	++	-
12	ADK ITAC papillaire	-	+++	+++
13	ADK ITAC mucineux	-	-	+++
14	ADK ITAC papillaire	-	-	+++
15	ADK ITAC mucineux	-	-	+++
16	ADK ITAC mixte (papillaire et mucineux)	-	++	+++
17	ADK ITAC papillaire	-	++	+++
18	ADK ITAC papillaire, colique et mucineux	+ (nucléaire focal)	+	+
19	ADK ITAC mucineux	-	+	+++
20	ADK ITAC mixte (colique et mucineux)	+ (nucléaire focal)	+	+++
21	ADK ITAC mixte (papillaire et mucineux)	-	-	+++
22	ADK ITAC papillaire	-	-	+++
23	ADK ITAC mixte (papillaire et colique)	-	-	+++
24	ADK ITAC colique	-	+++	++
25	ADK ITAC papillaire	+ (nucléaire focal)	+	+++
26	ADK ITAC mucineux	-	-	+++

Marquage des protéines clusterine et Fatty Acyl CoA enzyme Ligase 5 (FACL5)

Marquage sur tissu sain

- + marquage cytoplasmique focal au niveau de rares glandes
- ++ marquage cytoplasmique multifocal au niveau de quelques glandes
- +++ marquage cytoplasmique de la majorité des glandes
- NR non représentatif (peu ou pas de glande au niveau de la muqueuse normale)

Résultats sur tissu tumoral

+ , ++ , +++ selon intensité du marquage cytoplasmique
marquage parfois uniquement nucléaire avec la clusterine

Marquage de la protéine galectine 4

Résultats sur muqueuse normale

+ : faible marquage cytoplasmique au niveau de quelques glandes séreuses, des canaux et parfois apical en surface, ++ : marquage plus intense de même topographie

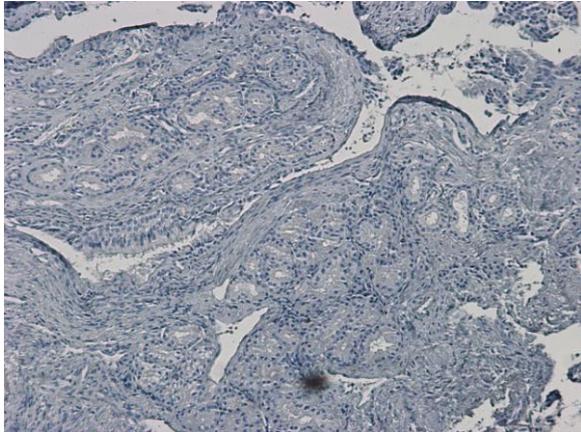
Résultats sur tissu tumoral

Marquage cytoplasmique à renforcement membranaire avec marquage nucléaire dans les ADK bien différenciés et pas de marquage nucléaire dans les mucineux et les tissus moins bien différenciés.

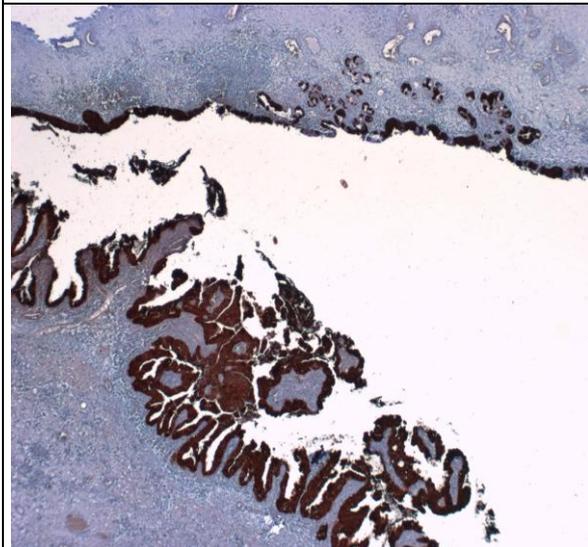
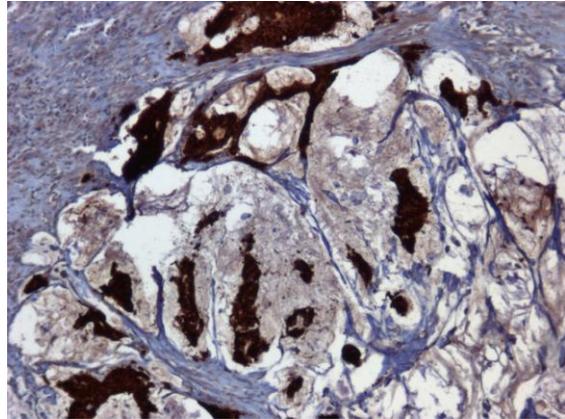
+ , ++ , +++ selon intensité du marquage

Figure n° 50 : Résultats du marquage par anticorps monoclonaux spécifiques anti-galectine

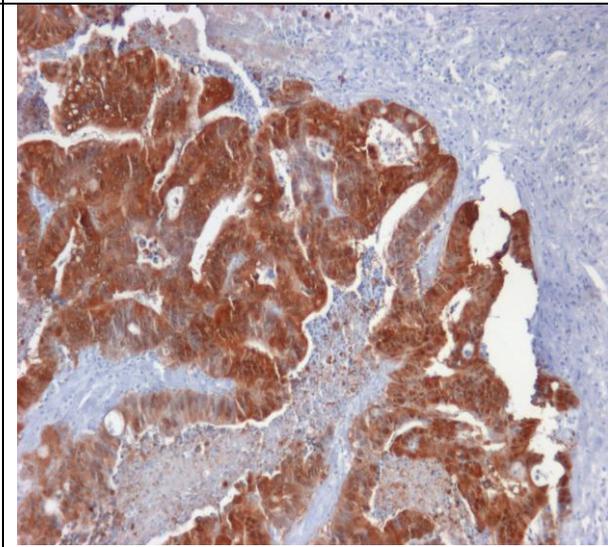
Marquage par anticorps monoclonaux sur la galectine : absence ou faible marquage.



Marquage de la galectine sur tissu tumoral ethmoïdal : marquage cytoplasmique.

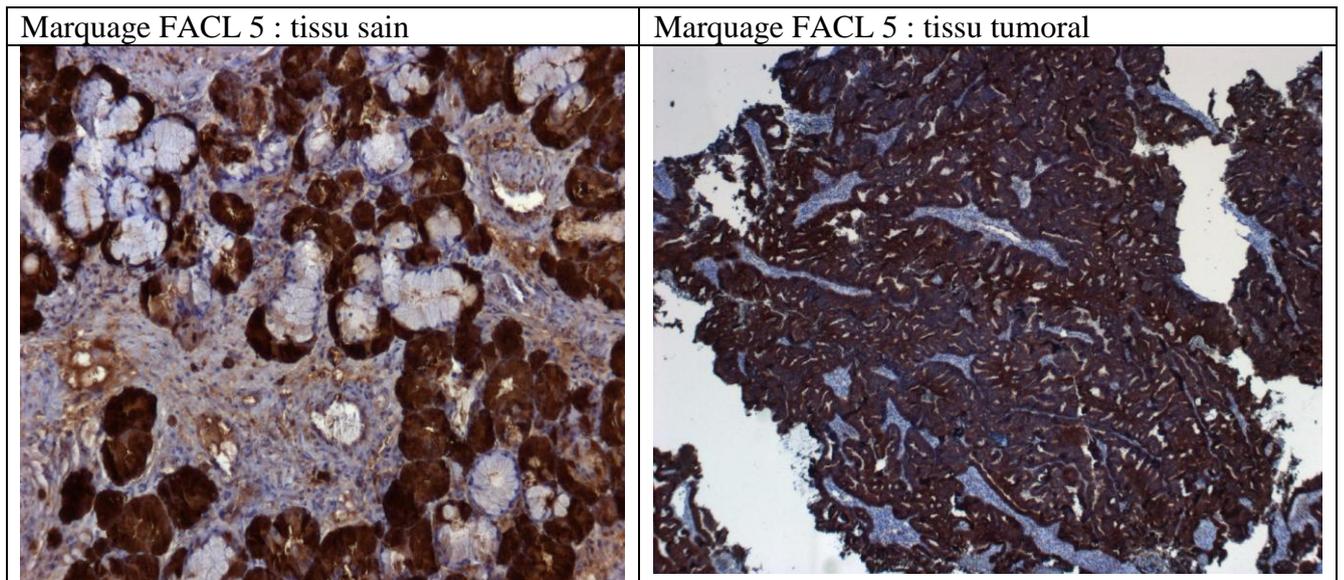
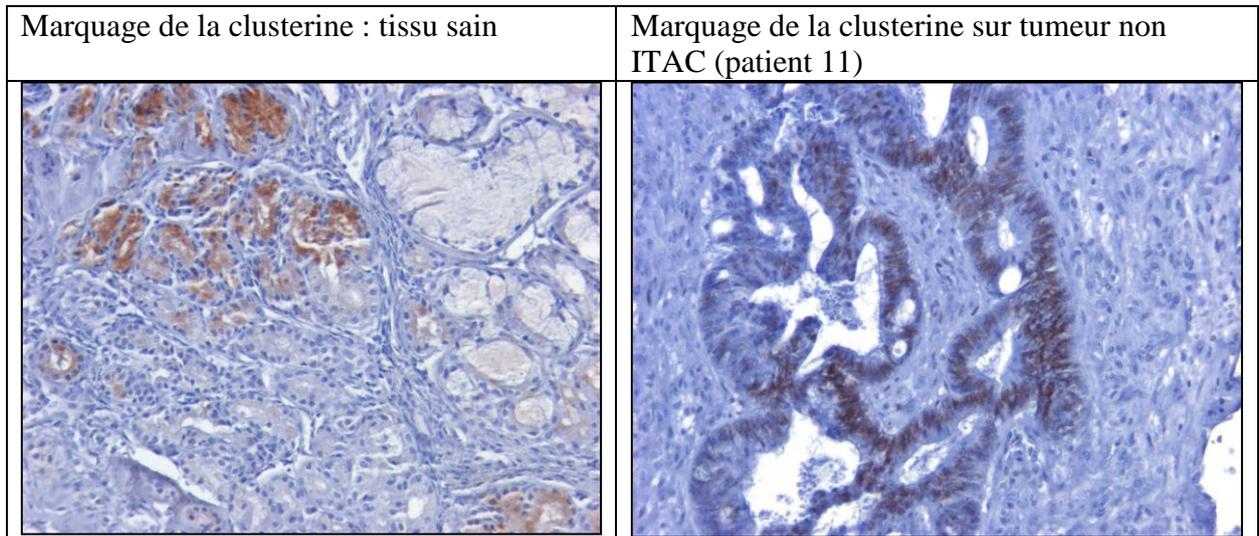


Adénocarcinome de l'éthmoïde : marquage de surface par les anticorps anti- galectine sur dysplasie de muqueuse.



Immunohistochimie sur tissu tumoral ethmoïdal : marquage cytosolique et renforcement membranaire.

Figure n° 51 : Résultats du marquage de la clusterine et FACL5 par anticorps monoclonaux spécifiques



E – Recherche d’une corrélation entre exposition à des facteurs environnementaux, survie et expression des marqueurs tumoraux

L’analyse statistique conduite sur les 26 sujets inclus n’a pas mis en évidence de corrélation entre survie et facteurs environnementaux. De même aucune corrélation entre les niveaux d’expressions de la galectine, de la clusterine, et de FACL5 n’a été trouvée avec l’exposition aux facteurs environnementaux ou la survie. A noter toutefois que le nombre de patients était faible.

V – DISCUSSION

Cette étude est la première à mettre en évidence deux marqueurs, détectables par immunohistochimie et qui pourraient jouer un rôle dans l’oncogénèse des adénocarcinomes de l’ethmoïde. Ces marqueurs pourraient ainsi être utilisés pour développer un test de dépistage précoce de l’adénocarcinome de l’ethmoïde à l’attention des salariés exposés.

Puces à ADN

La méthode des puces à ADN est originale dans le sens où nous n’avons pas trouvé dans la littérature d’étude de ce type appliquée aux adénocarcinomes de l’ethmoïde. Nous avons montré dans l’ introduction que deux gènes avaient été analysés jusqu’ici dans ce type de tumeur : Ras et p53 pour lesquels des mutations avaient été décrites mais avec un taux de fréquence inférieur à ce que l’on décrit dans le cancer du colon. Dans notre étude nous n’avons pas mis en évidence de modification d’expression significative de ces deux gènes.

Notre étude **non supervisée** a montré des groupes de gènes (clusters) qui étaient dérégulés :

- 2 clusters avec une augmentation d’activité :gènes intervenant dans le cycle cellulaire et dans le métabolisme cellulaire,
- 3 clusters avec une diminution de l’activité transcriptionnelle gènes de l’activité mitochondriale, de la signalisation et de l’angiogénèse.

Il eut été intéressant de comparer ces résultats avec la survie des patients afin de voir si ces trois clusters étaient liés à un meilleur pronostic. Ceci nécessitait d’avoir un échantillon plus large de sujets. Dans l’analyse non supervisée, deux patients ne

répondaient pas aux clusters : P6 et P19. Cela peut-être dû aux RNA totaux extraits non représentatifs de la tumeur ou à une « voie moléculaire » différente .

L'analyse **supervisée** quant à elle a mis en évidence 36 gènes significativement sous exprimés et 130 sur exprimés. Nous avons constaté que ceux-ci sont différents des gènes retrouvés dans les publications concernant les cancers ORL^{196,197,198} probablement en raison des caractéristiques histologiques et épidémiologiques différentes de ces tissus : carcinomes (épithéliomas) malpighiens étroitement liés à une forte consommation en alcool et tabac.

Nous avons constaté dans notre étude rétrospective que le pronostic vital dans les tumeurs de type ITAC est de 64% en survie spécifique ce qui est proche des résultats de l'étude du GETTEC. Ceci est supérieur à la survie des cancers ORL en général qui est estimée à 50% à cinq ans. Notre analyse non supervisée a montré 3 clusters qui indiquent une diminution de l'activité de transcription, de l'activité de signalisation et de l'angiogénèse. Ceci peut expliquer le meilleur pronostic de ces tumeurs mais cela nécessiterait confirmation sur de plus grandes séries. L'analyse supervisée va dans le sens de ces résultats en montrant une sur expression de *bax* qui favorise l'apoptose, et l'absence de sur expression de *PDGFR α* , récepteur cellulaire impliqué dans la croissance cellulaire par activation des tyrosines kinases intracellulaires.

Q – RTPCR et IHC

Suite à l'analyse par les puces à ADN, nous avons donc sélectionné 3 gènes d'intérêt avec un profil sur exprimé (*galectine*, *Fatty Acyl Co Enzyme A Ligase*, *Bax*) et deux avec un profil sous exprimé (*clusterine*, *PDGFR α*). Ces résultats ont été globalement confirmés en Q-RTPCR (15 patients) .

L' immunohistochimie réalisée pour LGALS4, FACL5 et CLU (26 patients) a clairement confirmé la forte expression de la galectine 4 dans les tumeurs et l'absence d'expression pour la clusterine. Pour FACL5 la sur-expression n'était pas consistante dans toutes les tumeurs.

¹⁹⁶ Alevizos I, Mahadevappa M, Zhang X, Ohyama H, *et al.* Oral cancer in vivo gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis. *Oncogene* 2001;**20**:6196-204

¹⁹⁷ Belbin TJ, Singh B, Barber I, Succi N, *et al.* Molecular classification of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays. *Cancer Res* 2002;**62**:1184-90

¹⁹⁸ Hwang D, Alevizos I, Schmitt WA, Misra J, *et al.* Genomic dissection for characterization of cancerous oral epithelium tissues using transcription profiling. *Oral Oncol* 2003;**39**:259-68

Le gène *LGALS4* a été retrouvé très fortement exprimés en Q-RTPCR avec des ratios compris respectivement entre 56,3<R<2862,6 sauf pour les patients P10 P11 pour lesquels aucun marquage n'a été retrouvé par immunohistochimie contrairement à tous les autres patients. Concernant le patient 10, il n'avait pas d'exposition professionnelle à un risque toxique puisqu'il avait occupé durant sa carrière un poste à la commission des permis de conduire, et, il n'avait pas non plus d'exposition au tabac, ou d'exposition extraprofessionnelle connue. L'histologie était de type non ITAC ce qui est concordant avec les données de la littérature¹⁹⁶. Le patient 11 était menuisier-ébéniste exposé 43 ans aux poussières de bois et sa tumeur était aussi très peu différenciée et qualifiée non ITAC. Ces résultats sont en faveur d'une corrélation de *LGALS4* avec le type histologique et la différenciation. l'desdénocarcinomes de l'ethmoïde..

Galectines

Le rôle des galectines est complexe à définir. La famille des galectines comprend 12 protéines différentes (LGAL S1 à LGAL S12). Les galectines sont de petites protéines solubles secrétées dans le cytosol, comprenant deux sous unités ou homodimères de 35 kDa. Chacune des sous-unités possède une affinité ou un domaine de reconnaissance pour le β galactose. Elles sont trouvées aussi bien dans le noyau, le cytoplasme, la surface cellulaire et le milieu extracellulaire dans l'ensemble des épithéliums du tractus digestif. Les propriétés biochimiques des galectines sont bien connues mais leurs fonctions in vivo ne sont pas clairement élucidées¹⁹⁷. Les études réalisées sur des cellules en culture suggèrent qu'elles participent à des processus aussi divers que la croissance cellulaire, l'apoptose, ou encore l'adhérence cellulaire. Les gènes des galectines ont été localisés sur le chromosome 1 (*LGALS8*), (*LGALS12*), le chromosome 17 (*LGALS9*), et le **chromosome 19** (*LGALS4*) sur des segments situés à la même hauteur par rapport au centromère¹⁹⁸.

La protéine galectine S4 est principalement exprimée dans le tractus gastro-intestinal des mammifères. Cest un monomère qui comprend deux sites de fixation pour des

¹⁹⁶ Franchi A, Santucci M, Wenig B. Adenocarcinoma. In: Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D (eds) - World Health Organisation classification of tumours. Pathology and genetics of head and necks tumours. Lyon: IARC; 2005:20-3

¹⁹⁷ Huflejt ME, Leffler H. Galectin-4 in normal tissues and cancer. *Glycoconj J* 2004;**20**:247-55

¹⁹⁸ Houzelstein D, Gonçalves IR, Fadden AJ, Sidhu SS, *et al.* Phylogenetic Analysis of the Vertebrate Galectine Family. *Mol Biol Evol* 2004;**21**:1177-87

carbohydrates. Ces deux sites sont reliés par un peptide. Les galectines S4 ont la propriété d'avoir une haute affinité pour les glycosphingolipides sulfatés et le groupement N-acétylgalactosamine ($\text{SO}_3^-3\text{Gal}\beta_1-3\text{GalNAc}$ pyranoside). Stechly L. *et al.* ont récemment démontré que la galectine S4 régule le transport des glycoprotéines du cytosol vers la membrane cellulaire des entérocytes normaux. Ces auteurs ont démontré que cette activité est plus marquée sur les lignées cellulaires tumorales de type colique (HT-29 colon carcinoma cells)¹⁹⁹. Leur particularité est de se lier aux chaînes de type β galactosides mais elles pourraient aussi se lier aux sphingolipides et à l'antigène carcinoembryonnaire exprimé dans le cancer du colon²⁰⁰.

Dans certains cancers, les galectines S4 sont hyper exprimées notamment le cancer épithélial de l'ovaire de type mucineux²⁰¹, et certaines lignées cellulaires de tumeurs du colon notamment celles qui sont très différenciées (cellules T84)²⁰². La *galectine* a été trouvée sur exprimée dans les tumeurs de type carcinoïde du poumon, de l'estomac et du rectum par la méthode utilisant les anticorps monoclonaux²⁰³. Dans ces études l'expression de la *galectine* est corrélée avec le degré de différenciation des tumeurs, nos résultats vont dans le même sens. On peut donc retenir que l'hyper expression de la galectine 4 sur la membrane cellulaire en ferait un bon marqueur de dépistage comme cela avait déjà été suggéré par Heinzelmann-Schwarz *et al.* en 2006²⁰⁴.

Dans notre étude, nous avons mis en évidence un marquage cytoplasmique de la galectine avec marquage nucléaire et renforcement membranaire dans les adénocarcinomes de l'etmoïde bien différenciés. En revanche, nous n'avons pas mis en évidence de marquage nucléaire dans les adénocarcinomes de type mucineux et les tissus moins bien différenciés. Ce marquage a été confirmé sur un tissu de type dysplasique. Nos résultats plaident donc pour le

¹⁹⁹ Stechly L, Morelle W, Dessein F, André S, *et al.* Galectin-4-Regulated Delivery of Glycoproteins to the Brush Border Membrane of Enterocyte-Like Cells. *Traffic* 2009;**10**:438-50

²⁰⁰ Ideo H, Seko A, Yamashita K. Galectin-4 binds to sulfated glycosphingolipids and carcinoembryonic antigen in patches on the cell surface of human colon adenocarcinoma cells. *J Biol Chem* 2005;**280**:4730-7

²⁰¹ Heinzelmann-Schwarz VA, Gardiner-Garden M, Henshall SM, Scurry JP, *et al.* A distinct molecular profile associated with mucinous epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2006;**94**:904-13

²⁰² Huflejt ME, Jordan ET, Gitt MA, Barondes SH, *et al.* Strikingly different localization of galectin-3 and galectin-4 in human colon adenocarcinoma T84 cells. Galectin-4 is localized at sites of cell adhesion. *J Biol Chem* 1997;**272**:14294-303

²⁰³ Rumilla KM, Erickson LA, Erickson AK, Lloyd RV. Galectin-4 expression in carcinoid tumors. *Endocr Pathol* 2006;**17**:243-9

²⁰⁴ Heinzelmann-Schwarz VA, Gardiner-Garden M, Henshall SM, Scurry JP, *et al.* A distinct molecular profile associated with mucinous epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2006;**94**:904-13

développement possible d'une technique de dépistage par frottis nasal avec recherche de ce marqueur de surface.

Dans le cadre d'une application de ce marqueur dans une méthode de dépistage, il est intéressant de noter dans notre étude l'absence de marquage de la galectine dans les adénocarcinomes de l'ethmoïde de type non ITAC car ceux-ci ne sont pas liés à l'exposition aux poussières de bois comme nous l'avons explicité dans la deuxième partie de la Thèse.

Il est intéressant de constater dans notre étude que le marquage de la galectine en IHC et fortement positif (+ + +) pour l'ensemble des patients classés T2 dans la classification TNM sauf pour les patients 18 (+) et 24 (+ +), ceci doit nous inciter à le proposer comme marqueur précoce, après validation sur des tissus précancéreux.

Lefranc F *et al.* ont recherché en utilisant un modèle de Cox si l'hyper expression de la *galectine 4* était de mauvais pronostic. Ils ont réalisé une étude immunohistochimique avec marquage par anticorps monoclonaux, tel que nous l'avons réalisé, sur 37 patients présentant des craniopharyngiomes de type malpighien (sous-type papillaire). Ils ont montré que l'hyper expression de la *galectine* signait un mauvais pronostic²⁰⁵. Dans notre étude, nous n'avons pas trouvé de lien entre l'expression de nos marqueurs tumoraux et la survie de nos patients.

Fatty Acyl Coenzyme Ligase 5

Les Fatty Acyl Coenzyme Ligases sont des enzymes cellulaires participant au métabolisme des acides gras. Elles transforment les chaînes d'acide gras en esters d'acyl-CoA. Leur localisation est ubiquitaire dans l'organisme humain mais on les trouve majoritairement dans le tractus intestinal au niveau des villosités de l'intestin grêle. Il existe plusieurs isoenzymes qui toutes participent à la synthèse des lipides et à la dégradation des acides gras. L'isoenzyme FACL5 est fortement exprimée dans l'utérus, et la rate et à bas niveau dans le cerveau de manière physiologique.

²⁰⁵Lefranc F, Mijatovic T, Decaestecker C, Kaltner H, *et al.* Monitoring the expression profiles of integrins and adhesion/growth-regulatory galectins in adamantinomatous craniopharyngiomas: their ability to regulate tumor adhesiveness to surrounding tissue and their contribution to prognosis. *Neurosurgery* 2005; **56**:763-76

Son expression est diminuée dans les adénomes et adénocarcinomes de l'intestin grêle²⁰⁶, et est augmentée dans les gliomes²⁰⁷ et les adénocarcinomes bien différenciés de l'endomètre²⁰⁸.

Dans notre étude la surexpression dans les tumeurs, initialement identifiée par les puces et la QPCR n'a pas été confirmée en IHC pour cette protéine. Elle ne peut donc être retenue comme un marqueur en vue d'un dépistage précoce de l'adénocarcinome de l'ethmoïde.

Clusterine

La sous expression de la *clusterine* a été confirmée dans tous nos tissus tumoraux par la Q-RT-PCR ($0,005 < R < 3,214$). Ceci a été confirmé par l'absence ou la baisse de marquage en IHC sur l'ensemble de nos tissus tumoraux comparativement aux tissus sains.

Le seul cas faisant exception est le patient 11 chez qui on a trouvé l'expression la plus haute en PCR et un marquage cytoplasmique en IHC.

La clusterine est une glycoprotéine sulfatée retrouvée dans de nombreux tissus. Elle aurait un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN^{209, 210}.

Le gène de la *clusterine* est localisé sur le **chromosome 8p21**²¹¹. Elle a été décrite hyper exprimée dans le cancer du sein et des poumons, sous exprimée dans les cancers de l'œsophage, du pancréas, de la prostate. Concernant le cancer du colon les résultats semblent contradictoires. Certaines équipes mettent en évidence une sur expression de la *clusterine* dans les cancers coliques²¹² tandis que Pucci *et al.* montrent dans des cellules de cancer du colon une sous expression de la *clusterine* sauf dans les tumeurs de haut grade avec

²⁰⁶ Gassler N, Schneider A, Kopitz J, Schnolzer M, *et al.* Impaired expression of acyl-CoA-synthetase 5 in epithelial tumors of the small intestine. *Hum Pathol* 2003;**34**:1048-52

²⁰⁷ Yamashita Y, Kumabe T, Cho YY, Watanabe M, *et al.* Fatty acid induced glioma cell growth is mediated by the acyl-CoA synthetase 5 gene located on chromosome 10q25.1-q25.2, a region frequently deleted in malignant gliomas. *Oncogene* 2000;**19**:5919-25

²⁰⁸ Gassler N, Yang SH, Keith M, Helmke BM, *et al.* Expression of acyl-CoA synthetase 5 in human endometrium and in endometrioid adenocarcinomas. *Histopathology* 2005;**47**:501-7

²⁰⁹ Shannan B, Seifert M, Boothman DA, Tilgen W, *et al.* Clusterin and DNA repair: a new function in cancer for a key player in apoptosis and cell cycle control. *J Mol Histol* 2006;**37**:183-8

²¹⁰ Shannan B, Seifert M, Leskov K, Willis J, *et al.* Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ* 2006;**13**:12-9

²¹¹ Fink TM, Zimmer M, Tschopp J, Etienne J *et al.* Human clusterin (CLI) maps to 8p21 in proximity to the lipoprotein lipase (LPL) gene. *Genomics* 1993;**16**:526-8

²¹² Xie D, Sham JS, Zeng WF, Che LH, *et al.* Oncogenic role of clusterin overexpression in multistage colorectal tumorigenesis and progression. *World J Gastroenterol* 2005;**11**:3285-9

métastases²¹³. Andersen et al. montrent une sous expression dans 75% les tumeurs rectocoliques qu'ils analysent et une sur expression dans 25% des autres cas²¹⁴.

Il semble en fait qu'il existe deux isoformes de la clusterine dont l'une, hautement glycosylée, cytosolique aurait un rôle de chaperone pour aider à récupérer et éliminer les protéines dénaturées. L'autre isoforme serait située dans le noyau cellulaire et serait pro-apoptotique sous l'effet d'un stress cellulaire. Yang *et al* ont montré sur des cellules de souris (« MCF cells ») par des techniques d'immuno Western blot que la sécrétion de la clusterine encore appelée protéine apoJ pouvait être induite par l'action des rayons X (Rayons X, 10 grays) trois jours après irradiation²¹⁵.

Par ailleurs, certaines études ont fait l'hypothèse que la dérégulation de la *clusterine* était lié au stress induit par la chirurgie, car son expression était augmentée après chirurgie^{216,217}. Kloskov *et al.* ont aussi montré que la synthèse de la clusterine était provoquée par l'exposition de cellules humaines ou de cellules de souris exposées à de faibles doses de rayonnements ionisants (0,02 à 0,5 Gray). Les auteurs concluent qu'il s'agit d'un phénomène adaptatif de la cellule qui reste à expliquer²¹⁸.

Han JH^a a démontré un lien entre l'effet carcinogène d'un toxique professionnel et la clusterine. Il a évalué sur un modèle animal (le rat) l'effet d'une administration répétée de styrène pendant 5 jours. L'expression de 120 gènes choisis arbitrairement et pouvant intervenir dans la cancérogenèse a été évaluée par RTQPCR. Il a mis en évidence une hyper expression de 5 gènes (*protéine kinase C*, *caséine kinase*, *H⁺ -ATPase vacuolaire*, *peroxiredoxine 1*, *aquaporine 9*) et une inhibition de la *clusterine*. Il démontre qu'on ne trouve pas de modification de l'expression de la clusterine dans les organes du rat tels que le foie, le cœur, les poumons et le rein. En revanche, elle est sous exprimée dans les cellules de

²¹³ Pucci S, Bonanno E, Pichiorri F, Angeloni C, *et al.* Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis. *Oncogene* 2004;**23**:2298-304

²¹⁴ Andersen CL, Schepeler T, Thorsen K, Birkenkamp-Demtroder K, *et al.* Clusterin expression in normal mucosa and colorectal cancer. *Mol Cell Proteomics* 2007;**6**:1039-48

²¹⁵ Yang CR, Yeh S, Leskov K, Odegaard E, *et al.* Isolation of KU70-binding proteins (KUBs). *Nucleic Acids Res* 1999;**27**:2165-74

²¹⁶ Zhang LY, Ying WT, Mao YS, He HZ, *et al.* Loss of clusterin both in serum and tissue correlates with the tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via proteomics approaches. *World J Gastroenterol* 2003;**9**:650-4

²¹⁷ Hsieh SY, Chen WY, Shih TC, Yeh JY, *et al.* Dys-regulation of clusterin in human hepatoma is not associated with tumorigenesis but is secondary to cell response to external stresses. *Mol Carcinog* 2005;**43**:100-7

²¹⁸ Klokov D, Criswell T, Leskov KS, Araki S, *et al.* IR-inducible clusterin gene expression: a protein with potential roles in ionizing radiation-induced adaptive responses, genomic instability, and bystander effects. *Mutat Res* 2004;**568**:97-110

Sertoli, les stéréocils des tubules séminifères et dans l'acrosome. Il conclut que la clusterine, glycoprotéine des membranes cellulaires, pourrait jouer un rôle dans la défense contre les agressions extérieures.

Dans notre étude, la *clusterine* est exprimée dans le cytoplasme et parfois dans le noyau dans les cellules saines, elle est sous exprimée pour toutes les tumeurs de type ITAC et non ITAC en Q-RTPCR. En immunohistochimie on ne retrouve pas de marquage sauf pour le patient 11 (sujet non-ITAC avec tumeur de haut grade), on peut donc supposer qu'elle intervient, dans les mécanismes de défense contre les agents agresseurs environnementaux, sa non expression pourrait être liée à la progression de la cellule tumorale. Par ailleurs, Ariza *et al.* ont montré des pertes sur le chromosome 8, porteur du locus de la clusterine, chez les sujets atteints d'adénocarcinome de l'ethmoïde²¹⁹.

Limites de l'étude

Une limite essentielle de notre étude est le faible nombre de patients inclus. Seuls 9 sujets ont bénéficié des puces à ADN. Toutefois la validation des résultats a pu être faite sur des sets indépendants de tumeurs et tissus sains. La seconde limite relève du choix des puces dédiées qui n'analysent pas l'ensemble des gènes humains. A l'époque il y avait un engouement pour ce type de puces, qui pourraient apporter des réponses plus rapides que les puces pangénomiques. Compte tenu des progrès dans le domaine des puces, notamment sur la reproductibilité interlaboratoire, la question de l'utilisation des puces pangénomiques ne se posent plus. Néanmoins nous avons démontré la faisabilité de ce type d'analyse sur les adénocarcinomes de l'ethmoïde et avons réussi à identifier deux bio-marqueurs potentiels.

²¹⁹ Ariza M, Llorente JL, Alvarez-Marcos C, Baragano L, *et al.* Comparative genomic hybridization in primary sinonasal adenocarcinomas. *Cancer* 2004;**100**:335-41

VI – CONCLUSION DE LA 4^{ème} PARTIE

Dans le cadre du développement d'un test de diagnostic précoce par **frottis nasal**, le **marquage par anticorps monoclonaux anti-galectine S4 et anti-clusterine peut être proposé**, ce d'autant que nous avons constaté sur un tissu présentant une dysplasie un marquage positif à la galectine. Il serait opportun d'y associer la recherche de micronoyaux ou de comètes sur les cellules de la muqueuse nasale, qui préciseraient la présence de lésions chromosomiques ou de lésions de l'ADN. Le test des adduits de l'ADN, quant à lui serait utile afin de confirmer notre hypothèse d'action des cancérigènes du bois.

Nous pouvons faire ici l'hypothèse d'un déséquilibre entre mécanisme de défense physiologique, ici, représenté par les protéines de surfaces favorisant l'adhésion cellulaire de type clusterine qui seraient réprimées sous l'action de facteurs agressifs exogènes* (il faut ici noter la forte **ressemblance de conformation stéréochimique entre les métabolites du benzène formant des adduits et la 2-6 méthoxy 1-4 benzoquinone constituant du bois** figures n° 52 à n° 55) et d'autre part la mise en place dans nos cellules agressées de réponses adaptées nous aidant à la défense contre l'agent externe, représenté ici par la sur expression de la *galectine S4*.

Afin d'étayer ces hypothèses, il conviendrait de valider nos résultats sur une série plus importante, et d'effectuer des études moléculaires fonctionnelles complémentaires. Après mise au point de lignées cellulaires, des tests *in vitro* pourraient être réalisés sur cultures cellulaires ethmoïdales afin de mesurer l'effet des cancérigènes.

Figure n° 52 : formule du 2-hydroxy 1,4-benzoquinone**métabolite du benzène formant des adduits* (voir aussi figure n°10, page 51 de la thèse).

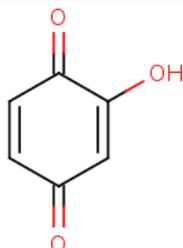


Figure n° 53 : formule de la 2-6 méthoxy 1-4 benzoquinone* *constituant du bois*

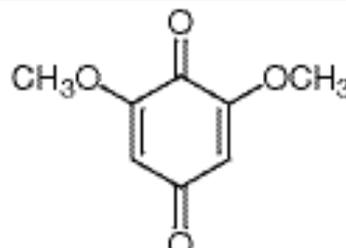


Figure n° 54 : formule du styrène*

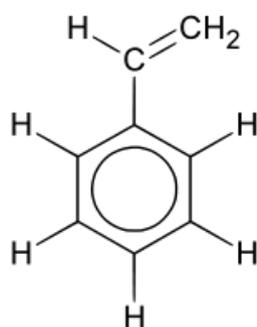


Figure n° 55 : formule de l'acide tannique*

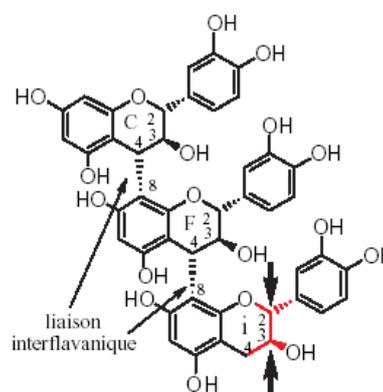


Figure n° 52-55 : L'ensemble des ces composés est formé de noyaux cycliques comportant des doubles liaisons avec des électrons « délocalisables » leur conférant un caractère nucléophile et une capacité à se lier sur l'ADN aux atomes d'azote de la guanine électrophiles.

Cinquième partie : article

Les résultats de mes travaux ont été présentés le 19 novembre 2008 en communication orale de la SFP – Carrefour de Pathologie – Paris (Maison de la Chimie) et publiés dans les Annales de Pathologie :

Renaudin K, Tripodi D, Quéméner S, Ferron C, Malard O, Beauvillain de Montreuil C, Delene C, Gérard C, Gratas Rabbia C. Galectine 4, Clusterine et Acyl-CoA synthetase : biomarqueurs impliqués dans l'oncogenèse des adénocarcinomes de l'ethmoïde. Annal. Pathol. Nov 2008 HS n°1 –28S143.

L'article suivant a été soumis aux revues :

- Cancer Research en août 2008,
- International Journal Cancer en septembre 2008,
- Actuellement il est soumis à la revue BMC Medical Genomics.

Gene expression profiling in sinonasal adenocarcinoma

Dominique Tripodi^{*.1,2,§}, Sylvia Quémener^{*.1}, Karine Renaudin^{3,4}, Christophe Ferron⁵, Olivier Malard⁵, Isabelle Guisle Marsollier⁶, Véronique Sébille-Rivain⁷, Christian Verger⁸, Christian Géraut², and Catherine Gratas-Rabbia-Ré^{1,9}

1- Inserm, UMR 892, Nantes, F-44093, France; Université de Nantes, UFR Médecine et Techniques Médicales, Nantes, F-44000, France

2- Service de Médecine du Travail et des Risques Professionnels, CHU de Nantes, Nantes, F-44093, France

3- Service d'Anatomie Pathologique, CHU de Nantes, , Nantes, F-44093, France

4- Université de Nantes, UFR Médecine et Techniques Médicales, EA Biométadys, Nantes, F-44093, France

5- Service ORL, CHU de Nantes, , Nantes, F-44093, France

6- Université de Nantes, UFR Médecine et Techniques Médicales, Plateforme Puces à ADN-OGP, Nantes, F-44000, France

7- Université de Nantes, UFR Médecine et Techniques Médicales, Laboratoire de Biomathématiques-Biostatistiques, Nantes, F-44000, France

8- Consultation des Pathologies Professionnelles, CH Hôtel-Dieu, , Rennes, F-35000, France

9- Service de Biochimie, CHU de Nantes, Nantes, F-44093, France

* These authors contributed equally to this work

§ Corresponding author

Email addresses: DT: dominique.tripodi@chu-nantes.fr
SQ: sylvia.quemener@chu-brest.fr
KR: karine.renaudin@chu-nantes.fr
CF: christophe.ferron@chu-nantes.fr
OM: olivier.malard@chu-nantes.fr
IGM: Isabelle.Guisle@nantes.inserm.fr
VSR: veronique.sebille@univ-nantes.fr
CV: christian.verger@univ-rennes1.fr
CG: christian.geraut@univ-nantes.fr
CGR: catherine.gratas@chu-nantes.fr

Abstract

Background

Sinonasal adenocarcinomas are uncommon tumors developing in ethmoid sinus after wood dust exposure. Although the etiology of these tumors is well defined very little is known regarding the molecular basis of these tumors and no diagnostic tool exists for an early detection in high-risk workers.

Methods

To identify genes involved in this disease we performed a gene expression profiling using cancer-dedicated microarrays, on nine matched samples of sinonasal adenocarcinomas and non-tumoral sinusal tissue. Microarrays results were validated by quantitative RT-PCR and immunohistochemistry on two additional set of tumors.

Results

Among the genes with significant differential expression we selected *LGALS4*, *ACS5*, *CLU*, *SRI* and *CCT5* for further exploration. The overexpression of *LGALS4*, *ACS5*, *SRI* and *CCT5* and the downregulation of *CLU* were confirmed by quantitative RT-PCR. Immunohistochemistry was performed for *LGALS4* (galectin 4), *ACS5* (acyl-CoA synthetase) and *CLU* (clusterin) proteins: *LGALS4* was highly up-regulated, particularly in the most differentiated tumors, while *CLU* was lost in all tumors. Regarding *ACS5* the expression was more dispersed and we did not find any correlation with the tumor type.

Conclusions

Within our microarray study in sinonasal adenocarcinoma we identified two proteins, LGALS4 and CLU with significant differential expression in tumors versus normal tissue. A further evaluation on a new set of tissues including precancerous stages and low grade tumors is necessary to evaluate the possibility of using them as diagnostic markers.

Background

Sinonasal adenocarcinoma is a rare cancer, usually developing in ethmoid sinuses, mainly in men between 30 and 85 years with a high frequency around 60 years old. Incidence rate was estimated by IARC (International Agency for Research on Cancer) from 0.7/100 000 in China to 1.4/100 000 in USA and 1.5/100 000 in France, and represents 3% of head and neck tumors [1, 2]. This cancer is recognized as an occupational cancer. Indeed it is well confirmed today that sinonasal adenocarcinoma is highly correlated with duration and level (3.5 mg/m^3) of wood dust exposures [3, 4] therefore the woodworkers have very elevated risks of nasal cancer (Standard Mortality Ratio: 310, **95% CI**, 160-560) [5, 6]. Other suspected risk factors include leather dust exposure [7, 8], metals such as chromium or nickel [9, 10] and formaldehyde although epidemiological data regarding this chemical are partially conflicting [4, 11]. Alcohol and tobacco do not seem to interact with the development of these tumors in contrast to most of the head and neck cancers [12]. Although the etiology of sinonasal adenocarcinoma is well-defined the wood pathogenesis is not clearly known [13]. On a morphohisto-pathological aspect these tumors are mainly intestinal-type adenocarcinomas [14, 15] and demonstrate typical changes, such as gland formation, seen in adenocarcinomas at other anatomic sites. The most common clinical symptoms (nosebleed, rhinitis, nasal obstruction) are not specific and this explains the delay in the diagnostic and the frequency of

advanced stages. The conventional treatment include local surgery [16] associated with radiotherapy. A survival rate of 5 years is only about 50% and it is important to point out that secondary effects are not negligible due to the location of these tumors [17]. Therefore early detection and alternative treatments are necessary. This requires however, better knowledge of the molecular mechanisms involved in the development of these tumors. Although many reports on epidemiological studies and risk factors of sinonasal adenocarcinomas have been published, only few reports have been made so far on the molecular biology of these tumors. As reviewed recently by Llorente *et al.* [13] several groups proceeded to molecular studies of sinonasal adenocarcinomas however they focused on specific genes, such as *ERBB1*, *CCND1*, *ERBB2*, *TP53*, *K-ras*, *COX-2* or *APC*, involved either in other head and neck tumors or in colorectal cancer because of morphological similarities [13, 18, 19]. Two groups reported comparative genomic hybridization in ethmoid sinus adenocarcinomas and revealed hot spots of chromosomal imbalances [20-22]. As well global genetic modifications (micronuclei and chromosomal aberrations) were found in buccal epithelial cells and blood lymphocytes of wood furniture workers [23]. The conclusion of all these investigations is that ethmoid sinus adenocarcinomas have their own molecular development pathway.

Therefore to identify genes involved in this pathway, we made, for the first time to our knowledge, a gene expression profiling of 9 sinonasal adenocarcinomas versus their matched normal tissue and found 186 genes with significant differential gene expression. The further evaluation by reverse-transcription quantitative real-time-PCR (qRT-PCR) and immunohistochemistry (IHC) of several selected genes, on two additional validation samples, confirmed the microarray data. We then opened the field of biomarkers in this tumor type and identified two promising candidates genes: *LGALS4* and *CLU*.

Methods

Subjects

Twenty six patients were included in our study. A first set of 19 males patients, undergoing surgery for ethmoid sinus adenocarcinomas were initially included between 2004 and 2006. Then a second set of 7 patients collected from 2006 to 2007 was used to complete the immunohistochemistry study.

All patients consented to participate in this project approved by the Clinical Board of the Centre Hospitalo-Universitaire de Nantes and signed an informed consent according to French regulations and to the Declaration of Helsinki. All patients answered a codified questionnaire regarding occupational exposures, addictives consumptions and family history. Twenty three out of the 26 patients were exposed to wood dusts and most of them had other occupational exposures (solvents, pesticides) sometimes combined with tobacco and/or alcohol. Two patients were exposed to leather dust (P7, P19) while only one (P10) had no occupational exposure (Table1). Ages ranged from 50 to 80 years with a mean age of 69 years. At the present time, six patients have died of their disease (Table1).

Tissue specimens

Two pieces of tissue samples were obtained from each patient undergoing surgery for ethmoidal adenocarcinoma: one in the tumor and one, non-tumoral, in the opposite sinus at 3 to 4 cm distance (this tissue will be called “normal” in the following text). All samples were immediately frozen and stored at -80°C. Remaining surgical resections of tumors and normal tissue were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin before histological examination and diagnosis according to World Health Organization recommendations [24]. Two main types of sinonasal adenocarcinoma are recognized in the ethmoid sinus based on the histological similarity to adenocarcinoma of the intestine: Intestinal Type Adenocarcinoma (ITAC) and non-Intestinal Type Adenocarcinoma (non-ITAC). ITAC can be further divided

into five categories [15, 25]: the “papillary-type” (well-differentiated adenocarcinoma), the “colonic-type” (moderately-differentiated adenocarcinoma), the “solid-type” (poorly-differentiated adenocarcinoma), the “mucinous-type” and the “mixed-type” composed of a mixture of the previously defined patterns. Non-ITAC are divided into low-grade and high-grade subtypes.

RNA extraction

On each matched normal and pathological tissue specimens from patients P1 to P19 two RNA extractions were performed from about 40 frozen sections (10 µm thick) using Total RNA and Protein Isolation kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer’s instructions. For each sample, the first and last sections were stained with hemalun/phloxin to confirm the histology and to evaluate the percentage of tumoral tissue. We had to eliminate 10 samples for microarrays analysis because of necrosis or too low percentage of non-necrotic tumoral tissue (less than 50%). Six out of these ten patients were included in the validation process by qRT-PCR as this technique is more sensitive than microarrays to identify tumoral cells within a sample. The other samples were completely excluded from the molecular analysis (Table 1).

The quantity and quality of each RNA were respectively evaluated with the NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) and the Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent, Santa Clara, CA). The RNAs extracted were of good quality and the RNA integrity number (RIN) was >7.5 in all cases [26].

RNA amplification and microarray hybridization

Cancer-dedicated microarrays were prepared in-house (Plateforme Puces à ADN-OGP-Nantes, France) with methods previously described in detail [27, 28] using 22,175 probes sets (50-mer oligonucleotides - MWG Biotech, Roissy, France) interrogating 6,864 genes involved in different types of tumors. These microarrays therefore included probes in triplicate for each gene, housekeeping genes and controls.

For microarray analysis one round of amplification was conducted on 500 ng total RNA using Amino Alkyl MessageAmpTMII aRNA Amplification kit (Ambion, Austin, TX) according to the manufacturer's instructions and the quantity and quality of each amplified RNA (aRNA) were again evaluated. Microarrays were done in duplicate for both RNA extractions of each tissue except for two patients as enough RNA was not available. The targets were prepared by labelling with Cy3-dUTP aRNA from the tumoral and normal tissues. In order to have less individual variations the reference was prepared by mixing equal quantity of all normal tissues [29, 30] and aliquots were then labelled with Cy5-dUTP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Each Cy3-dUTP sample was mixed with a Cy5-dUTP reference sample in equal amount and the mixture was applied on a microarray slide for hybridization at 40°C for 16 h [27]. The slides were then washed at room temperature 2 x 2 min with SSC 2X and SDS 0,1%, 2 min with SSC 1X, and 2 x 2 min with SSC 0,2X and scanned at 10µm/pixel resolution by ScanArray®ExpressHT (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA).

Microarray data analysis

Scanned signals were quantified from all microarrays by GenePix Pro software version 5.1 (Axon Instruments, Union City, CA) and consolidated expression values were done by MADSCAN software following five steps [30, 31]. Extraction of information was done from

the features close to the background or saturated and normalization was performed by the rank invariant and lowest fitness method with spatial normalization. Outliers values were eliminated with the spots in triplicates and biological replicates. To identify genes differentially expressed in tumor samples, we did a two-class comparison analysis by Significance Analysis of MicroArray (SAM) [32] on data filtered by differences between normal and pathological tissues medians as previously described [30] and we visualized genes with differential expression using Cluster [33] and Tree view [31]. An unsupervised clustering was also done with a hierarchical clustering algorithm [33] using Pearson coefficient and Student test. The clusters of genes with the same regulation were functionally annotated by GoMiner [34].

Data incorporated into the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>) are accessible through GEO Series GPL 7683 and (in process) .

cDNA synthesis and real-time PCR (qRT-PCR)

To confirm the microarray data we performed quantitative RT-PCR on selected genes using the MX4000 system and the Brilliant SYBR Green QPCR Core Reagent Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Initially cDNA was prepared in 20 μ l using 1 μ g of DNase-treated total RNA and the SuperScript III Reverse Transcriptase System (Invitrogen, Carlsbad, CA). Following a 5 fold dilution, 2 μ l of each sample were used for qRT-PCR with the different pairs of primers (Additional file 1: “Primers sequences”). The following PCR cycle parameters were used: hot-start DNA polymerase activation 95°C for 10 min, 40 cycles with denaturation at 95°C for 30 sec, specific annealing temperature as indicated in “Additional file 1: Primers sequences” for 30 sec and extension at 72°C for 30 sec. Each reaction was run in duplicate. The threshold cycles, obtained from the MX4000 software, were averaged (SD<0.5). Relative

expression of the target gene in tumor versus matched normal tissue was calculated according to the following equation described by Pfaffl [35], using the average Ct of three housekeeping genes: *RPLPO* (Ribosomal Protein, Large, PO), *UBC* (Ubiquitin C) and *β2M* (beta-2 microglobuline):

Relative expression for one patient and one gene:

$$R = \frac{\text{Eff GOI}^{(\text{Ct Normal tissue} - \text{Ct tumoral tissue})}}{\text{Eff HK}^{(\text{Ct normal tissue} - \text{Ct tumoral tissue})}}$$

GOI = gene of interest

HK = housekeeping gene (average of Ct of the three housekeeping genes).

Eff = efficiency of the qRT-PCR obtained from the standard curve

Statistical significance was obtained using a pair-wise fixed reallocation randomization test using the REST software [36]. To insure specificity of the qRT-PCR an agarose gel electrophoresis was initially performed to verify that a single PCR product was generated and then a melting curve was done at the end of each qRT-PCR. Linearity and efficiency of the qRT-PCR were checked for each gene with standard curve of 4 logs prepared with Universel RNA (Stratagene-AGILENT, CA). Efficiencies were in all cases >90%.

Immunohistochemical analysis

Protein expression of selected genes was assessed in deparaffinized 5-μm sections of normal and pathological formalin-fixed tissue of 26 patients with sinonasal adenocarcinomas included in the study. We used the following antibodies: monoclonal antibody against human Clusterin (clone CLI-9, Alexis Corporation Lausen, Switzerland, 1:500 dilution), monoclonal antibody against human acyl CoA synthetase 5 (ACS5) (Abnova, Jhongli City, Taiwan 1:200 dilution at 4°C overnight), polyclonal antibody against galectin-4 (T-20) (Santa Cruz, Heidelberg, Germany, 1:50 dilution). All specimens were submitted to heat-induced antigen retrieval and processed using the EnVision Detection Kit (DAKOCYTOMATION, Trappes,

France), except for *LGALS4* processed using ABC VECTASTAIN Elite ABC Kit (Burlingame, CA), with 3,3'-diaminobenzidine as chromagen and an hematoxylin counterstain. In each experiment, negative controls were performed by omitting the primary antibody.

Results

Microarray analysis

We examined gene expression profiles of 9 ethmoid adenocarcinomas using microarrays consisting of 6864 human genes involved in many types of cancers.

With the two-class comparison SAM, we observed 186 genes with significant differential expression between ethmoid adenocarcinomas and normal sinonasal tissue. Among these 186 genes, 150 were up-regulated and 36 down-regulated (Figure 1A and “Additional File 2: Genes with significant differential expression”). The top 59 genes ($1 < \text{fold change} < -1$) are presented in Table 2. The genes with the highest fold expression variation were selected for validation by qRT-PCR: *LGALS4* (fold change: 3.6), *ACS5* (fold change: 2.1), and *CLU* (fold change: -3.6). By unsupervised clustering, ie without any initial classification of the samples, 7 tumors out of 9 were separated from normal samples (Figure 1B). We revealed however 5 clusters of genes with differential expression between tumor and normal samples. Using GoMiner [34] we found that genes involved in metabolism and biosynthesis functions were overexpressed whereas those involved in transcription, angiogenesis, cellular signaling and mitochondrial functions were down-regulated. From this non-supervised analysis we selected for qRT-PCR analysis 2 more genes with high differential expression: *SRI* and *CCT5*. These genes, involved in drug resistance, were also in the list of overexpressed genes obtained from the two-class comparison analysis, with a fold change of 1.5 and 0.9 respectively.

Relative expression level of selected genes

To validate the differential gene expression obtained by microarray analysis, we performed quantitative PCR analysis of the selected genes in matched sets of tumors and normal tissues. We included the patients used for microarray analysis and 6 additional patients. For patients P8 and P19 as RNA from normal tissue was no more available, we used the Ct average ($SD < 1Ct$) of all normal tissues to calculate the relative expression level, for each gene [35].

A significant differential expression in tumoral tissue versus normal was confirmed for all selected genes. The genes with the highest overexpression were *LGALS4* with a mean ratio of 1309 (0.17-5993, $p = 0.001$), then *ACS5* with a mean ratio of 9.48 (0.14-23.55, $p = 0.001$). Patients P10 and P11 overexpressed neither *LGALS4* nor *ACS5*. (Figure 2A-B). *CLU* was highly down-regulated in most of the tumors (mean ratio:0.044, 0.005-0.26, $p = 0.001$) (Figure 2C). Many isoforms of *CLU* have been described in the literature [37], and we quantified by qRT-PCR the main ones meaning the nuclear form (n-clu) and the cytosolic form (s-clu). Both were found to be down-regulated (data not shown). Regarding *SRI* and *CCT5* we confirmed their significant up regulation ($p = 0.0016$ et $p = 0.006$ respectively) although the fold change was much lower (“Additional file 3: Relative expression of SRI and CCT5”).

Immunohistochemistry analysis of LGALS4, ACS5 and CLU

To confirm the variation of expression of the selected genes at the protein level, we performed immunohistochemical analysis of matched normal sinonasal and tumoral tissues of the 15 patients used for the molecular analysis and of an independent set of 11 other patients, using specific antibodies for *LGALS4*, *ACS5* and *CLU* (Table 3). In normal sinus mucosa these three markers were expressed by serous cells of the seromucinous glands present in the lamina propria. A weak and focal cytoplasmic staining of a few seromucinous glands was

observed with the antibodies against LGALS4 and CLU while the staining was more intense and diffuse for ACS5 (Figure 3A-B-C). Among the 26 tumors analyzed only 2 were high-grade non-ITAC and the others were ITAC: 5 “papillary-type” (well-differentiated adenocarcinoma), 2 “colonic-type” (moderately-differentiated adenocarcinoma), 9 “mucinous-type” adenocarcinoma and 8 mixed-type adenocarcinoma (Table 3). With LGALS4 antibody the ITAC tumor cells displayed a strong cytoplasmic and membranous staining with an additional nuclear staining in the well-differentiated adenocarcinomas. Interestingly, in a mixed ITAC (P5) poorly differentiated “solid-type” component showed no immunoreactivity for LGALS4 while the “colonic-type” component was positive (Table 3 and Figure 3D). Non-ITAC displayed no LGALS4 expression.

For ACS5 fifty percent of the tumor samples were negative while 50% showed a weak to strong cytoplasmic staining without any correlation with the histological type or with the differentiation of tumor (Table 3 and Figure 3E).

In contrast to normal mucosa CLU was found to be absent in tumors except in one high-grade non-ITAC tumor (Patient P11) where there was a diffuse cytoplasmic staining (Table 3 and Figure 3F).

For P6 and P19 which behaved differently in the unsupervised microarray analysis, we found the same results than in the other tumors. This is in favor of the use, for the microarrays, of RNA not representative of the tumors.

Discussion

Ethmoid carcinoma are uncommon tumors recognized as occupational disease in woodworkers. Current treatment with surgery and radiotherapy is not satisfying with the 50% survival at 5 years and important side effects. To get a better understanding of the molecular

events involved in this tumor and to identify potential new markers we did for the first time, to our knowledge, a gene expression profiling on 9 sinonasal adenocarcinomas.

This study with dedicated-microarrays containing 6864 genes previously known to be involved in cancer allowed us to select 5 genes (*LGALS4*, *ACS5*, *CLU*, *SRI* and *CCT5*) with significant differential expression between tumors and normal tissue. We confirmed by qRT-PCR the overexpression of *LGALS4*, *ACS5*, *SRI*, *CCT5* and the down-regulation of *CLU*. By IHC on an independent set of patients we focused our interest on the genes with the highest differential expression meaning *LGALS4*, *ACS5* and *CLU* and confirmed the results at the protein level for *LGALS4* and *CLU*.

LGALS4 gene encode for the galectin 4 protein [38]. Galectins constitute a family of proteins containing carbohydrate recognition domain (CRD) with high affinity for galactosides. Their complete physiological functions are not known however they have been involved in inflammation, apoptosis, cell adhesion and cell growth *LGALS4* was described in normal epithelial cells of oral esophagus, and intestinal mucosa [39, 40]. In tumors *LGALS4* expression is increased in liver, gastric, breast cancer and mucinous epithelial ovarian cancer while it is down-regulated in colon adenocarcinoma [41-43]. The presence of two binding sites for c-Rel, a subunit of NF κ -B, and the experimental data obtained with transgenic mice for c-Rel, suggest that *LGALS4* could be a downstream component of the NF κ -B pathway, known to be involved in regulation of tumorigenesis [44, 45]. In cancer cell lines *LGALS4* was expressed in highly differentiated cell lines which form polarized monolayers while undifferentiated cell lines did not express *LGALS4* but Galectin1 [38, 42]. In our series of ethmoid adenocarcinoma *LGALS4* is the gene with the highest differential expression and our IHC data are in accordance with the literature as we found that *LGALS4* is overexpressed in all ethmoid tumors except the high-grade non ITAC tumors which are poorly differentiated.

LGALS4 expression seems to be correlated to both histological type and differentiation of adenocarcinoma. This trend is confirmed by the case P5 where LGALS4 is overexpressed only in the “colonic-type” component and not in the poorly differentiated “solid-type” component of the tumor. For patient 6 (P6) we had a strong overexpression of LGALS4 in IHC in contrast to the relative expression obtained by qRT-PCR (fold change 0.45). We might then hypothesize that, in this “mucinous-type” ITAC containing numerous mucin lakes, the RNA extracted from the tissue was not representative of the tumor.

The highly conserved gene *CLU* (apolipoproteinJ, sulfated glycoprotein 2), encodes for the clusterin, a sulfated glycoprotein with chaperone activity and found in numerous tissues and body fluids. *CLU* has been involved in many biological functions such as DNA repair, cell cycle regulation and in apoptosis [37, 46]. In tumors *CLU* is described as overexpressed in several types of cancers: colon, breast and lung [37] however a down-regulation has been found in esophageal squamous cell carcinoma, in some pancreatic, prostate or colon cancers and in HPV negative squamous cell carcinoma of the head and neck [37, 46, 47] suggesting respectively a pro-survival or a pro-apoptotic function. The recent description of several isoforms, the nuclear form (n-*CLU*) and the cytoplasmic or secreted one (s-*CLU*) might help to resolve these apparent contradictions and to precise the cellular functions of the clusterin as well its potential use as biomarker [48-50].

In our series of ethmoid tumors *CLU* was highly down-regulated at the RNA level. Although the level of clusterin detected by IHC in normal tissue was quite low we confirmed the down-regulation of the protein except in one case (P11). This patient was also the least down-regulated by qRT-PCR. This case is interesting because he has been exposed to wood and by contrast with most of the cases reported in the literature he presented a non-ITAC tumor. The absence of clusterin in ethmoid tumors suggest a pro-apoptotic function in normal ethmoidal tissue, may be in response to DNA damage induced by wood dust, or other occupational

exposures. It is interesting to note that *CLU*, is localized on chromosome 8p21-p12 [51]. Indeed Ariza *et al.* found, by comparative genomic hybridization, losses on 8p21 in about 50% of patients with sinonasal adenocarcinomas [20]. This feature was confirmed by the study of Korinth *et al.* who reported for its series of 42 patients a loss of 8p in 61% of cases [21]. We do not know the cytogenetics of our tumors but it would be interesting to find out if in our tumors the down-regulation of *CLU* is due do deletion on chromosome 8p or if other mechanisms such as epigenetic regulation occur on the *CLU* gene.

ACS5, acyl coenzyme A synthetase 5 (*FACL5*, E.C. 6.2.1.3.), is one isoform of the ACSs, key proteins in the lipids metabolism via the activation of fatty acids in acylCoA thioesters. These esters are the metabolites for oxidation, elongation and desaturation of fatty acids as well as for the synthesis of complex lipids. *ACS5* is essential for lipid metabolism but it might also play a role in intermediate metabolism and regulation of gene expression [52]. This gene has been well characterized in the small intestine mucosa by Gassler *et al* [53, 54]. *ACS5* is expressed in the enterocytes from the villus tip but not in the crypts and it could be involved in the differentiation and maintenance of crypt-villus axis, by inducing TRAIL apoptosis in apical villi of the mucosa. In the context of tumorogenesis, few reports have been published on *ACS5*. In adenoma and adenocarcinoma of the small intestine *ACS5* expression is decreased [54] while it is up-regulated in gliomas [55], in well-differentiated endometrioid adenocarcinomas [56] and in some colorectal adenocarcinomas [57]. The qRT-PCR data in our panel of tumors were in favour of an increase of the expression ($p = 0.001$) however this was not confirmed by IHC. Indeed while some tumors expressed strongly *ACS5* others had completely lost the expression of *ACS5*. We did not find any correlation of *ACS5* expression with histological type, differentiation or collateral exposures.

The other selected genes were not evaluated by immunohistochemistry as their variation of expression was much lower and our first goal was to find new markers for a better

characterization of these tumors with a clear etiology. We confirmed however by qRT-PCR the transcriptional profiling obtained with the microarray.

SRI (Sorcin) and CCT5 (chaperonin-containing complex 1) are less known genes. Both encode for multidrug resistance proteins and might be involved in the detoxification of the cells [58, 59]. They are slightly overexpressed in our panel of tumors. This trend could be related to the chemical or particles exposures of the patients. Indeed SRI has also been identified by differential display analysis as overexpressed in tobacco-chewing mediated oral cancer [60].

Conclusions

In conclusion our transcriptomic study allowed us to identify genes involved in sinonasal adenocarcinomas. The validation of microarray data with qRT-PCR and immunohistochemistry confirmed the significant alterations of *LGALS4* and *CLU* expression. Because of the low incidence of recruitment of these tumors we had a limited number of patients and only one without wood exposure preventing any correlation with survival or wood exposure. Nevertheless after validation using tissue microarrays in a large set of tumors, including precancerous lesions and early stages, *LGALS4* and *CLU* could be included in a panel of non invasive diagnostic/prognostic tests for the follow-up of woodworkers, to allow an earlier detection of lesions using sinonasal smear.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

Authors' contributions

TD conceived the design of the study, performed the questionnaire, the follow up of the patients and participated to the draft of the paper. SQ participate to the tissue collection, performed the molecular and data analyses, and contributed to the draft of the paper. KR performed the pathological diagnoses and the immunohistochemistry interpretation. CF, OM, CV participated to the tissue collection and IGM to the microarray study. VSR and CG contributed to the design of the study and the epidemiological questionnaire.

CGRR participated in the study design, supervised the project and prepared the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank Dr. Jean Léger and Dr. Rémi Houlgatte for their help with the microarray analysis, Marie-Thérèse Le Cabellec for the cryostat sections, and Cécile Deleine for the immunohistochemical staining. We are grateful to C. Beauvillain, F. Jégoux, and C. Roedlich for their helpful discussion.

Grant support: La Ligue Contre le Cancer, comité Pays de la LOIRE ; La Direction de la Recherche Clinique du Centre Hospitalo-Universitaire de Nantes.

References

1. Dulguerov P, Jacobsen MS, Allal AS, Lehmann W, Calcaterra T: **Nasal and paranasal sinus carcinoma: are we making progress? A series of 220 patients and a systematic review.** *Cancer* 2001, **92**(12):3012-3029.
2. Luce D, Leclerc A, Begin D, Demers PA, Gerin M, Orłowski E, Kogevinas M, Belli S, Bugel I, Bolm-Audorff U, Brinton LA, Comba P, Hardell L, Hayes RB, Magnani C, Merler E, Preston-Martin S, Vaughan TL, Zheng W, Boffetta P: **Sinonasal cancer and occupational exposures: a pooled analysis of 12 case-control studies.** *Cancer Causes Control* 2002, **13**(2):147-157.
3. Pesch B, Pierl CB, Gebel M, Gross I, Becker D, Johnen G, Rihs HP, Donhuijsen K, Lepentsiotis V, Meier M, Schulze J, Bruening T: **Occupational risks for adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses in the German wood industry.** *Occup Environ Med* 2007, **65**(3):191-196.
4. IARC: **Wood dust and formaldehyde.** In: *Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* Edited by IARC, vol. 62. Lyon: IARC; 1995.
5. Demers PA, Boffetta P, Kogevinas M, Blair A, Miller BA, Robinson CF, Roscoe RJ, Winter PD, Colin D, Matos E, et al.: **Pooled reanalysis of cancer mortality among five cohorts of workers in wood-related industries.** *Scand J Work Environ Health* 1995, **21**(3):179-190.
6. IARC: **Cancer risk from occupational exposure to wood dust. A pool analysis of epidemiological studies.** In: *Tech Rep.* Edited by IARC; 1998: 30.
7. IARC: **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. Leather industries, boot and shoe manufacture and repair.** In: *Overall evaluations of carcinogenicity : an updating of IARC monographs* vol. 1-42. Lyon: IARC; 1987: 232-237.

8. Bonneterre V, Deschamps E, Persoons R, Bernardet C, Liaudy S, Maitre A, de Gaudemaris R: **Sino-nasal cancer and exposure to leather dust.** *Occup Med (Lond)* 2007, **57**(6):438-443.
9. Andersen A, Barlow L, Engeland A, Kjaerheim K, Lynge E, Pukkala E: **Work-related cancer in the Nordic countries.** *Scand J Work Environ Health* 1999, **25 Suppl 2**:1-116.
10. Adams JM, Cory S: **The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy.** *Oncogene* 2007, **26**(9):1324-1337.
11. Hauptmann M, Lubin JH, Stewart PA, Hayes RB, Blair A: **Mortality from solid cancers among workers in formaldehyde industries.** *Am J Epidemiol* 2004, **159**(12):1117-1130.
12. Hecht SS: **Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**(10):733-744.
13. Llorente JL, Perez-Escuredo J, Alvarez-Marcos C, Suarez C, Hermsen M: **Genetic and clinical aspects of wood dust related intestinal-type sinonasal adenocarcinoma: a review.** *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2009, **266**(1):1-7.
14. Barnes L, Johnson JT: **Clinical and pathological considerations in the evaluation of major head and neck specimens resected for cancer. Part II.** *Pathol Annu* 1986, **21 Pt 2**:83-110.
15. Kleinsasser O, Schroeder HG: **Adenocarcinomas of the inner nose after exposure to wood dust. Morphological findings and relationships between histopathology and clinical behavior in 79 cases.** *Arch Otorhinolaryngol* 1988, **245**(1):1-15.
16. Roux FX, Moussa R, Devaus B, Nataf F, Page P, Laccourreye O, Schwaab G, Brasnu D, Lacau Saint-Guily J: **Subcranial fronto-orbito-nasal approach for ethmoidal cancers surgical techniques and results.** *Surg Neurol* 1999, **52**(5):501-508.

17. Suarez C, Llorente JL, Fernandez De Leon R, Maseda E, Lopez A: **Prognostic factors in sinonasal tumors involving the anterior skull base.** *Head Neck* 2004, **26**(2):136-144.
18. Bornholdt J, Hansen J, Steiniche T, Dictor M, Antonsen A, Wolff H, Schlunssen V, Holmila R, Luce D, Vogel U, Husgafvel-Pursiainen K, Wallin H: **K-ras mutations in sinonasal cancers in relation to wood dust exposure.** *BMC Cancer* 2008, **8**:53.
19. Holmila R, Cyr D, Luce D, Heikkila P, Dictor M, Steiniche T, Stjernvall T, Bornholdt J, Wallin H, Wolff H, Husgafvel-Pursiainen K: **COX-2 and p53 in human sinonasal cancer: COX-2 expression is associated with adenocarcinoma histology and wood-dust exposure.** *Int J Cancer* 2008, **122**(9):2154-2159.
20. Ariza M, Llorente JL, Alvarez-Marcas C, Baragano L, Salas A, Rodriguez Prado N, Hermsen M, Suarez C, Sampedro A: **Comparative genomic hybridization in primary sinonasal adenocarcinomas.** *Cancer* 2004, **100**(2):335-341.
21. Korinth D, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Hattenberger S, Bockmuhl U, Dietel M, Schroeder HG, Donhuijsen K, Petersen I: **Chromosomal imbalances in wood dust-related adenocarcinomas of the inner nose and their associations with pathological parameters.** *J Pathol* 2005, **207**(2):207-215.
22. Hermsen MA, Llorente JL, Perez-Escuredo J, Lopez F, Ylstra B, Alvarez-Marcos C, Suarez C: **Genome-wide analysis of genetic changes in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma.** *Head Neck* 2009, **31**(3):290-297.
23. Rekhadevi PV, Mahboob M, Rahman MF, Grover P: **Genetic damage in wood dust-exposed workers.** *Mutagenesis* 2009, **24**(1):59-65.
24. Franchi A, Santucci M, Wenig B: **Adenocarcinoma.** In: *World Health Organization classification of tumors Pathology and genetics of head and neck tumours.* Edited by Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D. Lyon: IARC; 2005: 20-23.

25. Barnes L: **Intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses.** *Am J Surg Pathol* 1986, **10**(3):192-202.
26. Fleige S, Pfaffl MW: **RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance.** *Mol Aspects Med* 2006, **27**(2-3):126-139.
27. Was H, Cichon T, Smolarczyk R, Rudnicka D, Stopa M, Chevalier C, Leger JJ, Lackowska B, Grochot A, Bojkowska K, Ratajska A, Kieda C, Szala S, Dulak J, Jozkowicz A: **Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice.** *Am J Pathol* 2006, **169**(6):2181-2198.
28. Mori K, Berreur M, Blanchard F, Chevalier C, Guisle-Marsollier I, Masson M, Redini F, Heymann D: **Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) directly modulates the gene expression profile of RANK-positive Saos-2 human osteosarcoma cells.** *Oncol Rep* 2007, **18**(6):1365-1371.
29. Chelh I, Meunier B, Picard B, Reecy MJ, Chevalier C, Hocquette JF, Cassar-Malek I: **Molecular profiles of Quadriceps muscle in myostatin-null mice reveal PI3K and apoptotic pathways as myostatin targets.** *BMC Genomics* 2009, **10**:196.
30. Lamirault G, Gaborit N, Le Meur N, Chevalier C, Lande G, Demolombe S, Escande D, Nattel S, Leger JJ, Steenman M: **Gene expression profile associated with chronic atrial fibrillation and underlying valvular heart disease in man.** *J Mol Cell Cardiol* 2006, **40**(1):173-184.
31. Le Meur N, Lamirault G, Bihouee A, Steenman M, Bedrine-Ferran H, Teusan R, Ramstein G, Leger JJ: **A dynamic, web-accessible resource to process raw microarray scan data into consolidated gene expression values: importance of replication.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**(18):5349-5358.

32. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: **Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(9):5116-5121.
33. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D: **Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(25):14863-14868.
34. Zeeberg BR, Feng W, Wang G, Wang MD, Fojo AT, Sunshine M, Narasimhan S, Kane DW, Reinhold WC, Lababidi S, Bussey KJ, Riss J, Barrett JC, Weinstein JN: **GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data.** *Genome Biol* 2003, **4**(4):R28.
35. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(9):e45.
36. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L: **Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**(9):e36.
37. Shannan B, Seifert M, Leskov K, Willis J, Boothman D, Tilgen W, Reichrath J: **Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer.** *Cell Death Differ* 2006, **13**(1):12-19.
38. Huflejt ME, Leffler H: **Galectin-4 in normal tissues and cancer.** *Glycoconj J* 2004, **20**(4):247-255.
39. Paclik D, Danese S, Berndt U, Wiedenmann B, Dignass A, Sturm A: **Galectin-4 controls intestinal inflammation by selective regulation of peripheral and mucosal T cell apoptosis and cell cycle.** *PLoS ONE* 2008, **3**(7):e2629.
40. Paclik D, Lohse K, Wiedenmann B, Dignass AU, Sturm A: **Galectin-2 and -4, but not galectin-1, promote intestinal epithelial wound healing in vitro through a TGF-beta-independent mechanism.** *Inflamm Bowel Dis* 2008, **14**(10):1366-1372.

41. Duerr EM, Mizukami Y, Ng A, Xavier RJ, Kikuchi H, Deshpande V, Warshaw AL, Glickman J, Kulke MH, Chung DC: **Defining molecular classifications and targets in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors through DNA microarray analysis.** *Endocr Relat Cancer* 2008, **15**(1):243-256.
42. van den Brule F, Califice S, Castronovo V: **Expression of galectins in cancer: a critical review.** *Glycoconj J* 2004, **19**(7-9):537-542.
43. Heinzelmann-Schwarz VA, Gardiner-Garden M, Henshall SM, Scurry JP, Scolyer RA, Smith AN, Bali A, Vanden Bergh P, Baron-Hay S, Scott C, Fink D, Hacker NF, Sutherland RL, O'Brien PM: **A distinct molecular profile associated with mucinous epithelial ovarian cancer.** *Br J Cancer* 2006, **94**(6):904-913.
44. Romieu-Mourez R, Kim DW, Shin SM, Demicco EG, Landesman-Bollag E, Seldin DC, Cardiff RD, Sonenshein GE: **Mouse mammary tumor virus c-rel transgenic mice develop mammary tumors.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**(16):5738-5754.
45. Shen HM, Tergaonkar V: **NFkappaB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy.** *Apoptosis* 2009, **14**(4):348-363.
46. Shannan B, Seifert M, Boothman DA, Tilgen W, Reichrath J: **Clusterin and DNA repair: a new function in cancer for a key player in apoptosis and cell cycle control.** *J Mol Histol* 2006, **37**(5-7):183-188.
47. Martinez I, Wang J, Hobson KF, Ferris RL, Khan SA: **Identification of differentially expressed genes in HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas.** *Eur J Cancer* 2007, **43**(2):415-432.
48. Trougakos IP, Djeu JY, Gonos ES, Boothman DA: **Advances and challenges in basic and translational research on clusterin.** *Cancer Res* 2009, **69**(2):403-406.

49. Kevans D, Foley J, Tenniswood M, Sheahan K, Hyland J, O'Donoghue D, Mulcahy H, O'Sullivan J: **High clusterin expression correlates with a poor outcome in stage II colorectal cancers.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009, **18**(2):393-399.
50. Sakai I, Miyake H, Takenaka A, Fujisawa M: **Expression of potential molecular markers in renal cell carcinoma: impact on clinicopathological outcomes in patients undergoing radical nephrectomy.** *BJU Int* 2009.
51. Fink TM, Zimmer M, Tschopp J, Etienne J, Jenne DE, Lichter P: **Human clusterin (CLI) maps to 8p21 in proximity to the lipoprotein lipase (LPL) gene.** *Genomics* 1993, **16**(2):526-528.
52. Black PN, Faergeman NJ, DiRusso CC: **Long-chain acyl-CoA-dependent regulation of gene expression in bacteria, yeast and mammals.** *J Nutr* 2000, **130**(2S Suppl):305S-309S.
53. Gassler N, Kopitz J, Tehrani A, Ottenwalder B, Schnolzer M, Kartenbeck J, Lyer S, Autschbach F, Poustka A, Otto HF, Mollenhauer J: **Expression of acyl-CoA synthetase 5 reflects the state of villus architecture in human small intestine.** *J Pathol* 2004, **202**(2):188-196.
54. Gassler N, Schneider A, Kopitz J, Schnolzer M, Obermuller N, Kartenbeck J, Otto HF, Autschbach F: **Impaired expression of acyl-CoA-synthetase 5 in epithelial tumors of the small intestine.** *Hum Pathol* 2003, **34**(10):1048-1052.
55. Yamashita Y, Kumabe T, Cho YY, Watanabe M, Kawagishi J, Yoshimoto T, Fujino T, Kang MJ, Yamamoto TT: **Fatty acid induced glioma cell growth is mediated by the acyl-CoA synthetase 5 gene located on chromosome 10q25.1-q25.2, a region frequently deleted in malignant gliomas.** *Oncogene* 2000, **19**(51):5919-5925.

56. Gassler N, Yang SH, Keith M, Helmke BM, Schirmacher P, Obermuller N: **Expression of acyl-CoA synthetase 5 in human endometrium and in endometrioid adenocarcinomas.** *Histopathology* 2005, **47**(5):501-507.
57. Gassler N, Herr I, Schneider A, Penzel R, Langbein L, Schirmacher P, Kopitz J: **Impaired expression of acyl-CoA synthetase 5 in sporadic colorectal adenocarcinomas.** *J Pathol* 2005, **207**(3):295-300.
58. Ooe A, Kato K, Noguchi S: **Possible involvement of CCT5, RGS3, and YKT6 genes up-regulated in p53-mutated tumors in resistance to docetaxel in human breast cancers.** *Breast Cancer Res Treat* 2007, **101**(3):305-315.
59. Zhou Y, Xu Y, Tan Y, Qi J, Xiao Y, Yang C, Zhu Z, Xiong D: **Sorcin, an important gene associated with multidrug-resistance in human leukemia cells.** *Leuk Res* 2006, **30**(4):469-476.
60. Nagpal JK, Das BR: **Identification of differentially expressed genes in tobacco chewing-mediated oral cancer by differential display-polymerase chain reaction.** *Eur J Clin Invest* 2007, **37**(8):658-664.
61. Patel SG, Shah JP: **TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity.** *CA Cancer J Clin* 2005, **55**(4):242-258.

Figures

Figure 1- Heat map of data of two-class comparison (A) and unsupervised (B) analysis.

Expression levels are colour coded with red, green, black and grey corresponding to an increase, decrease, no change and missed data in gene expression, respectively.

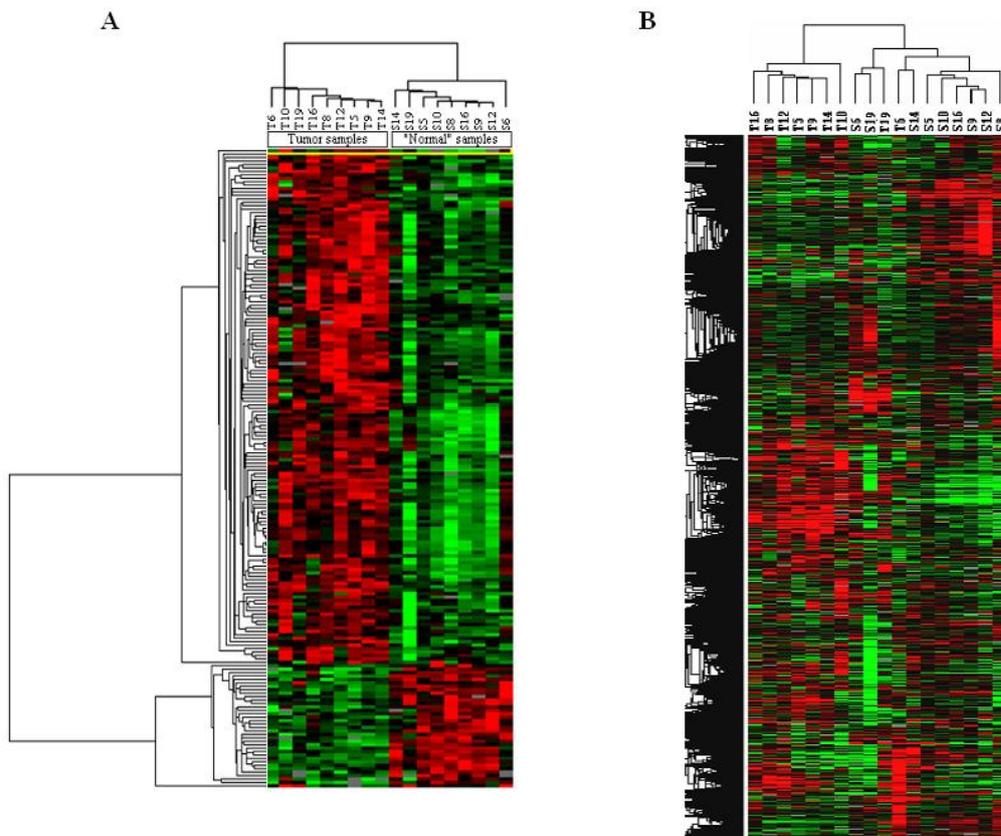


Figure 2- Relative expression levels of *LGALS4*, *ACS5*, *CLU*, in tumors versus matched normal sinusal tissue determined by qRT-PCR.

Fold change was calculated according to the equation described in materials and methods with normalization against the average of three housekeeping genes, *RPLPO*, β 2microglobulin, and *ubiquitin C*.

*tumoral tissue versus average of all normal sinusal tissues (cf Results qRT-PCR for detail)

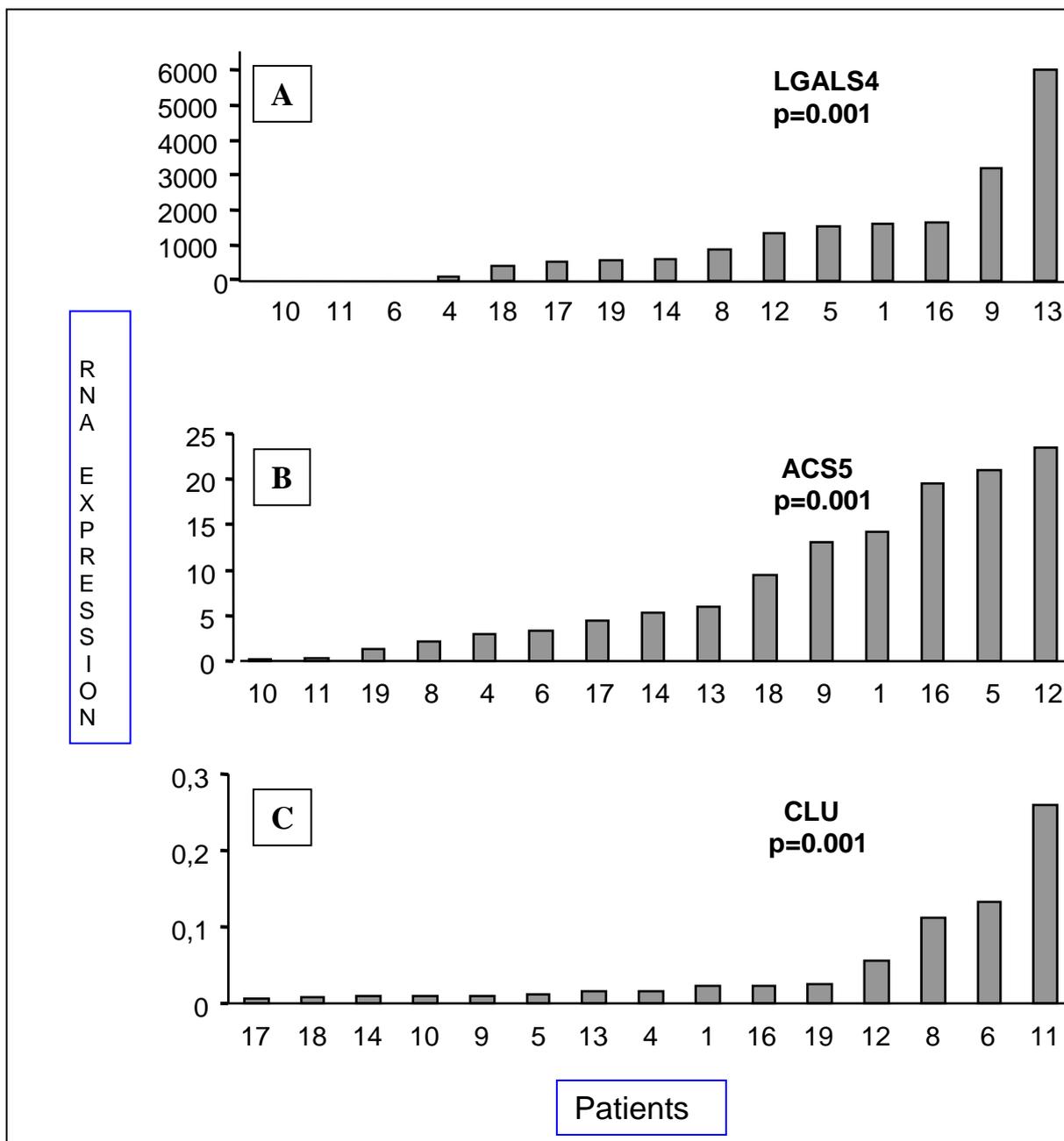


Figure 3- Representative cases of expression of LGALS4, CLU and ACS5 in matched normal mucosa (x100), and tumoral tissue (x25).

A-B-C: Normal sinusal mucosa immunostaining.

(A-C): Weak and focal cytoplasmic staining of serous cells in a few seromucinous glands with LGALS4 and CLU.

(A): Weak staining of respiratory epithelium with LGALS4

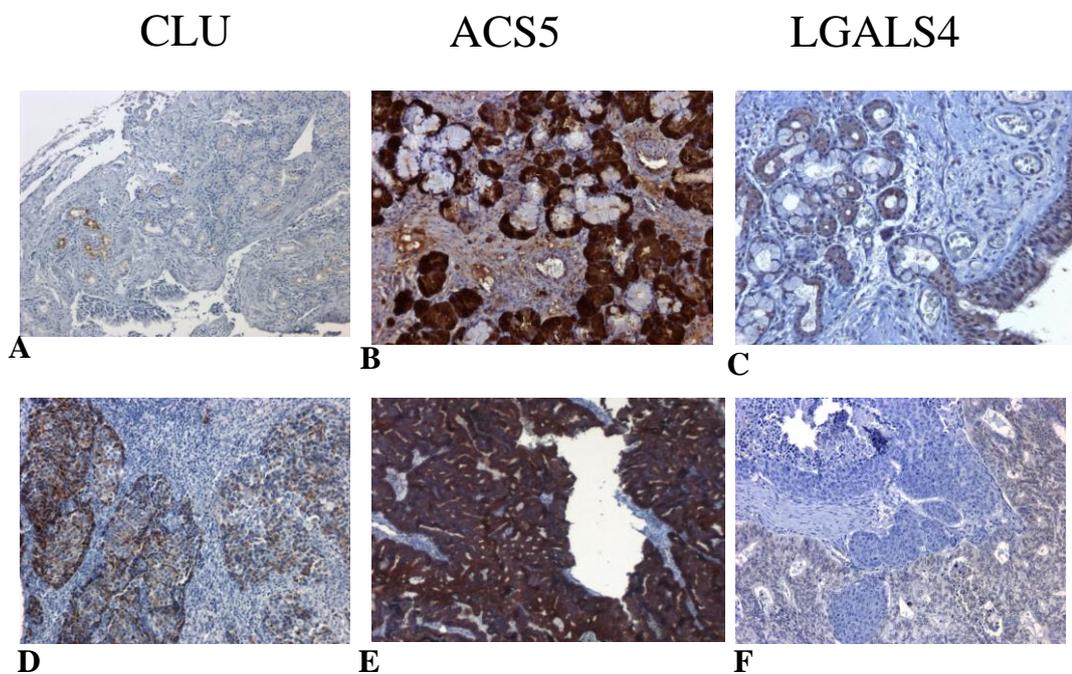
(B): Strong and diffuse immunostaining of serous cells with ACS5.

D-E-F: Tumor immunostaining.

(D): Poorly-differentiated “solid-type” component showed no immunoreactivity for LGALS4 while the “colonic-type” component is positive in a mixed ITAC (patient 5).

(E): Example of ACS5 expression in a “colonic-type” ITAC.

(F): No immunoreactivity for CLU in tumor samples (x100) except in one non-ITAC (Insert *(x25), Patient 11).



Tables

Table 1 - Summary of clinical data and use of tumor samples

<i>Patient</i>	<i>Age</i>	<i>Dust exposure^a</i> (years)	<i>Tobacco /alcohol</i>	<i>Others^b</i>	<i>TNM stage UICC2003 [61]</i>	<i>Treatment^{c,d}</i>	<i>Out-come^e</i>	<i>Micro -array</i>	<i>q RT PCR</i>	<i>IHC</i>
1	69	W (42)	+	+	T2N0M0	S, R	A	-	+	+
2	79	W (45)	-	-	R4bN0M0 ^C	S, R	DOD	-	-	+
3	72	W (25)	+	+	R3N0M0	S, R	A	-	-	+
4	55	W (17)	+	+	T3N0M0	S, R	A	-	+	+
5	62	W (3)	-	+	T4bN0M0	S	DOD	+	+	+
6	71	W (37)	+	+	R3N0M0	S, R	A	+	+	+
7	83	L (5)	+	+	T4aN0M0	S, R	DOD	-	-	+
8	66	W (43)	-	-	T4bN0M0	S	DOD	+	+	+
9	76	W (27)	+	+	R3N0M0	S, R	A	+	+	+
10	50	-	+	-	T4aN0M0	S, R	A	+	+	+
11	75	W (43)	-	+	T3N0M0	S, R	A	-	+	+
12	81	W (41)	-	+	T4aN0M0	S, R	DOD	+	+	+
13	71	W (30)	-	+	T3N0M0	S, R	A	-	+	+
14	60	W (25)	+	+	T2N0M0	S, R	A	+	+	+
15	73	W (6)	+	-	T2N0M0	S, R	A	-	-	+
16	68	W (32)	+	-	T2N0M0	S, R	A	+	+	+
17	70	W (25)	-	-	T2N0M0	S, R	A	-	+	+
18	79	W (20)	-	-	T2N0M0	S, R	D	-	+	+
19	77	L (12)	+	+	T4aN0M0	S, R	A	+	+	+
20	65	W (35)	-	+	T2N0M0	S, R	A	-	-	+
21	90	W (30)	+	-	T3N0M0	S, R	A	-	-	+
22	54	W (42)	-	-	T2N0M0	S, R	A	-	-	+
23	68	W (31)	+	+	T3N0M0	S, R	A	-	-	+
24	71	W (41)	+	+	T2N0M0	S, R	A	-	-	+
25	73	W (30)	-	+	T4aN0M0	S, R	A	-	-	+
26	75	W (9)	-	+	T4bN0M0	S, R	DOD	-	-	+

a: dust exposure: W= wood, L= leather

b: pesticides (xylophene), solvents (acetone, formaldehyde)

c: R = recurrent tumor

d: treatment: S = surgery, R = radiotherapy post-surgery

e: DOD = dead of disease, D = dead of other circumstances, A= alive

Table 2 - Top 59 genes differentially expressed in sinonasal adenocarcinomas after two-class comparison analysis

Accession Number	Gene Symbol	Gene annotation	Fold change (log2)
Up-regulated genes			
NM_006149	LGALS4	lectin, galactoside-binding, soluble, 4 (galectin S4)	3,084
NM_016234	ACSS5	fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 5	2,621
NM_001845	COL4A1	collagen, type IV, alpha 1	1,779
NM_002228	JUN	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	1,758
NM_001816	CEACAM8	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8	1,732
NM_001122	ADFP	adipose differentiation-related protein	1,628
XM_067746		similar to 60 kDa heat shock protein, mitochondrialprecursor (Hsp60) (60 kDa chaperonin) (CPN60) (Heat shock protein60) (HSP-60)	1,617
NM_004591	CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	1,560
BC000097	TGFBI	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	1,493
NM_000393	COL5A2	collagen, type V, alpha 2	1,461
NM_003130	SRI	sorcin	1,456
NM_001153	ANXA4	annexin A4	1,434
NM_005566	LDHA	lactate dehydrogenase A	1,416
NM_005563	STMN1	stathmin 1/oncoprotein 18	1,414
NM_017958	PLEKHB2	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 2	1,409
XM_092196		similar to Cytochrome c, somatic (LOC164837), mRNA.	1,387
AF112214	MRPL13	mitochondrial ribosomal protein L13	1,370
AJ250915	HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	1,346
BC003623	YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	1,342
NM_006111	ACAA2	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)	1,335
NM_021821	MRPS35	mitochondrial ribosomal protein S35	1,329
NM_002592	PCNA	proliferating cell nuclear antigen	1,319
NM_001827	CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	1,278
AB062125	TPM3	tropomyosin 3	1,224
NM_016245	DHRS8	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 8	1,206
NM_001226	CASP6	caspase 6, apoptosis-related cysteine protease	1,194
NM_004670	PAPSS2	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	1,172
XM_088293		similar to cytochrome c (LOC157317), mRNA.	1,164
NM_001428	ENO1	enolase 1, (alpha)	1,145
XM_060849		similar to cytochrome C, expressed in somatic tissues(LOC128146), mRNA.	1,133
AF135381	CKLF	chemokine-like factor	1,133
X84907	ENO1	enolase 1, (alpha)	1,121
NM_005720	ARPC1B	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa	1,114
NM_021130	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	1,110
NM_001288	CLIC1	chloride intracellular channel 1	1,095
BC015130	CYCS	cytochrome c, somatic	1,081
NM_012255	XRN2	5'-3' exoribonuclease 2	1,068
M34664	HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	1,066
AF054185	PSMA7	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7	1,044
NM_006601	TEBP	unactive progesterone receptor, 23 kD	1,037
AF136630	CBX3	chromobox homolog 3 (HP1 gamma homolog, Drosophila)	1,023
AF274941	CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B	1,013
AF320053	MYCN	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	1,006

Down-regulated genes

NM_001831	CLU	clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)	-3,606
NM_005978	S100A2	S100 calcium binding protein A2	-2,152
S68290	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	-2,102
NM_003713	PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B	-1,966
AB000889	PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B	-1,936
NM_001321	CSRP2	cysteine and glycine-rich protein 2	-1,916
NM_006485 /	FBLN1	fibulin 1	-1,799
AF007162	CRYAB	crystallin, alpha B	-1,590
NM_002825	PTN	pleiotrophin (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)	-1,405
NM_001063	TF	transferrin	-1,256
NM_004186	SEMA3F	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F	-1,246
NM_000424	KRT5	keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types)	-1,207
AF059617	PLK2	polo-like kinase 2 (Drosophila)	-1,186
NM_005596	NFIB	nuclear factor I/B	-1,149
NM_006206	PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	-1,090
NM_005900	MADH1	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 1 (Drosophila)	-1,047

Table 3 - LGALS4, ACS5 and CLU expressions in 26 sinonasal adenocarcinomas (IHC analysis).

Patient	Tumor subtypes (Barnes' classification [25])	CLU ^a	ACS5	LGALS4
1	ITAC mixed (papillary and mucinous)	-	-	+++
2	ITAC mucinous	-	-	+++
3	ITAC mucinous	-	-	+++
4	ITAC colonic	-	+	+++
5	ITAC mixed (solid and colonic)	-	++	-/+++
6	ITAC mucinous	-	+	+++
7*	ITAC mucinous	-	-	+++
8	ITAC mucinous	-	-	+++
9	ITAC mixed (papillary and mucinous)	-	+++	+++
10**	non ITAC high-grade	-	-	-
11	non ITAC high-grade	+++	++	-
12	ITAC papillary	-	+++	+++
13	ITAC mucinous	-	-	+++
14	ITAC papillary	-	-	+++
15	ITAC mucinous	-	-	+++
16	ITAC mixed (papillary and mucinous)	-	++	+++
17	ITAC papillary	-	++	+++
18	ITAC mixed (papillary, colonic and mucinous)	-	+	+
19*	ITAC mucinous	-	+	+++
20	ITAC mixed (colonic and mucinous)	-	+	+++
21	ITAC mixed (papillary and mucinous)	-	-	+++
22	ITAC papillary	-	-	+++
23	ITAC mixed (papillary and colonic)	-	-	+++
24	ITAC colonic	-	+++	++
25	ITAC papillary	-	+	+++
26	ITAC mucinous	-	-	+++

* Patients exposed to leather dust

** No occupational exposure

a- Intensity of immunostaining in tumoral cells:

+++ : positivity of 75 to 100% of cells with an strong staining.

++ : positivity of 25 to 75% of cells with heterogenous weak to strong staining.

+ : focal and weak positivity of 1 to 25 % of cells.

- : no staining.

Additional files

Additional file 1 - Primers sequences

Gene	Forward primer	Reverse primer	T°Annealing
CLU	TCCAGGACAGGTTCTTCACC	GAGAGAAGGGCATCAAGCTG	63
LGALS4	TCTTTGATCTGTCCATTCGCT	GATTTCCAATGTGTCCACCC	63
ACS5	GTGCTGATAGGGAATGTAGAG	GATGGGTATCATGGCTCCT	55
BAX	AAAACACAGTCCAAGGCA	ACCGTGACCATCTTTGTG	60
PDGFR α	ACTTGCTATTACAACCACACTC	TCCTCCACGATGACTAAATAATCC	55
CCT5	ATTGCTGTGAATGCCGTCCT	GAAATCCTTGTCCACAATCACGCC	63
SRI	GCTCAGCAAGGTGTTGTGAA	GAAAAGAGGACAAGCAAAGG	63
MONDO-A	ACGATGACATGCTGTATTGG	GCTGGTGTGAAGAAAGTGTG	60
NSAP-1	CTAGTAAAGGACCAGATGAGGC	CATTAGACGAAGATCCCATATAGG	60
α 2microglobuline*	GGCATCTTCAAACCTCCATGATG	TTCACCCCCACTGAAAAAGATGA	68
RPLPO*	GATGACCAGCCCAAAGGAGA	GTGATGTGCAGCTGATCAAGACT	68
UBC*	GATTTGGGTCGCGGTTCTT	TGCCTTGACATTCTCGATGGT	68

* Housekeeping gene

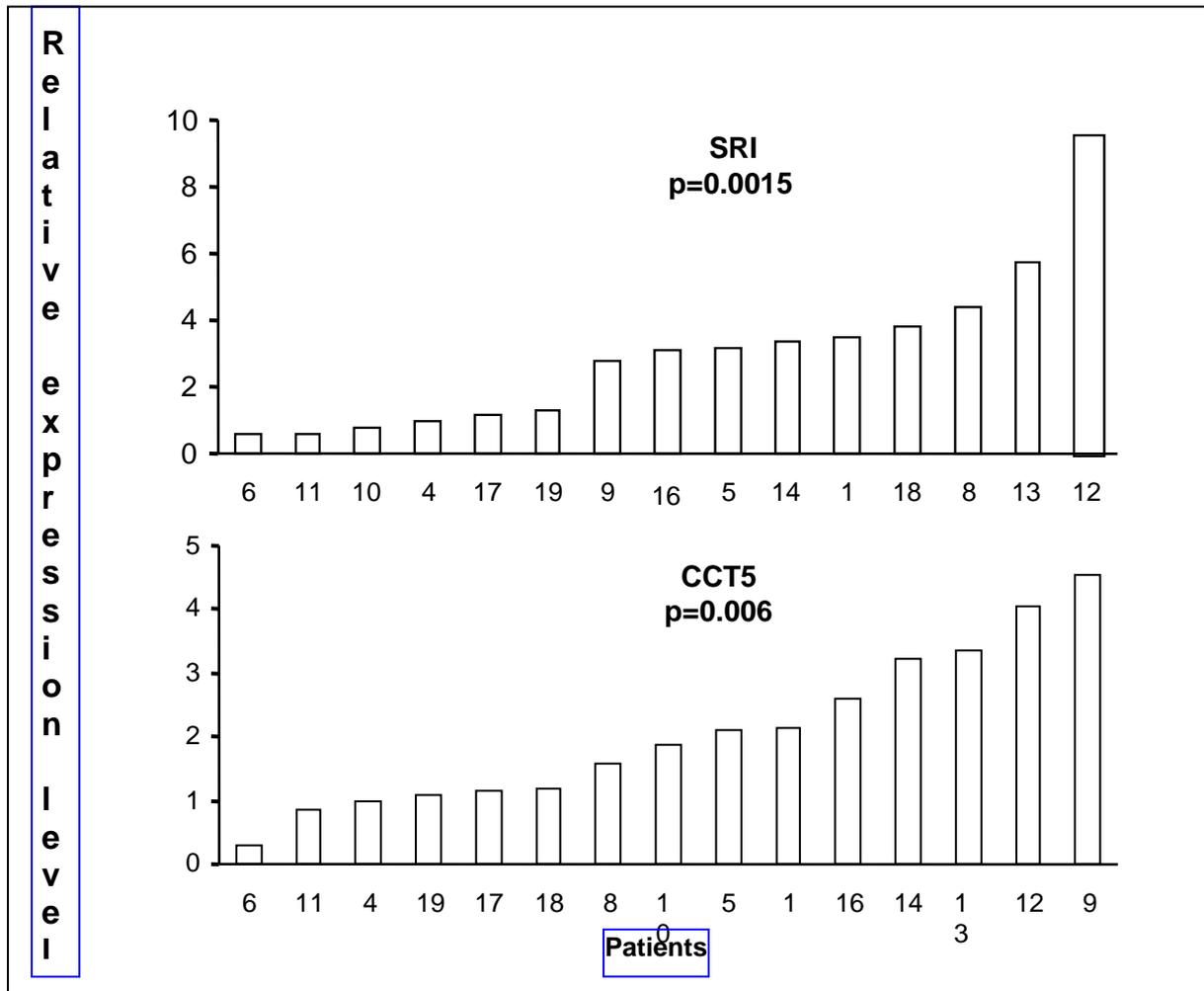
Additional file 2 - 186 genes with significant differential expression in sinonasal adenocarcinomas, identified by two-class comparison.

Gene Nb	Symbol	Annotations	Fold change (log 2)
NM_006149	LGALS4	lectin, galactoside-binding, soluble, 4 (galectin 4)	3,084
NM_016234	ACSL5	fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 5	2,621
NM_001845	COL4A1	collagen, type IV, alpha 1	1,779
NM_002228	JUN	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	1,758
NM_001816	CEACAM8	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8	1,732
NM_001122	ADFP	adipose differentiation-related protein	1,628
XM_067746		similar to 60 kDa heat shock protein, mitochondrialprecursor (Hsp60) (60 kDa chaperonin) (CPN60) (Heat shock protein60) (HSP-60)	1,617
NM_004591	CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	1,560
BC000097	TGFBI	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	1,493
NM_000393	COL5A2	collagen, type V, alpha 2	1,461
NM_003130	SRI	sorcin	1,456
NM_001153	ANXA4	annexin A4	1,434
NM_005566	LDHA	lactate dehydrogenase A	1,416
NM_005563	STMN1	stathmin 1/oncoprotein 18	1,414
NM_017958	PLEKHB2	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 2	1,409
XM_092196		similar to Cytochrome c, somatic (LOC164837), mRNA.	1,387
AF112214	MRPL13	mitochondrial ribosomal protein L13	1,370
AJ250915	HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	1,346
BC003623	YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	1,342
NM_006111	ACAA2	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)	1,335
NM_021821	MRPS35	mitochondrial ribosomal protein S35	1,329
NM_002592	PCNA	proliferating cell nuclear antigen	1,319
NM_001827	CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	1,278
AB062125	TPM3	tropomyosin 3	1,224
NM_016245	DHRS8	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 8	1,206
NM_001226	CASP6	caspase 6, apoptosis-related cysteine protease	1,194
NM_004670	PAPSS2	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	1,172
XM_088293		similar to cytochrome c (LOC157317), mRNA.	1,164
NM_001428	ENO1	enolase 1, (alpha)	1,145
XM_060849		similar to cytochrome C, expressed in somatic tissues(LOC128146), mRNA.	1,133
AF135381	CKLF	chemokine-like factor	1,133
X84907	ENO1	enolase 1, (alpha)	1,121
NM_005720	ARPC1B	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa	1,114
NM_021130	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	1,110
AF129756/NM_001288	CLIC1	chloride intracellular channel 1	1,095
BC015130	CYCS	cytochrome c, somatic	1,081
NM_012255	XRN2	5'-3' exoribonuclease 2	1,068
M34664	HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	1,066
AF054185	PSMA7	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7	1,044
NM_006601	TEBP	inactive progesterone receptor, 23 kD	1,037
AF136630	CBX3	chromobox homolog 3 (HP1 gamma homolog, Drosophila)	1,023
AF274941	CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B	1,013
AF320053	MYCN	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	1,006
NM_012073	CCT5	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	0,999
NM_002211	ITGB1	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	0,998
NM_004846	EIF4EL3	eukaryotic translation initiation factor 4E-like 3	0,983
NM_006016	CD164	CD164 antigen, sialomucin	0,979
NM_002046	GAPD	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,973
NM_004209	SYNGR3	synaptogyrin 3	0,965
NM_000581	GPX1	glutathione peroxidase 1	0,962
NM_005606	LGMN	legumain	0,959
AB049940	MRPS5	mitochondrial ribosomal protein S5	0,948
AF372979	ATP10A	ATPase, Class V, type 10A	0,945
BC017452	RFC4	replication factor C (activator 1) 4, 37kDa	0,938
NM_005507	CFL1	cofilin 1 (non-muscle)	0,931
BC029377	DKFZp586G0123	calcium-binding transporter	0,930
NM_000365	TPI1	triosephosphate isomerase 1	0,923

XM_059584		similar to evidence:NAS-hypothetical protein-putative(LOC132299), mRNA.	0,923
BC006543	CCT5	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	0,907
NM_152255	PSMA7	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7	0,899
NM_003404	YWHAB	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide	0,898
AB062294	UBL1	ubiquitin-like 1 (sentrin)	0,889
AK027801	BCDO2	beta-carotene dioxygenase 2	0,885
NM_001762	CCT6A	chaperonin containing TCP1, subunit 6A (zeta 1)	0,884
NM_000291	PGK1	phosphoglycerate kinase 1	0,877
NM_002293	LAMC1	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	0,877
NM_138635	H2AV	histone H2A.F/Z variant	0,871
BC000431		Similar to tubulin alpha 1, clone MGC:8360IMAGE:2819847, mRNA, complete cds.	0,870
NM_015878	OAZIN	ornithine decarboxylase antizyme inhibitor	0,859
NM_005805	PSMD14	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14	0,854
NM_004428	EFNA1	ephrin-A1	0,845
XM_067176	LOC131055	similar to peptidyl-Pro cis trans isomerase	0,845
BC101273	PAICS	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase	0,840
AF161421	LEREP04	likely ortholog of mouse immediate early response, erythropoietin 4	0,840
BC021995	SRP9	signal recognition particle 9kDa	0,836
NM_003091	SNRPB	small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1	0,833
NM_004964	HDAC1	histone deacetylase 1	0,833
NM_005915	MCM6	MCM6 minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe) (S. cerevisiae)	0,832
NM_002790	PSMA5	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 5	0,829
AF077199	LYPLA1	lysophospholipase I	0,828
BC009524	PSMD14	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14	0,827
AF355127	TUBB8-pending	tubulin, beta 8	0,819
AF297747	GMPS	guanine monphosphate synthetase	0,818
NM_006303	JTV1	JTV1 gene	0,812
NM_014423	AF5Q31	ALL1 fused gene from 5q31	0,808
NM_006367	CAP1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	0,803
NM_001067	TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	0,792
NM_005274	GNG5	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 5	0,790
BC030981	HMGB1	high-mobility group box 1	0,781
BC009218	ENO1	enolase 1, (alpha)	0,777
J05016	ERP70	protein disulfide isomerase related protein (calcium-binding protein, intestinal-related)	0,770
NM_005274	GNG5	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 5	0,768
NM_006713	PC4	activated RNA polymerase II transcription cofactor 4	0,766
AF054183	RAN	RAN, member RAS oncogene family	0,749
NM_015932	C13orf12	chromosome 13 open reading frame 12	0,746
AF060511		clone 016b10 My016 protein mRNA, complete cds.	0,732
NM_012145	DTYMK	deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase)	0,732
NM_002046	GAPD	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,731
NM_002786	PSMA1	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1	0,730
D00760	PSMA2	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2	0,728
NM_005648	TCEB1	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1 (15kDa, elongin C)	0,728
NM_004725	BUB3	BUB3 budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (yeast)	0,717
NM_000053	ATP7B	ATPase, Cu++ transporting, beta polypeptide (Wilson disease)	0,707
NM_015449	NICE-3	NICE-3 protein	0,705
BC003375	MRPL3	mitochondrial ribosomal protein L3	0,704
XM_167194		similar to ARP2/3 complex 21 kDa subunit (P21-ARC)(Actin-related protein 2/3 complex subunit 3) (LOC222755), mRNA.	0,690
NM_004324	BAX	BCL2-associated X protein	0,676
AF182290	LSM4	LSM4 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	0,672
NM_003350	UBE2V2	ubiquitinconjugating enzyme E2 variant 2	0,670
XM_170597	LOC256374	similar to peptidylprolyl isomerase A	0,663
NM_003821	RIPK2	receptor-interacting serine-threonine kinase 2	0,662
U91327		chromosome 12p15 BAC clone CIT987SK-99D8 complete sequence.	0,661
NM_013232	PDCD6	programmed cell death 6	0,655
AD001528	SMS	spermine synthase	0,648
NM_006325	RAN	RAN, member RAS oncogene family	0,634
NM_000175	GPI	glucose phosphate isomerase	0,631
NM_002534	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	0,630
BC007104	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	0,630
AB084917	COAS2	cyclophilin-LC	0,628
BC003094	TBCD	tubulin-specific chaperone d	0,626
NM_004047	ATP6V0B	ATPase, H+ transporting, lysosomal 21kDa, V0 subunit c"	0,626
NM_016489	NT5C3	5'-nucleotidase, cytosolic III	0,618
NM_006854	KDELR2	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	0,618
D64154	ADRM1	adhesion regulating molecule 1	0,614
NM_018480	HT007	uncharacterized hypothalamus protein HT007	0,613

NM_000454	SOD1	superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult))	0,611
BC003047	YWHAH	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide	0,609
XM_062890	LOC121981	similar to peptidyl-Pro cis trans isomerase	0,609
BC001741	GLO1	glyoxalase I	0,592
AF148645	RHEB	Ras homolog enriched in brain	0,590
NM_080916	DGUOK	deoxyguanosine kinase	0,588
NM_016139	C7orf17	chromosome 7 open reading frame 17	0,580
NM_003400	XPO1	exportin 1 (CRM1 homolog, yeast)	0,576
NM_005216	DDOST	dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase	0,575
NM_001103	ACTN2	actinin, alpha 2	0,570
NM_002356	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	0,570
NM_007217	PDCD10	programmed cell death 10	0,560
NM_002415	MIF	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	0,555
BC000748	TUBB4	tubulin, beta, 4	0,551
NM_002726	PREP	prolyl endopeptidase	0,493
AL031668/NM_007367/NM_016732	RALY	RNA binding protein (autoantigenic, hnRNP-associated with lethal yellow)	0,474
NM_005796	NUTF2	nuclear transport factor 2	0,470
NM_006082	K-ALPHA-1	tubulin, alpha, ubiquitous	0,455
NM_006863	LILRA1	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 1	0,448
NM_005770	SERF2	small EDRK-rich factor 2	0,446
U31520	MAN2A1	mannosidase, alpha, class 2A, member 1	0,445
NM_006602	TCFL5	transcription factor-like 5 (basic helix-loop-helix)	0,441
NM_006936	SMT3H1	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (yeast)	0,416
NM_002607	PDGFA	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	0,412
NM_017812	FLJ20420	hypothetical protein FLJ20420	0,397
NM_025197	CDK5RAP3	CDK5 regulatory subunit associated protein 3	-0,409
AK128868	AHNAK	AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)	-0,424
NM_004740	TIAF1	TGFB1-induced anti-apoptotic factor 1	-0,441
NM_018849 / NM_018850	ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	-0,456
NM_006139	CD28	CD28 antigen (Tp44)	-0,499
NM_000929	PLA2G5	phospholipase A2, group V	-0,514
BC032800	FXYD1	FXYD domain containing ion transport regulator 1 (phospholemman)	-0,527
NM_006764	IFRD2	interferon-related developmental regulator 2	-0,542
NM_004672/NM_145319	MAP3K6	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	-0,551
NM_000213	ITGB4	integrin, beta 4	-0,561
D38552	KIAA0073	KIAA0073 protein	-0,568
NM_032870	C6orf111	chromosome 6 open reading frame 111	-0,578
AK001842	FLJ10980	hypothetical protein FLJ10980	-0,653
NM_006258	PRKG1	protein kinase, cGMP-dependent, type I	-0,671
NM_018281	FLJ10948	hypothetical protein FLJ10948	-0,704
AJ277460	CLSTN3	calsyntenin 3	-0,738
L36531	ITGA8	integrin, alpha 8	-0,751
NM_000611	CD59	CD59 antigen p18-20 (antigen identified by monoclonal antibodies 16.3A5, EJ16, EJ30, EL32 and G344)	-0,819
NM_003798	CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), alpha-like 1	-0,913
NM_006765	TUSC3	tumor suppressor candidate 3	-0,919
NM_005900	MADH1	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 1 (Drosophila)	-1,047
NM_006206	PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	-1,090
NM_005596	NFIB	nuclear factor I/B	-1,149
AF059617	PLK2	polo-like kinase 2 (Drosophila)	-1,186
NM_000424	KRT5	keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types)	-1,207
NM_004186	SEMA3F	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F	-1,246
NM_001063	TF	transferrin	-1,256
NM_002825	PTN	pleiotrophin (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)	-1,405
AF007162	CRYAB	crystallin, alpha B	-1,590
NM_006485 / NM_006486 / NM_001996	FBLN1	fibulin 1	-1,799
NM_001321	CSRP2	cysteine and glycine-rich protein 2	-1,916
AB000889	PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B	-1,936
NM_003713	PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B	-1,966
S68290	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	-2,102
NM_005978	S100A2	S100 calcium binding protein A2	-2,152
NM_001831	CLU	clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)	-3,606

Additional file 3 - Relative expression levels of *SRI* and *CCT5* in tumors versus matched normal sinusal tissue determined by qRT-PCR



Sixième partie : conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

Nous nous étions fixé trois objectifs pour ce travail de recherche :

1° - faire un état des lieux des différents mécanismes de la cancérogenèse générale et en particulier des mécanismes chimiques afin de pouvoir les relier aux adénocarcinomes de l'ethmoïde. Ceci a été réalisé dans la première partie et, en fin de deuxième partie, nous avons émis l'hypothèse que les constituants du bois de part leur caractère nucléophile capable de se lier à la guanine de l'ADN en formant des adduits, pouvaient jouer un rôle majeur dans la cancérogenèse. Parmi ces constituants, notre analyse fait ressortir les éléments communs suivants : les tannins condensés, les aldéhydes, les composés quinoniques et la 2-6 diméthoxybenzoquinone, de composition proche de la méthoxybenzoquinone, issue du métabolisme du benzène et reconnue pour former des adduits sur l'ADN. Les anciens produits de traitement du bois tels le lindane et le pentachlorophénol doivent aussi être suspectés. Par ailleurs, il persiste aujourd'hui pour les menuisiers et ébénistes une exposition potentielle aux colles urée-formol contenues dans les panneaux de bois ou les contreplaqués.

2° - savoir si les facteurs environnementaux et professionnels en terme de durée, fréquence d'exposition, associés à des facteurs de risque personnels (tabagisme, consommation d'alcool notamment) avaient une influence sur la survie globale de la population sachant que classiquement, les facteurs pronostics analysés sont la taille de la

tumeur, l'atteinte ganglionnaire et le type histologique. Aucune étude jusqu'ici n'avait pris en compte les facteurs environnementaux.

A partir d'une étude rétrospective portant sur 98 patients atteints d'adénocarcinome sinonasal, l'analyse univariée a mis en évidence un lien entre survie globale à 5 ans et consommation de tabac, classification TNM, voie d'abord chirurgicale, éléments cliniques (exophtalmie, diplopie), atteinte de la lame criblée, du sphénoïde et des méninges, contrôle régional de la chirurgie première, chirurgie d'une récurrence pour le cancer de l'ethmoïde.

L'exposition aux solvants ou la durée d'exposition aux poussières de bois ne semblent pas intervenir comme facteur pronostic de survie.

L'analyse multivariée sur la survie globale a mis en évidence quatre variables indépendantes : le stade de la tumeur au moment du diagnostic, la consommation de tabac, l'exposition aux métaux et la voie d'abord chirurgicale. L'exposition au tabac durant la carrière professionnelle ayant un rôle négatif en diminuant la survie, l'exposition aux métaux améliorant la survie. Pour la survie spécifique, seule le type de voie d'abord chirurgicale et l'extension locale de la tumeur restent des facteurs significatifs indépendants. Ceci validant la prise en charge des patients par nos collègues chirurgiens.

Concernant la genèse des adénocarcinomes de l'ethmoïde au sein de notre population, nous avons retrouvé l'exposition aux poussières de bois chez tous les sujets à l'exception d'un boulanger exposé 46 ans à la poussière de farine ainsi qu'une femme de 31 ans agent de bureau porteuse d'une aspergillose sinusienne et trois professionnels de la chaussure. Ceci plaide en faveur du rôle propre de la poussière organique qui probablement par un phénomène de contact prolongé avec les muqueuses provoque une réaction inflammatoire.

Parmi les 98 patients, sept présentaient soit un antécédent d'adénome du colon (3 cas), soit un antécédent personnel de cancer colique (4 cas); l'un d'entre eux, non-fumeur, a développé un cancer bronchique et un cancer du colon associé au cancer de l'ethmoïde. Le rôle des poussières de bois doit être aussi suspecté. Ceci devrait conduire, si nos résultats sont validés sur une plus grande série, à proposer un dépistage systématique des cancers associés en particulier la recherche de cancer digestif chez les salariés exposés aux poussières de bois.

Il est remarquable de constater que l'adénocarcinome de l'ethmoïde prend naissance sur un épithélium respiratoire, que lorsqu'il est de type intestinal il est quasiment toujours lié à une exposition aux poussières de bois, et qu'enfin il existe une grande similitude histologique entre adénocarcinome de l'ethmoïde et adénocarcinome colique. On peut là aussi s'interroger sur le rôle des tannins et des substances carcinogènes associées dans la genèse de

l'adénocarcinome de l'ethmoïde de type ITAC et sur leur rôle dans la transformation métabolique de l'épithélium respiratoire en épithélium de type colique.

3° - enfin, les données bibliographiques internationales ne faisant pas d'analyse globale du profil d'expression génique dans l'adénocarcinome de l'ethmoïde, nous nous étions fixé deux objectifs principaux :

- a) identifier des marqueurs pouvant servir au diagnostic précoce de l'adénocarcinome de l'ethmoïde; ceci pouvant venir compléter la nasofibroscopie proposée aux salariés exposés aux poussières de bois suivant le référentiel de recommandations soumis à la HAS ;
- b) identifier des nouvelles cibles thérapeutiques puisque les molécules classiques de la chimiothérapie anticancéreuse sont inefficaces dans cette pathologie.

Nous avons ainsi réalisé une étude transcriptomique à partir de puces à ADN dédiées. Elle a permis d'individualiser 186 gènes sur ou sous exprimés parmi 6864 testés, dont deux gènes non décrits dans la littérature, concernant l'adénocarcinome de l'ethmoïde : le gène de la *GALECTINE* sur exprimé et le gène de la *CLUSTERINE* sous exprimé. Cette technique a été complétée par une étude en Q-RT-PCR et immunohistochimie qui a validé ces résultats. Ceci m'a conduit à émettre à une hypothèse concernant les mécanismes toxicologiques des poussières de bois et de leurs composants qui induiraient la répression de la clusterine, protéine de surface cellulaire. L'hyperexpression de la galectine S4, protéine de transport des glycoprotéines du cytosol vers les membranes cellulaires pourrait intervenir comme mécanisme de défense. Ces hypothèses devront être évaluées par des études fonctionnelles complémentaires afin de préciser s'il s'agit de mécanismes purement génétiques ou épigénétiques.

La *GALECTINE* étant un marqueur de surface cellulaire, celui-ci pourrait être proposé pour un dépistage de routine chez les salariés exposés dans la mesure où elle serait confirmée sur tissu dysplasique à partir de frottis de la muqueuse nasale. Nous avons montré dans la première étude qu'il existe une corrélation très étroite entre âge du diagnostic et âge du décès ($R = 0,8$; $p < 0,005$). Il conviendrait de proposer un dépistage de la population exposée à partir de 40 ans selon nos résultats. Enfin, l'hyperexpression de la galectine pourrait aussi

servir aussi au développement de cibles thérapeutiques, si des anticorps antigalectines circulants sont mis en évidence chez les patients atteints de ce cancer.

Une question reste en suspend, c'est celle de la similitude anatomopathologique entre cancer du colon et adénocarcinome de l'éthmoïde qui naît sur une muqueuse respiratoire, ce d'autant que nous avons mis en évidence une forte prévalence de cancer du colon, voire de deuxième cancer dans nos deux études. Notre étude n'a pas permis, comme dans d'autres études publiées jusqu'ici, d'individualiser des variations d'expression génique communément retrouvées dans les cancers coliques. La question du rôle des poussières de bois ou des adjuvants reste à explorer. Notre étude plaide en faveur d'un lien entre exposition aux poussières organiques et adénocarcinome de type colique et sur un rôle spécifique des poussières de bois dans la différenciation tissulaire au cours des différentes étapes de la cancérogenèse.

Perspectives

Optimisation de la prévention et de la prise en charge des cancers nasosinusiens en médecine du travail

Les résultats de notre étude peuvent concourir à l'optimisation du suivi des salariés exposés aux poussières de bois et de la prise en charge des cancers nasosinusiens. C'est pourquoi je présente ci-dessous mes propositions dans le cadre de la prévention primaire, secondaire et tertiaire actuellement mise en place.

Prévention primaire

La priorité doit être donnée à l'éviction de sources cancérogènes ou à leur substitution lorsque cela est possible. Ceci doit être mis en place en ce qui concerne les colles urée-formol toujours utilisées dans la fabrication des panneaux et contreplaqués.

Prévention secondaire

Les résultats de notre deuxième étude répondent en partie aux suggestions de l'HAS quant au développement de techniques de diagnostic précoce de l'adénocarcinome nasosinusal. En effet le frottis nasal pourrait venir compléter la nasofibroscopie. Celui-ci pourrait-être complété par le test des micronoyaux, le test des comètes et la recherche d'adduits de l'ADN. Ceci peut faire l'objet de projet de recherches complémentaires avec des équipes spécialisées tel que celles du Laboratoire de biogénotoxicologie de Monsieur le Professeur Botta.

Le groupe de travail de la HAS a récemment proposé que « le protocole de dépistage par nasofibroscopie soit proposé au-delà de la **trentième année** après le début de l'exposition » ; et il s'adresse à tout travailleur ayant été exposé aux poussières de bois pendant plus de **12 mois cumulés** lors de tâches d'usinage du bois (sciage, fraisage, rabotage, perçage, ponçage) ou lors de toute activité documentée exposant à une concentration de poussières de bois de plus de 1 mg/m^3 mesurée sur 8 heures. Nos résultats viennent nuancer cette proposition et nous considérons au vue de notre première étude que le dépistage doit être proposé **dès la vingtième année** après le début de l'exposition, soit **dès l'âge de 40 ans** si l'on considère que les premières expositions à risque débutent après la période d'apprentissage très réglementée actuellement.

Les résultats de notre deuxième étude doivent aussi conduire à proposer un dépistage systématique des cancers digestifs à la population régulièrement exposée aux poussières de bois.

Prévention tertiaire

Les résultats de la première étude nous interrogent quant au nombre de déclarations des maladies professionnelles : en effet, seulement 62,37 % des sujets ont bénéficié d'une déclaration en maladie professionnelle. Parmi ceux-ci 10,4 % n'ont pas été reconnu en maladie professionnelle : cela s'explique par le fait que notre système d'Assurance Maladie ne prend pas en charge en maladie professionnelle, ni les artisans, ni les employeurs. Une autre explication à l'insuffisance de déclaration de maladies professionnelles vient de l'absence de tableau de maladie professionnelle pour certains travaux, en effet dans notre

première étude, aucune déclaration n'a été réalisée pour les patients exposés aux tannins du cuir.

Il conviendrait donc d'optimiser notre système de déclaration de maladie professionnelle :

- l'adénocarcinome de l'ethmoïde survenant dans les métiers du cuir devrait être systématiquement déclaré et reconnu en maladie professionnelle, le tableau 47B pourrait être modifié en incluant les métiers exposant aux poussières de cuir.
- les artisans sont les plus touchés par la maladie et à ce titre, ils devraient pouvoir bénéficier de la reconnaissance en maladie professionnelle.

Le suivi post-professionnel est important aussi bien dans le cadre de la reconnaissance que dans la prise en charge de la maladie professionnelle. Pour cela la législation prévoit que les salariés disposent d'une attestation d'exposition aux poussières de bois signée par leur employeur lorsqu'ils quittent l'entreprise. Ils peuvent alors bénéficier d'une prise en charge par l'Assurance Maladie avec suivi au titre de la surveillance post professionnelle.

Il est actuellement recommandé, au titre de la surveillance post professionnelle, à titre provisoire, et dans l'attente d'une évaluation complémentaire, de faire pratiquer par le correspondant ORL un examen nasofibroscopique annuel en dépistage ciblé en fonction de données d'exposition transcrites sur l'attestation d'exposition remise au travailleur à l'issue de l'activité professionnelle. Le frottis nasal pourrait venir compléter ces examens si nos résultats sont confirmés.

Recherche épidémiologique

Les résultats de la première étude peuvent ouvrir deux voies de recherche sur le plan épidémiologique :

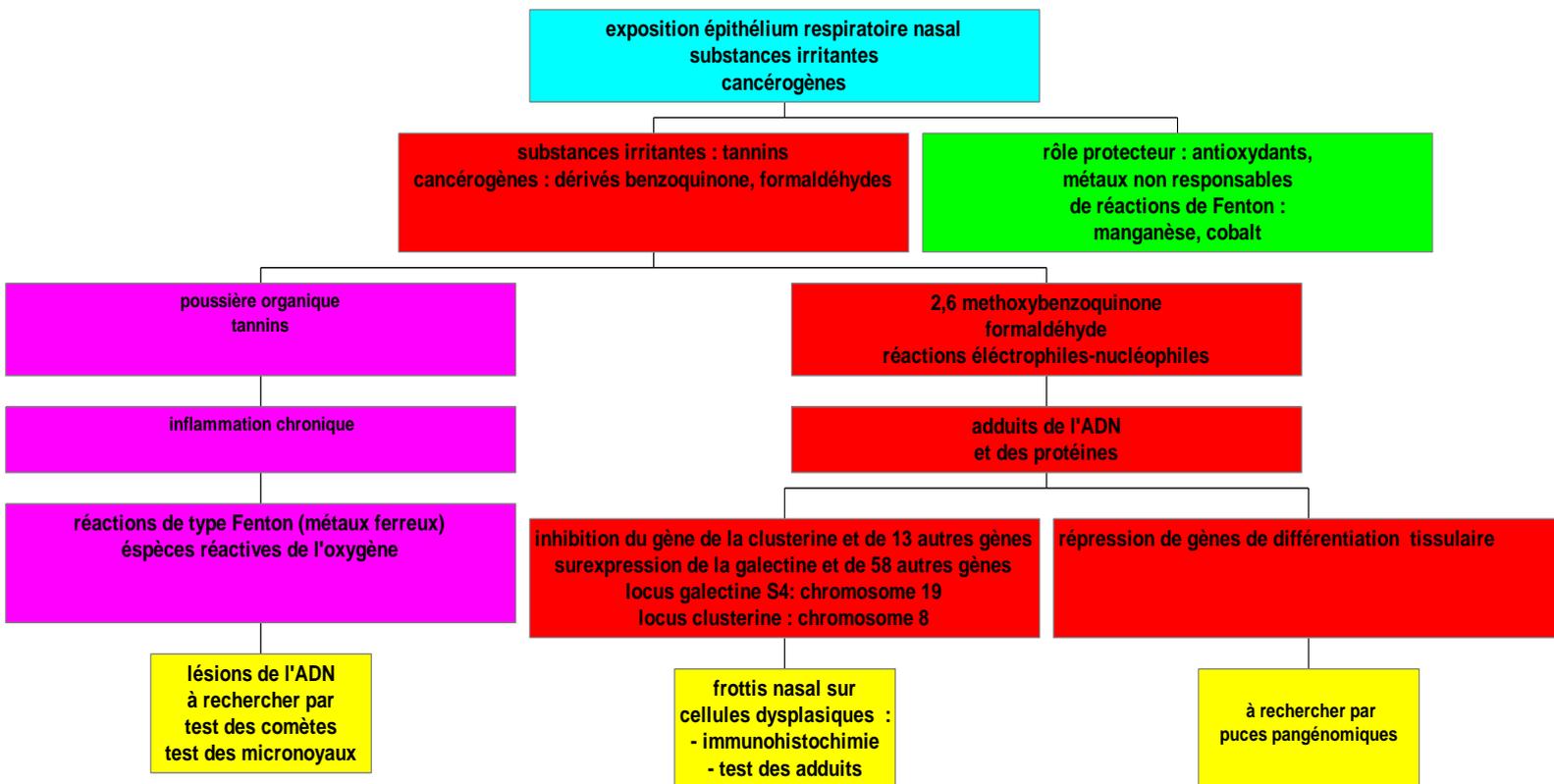
- recherche sur une large population de l'association cancer de l'ethmoïde – cancer du colon : étude cas-témoin ou étude de cohorte
- recherche de l'impact des facteurs environnementaux chez les patients présentant plusieurs cancers associés

Recherche fondamentale

Deux axes de recherche peuvent être proposés dans la suite de mes travaux

- Le premier dans l'objectif de confirmer nos marqueurs dans le diagnostic précoce de l'adénocarcinome de l'éthmoïde de type intestinal. Il conviendrait de disposer de tissus de type dysplasiques chez des salariés exposés aux poussières de bois. Des études en cours menées à Rennes et Nantes évaluant l'intérêt de l'IRM comparativement à la nasofibroscopie dans le cadre du diagnostic précoce du cancer de l'éthmoïde pourraient servir de recrutement de patients présentant des polypes (15 cas actuellement sur 120 salariés suivis au CHU de Nantes). Un groupe témoin de sujets présentant des polypes et non exposé aux poussières de bois serait aussi nécessaire afin de valider nos marqueurs.
- Il serait aussi intéressant de compléter notre travail par une étude immunohistochimique de la galectine et de la clusterine sur les tissus des 98 patients dont les données de survie sont connues et qui ont fait l'objet de la première étude de survie globale et spécifique présentée ici. Ceci permettrait de corrélérer ces marqueurs à la survie mais aussi au degré d'exposition des patients aux facteurs de risque cancérogène.

Synthèse générale : hypothèses sur les mécanismes entrant en jeu lors de la cancérogenèse chez des sujets exposés aux poussières de bois et perspectives de recherche



Références bibliographiques

Acheson ED, Codwell RH, Hadfield E, Macbeth RG. Nasal cancer in the woodworkers in the furniture industry. *Br Med J* 1968;**2**:587-96

Acheson ED, Cowdell RH, Rang EH. Nasal cancer in England and Wales: an occupational survey. *Br J Ind Med* 1981;**38**:218-24

Ahlbom A, Green A, Kheifets L, Savitz D, *et al.* Epidemiology of health effects of radiofrequency exposure. *Environ Health Perspect* 2004;**112**:1741-54

Alevizos I, Mahadevappa M, Zhang X, Ohyama H, *et al.* Oral cancer in vivo gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis. *Oncogene* 2001;**20**:6196-204

Alvarez I, Suarez C, Rodrigo JP, Nunez F, *et al.* Prognostic factors in paranasal sinus cancer. *Am J Otolaryngol* 1995;**16**:109-14

Andersen A, Barlow L, Engeland A, Kjaerheim K, *et al.* Work-related cancer in the Nordic countries. *Scand J Work Environ Health* 1999;**25**(Suppl 2):1-116

Andersen CL, Schepeler T, Thorsen K, Birkenkamp-Demtroder K, *et al.* Clusterin Expression in Normal Mucosa and Colorectal Cancer. *Mol Cell Proteomics* 2007;**6**:1039-48

Aouba A, Péquignot F, Le Toullec A, Jouglu E. Les causes médicales de décès en France en 2004 et leur évolution 1980-2004. Numéro thématique In: Surveillance épidémiologique des causes de décès en France - *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*. Institut de Veille Sanitaire; *BEH* n° 35-36 du 18/09/2007:309,12 p.

Ariza M, Llorente JL, Alvarez-Marcas C, Baragano L, *et al.* Comparative genomic hybridization in primary sinonasal adenocarcinomas. *Cancer* 2004;**100**:335-41

- Augustsson K, Skog K, Jagerstad M, Dickman PW, *et al.* Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: a population-based study. *Lancet* 1999;**353**:703-7
- Bager Y, Kenne K, Krutovskikh V, Mesnil M, *et al.* Alteration in expression of gap junction proteins in rat liver after treatment with the tumour promoter 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl. *Carcinogenesis* 1994;**15**:2439-43
- Baldwin RT, Preston-Martin S. Epidemiology of brain tumors in childhood -a review. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;**199**:118-31
- Barnes L. Intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Am J Surg Pathol* 1986;**10**:192-202
- Barnes L, Johnson JT. Clinical and pathological considerations in the evaluation of major head and neck specimens resected for cancer. Part II. *Pathol Annu* 1986;**21**:83-110
- Belbin TJ, Singh B, Barber I, Socci ND, *et al.* Molecular classification of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays. *Cancer Res* 2002;**62**:1184-90
- Bonnetterre V, Deschamps E, Persoons R, Bernardet C, *et al.* Sino-nasal cancer and exposure to leather dust. *Occup Med (Lond)* 2007;**57**:438-43
- Bornholdt J, Hansen J, Steiniche T, Dictor M, *et al.* K-ras mutations in sinonasal cancers in relation to wood dust exposure. *BMC Cancer* 2008;**8**:53
- Botta A - Contribution des tests à court terme. In : Pairon JC, Brochard P, Le Bourgeois JP, Ruffié P- Les cancers professionnels. Tome I. Paris : Ed. Margaux Orange; 2005:146-52,688p.
- Brinton LA, Blot WJ, Becker TA, Winn DM, *et al.* A case-control study of cancers of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Am J Epidemiol* 1984;**119**:896-906
- Brinton LA, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. Nasal cancer in the textile and clothing industries. *Br J Ind Med* 1985;**42**:469-74
- Brody JG, Rudel RA. Environmental pollutants and breast cancer. *Environ Health Perspect* 2003;**111**:1007-19
- Budavari S. The Merck Index. 12^{éd.} White House Station, New Jersey: Merck & Co Inc; 1996,2300p.
- Bulatao-Jayme J, Almero EM, Castro MC, Jardeleza MT, *et al.* A case-control dietary study of primary liver cancer risk from aflatoxin exposure. *Int J Epidemiol* 1982;**11**:112-9
- Bunin GR. Non genetic causes of childhood cancers: evidence from international variation, time trends, and risk factor studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;**199**:91-103
- Bussi M, Gervasio CF, Riontino E, Valente G, *et al.* Study of ethmoidal mucosa in a population at occupational high risk of sinonasal adenocarcinoma. *Acta Otolaringol* 2002;**122**:197-201

Byczkowski JZ, Kulkarni AP. Lipid peroxidation and benzo(a)pyrene derivative co-oxygenation by environmental pollutants. *Bull Environ Contam Toxicol* 1990;**45**:633-40

Chen R, Rabinovitch PS, Crispin DA, Emond MJ, *et al.* The initiation of colon cancer in a chronic inflammatory setting. *Carcinogenesis* 2005;**26**:1513-9

Choussy O, Ferron C, Védrine PO, Toussaint B, *et al.* GETTEC Study Group. Adenocarcinoma of ethmoid: a GETTEC retrospective multicenter study of 418 cases. *Laryngoscope* 2008;**118**:437-43

Christensen HC, Schüz J, Kosteljanetz M, Poulsen HS, *et al.* Cellular phone a risk of neurinoma. *Am J Epidemiol* 2004;**159**:277-83

Clapp R, Howe G, Jacobs Lefevre M. Environmental and occupational causes of cancer. A review of Recent Scientific Literature. Massachusetts : Lowell Center, 2005:46 p.

Clevers H. At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell* 2004;**118**:671-4

Cocco P, Heineman EF, Dosemeci M. Occupational risk factors for cancer of the central nervous system (CNS) among US women. *Am J Ind Med* 1999;**36**:70-4

Cohen M, Latta D, Coogan T, Costa M. Mechanisms of metal carcinogenesis: the reaction of metals with nucleid acids. In: Foulkes EC (ed) - Biological effects of heavy metals. Vol II, Metal Carcinogenesis. Floride CRC Press: Boca Raton; 1990:19-76

Collins JJ, Acquavella JF, Esmen NA. An updated meta-analysis of formaldehyde exposure and upper respiratory tract cancers. *J Occup Environ Med* 1997;**39**:639-51

Colt JS, Blair A. Parental occupational exposures and risk of childhood cancer. *Environ Health Perspect* 1998;**106**(Suppl 3):909-25

Comba P, Battista G, Belli S, de Capua B, *et al.* A case-control study of cancer of the nose and paranasal sinuses and occupational exposures. *Am J Ind Med* 1992;**22**:511-20

Comstock KE, Widersten M, Hao XY, Henner WD, *et al.* A comparison of the enzymatic and physicochemical properties of human glutathione transferase M4-4 and three other human mu class enzymes. *Arch Biochem Biophys* 1994;**311**:487-95

Concha G, Nermell B, Vahter MV., Metabolism of inorganic arsenic in children with chronic high arsenic exposure in northern Argentina. *Environ Health Perspect* 1998;**106**:355-9

Daniels JL, Olshan AF, Savitz DA. Pesticides and childhood cancers. *Environ Health Perspect* 1997;**105**:1068-77

Davis DL, Blair A, Hoel DG. Agricultural exposures and cancer trends in developed countries. *Environ Health Perspect* 1993;**100**:39-44

De Flora S, Wetterhahn KE. Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity. *Life Chem Resp* 1990;**2**:78-84

Demers PA, Boffetta P, Kogevinas M, Blair A, *et al.* Pooled reanalysis of cancer mortality among five cohorts of workers in wood-related industries. *Scand J Work Environ Health* 1995;**21**:179-90

Demers PA, Kogevinas M, Boffetta P, Leclerc A, *et al.* Wood dust and sino-nasal cancer: pooled reanalysis of twelve case-control studies. *Am J Ind Med* 1995;**28**:151-66

Denning DW, Allen R, Wilkinson AP, Morgan MR. Transplacental transfer of aflatoxin in humans. *Carcinogenesis* 1990;**11**:1033-5

Dich J, Zahm SH, Hanberg A, Adami H. Pesticides and cancer. *Cancer Causes Control* 1997;**8**:420-43

Dix TA, Marnett LJ. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives to ultimate carcinogens during lipid peroxidation. *Science* 1983;**221**:77-9

Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981;**66**:1191-308

Douglas EJ, Fiegler H, Rowan A, Halford S, *et al.* Array comparative genomic hybridization analysis of colorectal cancer cell lines and primary carcinomas. *Cancer Res* 2004;**64**:4817-25

Dulguerov P, Jacobsen MS, Allal AS, Lehmann W, *et al.* Nasal and paranasal sinus carcinoma: are we making progress? A serie of 220 patients and a systematic review. *Cancer* 2001;**92**:3012-29

Eastmond DA, Smith MT, Irons RD. An interaction of benzene metabolites reproduces the myelotoxicity observed with benzene exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987;**91**:85-95

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**:14863-8

Ellenhorn MJ, Barceloux DG. Medical toxicology: diagnosis and treatment of human poisoning. New York: Elsevier; 1988, 1512p.

Fiddler W. The occurrence and determination of *N*-nitroso compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975;**31**:352-60

Fink TM, Zimmer M, Tschopp J, Etienne J *et al.* Human clusterin (CLI) maps to 8p21 in proximity to the lipoprotein lipase (LPL) gene. *Genomics* 1993;**16**:526-8

Fontaine B – L'industrie du bois. In : Pairon JC, Brochard P, Le Bourgois JP, Ruffié P- Les cancers professionnels. Tome II. Paris : Margaux Orange; 2005:262-75,580p.

Fontana L, Liétin B, Catilina P, Devif C, *et al.* Occupational exposure to wood dust and nasal sinus cancer. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 2008;**125**:65-71

Franchi A, Santucci M, Wenig B. Adenicarcinoma. In: Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D (eds) - World Health Organisation classification of tumours. Pathology and genetics of head and necks tumours. Lyon: IARC; 2005:20-3

Frattini M, Perrone F, Suardi S, Balestra D, *et al.* Phenotype-genotype correlation : challenge of intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and prenasal sinuses. *Head Neck* 2006;**28**:909-15

Gallo O, Franchi A, Fini-Storchi I, Cilento G, *et al.* Prognostic significance of c-erbB2 oncoprotein expression in intestinal-type adenocarcinoma of the sinonasal tract. *Head Neck* 1998;**20**:224-31

Garabrant DH, Philbert MA. Review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) epidemiology and toxicology. *Crit Rev Toxicol* 2002;**32**:233-57

Gassler N, Schneider A, Kopitz J, Schnolzer M, *et al.* Impaired expression of acyl-CoA-synthetase 5 in epithelial tumors of the small intestine. *Hum Pathol* 2003;**34**:1048-52

Gassler N, Yang SH, Keith M, Helmke BM, *et al.* Expression of acyl-CoA synthetase 5 in human endometrium and in endometrioid adenocarcinomas. *Histopathology* 2005;**47**:501-7

Goodman M, Morgan RW, Ray R, Malloy CD, *et al.* Cancer in asbestos-occupational cohorts: a meta-analysis. *Cancer Causes Control* 1999;**10**:453-65

Gosselin RE, Smith RP, Hodge HC. Clinical toxicology of commercial products. 5^{éd.} Baltimore: Williams & Wilkins; 1984

Götte K, Riedel F, Schäfer C, Coy J, *et al.* Cylindrical cell carcinomas of the paranasal sinuses do not show p53 alterations but loss of heterozygosity at 3p and 17p. *Int J Cancer* 2000;**85**:740-2

Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2008;**135**:1079-99

Grau C, Jakobsen MH, Harbo G, Svane-Knudsen V, *et al.* Sino-nasal Cancer in Denmark 1982-1991-a nationwide survey. *Acta Oncol* 2001;**40**:19-23

Guengerich FP, Geiger LE, Hogg LL, Wright PL. In vitro metabolism of acrylonitrile to 2-cyanoethylene oxide, reaction with glutathione, and irreversible binding to proteins and nucleic acids. *Cancer Res* 1981;**41**:51-6

Gupta MM, Dani HM. Characterization of tannic acid metabolites formed in vitro by rat liver microsomes and assay of their carcinogenicity by the microsomal degranulation technique. *Chem Biol Interact* 1987;**63**:39-45

Han JH, Choi CS, Kim MY, Chun YJ. Differential gene expression by styrene in rat reproductive tissue. *J Toxicol Environ Health A* 2007;**70**:1259-63

Hardell L, Johansson B, Axelson O. Epidemiological study of nasal and nasopharyngeal cancer and their relation to phenoxy acid or chlorophenol exposure. *Am J Ind Med* 1982;**3**:247-57

- Hayes RB, Raatgever JW, de Bruyn A, Gerin M. Cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses and formaldehyde exposure. *Int J Cancer* 1986;**37**:487-92
- Hayes RB, Gerin M, Raatgever JW, de Bruyn A. Wood-related occupations, wood dust exposure. and sinonasal cancer. *Am J Epidemiol* 1986;**124**:569-77
- Heinzelmann-Schwarz VA, Gardiner-Garden M, Henshall SM, Scurry JP, *et al.* A distinct molecular profile associated with mucinous epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2006;**94**:904-13
- Henderson RF. Species differences in the metabolism of benzene. *Environ Health Perspect.* 1996;**104** (Suppl 6):1173-5
- Hermesen M, Postma C, Baak J, Weiss M, *et al.* Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* 2002;**123**:1109-19
- Hernberg S, Westerholm P, Schultz-Larsen K, Degerth R, *et al.* Nasal and sinonasal cancer. Connection with occupational exposures in Denmark, Finland and Sweden. *Scand J Work Environ Health* 1983;**9**:315-26
- Higginson J, Muir CS. Determination of the importance of environmental factors in human cancer: the role of epidemiology. *Bull Cancer* 1977;**64**:365-84
- Holmila R, Cyr D, Luce D, Heikkilä P, *et al.* COX-2 and p53 in human sinonasal cancer: COX-2 expression in associated with adenocarcinoma histology and wood-dust exposure. *Int J Cancer* 2008;**122**:2154-9
- Houzelstein D, Gonçalves IR, Fadden AJ, Sidhu SS, *et al.* Phylogenetic Analysis of the Vertebrate Galectine Family. *Mol Biol Evol* 2004;**21**:1177-87
- Hsieh SY, Chen WY, Shih TC, Yeh JY, *et al.* Dys-regulation of clusterin in human hepatoma is not associated with tumorigenesis but is secondary to cell response to external stresses. *Mol Carcinog* 2005;**43**:100-7
- Huang RN, Ho JC, Yih LH, Lee TC. Sodium arsenite induces chromosome endoreplication and inhibits protein phosphate activity in human fibroblasts. *Environ Mol Mutagen* 1995;**25**:188-96
- Huang X, Zhuang Z, Frenkel K, Klein CB, *et al.* The role of nickel and nickel-mediated reactive oxygen species in the mechanism of nickel carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1994;**102**:281-4
- Huflejt ME, Jordan ET, Gitt MA, Barondes SH, *et al.* Strikingly different localization of galectin-3 and galectin-4 in human colon adenocarcinoma T84 cells. Galectin-4 is localized at sites of cell adhesion. *J Biol Chem* 1997;**272**:14294-303
- Huflejt ME, Leffler H. Galectin-4 in normal tissues and cancer. *Glycoconj J* 2004;**20**:247-55
- Hwang D, Alevizos I, Schmitt WA, Misra J, *et al.* Genomic dissection for characterization of cancerous oral epithelium tissues using transcription profiling. *Oral Oncol* 2003;**39**:259-68

IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. Leather industries: boot and shoe manufacture and repair. In : Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. 1987;(Suppl)**7**:232-7

IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. Chromium, nickel and welding. 1990;**49**:1-648

IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. Wood dust and formaldehyde. 1995;**62**:1-440

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Non-ionizing radiation. Part 1: static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2002;**80**:1-395

Ideo H, Seko A, Yamashita K. Galectin-4 binds to sulfated glycosphingolipids and carcinoembryonic antigen in patches on the cell surface of human colon adenocarcinoma cells. *J Biol Chem* 2005;**280**:4730-7

Iwatsubo Y, Pairon JC, Boutin C, Ménard O, *et al.* Pleural mesothelioma: dose-response relation at low level of asbestos exposure in a French population-based case control study. *Am J Epidemiol* 1998;**148**:133-42

Jacobs JM, Nichols CE, Andrew AS, Marek DE, *et al.*, Effect of arsenite on induction of CYP 1A, CYP 2B, and CYP 3A in primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicol Appl Toxicol* 1999;**157**:51-9

Jager JW, Ostroski-Wegman P. Arsenic : a paradoxal human carcinogen. *Mutat Res* 1997;**386**:181-4

Jankowski R, Georgel T, Vignaud JM, Hemmaoui B, *et al.* Endoscopic surgery reveals that woodworkers' adenocarcinomas originate in the olfactory cleft. *Rhinology* 2007;**45**:308-14

Jegoux F. Adénocarcinomes de l'ethmoïde : expérience nantaise (80 cas). Place de la résection de la base du crâne par voie transfaciale. Thèse médecine Nantes, 2002, p.49

Kane AB. Mechanisms of mineral fibre carcinogenesis. In: IARC Sci Publ 1996;(140):11-34

Keating GA, Layton DW, Felton JS. Factors determining dietary intakes of heterocyclic amines in cooked foods. *Mutat Res* 1999;**443**:149-56

Kleinsasser O, Schroeder HG. Adenocarcinomas of the inner nose after exposure to wood dust. Morphological findings and relationships between histopathology and clinical behavior in 79 cases. *Arch Otorhinolaryngol* 1988;**245**:1-15

Kleinsasser O, Schroeder HG. What's new in tumours of the nasal cavity? Adenocarcinomas arising after exposure to wood dust. *Pathol Res Pract* 1989;**184**:554-8

Klokov D, Criswell T, Leskov KS, Araki S, *et al.* IR-inducible clusterin gene expression: a protein with potential roles in ionizing radiation-induced adaptive responses, genomic instability, and bystander effects. *Mutat Res* 2004;**568**:97-110

Koop DR, Laethem CL, Schnier GG. Identification of ethanol-inducible P450 isozyme as a benzene and phenol hydroxylase. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989;**98**:278-88

Korinth D, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Hattenberger S, *et al.* Chromosomal imbalances in wood dust-related adenocarcinomas of the inner nose and their associations with pathological parameters. *J Pathol* 2005;**207**:207-15

Kraus DH, Sterman BM, Levine HL, Wood BG, *et al.* Factors influencing survival in ethmoid sinus cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;**118**:368-72

Landrigan PJ, Boffetta P, Apostoli P. The reproductive toxicity and carcinogenicity of lead: a critical review. *Am J Ind Med* 2000;**38**:231-43

Laroque G, Fontaine B, Lemaître L, Frimat P- Le dépistage des pathologies naso-sinusiennes chez les salariés exposés aux poussières de bois : expérience lilloise. In : 28^{ème} Journées du BTP – Nice, 2005

Lawrence RM, Sweetman GMA, Tavares R, Farmer PB. Synthesis and characterisation of peptide adducts for use in monitoring human exposure to acrylonitrile and ethylene oxide. *Teratog Carcinog Mutag* 1996;**16**:139-48

Le Bodic MF, Barreau L, Champion L. Incidence des cancers en Loire Atlantique. Années 1998-1999-2000. Registre des cancers de Loire-Atlantique. Nantes : ARCLA, Association du Registre des Cancers de Loire Atlantique; 2002:77p.

Leclerc A, Martinez CM, Genin M, Luce D, *et al.* Sinonasal cancer and wood dust exposure. Results from a case-control study. *Am J Epidemiol* 1994;**140**:340-9

Leclerc A, Luce D, Demers PA, Boffetta P, *et al.* Sinonasal cancer and occupation. Results from the reanalysis of twelve case-control studies. *Am J Ind Med* 1997;**31**:153-65

Lee YW, Klein CB, Kargacin B, Salnikow K, *et al.* Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation. A new model for epigenetic carcinogens. *Mol Cell Biol* 1995;**15**:2547-57

Lefranc F, Mijatovic T, Decaestecker C, Kaltner H, *et al.* Monitoring the expression profiles of integrins and adhesion/growth-regulatory galectins in adamantinomatous craniopharyngiomas: their ability to regulate tumor adhesiveness to surrounding tissue and their contribution to prognosis. *Neurosurgery* 2005; **56**:763-76

Le Meur N, Lamirault G, Bihouée A, Steenman M, *et al.* A dynamic, web accessible resource to process raw microarray scan data into consilated gene expression value : importance of replication. *Nucl Acids Res* 2004;**32**:5349-58

Li JH, Rossmann TG. Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. *Mol Toxicol* 1989;**2**:1-9

Li M, Zhu Q, Hu CW, Chen L, Liu ZL *et al.* Cobalt and manganese stress in microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae): effects on lipid peroxidation and antioxydant enzymes. *J Environ Sci.* 2007; **19**:1330-5

- Licitra L, Suardi S, Bossi P, Locati LD, *et al.* Prediction of *TP53* status for primary cisplatin, fluorouracil, and leucovorin chemotherapy in ethmoid sinus intestinal-type adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2004;**22**:4901-6
- Liétin B, Mom T, Avan P, Llompart X, *et al.* Adenocarcinomas of the ethmoid sinus: retrospective analysis of prognostic factors. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 2006;**123**:211-20
- Lioy PJ, Greenberg A. Factors associated with human exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Ind Health* 1990;**6**:209-23
- Llorente JL, Nunez F, Rodrigo JP, Fernandez Leon R, *et al.* Sinonasal adenocarcinoma. Our experience. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2008;**59**:235-8
- Llorente JL, Pérez-Escuredo J, Alvarez-Marcos C, Suárez C, *et al.* Genetic and clinical aspects of wood dust related intestinal-type sinonasal adenocarcinoma: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009;**266**:1-7. Epub 2008 Jun17
- Loch-Caruso R, Galvez MM, Brant K, Chung D. Cell and toxicant specific phosphorylation of connexin 43: effects of lindane and TPA on rat myometrial and WB-F344 liver cell gap junctions. *Cell Biol Toxicol* 2004;**20**:147-69
- Lönn S, Ahlbom A, Hall P, Feychting M. Mobile phone use and the risk of acoustic neuroma. *Epidemiology*. 2004;**15**:653-9
- Luce D, Leclerc A, Morcet JF, Casal-Lareo A, *et al.* Occupational risk factors for sino-nasal cancer a case-control study in France. *Am J Ind Med* 1992;**21**:163-75
- Luce D, Gerin M, Leclerc A, Morcet JF, *et al.* Sinonasal cancer and occupation exposure to formaldehyde and other substances. *Int J Cancer* 1993;**53**:224-31
- Luce D, Leclerc A, Bégin D, Demers PA, *et al.* Sinonasal cancer and occupational exposures: a pooled analysis of 12 case-control studies. *Cancer Causes Control* 2002;**13**:147-57
- Lund VJ, Howard DJ, Wei WI, Cheesman AD. Craniofacial resection for tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses. A 17 years experience. *Head Neck* 1998;**20**:97-105
- Lynge E, Anttila A, Hemminki K. Organic solvents and cancer. *Cancer Causes Control* 1997;**8**:406-19
- Magnani C, Comba P, Ferraris F, Ivaldi C, *et al.* A case-control study of carcinomas of the nose and paranasal sinuses in the woolen textile manufacturing industry *Arch Environ Health* 1993;**48**:94-7
- McKinney CD, Mills SE, Franquemont DW. Sinonasal intestinal-type adenocarcinoma: immunohistochemical profile and comparison with colonic adenocarcinoma. *Mod Pathol* 1995;**8**:421-6

Merler E, Baldasseroni A, Laria R, Faravelli P, *et al.* On the causal association between exposure to leather dust and nasal cancer: further evidence from a case-control study. *Br J Ind Med* 1986;**43**:91-5

Mirvish SS. 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* 1995;**93**:17-48

Mueller O, Lightfoot S, Schroeder A. RNA integrity Number (RIN)- Standardisation of RNA Quality Control. Publication Number 5989-1165EN

Nakao K, Mehta KR, Fridlyand J, Moore DH, *et al.* High-resolution analysis of DNA copy number alterations in colorectal cancer by array-based comparative genomic hybridization. *Carcinogenesis* 2004;**25**:1345-57

Navas-Acien A, Pollan M, Gustavsson P, Plato N. Occupation, exposure to chemicals and risk of gliomas and meningiomas in Sweden. *Am J Ind Med* 2002;**42**:214-27

Nazar G, Gonzalez MV, Garcia JM, Llorente JL, *et al.* Amplification of CCND1, EMS1, PIK3CA, and ErbB oncogenes in ethmoid sinus adenocarcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;**135**:135-9

Nunez F, Suarez C, Alvarez I, Losa JL, *et al.* Sino-nasal adenocarcinoma ; epidemiological and clinico-pathological study of 34 cases. *J Otolaryngol* 1993;**22**:86-90

Olsen JH, Jensen SP, Hink M, Faurbo K, *et al.* Occupational formaldehyde exposure and increased nasal cancer risk in man. *Int J Cancer* 1984;**34**:639-44

Olsen JH, Asnaes S. Formaldehyde and the risk of squamous cell carcinoma of the sinonasal cavities. *Br J Ind Med* 1986;**43**:769-74

Olsen JH. Occupational risks of sinonasal cancer in Denmark. *Br J Ind Med* 1988;**45**:329-35

Osol A, Farrar GE. The Dispensatory of the United States of America. 25^{éd.} Philadelphia: JB Lippincott; 1955,2139p.

Partanen T. Formaldehyde exposure and respiratory cancer-a meta-analysis of the epidemiologic evidence. *Scand J Work Environ Health* 1993;**19**:8-15

Patel SG, Shah JP. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA Cancer J Clin* 2005;**55**:242-58

Pelin K, Hirvonen A, Taavitsainen M, Linnainmaa K. Cytogenetic response to asbestos fibers in cultured human primary mesothelial cells from 10 different donors. *Mut Res* 1995;**334**:225-33

Percodani J, Rose X, Folia M, Woisard V, *et al.* Les adénocarcinomes de l'ethmoïde : à propos de 46 patients. *Fr ORL* 2005;**89**:146-54

Pérez P, Dominguez O, Gonzalez S, Trivino A, *et al.* Ras gene mutations in ethmoid sinus adenocarcinoma : pronostic implications. *Cancer* 1999;**86**:255-64

- Perrone F, Oggionni M, Birindelli S, Suardi S, *et al.* TP53, p14ARF, p16INK4a and H-ras gene molecular analysis in intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Int J Cancer* 2003;**105**:196-203
- Pesch B, Pierl CB, Gebel M, Gross I, *et al.* Occupational risks for adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses in the German wood industry. *Occup Environ Med* 2008;**65**:191-6
- Peter H, Bolt HM. Irreversible protein binding of acrylonitrile. *Xenobiotica* 1981;**11**:51-6
- Peters RK, Garabrant DH, Yu MC, Mack TM. A case-control study of occupational and dietary factors in Colorectal Cancer in Young men by Subsite. *Cancer Res* 1989; **49**:5459-68
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in rel-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;**29**: e45
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;**30**:e36
- Pott P. Cancer scroti. In: Chirurgical Observations. London: Hawes, Clark and Collins; 1775:63-68,465p.
- Pucci S, Bonanno E, Pichiorri F, Angeloni C, *et al.* Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis. *Oncogene* 2004;**23**:2298-304
- Rekhadevi PV, Mahboob M, Rahman MF, Grover P. Genetic damage in wood dust-exposed workers. *Mutagenesis* 2009;**24**:59-65
- Rothman N, Smith MT, Hayes RB, Traver RD, *et al.* Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1 609C-->T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone. *Cancer Res* 1997; **57**:2839-42
- Roush GC, Walrath J, Stayner LT, Kaplan SA, *et al.* Nasopharyngeal cancer, sinonasal cancer, and occupations related to formaldehyde: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 1987;**79**:1221-4
- Rumilla KM, Erickson LA, Erickson AK, Lloyd RV. Galectin-4 expression in carcinoid tumors. *Endocr Pathol* 2006;**17**:243-9
- Saber AT, Nielsen LR, Dictor M, Hagmar L, *et al.* K-ras mutations in sinusoidal adenocarcinomas in patients occupationally exposed to wood dust or leather dust. *Cancer Lett* 1998;**126**:59-65
- Salvan D, Julieron M, Marandas P, Janot F, *et al.* Combined transfacial and neurosurgical approach to malignant tumours of the ethmoid sinus. *J Laryngol Otol* 1998;**112**:446-50
- Schiffman MH, Felton JS. Re: Fried foods and the risk of colon cancer. *Am J Epidemiol* 1990;**131**:376-8

- Shannan B, Seifert M, Boothman DA, Tilgen W, *et al.* Clusterin and DNA repair: a new function in cancer for a key player in apoptosis and cell cycle control. *J Mol Histol* 2006;**37**:183-8
- Shannan B, Seifert M, Leskov K, Willis J, *et al.* Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ* 2006;**13**:12-9
- Shi XG, Dalal NS. On the hydroxy radical formation between hydrogen peroxide and biological generated chromium (V) species. *Arch Biochem Biophys* 1990;**277**:342-50
- Siemiatycki J, Richardson L, Straif K, Latreille B, *et al.* Listing occupational carcinogens. *Environ Health Perspect* 2004;**112**:1447-59
- Snow ET, Costa M. Nickel toxicity and carcinogenesis. In: Rom WN (ed) - Environmental and Occupational Medicine. 3éd. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998:1057-64
- Stechly L, Morelle W, Desein F, André S, *et al.* Galectin-4-Regulated Delivery of Glycoproteins to the Brush Border Membrane of Enterocyte-Like Cells. *Traffic* 2009;**10**:438-50
- Steinmaus C, Smith AH, Jones RM, Smith MT. Meta-analysis of benzene exposure and non-Hodgkin lymphoma: biases could mask an important association. *Occup Environ Med* 2008;**65**:371-8
- Stoll D, Bébéar JP, Truilhé Y, Darrouzet V, *et al.* Ethmoid adenocarcinomas: retrospective study of 76 patients. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 2001;**122**:21-9
- Stollmann T. A manual of pharmacology and its applications to therapeutics and toxicology. 8éd. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1957
- Suarez C, Llorente JL, Fernandez de Leon R, Cabanillas R, *et al.* Anterior craniofacial resection: oncologic outcome and complications in a series of 111 cases. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2004;**55**:27-33
- Takayama S, Thorgeirsson UP, Adamson RH. Chemical carcinogenesis studies in nonhuman primates. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2008;**84**:176-88
- Uuskula M, Jarvantaus H, Hirvonen A, Sorsa M, *et al.* Influence of GSTM1 genotype on sister chromatid exchange induction by styrene-7,8-oxide and 1,2epoxy-3-butene in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis* 1995;**16**:947-50
- Van den Brûle F, Califice S, Castronovo V. Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J* 2004;**19**:537-42
- Van der Woude CJ, Kleibeuker JH, Jansen PL, Moshage H. Chronic inflammation, apoptosis and (pre)malignant lesions in the gastro-intestinal tract. *Apoptosis* 2004;**9**:123-30
- Vaughan TL, Strader C, Davis S, Daling JR. Formaldehyde and cancers of the pharynx, sinus and nasal cavity: I. Occupational exposures. *Int J Cancer* 1986;**38**:677-83

- Wang H, Dick R, Yin H, Licad-Coles E, *et al.* Structure-function relationships of human liver cytochromes P450 3A: aflatoxin B1 metabolism as a probe. *Biochemistry* 1998;**37**:12536-45
- Ward MH, Sinha R, Heineman EF, Rothman N, *et al.* Risk of adenocarcinoma of the stomach and esophagus with meat cooking method and doneness preference. *Int J Cancer* 1997;**71**:14-9
- Ward EM, Burnett CA, Ruder A, Davis-King K. Industries and cancer. *Cancer Causes Control* 1997;**8**:356-70
- Wartenberg D, Reyner D, Scott CS. Trichloroethylene and cancer: epidemiologic evidence. *Environ Health Perspect* 2000;**108**(Suppl 2):161-76
- Wertheimer N, Leeper E. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Am J Epidemiol* 1979;**109**:273-84
- Wogan GN. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Res* 1992;**52**(Suppl. 7):2114-8
- Wogan GN, Tannenbaum SR. Environmental *N*-nitroso compounds: implications for public health. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975;**31**:375-83
- Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Non-ionizing radiation, *Part 1: static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields*. IARC Monogr Eval Carcinolog Risks Hum.2002;**80**:1-395.
- Wu TT, Barnes L, Bakker A, Swalsky PA, *et al.* K-ras 2 and P53 genotyping of intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Mod Pathol* 1996;**9**:199-204
- Xie D, Sham JS, Zeng WF, Che LH, *et al.* Oncogenic role of clusterin overexpression in multistage colorectal tumorigenesis and progression. *World J Gastroenterol* 2005;**11**:3285-9
- Yamashita Y, Kumabe T, Cho YY, Watanabe M, *et al.* Fatty acid induced glioma cell growth is mediated by the acyl-CoA synthetase 5 gene located on chromosome 10q25.1-q25.2, a region frequently deleted in malignant gliomas. *Oncogene* 2000; **19**:5919-25
- Yang CR, Yeh S, Leskov K, Odegaard E, *et al.* Isolation of KU70-binding proteins (KUBs). *Nucleic Acids Res* 1999;**27**:2165-74
- Yom SS, Rashid A, Rosenthal DI, Elliott DD, *et al.* Genetic analysis of sinonasal adenocarcinoma phenotypes : distinct alterations of histogenetic significance. *Mod Pathol* 2005;**18**:315-9
- Zahm SH, Ward MH. Pesticides and childhood cancer. *Environ Health Perspect* 1998;**106**(Suppl 3):893-908
- Zeeberg BR, Feng W, Wang G, Wang MD, *et al.* GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol* 2003;**4**:R28. Epub 2003 Mar 25

Zhang LY, Ying WT, Mao YS, He HZ *et al.* Loss of clusterin both in serum and tissue correlates with the tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via proteomics approaches. *World J Gastroenterol* 2003;**9**:650-4

Zheng W, Blot WJ, Shu XO, Diamond EL, *et al.* A population-based case-control study of cancers of the nasal cavity and paranasal sinuses in Shanghai. *Int J Cancer* 1992;**52**:557-61

Zheng W, Gustafson DR, Sinha R, Cerhan JR, *et al.* Well-done meat intake and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;**90**:1724-9

Annexe 1 : Dates du diagnostic (date_diag), diagnostic histologique (Ana. Path.), dates du décès (DC)= décès, survie, cause du décès (KE = adénocarcinome de l'ethmoïde, K = cancer).

Patients	Date naiss.	Sexe	Date_diag.	Ana. Path.	Age diag.	Date DC	Age DC	Survie(mois)	Cause DC
1	18/01/1927	1	29/12/1987	papillaire	60	24/04/2003	75	183	KE
2	29/11/1933	1	07/11/2000	papillaire	67				
3	07/09/1933	1	21/03/2002	colique	68	01/10/2003	70	18	KE
4	04/07/1922	1	29/01/2001	mucineux	79	13/03/2002	80	13	KE
5	24/03/1929	1	28/02/2001		72				
6	27/10/1936	1	03/02/2003	mucineux	67	01/04/2007	71	49	KE
7	03/09/1947	1	23/10/2002	colique	55	01/10/2006	59	47	KE
8	29/11/1937	1	12/02/1985	mucineux	48	01/11/1996	60	140	KE
9	03/12/1921	1	06/03/1995	mucineux	74	01/07/1996	75	15	KE
10	25/11/1938	1	27/05/1999	mucineux	61				
11	01/09/1933	1	05/02/1996	colique	66	01/12/1999	70	45	KE
12	31/07/1932	1	10/09/2004	mucineux	72	12/07/2005	73	10	KE
13	04/11/1926	1	08/06/1988	mucineux	62	01/03/2005	79	200	KE
14	31/05/1924	1	04/09/2001	mixte	77				
15	08/04/1932	1	03/04/1997	mucineux	65				
16	20/07/1934	1	16/06/2000	mucineux	66				
17	01/01/1932	1	12/08/1991	papillaire	59	10/01/1998	65	76	KE
18	01/06/1934	1	24/01/1995	colique	61	01/12/1998	65	46	KE
19	15/03/1933	1	20/06/1991	mixte	58	01/08/1994	61	37	KE
20	15/11/1934	1	20/06/2001	colique	67				
21	31/05/1940	1	02/02/1999	papillaire	59	01/01/2003	63	46	KE
22	01/02/1938	1	01/04/1998	mixte	60	11/03/1999	61	11	KE
23	26/08/1925	1	29/11/1988	mucineux	63				
24	08/09/1935	1	30/09/1990	mucineux	55	04/11/2004	69	169	KE
25	26/08/1942	1	30/03/1998	papillaire	55				
26	01/08/1922	1	24/11/1998	mucineux	66				
27	26/02/1933	1	06/04/1993	mucineux	60				
28	18/06/1934	1	21/08/2000	mucineux	66				
29	17/04/1921	1	30/10/1996	papillaire	75	03/12/2002	81	73	KE
30	26/02/1935	1	22/07/1998	colique	63	26/09/2000	65	26	KE
31	28/07/1933	1	14/10/1992	mixte	59	04/12/1993	60	13	KE
32	26/06/1933	1	09/02/1989	mucineux	56	01/01/1996			accident
33	30/07/1947	1	11/10/1999	papillaire	52				non
34	14/12/1936	1	02/07/1998	mucineux	62	15/05/2000	64	22	KE
35	28/01/1937	1	30/09/2000	mucineux	62	30/03/2000			KE
36	03/07/1943	1	11/10/1993	mixte	50				
37	18/07/1932	1	08/09/2004	mucineux	72	30/11/2004	72	2	KE
38	24/04/1937	1	25/06/2002	mucineux	65	02/03/2005	68	32	KE
39	19/10/1933	1	13/06/2001	mixte	68				
40	14/02/1933	1	09/01/2002	colique	69		69		
41	13/02/1935	1	06/11/1997	papillaire	62	09/08/1998	63	9	KE
42	19/01/1929	1	16/02/1998	mucineux	69				
43	18/02/1925	1	04/05/2001	colique	76				
44	30/09/1943	1	17/06/1998	mixte	55				
45	10/07/1939	1	11/04/1996	colique	67	16/10/1998	70	30	KE
46	05/02/1960	2	08/04/1991	papillaire	31	13/06/1994	34	38	KE
47	19/08/1932	1	18/05/2001	mucineux	69				
48	06/08/1930	1	05/03/1992	papillaire	62	28/02/2007	77	179	KE

patients	Date naiss.	Sexe	Diag_ana.path.	Ana. Path.	Age diag	Date DC	Age DC	Survie(mois)	Cause DC
49	24/02/1942	1	20/07/1999	papillaire	57				
50	23/05/1944	1	03/01/2002	colique	57				
51	09/09/1930	1	01/07/1992	papillaire	62	01/04/2002	72	116	KE
52	26/05/1944	1	31/10/2001	colique	67				
53	21/08/1927	1	17/04/1996	colique	69	01/01/2003	76	80	KE
54	14/08/1944	1	24/01/1995	mucineux	51	21/05/1996	52	15	KE
55	13/02/1932	1	26/08/1998	papillaire	66			115	
56	26/02/1927	1	12/05/1989	mucineux	62	15/07/1989	62	2	KE
57	26/09/1928	1	22/05/1997	mucineux	69	01/08/2005	77	98	Kcolon
58	17/04/1933	1	03/10/2000	mucineux	67	01/01/2006			K poumon
59	16/02/1944	1	05/10/1990	papillaire	46	02/08/1996	52	69	KE
60	07/03/1934	1	21/02/2003	colique	69	22/04/2003	69	1	KE
61	02/01/1923	1	19/04/2004	mucineux	81	17/06/2005	82	13	KE
62	30/03/1934	1	26/02/2003	colique	69				
63	27/03/1911	1	26/12/1988	solide	77	01/03/1989	77	2	KE
64	30/10/1945	1	22/04/2002	mixte	57				
65	17/02/1935	1	02/06/1998	mixte	63	01/01/2007	72	102	KE
66	05/03/1934	1	07/04/1988	papillaire	54	07/04/2002	68	168	Cirrhose
67	16/03/1935	1	24/01/2000	mucineux	65				
68	05/08/1932	1	07/07/1995	mucineux	63	16/10/1995	63	3	KE
69	21/07/1911	1	01/09/1993	solide	72	12/10/1993	72	1	KE
70	10/11/1945	1	07/09/1988	solide	43	29/10/1988	43	1	KE
71	05/07/1939	1	23/02/2000	papillaire	61				
72	26/05/1931	1	29/10/2001	papillaire	70				
73	05/05/1939	1	12/01/1995	colique	56				
74	25/07/1932	1	01/03/1994	colique	62	04/04/2002	70	97	KE
75	01/11/1936	1	24/11/1997	mixte	61				
76	11/04/1928	2	02/07/1996	papillaire	68	09/02/1997	69	7	KE
77	14/12/1935	1	21/12/1999	papillaire	64				
78	14/06/1924	1	25/02/2002	colique	77	10/03/2005	80	36	cardiaque
79	09/12/1927	1	22/11/2000	mixte	73	01/01/2002	74	13	KE
80	01/12/1932	1	27/10/1994		62				
81	26/05/1910	1	21/11/1994	mixte	84	1998	98	48	Alzheimer
82	16/01/1940	1	03/08/2004	mucineux	64	25/05/2005	65	9	KE
83	13/08/1929	1	30/09/2004	mixte	75				
84	04/07/1930	1	07/06/1991	solide	61				
85	25/12/1932	1	05/06/1999	solide	67				
86	29/06/1932	1	04/01/1990	papillaire	57	14/05/1998	65	100	KE
87	15/01/1953	1	23/09/2004	mucineux	51				
88	08/09/1930	1	15/11/2002	colique	72				
89	06/07/1929	1	19/08/1997	mucineux	68	20/07/2000	71	35	KE
90	26/12/1938	1	22/06/1998	colique	60	01/03/2006	68	92	Kpoumon
91	24/10/1937	1	02/03/1994	mucineux	57				
92	11/03/1933	1	28/02/1995	mixte	72				
93	03/09/1933	1	10/01/2003	colique	69	01/01/2004	70	11	KE
94	17/04/1937	1	18/12/1997	colique	61	17/05/2001	64	40	KE
95	30/09/1933	1	16/08/1995	colique	62	01/10/1998	65	37	KE
96	16/03/1955	1	16/04/1998	papillaire	43	14/06/1998	43	1	KE
97	11/07/1928	1	05/10/1992	mucineux	64	28/02/2000	71	88	Kpoumon
98	18/01/1928	1	22/05/2001	colique	73	01/12/2004	77	42	AVC

Annexes 2 : Professions et degré d'expositions aux substances cancérogènes

Patient	Profession	Poussières de bois (années)	Métaux (années)	Indice_solvant nbjours/an.années	Exposition au tabac (en paquetsannées)	Alcool > 2v/jour
1	menuisier-ebeniste	40	0	40	0	Non
2	menuisier-ebeniste	46	0	0	20	Non
3	menuisier-ebeniste	46	0	0	20	Non
4	menuisier	11	0	0	0	Non
5	agriculteur	0	0	7300	0	Oui
6	menuisier-ebeniste	45	0	0	0	Non
7	menuisier	10	0	0	0	Non
8	menuisier	44	0	0	0	Non
9		45				
10	menuisier	45	0	0	0	Non
11	menuisier	4	0	0	55	Oui
12	menuisier-ebeniste	42	0	0	0	Non
13	menuisier	18	0	0	0	Non
14	dessinateur	2	0	0	10	Non
15	charpentier	5	0	4745	0	Non
16	menuisier-ebeniste	37	0	148	10	Non
17	ébeniste	16	0	2920	0	Non
18	menuisier	25	0	0	0	Non
19	menuisier	40	0	0	5	Non
20	menuisier	10	0	73	0	Non
21	menuisier	42	0	0	2	Non
22	menuisier	17	0	0	35	Non
23	chaussure	13	12	0	14	Non
24	menuisier	39	0	0	5	Non
25	menuisier	35	0	120	0	Non
26	menuisier	15	0	180	0	Non
27	ebeniste	29	0	5475	12	Non
28	menuisier	36	10	0	0	Non
29	menuisier-ebeniste	40	0	4745	5	Non
30	menuisier	28	0	0	5	Non
31	menuisier	45	0	0	5	Non
32	menuisier-ebeniste	38	0	3650	20	Non
33	boucher	30	0	0	0	Non
34	ebeniste	46	0	8395	0	Non
35	boulangier	46	0	182,5	0	Non
36	menuisier	36	0	0	0	Non
37	menuisier-ebeniste	46	0	5475	1	Non
38	menuisier	46	0	0	0	Non
39	menuisier	45	0	0	0	Non
40	menuisier	44	0	0	0	Non
41	menuisier	42	0	0	40	Non
42	menuisier	42		0	2	Non
43	menuisier	46	0	0	0	Non
44	menuisier	40	0	0	0	Non
45	Ingénieur	0	0	0		Non
46	secrétaire	0	0	0	0	Non
47	menuisier	10	0	0	0	Non
48	menuisier	41	0	0	0	Non

Patients	Professions	Poussières de bois (années)	Métaux (années)	Indice solvant (nb.jours/an.années)	Exposition tabac (paquets.années)	Alcool > 2v/jour
49	menuisier	38	0	3650	8	Non
50	menuisier-ebeniste	42	0	8030	0	Non
51	menuisier-ebeniste	40	0	825	17,5	Non
52	menuisier	33	0	0	0	Non
53	menuisier	14	0	0	0	Non
54	menuisier-ebeniste	37	0	6570	10	Non
55	menuisier-ebeniste	43	0	7665	0	Non
56	menuisier	45	0	0	0	Non
57	menuisier	40	0	7300	0	Non
58	chaussure	40	0	7300	0	Oui
59	ebeniste	7	0	8030	0	Non
60	menuisier-ebeniste	15	0	4562	40	Non
61	chaussure	5	2	1825	20	Non
62	menuisier	43	0	400	5	Non
63	menuisier	40	0	0	0	Non
64	menuisier	41	2	7300	5	Non
65	menuisier	43	0	0	0	Non
66	ebeniste	41	0	0	0	Non
67	menuisier	40	0	0	0	Non
68	menuisier	30	10	0	20	Non
69	menuisier-ebeniste	4	0	0	20	Oui
70	menuisier-ebeniste	25	0	3650	5	Oui
71	menuisier-ebeniste	31	0	108	0	Oui
72	menuisier	12	0	0	0	Non
73	emballage	7	0	2555	7	Non
74	menuisier	29	0	1642	0	Non
75	menuisier-ebeniste	42	3	15330	0	Oui
76						
77	menuisier-ebeniste	46	36	0	0	Non
78	menuisier-ebeniste	40	1	7300	20	Non
79	menuisier	10	0	10950	0	Non
80	menuisier	7	0	0	20	Non
81	menuisier		0	0	0	Non
82	menuisier	43	0	8760	0	Non
83	charpentier	37	2	3650	0	Oui
84	menuisier	16	0	0	0	Non
85	menuisier	46	0	0	5	Non
86	charpentier	44	0	480	0	Non
87	menuisier	12	0	0	25	Non
88	menuisier	43	30	0	0	Non
89	menuisier	46	0	276	10	Non
90	menuisier	20	0	0	40	Non
91	menuisier	5	0	0	0	Non
92	charpentier	45	0	540	0	Non
93	menuisier-ebeniste	12	0	2190	0	Non
94	menuisier	18	0	0	16	Non
95	charpentier	41	0	4380	5	Non
96	menuisier	14	0	0	23	Non
97	menuisier	5	0	0	40	Non
98	charpentier	45	0	40	15	Oui

Annexe 3 : Professions, années d'exposition (Ans_exp), description des signes cliniques au moment du diagnostic d'adénocarcinome de l'ethmoïde.

Patients	Profession	Ans_exp	Symptômes	Côté	Epistaxis	Obstruction	Rhinorrhée	exophtalmie	diplopie
1	menuisier-ebeniste	40	>6mois	gauche	oui	Non	Non	Non	Non
2	menuisier-ebeniste	46	3à6mois	gauche	oui	Non	Non	Non	Non
3	menuisier-ebeniste	46	3à6mois	bilateral	oui	Oui	Non	Non	Non
4	menuisier	11	>6mois	gauche	oui	Oui	Oui	Non	Oui
5	agriculteur	0	>6mois	droit	oui	Oui	Oui	Non	Non
6	menuisier-ebeniste	45		gauche	Non	Non	Non	Non	Non
7	menuisier	10	>6mois	droit	Non	Oui	Non	Non	Non
8	menuisier	44	>6mois	droit	Oui	Oui	Non	Non	Non
9		45	3à6mois	gauche	Non	Non	Non	Oui	Oui
10	menuisier	45	>6mois	droit	Non	Oui	Non	Non	Non
11	menuisier	4	>6mois	gauche	Non	Oui	Non	Non	Non
12	menuisier-ebeniste	42	>6mois	bilateral	Oui	Oui	Non	Non	Non
13	menuisier	18	>6mois	droit	Non	Non	Non	Non	Non
14	dessinateur	2	<3mois	droit	Oui	Oui	Non	Non	Non
15	charpentier	5	>6mois	droit	Non	Oui	Non	Non	Non
16	menuisier-ebeniste	37	>6mois	droit	Non	Non	Non	Non	Non
17	ébeniste	16	>6mois	gauche	Non	Oui	Non	Oui	Non
18	menuisier	25	>6mois	droit	Non	Oui	Non	Non	No
19	menuisier	40	>6mois	droit	Oui	Oui	Non	Non	Non
20	menuisier	10	>6mois	droit	Non	Oui	Oui	Non	Non
21	menuisier	42	>6mois	gauche	Oui	Oui	Non	Non	Non
22	menuisier	17	>6mois	droit	Non	Oui	Oui	Non	Oui
23	chaussure	13	3à6mois	gauche	Non	Oui	Non	Non	Non
24	menuisier	39	>6mois	droit	Oui	Non	Non	Non	Non
25	menuisier	35	3à6mois	droit	Oui	Oui	Oui	Non	Non
26	menuisier	15	>6mois	bilateral	Non	Oui	Oui	Non	Non
27	ebeniste	29	>6mois	droit	Oui	Non	Oui	Non	Non
28	menuisier	36	3à6mois	droit	Oui	Oui	Oui	Non	Non
29	menuisier-ebeniste	40	<3mois	gauche	Oui	Oui	Non	Oui	Oui
30	menuisier	28	3à6mois	droit	Non	Oui	Oui	Non	Non
31	menuisier	45	<3mois	gauche	Non	Oui	No	Non	Non
32	menuisier-ebeniste	38	3à6mois	droit	Oui	Non	Oui	Non	Non
33	boucher	30	>6mois	gauche	Oui	Non	Non	Non	Non
34	ebeniste	46	3à6mois	gauche	Non	Oui	Non	Oui	Non
35	boulangier	46	>6mois	bilateral	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
36	menuisier	36	>6mois	gauche	Non	Oui	Non	Non	Non
37	menuisier-ebeniste	46	3à6mois	gauche	Oui	Oui	Oui	Non	Non
38	menuisier	46	>6mois	droit	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
39	menuisier	45	3à6mois	gauche	Oui	Oui	Non	Non	Non
40	menuisier	44	3à6mois	gauche	Oui	Oui	Non	Non	Non
41	menuisier	42	>6mois	droit	Oui	Oui	Non	Non	Non
42	menuisier	42	>6mois	gauche	Non	Oui	Non	Non	Non
43	menuisier	46	>6mois	droit	Oui	Oui	Non	Non	Non
44	menuisier	40	>6mois	droit	Oui	Oui	Non	Non	Non
45	Ingénieur	0	>6mois	droit	Oui	Oui	Non	Oui	Oui
46	secrétaire	0	>6mois	bilateral	Oui	Oui	Non	Non	Non
47	menuisier	10	3à6mois	droit	Oui	Oui	Oui	Non	Non
48	menuisier	41	>6mois	gauche	Oui	Oui	Non	Non	Non

Patients	Profession	Ans_exp	Symptômes	Côté	Epistaxis	Obstruction	Rhinorrhée	exophtalmie	diplopie
49	menuisier	38	3à6mois	gauche	Oui	Oui	Non	Non	Non
50	menuisier-ebeniste	42	<3mois	droit	Non	Oui	Non	Non	Non
51	menuisier-ebeniste	40	>6mois	gauche	Non	Oui	Non	Non	Non
52	menuisier	33	>6mois	droit	Oui	Oui	Non	Non	Non
53	menuisier	14	<3mois	gauche	Non	Non	Oui	Non	Non
54	menuisier-ebeniste	37	<3mois	bilateral	Oui	Non	Non	Oui	Oui
55	menuisier-ebeniste	43	>6mois	droit	Non	Oui	Non	Oui	Oui
56	menuisier	45	3à6mois	bilateral	Non	Non	Non	Non	Non
57	menuisier	40	3à6mois	droit	Non	Oui	Non	Non	Non
58	chaussure	40	>6mois	gauche	Oui	Oui	Non	Non	Non
59	ebeniste	7	3à6mois	gauche	Non	Oui	Non	Non	Non
60	menuisier-ebeniste	15	>6mois	droit	Non	Oui	Oui	Oui	Non
61	chaussure	5	3à6mois	droit	Oui	Oui	Oui	Non	Non
62	menuisier	43	3à6mois	droit	Non	Oui	Oui	Non	Non
63	menuisier	40	<3mois	gauche	Oui	Non	Non	Non	Non
64	menuisier	41	>6mois	droit	Oui	Oui	Non	Non	Non
65	menuisier	43	>6mois	gauche	Non	Oui	Oui	Non	Non
66	ebeniste	41	3à6mois	droit	Oui	Oui	Non	Non	Non
67	menuisier	40	>6mois	gauche	Non	Oui	Non	Non	Non
68	menuisier	30	>6mois	bilateral	Non	Oui	Non	Non	Non
69	menuisier-ebeniste	4	<3mois	gauche	Oui	Oui	Non	Oui	Oui
70	menuisier-ebeniste	25	3à6mois	gauche	Non	Oui	Non	Oui	Non
71	menuisier-ebeniste	31	>6mois	gauche	Non	Oui	Non	Non	Non
72	menuisier	12	<3mois	gauche	Oui	Non	Non	Non	Non
73	emballage	7	<3mois	droit	Non	Oui	Non	Non	Non
74	menuisier	29	3à6mois	droit	Non	Oui	Oui	Non	Non
75	menuisier-ebeniste	42	>6mois	gauche	Non	Oui	Non	Non	Non
76			<3mois	gauche	Non	Non	Non	Oui	Oui
77	menuisier-ebeniste	46	>6mois	gauche	Oui	Oui	Non	Non	Non
78	menuisier-ebeniste	40	3à6mois	gauche	Oui	Oui	Oui	Non	Non
79	menuisier	10	>6mois	gauche	Non	Oui	Non	Non	Non
80	menuisier	7		droit	Non	Oui	Non	Non	Non
81	menuisier		>6mois	droit	Oui	Oui	Non	Non	Non
82	menuisier	43	3à6mois	droit	Oui	Non	Non	Oui	Oui
83	charpentier	37	3à6mois	droit	Non	Oui	Non	Non	Non
84	menuisier	16	>6mois	droit	Oui	Oui	Non	Non	Non
85	menuisier	46	<3mois	gauche	Non	Oui	Non	Non	Non
86	charpentier	44	>6mois	droit	Non	Oui	Non	Non	Non
87	menuisier	12	>6mois	gauche	Oui	Oui	Oui	Non	Non
88	menuisier	43	>6mois	droit	Oui	Oui	Non	Non	Non
89	menuisier	46	>6mois	gauche	Oui	Oui	Non	Non	Non
90	menuisier	20	3à6mois	droit	Non	Oui	Non	Non	Non
91	menuisier	5	>6mois	gauche	Non	Oui	Non	Non	Non
92	charpentier	45	>6mois	gauche	Oui	Oui	Non	Non	Non
93	menuisier-ebeniste	12	>6mois	droit	Non	Oui	Non	Non	Non
94	menuisier	18	>6mois	droit	Non	Oui	Non	Non	Non
95	charpentier	41	3à6mois	droit	Oui	Oui	Oui	Non	Non
96	menuisier	14	<3mois	gauche	Non	Non	Non	Non	Non
97	menuisier	5	>6mois	droit	Oui	Oui	Non	Non	Non
98	charpentier	45	>6mois	droit	Non	Oui	non	Non	Non

Annexe 4 : Antécédents (ATCD) personnels et familiaux de cancer (K = cancer).

patients	Profession	Ans_exp	ATCD_personnels	ATCD_familiaux
1	menuisier-ebeniste	40	aucun	aucun
2	menuisier-ebeniste	46	polypes coliques	aucun
3	menuisier-ebeniste	46	aucun	aucun
4	menuisier	11	K prostate	aucun
5	agriculteur	0	aucun	aucun
6	menuisier-ebeniste	45	aucun	aucun
7	menuisier	10	aucun	aucun
8	menuisier	44	aucun	aucun
9		45		
10	menuisier	45	aucun	aucun
11	menuisier	4	aucun	MDH
12	menuisier-ebeniste	42	K colon	aucun
13	menuisier	18	aucun	aucun
14	dessinateur	2	Kprostate	aucun
15	charpentier	5	aucun	aucun
16	menuisier-ebeniste	37	aucun	K COLON,KGASTRIQUE
17	ébeniste	16	K colon	aucun
18	menuisier	25	aucun	aucun
19	menuisier	40	aucun	aucun
20	menuisier	10	Adenome Prostat	aucun
21	menuisier	42	K prostate	K PROSTATE
22	menuisier	17	aucun	aucun
23	chaussure	13	aucun	K OS
24	menuisier	39	K prostate	aucun
25	menuisier	35	aucun	aucun
26	menuisier	15	aucun	aucun
27	ebeniste	29	K prostate	aucun
28	menuisier	36	aucun	aucun
29	menuisier-ebeniste	40	aucun	aucun
30	menuisier	28	aucun	aucun
31	menuisier	45	aucun	aucun
32	menuisier-ebeniste	38	aucun	aucun
33	boucher	30	aucun	aucun
34	ebeniste	46	aucun	aucun
35	boulangier	46	aucun	aucun
36	menuisier	36	aucun	aucun
37	menuisier-ebeniste	46	aucun	aucun
38	menuisier	46	aucun	aucun
39	menuisier	45	aucun	aucun
40	menuisier	44	aucun	aucun
41	menuisier	42	aucun	aucun
42	menuisier	42	aucun	aucun
43	menuisier	46	aucun	aucun
44	menuisier	40	aucun	aucun
45	Ingénieur	0	aucun	aucun
46	secrétaire	0	aucun	aucun
47	menuisier	10	K prostate	aucun
48	menuisier	41	glioblastome	aucun

patients	Profession	Ans_exp	ATCD_personnels	ATCD_familiaux
49	menuisier	38	K prostate	aucun
50	menuisier-ebeniste	42	aucun	aucun
51	menuisier-ebeniste	40	aucun	aucun
52	menuisier	33	aucun	aucun
53	menuisier	14	aucun	aucun
54	menuisier-ebeniste	37	aucun	aucun
55	menuisier-ebeniste	43	aucun	aucun
56	menuisier	45	aucun	aucun
57	menuisier	40	K colon	aucun
58	chaussure	40	K poumon	K chez un frere
59	ebeniste	7	aucun	aucun
60	menuisier-ebeniste	15	K vessie	aucun
61	chaussure	5	aucun	K POUMON
62	menuisier	43	aucun	aucun
63	menuisier	40	aucun	aucun
64	menuisier	41	aucun	aucun
65	menuisier	43	aucun	aucun
66	ebeniste	41	aucun	aucun
67	menuisier	40	aucun	aucun
68	menuisier	30	aucun	aucun
69	menuisier-ebeniste	4	aucun	aucun
70	menuisier-ebeniste	25	aucun	aucun
71	menuisier-ebeniste	31	aucun	aucun
72	menuisier	12	?	?
73	emballage	7	aucun	aucun
74	menuisier	29	aucun	aucun
75	menuisier-ebeniste	42	polypes coliques	aucun
76				
77	menuisier-ebeniste	46	aucun	aucun
78	menuisier-ebeniste	40	aucun	aucun
79	menuisier	10	aucun	aucun
80	menuisier	7	aucun	aucun
81	menuisier		aucun	aucun
82	menuisier	43	aucun	aucun
83	charpentier	37	seminome	2 K GASTRIQUE
84	menuisier	16	aucun	aucun
85	menuisier	46	aucun	aucun
86	charpentier	44	aucun	aucun
87	menuisier	12	aucun	aucun
88	menuisier	43	aucun	aucun
89	menuisier	46	aucun	aucun
90	menuisier	20	Kpoumon	aucun
91	menuisier	5	K cutané	aucun
92	charpentier	45	K colon,Kpoumon	aucun
93	menuisier-ebeniste	12	aucun	aucun
94	menuisier	18	aucun	aucun
95	charpentier	41	polypes coliques	aucun
96	menuisier	14	aucun	aucun
97	menuisier	5	Kpoumon	aucun
98	charpentier	45	aucun	aucun

Annexe 5 : Déclarations et reconnaissance en maladie professionnelle (MP) 1 = oui ; 0 = non

Patients	Profession	Ans_exp	Déclaration MP	Reconnaissance MP
1	menuisier-ebeniste	40	1	1
2	menuisier-ebeniste	46	1	1
3	menuisier-ebeniste	46	0	0
4	menuisier	11	1	0
5	agriculteur	0	0	0
6	menuisier-ebeniste	45	1	1
7	menuisier	10	1	1
8	menuisier	44	1	1
9		45		
10	menuisier	45	1	1
11	menuisier	4	0	0
12	menuisier-ebeniste	42	0	0
13	menuisier	18	1	1
14	dessinateur	2	0	0
15	charpentier	5	1	1
16	menuisier-ebeniste	37	1	1
17	ébeniste	16		
18	menuisier	25		
19	menuisier	40	1	1
20	menuisier	10	0	0
21	menuisier	42	1	1
22	menuisier	17	1	1
23	chaussure	13	1	0
24	menuisier	39	1	1
25	menuisier	35	1	1
26	menuisier	15	0	0
27	ebeniste	29	0	0
28	menuisier	36	1	1
29	menuisier-ebeniste	40	0	0
30	menuisier	28	1	1
31	menuisier	45	1	1
32	menuisier-ebeniste	38	1	1
33	boucher	30	1	1
34	ebeniste	46	1	1
35	boulangier	46	0	0
36	menuisier	36	0	0
37	menuisier-ebeniste	46	1	1
38	menuisier	46	1	1
39	menuisier	45	1	1
40	menuisier	44	0	0
41	menuisier	42	1	0
42	menuisier	42	1	1
43	menuisier	46	1	1
44	menuisier	40	0	0
45	Ingénieur	0	0	0
46	secrétaire	0	0	0
47	menuisier	10	1	1
48	menuisier	41	1	1

Patients	Profession	Ans_exp	Déclaration MP	Reconnaissance MP
49	menuisier	38	1	1
50	menuisier-ebeniste	42	1	1
51	menuisier-ebeniste	40	0	0
52	menuisier	33	1	1
53	menuisier	14	0	0
54	menuisier-ebeniste	37	1	1
55	menuisier-ebeniste	43	1	1
56	menuisier	45	0	0
57	menuisier	40	0	0
58	chaussure	40	0	0
59	ebeniste	7	1	1
60	menuisier-ebeniste	15	0	0
61	chaussure	5	1	0
62	menuisier	43	1	1
63	menuisier	40	0	0
64	menuisier	41	1	1
65	menuisier	43	1	1
66	ebeniste	41	1	1
67	menuisier	40	1	1
68	menuisier	30	0	0
69	menuisier-ebeniste	4	0	0
70	menuisier-ebeniste	25	1	1
71	menuisier-ebeniste	31	1	1
72	menuisier	12	0	0
73	emballage	7	0	0
74	menuisier	29	1	1
75	menuisier-ebeniste	42	1	1
76				
77	menuisier-ebeniste	46	1	0
78	menuisier-ebeniste	40	0	0
79	menuisier	10	0	0
80	menuisier	7	0	0
81	menuisier		0	0
82	menuisier	43	1	1
83	charpentier	37	1	1
84	menuisier	16	1	F1
85	menuisier	46	0	0
86	charpentier	44	1	1
87	menuisier	12	1	1
88	menuisier	43	1	1
89	menuisier	46	0	0
90	menuisier	20	1	1
91	menuisier	5	0	0
92	charpentier	45	1	1
93	menuisier-ebeniste	12	0	0
94	menuisier	18	1	1
95	charpentier	41	1	1
96	menuisier	14	0	0
97	menuisier	5	0	0
98	charpentier	45	1	0

Annexe 6 : Résultats du bilan d'extension et classification TNM UICC 1997

Patients	orbite	méninge	endocrâne	sphénoïde	sinus_maxillaire	lame criblée	TNM UICC 1997
1	non	non	non	non	non		2
2	non	non	non	non	non		2
3	non	non	non	non	oui		3
4	non	non	non	non	non	oui	2
5	non	non	non	non	oui		3
6	non	non	non		non	oui	2
7	non	non	non	non	oui		3
8	non	non	non	non	oui		3
9	oui	oui	non	oui	non		4
10	non	non	non	non	non		2
11	non	non	non	non	oui		3
12	non	non	non	oui	oui		4
13	non	non	non	non	oui		3
14	non	non	non	non	non		2
15	non	non	non	non	non		2
16	non	non	non	non	non		2
17	oui	non	non	non	oui	oui	3
18	oui	oui	non	non	non		4
19	non	non	non	non	oui	oui	3
20	non	non	non	non	non		2
21	non	non	non	non	non		2
22	oui	oui	oui	oui	oui		4
23	non	non	non	non	oui		3
24	non	non	non	non	non		2
25	non	non	non	non	non		2
26	non	non	non	non	non		2
27	non	non	non	non	non	oui	2
28	non	non	non	non	oui		3
29	oui	non	oui	non	oui		4
30	non	non	non	non	non		2
31	non	oui	non	oui	oui		4
32	non	non	non	non	oui		3
33	oui	non	non	non	non		4
34	oui	oui	oui	non	non		4
35	oui	oui	oui	oui	oui		4
36	non	non	non	non	oui	oui	3
37	non	non	non	oui	non		4
38	oui	oui	non	non	non		4
39	non	non	non	non	oui		3
40	non	oui	oui	non	non		4
41	non	oui	oui	oui	non		4
42	non	non	non	non	non		2
43	non	non	non	non	oui		3
44	non	non	non	non	oui		3
45	oui	oui	non	oui	oui		4
46	non	oui	oui	non	non		4
47	non	non	non	non	non	oui	2
48	non	non	non	non	oui		3

patients	orbite	méninge	endocrâne	sphénoïde	sinus_maxillaire	lame criblée	TNM UICC 1997
49	non	non	non	non	non		2
50	non	non	non	non	non		4
51	non	non	non	non	non		2
52	non	non	non	non	non		2
53	non	non	non	non	oui	oui	3
54	oui	oui	oui	oui	oui		4
55	non	oui	non	non	oui		3
56	non	non	oui	oui	non		4
57	non	non	non	non	oui		3
58	non	non	non	non	oui		3
59	non	non	non	non	non		2
60	non	non	non	oui	oui		4
61	non	non	non	oui	oui		4
62	non	non	non	non	oui	oui	3
63	non	oui	oui	oui	non		4
64	non	non	non	oui	non		3
65	non	non	non	non	non		2
66	non	non	non	non	non		2
67	oui	oui	oui	oui	oui		4
68	non	non	non	oui	oui	oui	4
69	oui	oui	oui	non	oui		4
70	oui	oui	oui	oui	oui		4
71	non	non	non	non	non		2
72	non	non	non	non	oui		3
73	non	non	non	non	non		2
74	non	non	non	non	non		2
75	non	non	non	non	non		2
76	oui	non	non	oui	non		4
77	non	non	non	non	non		2
78	non	non	non	oui	non		4
79	non	non	non	oui	non		4
80	non	non	non	non	oui		3
81	non	non	non	non	non		2
82	oui	non	oui	oui	oui		4
83	non	non	non	non	non	oui	2
84	non	non	non	non	non		1
85	oui	oui	oui	oui	non		4
86	non	non	non	non	non		2
87	non	non	non	non	oui		3
88	oui	non	non	non	oui		3
89	oui	non	non	non	non		3
90	non	non	non	non	non		2
91	non	non	non	non	non		2
92	oui	non	non	non	oui		4
93	non	oui	oui	oui	non		4
94	non	non	non	non	non		2
95	non	non	non	non	non		2
96	non	oui	oui	non	non		4
97	non	non	non	non	oui		3
98	non	non	non	non	non		2

Annexe 7 : Type de chirurgie (TFC= transfaciale, TFC_BC= transfaciale avec résection de la base du crâne, macro = macroscopique, micro = microscopique) et doses radiothérapie (RX).

Patients	Chirurgie	Voie d'abord	Chirurgie lame criblée	Chirurgie orbite	Chirurgie méninge	Chirurgie cérébrale	résection_macro	micro	RX (grays)
1	oui	TFC	non	non	non	non	suffisante	suffisante	66
2	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	suffisante	suffisante	66
3	oui	TFC_BC	oui	non	oui	oui	limite	insuffisante	60
4	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	suffisante	limite	66
5	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	suffisante	limite	66
6	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	large	suffisante	54
7	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	suffisante	suffisante	60
8	oui	TFC	non	non	non	non	large	suffisante	65
9	oui	mixte	oui	non	oui	non	limite	incomplète	66
10	oui	TFC	non	non	non	non	large	suffisante	54
11	oui	TFC	non	non	non	non	suffisante	incomplète	70
12	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	suffisante	limite	66
13	oui	TFC	non	non	non	non	limite	suffisante	55
14	oui	TFC	non	non	non	non	large	suffisante	60
15	oui	TFC	non	non	non	non	suffisante	suffisante	60
16	oui	TFC	oui	non	non	non	suffisante	limite	70
17	oui	mixte	oui	non	oui	non	suffisante	suffisante	60
18	oui	mixte	oui	non	oui	non	suffisante	limite	60
19	oui	mixte	oui	non	oui	non	suffisante		65
20	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	suffisante	limite	70
21	oui	TFC	oui	non	non	non	suffisante	suffisante	60
22	non								70
23	oui	TFC	non	non	non	non	large	suffisante	60
24	oui	TFC	non	non	non	non	large	suffisante	56
25	oui	TFC	non	non	non	non	suffisante	suffisante	70
26	oui	TFC	non	non	non	non	suffisante	insuffisante	66
27	oui	mixte	oui	non	oui	non	large	suffisante	54
28	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	large	suffisante	70
29	oui	mixte	oui	non	oui	non	suffisante	suffisante	70
30	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	suffisante	suffisante	60
31	oui	mixte	oui	non	oui	non	suffisante	limite	55
32	oui	TFC	non	non	non	non	large	suffisante	60
33	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	large	suffisante	65
34	non								80
35	oui	TFC_BC	oui	non	oui	oui	limite	incomplète	70
36	oui	mixte	oui	non	oui	non	suffisante	suffisante	70
37	non								
38	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	suffisante	limite	66
39	oui	TFC	non	non	non	non	suffisante	limite	66
40	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	suffisante	limite	60
41	oui	mixte	oui	oui	oui	oui	insuffisante	insuffisante	66
42	oui	TFC	non	non	non	non	large	suffisante	60
43	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	large	suffisante	60
44	oui	TFC	non	non	non	non	suffisante	limite	50
45	non								60
46	oui	mixte	oui	non	oui	oui	insuffisante	insuffisante	
47	oui	TFC_BC	oui	oui	oui	non	large	suffisante	60
48	oui	TFC	non	non	non	non	suffisante	suffisante	60

Patients	chirurgie	voieabord	Chirurgie lamecristallée	Chirurgie de l'orbite	Chirurgie meninge	Chirurgie cérébrale	r_sec_macro	micro	RX (grays)
49	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	large	suffisante	62
50	oui	TFC	oui	non	non	non	suffisante	suffisante	66
51	oui	TFC	non	non	non	non	limite	insuffisante	60
52	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	suffisante	suffisante	56
53	oui	mixte	oui	non	oui	non	suffisante	suffisante	59
54	non								72
55	oui	TFC	oui	non	oui	non	suffisante	limite	65
56	non								60
57	oui	TFC	non	non	non	non	suffisante	limite	60
58	oui	TFC	non	non	non	non	large	suffisante	50
59	oui	TFC	non	non	non	non	large	suffisante	55
60	oui	mixte	oui	non	oui	non	large	suffisante	60
61	oui	TFC	non	non	non	non	limite	limite	60
62	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	suffisante	suffisante	54
63	non								
64	oui	TFC	non	non	non	non	suffisante	suffisante	60
65	oui	TFC	non	non	non	non	limite	limite	60
66	oui	TFC	non	non	non	non	suffisante	suffisante	60
67	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	limite	limite	56
68	oui	mixte	oui	non	oui	non	suffisante	insuffisante	
69	non								18
70	oui	mixte	oui	non	oui	non	limite	insuffisante	
71	oui	TFC	non	non	non	non	large	suffisante	60
72	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	suffisante	suffisante	66
73	oui	mixte	oui	non	non	non	suffisante	suffisante	70
74	oui	TFC_BC	non	non	non	non	suffisante	suffisante	70
75	oui	TFC	non	non	non	non	large	suffisante	
76	non								74
77	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	large	suffisante	60
78	oui	TFC	oui	non	non	non	insuffisante	incomplète	66
79	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	suffisante	limite	50
80	oui	TFC	non	non	non	non	suffisante	limite	
81	oui	TFC	non	non	non	non	suffisante	suffisante	60
82	oui	TFC	oui	oui	oui	oui	insuffisante	insuffisante	66
83	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	suffisante	suffisante	66
84	oui	TFC	non	non	non	non	large	suffisante	64
85	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	limite	suffisante	60
86	oui	TFC	oui	non	non	non	suffisante	suffisante	65
87	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	large	suffisante	60
88	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	suffisante	limite	55
89	oui	TFC	non	non	non	non	limite	insuffisante	60
90	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	large	suffisante	56
91	oui	TFC	non	non	non	non	suffisante	suffisante	60
92	oui	mixte	oui	non	non	non	suffisante	suffisante	60
93	oui	mixte	oui	non	oui	oui	suffisante	suffisante	62
94	oui	TFC	non	non	non	non	large	suffisante	70
95	oui	TFC	non	non	non	non	suffisante	limite	65
96	oui	mixte	oui	non	oui	oui	limite	limite	
97	oui	TFC	non	non	non	non	suffisante	limite	55
98	oui	TFC_BC	oui	non	oui	non	suffisante	suffisante	65

Annexe 8 : Projet Hospitalier de Recherche Clinique

**Identification de marqueurs tumoraux prédictifs de rechute dans les adénocarcinomes de l'éthmoïde.
Etude multicentrique**

PROTOCOLE

Promoteur :

CHU Nantes, 5 allée de l'Île Gloriette, 44093 Nantes Cédex

Investigateur principal :

Monsieur le Docteur Tripodi , Service de Médecine et Santé au Travail. CHU Hôtel Dieu. Nantes.

Investigateurs :

Monsieur le Professeur Beauvillain. Chef de Service ORL. CHU Hôtel Dieu Nantes.

Monsieur le Professeur Géraut. Chef de Service. Consultation de Pathologies Professionnelles. CHU Hôtel Dieu. Nantes.

Madame le Docteur F. Molinié, Registre des Cancers de Loire Atlantique et Vendée- PIMESP. CHU Hôtel Dieu. Nantes

Madame le Docteur K. Renaudin, Service d'Anatomie Pathologie, Professeur Labois. CHU Hôtel Dieu. Nantes.

Monsieur le Docteur JF. Mosnier, Responsable de la Tumorothèque Centrale, Hôpital Laënnec, Nantes.

Monsieur le Professeur Marianowski, Chef de Service ORL, CHU Morvan, 5 avenue Foch. 29200 Brest.

Monsieur le Professeur Leclech, Chef de Service ORL, CHU Pontchaillou, 2 rue Henri Le Guilloux. 35033 Rennes.

Monsieur le Professeur Dubin, Monsieur le Professeur Lacourreye, Clinique ORL, CHU d'Angers - 4 rue Larey - 49033 Angers.

Monsieur le Professeur Beutter, Chef de Service ORL, CHRU de Tours, Hôpital Bretonneau, 2 boulevard Tonnelé. 37044 Tours

Monsieur le Professeur Fontanel, Monsieur le Professeur Klossec, CHU de Poitiers. Rue de la Milétrie, 86021 Poitiers.

Monsieur le Professeur Dewitte, Chef de Service, Consultation de Pathologie Professionnelle, CHU Morvan, 5 avenue Foch. 29200 Brest.

Monsieur le Professeur Verger, Chef de Service , Consultation de Pathologie Professionnelle, CHU Pontchaillou, 2 rue Henri Le Guilloux.

35033 Rennes.

Madame le Professeur Penneau Fontbonne, Consultation de Pathologie Professionnelle, CHU d'Angers - 4 rue Larey - 49033 Angers.

Monsieur le Professeur Lasfargues, Chef de Service , Consultation de Pathologie

Professionnelle, CHRU de Tours, Hôpital Bretonneau, 2 boulevard Tonnelé. 37044 Tours

Collaborateurs de recherche :

Monsieur le Professeur Meflah, PU-PH, Directeur Inserm U419, Service de Biochimie Générale, CHU Hôtel Dieu. Nantes.

Madame le Docteur Gratas-Rabbia-Ré, MCU-PH ; Inserm U419, Service de Biochimie Générale, CHU Hôtel Dieu. Nantes.

Equipes associées :

Docteur J. Léger, Génopôle Ouest , Plateforme Transcriptome.

Docteur V. Sébille-Rivain, Laboratoire de Biomathématiques-Biostatistiques. Faculté de Pharmacie. DRRC - Cellule de Biostatistiques, CHU de Nantes.

Sites de l'investigation :

Consultations de Pathologie Professionnelle, CHU Hôtel-Dieu Nantes, CHRU Pontchaillou Rennes, CHU Angers, CHU Brest, CHU Tours.

Services ORL, CHU Hôtel-Dieu Nantes, CHRU Pontchaillou Rennes, CHU Angers, CHU Brest, CHU Tours et Poitiers.

SOMMAIRE

- 1 RESUME DE L'ETUDE**
 - 2 OBJECTIF**
 - 3 JUSTIFICATION DE L'ETUDE**
 - 4 SCHEMA EXPERIMENTAL**
 - 5 DEFINITION DES SUJETS ELIGIBLES**
 - 6 BILAN INITIAL**
 - 7 CRITERES DE JUGEMENT**
 - 8 MODALITES DE REALISATION**
 - 9 GESTION DES EVENEMENTS INDESIRABLES**
 - 10 NOMBRE DE SUJETS NECESSAIRE**
 - 11 ANALYSE STATISTIQUE**
 - 12 REFERENCES**
 - 13 ASPECTS LOGISTIQUES, LEGAUX ET GENERAUX**
 - 14 ASPECTS ETHIQUES**
 - 15 CONFIDENTIALITE DES DONNEES**
 - 16 ORGANISATION PRATIQUE**
-
- ANNEXE 1 : NOTICE D'INFORMATION AU PATIENT**
 - ANNEXE 2 : CONSENTEMENT DE PARTICIPATION**
 - ANNEXE 3 : CAHIER D'OBSERVATION**

1 RESUME DE L'ETUDE

1-1 Objectifs de l'étude

L'objectif est d'identifier des marqueurs moléculaires spécifiques dans les adénocarcinomes de l'ethmoïde et d'étudier la relation qui existe entre l'expression de ces gènes et la survie sans rechute à 2 ans.

1-2 Caractéristiques de l'étude

Etude ouverte, prospective, multicentrique, sans bénéfice individuel direct.

L'objet de l'étude présentée est l'évaluation et la recherche, par des techniques avancées de biologie moléculaire, de l'expression de gènes spécifiques dans cancers de l'ethmoïde. En effet plusieurs travaux scientifiques nous incitent à promouvoir ce type d'étude: les données épidémiologiques qui indiquent un accroissement constant des cancers liés au tabac, ou l'alcool, mais peu de données sur les cancers professionnels, leur expression génétique et le lien éventuel qui pourrait être fait avec une exposition à des carcinogènes environnementaux. Pour ce qui concerne le cancer de l'ethmoïde, étroitement lié à l'exposition aux poussières de bois, aucune publication n'est recensée jusqu'à ce jour, sur les marqueurs génétiques. Par ailleurs des avancées récentes en terme de biotechnologie moléculaire et rapidité de séquençage du génome humain permettent aujourd'hui de dénombrer chez l'homme 30000 gènes environ. Néanmoins, leur fonctionnalité, en particulierité dans les cancers ORL est en cours d'exploration. Les premières techniques développées dans les années 80 telle la PCR permettent l'analyse quantitative de l'expression, gène par gène ; la technique des puces à ADN, permet maintenant une analyse quasi immédiate de plus de 10000 gènes. Elle peut donc permettre d'isoler une famille de gènes de fonction altérée et spécifique d'un cancer donné. L'objet principal est donc ici de rechercher dans les cancers de l'ethmoïde une ou plusieurs familles de gènes altérées et de la comparer au tissu sain (technique des puces à ADN). L'objectif secondaire sera d'étudier la valeur pronostique des pronostics des gènes identifiés en terme de survie à deux ans en tenant compte des données histologiques, de l'extension de la tumeur, et de l'influence des facteurs environnementaux sur l'expression des gènes (interrogatoire précis des patients sur le degré d'exposition à des risques chimiques carcinogènes connus). 30 sujets, ayant donné un consentement libre et éclairé seront inclus dans différents centres de l'Ouest de la France. Chaque tissu pathologique et sain prélevé sera dirigé vers le Service d'Anatomie Pathologique local qui confirmera le diagnostic histologique et la présence de tissu sain. Les tissus seront ensuite congelés et dirigés vers la tumorothèque locale. Chaque sujet inclus bénéficiera dans les Centres de Consultation de Pathologie Professionnel d'un interrogatoire précis sur les expositions professionnelles et environnementales subies durant leur carrière professionnelle. Enfin les tissus seront adressés à la tumorothèque du CHU de Nantes (Dr Mosnier, Hôpital Laënnec). L'Unité INSERM 601, participera au développement des techniques microarrays (puces à ADN) et à la PCR Quantitative pour mesurer la sur-expression des gènes dans les tissus pathologiques par rapport aux tissus sains. L'analyse biostatistique des résultats sera réalisée par le Laboratoire de Biostatistiques et Biomathématiques de la Faculté de Médecine de Nantes.

1-3 Durée de l'étude

Trois ans.

Nombre de patients :

Le nombre de patients qu'il est nécessaire d'inclure dans l'étude de la valeur pronostique des marqueurs moléculaires identifiés dans les cancers de l'ethmoïde est de 40,

2 JUSTIFICATION DE L'ETUDE

2-1 Données épidémiologiques

L'ensemble des données épidémiologiques s'accorde sur une corrélation entre les cancers ORL et des facteurs toxicologiques personnels ou environnementaux : principalement alcool et tabac et dans un nombre plus limité de cas, exposition professionnelle, telle que la poussière du bois ou des tanins pour le cancer de l'ethmoïde (Brinton *et al* 2002, Zhu *et al*, 2002, Stoll *et al*, 2001).

Dans les Pays de la Loire, ce cancer est une affection fréquente. Il arrive en troisième position chez l'homme, en terme de taux d'incidence standardisé. Le réseau FRANCIM estime qu'il est la troisième cause de mortalité chez les hommes, dans les Pays de la Loire comme en France.

En Loire-Atlantique les taux d'incidence sont proches de ceux estimés par FRANCIM pour la région Pays de la Loire. Le taux d'incidence annuel standardisé (sur la population européenne) est de 66,5/10⁵ hommes et de 7,9/10⁵ femmes (calcul moyen sur 1998-2001). 89 % des cancers ORL sont des carcinomes épidermoïdes. 87 % sont diagnostiqués chez l'homme.

Il résulte des données épidémiologiques et histologiques que la grande majorité des carcinomes ORL sont

des carcinomes épidermoïdes liés à une exposition isolée ou concomitante à l'alcool et au tabac.

L'adénocarcinome de l'ethmoïde est étroitement lié aux poussières de bois mais aussi au formaldéhyde. (Luc D. *et al.*, 2002)

Répartition des cancers ORL par topographie et type histologique diagnostiqués en Loire Atlantique entre 1998-2001 :

Topographie	épidermoïde	adénocarcinome	Autre	Lymphome	non précisé	Total
Lèvre	82	3	0	0	0	85
Cavité buccale	663	32	8	40	20	763
Oropharynx	108	2	0	1	4	115
Nasopharynx	14	2	7	11	2	36
Sinuspiriforme	103		0	0	2	105
Hypopharynx	83	2	0	2	5	92
Pharynx SAI	28	1	0	2	0	31
Larynx	435	3	1	1	7	447
Fosse Nasale	28	5	5	4	3	45
Ethmoïde	0	17	1	0	0	18
Total	1544	67	22	61	43	1737

Notes :

- cancer ORL diagnostiqués chez des patients résidant en Loire-Atlantique au moment du diagnostic.

- autres histologies : neuroendocrine, mucipare, mixte glandulaire et malpighien, mélanome, sarcome, carcinome basaloïde, paragangliome...

Source : Registre des cancers de Loire-Atlantique, Dr Molinié, Hôpital Laennec. Nantes (2003).

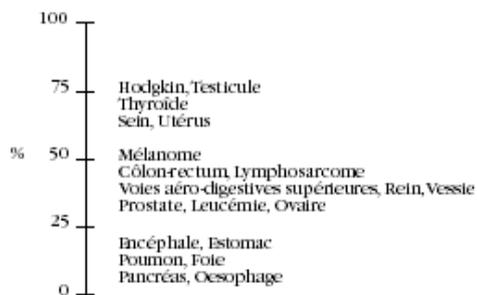
2-2 Facteurs pronostiques

- Pour Do K.A. *et al* (2003), le risque de rechute après chirurgie est lié à l'âge (RR = 2,1 ; 95 % CI 1,5-2,8), la poursuite de l'exposition au tabac (RR = 2,1 ; 95 % CI 1,3-3,6) ou l'alcool (RR = 1,3 ; 95 % CI 1,0-1,7), et le stade de la tumeur (RR = 1,5 ; 95 % CI 1,1-2,1 pour un stade II traité par chimiothérapie).
- Browman G.P. *et al* (2002), constatent que la poursuite de la consommation de tabac réduit le taux de survie. Parmi 148 patients inclus, 113 patients atteints de cancer ORL (stade 3 ou 4) sont fumeurs pendant la radiothérapie. Les non fumeurs ou faiblement fumeurs ont un taux de survie plus élevé indépendamment du traitement : en moyenne 42 mois contre 29 mois chez les fumeurs. Au total il est démontré que le stade initial de la tumeur et la poursuite d'une exposition à des carcinogènes sont des facteurs pronostiques majeurs.

Ainsi, la consommation de tabac et d'alcool sont des facteurs déterminants dans la genèse mais aussi dans la rechute des tumeurs ORL. Dans les critères pronostiques interviennent aussi le stade initial et le type histologique de la tumeur (O-charoenrat *et al*, 2002).

Le pronostic vital global des cancers ORL est de 50 % de survie à 5 ans :

Ordre de grandeur des taux de survie à 5 ans, tous stades confondus, pour les principales localisations cancéreuses (en %)



Sources : Hédelin 1990, EPC 1991

Source : ORS Pays de la Loire
Dernière mise à jour : Mai 1998
© ORS Pays de la Loire

Le pronostic dans les cancers de la paroi postérieure du pharynx a été étudié par l'équipe nantaise dans le cadre d'une méta-analyse (Christophe Ferron, 2002).

Auteurs	Année	Nombre de cas	Type de traitement initial	Survie à 3 ans	Survie à 5 ans
Dalley	1968	47	RTE	23 %	12,5 %
Wang	1971	36	RTE	25 %	16,6 %
Bryce	1971	38	Chirurgie + RTE ou RTE	17,6 %	22,2 %
Carpenter	1976	37	Chirurgie + RTE ou RTE	21,7 %	-
Mark	1978	13	RTE	-	15 %
Pene	1978	131	RTE	-	3 %
Puhakka	1980	35	RTE	21 %	21 %
Talton	1981	24	RTE	-	25 %
Raine	1982	26 (T1-T2)	RTE (18) chirurgie (6)	-	28 %
Schwabb	1983		Chirurgie + RTE	-	25 %
Jaulery	1986	98	RTE	-	18 %
Spiro	1990	78	Chirurgie + RTE ou RTE	-	32 %
Barzan	1995	63	Chirurgie + RTE ou RTE	-	22 %
Cooper	2000	22	RTE	50 % (T1-T2 : 77 % T3-T4 : 11 %)	-
Julieron	2001	54 23 (post-RTE)	Chirurgie + RTE ou RTE	-	35 % 16 %

RTE : radiothérapie externe exclusive ; chirurgie + RTE : association radiochirurgicale ; post-RTE : traité après échec d'une radiothérapie exclusive.

2-3 Etat de la recherche scientifique dans les cancers ORL:

Les stratégies thérapeutiques actuelles des cancers ORL reposent principalement sur la compréhension de l'histoire de la maladie et sur l'évaluation des facteurs pronostiques cliniques (stade tumoral, taille de la tumeur, et existence de ganglions). En fonction de ces données, une chirurgie, une chimiothérapie et/ou une radiothérapie sont mises en place.

Le traitement optimal n'a pas encore été identifié, en raison peut-être de la grande hétérogénéité des patients et des tumeurs (Stoll D, Bebear JP *et al.*, 2001).

C'est pourquoi, les études les plus récentes s'orientent vers la recherche de marqueurs biologiques : altérations chromosomiques, variation de l'expression génique dans les tumeurs.... Jusqu'à présent malgré un grand nombre d'études seulement quatre marqueurs semblent avoir une pertinence sans être encore complètement validé du fait de résultats parfois discordants (Quon H. *et al.*, 2001).

- p53 : c'est une protéine nucléaire et l'un des marqueurs le plus étudié dans les cancers ORL. Les fonctions de ce gène sont nombreuses : régulation de la transcription des gènes, de la synthèse de l'ADN, coordination du cycle cellulaire, et apoptose. Son rôle de gène suppresseur de tumeur a été largement démontré même si les mécanismes d'action précis ne sont pas complètement connus. De plus, p53 joue un rôle important comme médiateur de la sensibilité cellulaire à la chimiothérapie et /ou la radiothérapie. Dans les cancers ORL, la littérature suggère un effet négatif d'une protéine p53 anormale sur le contrôle locorégional et la survie de patients. Toutefois la concordance entre les différents travaux n'étant pas totale, des études complémentaires sur des cohortes homogènes de patients sont nécessaires pour valider p53 comme marqueur moléculaire pronostique.
- EGFR (epidermal growth factor receptor): glycoprotéine transmembranaire, c'est un récepteur de la famille des tyrosines kinases. Son activation par l'EGF ou le TGF induit une augmentation de la croissance cellulaire. Une sur-expression de ce gène est observée dans 42 % à 80 % des cancers ORL et ceci aurait un effet négatif sur les rechutes et la survie des patients.
- TGF α : polypeptide homologue à l'EGF. Bien que moins étudié que l'EGF, quelques travaux montrent que la sur-expression de ce gène pourrait entraîner une augmentation du risque de rechute.
- Cyclin D1 : membre de la famille des cyclines-dépendantes- kinases, responsable de la régulation du cycle cellulaire. Plusieurs études mettent en évidence que la sur-expression de la cyclin D1 ou l'amplification de son gène sont associés à une diminution de la survie des patients traités par radiothérapie.

Bien que ces quatre gènes semblent prometteurs dans un contexte pronostique, d'autres études de cohortes sont nécessaires pour parvenir à démontrer leur éventuelle utilité clinique. **A ce jour aucun marqueur biologique ne contribue aux décisions thérapeutiques, en particulier dans les cancers de l'ethmoïde.**

Les études réalisées à ce jour se sont appuyées sur des méthodes classiques : immunohistochimie, PCR, et séquençage. L'avènement de la technique des puces à ADN (microarrays), puissant outil d'analyse du transcriptome, devrait permettre une meilleure exploration, via l'étude simultanée d'un grand nombre de gènes. Cette approche méthodologique doit permettre l'identification de gènes d'intérêts. On peut s'attendre à une nouvelle classification des tumeurs susceptibles de modifier la prise en charge de patients (prédiction de la réponse aux traitements, de la rechute, identification de nouvelles cibles thérapeutiques). Des études de ce type ont déjà été réalisées :

- en 2001, Alevizos *et al.* comparent le tissu sain et le tissu tumoral de 5 patients porteurs de cancer ORL, par la technique des puces à ADN (microarrays): ils isolent 39 gènes d'intérêt (16 sur exprimés, 23 sous exprimés).
 - Hwang en 2002, a isolé 45 gènes dont 16 sur exprimés et 29 sous exprimés ; ces résultats ont été confirmés par RT-PCR. 16 gènes sont communs avec l'étude d'Alevizos *et al.* (2001).
 - Belbin *et al* (2002) ont classifié des patients en 2 sous-groupes, d'après leur profil d'expression génétique (375 gènes isolés après microarrays).
 - Higuchi *et al* (2003) ont étudié quant à eux les gènes impliqués dans la résistance des cancers ORL au CDDP (dérivé du Cis-Platine) et ont identifié 3 gènes exprimés différemment dans les cellules sensibles et les cellules résistantes : sur-expression de GPH α (glycoprotéine hormone sous-unité α), et sous-expression du récepteur des folates KIA0069, et de l'antigène tumoral L6, Ces gènes sont à valider sur un grand nombre de tumeurs pour confirmer leur utilité en tant que marqueur.
- **A ce jour aucune étude publiée dans le domaine de marqueurs génétiques sur le cancer de l'ethmoïde, ce qui nous conduit au vu des études épidémiologiques qui confirment la rareté de ce type de cancer, à mettre en place une étude multicentrique axée sur la recherche de marqueurs spécifiques des cancers de l'ethmoïde.**

2-4 Projet de recherche

Notre projet comportera trois phases : 1) identification de marqueurs spécifiques via la technique des microarrays, 2) validation des marqueurs sélectionnés par PCR en temps réel, 3) évaluation de la valeur pronostique des gènes précédemment identifiés en termes de survie sans rechute à 2 ans en tenant compte du protocole thérapeutique (chirurgie \pm chimiothérapie \pm radiothérapie), des facteurs pronostiques cliniques et para-cliniques (stade tumoral, taille de la tumeur, existence de ganglions envahis et données histologiques) et

des facteurs de risques personnels ou environnementaux (alcool, tabac, facteurs professionnels).

3 OBJECTIFS

Objectif principal

L'objectif est d'identifier des marqueurs moléculaires spécifiques dans les cancers de l'ethmoïde.

Objectif secondaire

L'objectif secondaire est d'étudier la valeur pronostique des profils d'expression des gènes précédemment identifiés en terme de survie sans rechute à 2 ans.

4 SCHEMA EXPERIMENTAL

Cette question conduit à proposer une étude ouverte, prospective, multicentrique, sans bénéfice individuel direct.

5 DEFINITION DES SUJETS ELIGIBLES

5-1 Critères d'inclusion

- Adulte de plus de 18 ans ou plus
- Ayant un adénocarcinome de l'ethmoïde confirmé histologiquement.
- Ayant donné un consentement libre, éclairé et par écrit.

5-2 Critères de non inclusion

- Autres cancers ORL
- Patient n'ayant pas signé le consentement informé

6, BILAN INITIAL

Les échantillons utilisés pour cette étude proviendront du service de chirurgie ORL (Monsieur le Pr. Beauvillain, à Nantes), après obtention du consentement libre et éclairé des patients. Ces patients auront un interrogatoire clinique classique et un questionnaire épidémiologique approfondi afin d'avoir connaissance des facteurs d'exposition possibles.

Le bilan d'extension du cancer sera clinique et histologique (adénopathies) et radiologique (Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire cérébrale) pour préciser la taille de la tumeur.

7 CRITERES DE JUGEMENT

7-1 Critère principal

Le critère de jugement privilégié est l'identification de marqueurs moléculaires spécifiques dans les cancers de l'ethmoïde.

7-2 Critère secondaire

Le critère secondaire est l'étude de la relation qui existe entre le profil d'expression des gènes identifiés et la survie sans rechute à 2 ans en tenant compte des facteurs pronostiques cliniques et para-cliniques (stade tumoral, taille de la tumeur, existence de ganglions, données histologiques), du protocole thérapeutique suivi (chirurgie ±chimiothérapie±radiothérapie) et des facteurs de risque personnels ou environnementaux (alcool, tabac, facteurs professionnels: poussière de bois).

8 MODALITES DE REALISATION

8-1 Interrogatoire des patients hospitalisés pour cancer dans le service d'ORL et inclusion dans l'étude

Pour tous les patients atteints de cancers inclus dans le protocole, le Médecin référent du service Médecine de Médecine Travail procédera à un interrogatoire sur les expositions professionnelles et environnementales antérieures pour la constitution du cahier d'observation (annexe 3).

8-2 Recueil des prélèvements

L'opérateur (bloc chirurgical ORL) devra recueillir un fragment de tissu tumoral et un fragment en zone péri-tumorale saine. Le tissu de taille suffisante, (tissu pathologique 1 à 4 cm², tissu sain: 0,5 à 1 cm²), à l'état frais, sera placé dans les flacons usuels destinés à l'anatomie pathologique (Flacon marqué 'TISSU PATHOLOGIQUE' et 'TISSU SAIN').

Les fragments aussitôt prélevés seront acheminés vers le Service d'Anatomie Pathologique du CHU pour congélation à - 80° C. Il y a la possibilité à Nantes, d'acheminer les prélèvements par un technicien du Service Anatomie Pathologique (son bip est le 26 051). En l'absence de technicien, un Agent Hospitalier du Service ORL pourra acheminer directement les prélèvements au Laboratoire d'Anatomie Pathologique.

Les fragments congelés seront ensuite dirigés par le Service d'Anatomie Pathologique vers la Tumorothèque locale, puis vers la Tumorothèque Centrale du CHU de Nantes (Docteur MOSNIER, Hôpital Laënnec, NANTES).

Une fiche contenant toutes les informations sur le type d'intervention chirurgicale, le type de tissu et les expositions ou traitements éventuels, sera adjointe sera placée dans le cahier d'observation (annexe 3).

Elle sera jointe au cahier de recueil des données.

Notre projet comportera trois étapes qui se dérouleront de la manière suivante :

8-3 Première phase

La première phase de l'étude consistera à identifier les gènes ayant des profils d'expression différents dans les tumeurs.

Pour cela nous utiliserons la technique des microarrays ou puces à ADN pour comparer de façon globale, au sein d'une pathologie donnée, le transcriptome d'un tissu sain versus un tissu tumoral. Cette phase sera faite en collaboration avec le Genopole Ouest.

Le principe de cette technique est le suivant : les ARN des deux tissus à comparer sont extraits, quantifiés puis marqués avec des fluorochromes Cy3 et Cy5 de différentes couleurs. Ces ARN cibles sont ensuite hybridés sur une puce, lame de verre sur laquelle ont été fixés des sondes, c'est à dire des séquences de gènes connus et répertoriés. Après les étapes de lavage, les hybrides sondes-cibles fluorescents sont repérés, quantifiés et la comparaison des intensités de fluorescence entre les deux fluorochromes permet d'évaluer la différence de niveaux d'expression relatives des gènes entre les deux échantillons.

Recueil des images par le scanner

Des images brutes des signaux Cy3 et Cy5 vont être obtenues en lisant les lames dans un scanner. Ces images vont ensuite être traitées par le logiciel Genepix et les données d'expression brutes issues de cette analyse vont être filtrées et normalisées en utilisant une méthode développée dans notre laboratoire. L'analyse statistique sera réalisée à l'aide du logiciel SAM software développé spécifiquement pour l'analyse des données de puces à ADN.

La lecture sera réalisée par un scanner composé d'un microscope confocal couplé à trois lasers (ScanArray 4000 GSI LUMONICS-USA) avec une résolution spatiale de 10 µm.

Traitement de l'image et extraction des données

Les images seront traitées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (GENEPIX) dédié aux puces à ADN.

Les étapes clés de cette analyse consistent à localiser les différentes unités d'hybridation, à segmenter chaque unité en séparant signal et bruit de fond puis à extraire l'ensemble des données recueillies pour

chaque unité d'hybridation (intensité d'hybridation et critères de qualités) dans un fichier informatique.

Traitement des données

Les données seront d'abord traitées de manière à éliminer les artefacts expérimentaux.

- Un score compilant les critères de qualité et les niveaux d'intensité du signal permettra de sélectionner les hybridations valides pour l'interprétation des données. Les dépôts comportant des défauts seront éliminés.
- Une étape de normalisation des données est ensuite réalisée. Elle est appliquée sur une sélection préalable des données (méthode des rangs) et utilise une procédure de régression non linéaire (lowess fitness).
- Enfin une procédure d'élimination des valeurs aberrantes (outliers) est appliquée sur les données normalisées. Les tests de Grubb, Dixon et Z-modifié sont utilisés.

L'ensemble des valeurs ainsi obtenues pour l'ensemble des gènes et des hybridations réalisées sera regroupé dans une matrice d'expression des gènes. C'est cette matrice qui sera utilisée pour les analyses statistiques.

Ces étapes sont indispensables pour permettre de s'affranchir des artefacts expérimentaux. Elles permettent une analyse fiable des résultats à l'intérieur d'une puce et surtout de confronter les résultats des différentes hybridations. Elles font aujourd'hui appel à un traitement automatisé par le biais de procédures développées au sein de l'équipe de génomique de la Plateforme transcriptome du Génomôle Ouest (Programme MADTOOLS).

8-4 Deuxième phase

Cette phase a pour objectif de **confirmer la première phase** par une méthode quantitative, la **PCR en temps réel**.

Pour cette étude les ARN de tissus péri-tumoraux et tumoraux seront extraits puis traités par une transcriptase reverse pour obtenir des ADNc qui seront analysés par PCR quantitative.

La PCR (polymerase Chain Réaction) en temps réel, technique développée dans les années 90 est actuellement en plein essor. Elle est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction et par conséquent à la quantité initiale de matrice.

La PCR en temps réel réalise le suivi de la fluorescence à chaque cycle contrairement à la PCR classique où les amplicons ne sont détectés qu'à la fin du processus. La fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité d'amplicons. Cette technique permet une analyse quantitative précise basée sur le concept de « cycle seuil (Ct) ». Ce cycle peut-être comparé aux Ct obtenus dans les mêmes conditions avec des concentrations connues d'amplicons (courbes standards) et permet ainsi de connaître le nombre de copies initiales du gène dans l'échantillon. Pour calibrer le système, les gènes d'intérêt seront dans tous les cas quantifiés par rapport à l'expression d'un gène de ménage, tel que la GAPDH. Tout étant automatisé, la quantification ne comporte aucune étape post-PCR ce qui évite toute contamination.

La différence d'expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) des gènes entre le tissu pathologique et le tissu sain sera calculée en utilisant la méthode du $\Delta\Delta Ct$, décrite ci-dessous :

$$\begin{aligned}\Delta Ct &= Ct \text{ gène intérêt} - Ct \text{ gène de ménage} \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct \text{ tissu pathologique} - \Delta Ct \text{ tissu sain} \\ \text{rapport d'expression} &: 2^{-\Delta\Delta Ct}\end{aligned}$$

Il existe différentes techniques de détection parmi lesquelles nous utiliserons : le sybr green et les sondes à hydrolyse. (sondes Taqman):

- Le sybr green est un agent intercalant dont la fluorescence augmente lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. Cette technique est simple à mettre en œuvre, et bon marché mais elle est peu spécifique car le sybr green peut se lier à tout ADN double brin. Chaque amplicon à une température de dissociation (Tm) caractéristique ce qui permet de distinguer les produits spécifiques des non spécifiques tel que les primers-dimers ;

- Les sondes à hydrolyse : cette méthode est basée sur l'activité 5'exonucleasique de la Taq polymérase, qui hydrolyse une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon. Ces sondes, spécifiques du gène à étudier, sont synthétisées avec un fluorochrome reporter en 5' et un quencher en 3'. Lors de l'hydrolyse le reporter est libéré de l'environnement du quencher et son excitation permet alors l'émission de fluorescence qui sera enregistrée à chaque cycle de la PCR. Cette technique est plus coûteuse que le sybr green mais plus spécifique et permet de faire des réactions PCR en multiplex.

8-5 Troisième phase

Cette phase aura pour objectif d'étudier la relation entre le profil d'expression des gènes identifiés et la survie sans rechute à 2 ans en tenant compte des facteurs pronostiques cliniques et para-cliniques (stade tumoral, taille de la tumeur, existence de ganglions envahis, degré de différenciation tumorale), du protocole thérapeutique suivi (chirurgie ±chimiothérapie±radiothérapie) et des facteurs de risques cumulés (alcool, tabac, facteurs professionnels).

9 GESTION DES EVENEMENTS INDESIRABLES

Dans notre étude, il n'y pas de risque surajouté par rapport à l'intervention chirurgicale et au protocole thérapeutique décidé par les chirurgiens et les oncologues. Néanmoins, l'investigateur aura la responsabilité de noter et de rapporter tout les évènement indésirable (EI) éventuel survenant suite à l'intervention chirurgicale et à la prise en charge thérapeutique. Chaque EI sera suivi jusqu'à sa complète résolution, qu'il soit imputable ou non au geste chirurgical ou qu'il évoque ou non une évolution de la maladie sous-jacente.

9-1 Définition des évènements indésirables

9-1-1 Evènement indésirable grave

- tout évènement fatal pendant l'intervention
- tout évènement menaçant le pronostic vital,
- tout évènement provoquant ou prolongeant une hospitalisation,
- tout évènement entraînant un handicap ou une incapacité.

9-1-2 Autres évènements indésirables

Tout évènement subi par un patient au cours de l'étude, qu'il soit attendu ou non, qu'il soit considéré ou non comme lié à l'étude.

9,2, Définition de l'intensité des évènements indésirables

L'intensité des EI est évaluée selon une cotation à 4 classes :

- léger de grade 1 : EI généralement transitoire et sans retentissement sur les activités normales,
- modéré de grade 2 : EI suffisamment gênant pour retentir sur les activités normales,

- sévère de grades 3 et 4 : EI modifiant considérablement le cours normal des activités du patient, ou invalidant, ou constituant une menace pour la vie du patient.

9,3, Déclaration des évènements indésirables

9-3-1 Déclaration d'un évènement indésirable grave

Les EI graves, qu'ils soient ou non imputables au geste chirurgical, doivent impérativement être déclarés dans les 24 heures de leur survenue par fax (02 40 08 71 67) au promoteur de l'étude.

Un formulaire spécifique d'EI grave sera rempli par l'investigateur et adressé au promoteur dans les 7 jours qui suivent sa survenue.

9-3-2 Déclaration des autres évènements indésirables

Tous les autres EI seront rapportés sur le formulaire « évènement indésirable » du cahier d'observation en précisant la date et l'heure de survenue, la description, la sévérité, la durée, le mode de résolution, l'étiologie, l'imputabilité et les décisions prises.

9-4 Conduite à tenir devant un évènement indésirable

Si un EI survient, l'investigateur pourra :

- soit poursuivre l'intervention chirurgicale,
- soit arrêter temporairement ou définitivement.

En outre, la surveillance sera renforcée et un traitement symptomatique pourra être ajouté.

10 NOMBRE DE SUJETS NECESSAIRE

Analyse par la technique des microarrays

Le nombre de patients à inclure pour l'analyse par la technique des microarrays est 6 afin de permettre la mise en évidence d'une différence des niveaux moyens d'expression des gènes de l'ordre de 1,32 en échelle log base 2, c'est-à-dire une différence de $2^{1,32} = 2,5$ en supposant que l'écart-type du niveau d'expression des gènes est de 0,35 en échelle log base 2, c'est-à-dire $2^{0,35} = 1,3$ aux risques d'erreur $\alpha = 0,005$ (risque faible afin de limiter les faux positifs) et $\beta = 0,05$ (Simon R, 2002 ; Ting Lee ML, 2002).

Analyse par PCR et étude pronostique

Le calcul du nombre de patients à inclure est basé sur des hypothèses liées au risque de rechute ou de décès, sur les différences entre les profils d'expression des gènes (précédemment identifiés par la technique des microarrays) et analysés par PCR quantitative, et sur l'influence de ces différences sur le risque de rechute ou de décès.

Le nombre de rechute ou de décès qu'il est nécessaire d'observer est 48 afin de permettre la détection d'une augmentation du risque instantané de rechute ou de décès (risque supposé doublé en fonction d'un changement d'une unité en échelle log base 2 du profil d'expression des gènes) aux risques d'erreur $\alpha = 0,005$ (risque faible afin de limiter les faux positifs) et $\beta = 0,05$ (Simon R, 2002). De plus, l'écart-type du niveau d'expression des gènes identifiés, exprimé en échelle log base 2, est supposé être égal à 1, c'est-à-dire $2^1 = 2$,

Le nombre de patients à inclure est donc de 40 si l'on ne retient que l'adénocarcinome de l'ethmoïde (en supposant un risque de rechute ou de décès égal à 40 %, et en éliminant les carcinomes ORL pharyngés ou laryngés).

11 ANALYSE STATISTIQUE

Les analyses porteront sur tous les patients inclus (analyse en intention de traiter).

11-1 Technique des microarrays

La sélection statistique des gènes différentiels sera réalisée avec le logiciel SAM (significance analysis of microarrays). L'objectif est de détecter les gènes dont l'expression sera différentielle et statistiquement significative entre les tissus sains versus tissus pathologiques. Un gène sera considéré comme tel si la variation de son niveau d'expression est significativement supérieure à l'écart type de ses mesures répétées. Il s'agit d'un test dérivé du test t de Student. Le niveau de confiance dans le résultat sera exprimé en déterminant le taux de faux positifs dans les gènes sélectionnés (FDR pour false discovery rate). Le groupe de gènes que nous allons sélectionner sera celui qui possédera le FDR médian le plus bas. Sur la base de ce FDR, une valeur de confiance statistique sera calculée pour chaque gène (q-value).

Un deuxième test de significativité statistique sera réalisé pour chaque gène. Il s'agit d'un test t. A la différence des procédures classiques, le seuil de significativité du test pour chaque gène ne sera pas calculé selon les abaques habituellement utilisés. En effet, dans le contexte des données de puces à ADN, cette procédure est trop permissive et introduit donc un trop grand nombre de faux positifs. Des procédures de « bootstrapping » seront donc utilisées. Ces procédures seront réalisées à l'aide du logiciel R. Pour chaque gène, une p-value sera ainsi calculée. Cette p-value possède la même signification statistique que la p-value classiquement calculée selon d'autres méthodes. Une p-value mesurée à 0,05 signifie donc une erreur de type I de 5 % pour le gène étudié.

La sélection des gènes d'intérêts sera effectuée en comparant les profils d'expression obtenus dans les tissus sains versus les tissus pathologiques.

11-2 Etude pronostique

11,2,1, Estimation

Estimations ponctuelles (pourcentages, moyennes) et par écart-types pour les variables qualitatives et quantitatives. Estimation de la fonction de survie sans rechute par l'estimateur de Kaplan-Meier.

11,2,2, Analyse univariée - Identification des gènes ayant des niveaux d'expression différents

Les analyses consisteront à tester l'existence d'une relation entre les profils d'expression des gènes précédemment identifiés pris séparément et la survie sans rechute à 2 ans. Des analyses univariées seront également effectuées sur les variables démographiques recueillies à l'inclusion, les facteurs de risques environnementaux (alcool, tabac) et les facteurs pronostiques cliniques connus (stade tumoral, taille de la tumeur, existence de ganglions). Des tests du log-rank seront réalisés.

Selon le nombre de gènes sélectionnés, le contrôle de la probabilité de rejeter à tort au moins l'une des hypothèses nulles testées sera réalisée au seuil $\alpha=5\%$ à l'aide de la procédure de Bonferroni.

11,2,3, Analyse multivariée

Les facteurs qui auront été précédemment identifiés dans les analyses univariées comme liés au critère étudié ainsi que les facteurs pronostiques cliniques et para-cliniques (stade tumoral, taille de la tumeur, existence de ganglions, degré de différenciation histologique), le protocole thérapeutique suivi (chirurgie \pm chimiothérapie \pm radiothérapie), et les facteurs de risque environnementaux (alcool,

tabac, facteurs professionnels), seront ensuite incorporés dans des modèles permettant d'effectuer des analyses multivariées.

Les analyses multivariées seront effectuées à l'aide de modèles de Cox (l'hypothèse des hasards proportionnels sera vérifiée pour chacune des variables candidates à l'inclusion dans le modèle). La sélection du meilleur modèle de Cox permettant d'expliquer les phénomènes observés sera réalisée en utilisant des tests du rapport des vraisemblances. L'utilisation de méthodes de sélection ascendantes et descendantes pas à pas permettra de sélectionner les facteurs les plus importants pour prédire la survie sans rechute à 2 ans des patients.

Une méthode de ré-échantillonnage, la méthode de Bootstrap (Efron B, 1993), qui permet de limiter la sensibilité du modèle à l'échantillonnage, sera utilisée dans une étape de validation afin d'évaluer la robustesse du modèle de Cox final.

12 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alevizos I, Mahadevappa M, Zhang X, Ohyama H, Kohno Y, Posner M, Gallagher GT, Varvares M, Cohen D, Kim D, Kent R, Donoff RB, Todd R, Yung CM, Warrington JA, Wong DT. Oral cancer in vivo gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis. *Oncogene*. 2001;20:6196-204
2. Belbin T.J., Singh B., Belbin TJ, Singh B, Barber I, Socci N, Wenig B, Smith R, Prystowsky MB, Childs G. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays. *Cancer Res*. 2002;62:1184-90
3. Brinton LA, Comba P, Hardell L, HaOui RB, Magnani C, Merler E, Preston-Martin S, Vaughan TL, Zheng W, Boffetta P. Sinonasal cancer and occupational exposures: a pooled analysis of 12 case-control studies. *Cancer Causes Control* 2002;13:147-57
4. Browman GP, Mohide EA, Willan A, Hodson I, Wong G, Grimard L, MacKenzie RG, El-Sayed S, Dunn E, Farrell S. Association between smoking during radiotherapy and prognosis in head and neck cancer: a follow-up study. *Head Neck*. 2002 ;24:1031-7
5. Do KA, Johnson MM, Doherty DA, Lee JJ, Wu XF, Dong Q, Hong WK, Khuri FR, Fu KK, Spitz MR. Second primary tumors in patients with upper aerodigestive tract cancers: joint effects of smoking and alcohol. *Cancer Causes Control*. 2003;2:131-8
6. Efron B, Tibshirani RJ: *An Introduction to the Bootstrap*. San Francisco, Chapman & Hall, 1993
7. Ferron C., Emam N., Beauvillain de Montreuil C. Tumeurs de la paroi postérieure du pharynx. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*. 20-601-A-10 (2002)16
8. Higuchi E, Oridate N, Furuta Y, Suzuki S, Hatakeyama H, Sawa H, Sunayashiki-Kusuzaki K, Yamazaki K, Inuyama Y, Fukuda S. Differentially expressed genes associated with CIS-diamminedichloroplatinum (II) resistance in head and neck cancer using differential display and CDNA microarray. *Head Neck*. 2003 ;25:187-93
9. Hwang D, Alevizos I, Schmitt WA, Misra J, Ohyama H, Todd R, Mahadevappa M, Warrington JA, Stephanopoulos G, Wong DT, Stephanopoulos G. Genomic dissection for characterization of cancerous oral epithelium tissues using transcription profiling. *Oral Oncol*. 2003 ; 39:259-68

10. Luc D, Leclerc A, Begin D, Demers PA, Gerin M, Orłowski E, Kogevinas M, Belli S, Bugel I, Bolm-Audorff U, Brinton LA, Comba P, Hardell L, HaOui RB, Magnani C, Merler E, Preston-Martin S, Vaughan TL, Zheng W, Boffetta P. Sinonasal cancer and occupational exposures: a pooled analysis of 12 case-control studies. *Cancer Causes Control* 2002 Mar ;13(2):147-57,
11. O-charoenrat P, Rhys-Evans PH, Archer DJ, Eccles SA. C-erbB receptors in squamous cell carcinomas of the head and neck: clinical significance and correlation with matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factors. *Oral Oncol.* 2002 ;1:73-80,
12. Quon H., Liu F.F., Cummings B.J.. Potential molecular prognostic markers in Head and Neck squamous cell carcinomas. *Head and Neck.* 2001 ;23: 147-159
13. Remontet L., Esteve J., Bouvier A.M., Grosclaude P., Launoy G., Menegoz F., Exbrayat C., Tretare B., Carli M.P., Guizard A.V., Berceili P., Colonna M., Halna J.M., Hedelin G., Macé-Lesec'h J., Jun Peng, Buemi A., Velten M., Jouglu E., Arveux P., Le Bodic L., Michel E., Sauvage M., Schwartz C, Faivre J., Estimations nationales: tendances de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1978 et 2000, *BEH.* 2003 ; 41-42: 191
14. Simon R, Radmacher MD, Dobbin K. Design of studies using DNA Microarrays. *Genetic Epidemiology.* 2002 ;23:21-36,
15. Stoll D, Bebear JP, Truilhe Y, Darrouzet V, David N. Ethmoid adenocarcinomas: retrospective study of 76 patients. *Rev Laryngol Otol Rhinol .* 2001 ;122:21-9
16. Ting Lee ML, Whitmore GA. Power and sample size for DNA microarray studies. *Statistics in Medicine.* 2002 ;21:3543-3570,
17. Zhu K, Levine RS, Brann EA, Hall HI, Caplan LS, Gnepp DR. Case-control study evaluating the homogeneity and heterogeneity of risk factors between sinonasal and nasopharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2002 ; 1 ; 99:119-23

13- ASPECTS LOGISTIQUES, LEGAUX ET GENERAUX

L'ensemble de ces informations est résumé sur une notice d'information remise à chaque patient et dont une copie est jointe en annexe 1,

Le formulaire de consentement, dont une copie est jointe en annexe 2, sera signé en deux exemplaires par le patient et l'investigateur. Une copie de ce document sera remise à la personne participant à l'étude ; l'investigateur principal gardera le deuxième exemplaire dans ses archives pendant un minimum de 15 ans.

13-1 Transcription des données et archivage

Toutes les informations requises par le protocole seront fournies et une explication donnée pour chaque donnée manquante.

Les données seront transcrites dans le cahier d'observation au fur et à mesure qu'elles seront obtenues, qu'il s'agisse de données cliniques ou paracliniques. Elles seront copiées de façon nette et lisible à l'encre noire dans ce cahier. Les données erronées dépistées sur le cahier d'observation seront clairement barrées et les nouvelles données copiées sur le cahier avec les initiales de l'investigateur qui aura fait la correction et la date de la correction.

13-2 Rapport final de l'étude

Il sera écrit conjointement par le coordinateur, l'investigateur principal, le méthodologiste-biostatisticien.

13-3 Publication

Les règles de publication sont les suivantes :

- signature par l'investigateur principal, le méthodologiste, les co-investigateurs des centres impliqués dans la limite du nombre d'auteurs acceptés par la revue, puis par ceux qui viendraient apporter une contribution significative au cours de son déroulement,
- mention de l'origine du financement,
- mention de l'origine des produits étudiés.

En cas d'études annexes, les résultats de celles-ci ne pourront être publiés qu'avec l'accord du coordinateur et du méthodologiste, et uniquement après publication de l'étude principale qui devra être citée.

ASPECTS ETHIQUES

RECHERCHE SANS BENEFICE INDIVIDUEL DIRECT

Les patients participants à cette étude seront inscrits dans le registre national des patients qui se prêtent aux recherches sans bénéfice individuel direct.

CONSENTEMENT LIBRE, ECLAIRE, ECRIT

L'investigateur s'engage à informer le patient de façon claire et juste du protocole et à lui demander un consentement éclairé et écrit (annexe 1). Il remettra au patient un exemplaire de la notice d'information et une feuille de consentement. Le patient ne pourra être inclus dans l'étude qu'une fois qu'il aura pris connaissance du formulaire d'information et signé le consentement. Ces deux formulaires seront délivrés sur papier dupliqué afin que le patient et l'investigateur puissent chacun en garder un exemplaire. L'original de l'investigateur sera classé dans le classeur investigateur. Une copie du consentement sera transmise au promoteur pour suivi des inclusions et sera conservée dans une enveloppe fermée.

- **Assurances**

Le promoteur déclare avoir souscrit une police d'assurance garantissant, selon les clauses prévues au contrat et dans la limite des sommes fixées, les conséquences pécuniaires de sa responsabilité civile telle qu'elle résulte de l'application de l'article L 209-7 du code de la Santé Publique. La police couvre notamment les investigateurs ainsi que l'ensemble de leurs collaborateurs et préposés effectuant les essais cliniques en conformité avec les lois en vigueur. La souscription d'une telle police par le promoteur n'a pas d'effet de le priver de ses droits de recours contre les personnes précitées en cas de fautes de celles-ci.

- **Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale**

L'investigateur principal s'engage à soumettre le projet d'étude à l'avis préalable du Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB) n°2 des Pays de Loire. Les informations communiquées portent d'une part sur les modalités et la nature de la recherche et d'autre part, sur les garanties prévues pour les patients participant à cet essai.

- **Déclaration d'Helsinki - loi Huriet**

L'investigateur principal s'engage à réaliser cette étude selon les recommandations de la déclaration d'Helsinki, les dispositions de la loi numéro 88-1138 du 20 Décembre 1988, dite loi Huriet, modifiée par la loi numéro 90-86 du 23 Janvier 1990, la loi numéro 90-549 du 2 juillet 1990 et la loi numéro 91-73 du 18 Janvier 1991 et l'article R.94630 du 25 Juillet 1994 et selon les bonnes Pratiques Clinique (ICH, mai 1997).

- **Amendements au protocole**

Toute modification du protocole doit faire l'objet d'un amendement ou d'une note d'information au CCPPRB n°2 des Pays de Loire (le protocole amendé devra faire l'objet d'une version actualisée datée). Elle ne prendra effet qu'après l'avis favorable du CCPPRB n°2 des Pays de Loire et notification au ministère. Les formulaires d'information et de recueil du consentement du patient devront être modifiés si besoin.

- **Anonymat des patients**

En signant ce protocole l'investigateur principal et l'ensemble des co-investigateurs s'engagent à maintenir confidentielles les identités des patients ou patientes qui ont participé à l'étude. Un numéro de cahier sera donné lors de la pré-inclusion du patient. Les 3 premières lettres du nom, les 3 premières lettres du prénom, et la date de naissance seront les seules informations qui figureront sur le cahier d'observation et qui permettront de rattacher à posteriori le cahier d'observation au patient. Le promoteur est également tenu de rendre anonyme tous les documents qu'il pourrait avoir en sa possession.

15 CONFIDENTIALITE DES DONNEES

Le fichier informatique utilisé pour réaliser la présente recherche a fait l'objet d'une demande d'autorisation à la CNIL (Commission Nationale Informatique et Libertés), en application de la loi « informatique et libertés ». Les données médicales de chaque patient ne seront transmises qu'au promoteur, et, le cas échéant aux autorités sanitaires habilitées, dans les conditions garantissant leur confidentialité.

Le promoteur et les autorités de tutelle pourront demander un accès direct au dossier médical pour vérification des procédures et/ou des données de l'essai clinique, sans violer la confidentialité et dans les limites autorisées par les lois et réglementations.

16 ORGANISATION PRATIQUE

Procédures de recueil des données

Les données cliniques et biologiques seront consignées sur un cahier d'observation rédigé par le Service d'ORL et la Consultation de Pathologie Professionnelle, Hôtel-Dieu, CHU de Nantes (annexe 3: cahier d'observation).

Un cahier d'observation sera créé par patient. Il sera complété par l'investigateur ou un ARC. Les feuilles devront être remplies au stylo bille bleu ou noir. En cas de données manquantes, l'investigateur devra inscrire DM (données manquantes). En cas de modification d'une donnée inscrite, la donnée fautive sera barrée, la valeur exacte sera notée à côté et la modification sera datée et annotée des initiales de l'investigateur. Le cahier d'observation reprendra les différentes étapes de la prise en charge du patient dans le protocole.

Les cahiers seront datés et signés lorsque le patient sera sorti d'essai afin d'en valider les données. Les cahiers seront archivés dans le secteur prévu à cet effet. Les cahiers d'observation des autres centres seront adressés régulièrement au centre de référence pour analyse et archivage.

Monitoring de l'étude

Il sera assuré par la cellule de promotion de la recherche clinique. Il aura pour but de s'assurer de la présence des consentements, de la transmission des EIG en temps voulu, de l'adhésion au protocole. Il sera fonction des inclusions réalisées dans l'étude.

Il sera suivi de la manière suivante :

- Une réunion de mise en place avec l'investigateur principal sera faite avant le début de l'essai (validation de la qualification du risque, rappel des BPC, organisation de la recherche, monitoring prévu).
- Il sera demandé à l'investigateur de transmettre en temps réel les inclusions à la cellule de promotion de la recherche clinique.
- Les événements indésirables graves (EIG) doivent être signalés dans les 24 heures au promoteur.

Les visites de monitoring sur site seront organisées après rendez-vous avec l'investigateur, les ARC de promotion devront pouvoir consulter :

- les cahiers de recueil de données des patients inclus
- les dossiers médicaux et infirmiers des patients
- le classeur investigateur

Le monitoring de base vérifiera les 6 points suivants :

- la présence des consentements éclairés signés
- le respect des critères d'inclusion
- le critère principal de jugement
- les critères secondaires d'évaluation
- la surveillance et la déclaration des EIG
- le signalement de faits nouveaux (amendements)

Lors du monitoring, la totalité des dossiers seront évalués à 100 %.

LETTRE D'INFORMATION

Le but de notre étude est l'identification par des techniques de biologie moléculaire de l'expression de gènes spécifiques des cancers ORL de l'ethmoïde.

Des avancées récentes en biologie moléculaire et rapidité de séquençage du génome humain permettent aujourd'hui de dénombrer chez l'homme 30000 gènes environ. Néanmoins, leur fonctionnalité, en particulier dans les cancers est en cours d'exploration. Les techniques PCR (Polymerase Chain Réaction) développées dans les années 80 permettent l'analyse individuelle de l'expression des gènes alors que la technique des puces à ADN, permet maintenant une analyse simultanée de plus de 10000 gènes. L'objet principal est de rechercher des gènes exprimés dans les cancers ORL de l'ethmoïde. L'objectif secondaire sera l'étude de la relation qui existe entre le profil d'expression des gènes identifiés et la survie sans rechute à 2 ans en tenant compte des facteurs de risques personnels et environnementaux (alcool, tabac, et facteurs d'exposition professionnelle), des facteurs pronostiques cliniques et paracliniques (stade tumoral, taille de la tumeur, existence de ganglions) et du traitement suivi.

La durée de participation à cette étude sera de deux ans après la date d'inclusion.

Les procédures qui seront suivies sont les suivantes :

- information libre et éclairée et manuscrite sur l'objet de l'étude
- signature de la lettre de consentement
- interrogatoire sur les expositions au tabac, l'alcool, les facteurs d'exposition professionnelle et environnementaux toxiques (questionnaire fourni au patient).
- Prélèvement du tissu tumoral et du tissu péritumoral sain de petite taille (100 à 200 mg) lors de l'intervention chirurgicale et envoi des tissus à l'INSERM Unité 419 du CHU de NANTES.

Les bénéfices recherchés sont donc ici: la susceptibilité individuelle face au développement du cancer, le suivi avec deux ans de recul et la confrontation des données génétiques initiales et l'évolution éventuelle de la maladie. A terme, c'est la mise en place de traitement spécifique mieux adapté qui est souhaitée.

Les risques prévisibles, les désavantages qui pourraient résulter des traitements de l'étude sont minimes puisque le protocole thérapeutique chirurgical et post-chirurgical n'est en aucune façon modifié par l'étude.

La confidentialité des données est maintenue par l'attribution de code à chaque dossier et chaque prélèvement,

- la couverture par une assurance est assurée par le CHU de NANTES qui est promoteur de l'étude.
- le caractère volontaire de leur participation.

Notre étude repose sur une collaboration originale entre plusieurs équipes : les Services de Chirurgie ORL de l'OUEST, le Service de Médecine et Santé au Travail, le Pôle d'Information Médicale en Santé Publique du CHU de Nantes, l'Unité INSERM 419 du CHU de Nantes, le Génopôle Ouest, et le Laboratoire de Biomathématiques-Biostatistiques de la Faculté de Pharmacie de Nantes.

LETTRE DE CONSENTEMENT

INTITULÉ DE L'ETUDE :

Identification de marqueurs tumoraux prédictifs de rechute dans les cancers de l'ethmoïde

Je soussigné(e):

Monsieur, Madame,

NOM.....Prénom.....

certifie que le Docteur m'a proposé de participer à une étude dont l'intitulé est précisé ci-dessus et avoir été informé clairement, lors de la consultation de pathologie professionnelle du :....., des risques éventuels et des bénéfices.

Cette étude repose sur la recherche de marqueurs tumoraux spécifiques des cancers ORL en lien avec des expositions personnels (alcool, tabac) ou environnementales, notamment professionnelles. Des études récentes montrent maintenant de façon certaine l'expression de gènes spécifiques dans le déclenchement des tumeurs.

L'objet de l'étude est le suivant:

- 1) déterminer ces gènes dans des cancers de l'ethmoïde,
- 2) L'objectif secondaire est l'étude de la relation qui existe entre le profil d'expression des gènes identifiés et la survie sans rechute à 2 ans en tenant compte des facteurs pronostiques cliniques et para-cliniques obtenus (stade tumoral, taille de la tumeur, existence de ganglions) et des facteurs de risque personnels ou environnementaux (alcool, tabac, et facteurs professionnels) .

Cette étude repose donc la réalisation de 2 consultations et un prélèvement tissulaire lors de l'intervention chirurgicale au bloc ORL du CHU de Nantes:

- Une consultation au Centre de Pathologie Professionnelle du CHU où sera constituée le cahier d'observation et une deuxième consultation deux ans après inclusion.
- le deuxième examen sera l'analyse des marqueurs tumoraux par l'Unité INSERM 419 sur un prélèvement de pièce opératoire en zone tumorale et péri-tumorale (tissu sain).

Il s'agit d'une étude sans bénéfice individuel direct mais qui pourra éventuellement permettre dans les années à venir de proposer des thérapeutiques complémentaires à la chirurgie ou de modifier les indications thérapeutiques. Enfin, cette étude permettra de donner des conseils préventifs aux patients. A tout moment je serai libre de me retirer de l'étude et j'accepte l'utilisation statistique des résultats de cette étude.

J'accepte donc de participer à cette étude coordonnée par Monsieur le Professeur Géraut et Monsieur le Professeur Beauvillain.

FAIT A NANTES, le ;

SIGNATURE :

Cahier d'observation

NUMERO DE DOSSIER :

NOM : _____ **PRENOM :** _____

ADRESSE : _____

■ : _____ **Date de naissance :** ____/____/____

AGE : _____ **SEXE :** M F

ANTECEDENTS FAMILIAUX (à préciser):

ANTECEDENTS PERSONNELS :

CANCER /oui-non..... Si oui :

TABAC : OUI NON Nbre de paquets/années : _____

ALCOOL : estimation de la consommation en grammes par jour :

FORMATION 1 :

DUREE EN ANNEES : _____

FREQUENCE D'EXPOSITION : _____

PORT DE MASQUE : OUI NON Durée : _____

**SYSTEME D'ASPIRATION au poste de travail : OUI –NON pendant combien de temps:
PROFESSION 1:**

DUREE EN ANNEES : _____

FREQUENCE D'EXPOSITION : _____

PORT DE MASQUE : OUI NON Durée : _____

SYSTEME D'ASPIRATION : OUI –NON Durée : _____

EXPOSITION PROFESSIONNELLE REGULIERE A DES SOLVANTS : OUI NON

Si oui préciser lesquels : _____ durée : _____

- **aliphatiques : oui-non**
- **aromatiques : oui-non**
- **chlorés : oui-non**
- **dérivés cétoniques : oui-non**
- **dérivés à fonction –OH : oui-non**
- **dérivés de l'éthylène glycol : oui-non**
- **autres :**

EXPOSITION REGULIERE A DES METAUX LOURDS :

OUI NON

Si oui préciser lesquels : _____ durée : _____

EXPOSITION REGULIERE A DES PESTICIDES : OUI NON

Si oui préciser lesquels : _____

EXPOSITION PROFESSIONNELLE REGULIERE A DES RADIATIONS : OUI NON

Si oui préciser lesquelles : _____

FORMATION 2 :

DUREE EN ANNEES : _____

FREQUENCE D'EXPOSITION : _____

PORT DE MASQUE : OUI NON Durée : _____

**SYSTEME D'ASPIRATION/VENTILATION au POSTE DE TRAVAIL : OUI –NON
durée :**

PROFESSION 2:

DUREE EN ANNEES : _____

FREQUENCE D'EXPOSITION : _____

PORT DE MASQUE : OUI NON Durée : _____

SYSTEME D'ASPIRATION : OUI –NON Durée : _____

EXPOSITION PROFESSIONNELLE REGULIERE A DES SOLVANTS : OUI NON

Si oui préciser lesquels : _____ durée : _____

- aliphatiques : oui-non
- aromatiques : oui-non
- chlorés : oui-non
- dérivés cétoniques : oui-non
- dérivés à fonction –OH : oui-non
- dérivés de l'éthylène glycol : oui-non
- autres :

EXPOSITION REGULIERE A DES METAUX LOURDS :

OUI NON

Si oui préciser lesquels : _____

EXPOSITION REGULIERE A DES PESTICIDES : OUI NON

Si oui préciser lesquels : _____

EXPOSITION PROFESSIONNELLE REGULIERE A DES RADIATIONS : OUI NON

Si oui préciser lesquelles : _____

Modèle de fiche jointe au cahier d'observation à remplir par le chirurgien le jour de l'intervention:

Nom-Prénom du patient opéré: trois premières lettres ; date de naissance :

Nom du chirurgien: date de l'intervention:

Type de tumeur : Endolarynx – Oropharynx – Ethmoïde

Localisation exacte: à compléter sur le schéma joint

Aspect macroscopique:

Classification TNM :

Type d'intervention:

Si chimiothérapie pré-opératoire, préciser le type de protocole:

Préciser s'il y a eu une radiothérapie avant chirurgie: oui - non

Préciser la consommation en

tabac (paquets-année):

alcool (grammes par jour):

exposition bois : oui - non

Titre de l'étude

Identification de marqueurs tumoraux prédictifs de rechute dans les cancers de l'ethmoïde

Signatures des investigateurs :

Investigateur principal :

Monsieur le Docteur Tripodi Dominique, Médecin du Travail. CHU Nantes

Investigateurs associés :

Monsieur le Professeur Beauvillain. Chef de Service Chirurgie ORL et Cervico-faciale. CHU Hôtel Dieu. Nantes

Monsieur le Professeur Géraut. Chef de Service - Consultation de Pathologies Professionnelles. CHU Hôtel Dieu. Nantes

Monsieur le Professeur Meflah, PU-PH, Directeur Inserm U419, Service de Biochimie Générale. CHU Nantes

Madame le Docteur Gratas-Rabbia-Ré MCU-PH ; Inserm U419, Service de Biochimie Générale. CHU Nantes

Docteur Molinié, Registre des Cancers de Loire Atlantique et Vendée - PIMESP

Docteur J. Léger, Génopôle Ouest, Plateforme Transcriptome

Docteur V. Sébille-Rivain, Laboratoire de Biomathématiques-Biostatistiques. Faculté de Pharmacie. DRRC - Cellule de Biostatistiques, CHU de Nantes

Madame le Docteur K. Renaudin et Monsieur le Professeur Laboisie, Service d'Anatomie Pathologie,. CHU Hôtel Dieu. Nantes

Monsieur le Docteur J.F. Mosnier, Responsable de la Tumorotheque Centrale. Hôpital Laënnec, Nantes.

Facteurs pronostiques et marqueurs tumoraux de l'adénocarcinome de l'ethmoïde.

L'adénocarcinome de l'ethmoïde, causé principalement par l'exposition à la poussière de bois, est la deuxième cause de cancer professionnel en France. Par une approche rétrospective sur une série de 98 patients, nous avons montré que la survie globale à 5 ans est de 62 % et qu'il existe un lien étroit avec le stade TNM, certains signes cliniques, l'atteinte de la lame criblée, du sphénoïde, des méninges, le contrôle local de la chirurgie ($p < 0.001$), et la chirurgie de la lame criblée ($p = 0.0294$). L'analyse multivariée fait apparaître les quatre facteurs indépendants suivants : diplopie ($p = 0.0159$), extension locale à l'orbite ($p = 0.0113$), caractère bilatéral ($p = 0.00113$), classification TNM ($p < 0.001$). La survie n'est pas liée à la durée d'exposition au bois. Toutefois nous avons mis en évidence que la durée cumulée d'exposition au tabac (paquets.années) intervient dans la survie à 5 ans ($p = 0.0004$). La deuxième étude, prospective, a été réalisée grâce à un PHRC soutenu par le CHU de Nantes : 26 patients ont été inclus à partir de 2003. Un prélèvement de tissu tumoral et de tissu sain sinusal ont été réalisés pour chacun d'eux. Pour identifier des gènes impliqués dans ce cancer, nous avons utilisé des puces à ADN et avons pu identifier, parmi les 6864 testés, 186 gènes sur ou sous exprimés dans les tumeurs. Par PCR et immunohistochimie nous avons confirmé la sur-expression significative de la *galectine 4* et la perte d'expression de la *clusterine*. Ces deux marqueurs pourraient être ultérieurement utilisés pour développer un test de dépistage précoce chez les sujets exposés.

Mots clés: adénocarcinome ethmoïde, bois, tannins, puces à ADN, *LGALS4*, *CLU*.

Prognostic factors and tumoral markers of ethmoid adenocarcinoma.

Ethmoid adenocarcinoma, due mainly to wood dust exposure, is the second occupational cancer in France. On a retrospective study about 98 patients recovered from 1987 to 2004, we concluded that global survival rate was 62% at 5 years and was influenced by exphtalmus, diplopia, TNM stage, local extension to dura and to sphenoid, macroscopic and microscopic control ($p < 0.001$), cribriform plate surgery ($p = 0.0294$). Cox model isolated four influencing factors : diplopia ($p = 0.0159$), orbit extension ($p = 0.0113$), bilateral extension (0.00113), TNM stage ($p < 0.001$). Survival rate was not influenced by duration of exposure to wood dust; nevertheless, total tobacco consumption (pack.years) could influence survival rate ($p = 0.0004$). The second study was prospective: 26 patients who had presented ethmoid adenocarcinoma were analyzed. In an attempt to identify genes involved in this disease, we proceeded to a gene expression profiling using cancer-dedicated microarrays, on nine matched samples of sinonasal adenocarcinomas and non tumoral sinonasal tissue. *LGALS4* was highly up-regulated, particularly in the most differentiated tumors, and *CLU* was lost in all tumors. After further evaluation, *LGALS4* and *CLU* may be useful for an earlier detection of cancer in high-risk woodworkers, using sinonasal smear.

Keys words: ethmoid, adenocarcinoma, wood dust, tannins, microarrays, *LGALS4*, *CLU*.

Nom Prénom : TRIPODI Dominique

Adresse : Unité INSERM UMR U892, Service de Médecine du Travail et des Risques professionnels-CHU NANTES.