



**HAL**  
open science

# Etude des facteurs de risque des leucémies de l'enfant

Alicia Amigou

► **To cite this version:**

Alicia Amigou. Etude des facteurs de risque des leucémies de l'enfant. Santé publique et épidémiologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T016 . tel-00954463

**HAL Id: tel-00954463**

**<https://theses.hal.science/tel-00954463>**

Submitted on 3 Mar 2014

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

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



**UNIVERSITÉ Paris-Sud 11**  
**Faculté de Médecine Paris-Sud 11**

Ecole Doctorale 420

Année 2013

**Thèse**  
pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11**

**Discipline : Santé Publique - Épidémiologie**

**Mlle Alicia AMIGOU**  
Née le 23 janvier 1984 à Les Lilas

Présentée et soutenue publiquement le 24 avril 2013

**ETUDE DES FACTEURS DE RISQUE DES LEUCEMIES DE  
L'ENFANT**

Directeur de thèse : Madame le Docteur Jacqueline Clavel

**JURY**

Monsieur Jean BOUYER  
Monsieur Denis ZMIROU  
Monsieur Rémy SLAMA  
Madame Martine HOURS  
Monsieur Jérémie BOTTON  
Madame Jacqueline CLAVEL

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse



## **Remerciements....**

*Je tiens en premier lieu à remercier ma directrice de thèse, le docteur Jacqueline Clavel, pour m'avoir fait confiance et pour avoir accepté de m'encadrer tout au long de ce parcours. Je la remercie pour sa rigueur, ses réflexions et ses qualités scientifiques, et son exceptionnelle disponibilité malgré sa charge de travail.*

*Je remercie Denis Hémon, pour ses critiques pertinentes et ses qualités pédagogiques.*

*Je voudrais également remercier les différents membres du jury et notamment Monsieur Jean Bouyer qui m'a fait l'honneur d'en être le président; le Professeur Denis Zmirou et Monsieur Rémy Slama d'avoir été les rapporteurs de ma thèse, et qui m'ont permis grâce à la pertinence de leurs remarques d'approfondir mon travail; ainsi que Mme Martine Hours et Monsieur Jérémie Botton qui ont acceptés d'être examinateurs.*

*Merci à tous les membres de l'équipe d'épidémiologie environnementale des cancers du CESP avec qui cela a toujours été un plaisir de venir travailler.*

*Un grand merci à Jérémie, avec qui j'ai eu de nombreux échanges concernant une partie de mon travail ; pour son aide précieuse et ses bons conseils.*

*Merci à Stéphanie, pour sa gentillesse, sa serviabilité et sa patience à toute épreuve! Sans oublier la qualité de son travail...*

*Merci à Laurent pour toutes les fois où je l'ai interrompu dans son travail, pour ses nombreux dépannages en informatique et avec SAS !*

*Merci à Evelyne et Linda pour leur disponibilité dans toutes les démarches administratives.*

*Merci à Audrey de m'avoir soutenue à Londres.*

*Un merci tout particulier à mes collègues de bureau, Isabelle que je remercie pour l'accueil chaleureux qu'elle m'a fait quand je suis arrivée dans l'unité, pour sa sympathie et pour son aide à mes débuts avec SAS ; Claire F. pour sa bonne humeur, nos échanges et la clarté de ses explications ; et enfin Solène et Claire D. que j'avais plaisir à retrouver chaque jour et qui sont devenues pour moi bien plus que des collègues...*

*Merci aussi à Florence G., Farida, Marie et Céline, merci pour tous ces moments partagés au travail ou en dehors de Villejuif!*

*Merci également à tous les autres membres ou anciens membres de l'équipe, Aurélie, Alexandra, Sara, Delphine, Mireille, Sofien, Nicolas, Lucie, Isabelle, Florence, Pascal, Thérèse, Emilie C., Souad, Soizic, Oumar, Sylvie, Antoinette, Alex, Thomas, Lucie, Jennifer, Emilie N.,...*

*Merci à mes amis pour leur présence au quotidien, et une pensée à Achraf, pour nos fous rires et nos orgies culinaires partagés!*

*Je remercie mes parents, pour les valeurs qu'ils m'ont transmises, pour m'avoir toujours laissé libre de mes choix, et pour m'avoir soutenue dans les moments difficiles...*

*Enfin, je n'oublie pas ma sœur, Lise, que j'aime par dessus tout...*

## **Résumé :**

**Objectif :** Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une recherche étiologique sur les leucémies aiguës (LA) de l'enfant, pathologies dont les facteurs de risque sont peu connus. Plusieurs hypothèses ont été testées : 1) le rôle protecteur d'une supplémentation maternelle en acide folique avant et pendant la grossesse et l'investigation par une approche gène-candidat du rôle de polymorphismes communs rs1801133 et 1801131 de *MTHFR* et rs1801394 et rs1532268 de *MTRR* supposés modifier le métabolisme des folates, 2) l'association entre la profession et des expositions professionnelles maternelles lors de la grossesse, 3) l'existence d'un lien positif avec l'exposition des enfants au trafic routier.

**Matériel et méthodes :** Les données analysées proviennent d'une étude cas-témoins française, ESCALE, basée sur le Registre National des Hémopathies malignes de l'Enfant et réalisée en population générale sur la période 2003-2004. L'échantillon comportait 648 cas de leucémie aiguë lymphoblastique [LAL], 116 cas de leucémie aiguë non lymphoblastique [LANL], et 1681 témoins de moins de 15 ans. L'échantillonnage a été stratifié sur l'âge et le sexe. Les données ont été recueillies auprès des mères à l'aide d'un questionnaire téléphonique standardisé, identique pour les cas et les témoins. Les génotypes ont été obtenus par génotypage à haut débit, pangénomique pour les cas et à façon pour les témoins, et par imputation pour les polymorphismes non génotypés. Le géocodage des adresses et des indicateurs dérivés de données d'émission de trafic ont permis d'estimer l'exposition des enfants au trafic routier. Les odds ratios (OR) ont été estimés à l'aide de modèles de régression logistique non conditionnelle, incluant les facteurs de confusion potentiels.

**Résultats :** Le risque de LA était significativement inversement associé à une supplémentation maternelle en acide folique avant ou pendant la grossesse (OR=0.4 [0.3-0.6]). Aucun des polymorphismes génétiques de *MTHFR* et de *MTRR* n'était associé au risque de LA. Cependant, le fait d'être à la fois porteur homozygote des allèles variants de l'un des polymorphismes de *MTHFR*, et porteur de deux allèles variants des polymorphismes de *MTRR* était positivement associé au risque de LA (OR=1.6 [0.9-3.1]). Nous n'observons pas d'interaction entre *MTHFR*, *MTRR* et une supplémentation maternelle en acide folique.

Des associations positives et significatives ont été mises en évidence entre le risque de LA et des expositions auto-déclarées professionnelles maternelles pendant la grossesse, aux teintures de cheveux (OR=3.0 [1.7-5.2]), à des peintures ou vernis et/ou colles (OR=1.5 [1.1-2.2]), et à des rayonnements ionisants (OR=2.4 [1.3-4.6]). Cependant, ces associations étaient limitées aux fréquences d'exposition de moins d'1 heure par semaine et peuvent refléter une sur-déclaration chez les cas. L'exposition maternelle professionnelle aux pesticides n'était pas associée aux LA dans notre étude.

Les LA étaient significativement associées à des concentrations élevées de NO<sub>2</sub> de fond liées au trafic estimées au lieu de résidence (OR=1.2 [1.0-1.5]) et avec la présence de routes à fort trafic dans un rayon de 500 m centré sur ce lieu (OR=2.0 [1.0-3.6]). Nous observons une association significative entre les LA et une densité élevée de routes à fort trafic dans un rayon de 500 m (OR=2.2 [1.1-4.2]), avec une tendance linéaire positive significative de l'association des LAL avec la longueur totale de routes à fort trafic dans un rayon de 500 m.

**Conclusion :** Cette thèse apporte des arguments en faveur du rôle protecteur d'une supplémentation maternelle périconceptionnelle en acide folique. Elle suggère également un rôle des polymorphismes de *MTHFR* et *MTRR* dans le risque des LA, sans interaction toutefois avec la supplémentation. Enfin, elle renforce l'hypothèse que vivre près de routes à fort trafic pourrait augmenter le risque de LA.



## **Abstract**

**Objectives:** This work investigated three hypotheses related to the etiology of childhood acute leukemia (AL): 1) maternal folic acid supplementation before or during pregnancy reduces AL risk, accounting for the SNPs rs1801133 (C677T) and rs1801131 (A1298C) in *MTHFR* and rs1801394 (A66G) and rs1532268 (C524T) in *MTRR*, assumed to modify folate metabolism, 2) maternal occupation and occupational exposure during pregnancy may be linked to LA 3) traffic is a source of environmental exposures, including benzene, which may be related to childhood leukemia.

**Methods:** The data were obtained from the national registry-based case-control study ESCALE, carried out in France in 2003-2004. The ESCALE study included 764 cases and 1681 controls less than 15 years old and the controls were frequency matched with the cases on age and gender. The data were collected by a standardized telephone interview of the mothers. Various indicators of exposure to traffic and pollution were determined using the geocoded addresses at the time of diagnosis for the cases and of interview for the controls. The genotypes were obtained using high-throughput platforms and imputation for untyped polymorphisms. CITP-68 classification was used to classify maternal occupation during pregnancy. Indicators of the distance from, and density of, main roads and background traffic NO<sub>2</sub> concentrations data were used. Odds ratio (OR) were estimated using unconditional regression models adjusted for potential confounders.

**Results:** AL was significantly inversely associated with maternal folic acid supplementation before and during pregnancy (OR=0.4 [0.3–0.6]). *MTHFR* and *MTRR* genetic polymorphisms were not associated with AL. However, AL was positively associated with homozygosity for any of the *MTHFR* polymorphisms and carriage of both *MTRR* variant alleles (OR=1.6 [0.9–3.1]). No interaction was observed between *MTHFR*, *MTRR*, and maternal folate supplementation. Significant positive associations were observed between childhood AL and self-reported maternal occupational exposures during pregnancy to hair dye (OR=3.0 [1.7-5.2]), to paints or polishes and/or glues (OR=1.5 [1.1-2.2]), and to ionising radiations (OR=2.4 [1.3-4.6]). However, these associations were limited to exposure frequencies of less than 1 hour by week. Maternal occupational exposure to pesticides during pregnancy was not related to AL. AL was significantly associated with high estimates of traffic NO<sub>2</sub> concentration at the place of residence (OR=1.2 [1.0-1.5]) and with the presence of a heavy-traffic road within 500 meters compared to the absence of a heavy-traffic road in the same area (OR=2.0 [1.0-3.6]). There was a significant association between AL and a high density of heavy-traffic roads within 500 meters in comparison to the reference category with no heavy-traffic road within 500 meters (OR=2.2 [1.1-4.2]), with a significant positive linear trend of the association of AL with the total length of heavy-traffic road within 500m.

**Conclusion:** The study findings support the hypothesis that maternal folic acid supplementation may reduce the risk of childhood AL. The findings also suggest that the homozygous genotype for any of the *MTHFR* variants and carrying both *MTRR* variants could be a risk factor for AL. Finally, the results support the hypothesis that living close to heavy-traffic roads may increase the risk of childhood leukemia.



### **Travaux relatifs à la thèse :**

Amigou A, Sermage-Faure C, Orsi L, Leverger G, Baruchel A, Bertrand Y, Nelken B, Robert A, Michel G, Margueritte G, Perel Y, Mechinaud F, Bordigoni P, Hémon D, Clavel J. *Road traffic and childhood leukemia: The ESCALE study (SFCE)*. **Environ Health Perspect.** 2011 Apr;119(4):566-72. doi: 10.1289/ehp.1002429. Epub 2010 Dec 8.

Amigou A, Rudant J, Orsi L, Goujon-Bellec S, Leverger G, Baruchel A, Bertrand Y, Nelken B, Plat G, Michel G, Haouy S, Chastagner P, Ducassou S, Rialland X, Hémon D, Clavel J. *Folic acid supplementation, MTHFR and MTRR polymorphisms, and the risk of childhood leukemia: The ESCALE study (SFCE)*. **Cancer Causes Control.** 2012;23(8):1265-77.

*Communication orale et affichée:*

**International Conference on Childhood Cancer** (Children with Cancer UK) 24-26 avril 2012, Londres. *Folic acid supplementation, MTHFR and MTRR polymorphisms, and the risk of childhood leukemia: The ESCALE study (SFCE)*. Amigou A, Rudant J, Orsi L, Goujon-Bellec S, Hémon D, Clavel J.

### **Autres articles publiés sur les leucémies de l'enfant :**

Rudant J, Amigou A, Orsi L, Althaus T, Leverger G, Baruchel A, Bertrand Y, Nelken B, Plat G, Michel G, Sirvent N, Chastagner P, Ducassou S, Rialland X, Hémon D, Clavel J. *Fertility treatments, congenital malformations, fetal loss, and childhood acute leukemia: The ESCALE study (SFCE)*. **Pediatr Blood Cancer.** 2013;60(2):301-8.



## Table des matières

<b>1. Introduction.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Contexte scientifique – épidémiologie des leucémies aiguës de l’enfant.....</b>	<b>17</b>
1.1.1 Epidémiologie descriptive.....	17
1.1.2 Etiologie des leucémies aiguës de l’enfant - généralités.....	19
1.1.3 Etiologie des hémopathies malignes de l’enfant – revue détaillée des questions abordées dans la thèse.....	22
<b>1.2 Objectif de la thèse.....</b>	<b>57</b>
<b>2. Matériel et méthodes.....</b>	<b>59</b>
<b>2.1 Echantillonnage.....</b>	<b>61</b>
2.1.1 Définition des cas.....	61
2.1.2 Recrutement des témoins.....	62
<b>2.2 Recueil des données.....</b>	<b>63</b>
2.2.1 Interview.....	63
2.2.2 Recueil du matériel biologique.....	65
<b>2.3 Détermination des génotypes pour les polymorphismes du métabolisme des     folates 65</b>	
2.3.1 Génotypage.....	66
2.3.2 Imputation des SNPs non génotypés.....	66
2.3.3 Sélection des sujets caucasiens pour l’étude d’association.....	67
<b>2.4 Codage et génération de variables.....</b>	<b>68</b>
2.4.1 Variables sociodémographiques.....	68
2.4.2 Supplémentation maternelle en acide folique et en vitamines.....	69
2.4.3 Polymorphismes de <i>MTHFR</i> et <i>MTRR</i> .....	69
2.4.4 Profession et expositions professionnelles des mères lors de la grossesse.....	70
2.4.5 Indicateurs d’exposition au trafic routier.....	71
2.4.6 Facteurs de confusion.....	73
<b>2.5 Méthodes statistiques.....</b>	<b>73</b>
2.5.1 Comparaison des cas et des témoins.....	73
2.5.2 Vérification de la qualité de l’échantillonnage.....	73
2.5.3 Ajustements complémentaires, recherches d’interactions.....	74
2.5.4 Analyses de sensibilité.....	74
2.5.5 Test de tendance linéaire.....	75
<b>2.6 Aspects réglementaires.....</b>	<b>76</b>
<b>2.7 Puissance de l’étude.....</b>	<b>76</b>
<b>3. Résultats.....</b>	<b>77</b>

<b>3.1</b>	<b>Comparabilité des cas et des témoins .....</b>	<b>79</b>
<b>3.2</b>	<b>Supplémentation maternelle en acide folique, polymorphismes du métabolisme des folates, et leucémie de l'enfant.....</b>	<b>82</b>
3.2.1	Supplémentation maternelle périconceptionnelle en acide folique .....	82
3.2.2	Relation entre les génotypes de <i>MTHFR</i> et <i>MTRR</i> et le risque de leucémie aigue.....	85
<b>3.3</b>	<b>Professions et expositions professionnelles des mères lors de la grossesse et risque de LA de l'enfant.....</b>	<b>89</b>
3.3.1	Professions maternelles .....	89
3.3.2	Expositions professionnelles déclarées par les mères .....	89
3.3.3	Analyses complémentaires et études de sensibilité .....	96
<b>3.4</b>	<b>Exposition au trafic routier et risque de leucémie aigue .....</b>	<b>97</b>
3.4.1	Proximité des routes à fort trafic.....	97
3.4.2	Densité en routes à fort trafic de la zone de 500 m autour du domicile.....	97
3.4.3	Pollution liée au trafic - concentration atmosphérique en NO <sub>2</sub> .....	99
3.4.4	Variable combinant indicateurs de route et pollution liée au trafic .....	99
3.4.5	Influence des caractéristiques socio-démographiques et du type de logement sur le niveau d'exposition.....	101
3.4.6	Influence des indicateurs de trafic sur la concentration de NO <sub>2</sub> .....	101
3.4.7	Ajustements sur les facteurs de confusion .....	103
3.4.8	Analyses complémentaires et études de sensibilité .....	104
<b>4.</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>107</b>
<b>4.1</b>	<b>Rappel des principaux résultats.....</b>	<b>109</b>
<b>4.2</b>	<b>Validité interne.....</b>	<b>110</b>
4.2.1	Sélection des cas et des témoins .....	110
4.2.2	Erreurs de classement des expositions.....	112
4.2.3	Risque de première espèce.....	117
4.2.4	Prise en compte des facteurs de confusion.....	117
<b>4.3</b>	<b>Validité externe-comparaison des résultats aux données de la littérature .....</b>	<b>118</b>
4.3.1	Supplémentation maternelle en acide folique et risque de LA de l'enfant - interaction avec les polymorphismes de <i>MTRR</i> et <i>MTHFR</i> .....	118
4.3.2	Profession et expositions maternelles professionnelles lors de la grossesse et risque de LA .....	120
4.3.3	Trafic routier et risque de LA de l'enfant.....	123
<b>4.4</b>	<b>Perspectives et conclusion .....</b>	<b>125</b>
<b>5.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>127</b>
<b>6.</b>	<b>ANNEXES .....</b>	<b>143</b>

## **LISTE DES PRINCIPAUX ACRONYMES UTILISÉS**

**ADN** : Acide Désoxyribo-Nucléique

**CEPH** : Centre d'Etude des Polymorphismes Humains

**CSP** : Catégorie Socio-Professionnelle

**EHW** : Equilibre d'Hardy-Weinberg

**FAM** : Fréquence de l'Allèle Mineur

**HPA** : Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques

**IC 95%** : Intervalle de Confiance à 95%

**LA** : Leucémie Aiguë

**LAL** : Leucémie Aiguë Lymphoblastique

**LAM** : Leucémie Aiguë Myéloblastique

**LANL** : Leucémie Aiguë non Lymphoblastique

**MTHFR**: méthylène tétrahydrofolate-réductase

**MTR** : méthionine synthase

**MTRR** : méthionine synthase réductase

**OR** : Odds Ratio

**RNHE** : Registre National des Hémopathies malignes de l'Enfant

**SAM** : S-adénosyl-méthionine

**SNP** : *Single Nucleotide Polymorphism* (polymorphisme nucléotidique simple)

**THF** : tétrahydrofolate



# **1. Introduction**



## 1.1 Contexte scientifique – épidémiologie des leucémies aiguës de l'enfant

### 1.1.1 Epidémiologie descriptive

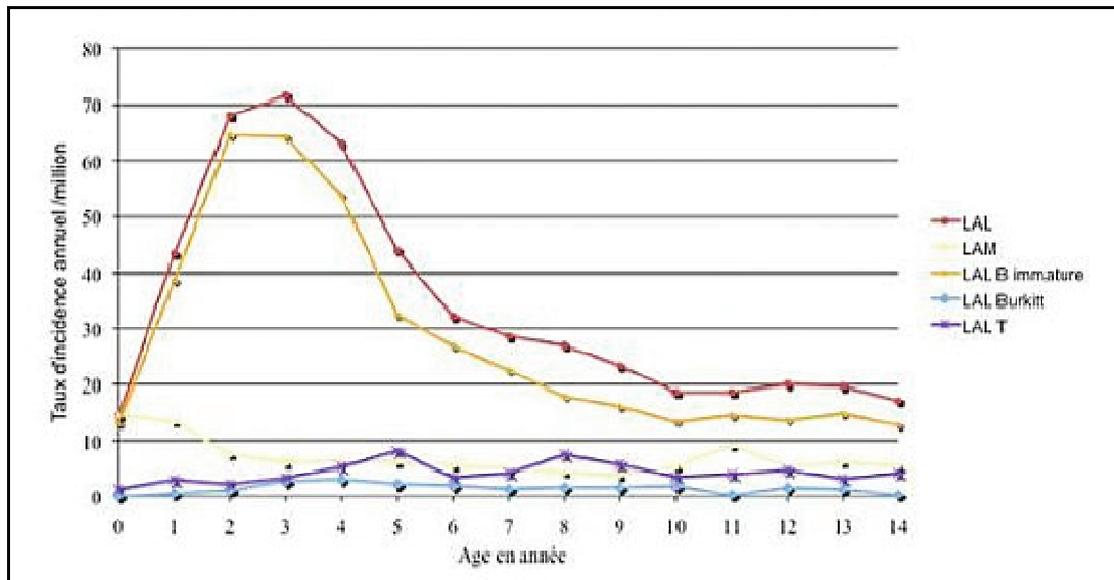
Dans la plupart des pays industrialisés, environ 1 enfant sur 500 est atteint d'un cancer avant l'âge de 15 ans. Ainsi, près de 1 700 nouveaux cas de cancer surviennent chaque année en France. Bien que leur pronostic se soit beaucoup amélioré, les cancers constituent la deuxième cause de mortalité chez l'enfant de plus de 1 an, après les accidents.

Les leucémies aiguës (LA) de l'enfant représentent 29% des cas de cancer en France et sont les cancers les plus fréquents chez l'enfant. Ce sont des maladies relativement rares, avec un taux d'incidence standardisé sur la population mondiale de 45,9 cas par million dans notre pays (Clavel *et al*, 2004a). Les leucémies aiguës de type lymphoblastiques (LAL) représentent environ 80% des LA et sont en majorité des LAL dites communes, développées aux dépens des précurseurs de la lignée B. Il s'agit plus rarement des LAL pro-B, les plus indifférenciées, qui touchent surtout l'enfant de moins de 1 an, ou des LAL matures B, comme les LAL de Burkitt, qui représentent environ 5% des LAL. Les LAL T, développées aux dépens des cellules lymphoïdes T, représentent environ 15% des LAL. L'incidence des LAL est un peu plus élevée chez les garçons que chez les filles (sex ratio=1,2) et on observe une prédominance masculine plus importante pour les LAL B matures (sex ratio=3,8). Les LAL B immatures décrivent un pic marqué à l'âge de 2-3 ans, plus marqué chez les garçons que chez les filles, et encore nettement visible un peu après 6 ans (figure 1).

Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) constituent un peu moins de 20% des leucémies aiguës (LA) de l'enfant et leur sex ratio est de 1,1. Elles peuvent se présenter sous différents types morphologiques selon qu'elles dérivent des précurseurs des globules rouges, des plaquettes, des monocytes ou des polynucléaires. L'incidence des LAM est plus élevée avant 2 ans (figure 1).

L'incidence des LA semblait stable en France entre 1990 et 1999 (Clavel *et al*, 2004a) mais une analyse récente suggère une augmentation de l'incidence des LAL, notamment chez les filles (Goujon-Bellec et Mollié *et al*, 2013), cohérente avec ce qui est relevé dans d'autres pays occidentaux (Coebergh *et al*, 2006). L'amélioration des pratiques d'enregistrement peut avoir contribué à cette augmentation. Les cas sont en effet devenus plus faciles à compter grâce à l'augmentation des sources fiables accessibles par fichiers électroniques et grâce à la concentration de la prise en charge dans un plus petit nombre de services qualifiés.

Figure 1: Taux d'incidence des leucémies aiguës de l'enfant selon l'âge en France (RNHE, 2000-2004)



Source : site web du RNHE : <http://www.u754.idf.inserm.fr/page.asp?page=4611>

Le pronostic des LA de l'enfant s'est nettement amélioré au cours des dernières années. Le taux de survie à 5 ans est actuellement proche de 90% pour les LAL, et de 65% pour les LAM (Clavel et Lacour, communication personnelle). Le pronostic est plus sombre lorsque la leucémie survient avant l'âge de 1 an, quel que soit le type de leucémie (taux de survie à 5 ans de 60%). Chez les enfants guéris, le risque de séquelles et de développement de cancers secondaires subsiste à long terme.

### 1.1.2 Etiologie des leucémies aiguës de l'enfant - généralités

Les facteurs de risque actuellement reconnus sont essentiellement des facteurs iatrogènes, tels que certaines chimiothérapies anticancéreuses (inhibiteurs de topoisomérases II, alkylants) et les radiations ionisantes à forte dose (radiothérapie ou irradiation accidentelle rare), ces dernières étant particulièrement délétères lors du développement fœtal intra-utérin [IARC,2000] ; [IARC,2001]. Des maladies génétiques sont également des facteurs de risque identifiés de leucémie aiguë. La *trisomie 21* multiplie par environ 50 le risque de LAM et par environ 10 le risque de LAL (Ross *et al*, 2005). Les leucémies surviennent aussi, exceptionnellement, dans le cadre de syndromes génétiques identifiés, comme le syndrome de Li-Fraumeni, certains syndromes d'instabilité chromosomique (anémie de Fanconi, ataxie télangiectasie, syndrome de Bloom) ou une neurofibromatose de Von Recklinghausen (Sommelet *et al*, 2009). Ajoutés à ces facteurs, les radiations ionisantes, le sexe et l'ethnie expliquent moins de 10 % des cas de leucémies (Buffler *et al*, 2005; Wiemels, 2012). Par ailleurs, il est maintenant prouvé que la forte concordance du risque de leucémie de l'enfant entre jumeaux monozygotes résulte de la transmission transplacentaire de clones préleucémiques.

Les études d'association génome entier montrent de façon convergente des associations avec des polymorphismes de 2 gènes, *ARID5B* et *IKZF1*, impliqués dans la différenciation des lymphocytes B (Papaemmanuil *et al*, 2009; Trevino *et al*, 2009) (Orsi *et al*, 2012). Les allèles variants de ces gènes sont associés à un doublement du risque de LA.

En dehors de ces causes identifiées, plusieurs facteurs sont suspectés (INSERM 2008).

- *Facteurs infectieux et immunitaires*

Certains agents infectieux pourraient induire une leucémogénèse, comme chez l'animal où des virus leucémogènes de type rétrovirus et herpès virus ont été bien identifiés. Il y a une vingtaine d'années, Kinlen avait postulé que les leucémies pourraient être une séquelle rare d'une infection fréquente et spécifique, probablement d'origine virale, émergeant sous forme de micro-épidémies à l'occasion de mouvements extrêmes de population (Kinlen, 1988). Un afflux de population en zone isolée perturberait l'équilibre immunitaire de la population vis à vis de l'agent viral hypothétique et augmenterait l'incidence des leucémies aiguës (Kinlen, 1988; Rudant *et al*, 2006a). Au regard de cette hypothèse, notre équipe a mis en évidence une association entre l'incidence des leucémies de l'enfant et les mouvements de population du

lieu de résidence à la naissance (Rudant *et al*, 2006b) ou à l'interview (Bellec & Clavel, 2008). Dans la dernière étude, les 15% de la population qui était dans les communes isolées ayant connu les mouvements de population les plus importants avaient un SIR de 1,4.

Une autre hypothèse infectieuse, serait que des infections banales pourraient aussi intervenir de façon indirecte, en induisant une réponse immunitaire anormale et rare chez des enfants dont le système immunitaire serait insuffisamment préparé (Greaves, 1988; Greaves, 1997). Plusieurs études ont mis en évidence une association négative entre les leucémies de l'enfant et un nombre élevé d'infections banales avant 1 an (Rudant *et al*, 2010), ou la mise en collectivité précoce (Urayama *et al*, 2010).

- *Facteurs génétiques*

La comparaison de la séquence d'ADN de deux humains montre une identité de 99,9 %. Dans la fraction restante (0,1%) réside le degré de risque d'apparition de certaines maladies à hérédité complexe (comme l'asthme, le diabète et le cancer) ou la susceptibilité individuelle à certains médicaments. Des gènes de susceptibilité génétique codant pour des enzymes ayant un rôle dans le métabolisme des xénobiotiques et le transport membranaire ont été associés aux leucémies de l'enfant. Des associations positives ont été retrouvées entre les LAL de l'enfant et certains *haplotypes HLA* (Human Leukocyte Antigen) (Dorak *et al*, 1995; Stiller, 2004). De nombreuses études d'association gène-candidat ont été publiées sur des polymorphismes situés dans des gènes codant pour des enzymes du métabolisme des carcinogènes, du métabolisme des folates et de la réparation de l'ADN et certains polymorphismes semblaient associés positivement ou négativement au risque de LA (Vijaykrishnan & Houlston, 2010b). Cependant, il existe encore très peu d'études sur les interactions gène-environnement (Chokkalingam *et al*, 2008). Deux études ont rapporté que la consommation maternelle de tabac doublait le risque de leucémie aiguë chez des enfants porteurs de l'allèle *CYP1A1\*2A* (Clavel *et al*, 2005; Infante-Rivard *et al*, 2000a) ce qui ne s'est pas confirmé dans l'étude actuelle (Bonaventure *et al*, 2012). Clavel *et al*. ont aussi trouvé une interaction entre consommation maternelle de tabac et délétion du gène *GSTM1* (Clavel *et al*, 2005). Infante-Rivard *et al* ont rapporté des interactions positives entre la consommation maternelle d'alcool et la délétion du gène *GSTM1* et l'allèle *CYP2E1\*5* (Infante-Rivard *et al*, 2002), entre l'utilisation d'insecticides et les mutations *CYP1A1m1* et *m2* (Infante-Rivard *et al*, 2000b), et entre l'exposition aux rayons X après la naissance et le gène *MSH3* chez les filles (Infante-Rivard *et al*, 2000b). Urayama *et al*. ont rapporté une

interaction entre le gène *MDR1* et l'exposition domestique aux insecticides pendant la grossesse (Urayama *et al*, 2007).

- *Facteurs environnementaux*

L'exposition à des *champs électriques et magnétiques à extrêmement basse fréquence*, générés notamment par les lignes à haute tension, pourrait être associée au risque de LA chez l'enfant (Ahlbom *et al*, 2000; Kheifets *et al*, 2010), et a été pour cette raison classée cancérogène possible (2B) par le Centre International de Recherche sur le Cancer. Tandis qu'une association à des *radiations ionisantes à faible dose* (radon, sites nucléaires, examens médicaux à but diagnostique) est plus discutée.

Le tabagisme maternel pendant la grossesse et pendant l'enfance ne semble pas lié aux leucémies de l'enfant, malgré le nombre important d'études réalisées, mais le *tabagisme paternel préconceptionnel* a été mis en cause à plusieurs reprises (Chang *et al*, 2006; Ji *et al*, 1997; Shu *et al*, 1996; Sorahan *et al*, 1997; Sorahan *et al*, 2001).

*L'utilisation maternelle de pesticides au domicile*, pendant la grossesse et l'enfance a été fréquemment associée au risque de LA chez l'enfant (Rudant *et al*, 2007), alors que la littérature sur les expositions parentales agricoles est moins convaincante. Les expositions agricoles sont devenues rares en France. Les données de l'INSEE ([www.insee.fr/fr/.../EEC04\\_PACT03\\_2004.xls](http://www.insee.fr/fr/.../EEC04_PACT03_2004.xls)) indiquent que les agricultrices, ouvrières ou exploitantes, ne représentaient en 2004 que 2,6% des femmes de la population active de tous âges, et que cette proportion est passée à 1,8% en 2010.

Le rôle de *l'exposition professionnelle des parents aux solvants organiques et aux hydrocarbures aromatiques polycycliques* est discuté. *L'exposition environnementale aux hydrocarbures aromatiques, notamment au benzène*, par l'intermédiaire des usines pétrochimiques, du trafic automobile ou des stations-service pourrait être associée à une augmentation du risque de LA chez l'enfant.

### **1.1.3 Etiologie des hémopathies malignes de l'enfant – revue détaillée des questions abordées dans la thèse**

#### *1.1.3.1 Acide folique, métabolisme des folates et implication potentielle dans les LA de l'enfant*

- ***Apports en folates et rôle physiologique***

La vitamine B9, désignée par le terme de folates à l'état naturel, est apportée par l'alimentation et en particulier par les légumes verts. Sa forme synthétique est dénommée acide folique ou acide ptéroylmonoglutamique et peut être administrée isolée ou associée à d'autres vitamines ou suppléments nutritionnels. Des différences de biodisponibilité, ont été observées pour les deux formes de cette vitamine. Cela s'explique en partie par le fait que l'acide folique, sous forme monoglutamique, peut être absorbé directement, tandis que les folates, sous forme polyglutamique essentiellement, nécessitent l'intervention d'une enzyme intestinale pour être absorbés sous forme monoglutamique. Les folates sont des transporteurs d'unités monocarbonées nécessaires à un grand nombre de réactions métaboliques, qui sont la synthèse d'acide thymidilique (dTMP), la synthèse des bases puriques, la transformation de l'homocystéine en méthionine et la synthèse de la S-adénosyl méthionine, ainsi que l'interconversion de la sérine en glycine, et le catabolisme de l'histidine. Cette vitamine est donc indispensable à la synthèse des acides nucléiques et de l'ADN, ce qui explique que les besoins soient augmentés au moment des multiplications cellulaires rapides du premier trimestre de la grossesse. De ce fait, une carence en vitamine B9 entraîne un allongement des phases G1 et S du cycle, ce qui ralentit la division cellulaire. L'érythropoïèse, qui est la production des érythrocytes (globules rouges) dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hémapoïétiques, est également perturbée par asynchronisme de maturation nucléocytoplasmique.

La vitamine B9 joue un rôle important dans la prévention des malformations du tube neural qui peuvent toucher le fœtus pendant la grossesse, et c'est ce qui a justifié la recommandation d'une supplémentation maternelle en acide folique périconceptionnelle d'abord en 1995 par la Société Française de Pédiatrie, puis en 1997 par le Collège de Gynécologie Obstétrique. En août 2000, la Direction Générale de la Santé a recommandé aux praticiens amenés à prendre en charge des femmes en âge de procréer d'insister sur la nécessité de consommer des aliments riches en folates pour toutes les femmes en âge de procréer, et de supplémenter systématiquement toutes les femmes 4 semaines avant et 8 semaines après la conception avec

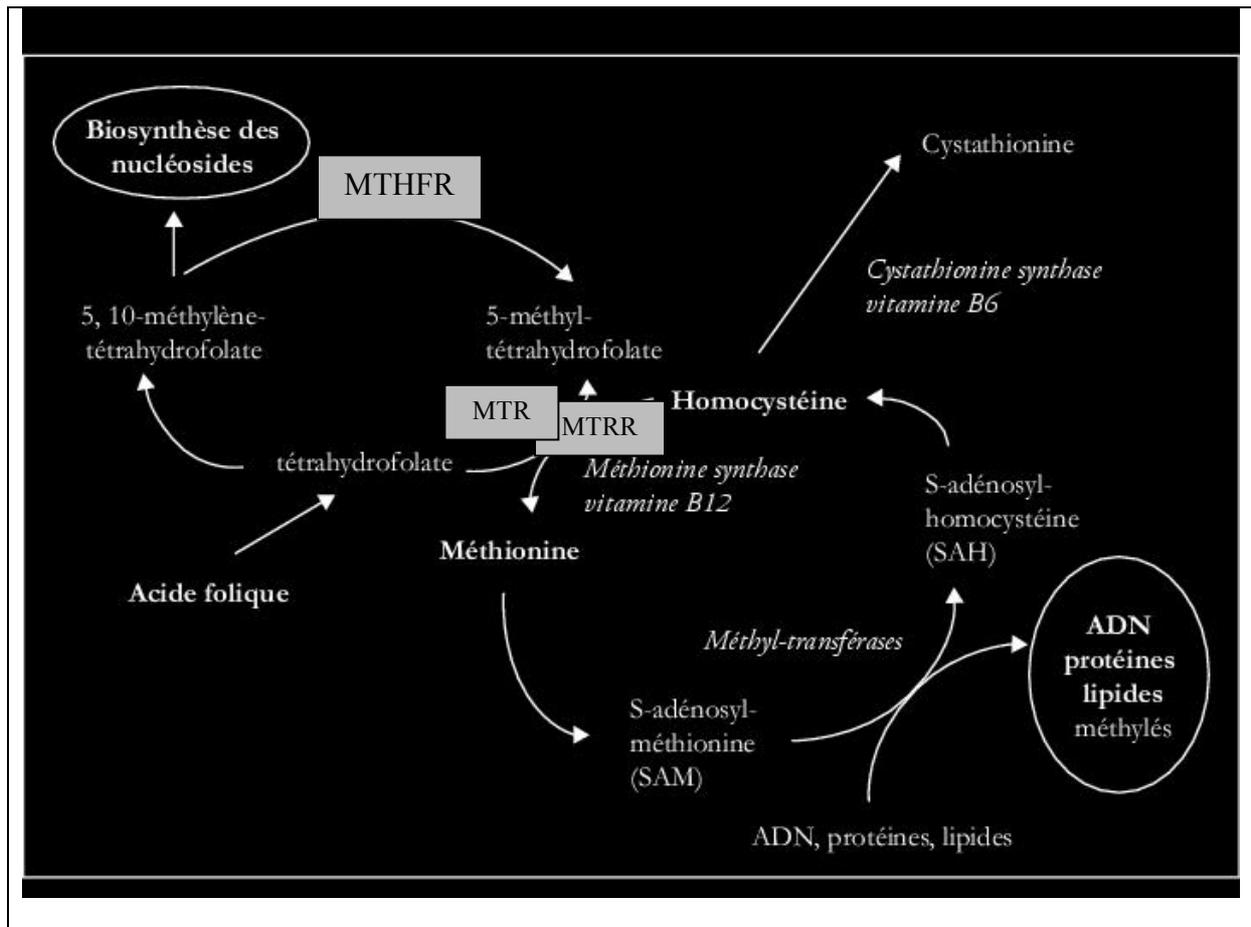
0,4 mg/j d'acide folique, cette dose étant augmentée à 5 mg/j pour les femmes à risque élevé d'anomalies de fermeture du tube neural. Ce n'est qu'en décembre 2004 qu'une campagne d'information et de sensibilisation auprès des professionnels de santé a été lancée par les pouvoirs publics dans le cadre du Programme National Nutrition Santé (<http://www.inpes.sante.fr/70000/dp/04/dp041209.pdf>).

La supplémentation préconceptionnelle était encore très rare à la fin des années 90, et la supplémentation concernait moins d'un quart des femmes. Dans une étude cas-témoins multicentrique française de 1998-1999 sur les fentes orofaciales, la prise de suppléments vitaminiques contenant de l'acide folique rapportée par les mères des témoins était de 0.8% le mois précédant la grossesse et de 24% au premier trimestre de la grossesse (Rouget *et al*, 2005). De même, dans une autre étude conduite uniquement dans des maternités parisiennes en 1999, 24.3% des mères déclaraient avoir pris un produit contenant de l'acide folique entre 1 mois avant et 2 mois après le début de la grossesse (Dehe *et al*, 2000). Dans cette étude, la supplémentation débutée avant la conception ne concernait que 2% des femmes et seulement la moitié de ces femmes l'avait poursuivie au moins le premier mois de la grossesse

- ***Métabolisme des folates***

Pour être utiles à l'organisme, les folates doivent entrer dans un cycle de métabolisme (figure 2) et être transformés sous différentes formes par différentes enzymes qui sont produites dès la période de préimplantation de l'embryon (Ikeda *et al*, 2012).

Figure 2 : Schéma du métabolisme des folates (Sinnett *et al*, 2006)



L'enzyme *MTHFR* (5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase) joue un rôle essentiel dans le cycle du métabolisme des folates en catalysant la conversion irréversible de la 5,10-méthylène tétrahydrofolate en 5-méthyl tétrahydrofolate, qui est nécessaire à la synthèse de thymidine (base pyrimidique, spécifique de l'ADN).

La méthionine synthase réductase ou *MTRR* est impliquée dans le maintien sous forme active de la méthionine synthase (*MTR*), en régénérant son cofacteur, la méthylcobalamine (une des formes actives de vitamines B12). *MTR* est une enzyme centrale dans le métabolisme des folates et de l'homocystéine puisque sous forme active, elle est essentielle au maintien de niveaux appropriés de méthionine, qui agit comme un précurseur pour la S-adenosylméthionine, donneuse universelle de groupes méthyles. Cependant, la réactivation de cette enzyme semble être nécessaire occasionnellement plutôt qu'à chaque cycle (Drummond *et al*, 1993).

Une insuffisance en folates diminue la disponibilité du 5-méthyl-THF pour la méthylation de la méthionine en homocystéine, qui à son tour, diminue les concentrations de S-adénosyl-méthionine, le principal donneur de méthyles pour la méthylation de l'ADN. Il en résulte une hypométhylation de l'ADN, qui peut changer l'expression des gènes et augmenter le nombre de cassures dans les brins d'ADN. Le 5,10-méthylène-THF est également un donneur de méthyles pour la formation de thymidilate, ce qui entraîne en cas de carence en folates, un changement dans la balance des précurseurs de l'ADN et peut causer une incorporation d'uracile à la place de la thymidine dans l'ADN. Des tentatives répétées d'excision de l'uracile par les enzymes de réparation de l'ADN peuvent déstabiliser l'ADN et causer des cassures menant à des aberrations chromosomiques et des transformations malignes (Blount *et al*, 1997).

Une carence en folates entraîne des altérations chromosomiques, la formation de sites fragiles et de micronoyaux, modifications souvent associées à un processus de tumorigenèse. La méthylène tétrahydrofolate-réductase (*MTHFR*) étant une enzyme clé du métabolisme des folates, des variations de l'activité enzymatique dues à des polymorphismes génétiques pourraient moduler la susceptibilité au cancer (Kim, 2000; Sinnott *et al*, 2006).

- ***Supplémentation maternelle en acide folique et risque de LA de l'enfant***

Trois études cas-témoins ont analysé l'association entre les leucémies aiguës lymphoblastiques et une supplémentation en acide folique, seule ou associée à d'autres suppléments, lors de la grossesse (tableau 1.1). Une étude australienne de petite taille sur la période 1984-1992 a montré une association inverse, forte et significative, avec une prise d'acide folique avec ou sans fer (OR=0.4 [0.2-0.7]) (Thompson *et al*, 2001). Cette étude trouvait également que l'effet protecteur de l'acide folique variait peu selon le moment du début de la prise pendant la grossesse et selon la durée de la prise. Mais deux études publiées ultérieurement, en Nouvelle-Zélande (Dockerty *et al*, 2007) et en Australie (Milne *et al*, 2010) ne retrouvaient pas d'association. L'étude de Dockerty *et al* incluait un nombre de cas proche de celui de l'étude de Thompson *et al* et ne distinguait pas non plus la prise d'acide folique de celle du fer. L'étude de Milne *et al* analysait la prise d'acide folique en séparant différentes périodes de la grossesse. Deux autres études cas-témoins, sur la prise de médicaments pendant la grossesse, se sont intéressées à la supplémentation en acide folique mais sans distinguer la prise d'acide folique de celle d'autres vitamines. Une supplémentation avec de l'acide folique seul ou en combinaison avec d'autres vitamines et/ou minéraux pendant au moins cinq jours

consécutifs n'était pas associée aux LAL dans une étude cas-témoins canadienne (Shaw *et al*, 2004). Une étude allemande (Schüz *et al*, 2007) a montré une association inverse non significative avec une supplémentation en vitamines, acide folique et/ou fer (OR=0.8 [0.7-1.0]), plus marquée pour les enfants âgés de 5 ans et plus (OR=0.7 [0.5 0.9]). Une étude conduite en Ontario dans le but d'évaluer l'impact d'une campagne de fortification des farines alimentaires en acide folique en 1997, n'a pas montré de changement d'incidence des LAL chez les nourrissons (French *et al*, 2003) puis, plus tard chez les enfants plus âgés (Grupp *et al*, 2011).

Tableau 1.1 Supplémentation maternelle en acide folique (AF) pendant la grossesse et risque de LA chez l'enfant.

Auteur, année, lieu, dates de l'étude	Echantillonnage	Type de supplémentation	Fréquence chez témoins	OR, IRR [IC95%]
<b>Etudes cas-témoins</b>				
<b>Thompson et al. 2001</b> Australie 1984-1992	83 LAL 166 témoins appariés	AF avec ou sans fer	46%	0.4 [0.2-0.7]
<b>Shaw et al. 2004</b> Canada 1980-2000	789 LAL 789 témoins appariés âge/sexe	AF seul ou en combinaison avec vitamines ou minéraux ≥ 5 jours consécutifs	59%	1.0 [0.8-1.2]
<b>Schüz et al. 2007</b> Allemagne 1992-1994	633 LAL 101 LAM 2057 témoins appariés	vitamines, AF et/ou fer	LAL: 38% LAM: 44%	LAL : 0.8 [0.7-1.0] LAM : 1.1 [0.7-1.7]
<b>Dockerty et al. 2007</b> Nouvelle-Zélande 1990-1993	97 LAL 303 témoins appariés	AF avec ou sans fer	9%	1.1 [0.5-2.7]
<b>Milne et al. 2010</b> Australie 2003-2007	393 LAL 1249 témoins appariés	AF		préconception 1.0 [0.8-1.3] 1 <sup>er</sup> trimestre 1.2 [0.9-1.6] 6 derniers mois 0.8 [0.7-1.1]
		vitamines avec AF	29.6%	1.1 [0.7-1.4]
<b>Etudes d'intervention (« avant-après »)</b>				
<b>French et al. 2003</b> Ontario (Canada)	ALL < 1 an	campagne de fortification des farines en AF (1997)		1.0 [0.4-2.3]
<b>Grupp et al. 2011</b> Ontario (Canada)	ALL: 0-9 ans		0-4 ans : 1.1 [0.9-1.2] 5-9 ans : 1.1 [0.9-1.3]	

- ***Polymorphismes des enzymes impliquées dans le métabolisme des folates***

On estime qu'il existe dans le génome plus de dix millions de variations communes (fréquence de plus de 5 % dans la population), la plupart étant des variations d'une seule base d'une séquence d'ADN entre individus d'une même espèce, soit les polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) (Kruglyak & Nickerson, 2001). Un gène est considéré comme polymorphe s'il existe au moins deux allèles à une fréquence égale ou supérieure à 1 %. Ils représentent plus de 90% de toutes les différences entre individus. En moyenne un SNP est rencontré tous les 300 à 1 200 nucléotides et il y en a de l'ordre de 10 millions dans le génome humain. Dans une population déterminée, l'allèle ayant la fréquence la plus petite est appelé allèle mineur. Un SNP peut être identifié selon un numéro précédé de « rs » ou bien par l'allèle de référence, suivi du numéro de la position du nucléotide dans la séquence ADN du gène, puis de l'allèle variant (ex : C677T).

Deux polymorphismes communs pour le gène *MTHFR*, C677T et A1298C, modifiant l'activité de l'enzyme ont été identifiés. La variation T677 remplaçant une alanine par une valine au codon 222 affecte le domaine catalytique de *MTHFR*, créant une enzyme thermolabile dont l'activité catalytique est réduite, par rapport à l'enzyme de génotype ancestral thermostable, d'environ 60 à 70% pour les homozygotes et à un niveau intermédiaire pour les hétérozygotes (35-40%) (Frosst *et al*, 1995). Ce polymorphisme entraîne une diminution des niveaux de 5-méthyl THF, une accumulation de 5,10 -méthylène THF, d'où une augmentation des niveaux d'homocystéine plasmatique et des changements dans la composition cellulaire des dérivés du folate mono-carbonés avec apparition de polyglutamates THF formylés (Bagley & Selhub, 1998; Frosst *et al*, 1995). Cette perte d'activité entraîne une diminution des niveaux de 5,10-méthylène-THF, substrat de *MTHFR* nécessaire à la synthèse de thymidylate, ce qui entraîne la mésincorporation d'uracile dans l'ADN, une diminution de l'efficacité du système de réparation de l'ADN et une accumulation de cassures et de lésions au niveau des chromosomes (Blount *et al*, 1997; Sinnott *et al*, 2006). Elle entraîne également une hypométhylation de l'ADN due à la baisse des niveaux de S-adenosyl-méthionine (SAM). A l'état homozygote, ce polymorphisme prédispose au développement d'une hyperhomocystéinémie (augmentation d'environ 25%) (Frosst *et al*, 1995; Kluijtmans *et al*, 1997), particulièrement lors d'une carence en folates (Jacques *et al*, 1996). Cependant, en l'absence de carence en folates, les niveaux d'homocystéine plasmatique seraient bas et indépendants du génotype. L'autre

polymorphisme A1298C affecte le domaine régulateur de *MTHFR* en remplaçant un glutamate par une alanine au codon 429. L'activité de l'enzyme est diminuée mais de façon moins marquée que pour C677 et les individus homozygotes pour l'allèle A1298 ne semblent pas avoir des taux plasmatiques d'homocystéine plus élevés, sauf en présence de l'allèle C677 (Weisberg *et al*, 2001). En effet, une étude suggère que les individus hétérozygotes pour les deux variants A1298C et C677T ont le même profil biochimique que les individus homozygotes pour le variant C677T (Weisberg *et al*, 1998).

Une étude *in vitro* de deux polymorphismes de *MTRR* C524T et A66G montre que ces variants semblent diminuer l'affinité de l'enzyme pour la méthionine synthase (*MTR*) (Olteanu *et al*, 2002). Le polymorphisme A66G mène au remplacement de l'isoleucine par la méthionine au codon 22, et le polymorphisme C524T, au remplacement de la sérine par la leucine au codon 175.

Les caractéristiques des polymorphismes étudiés dans *MTHFR* et *MTRR* sont résumées dans le tableau 1.2.

Tableau 1.2 Données sur les polymorphismes d'intérêt de *MTHFR* et *MTRR*.

Polymorphisme (SNP)	Localisation	MAF <sup>1</sup> témoins	MAF HapMap CEU	Allèle ancestral	Allèle variant	Modification phénotypique	Effet mutation
<i>MTHFR</i> C677T (rs1801133)	1p36.22	35.7%	31.0%	C	T	alanine <--> valine	activité diminuée
<i>MTHFR</i> A1298C (rs1801131)	1p36.22	31.5%	35.8%	A	C	glutamate <--> alanine	activité diminuée
<i>MTRR</i> C524T (rs1532268)	5p15.31	37.2%	30.8%	C	T	sérine <--> leucine	diminution affinité enzyme pour MTR?
<i>MTRR</i> A66G (rs1801394)	5p15.31	53.0%	44.8%	A	G	isoleucine <--> méthionine	diminution affinité enzyme pour MTR?

<sup>1</sup>MAF = Minor allele frequency (fréquence de l'allèle variant)

- ***Polymorphismes de MTHFR et MTRR et risque de LA de l'enfant***

Près de vingt études ayant analysé les deux SNPs de *MTHFR* ont apporté des résultats très contrastés, montrant soit aucune association (Metayer *et al*, 2011; Petra *et al*, 2007; Schnakenberg *et al*, 2005; Thirumaran *et al*, 2005), soit une association avec A1298C seul, inverse (Kamel *et al*, 2007; Krajinovic *et al*, 2004; Lightfoot *et al*, 2010), ou positive (Alcasabas *et al*, 2008; Kim *et al*, 2006), soit une association inverse avec C677T seul (Zanrosso *et al*, 2006), soit des associations inverses pour les deux SNPs (Chan *et al*, 2010; Reddy & Jamil, 2006; Tong *et al*, 2010; Wiemels *et al*, 2001), soit enfin une association positive pour A1298C et inverse pour C677T (de Jonge *et al*, 2009; Oliveira *et al*, 2005; Wiemels *et al*, 2001; Yeoh *et al*, 2010). Deux autres études ont porté uniquement sur *MTHFR* C677T. L'une d'elles ne trouvait pas d'association (Balta *et al*, 2003) et l'autre trouvait une association inverse (Chatzidakis *et al*, 2006) (tableau 1.3).

Tableau 1.3 Etudes sur le lien entre les polymorphismes de *MTHFR* C677T et A1298C et le risque de LA de l'enfant.

	Echantillonnage	Fréquence des génotypes (témoins)	<i>MTHFR</i> C677T - OR [IC95%]	A1298C - OR [IC95%]
<b>Wiemels et al. 2001</b> Royaume-Uni; 1992-1998	253 LA (37 MLL 78 TEL-AML1+ 138 hyperdipl) 200 échantillons de sang de cordon (sujets blancs)	C677T CT: 39.5% / TT : 16.0% A1298C AC: 42.0% / CC: 12.0% Témoins pas en équilibre HW	CT/TT 0.4 [0.2-0.9] MLL+ CT/TT 1.0 [0.6-1.9] TEL-AML1 CT/TT 0.8 [0.5-1.3] Hyperdipl.	AC/CC 1.1 [0.7-2.7] MLL+ AC/CC 0.6 [0.3-1.1] TEL-AML1 AC/CC 0.9 [0.6-1.5] Hyperdipl.
<b>Balta et al. 2004</b> Turquie; 2000-2002	142 LAL, 33 LANL (7 mois à 17 ans) 185 volontaires sains (frères/sœurs de patients )	C677T CT: 47% / TT: 4.3% Témoins pas en équilibre HW	TT 1.7 [0.7-4.6] LAL TT 1.4 [0.3-7.2] LANL	
<b>Krajinovic et al. 2004</b> Canada; 1988-2001	270 LAL 300 témoins, même hôpital hors hématologie	C677T CT: 42.7% / TT: 15.3% A1298C AC: 39.7% / CC: 10.3%	CT 1.1 [0.8-1.6] TT 0.8 [0.4-1.3]	AC 0.9 [0.6-1.3] CC 0.4 [0.2-0.8]
<b>Oliveira et al. 2005</b> Portugal	103 LAL <17 ans 111 témoins (âge moyen 25 ans, nés même région)	C677T CT: 51.3% / TT: 8.1% A1298C AC: 43.2% / CC: 8.1%	CT 0.8 [0.5-1.4] TT 0.5 [0.2-1.7]	AC 1.8 [0.5-1.7] CC 1.5 [0.5-4.1]
<b>Scnakenberg et al. 2005</b> Allemagne, Autriche, Suisse	443 LAL: 1-18 ans - 1999-2001 379 donneurs de sang 18-68 ans caucasiens	C677T MAF = 31.4% A1298C MAF = 36.7%	Pas d'association	Pas d'association
<b>Thirumaran et al. 2005</b> Allemagne; 1983-2003	460 LA 1 472 témoins appariés sur ethnie	C677C CT: 47.0% / TT: 11.5% A1298C AC: 44.3% / CC: 10.2%	CT 0.9 [0.7-1.1] TT 1.1 [0.8-1.6]	AC 1.0 [0.8-1.3] CC 1.2 [0.8-1.7]
<b>Reddy et Jamil 2006</b> Inde; 2003-2005	135 LAL: 1 à 10 ans 142 témoins appariés (mêmes instituts locaux)	C677C CT: 40.8% / TT : 3.5% A1298C AC: 47.9% / CC: 6.3%	CT 0.5 [0.3-0.8] TT 0.5 [0.1-1.8]	AC 0.5 [0.3-0.9] CC 0.5 [0.2-1.5]
<b>Chatzidakis et al. 2006</b> Grèce; 1997-2004	52 LAL (4 mois-13,4 ans) 88 témoins (19-77 ans)	C677T CT: 53.4% / TT: 10.2%	CT/TT 0.4 [0.2-0.8]	
<b>Zanrosso et al. 2006</b> Brésil	176 LAL (moyenne d'âge: 6,2 ans) 199 échantillons sang (moyenne d'âge: 25 ans)	C677T CT: 42.0% / TT 8.4% A1298C AC: 41.6% / CC: 6.7%	CT 1.0 [0.5-1.8] TT 1.1 [0.4-3.3]	AC 0.9 [0.5-1.7] CC 1.1 [0.3-3.8]
<b>Kim et al. 2006</b> Corée du Sud; 1996-2002	66 LAL de 1 à 15 ans 100 témoins de 1 à 15 ans	C677T CT: 55.0% / TT: 21.0% A1298C AC: 21.0% / CC: 2.0%	CT 1.0 [0.5-2.1] TT 0.7 [0.3-1.9]	AC 2.2 [1.1-4.5] CC 1.0 [0.1-11.5]
<b>Kamel et al. 2007</b> Egypte; 2003	88 LAL pré-B ≤18 ans (médiane: 6 ans) 311 témoins (donneurs de sang de 18 à 48 ans)	C677T CT: 43.4% / TT: 6.4% A1298C AC: 45.2% / CC: 9.4%	CT 0.9 [0.6-1.3] TT 0.8 [0.4-1.6]	AC 0.4 [0.2-0.7] CC 0.9 [0.8-1.1]
<b>Alcasabas et al. 2008</b> Philippines; 2001-2005	191 LAL (âge moyen: 6.9 ans) 394 sang de cordon	C677T CT: 16.5% / TT: 1.5% A1298C AC: 45.2% / CC: 14.2%	CT 1.4 [0.9-2.2] TT 1.1 [0.2-5.3]	AC 1.5 [1.0-2.2] CC 1.9 [1.1-3.1]
<b>De Jonge et al. 2009</b> Pays Bas	245 cas de LAL < 18 ans Europe de l'est 500 donneurs banque de sang de Rotterdam	C677T CT: 45.0% / TT: 10.9% A1298C AC: 43.7% / CC: 9.2%	CT 0.7 [0.5-1.0] TT 0.7 [0.4-1.2]	AC 1.0 [0.7-1.4] CC 1.6 [1.0-2.7]
<b>Chan et al. 2010</b> Indonésie; 2005-2008	185 LAL < 15 ans 177 témoins appariés sur ethnie	C677T CT: 28.8% / TT: 2.3% A1298C AC: 42.4% / CC: 11.3%	CT 0.7 [0.5-1.2] TT 0.4 [0.1-2.5]	AC 0.8 [0.5-1.2] CC 0.5 [0.3-1.1]
<b>Lightfoot et al. 2010</b> Royaume-Uni; 1991-1996	939 LAL - 89 LAM <14 ans 824 témoins d'une étude cas-témoins	C677T CT: 41.7% / TT: 11.1% A1298C AC: 43.7% / CC: 10.2%	CT 1.0 [0.8-1.3] TT 1.0 [0.7-1.4]	AC 0.8 [0.6-1.0] CC 0.8 [0.6-1.2]
<b>Tong et al. 2010</b> Chine; 2007-2009	361 LAL: 1 à 18 ans 508 témoins appariés sur âge (+/- 5 ans) et sexe	C677T CT: 50.6% / TT: 15.3% A1298C AC: 28.0% / CC: 4.7%	CT 1.0 [0.7-1.3] TT 0.5 [0.3-0.9]	AC 0.8 [0.6-1.2] CC 0.7 [0.3-1.5]
<b>Yeoh et al. 2010</b> Singapour : 1998-2008 Malaisie : 1998-2008	321 LAL/ chinois 346 sang de cordon 210 LAL /malaisiens / 410 sang de cordon < 19,4 ans moyenne âge: 5.8 +/-0.2 ans	C677T CT: 43.5% / TT: 9.3% A1298C AC: 33.4% / CC: 5.2% A1298C AC: 40.2% / CC: 11.1%	CT 0.6 [0.5-0.9] TT 0.7 [0.4-1.2]	AC 1.3 [0.9-1.8] CC 1.6 [0.8-3.1] AC 1.4 [1.0-2.0] CC 1.4 [0.8-2.5]
<b>Yang et al. 2011</b> Chine	231 LAL: 2-15 ans 367 volontaires sains: 4-60 ans	C677T CT: 45.8% / TT: 31.3% A1298C AC: 28.9% / CC: 1.9%	CT 0.9 [0.6-1.4] TT 1.0 [0.7-1.6]	AC 0.9 [0.6-1.3] CC 0.7 [0.2-2.6]

La méta-analyse la plus récente à ce jour (Yan *et al*, 2011) a conclu à une faible association négative et significative entre le polymorphisme *MTHFR* C677T et le risque de LAL de l'enfant. Trois autres méta-analyses, deux significatives (Koppen *et al*, 2010; Zintzaras *et al*, 2006) et une autre non (Pereira *et al*, 2006a), trouvaient aussi des associations négatives ; tandis que deux autres études (Vijayakrishnan & Houlston, 2010a; Wang *et al*, 2010) ne retrouvaient pas d'association. Pour le polymorphisme de *MTHFR* A1298C, la méta-analyse de 2011 (Yan *et al*, 2011) ne montrait pas d'association avec le risque de LAL de l'enfant, ainsi que deux autres méta-analyses (Vijayakrishnan & Houlston, 2010a; Zintzaras *et al*, 2006). Enfin, deux autres études (Koppen *et al*, 2010; Pereira *et al*, 2006a) trouvaient des associations inverses non significatives (tableau 1.4).

Tableau 1.4. Méta-analyses des études sur le lien entre les polymorphismes de *MTHFR* et le risque de LA de l'enfant.

Auteur, année, lieu, dates de l'étude	<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTHFR</i> A1298C
Zintzaras <i>et al</i> . 2006 1999-2005	4 études TT vs CC OR=0.7 [0.5-0.9]	3 études CC vs AA OR=0.6 [0.3-1.3]
Pereira <i>et al</i> . 2006 1999- 2006	8 études (1 772 LAL et 2 795 témoins) TT vs CC OR=0.8 [0.7-1.0] (Test Egger+)	8 études (1 710 LAL et 2 712 témoins) CC vs AA OR=0.8 [0.6-1.3]
Koppen <i>et al</i> . 2009 1999-2009	7 études CT vs CC OR=0.8 [0.6-0.9]	6 études AC vs AA OR=0.8 [0.6-1.2]
Wang <i>et al</i> . 2010 1999-2009	21 études (3 358 LAL et 6 961 témoins) 677T vs C677=0.9 [0.8-1.1]	
Vijayakrishnan & Houlston 2010 1996-2009	17 études (2 770 cas et 4 713 témoins) CT vs CC OR=1.0 [0.9-1.1] TT vs CC OR=0.9 [0.7-1.0]	14 études (2 496 cas et 4 403 témoins) CA vs AA OR=1.1 [1.0-1.2] CC vs AA OR=1.1 [0.9-1.3]
Yan <i>et al</i> . 2011	21 études (4 340 cas et 6 884 témoins) TT vs CC OR=0.8 [0.7-0.9]	18 études (4 230 cas et 6 414 témoins) CC vs CA/AA OR=1.0 [0.9-1.2]

Les polymorphismes de *MTRR* ont été moins étudiés (tableau 1.5). La seule étude (Gast *et al*, 2007) sur C524T ne trouvait pas d'association avec les LAL lorsque ce polymorphisme était analysé seul. Le polymorphisme A66G n'était pas associé aux LAL dans une étude (Yang *et al*, 2011) et inversement lié aux LAL dans trois études, significativement (Gast *et al*, 2007) ou non (de Jonge *et al*, 2009; Metayer *et al*, 2011). Une autre étude ne retrouvait pas d'association (Petra *et al*, 2007).

Tableau 1.5 Etudes sur le lien entre les polymorphismes de *MTRR* et le risque de LA chez l'enfant.

Auteur, année, lieu, dates de l'étude	Echantillonnage	<i>MTRR</i> A66G OR [IC95%]	<i>MTRR</i> C524T OR [IC95%]
Gast <i>et al</i> . 2007 Allemagne	460 LAL (âge moyen : 6.9 ans) 1983-2003 552 témoins (âge moyen: 32 ans) 1959-1986	AG (53.6%) 0.7 [0.5-1.0] GG (28.8%) 0.6 [0.4-0.9]	CT (46.5%) 1.1 [0.8-1.4] TT (11.7%) 1.1 [0.7-1.7]
Petra <i>et al</i> . 2007 Slovénie	68 LAL (1-17 ans) 258 étudiants (18-27 ans)	AG (52.7%) 0.8 [0.4-1.6] GG (29.1%) 0.6 [0.3-1.4]	
De Jonge <i>et al</i> . 2009 Pays-bas	245 cas de LAL < 18 ans (Europe de l'Est) 500 donneurs de sang (Pays-bas)	AG (49.1%) 0.8 [0.6-1.2] GG (30.7%) 0.7 [0.5-1.1]	
Métayer <i>et al</i> . 2011 USA, 1996-2002	377 LAL < 15 ans 448 cas appariés (date de naissance, sexe, ethnie)	Non hispaniques AG (54.4%) 0.8 [0.5-1.2] AA (22.8%) 0.9 [0.5-1.5] Hispaniques AG (41.3%) 1.1 [0.7-1.7] GG (11.7%) 0.7 [0.3-1.5]	
Yang <i>et al</i> . 2011 Chine	231 LAL: 2-15 ans 367 volontaires sains: 4-60 ans	AG (39.8%) 1.1 [0.8-1.6] GG (6.3%) 0.9 [0.4-1.8]	

Peu d'études à ce jour, ont étudié des combinaisons de polymorphismes. Certaines études ont analysé les deux SNPs de *MTHFR* combinés et trouvaient des associations inverses significatives avec certaines combinaisons (Kamel *et al*, 2007; Krajcinovic *et al*, 2004; Reddy & Jamil, 2006; Yeoh *et al*, 2010), tandis que d'autres ne reportaient aucune association pour l'ensemble des combinaisons (Kim *et al*, 2006; Oliveira *et al*, 2005; Petra *et al*, 2007; Schnakenberg *et al*, 2005; Thirumaran *et al*, 2005), ou une association positive (Alcasabas *et al*, 2008). L'étude de Petra *et al* montrait une association inverse non significative avec le fait d'être à la fois homozygote pour l'allèle variant (T) de *MTHFR* C677T et porteur de l'allèle variant (G) de *MTRR* A66G. Une publication récente sur l'étude californienne NCCLS (Metayer *et al*, 2011), sur un ensemble de polymorphismes dans des gènes impliqués dans la voie du métabolisme des folates, suggérait une association positive entre le risque de LAL et un bloc haplotypique spécifique de 3 SNPs dans *MTRR* chez les hispaniques.

- ***Interactions acide folique et polymorphismes de MTHFR et MTRR***

La supplémentation en acide folique pourrait influencer les niveaux d'homocystéine plasmatique. Une étude suggérait que les individus homozygotes pour l'allèle variant C677T de *MTHFR* tendaient à avoir des niveaux d'homocystéine plasmatique normaux lorsque l'apport de folates était adéquat (Rozen, 1997). Un apport suffisant en folates réduirait ainsi l'impact de la baisse d'activité de l'enzyme due au polymorphisme sur la méthylation de l'ADN (Friso *et al*, 2002) ou l'incorporation de l'uracile dans l'ADN (Blount *et al*, 1997). Certains auteurs suggèrent que le polymorphisme C677T pourrait ainsi réduire le risque de cancer si la prise de folates est adéquate ou, au contraire, augmenter le risque de cancer si la prise de folates est inadéquate (Kim, 2000).

En analyse cas-seuls, Milne *et al* (Milne *et al*, 2006) n'ont pas observé d'interaction entre le génotype de *MTHFR* et la supplémentation en folates en association avec les LAL. L'étude californienne (Metayer *et al*, 2011) trouvait une interaction entre certains polymorphismes de *MTRR* et la quantité moyenne de folates de l'alimentation maternelle, ces polymorphismes étant positivement associés aux LAL pour des apports en folates inférieurs à la médiane, et négativement pour des apports supérieurs. Il n'y avait pas d'interaction entre la prise de folates et chacun des polymorphismes de *MTHFR* ou du polymorphisme A66G de *MTRR*. Deux études ont stratifié leurs analyses des polymorphismes de *MTHFR* avant et après une campagne de recommandation de supplémentation en folates et ne trouvaient pas d'association pour l'étude germanique (Thirumaran *et al*, 2005) et une association négative restreinte à la période précédant la campagne pour l'étude canadienne (Krajinovic *et al*, 2004).

### 1.1.3.2 Profession des mères lors de la grossesse, expositions professionnelles in utero et risque de LA de l'enfant

- **Profession**

Depuis le début des années 1980, 7 études se sont intéressées au lien entre la profession exercée par les mères et le risque de LA de l'enfant (tableau 1.6). Parmi elles, nous comptons 5 études cas-témoins appariées, dont 3 étaient chez les enfants de moins de 15 ans (Hemminki *et al*, 1981; McKinney *et al*, 2003; Shu *et al*, 1988), une autre étude ne s'intéressait qu'au risque de LANL chez les moins de 18 ans (Buckley *et al*, 1989) et enfin, une dernière étude portait sur le risque de LA chez des sujets de moins de 30 ans (Ali *et al*, 2004). L'étude finlandaise (Hemminki *et al*, 1981) rapportait une augmentation non significative du risque de LAL sur la période 1959-1975 pour la profession maternelle de pharmacien et une légère association positive sur la période 1965-1975 pour le métier d'ouvrier d'usine. Des associations positives et significatives ont été mises en évidence dans l'étude de Shu à Shanghai, en prenant comme référence les employés de bureau. Les professions maternelles dans le secteur de l'industrie chimique et/ou des professions apparentées (OR=3.3 [1.6-6.8]), et les femmes médecins (OR=5.7 [1.3-24.5]) montraient un risque augmenté d'avoir un enfant atteint de LA. Les métiers du traitement et du raffinage des métaux étaient également associés au risque de LANL (OR=4.6 [1.3-17.2]) et les métiers de l'agriculture et forestiers au risque de LA (OR=2.3 [0.9-6.3]). Une étude de taille plus importante conduite aux USA (McKinney *et al*, 2003) a classé les professions des mères en groupes combinant des professions considérées homogènes pour des expositions spécifiques en période périconceptionnelle. Une association positive et significative avec le risque de LA était retrouvée pour les métiers exposant à des métaux (OR=3.7[1.6-8.6]) et était d'autant plus marquée pour les LAL (OR=3.9 [1.6-9.3]). Le groupe de profession intitulé « agriculture » correspondant à la vie à la ferme et une exposition aux animaux augmentait le risque de LA non significativement (OR =1.4 [0.6-3.3]). Les métiers du groupe « médical et soins de santé » montrait une association négative à la limite de la significativité avec le risque de LA (OR=0.8 [0.6-1.0]). L'étude américaine et canadienne de Buckley (Buckley *et al*, 1989) incluant uniquement des cas de LANL de moins de 18 ans reportait, elle aussi, une association positive et significative avec les professions des mères dans l'industrie du métal (OR=4.5 (10 cas; 3 témoins) (p=0.03)). La dernière étude cas-témoins conduite à Taiwan (Ali *et al*, 2004) incluait peu de cas de LA de moins de 30 ans et aucun emploi ou catégorie d'emploi ni titre d'industrie n'étaient retrouvés associés au risque de LA. Une étude de cohorte suédoise (Mutanen & Hemminki, 2001)

incluant des enfants diagnostiqués entre 1958 et 1996 et ayant connaissance du nom de l'emploi des mères exercé en 1960, reportait une association positive et significative pour le métier d'aide-soignante (SIR=1.6 [1.1-2.2]) et non significative pour le métier d'infirmière (SIR=1.5 [0.9-2.5]). Une autre étude de cohorte rétrospective dans une entreprise d'électronique taïwanaise (Sung *et al*, 2008), incluant les premiers enfants nés d'une grossesse simple entre 1978 et 2001, montrait une association positive et significative pour une exposition périconceptionnelle (RR=3.8 [1.2-12.6]).

Tableau 1.6. Etudes sur le lien entre les professions des mères exercées pendant la grossesse et le risque de LA de l'enfant.

	Echantillonnage	Recueil de l'exposition	Résultats OR [IC95%], RR [IC95%], SIR [IC95%]
<b>Hemminki et al. 1981</b> Finlande 1959-1975	319 cas < 15 ans témoins appariés nés dans même maternité: -1959-68: 1 témoin par cas -1969-75: 2 témoins par cas	emploi mères au moment de la grossesse pas détails des expositions 10 groupes des principales professions (groupes hétérogènes avec expositions variées)	Pharmaciens : OR=2.6 NS
<b>Shu et al. 1988</b> Chine, Shangai 1974-1986	309 cas < 15 ans 688 témoins appariés sur sexe et année de naissance	questionnaire	groupe de référence= employés de bureau industrie chimique: OR=3.3 [1.6-6.8] LAL : OR=3.2 [1.5-7.0]; LANL: OR=3.3 [1.3-8.8] Agriculture et forestier: OR=2.3 [0.9-6.3] Traitement et raffinage des métaux: OR=2.6 [0.9-7.7] LAL : OR=1.0 [0.2-4.9]; LANL : OR=4.6 [1.3-17.2] Médecins: OR=5.7 [1.3-24.5]
<b>Buckley et al. 1989</b> USA, Canada 1980-1984	204 LANL < 18 ans 1 témoin apparié par cas sur âge et race	interview des mères expositions auto-déclarées	industrie du métal: OR=4.5 (10 cas; 3 témoins) (p=0.03)
<b>Mutanen et al. 2001</b> Suède 1958-1996	Cohorte d'enfants nés entre 1935 et 1996 : 2397 sujets (1298 garçons et 1099 filles)	nom emploi mères exercé en 1960	aide-soignantes: SIR=1.6 [1.1-2.2] infirmières: SIR=1.5 [0.9-2.5]
<b>McKinney et al. 2003</b> UK 1991-1996	1 737 LA <15 ans 2 témoins par cas appariés sur sexe, âge et aire géographique	histoire professionnelle - 31 groupes d'exposition à partir du titre de emploi - probabilités d'exposition (certaine, possible, non exposé) - groupes de professions construits en combinant des professions considérées homogènes pour des expositions spécifiques	exposition périconceptionnelle : médical/soins de santé: LA : OR=0.8 [0.6-1.0] LAL : OR=0.8 [0.6-1.0] agriculture (vie à la ferme et exposition aux animaux) : LA : OR=1.4 [0.6-3.3]; LAL : OR=1.7 [0.7-4.0] métal: LA: OR =3.7 [1.6-8.6]; LAL: OR =3.9 [1.6-9.3]
<b>Ali et al. 2004</b> Taïwan	103 LA (âge moyen= 11.3) < 30 ans 247 témoins appariés sur âge et sexe (âge moyen=12.6)	histoire professionnelle des sujets et parents	pas d'association avec emploi des mères ou des catégories d'emploi, ni nom industrie pas d'association des parents et sujets avec titres d'emplois susceptibles d'être exposés à des produits pétrochimiques
<b>Sung et al. 2007</b> Taïwan 1978- 2001	40 647 naissances: 1 <sup>er</sup> enfant issu d'une grossesse simple (639051 personnes-années)	entreprise d'électronique où exposition potentielle à des solvants organiques 3 mois avant et après début de la grossesse	exposition périconceptionnelle : RR=3.8 [1.2-12.6]

- ***Expositions maternelles aux peintures et/ou aux solvants lors de la grossesse et risque de LA de l'enfant***

Entre 1989 et 2012, 10 études cas-témoins se sont intéressées à l'exposition des mères ou des parents aux peintures et/ou aux solvants (tableau 1.7). Parmi ces études, 3 analysaient des expositions domestiques (Bailey *et al*, 2011; Freedman *et al*, 2001; Scelo *et al*, 2009), 6 autres (Abadi-Korek *et al*, 2006; Buckley *et al*, 1989; McKinney *et al*, 2003; Reid *et al*, 2011; Schuz *et al*, 2000; Shu *et al*, 1999) étudiaient des expositions professionnelles et une dernière étude avait reporté les deux types d'exposition (Infante-Rivard *et al*, 2005).

- *Exposition domestique*

L'étude de Freedman aux Etats-Unis reportait une association positive et significative (OR= 1.7 [1.1-2.7]) avec le risque de LA de l'enfant pour une exposition des mères à plus de 4 pièces peintes au domicile pendant les 12 mois précédant la naissance de l'enfant (Freedman *et al*, 2001). L'étude australienne trouvait une association du même ordre de grandeur avec le risque de LAL pour des mères exposées à plus de 3 pièces peintes à leur domicile lors de la grossesse (OR=1.7 [1.0-2.8]) (Bailey *et al*, 2011). Cette étude reportait d'autres associations positives et significatives, une pour l'utilisation de peintures à base d'eau seulement appliquées dans l'habitat pendant la grossesse de la mère par une personne autre que l'un des parents (OR=2.2 [1.0-5.0]), une autre, pour l'application de peintures au domicile par une personne autre que les parents pendant l'année précédant la conception de l'enfant (OR=2.4 [1.3-4.3]) ainsi qu'une dernière, pour l'application par les mères (et/ou non le père ou une autre personne) de peintures à base d'huile (+/- base d'eau) à l'extérieur du domicile (OR= 3.0 [1.1-8.3]). L'utilisation avant ou pendant la grossesse de produits de traitements des sols pouvant contenir des produits similaires à ceux des peintures ou des colles et solvants n'était pas associée au risque de LA. Une étude de taille intermédiaire conduite au Canada entre 1980 et 2000 (Infante-Rivard *et al*, 2005), ne reportait pas non plus d'association pour une exposition maternelle pendant la grossesse aux solvants au domicile. Dans l'ensemble, une étude californienne (Scelo *et al*, 2009) ne trouvait pas d'association entre l'utilisation de peintures ou solvants au domicile de 3 mois avant la grossesse jusqu'à la naissance et pendant la grossesse avec le risque de LAL ou LAM. Cependant, une association positive et significative était reportée pour l'utilisation de peintures pendant la grossesse et le risque de LAL avec translocation t (12 :21) (OR= 3.3 [1.1-9.6]). Chez les enfants de moins de 2 ans, le

risque de LAL était augmenté avec l'utilisation de peintures de 3 mois avant la grossesse jusqu'à la naissance ainsi que pendant la grossesse mais non significativement.

- *Exposition professionnelle*

Trois études cas-témoins de grande taille conduites dans les années 1990 s'intéressaient à l'utilisation de peintures et/ou de solvants par les mères en milieu professionnel. Les deux premières trouvaient une association positive et significative entre le risque de LAL et une exposition des mères pendant la grossesse à des peintures ou diluants (OR=1.7 [1.2-2.3]) pour l'étude américaine (Shu *et al*, 1999) et à des peintures ou laques (OR=2.0 [1.2-3.3]) pour l'étude allemande (Schuz *et al*, 2000). L'étude américaine (Shu *et al*, 1999) trouvait également une association avec l'exposition des mères à des solvants pendant la grossesse (OR=1.6 [1.1-2.3]), tandis que cette association n'était pas retrouvée dans l'étude allemande (Schuz *et al*, 2000), ou dans celle du Royaume-Uni pour une exposition un an avant la naissance (McKinney *et al*, 2003). Une étude ultérieure conduite au Canada entre 1980 et 2000 (Infante-Rivard *et al*, 2005), ne rapportait pas d'association pour une exposition des mères aux solvants en milieu professionnel pendant la grossesse, ni pour une exposition deux ans avant la grossesse et jusqu'à la naissance. Cependant, deux associations positives et significatives étaient retrouvées pour une exposition au toluène lors de la grossesse (OR=2.3 [1.0-3.0]). Ces associations étaient également significative pour des mères exposées de 2 ans avant la grossesse jusqu'à la naissance, ainsi que l'exposition au white spirit après 1970 de deux ans avant la grossesse jusqu'à la naissance était également associée aux LA (Infante-Rivard *et al*, 2005). Trois autres études de petite taille s'intéressaient à ces expositions. L'étude américaine portait sur les LANL et reportait une association positive mais non significative pour des mères exposées à des peintures et pigments pendant la grossesse (Buckley *et al*, 1989). Cette étude ne trouvait pas d'association avec les solvants, tandis que l'étude israélienne trouvait une association positive et significative mais pour une exposition estimée sur toute l'histoire professionnelle (Abadi-Korek *et al*, 2006). Enfin, l'étude de Reid conduite en Australie suggérait une association avec les mères exposées à des solvants une année avant la naissance (OR=1.6 [0.9-2.9]). Aucune association n'était retrouvée pour une exposition à des peintures et colorants ainsi qu'à des colles et résines (Reid *et al*, 2011).

Tableau 1.7 Expositions maternelles domestiques et professionnelles à des peintures et/ ou solvants lors de la grossesse et risque de LA de l'enfant

Auteur, année, lieu, dates de l'étude	Echantillonnage	Recueil exposition	Peintures OR [IC95%]	Solvants OR [IC95%]
<b>Expositions domestiques:</b>				
<b>Freedman et al. 2001</b> USA 1989-1993	640 LAL < 15 ans 640 témoins individuellement appariés au cas sur âge, premiers chiffres numéro téléphone et race	interview	1 an avant naissance: OR=1.2 [0.9-1.5] (> 4 pièces : OR =1.7 [1.1-2.7])	
<b>Infante-Rivard et al. 2005</b> Canada 1980-2000	790 LAL et 790 témoins appariés sur âge et sexe 1980-1993: cas entre 0 et 9 ans 1994-2000: cas < 14 ans	questionnaire		pas d'association avec solvants au domicile
<b>Scélo et al. 2009</b> USA, Californie 1995-2005	650 LA (550 LAL et 100 LAM) < 15 ans 438 paires et 212 triplés de témoins appariés sur date de naissance, sexe, ethnie hispanique, et race de la mère	interview liste de produits	Pendant grossesse : LAL OR=1.2 [0.9-1.7] t(12;21): OR=3.3 [1.1-9.6] LAM: OR=1.0 [0.4-2.6]	Avant la naissance : LAL OR=1.2 [0.8-1.7] LAM: OR=0.9 [0.3-2.3]
<b>Bailey et al. 2011</b> Australie 2003-2006	389 LAL < 15 ans 876 témoins appariés sur âge, sexe et état de résidence	questionnaire	Pendant grossesse : Utilisation maternelle : OR=1.3 [0.9-1.9] (> 3 pièces: OR=1.7 [1.0-2.8]) Utilisation par d'autres que mère OR=1.6 [0.8-3.0] (> 3 pièces: OR=2.2 [0.9-5.6])	Pendant grossesse : produit décapant: OR=1.6 [0.7-3.7]
<b>Expositions professionnelles :</b>				
<b>Buckley et al. 1989</b> USA et Canada 1980-1984	204 LANL < 18 ans 1 témoins apparié par cas sur âge et race	interview auto-déclarée matrice emploi-expositions	Pendant la grossesse : Peintures et pigments : OR=1.5 NS	Pendant la grossesse : solvants: pas d'association
<b>Shu et al. 1999</b> USA 1989-1993	1842 LAL < 15 ans 1842 témoins appariés (âge, sexe, ethnie et indicatif)	interview auto-déclarée hygiénistes	Pendant la grossesse Peintures/diluants : OR=1.7 [1.2-2.3]	Pendant la grossesse : OR=1.6 [1.1-2.3]
<b>Schüz et al. 2000</b> Allemagne 1992-1997	1138 LAL < 15 ans et 2962 témoins, appariés sur sexe, sexe, et agglomération	interview liste de produits	Peintures ou laques: préconception OR=1.6 [1.1-2.4] pendant la grossesse OR=2.0 [1.2-3.3]	préconception : OR=1.2 [0.9-1.7] pendant la grossesse : OR=1.3 [0.8-1.9]

<b>McKinney et al. 2003</b> UK 1991-1996	1737 LA <15 ans 2 témoins par cas appariés sur sexe, âge et région	interview tâches emploi		Pendant période périconceptionnelle : LA : OR=1.1 [0.8-1.6]
<b>Infante-Rivard et al. 2005</b> Canada 1980-2000	790 LAL et 790 témoins appariés sur âge et sexe 1980-1993: cas entre 0 et 9 ans 1994-2000: inclusion cas jusqu'à 14 ans	interview titre emploi expertise par hygiénistes		Pendant la grossesse: OR=1.0 [0.8-1.3] Hydrocarbures aromatiques mononucléés: OR=1.7 [1.1-2.7] dont toluène: OR=2.3 [1.0-5.0]
<b>Abadi-Korek et al. 2006</b> Israël 1984-2002	112 LAL et 112 témoins hospitaliers (maladies hémato) appariés (âge, sexe, département, religion)	Interview titre emploi liste de métiers exposés		Emplois exposés : OR=2.1 [1.1-4.2]
<b>Reid et al. 2011</b> Australie 2003-2006	379 LAL <15 ans 1 361 témoins appariés (âge, sexe et état résidence) histoire professionnelle: 854 mères	Interview tâches emploi experts	1 an avant naissance: peintures et colorants: OR=1.1 [0.8-1.6] colles et résines: OR=1.0 [0.4-2.3]	1 an avant naissance : OR=1.6 [0.9-2.9]

- ***Exposition maternelle aux pesticides lors de la grossesse***

Les pesticides font partie des facteurs environnementaux suspectés car ils pourraient promouvoir des événements moléculaires et cellulaires tels que des aberrations chromosomiques, un stress oxydatif, une perturbation des signaux cellulaires, ou des mutations qui pourraient être liés à une augmentation du risque de cancer (Infante-Rivard & Weichenthal, 2007).

- *Exposition domestique*

Deux méta-analyses récemment publiées ont mis en évidence une association positive et significative entre une exposition maternelle à des pesticides au domicile et le risque de LA (Turner *et al*, 2011; Vinson *et al*, 2011). Une méta-analyse française reportait un méta-OR de 1.6 [1.2-2.0] calculé à partir de 9 études analysant le lien entre une exposition maternelle à des pesticides et le risque de LA mais cette exposition pouvait dans certaines études ne pas être limitée à la grossesse (Vinson *et al*, 2011). Une seconde méta-analyse ciblait spécifiquement cette période et calculait un méta-OR de même ordre de grandeur sur la base de 11 études (méta-OR=1.5 [1.1-2.1]) pour une exposition maternelle à des pesticides au domicile pendant la grossesse utilisés par la mère ou une autre personne (Turner *et al*, 2011). Lorsque l'utilisation de pesticides pendant la grossesse était restreinte à la mère l'hétérogénéité entre les études était diminuée (5 études) et le méta-OR augmenté (méta-OR=2.1 [1.6-2.6]).

- *Exposition professionnelle*

De nombreuses études ont étudié le lien entre le risque de LA de l'enfant et l'exposition maternelle des mères en milieu professionnel aux pesticides (tableau 1.8). Les informations ayant permis l'estimation de l'exposition provenaient de réponses à un questionnaire et/ou à une interview téléphonique ou face à face recueillant l'histoire professionnelle des mères plus ou moins détaillée selon les études. A partir de ces informations, l'exposition était déterminée soit à partir de l'auto-déclaration d'une exposition aux pesticides, soit à partir du titre de l'emploi associé ou non à d'autres renseignements sur le métier exercé. Des hygiénistes ou d'autres experts pouvaient être chargés d'estimer l'exposition potentielle aux pesticides ou bien les mères étaient classées dans le groupe exposé si leur profession était liée à l'agriculture ou d'autres métiers susceptibles d'exposer les mères aux pesticides. Le regroupement de ces métiers variait selon les études parmi les métiers suivant : agriculteur, jardinier, forestier, fleuriste, horticulteur. De plus, la période d'exposition considérée pouvait être limitée à la grossesse ou bien s'étendre sur une période de un an avant la grossesse jusqu'à la naissance de l'enfant.

A ce jour, 3 méta-analyses incluant des études, publiées entre 1985 et 2008, sur l'exposition maternelle professionnelle aux pesticides ont été réalisées. En raison des critères de sélection des études relatifs à chaque méta-analyse, le nombre d'études incluses variaient, cependant chaque méta-analyse trouvait une association positive et significative entre l'exposition des mères aux pesticides en période prénatale et le risque de LA. La première, publiée en 2009, incluait 16 études dont 15 définissaient bien l'exposition maternelle prénatale aux pesticides, avec un méta-OR de 2.1 [1.5-2.9], inchangé lorsque la période d'exposition considérée était restreinte à la grossesse, et renforcé pour les métiers agricoles (OR=2.4 [1.5-3.9]) (Wigle *et al*, 2009). Une association similaire (méta-RR de 2.0 [1.1-3.6]) était retrouvée dans la seconde méta-analyse, qui portait sur 8 études de cohorte (Van Maele-Fabry *et al*, 2010). Toutefois, dans cette étude, il n'y avait pas d'association avec un emploi dans une ferme ou dans l'agriculture pendant leur grossesse. Dans la dernière méta-analyse (Vinson *et al*, 2011), l'association avec une exposition professionnelle en période prénatale était moins élevée (méta-OR=1.5 [1.3-1.8]). Une étude postérieure à ces méta-analyses ne rapportait pas d'association entre le risque de LA et une exposition maternelle professionnelle aux pesticides un an avant la naissance de l'enfant (OR=0.7 [0.1-6.4]), déterminée par expertise individuelle des histoires professionnelles maternelles (Glass *et al*, 2012).

Tableau 1.8 Méta-analyses des études sur l'exposition maternelle professionnelle aux pesticides et le risque de LA

<b>Méta-analyses:</b>	<b>Echantillonnage</b>	<b>Résultats OR [IC95%]</b>
<b>Wigle et al. 2009</b> 1985-2008	31 études: 26 cas-témoins, 5 cohortes 3 études non publiées + 1 étude en japonais	Exposition maternelle Prénatale : OR=2.1 [1.5-2.9] (16 études) Dont agriculture OR=2.4 [1.5-3.9] Pendant la grossesse: OR=2.1 [1.5-2.9] (15 études)
<b>Van Maele-Fabry et al. 2010</b> 1985-2008	25 études: 3 cohortes 22 cas-témoins que 11 études ≤ 15 ans	Etudes de cohortes: mRR=0.8 [0.5-1.1] (3 études) Etudes cas-témoins mOR=1.6 [1.2-2.2] (10 études) LAL mRR=1.3 [0.7-2.6] (4 études) LANL mRR=2.7 [1.1-6.8] (2 études) Pendant la grossesse: mRR 2.0 [1.1-3.6] (8 études) Ferme/agriculture pendant grossesse mRR=0.8 [0.2-2.7] (4 études)
<b>Vinson et al. 2012</b> 1985-2008	40 études relatives aux cancers de l'enfant: 38 cas-témoins 2 cohortes	Expo des mères aux pesticides en période prénatale: OR=1.5 [1.3-1.8]

- *Exposition maternelle aux rayonnements ionisants lors de la grossesse*

Les études publiées sur les expositions maternelles aux rayonnements ionisants lors de la grossesse s'intéressaient également soit à des expositions non-professionnelles, soit à des expositions professionnelles.

- *Exposition non-professionnelle*

Une revue de la littérature publiée en 2008 (Schulze-Rath *et al*, 2008) ne reportait pas d'association entre le risque de LA et une exposition prénatale aux radiations ionisantes provenant de radiographies à but diagnostic. Les données étaient issues de 9 études cas-témoins, pour la plupart de petites tailles, avec des périodes d'inclusion des sujets s'étendant de 1936 à 1998, et certaines études avaient inclus des sujets de plus de 15 ans. De plus, excepté pour une étude, le recueil de l'exposition faisait appel à la mémoire des mères. La plupart de ces études n'estimaient pas les doses de rayonnements ionisants reçues par les mères. Par ailleurs, les techniques d'imagerie médicale ont évolué au cours du temps vers une diminution des doses de radiation reçues par le patient. Cependant, ces études ne prenaient pas en compte les expositions à des scans qui sont apparus plus récemment et dont la pratique s'est largement répandue, exposant les patients à des doses plus élevées. Les doses de rayonnements ionisants reçues par les mères ont ainsi pu être très variables selon les études. Une étude cas-témoins ultérieure conduite en Australie entre 2003 et 2006 (Bailey *et al*, 2010), n'observait pas non plus d'association entre une exposition des mères pendant la grossesse à des radiographies de la région abdominale ou pelvienne et le risque de LAL mais dans cette étude la prévalence de l'exposition était particulièrement faible (1% des cas et 1,8% des témoins).

- *Exposition professionnelle (tableau 1.9)*

L'étude américaine publiée en 1989, n'incluant que des cas de leucémies aiguës non lymphoblastiques, n'observait pas de lien avec l'exposition maternelle aux radiations ionisantes avec port de dosimètre (Buckley *et al*, 1989). Trois études, ne séparant pas dans leurs analyses les cas de leucémie aiguë des cas de lymphomes non hodgkiniens, s'intéressaient également à cette exposition. Une étude cas-témoins du Royaume-Uni, n'incluant que très peu de cas de moins de 5 ans, incluse dans une cohorte d'enfants de mères travaillant dans l'industrie du nucléaire, rapportait une association positive et significative pour une exposition maternelle pendant la grossesse (OR =3.0 [0.1-57.6]) (Roman *et al*, 1993). Toujours au Royaume-Uni, une étude de cohorte de manipulateurs radio montrait également une augmentation du risque de LA, mais non significative (Roman *et al*, 1996). Enfin, une autre étude de cohorte du Royaume Uni, déterminant l'exposition à partir d'un registre national des travailleurs exposés aux radiations ionisantes, ne mettait pas en

évidence d'association mais ce registre ne couvrait pas les manipulateurs radio où la proportion de femmes est plus importante (Bunch *et al*, 2009). Une étude cas-témoins allemande, observait une association positive mais non significative pour l'exposition maternelle aux radiations ionisantes dans une installation nucléaire et le risque de LA (OR =1.5 [0.9-2.8]) (Meinert *et al*, 1999). Une association non significative inverse était observée dans une étude cas-témoins du Royaume-Uni pour une exposition maternelle 1 an avant la naissance aux radiations ionisantes déterminée à partir du titre de l'emploi des mères (McKinney *et al*, 2003). Pour finir, une étude de cohorte américaine de manipulateurs radio ne reportait pas d'association entre le risque de LA et des estimation à partir de la littérature de doses de radiations ionisantes reçues par les mères in utero (Johnson *et al*, 2008). Globalement, le nombre d'études publiées analysant séparément les LA reste limité et leurs résultats sont contradictoires.

Tableau 1.9 Exposition maternelle professionnelle aux rayonnements ionisants et risque de LA de l'enfant

Auteur, année, lieu, dates de l'étude	Echantillonnage	Recueil de l'exposition	Résultats OR [IC95%], HR [IC95%]																
<b>Buckley et al. 1989</b> USA 1980-1984	204 LANL < 18 ans 204 témoins appariés par cas sur âge et race	interview des mères expositions auto-déclarées	pas d'association avec rayonnements ionisants pour mères porteuses d'1 dosimètre (4 cas et 4 témoins)																
<b>Roman et al. 1993</b> UK 1972-1989	Cas-témoins dans l'industrie du nucléaire 54 LAL/ LNH < 5 ans 324 témoins	mères dans industrie du nucléaire et exposées à radiations ionisantes de la conception à la naissance	OR=3.0 [0.1-57.6] (1 cas / 2 témoins)																
<b>Roman et al. 1996</b> UK 1988-1990	cohorte de 5 621 manipulateurs radio entre 30 et 64 ans cas de LAL/LNH	mères exposées à radiation ionisante	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Age</th> <th>O</th> <th>E</th> <th>SIR</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0-4</td> <td>3</td> <td>1.8</td> <td>1.7 [0.3-4.9]</td> </tr> <tr> <td>5-9</td> <td>1</td> <td>0.9</td> <td>1.1 [0.0-6.2]</td> </tr> <tr> <td>10-14</td> <td>1</td> <td>0.5</td> <td>2.0 [0.1-11.1]</td> </tr> </tbody> </table>	Age	O	E	SIR	0-4	3	1.8	1.7 [0.3-4.9]	5-9	1	0.9	1.1 [0.0-6.2]	10-14	1	0.5	2.0 [0.1-11.1]
Age	O	E	SIR																
0-4	3	1.8	1.7 [0.3-4.9]																
5-9	1	0.9	1.1 [0.0-6.2]																
10-14	1	0.5	2.0 [0.1-11.1]																
<b>Meinert et al. 1999</b> Allemagne 1992-1994 1980-1994: zone où installation nucléaire	1 184 LA < 15 ans 2588 témoins appariés sur sexe, date de naissance dans l'année et district de résidence	questionnaire + interview téléphonique: si profession dans installation nucléaire: port de dosimètre, information sur exposition aux radiations préconceptionnelle cumulée	Pendant la grossesse: < 15 ans OR =1.5 [0.9-2.8] (20 cas /32 témoins) < 19 mois OR =3.3 [0.6-13.3] (4 cas / 5 témoins)																
<b>McKinney et al. 2003</b> UK 1991-1996	1 737 LA <15 ans 2 témoins par cas appariés sur sexe, âge et région	titre de l'emploi: - exposition certaine (tous les jours ou à niveaux très élevés) - exclusion des possibles (exposition peut se produire mais pas nécessairement tous les jours ou à des niveaux très élevés)	Période périconceptionnelle (1 an avant naissance): LA: OR = 0.6 [0.1-5.2] (1 cas/7 témoins)																
<b>Johnson et al. 2008</b> USA 1921-1984	81 262 enfants de mères manip radio	questionnaires exposition professionnelle annuelle estimée à partir de la littérature Dose estimée: moyenne des doses reçues au niveau des ovaires année avant et année de la naissance	Exposition des mères pendant la grossesse: <table border="1"> <thead> <tr> <th>Dose (mGy)</th> <th>LA</th> <th>HR</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>28</td> <td>1.0 Réf</td> </tr> <tr> <td>&gt; 0-0.17</td> <td>17</td> <td>1.1 [0.6-2.0]</td> </tr> <tr> <td>0.18-1.0</td> <td>15</td> <td>0.9 [0.5-1.8]</td> </tr> <tr> <td>1.01-12.6</td> <td>3</td> <td>1.1 [0.3-3.7]</td> </tr> </tbody> </table>	Dose (mGy)	LA	HR	0	28	1.0 Réf	> 0-0.17	17	1.1 [0.6-2.0]	0.18-1.0	15	0.9 [0.5-1.8]	1.01-12.6	3	1.1 [0.3-3.7]	
Dose (mGy)	LA	HR																	
0	28	1.0 Réf																	
> 0-0.17	17	1.1 [0.6-2.0]																	
0.18-1.0	15	0.9 [0.5-1.8]																	
1.01-12.6	3	1.1 [0.3-3.7]																	
<b>Bunch et al. 2009</b> UK 1952-1986 1987-1999	1952-1999: 20 067 LA et LNH 20 067 témoins appariés (1987-1999: 6 208 LA et LNH et 6 208 témoins appariés)	registre national des travailleurs exposés aux radiations (ne couvre pas les manipulateurs radio dans le domaine médical)	pas d'association (2 cas /1 témoin)																

### 1.1.3.3 Exposition au trafic routier et risque de LA de l'enfant

L'exposition environnementale au benzène a été suspectée d'être associée aux leucémies de l'enfant, au regard des connaissances dont on disposait sur le benzène en milieu professionnel, leucémogène pour l'homme et classé depuis 1982 dans le groupe 1 des cancérogènes prouvés pour l'homme (IARC 1982). Le caractère leucémogène du benzène est particulièrement net pour les LAM, mais les études ayant conclu à cet effet ont été réalisées uniquement chez l'adulte, où les LAM sont majoritaires et pour des expositions à des concentrations bien supérieures (Rinsky, 1989) à celles du milieu environnemental. Cependant, en 2007, une étude a suggéré que l'exposition à de faibles doses de benzène (médiane : 22 µg/m<sup>3</sup>), chez des policiers chargés de la régulation du trafic, pouvait entraîner une altération de la méthylation de l'ADN et perturber le mécanisme de l'expression génétique (Bollati et al, 2007).

D'autres émissions liées au trafic routier sont mises en causes dans certains cancers. L'agence internationale de recherche sur le cancer a classé les émissions de particules fines diesel émanant des pots d'échappement comme carcinogènes certains (groupe 1) et les gaz d'échappement des moteurs à essence comme possiblement cancérigènes (groupe 2B) pour l'homme. Ces classements ne faisaient pas référence aux cancers de l'enfant.

Quinze études ont été consacrées à l'influence du trafic routier sur le risque de leucémie de l'enfant. Le trafic y est évalué selon des indicateurs variés (tableau 1.10).

Plusieurs études ont pris comme indicateur la proximité d'une route à grande circulation (Harrison *et al*, 1999; Steffen *et al*, 2004b; Visser *et al*, 2004). L'étude de Harrison *et al* a mis en évidence un nombre de cas de LA plus élevé qu'attendu dans des zones situées à moins de 100 mètres d'une station-service et/ou d'une route principale. Cependant, cette étude souffrait d'incertitudes sur l'estimation de la population. Dans une étude reposant sur 5 cas de LAL de l'enfant, Visser *et al* (Visser *et al*, 2004) ont observé une augmentation non significative du risque chez les enfants résidant sur une route à un fort score d'intensité de trafic journalier (SIR= 2.6 [0.9-6.1]) par rapport à ceux qui résidaient à l'écart des routes. L'étude de Steffen *et al* (Steffen *et al*, 2004b) en France ne trouvait pas d'association entre le risque de LA et l'exposition auto-déclarée à une route à fort trafic à moins de 50 mètres du domicile de l'enfant.

Trois études ont utilisé le trafic quotidien des routes à proximité du domicile comme un indicateur de trafic (Langholz *et al*, 2002; Pearson *et al*, 2000; Reynolds *et al*, 2001; Savitz & Feingold, 1989). L'étude de Savitz *et al* aux USA (Savitz & Feingold, 1989) estimant le trafic routier journalier dans

la rue du domicile de l'enfant ( $< 500$  vs  $\geq 500$  véhicules/jour) a mis en évidence une association significative entre LA et trafic de plus de 500 véhicules/jour dans la rue du domicile (OR=2.1 [1.1-4.0]). L'association était d'autant plus marquée que le trafic était plus intense ( $< 500$  vs  $\geq 10\,000$  véhicules/jour) (OR=4.7 [1.6-13.5]). A partir des mêmes données, Pearson *et al* (Pearson *et al*, 2000) ont étendu l'exposition au trafic jusqu'à 450 mètres du domicile en pondérant le trafic par la distance à la route, et mis en évidence une association significative pour les sujets exposés à plus de 20 000 véhicules/jour (OR=8.3 [2.1-32.8]). Deux autres études ont mis en évidence une association positive mais non significative entre le risque de LA et l'exposition au trafic routier dans un rayon de 165 mètres du domicile (Reynolds *et al*, 2001) ou de 450 mètres du logement occupé le plus longtemps en pondérant par la distance (Langholz *et al*, 2002).

Dans quatre autres études, c'est la densité du trafic, c'est à dire le trafic rapporté à une surface couverte qui a été utilisé (Reynolds *et al*, 2004; Reynolds *et al*, 2002b; Von Behren *et al*, 2008). Une étude cas-témoins danoise très bien faite et incluant 986 LA (Raaschou-Nielsen *et al*, 2001) n'a mis en évidence aucune association entre le risque de LA et une exposition pendant l'enfance ou in utero à une densité de trafic élevée ( $\geq 10\,000$  versus  $< 500$  véhicules/jour). Une étude cas-témoins californienne (Reynolds *et al*, 2004) importante sur les enfants de moins de 5 ans n'a pas mis en évidence d'association avec la densité de routes ou la densité du trafic dans un rayon de 150 mètres centré sur le domicile à la naissance de l'enfant. Une autre étude des USA (Von Behren *et al*, 2008), limitée aux cas de LAL, n'a pas non plus montré d'association avec une densité de trafic dans un rayon de 150 mètres du domicile à la naissance, pendant l'enfance ou au moment du diagnostic. Une limite potentielle de l'étude est que les familles des témoins avaient un revenu moyen annuel plus élevé que les familles des cas, ce qui pouvait amener à surestimer l'exposition chez les témoins. Une autre étude californienne à design écologique (Reynolds *et al*, 2002b) a montré une augmentation faible mais significative du risque de LA avec un niveau très élevé de densité de trafic (RR=1.2 [1.0-1.4]).

La densité de véhicules de la municipalité a été prise comme indicateur dans deux études écologiques (Nordlinder & Jarvholm, 1997; Reynolds *et al*, 2002b), et une étude cas-témoins (Weng *et al*, 2009) a utilisé la densité de stations-service. L'étude écologique suédoise a mis en évidence une association significative entre le risque de LAM avant 25 ans et la densité de véhicules dans la municipalité (Nordlinder & Jarvholm, 1997) et une étude écologique californienne (Reynolds *et al*, 2004) n'a pas montré d'augmentation du risque de LA avec la densité de véhicules. Dans une étude cas-témoins de Taïwan (Weng *et al*, 2009), les décès par LA étaient liés à la densité de la zone de résidence en stations-service.

Enfin, six études ont quantifié la pollution liée au trafic par une estimation de la concentration locale de NO<sub>2</sub> ou de benzène (Crosignani *et al*, 2004; Feychting *et al*, 1998; Raaschou-Nielsen *et al*, 2001; Vinceti *et al*, 2012; Weng *et al*, 2009; Whitworth *et al*, 2008). Dans une étude cas-témoin suédoise nichée dans une cohorte incluant 39 cas, Feychting *et al* (Feychting *et al*, 1998) ont mis en évidence une augmentation non significative du risque de LA avec les concentrations estimées de NO<sub>2</sub>. Dans une étude danoise incluant 986 LA, les concentrations de NO<sub>2</sub> et de benzène de chaque enfant in utero et pendant l'enfance ont été estimées à l'aide d'un modèle de dispersion atmosphérique introduisant de nombreuses données dont le trafic, la configuration des rues et les variations météorologiques (Raaschou-Nielsen *et al*, 2001). Aucune association n'a été mise en évidence entre le risque de LA et les concentrations estimées. Cette étude comportait également une méthode de validation de l'exposition. Une étude cas-témoins du Piémont (Crosignani *et al*, 2004) a mis en évidence une relation dose-réponse significative entre le risque de LA et l'exposition à des concentrations de benzène estimées à l'aide d'un modèle prenant en compte divers données dont le taux de trafic et la distance à la route principale à 300 mètres de la résidence de l'enfant (OR= 3.9 [1.4-11.3]) pour les sujets les plus exposés). Une autre étude cas-témoin italienne (Vinceti *et al*, 2012) et ultérieure à celle de Crosignani, incluant peu de sujets, et estimant la concentration moyenne annuelle de benzène à l'adresse de l'enfant à l'aide d'un modèle intégrant des données de flux de trafic et les conditions météorologiques, trouvait une augmentation à la limite de la significativité du risque de LA chez les enfants de moins de 5 ans pour des concentrations supérieures ou égales au 75<sup>ème</sup> percentile (OR=3.3 [1.0-10.3]). Cette association devenait significative avec le risque de LAM (OR=5.5 [1.1-26.51]). Enfin, l'étude cas-témoin menée à Taiwan sur des sujets décédés (Weng *et al*, 2009) a mis en évidence une augmentation significative des LA chez les enfants exposés à des concentrations de NO<sub>2</sub> moyennes annuelles mesurées dans la municipalité de résidence supérieures à 20,9 µg/m<sup>3</sup>.

Tableau 1.10 Etudes sur l'association entre trafic routier et risque de LA

Auteur	Type d'étude	Type d'exposition	OR** ou RR***
<b>Proximité de routes à grande circulation</b>			
<b>Harrison et al. 1999</b> Royaume-Uni	Incidence 130 cas de LA 251 tumeurs solides	<b>Route principale</b> Distance du domicile	Proximité de route Distance ≥ 100 m <b>1.0</b> Réf. Distance < 100 m <b>1.6</b> [0.9-2.9]
<b>Steffen et al. 2004</b> France	Etude cas-témoins 280 cas 285 témoins	<b>Présence d'une route à fort trafic</b> <50 m (réponse questionnaire interview des mères)	<u>Proximité de route &lt; 50 m</u> Secondaire <b>1.1</b> [0.7-1.6] Principale <b>1.1</b> [0.6-2.2] Autoroute <b>1.3</b> [0.6-2.9]
<b>Visser et al. 2004</b> Amsterdam	Etude écologique	<b>Routes à fort trafic</b> <50 m définies par score d'intensité de trafic	<u>Résidence sur routes principales</u> SIR <b>1.4</b> [0.4-3.2] SIR trafic > <b>2.6</b> [0.9-6.1]
<b>Trafic routier à proximité (nombre de véhicules par jour)</b>			
<b>Savitz et al. 1989</b> USA	Etude cas-témoins 97 cas (78 LAL) 259 témoins	<b>Trafic routier</b> rue du domicile Nombre de véhicules/jour	<u>Nb véhicules/j</u> < 500 v/j <b>1.0</b> Réf. 500-4 999 v/j <b>2.1</b> [1.1-4.0] 5 000-9 999 v/j <b>2.7</b> [1.3-5.9] ≥ 10 000 v/j <b>4.7</b> [1.6-13.5]
<b>Pearson et al. 2000</b> USA	Etude cas-témoins 97 cas 259 témoins (étude de Savitz)	<b>Trafic routier</b> route avec le plus fort trafic proche domicile Nb de véhicules/j pondéré par distance domicile-route	<u>Nb véhicules/j (pondéré/distance)</u> < 500 v/j <b>1.0</b> Réf. ≥ 500 v/j <b>2.1</b> [1.1-4.1]
<b>Reynolds et al. 2001</b> USA	Etude cas-témoins 90 cas < 5 ans 349 témoins	<b>Trafic routier</b> Nombre de véhicules/jour à 165 m du domicile à la naissance	<u>Nb véhicules/j</u> < 10 000 <b>1.0</b> Réf. 10 000-19 999 <b>1.4</b> [0.6-3.1] > 20 000 <b>1.6</b> [0.7-3.3]
<b>Raaschou-Nielsen et al. 2001</b> Danemark	Etude cas-témoins 986 cas 1972 témoins	<b>Trafic routier</b> Nombre de véhicules/jour pondéré par le temps passé dans chaque domicile pendant l'enfance	<u>Nb véhicules/j (pondéré/temps)</u> < 500 <b>1.0</b> Réf. 500-< 5 000 <b>0.9</b> [0.8-1.1] 5 000-< 10 000 <b>0.8</b> [0.5-1.2] ≥ 10 000 <b>0.9</b> [0.4-1.8]
<b>Langholz et al. 2002</b> USA	Etude cas-témoins 212 cas < 10 ans 202 témoins	<b>Trafic routier</b> Nombre de véhicules/jour pondéré par distance au domicile	<u>Nb véhicules/j (pondéré/distance)</u> 1 <sup>er</sup> quintile <b>1.0</b> Réf. 2 <sup>ème</sup> quintile <b>1.6</b> [0.8-3.6] 3 <sup>ème</sup> quintile <b>1.1</b> [0.5-2.4] 4 <sup>ème</sup> quintile <b>1.1</b> [0.5-2.2] 5 <sup>ème</sup> quintile <b>1.4</b> [0.7-3.0]
<b>Densité de trafic à proximité (nombre de véhicules par jour et par km<sup>2</sup>)</b>			
<b>Reynolds et al. 2002</b> Californie	Etude écologique 2443 LA - 46 millions d'enfants années	<b>Densité de trafic</b> Unité géographique et réseau de routes	<u>Densité de trafic (percentiles)</u> < 25 <sup>ème</sup> <b>1.0</b> Réf. > 90 <sup>ème</sup> <b>1.2</b> [1.0-1.4]
<b>Reynolds et al. 2004</b> USA	Etude cas-témoins 1728 cas < 5 ans 8730 témoins	<b>Densité de trafic</b> Densité de trafic et densité de routes à 150 m du domicile à la naissance	<u>Densité de trafic (percentiles)</u> < 29 <sup>ème</sup> <b>1.0</b> Réf. 29-49 <sup>ème</sup> <b>0.9</b> [0.8-1.1] 50-74 <sup>ème</sup> <b>1.1</b> [0.9-1.2] 75-89 <sup>ème</sup> <b>0.9</b> [0.8-1.1] > 90 <sup>ème</sup> <b>0.9</b> [0.7-1.1]
<b>Von Behren et al. 2008</b> USA	Etude cas-témoins < 15 ans 310 cas de LAL 396 témoins	<b>Densité de trafic</b> rayon de 152 m centré sur adresses diagnostic et moyenne de densité vie entière	<u>Densité de trafic (percentiles)</u> < 50 <sup>ème</sup> <b>1.0</b> Réf. ≥ 75 <sup>ème</sup> <b>1.2</b> [0.8-1.8]

Auteur	Type d'étude	Type d'exposition	OR** ou RR***
<b>Autres indicateurs de trafic</b>			
<b>Nordlinder et al. 1997</b> Suède	Etude écologique 0-24 ans 277 municipalités	<b>Densité de véhicules</b> Nombre de voitures/km <sup>2</sup> dans ville d'habitation	<u>Densité de véhicules/km<sup>2</sup></u> Taux d'incidence LAM /100 000 < 5 v/km <sup>2</sup> <b>3.4</b> ≥ 20 v/km <sup>2</sup> <b>5.5 (p&lt;0.05)</b>
<b>Reynolds et al. 2002</b>	Etude écologique 0-14 ans 2443 LA 46 millions d'enfants années	<b>Densité de véhicules</b> Adresse diagnostic assignée à une unité géographique et réseau de routes pour estimation	<u>Densité de véhicules</u> < 25 <sup>ème</sup> perc. <b>1.0</b> Réf. 75-89 <sup>ème</sup> perc. <b>1.2</b> [1.0-1.4] 90 <sup>ème</sup> perc. <b>1.0</b> [0.9-1.2]
<b>Weng et al. 2009</b> Taiwan	Etude cas-témoins 0-14 ans 729 cas décédés 729 témoins décédés	<b>Densité de stations-service</b> nb de stations divisé par superficie municipalité	<u>Densité de stations-service</u> ≤ 0.149 <b>1.0</b> Réf. 0.150-0.395 <b>1.5</b> [1.1-2.0] 0.399-2.692 <b>1.9</b> [1.3-2.8]
<b>Indicateurs de pollution (NO<sub>2</sub> et benzène)</b>			
<b>Feychting et al. 1998</b> Suède	Etude cas-témoins nichée dans une cohorte 39 cas 550 témoins	<b>Concentration de NO<sub>2</sub></b> Estimations (99 <sup>ème</sup> perc. des teneurs en NO <sub>2</sub> pour des moyennes d'1 h sur 1 an + NO <sub>2</sub> de fond)	<u>NO<sub>2</sub> (µg/m<sup>3</sup>)</u> < 39 <b>1.0</b> Réf. 40-49 <b>1.7</b> [0.2-14.6] ≥ 50 <b>2.7</b> [0.3-20.6]
<b>Raaschou-Nielsen et al. 2001</b> Danemark	Etude cas-témoins 986 cas 1972 témoins	<b>Concentration de NO<sub>2</sub></b> Concentrations estimées en NO <sub>2</sub> et en benzène (modèle)	<u>NO<sub>2</sub> (ppb-i)</u> 11.5-29.3 <b>1.1</b> [0.8-1.3] 29.4-57.7 <b>1.2</b> [0.2-2.0] ≥ 57.8 <b>0.8</b> [0.3-2.2]
<b>Weng et al. 2008</b> Taiwan	Etude cas-témoins design écologique (municipalité) 308 cas décédés 308 témoins décédés	<b>Exposition au NO<sub>2</sub></b> données des stations de mesure dans municipalité de résidence	<u>NO<sub>2</sub> (ppb)</u> ≤ 20.9 <b>1.0</b> Réf. 21-25.3 <b>1.7</b> [1.1-2.6] 26.3-44.9 <b>2.3</b> [1.4-3.6]
<b>Raaschou-Nielsen et al. 2001</b> Danemark	Etude cas-témoins 986 cas 1972 témoins	<b>Concentration de benzène</b> concentrations estimées en NO <sub>2</sub> et en benzène (modèle)	<u>Benzène (ppb-i)</u> < 3.8 <b>1.0</b> Réf. 3.8-10.3 <b>0.8</b> [0.6-1.0] 10.4-26.9 <b>0.9</b> [0.6-1.5] ≥ 27.0 <b>0.4</b> [0.1-1.6]
<b>Crosignani et al. 2004</b> Italie	Etude cas-témoins 120 cas 480 témoins	<b>Concentration de benzène</b> Modélisation (nb de véhicules/j + distance au domicile + météo ...)	<u>Benzène(µg/m<sup>3</sup>)</u> < 0.1 <b>1.0</b> Réf. 0.1-10 <b>1.5</b> [0.9-2.5] > 10 <b>3.9</b> [1.4-11.3]
<b>K. W. Whitworth et al. 2008</b> USA	Etude écologique 670 Leucémies < 20 ans 510 LAL et 92 LAM	<b>Concentration de benzène</b> concentrations estimées en benzène (modèle)	<u>Benzène (µg/m<sup>3</sup>)</u> > 75 <sup>ème</sup> perc. LA <b>1.4</b> [1.1-1.8] LAL <b>1.2</b> [0.9-1.7] LAM <b>2.0</b> [1.0-4.0]
<b>Vincenti et al. 2012</b> Italie	Etude cas-témoins 83 cas 332 témoins appariés	<b>Concentration de benzène</b> Concentrations moyennes annuelles estimées (modèle de dispersion des émissions de trafic routier) Adresses résidences géocodées	<u>Benzène (µg/m<sup>3</sup>)</u> ≥ 75 <sup>ème</sup> perc. LA < 15 ans <b>1.7</b> [0.8-3.6] LA < 5 ans <b>3.3</b> [1.0-10.3] LAL < 5 ans <b>2.0</b> [0.6-6.5] LAM < 5 ans <b>5.5</b> [1.1-26.5]

Des études (Duarte-Davidson *et al*, 2001) ont montré que les concentrations de benzène en bordure de station et à proximité des pompes lors du remplissage de réservoir des voitures, pouvaient atteindre des niveaux très élevés, par rapport aux niveaux de fond, à distance des stations.

D'autres études utilisant comme indicateurs la présence à proximité du domicile d'un site pétrochimique (Lyons *et al*, 1995; Sans *et al*, 1995), d'une raffinerie (Knox, 1994; Wilkinson *et al*, 1999), ou d'une station-service à proximité (Harrison *et al*, 1999) ou mitoyenne au domicile (Brosselin *et al*, 2009; Steffen *et al*, 2004b) ont toutes mis en évidence une association positive avec le risque de LA excepté l'étude de Wilkinson, ce qui est également évocateur d'un lien entre leucémie de l'enfant et exposition au benzène (tableau 1.11).

Tableau 1.11. Etudes sur l'association entre sites pétroliers et stations-services pendant l'enfance et risque de LA

Auteur, année, lieu	Type d'étude	Type d'exposition	Résultats SIR*, OR** ou RR***
Sans <i>et al.</i> 1995 Royaume-Uni	Etude géographique décès	Site pétrochimique Distance du domicile 0-3 km	SIR exposés/ non exposés : LA tout type <b>2.7</b> [0.3-9.9] LAL <b>2.3</b> [0.1-13.0] LAM <b>5.0</b> [0.1-27.9]
Lyons <i>et al.</i> 1995 Royaume-Uni	Etude géographique	Site pétrochimique Distance du domicile	SIR exposés/ non exposés 0-1.5 km LA tout type <b>2.2</b> (ns)
Knox <i>et Gilman</i> 1994 Royaume-Uni	Etude géographique	Raffinerie de pétrole ou dépôt de pétrole Distance du domicile	Comparaison des distances LA tout type 9 km Témoins 12.7 km Test apparié t= <b>5.8</b> (2.1)
Wilkinson <i>et al.</i> 1999 Royaume-Uni	Etude géographique	Raffinerie Distance du domicile 0-2 km	Nb de cas observés/attendus LA tout type <b>1.0</b> [0.6-1.6] LAM <b>0.7</b> [0.1-2.4] LAL <b>1.1</b> [0.6-1.8]
Harrison <i>et al.</i> 1999 Royaume-Uni	130 cas de LA 251 témoins T. solides	Station-service Distance du domicile	OR LA tout type ≥ 100 m <b>1.0</b> Réf. < 100 m <b>2.0</b> [0.7-5.4]
Steffen <i>et al.</i> 2004 France	Etude cas-témoins 280 cas de LA 285 témoins	Station-service et/ou garage automobile mitoyens du domicile	OR LA tout type (oui vs non) Station/garage <b>4.0</b> [1.5-10.3]
Brosselin <i>et al.</i> 2009 France	Etude cas-témoins 765 cas de LA 1681 témoins	Station-service mitoyenne du domicile	OR LA tout type (oui vs non) Station <b>1.9</b> [1.2-3.0]

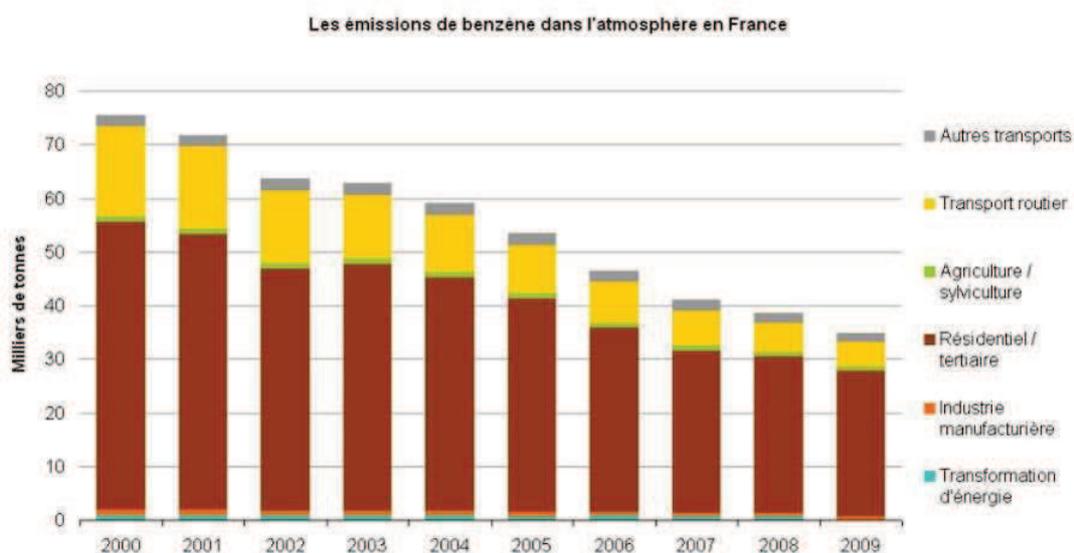
Le benzène est un hydrocarbure aromatique cyclique de la famille des composés organiques volatils. Ses émissions dans l'air extérieur proviennent :

- de l'évaporation lors du stockage et de la distribution des carburants ;
- de l'évaporation à partir des moteurs ou du réservoir ;
- de l'émission à travers les gaz d'échappement du fait de la combustion incomplète du carburant, et plus particulièrement par les véhicules à motorisation essence ;
- des émissions diffuses dans l'industrie chimique ;
- des produits de bricolage ou d'entretien.

Le trafic routier n'est pas la seule source d'exposition au benzène. Des études de monitoring du benzène ont montré qu'environ 40% de l'exposition au benzène d'un non fumeur étaient dues à l'air extérieur (Wallace, 1996).

En 2000, le secteur résidentiel/tertiaire contribuait à hauteur de 71% dans la part des émissions de benzène dans l'atmosphère en France, suivi par le transport routier (22% des émissions) (<http://www.statistiques.developpementdurable.gouv.fr/lessentiel/ar/227/1101/pollution-lair-benzene.html>). En 2004, une baisse de 27% par rapport à l'année 2000 des émissions de benzène liées au transport routier a été mesurée (figure 3).

Figure 3 : Part des émissions de benzène dans l'atmosphère selon les secteurs d'activité (données CITEPA) entre 2000 et 2009

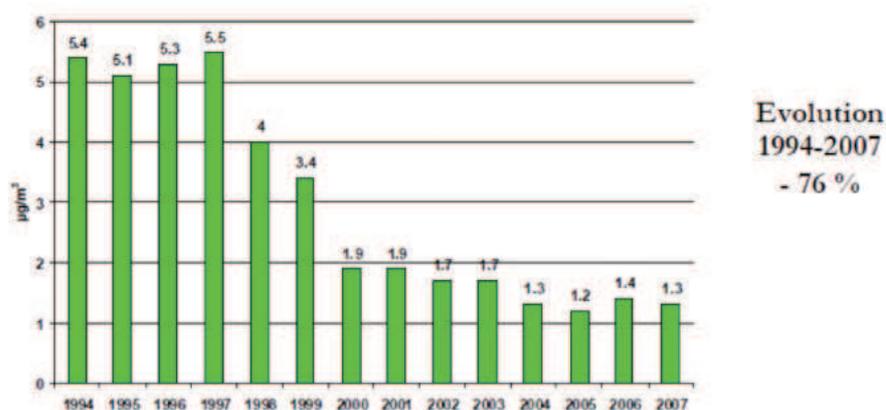


Notes : France métropolitaine.  
Source : Citepa (Coralie, format Secten, mise à jour avril 2011).

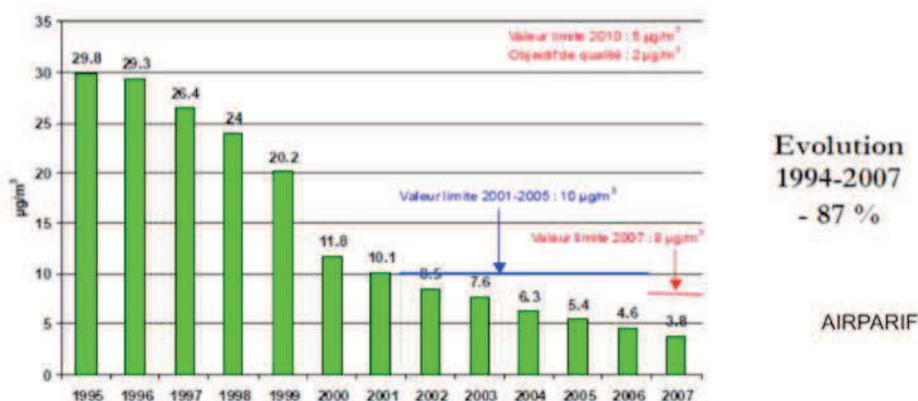
Les émissions de benzène sont davantage augmentées à faible vitesse et/ou avec un moteur froid et la distance d'impact de dispersion du benzène autour d'un axe routier a été estimée à une cinquantaine de mètres pour un axe modeste et de 100 à 150 mètres pour un axe majeur (AIRPARIF).

Suite à l'application, à partir de 2000, d'une réglementation européenne (directive 1998/70/CE) fixant à 1%, la teneur maximale de benzène contenu dans les carburants, les concentrations moyennes annuelles de benzène en milieu urbain mesurées par AIRPARIF en situation de fond ou de trafic ont considérablement diminué (figure 4).

Figure 4 : Concentrations de benzène dans l'agglomération parisienne mesurées par AIRPARIF sur la période 1994-2007



a. Evolution, à échantillon constant de quatre stations urbaines de fond, de la concentration moyenne annuelle de benzène dans l'agglomération parisienne.

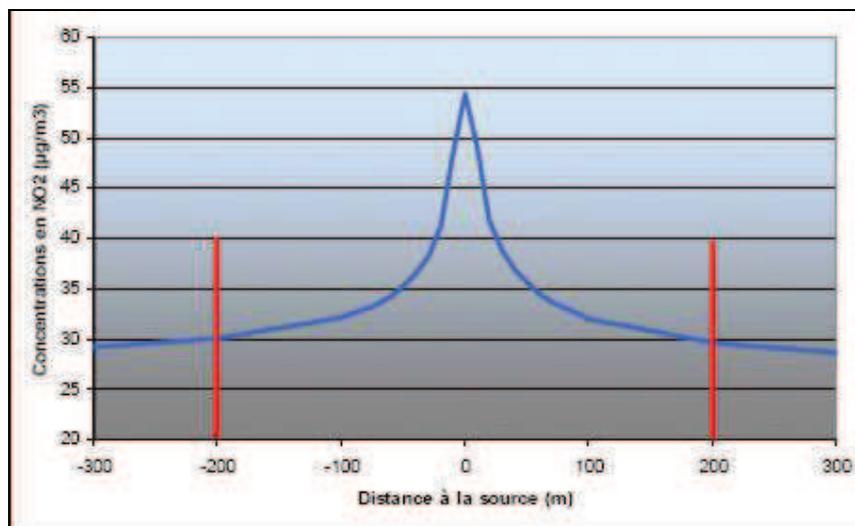


b. Evolution, de la concentration moyenne annuelle de benzène sur la station trafic de la place Victor Basch à Paris.

Il n'existait pas de données de benzène disponibles sur la France entière, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à un autre polluant indicateur des activités de transport, le NO<sub>2</sub>. Il est directement émis par les sources motorisées de transport, mais il est également produit dans l'atmosphère à partir des émissions de véhicules (monoxyde d'azote, NO) sous l'effet de leur transformation chimique en NO<sub>2</sub> ( $\text{NO} + \text{O}_3 = \text{NO}_2 + \text{O}_2$ ). Les transports sont en France, la principale source d'émission de dioxyde d'azote (AIRPARIF).

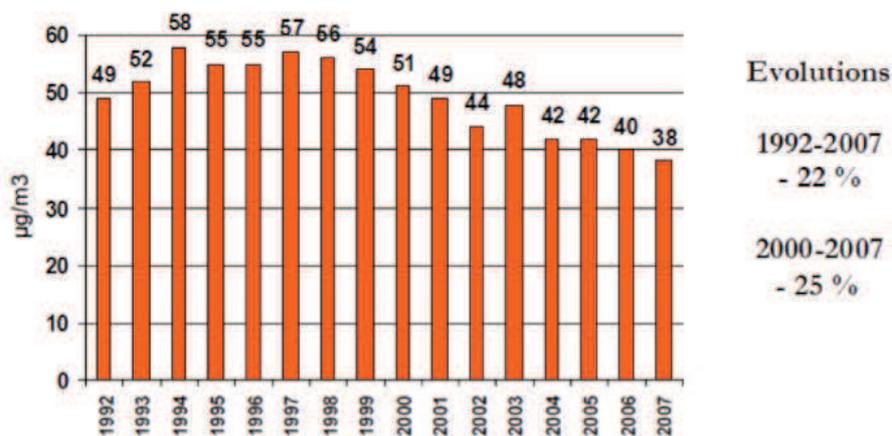
Les émissions de NO<sub>2</sub> sont favorisées lorsque les moteurs tournent à plein régime et lorsque la vitesse du trafic est élevée. La part croissante des véhicules diesel, dans la composition du parc automobile, plus émetteurs que les véhicules à essence contribue au maintien à haut niveau des concentrations du NO<sub>2</sub>. La distance d'impact direct de l'axe routier concernant les émissions de NO<sub>2</sub> est estimée à 100m en milieu urbain fermé (bâti>50%) jusqu'à 200m en milieu ouvert (bâti<50%) (Jeannée, 2006). La figure ci-dessous (figure 5) représente un exemple de dispersion du NO<sub>2</sub> de part et d'autre d'un axe routier.

Figure 5 : Exemple de dispersion des concentrations moyennes annuelles de NO<sub>2</sub> de part et d'autre d'une rocade pour l'état initial (avec prise en compte de la pollution de fond).

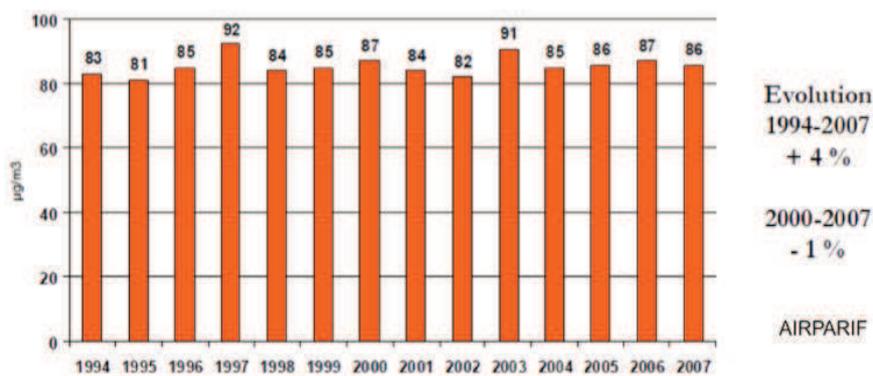


D'après les données d'AIRPARIF mesurées en région parisienne, les concentrations de NO<sub>2</sub> de fond et en situation de trafic sont restées relativement stables entre 1994 et 2004 (figure 6).

Figure 6 : Concentrations de NO<sub>2</sub> mesurées par AIRPARIF



a. Evolution, à échantillon constant de cinq stations urbaines de fond, de la concentration moyenne annuelle en dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) dans l'agglomération parisienne.



b. Evolution, à échantillon constant de cinq stations trafic, de la concentration moyenne annuelle en dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) en situation de proximité au trafic dans l'agglomération parisienne.

Une étude de Reynolds *et al* (Reynolds 2002) comparant en 1990 des mesures de trafic et des données monitorées annuelles médianes d'air ambiant a montré une corrélation significative entre NO<sub>2</sub> et densités de véhicules, de routes et de trafic, ainsi qu'une corrélation significative entre benzène et densité de trafic (tableau 1.11).

Tableau 1.11 Coefficient de corrélation de Spearman entre des mesures de trafic et des données de monitoring de l'air ambiant en Californie moyennées sur l'année 1990 (Reynolds 2002).

	nb de moniteurs	densité de véhicules	densité de routes	densité de trafic
CO (monoxyde de carbone)	93	0.5*	0.62*	0.7*
NO <sub>2</sub> (dioxyde d'azote)	81	0.27*	0.32*	0.3*
Benzène	20	0.1	0.06	0.69*
1,3 butadiène	20	0.1	-0.01	0.57*
PM10	57	0.05	0.31**	0.23

\* corrélation significative (p<0.01]

\*\*corrélation significative (p<0.05]

## 1.2 Objectif de la thèse

Les objectifs de cette thèse étaient d'étudier les facteurs de risque des leucémies aiguës de l'enfant à partir de l'étude nationale cas-témoins ESCALE. Ce travail s'est décliné selon 3 axes de recherche sur :

- l'association entre une supplémentation maternelle en acide folique avant et pendant la grossesse et le risque de LA de l'enfant et l'investigation par une approche gène-candidat du rôle de polymorphismes communs de *MTHFR* et *MTRR* supposés modifier le métabolisme des folates ;
- l'association entre la profession et des expositions professionnelles maternelles lors de la grossesse et le risque de LA de l'enfant ;
- l'association entre l'exposition des enfants au trafic routier et le risque de LA de l'enfant.



## **2. Matériel et méthodes**



Ce travail a été réalisé à partir de l'enquête cas-témoin ESCALE dont l'objectif général était de rechercher les facteurs de risque environnementaux et génétiques des hémopathies malignes, des neuroblastomes et des tumeurs cérébrales de l'enfant. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes concentrés sur les leucémies aiguës de l'enfant.

## **2.1 Echantillonnage**

### **2.1.1 Définition des cas**

Les cas éligibles étaient les cas incidents primitifs de leucémie aiguë (LA) survenus entre le 1<sup>er</sup> janvier 2003 et le 31 décembre 2004 chez les enfants de moins de 15 ans résidant en France métropolitaine au moment du diagnostic. Les enquêteurs spécialisés, du Registre National des Cancers de l'Enfant (Registre National des Hémopathies malignes de l'Enfant et Registre National des Tumeurs Solides de l'Enfant), assignés à chaque unité hospitalière d'oncologie pédiatrique étaient chargés de les identifier dans les deux mois suivant leur diagnostic. Etaient non éligibles les enfants adoptés ou en foyer, ainsi que ceux dont la mère biologique était décédée, présentait des troubles psychologiques graves ou n'était pas francophone. Pour des raisons éthiques, après concertation avec les pédiatres, les mères d'enfants décédés ou hospitalisés en soins palliatifs n'ont pas été contactées.

Au total, 937 cas de LA ont été identifiés pour la période 2003-2004 dont 95 n'étaient pas éligibles : 34 enfants étaient décédés, 7 étaient hospitalisés en soins palliatifs, 10 mères biologiques étaient décédées, 29 mères n'étaient pas francophones et 15 présentaient des troubles psychologiques graves.

L'échantillon comportait finalement 764 LA, dont 648 LAL et 116 LA non lymphoblastiques (LANL : 101 LAM et 15 autres LA indifférenciées, de type cytologique non déterminé ou biphénotypiques) et le taux de participation des cas était de 91%.

Les cas ont été confirmés, documentés et classés par types histologiques et sous-types immunologiques par le Registre National des Hémopathies malignes de l'Enfant.

### 2.1.2 Recrutement des témoins

Les témoins ont été recrutés en population générale entre 2003 et 2004 sur la base de l'annuaire téléphonique national selon une méthode d'échantillonnage par quotas. Cet échantillonnage a été réalisé par l'Institut CSA (sur marché public). Un échantillon de 30 000 foyers a été extrait au début de chacune des 2 années d'enquête de façon à représenter la population française en termes de distribution par région et par habitat rural/urbain. Une base a été constituée en incrémentant chaque numéro de téléphone par 1 de façon à inclure les numéros sur liste rouge. Cette base avait des distributions géographique et démographique similaires à celles de l'extraction initiale, du fait de la conservation des 6 premiers chiffres du numéro de téléphone qui déterminent la localisation de la ligne. Le groupe témoin a ensuite été constitué en utilisant des quotas assurant la même distribution d'âge et de sexe que l'ensemble des cas inclus dans ESCALE. Ces quotas ont été générés à partir des distributions observées dans le Registre des Hémopathies Malignes de l'Enfant (Clavel et al. 2004) et les Registres Régionaux des Cancers de l'Enfant (Desandes et al. 2004) et comportaient 16 strates soit, pour chaque sexe, les huit classes d'âge suivantes : 0-1 an, 2 ans, 3 ans, 4 ans, 5-6 ans, 7-8 ans, 9 à 11 ans et 12 à 14 ans. Des quotas supplémentaires ont été appliqués pour rendre le groupe témoin comparable à la population française de même âge sur le nombre d'enfants de moins de 15 ans vivant dans le foyer d'après le recensement de la population de 1999 [INSEE (Institut national de la statistique et des études économiques), 1999]. Le but était d'éviter un biais dans la distribution du rang de naissance, qui peut survenir si la probabilité de sélection d'un témoin parmi les abonnés téléphoniques dépend de la taille de la fratrie. Chacune des 16 strates précédentes a donc été subdivisée en trois sur le nombre d'enfants de moins de 15 ans vivant dans le foyer (1, 2, 3 ou plus). Comme les cas, les témoins devaient, pour être éligibles, résider en France métropolitaine, ne pas avoir été adoptés et avoir une mère biologique qui pouvait être interviewée (francophone, ne présentant pas de trouble psychiatrique grave et non décédée).

Sur les 50 217 numéros de téléphone composés, 22 584 ne correspondaient pas à un numéro de foyer, 24 412 étaient inéligibles, et, pour 862, l'interlocuteur a raccroché avant que l'interviewer ait pu vérifier les critères d'éligibilité du foyer. Pour les 2 360 numéros restant éligibles, il y a eu 679 refus de participer, soit un final de 1681 témoins inclus dans l'étude avec un taux de participation de 71%.

Le processus de sélection des cas et des témoins est résumé dans la figure 2.1.

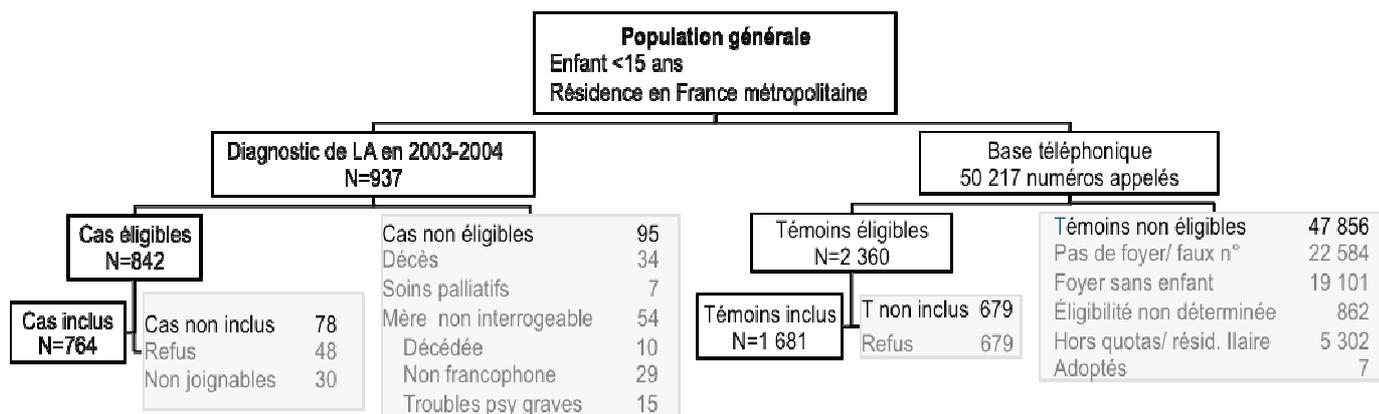


Figure 2.1 : Echantillonnage des cas et des témoins de l'enquête ESCALE.

## 2.2 Recueil des données

### 2.2.1 Interview

Les mères des cas et des témoins ont été interrogées par téléphone, de façon anonyme, par des enquêteurs expérimentés de l'Institut CSA spécialement formés à l'étude. Les interrogatoires des cas et des témoins se sont déroulés sur la même période, entre 2003 et 2005.

Chez les cas, l'interview, soumise au consentement des mères mais également à celui des médecins, s'est faite avec un délai médian de 4 mois après le diagnostic [1-24 mois]. Un délai minimum de 2 mois était demandé aux enquêteurs dans le but de laisser aux mères le temps de redevenir accessibles après le choc du diagnostic, tout en réduisant au maximum une sélection par la survie.

L'interview durait en moyenne 40 minutes. Le questionnaire, standardisé et informatisé pour l'utilisation téléphonique, était identique pour les cas et les témoins. Il comportait des questions sur les caractéristiques sociodémographiques, la structure familiale, les caractéristiques périnatales, les antécédents médicaux de l'enfant (infections, vaccinations, allergies, anomalies chromosomiques, médicaments), son histoire résidentielle, son environnement (animaux, cultures, utilisation de pesticides à la maison ou autour, en cas d'environnement agricole, activités de loisirs à la maison) et son mode de vie (mode de garde, loisirs, téléphones portables). Il portait également sur l'histoire professionnelle des parents, les expositions maternelles pendant la grossesse, les antécédents

familiaux de cancer, d'allergie et de maladie auto-immune. Le pays de naissance des grands-parents était également reporté.

Les données ayant permis la génération des variables d'intérêts ont été recueillies lors de l'interview de la façon suivante :

- *Supplémentation des mères en acide folique et vitamines*

Lors de l'interview téléphonique, les mères devaient indiquer si elles avaient pris des suppléments vitaminiques (oui/non/ne sait pas). En cas de réponse positive, il leur était demandé de préciser leur supplémentation (multivitamines, folates, vitamine C, vitamine D, autres vitamines) en période préconceptionnelle (1 mois avant la grossesse) ou pendant la grossesse (1er trimestre, 2ème trimestre, 3ème trimestre).

- *Emplois des parents, et expositions professionnelles des mères lors de la grossesse*

Le questionnaire comportait le métier de chacun des parents au moment de l'interview et lors de la grossesse. L'interview recherchait également tout emploi d'agriculteur, même supplémentaire ou non déclaré, des parents pendant la grossesse.

Une liste fermée était utilisée pour rechercher une exposition professionnelle pendant la grossesse aux produits ou agents physiques suivants : peintures ou vernis ; colles ; colorants textiles ; teintures de cheveux ; pesticides, insecticides, fongicides, herbicides ; essence carburant ; autres carburants ; produits de nettoyage à sec ; radars ; rayonnements ionisants. La fréquence de ces expositions était ensuite détaillée en 4 modalités : au moins 1 heure par jour ; au moins 1 heure par semaine ; au moins 1 heure par mois ; moins d'1 heure par mois. L'information sur le port ou non d'un dosimètre était également recueillie.

- *Histoire résidentielle et géolocalisation du dernier domicile*

Le questionnaire décrivait tous les logements habités par la mère dès le début de la grossesse, puis par l'enfant concerné jusqu'au jour du diagnostic pour les cas ou de l'interview pour les témoins. Pour chaque logement étaient précisés : les dates d'arrivée et de départ du logement (mois/année), le type de logement (appartement, maison ou ferme), et la commune de résidence (nom et code postal). L'adresse précise du dernier logement était recueillie.

Cette adresse a été géocodée sous forme de coordonnées Lambert II étendu (X,Y) par l'entreprise Géocible au moyen du logiciel de système d'information géographique MAPINFO (Mapinfo, Pitney Bowes Software Inc., Troy, NY, USA) et des cartes vectorisées NAVTEQ (Navteq, Paris, France; <http://www.navteq.com/>) et BD ADRESSE (données IGN). Les adresses non reconnues

dans les bases de données ont été localisées manuellement en utilisant les plans des communes. Toutes les adresses ont été géocodées avec un niveau de précision en 3 catégories : adresse précise trouvée (localisation avec une incertitude moyenne de 20 m), adresse à un numéro ou carrefour voisin (localisation avec une incertitude moyenne de 100 m), adresse connue au niveau de la commune sans plus de précision (localisation avec une incertitude moyenne de 1000 m) (tableau 2.2).

Tableau 2.2 Répartition des cas et des témoins selon la précision du géocodage de l'adresse de leur domicile.

	Témoins (N=1681)		Toutes LA (N=763)	
	n	%	n	%
Précision à 20 m	1320	79%	558	73%
Précision à 100 m	324	19%	184	24%
Géocodage à la commune_1000m	37	2%	21	3%

### 2.2.2 Recueil du matériel biologique

Chez les cas, le prélèvement de sang a été réalisé au cours d'une des prises de sang prévues pour les soins et l'extraction d'ADN a été faite par le Centre d'Etude des Polymorphismes humains (CEPH). Chez les témoins, des cellules buccales ont été recueillies au domicile, par les sujets eux-mêmes, au moyen de prélèvements de salive sur brossettes (MasterAmp buccal swabs), et l'extraction d'ADN a été réalisée par la société Integragen. Au total, après obtention du consentement des parents, 729 cas (95,4%) et 810 témoins (48,2%) ont été prélevés.

### 2.3 Détermination des géotypes pour les polymorphismes du métabolisme des folates

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux polymorphismes disponibles par géotypage ou par imputation ayant un impact fonctionnel connu sur l'activité des enzymes du métabolisme des folates. Les deux enzymes pour lesquelles ces polymorphismes ont pu être déterminés sont la 5,10-Méthyltétrahydrofolate réductase (*MTHFR*) et la 5-méthyltétrahydrofolate-homocystéine méthyltransférase réductase (*MTRR*). Nous avons retenu les polymorphismes rs1801131 (A1298C) et rs1801133 (C677T) pour *MTHFR* et les polymorphismes rs1801394 (A66G) et rs1532268 (C524T) pour *MTRR*.

### 2.3.1 Génotypage

- *Génotypage des cas*

Un génotypage pangénomique a été réalisé par le Centre National du Génotypage pour les 588 cas pour lesquels suffisamment d'ADN avait été obtenu, sur une puce ILLUMINA 370K Quad. Six cas de trisomie 21 et 47 cas dont les échantillons prélevés ne répondaient pas aux critères des contrôles de qualité ont été exclus. Au total, 535 cas restant ont été génotypés avec succès (74% des cas prélevés) pour 339,258 SNPs avec un call rate individuel (nombre de SNPs génotypés avec succès chez un individu rapporté au nombre de SNPs pour lesquels le génotypage a fonctionné, soit 339,258 SNPs génotypés chez au moins 1 cas) supérieur à 97%. Ce génotypage incluait les SNPs d'intérêt rs1801133 de *MTHFR* et rs1532268 de *MTRR*.

- *Génotypage des témoins*

Chez les témoins, le génotypage de 4551 SNPs a été réalisé sur une puce à façon ILLUMINA I-Select par la société Integragen. Ces SNPs sont un sous-ensemble des SNPs de la puce des cas codant pour 200 gènes candidats, enrichi des autres SNPs disponibles pour ces gènes. Pour 240 témoins, la quantité d'ADN ou sa qualité étaient insuffisantes pour le génotypage et 109 témoins génotypés n'ont pas été retenus pour l'analyse parce que le call rate individuel n'atteignait pas 95%. Au total 461 (80,9 %) témoins ont été génotypés avec un call rate supérieur ou égal à 95%. Le génotypage des témoins a fourni le génotype des 4 SNPs d'intérêt de *MTHFR* (rs1801131 et rs1801133) et *MTRR* (rs1801394 et rs1532268).

- *Comparaison des puces cas et témoins*

La comparabilité des méthodes de génotypage utilisées pour les cas et les témoins a été vérifiée en régénotypant 96 cas sur la puce des témoins. Les 2 puces étaient totalement concordantes pour tous les SNPs génotypés.

### 2.3.2 Imputation des SNPs non génotypés

Chez les cas, les SNPs rs1801131 (*MTHFR*) et rs1801394 (*MTRR*) ont été imputés par Stéphanie Goujon, statisticienne de l'équipe, à l'aide du logiciel IMPUTE Version2 (Howie et al. 2009 *PLoS Genetics*). Les imputations ont été réalisées gène par gène, séparément pour les cas et les témoins. Les différentes bases ont été restreintes aux SNPs inclus dans le gène ou situés à moins de 100 000 paires de bases de chaque extrémité. Cette restriction a permis de considérablement réduire le temps de calcul sans perte d'information puisque la zone considérée était assez large pour contenir les SNPs les plus informatifs, i.e ceux qui sont en déséquilibre de liaison avec le(s) SNP(s)

du gène à imputer. Pour chaque application, 100 itérations ont été effectuées, dont 20 pour la période *de chauffe* (ou *burn-in*) qui est définie comme le temps, en nombre d'itérations, nécessaire pour atteindre la convergence des paramètres. IMPUTE utilise l'information des SNPs localisés dans le gène d'intérêt ou de chaque côté du gène ( $\pm 100,000$  pb), en prenant pour référence les génomes d'individus CEU (résidents de l'Utah ayant des ancêtres d'Europe du Nord et de l'Ouest) des bases de données 1000 Genomes Project (Pilot 1 ; couverture incomplète mais dense du génome) et HapMap Project (Phases I + II + III # 28). Les génotypes imputés étaient pris en compte s'ils étaient inférés avec une probabilité d'au moins 0.9 et si les critères de qualité d'IMPUTE *Info* et *Certitude* étaient tous deux supérieurs à 0.8. Les analyses ont également été réalisées avec des modèles de régression logistique pondérés par la probabilité post-imputation de chaque génotype dans le but de tenir compte de l'incertitude de l'imputation.

### **2.3.3 Sélection des sujets caucasiens pour l'étude d'association**

Les analyses portant sur les génotypes et les interactions gène-environnement ont été restreintes aux sujets ayant aux moins deux grands-parents nés en Europe afin d'éviter un potentiel biais de stratification de population. En effet, chez les cas, avoir 2 grands-parents nés en Europe prédisait avec une sensibilité de 98,2% et une spécificité de 94,3% le caractère Caucasien défini par le CEPH [Centre d'Etude du polymorphisme humain : <http://www.cephb.fr/en/cephdb/>] à partir d'une analyse en composante principale de 96,609 SNPs de la puce utilisée pour l'analyse pangénomique (voir plus loin).

Au final, après génotypage, 493 cas et 441 témoins ayant aux moins deux grands-parents ont été retenus pour ces analyses (tableau 2.3).

Les 493 cas consistaient en 434 cas de LAL (365 LAL à cellules B communes, 19 LAL à cellules B matures, 40 LAL à cellules T, et 10 LAL non spécifiées (ICCC codes: I.10: 98263, 98353, 98363, 98373, 99483) ; ainsi que 59 cas de LANL [51 LAM (ICCC codes: I.b: 98403, 98613, 98663, 98673, 98713, 98723, 98733, 98743, 98913, 98953, 98963, 98973, 99103) et 8 leucémies indifférenciées ou biphénotypiques (ICCC codes: I.e.: 98053, 99303)].

Tableau 2.3 Sélection des sujets inclus dans l'étude des polymorphismes de *MTHFR* et *MTRR*

<b>Cas</b>		<b>Témoins</b>	
Total	<b>764</b>		<b>1681</b>
ADN et géotypage		ADN et géotypage	
Prélèvement de sang	729	Prélèvement de salive	810
Géotypage possible (Illumina 370K)	535	Géotypage possible (Illumina i-select)	570
Contrôles de qualité satisfaits (call rate >97%)	477	Contrôles de qualité satisfaits (call rate ≥95%)	461
Sélections supplémentaires		Sélections supplémentaires	
Exclusion des trisomies 21	471	Exclusion des trisomies 21	461
Restriction aux caucasiens (≥ 2 grands-parents nés en Europe)	<b>493</b>	Restriction aux caucasiens (≥ 2 grands-parents nés en Europe)	<b>441</b>
Géotypages et imputations		Géotypages et imputations	
MTHFR C677T (rs1801133)	Géotypé	MTHFR C677T (rs1801133)	Géotypé
MTHFR A1298C (rs1801131)	Imputé	MTHFR A1298C (rs1801131)	Géotypé
MTRR A66G (rs1801394)	Imputé	MTRR A66G (rs1801394)	Géotypé
MTRR C524T (rs1532268)	Géotypé	MTRR C524T (rs1532268)	Géotypé

## 2.4 Codage et génération de variables

### 2.4.1 Variables sociodémographiques

La variable de stratification âge\*sexe en 16 classes est celle qui a été utilisée pour les quotas de recrutement. Elle combine chacun des sexes garçon ou fille avec les huit strates d'âge [0-2 ans [, [2-3 ans[, [3-4 ans[, [4-5 ans[, [5-7 ans[, [7-9 ans[, [9-12 ans[ et [12-15 ans[.

La variable du nombre d'enfants âgés de moins de quinze ans vivant dans le foyer a été obtenue directement à partir de la question correspondante du questionnaire. Elle est codée en 3 catégories (1, 2, 3 ou plus).

La *catégorie socioprofessionnelle du foyer* (CSP) correspondait à la catégorie la plus qualifiée des CSP des deux parents. La variable a été construite à partir de l'emploi des parents au moment du diagnostic pour les cas et de l'interview pour les parents, codée selon la classification internationale type des professions du Bureau International du Travail (CITP-BIT 1968). Elle a été découpée en quatre catégories basées sur le premier chiffre de la classification du BIT, sauf pour la catégorie 5 du BIT, scindée en 2 parties en utilisant le 2ème chiffre du code BIT: (1) directeurs, professions intellectuelles et intermédiaires (codes 0, 1 et 2); (2) métiers administratifs et commerciaux (codes 3, 4 et 5.0-5.2); (3) métiers de service (codes 5.3-5.5); (4) ouvriers d'usine et agricoles (codes 6 à 9). Les parents sans emploi (1%) ont été rattachés à cette dernière catégorie.

La variable *niveau d'études* comptait quatre catégories : (1) absence de diplôme ; (2) diplôme moins qualifié que le baccalauréat (ex. CAP, BEP); (3) baccalauréat ; (4) diplôme supérieur au baccalauréat, enseignement supérieur.

La variable *type de logement* était définie en quatre catégories : appartement, maison, exploitation agricole, autres (caravanes...).

La variable *nombre de déménagements* depuis la date de conception prenait les valeurs 0 (aucun déménagement), 1 (un seul déménagement) ou 2 (au moins 2 déménagements).

L'*habitat* rural ou urbain a été défini à partir des tranches d'urbanisation du recensement INSEE de l'année 1999 (TU99), regroupées en (1) commune rurale (TU99 0 ou 1 : tranche urbaine < 5000 habitants), (2) commune intermédiaire (TU99 2 à 5 : tranche urbaine 5 000-100 000 habitants), et (3) urbaine (TU99 6 à 8 : tranche urbaine > 100 000 habitants).

#### **2.4.2 Supplémentation maternelle en acide folique et en vitamines**

La variable « *supplémentation maternelle en acide folique* » correspondait à une cure maternelle en suppléments contenant de l'acide folique en phases préconceptionnelle et/ou gestationnelle, soit sous forme d'acide folique seul ou de multivitamines contenant de l'acide folique à une dose minimale de 0,4 mg/j. Cette variable dichotomique a ensuite été déclinée suivant le moment de début de prise de la supplémentation (1) période préconceptionnelle ou 1<sup>er</sup> trimestre ;(2) à partir du 2<sup>nd</sup> trimestre ;(3) à partir du 3<sup>ème</sup> trimestre.

La variable « *supplémentation vitaminique* » référait quant à elle, à une supplémentation vitaminique contenant potentiellement de l'acide folique et sans spécification de la dose.

#### **2.4.3 Polymorphismes de *MTHFR* et *MTRR***

Les SNPs de *MTHFR* et *MTRR* ont été analysés individuellement en codage dominant (1 ou 2 allèles variants vs aucun) et récessif (2 allèles variants vs 0 ou 1).

Les génotypes de ces SNPs ont également été regroupés dans des variables combinées, sur la base de la distribution des témoins et de l'homogénéité des ORs d'association avec le risque de LA. Pour *MTHFR*, lesSNPsrs1801131 et rs1801133 ont été regroupés de la façon suivante (1) CC et AA, soit aucun allèle variant ; (2) CT ou AC, ni TT ni CC, soit au moins allèle variant mais aucun homozygote; (3) TT ou CC, soit au moins allèle variant homozygote. Pour *MTRR*, les SNPs rs1801394 et rs1532268 ont été combinés de la façon suivante : (1) CC et AA, soit aucun allèle variant ; (2) CC et AG/GG, soit un allèle variant de rs1801394 mais rs1532268 non variant;

(3) CT/TT et AA, soit un allèle variant de rs1532268 mais rs1801394 non variant; (3) CT/TT et AG/GG, soit au moins un allèle variant pour les 2 SNPs.

Enfin, les 4 polymorphismes de *MTHFR* et *MTRR* ont également été combinés en une seule variable, le « *statut MTHFR/MTRR* », avec les 4 modalités suivantes : (1) *MTHFR* non variant (CC et AA) quel que soit le statut des SNP de *MTRR* ; (2) au moins un variant de *MTHFR*, et aucun homozygote (CT ou AC, ni TT ni CC) quel que soit le statut des SNP de *MTRR* ; (3) au moins un SNP de *MTHFR* homozygote variant (TT ou CC) et moins de 2 SNPs variants de *MTRR*; (4) au moins un SNP de *MTHFR* homozygote variant (TT ou CC) et au moins deux SNPs variants pour *MTRR*.

#### **2.4.4 Profession et expositions professionnelles des mères lors de la grossesse**

*Les emplois pendant la grossesse* ont été codés à l'aveugle du statut cas-témoins par une personne expérimentée. Le codage utilisé était la Classification Internationale Type des Professions (édition de 1968) du Bureau International du Travail (BIT, 1968). Le code BIT est un code constitué de 5 chiffres, permettant une classification hiérarchique des emplois. Seuls les 3 premiers chiffres ont été utilisés dans cette enquête.

Des variables dichotomiques ont été générées pour chaque métier à partir du premier ou des 2 premiers chiffres des codes BIT. Les enfants dont les mères n'exerçaient pas de profession lors de leur grossesse ont été classés dans la catégorie de référence.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux emplois les plus fréquents parmi les catégories BIT à 2 digits: personnel enseignant (code BIT 1-3) ; coiffeuses, spécialistes des soins de beauté et travailleurs assimilés (code BIT 5-7) ; secrétaires (codes BIT 3-1 à 3-4) ; infirmières (codes BIT 0-71 et 0-72).

*Les expositions professionnelles pendant la grossesse* aux peintures ou vernis et/ou colles, teintures de cheveux, pesticides, rayonnements ionisants de la liste *a priori* proposée lors de l'interview étaient codées selon leur fréquence déclarée : (1) aucune exposition, (2) exposition de plus d'1 heure/jour, (3) : exposition de plus d'1 heure/semaine, (4) : exposition de plus d'1 heure/mois et (5) : exposition de moins d'1 heure/mois.

Ces classes ont été regroupées en une variable en 3 catégories prenant la valeur 0 (classe (1), soit aucune exposition), 1 (classes (4) et (5), soit exposition moins fréquente qu'1 heure par semaine) ou 2 (classes (2) et (3), soit exposition d'1 heure/semaine ou plus fréquente).

## 2.4.5 Indicateurs d'exposition au trafic routier

Les coordonnées des logements des sujets obtenues à partir de l'adresse du dernier logement occupé ont permis de déterminer leur proximité aux principaux axes du réseau routier à partir d'une carte vectorielle établie par Navteq. Navteq classe les axes routiers en fonction de grandes catégories de trafic. La fonction de classe 1 regroupe les autoroutes et roades ; la fonction de classe 2, les routes nationales ; la fonction de classe 3, les routes départementales. A partir de ces données, la société Géocible a estimé la longueur des routes des différentes classes dans des cercles de rayon 100, 200, 300, 400 et 500 mètres centrés sur le lieu de résidence.

- *Indicateur de distance*

La « *présence de routes à grande circulation dans un rayon de 500 mètres* » comporte quatre catégories en fonction des classes de route Navteq :

La catégorie "*Exposition forte* " comprenait les sujets dont la résidence était située à moins de 500 mètres d'une route de classe 1 et d'une route de classe 2.

La catégorie "*Exposition moyenne*" comprenait les sujets dont la résidence était située à moins de 500 mètres d'une route de classe 1 et à plus de 500 mètres d'une route de classe 2.

La catégorie "*Exposition faible*" concernait les sujets dont la résidence était située à plus de 500 mètres d'une route de classe 1 et à moins de 500 mètres d'une route de classe 2, et ceux dont la résidence était située à plus de 500 mètres de routes de classes 1 et 2 mais à moins de 500 mètres d'une route de classe 3.

La catégorie "*Non exposés*" regroupait les sujets dont la résidence était localisée à plus de 500 mètres de routes de classes 1, 2 et 3.

- *Indicateur de densité de trafic*

La variable « densité de routes à fort trafic » a été construite à partir de la distribution, chez les témoins, de la longueur des routes de classe 1 et 2 présentes dans un cercle de rayon 500 mètres centré par le domicile. Cette variable comportait quatre catégories :

La catégorie "*Densité forte*" comprenait les sujets ayant plus de 750 mètres de routes de classe 1 (25<sup>ème</sup> percentile) et plus de 750 mètres de routes de classe 2 (25<sup>ème</sup> percentile) à moins de 500 mètres de leur résidence.

La catégorie "*Densité moyenne*" comprenait les sujets ayant plus de 750 mètres de routes de classe 1 mais moins de 750 mètres de routes de classe 2 à moins de 500 mètres de leur résidence.

La catégorie "*Densité faible*" comprenait les sujets ayant moins de 750 mètres de routes de classe 1 à moins de 500 mètres de leur résidence.

La catégorie "*Non exposés*" incluait les sujets n'ayant aucune route de classe 1 et de classe 2 dans un rayon de 500 mètres autour de leur résidence.

- *Indicateur de pollution liée au trafic*

Une troisième variable « **Concentration de NO<sub>2</sub>** » estimait la pollution atmosphérique de fond liée au trafic. Les concentrations de NO<sub>2</sub> en 2000 ont été fournies par l'ADEME. Une carte couvrant la France entière par mailles de 4 km a été réalisée par Géovariations (Deraisme et Jeannée ; 2003) à partir des données de stations de mesure du réseau ATMO (Fédération des Associations de Surveillance de la Qualité de l'Air) et l'occupation des sols (base Corine Land Cover) à l'aide d'une méthode d'interpolation géostatistique (co-krigeage avec régression linéaire multiple). Nous avons affecté à chaque sujet la moyenne pondérée des concentrations de NO<sub>2</sub> lié au trafic des centres de maille rencontrés dans un cercle d'un rayon de 3 km centré sur son lieu de résidence.

La distribution chez les témoins des concentrations de NO<sub>2</sub> lié au trafic a été utilisée pour déterminer trois catégories d'exposition au NO<sub>2</sub> :

La catégorie "*Concentrations élevées*" incluait les sujets exposés à des concentrations supérieures ou égales à 16,2 µg/m<sup>3</sup> (75<sup>ème</sup> percentile).

La catégorie "*Concentrations moyennes*" comprenait les sujets exposés à des concentrations de NO<sub>2</sub> comprises entre 12,2 µg/m<sup>3</sup> (50<sup>ème</sup> percentile) et 16,1 µg/m<sup>3</sup>.

La catégorie "*Non exposés*" regroupait les sujets ayant des concentrations de NO<sub>2</sub> inférieures à 12,2 µg/m<sup>3</sup>.

- *Indicateur combiné de trafic et de pollution*

Une dernière variable, « **Exposition combinée** », combinait les deux indicateurs de trafic et la concentration de NO<sub>2</sub> liée au trafic. Elle comporte trois catégories.

La catégorie "*Exposition forte*" regroupait les sujets classés conjointement dans les catégories "Exposition forte", "Densités forte", et "Concentrations élevées ou moyennes" de NO<sub>2</sub>.

La catégorie "*Non exposés*" comprenait les sujets classés non exposés pour les trois variables.

La catégorie "*Exposition intermédiaire*" regroupait les sujets classés dans aucune des catégories précédentes.

#### **2.4.6 Facteurs de confusion**

Les variables liées aux leucémies, soit négativement (rang de naissance élevé, infections banales fréquentes), soit positivement (utilisation maternelle de pesticides, tabagisme paternel pré-conceptionnel, voisinage immédiat d'une station-service) lors des analyses précédentes ont été considérées comme des facteurs de confusion potentiels.

La variable *rang de naissance* était découpée en quatre catégories : rangs de naissance 1, 2, 3 et 4 et plus. Les autres variables ont été codées de façon dichotomique : *utilisation domestique de pesticides* par la mère pendant la grossesse (oui vs non), *consommation paternelle préconceptionnelle de tabac* (oui vs non), *infections banales précoces répétées* (> 3 infections virales avant l'âge de un an vs  $\leq 3$ ), *exposition aux stations-service* (au moins un logement mitoyen d'une station-service vs aucun logement mitoyen d'une station service).

## **2.5 Méthodes statistiques**

### **2.5.1 Comparaison des cas et des témoins**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS Version 9.2 (*SAS Institute*, Cary, USA). Les odds ratios (OR) et leurs intervalles de confiance (IC95%) ont été estimés par régression logistique non conditionnelle. Les analyses ont été ajustées systématiquement sur la variable de stratification combinée âge-sexe et sur la CSP. Pour l'analyse des emplois et des expositions professionnelles maternelles, l'ajustement sur la CSP n'était pas toujours possible, la CSP étant trop intriquée avec les catégories de métier. Les tests statistiques utilisés étaient bilatéraux, le seuil de signification statistique étant fixé à 5%.

Les analyses par sous-types LAM et LAL ont été réalisées à l'aide de modèle de régression polytomique non conditionnelle avec ajustement systématique sur la variable de stratification combinée âge-sexe et la CSP. Les analyses ont également été stratifiées par tranches d'âge de 5 ans.

### **2.5.2 Vérification de la qualité de l'échantillonnage**

Nous avons vérifié la comparabilité des cas et des témoins pour la variable de stratification combinée âge-sexe et les variables sociodémographiques sur l'ensemble de l'échantillon et sur le sous-échantillon des individus génotypés.

Nous avons recherché systématiquement, pour chaque polymorphisme candidat, une déviation de la distribution des génotypes observée chez les témoins à la distribution attendue sous l'hypothèse de l'équilibre de Hardy-Weinberg (test du  $\chi^2$ ).

### **2.5.3 Ajustements complémentaires, recherches d'interactions**

Les liens entre les facteurs de risque étudiés et les caractéristiques sociodémographiques ou les caractéristiques périnatales ont été étudiés chez les témoins, après ajustement sur la variable de stratification âge-sexe.

La stabilité des résultats a été testée après des ajustements additionnels et/ou des analyses stratifiées sur les facteurs liés aux leucémies dans la littérature ou dans l'étude ESCALE (rang de naissance, poids de naissance, allaitement, infections banales précoces, utilisation maternelle domestique de pesticides pendant la grossesse, tabac paternel préconceptionnel, et exposition à une station-service) ou sur des variables liées aux variables d'intérêts chez les témoins. Les variables n'étaient pas retenues dans les modèles si elles ne changeaient pas la première décimale des odds ratios. Les analyses ont également été réalisées en excluant les enfants atteints de trisomie 21, facteur de risque établi des leucémies aiguës.

Nous avons recherché d'éventuelles interactions entre la supplémentation maternelle en acide folique et les polymorphismes de *MTHFR* et *MTRR*, en testant l'écart à un modèle multiplicatif, par comparaison des modèles logistiques sans et avec le terme d'interaction, le seuil de signification statistique étant fixé à 5%. Les analyses des génotypes ont aussi été stratifiées sur la prise d'acide folique et inversement, la prise d'acide folique a été stratifiée sur les génotypes. Ces analyses ont été systématiquement ajustées sur la variable de stratification âge-sexe et la CSP.

### **2.5.4 Analyses de sensibilité**

Afin de tester la robustesse des résultats, les analyses principales ont été répétées :

Répétition des analyses principales en classant les sujets déclarant les plus faibles fréquences d'exposition soit parmi les sujets exposés, soit parmi les sujets non exposés, soit comme des données manquantes.

En restreignant les analyses à certaines catégories de sujets, par exemple aux porteurs de dosimètres pour les expositions déclarées aux rayonnements ionisants, ou aux sujets n'ayant jamais déménagé, pour l'exposition au trafic routier.

En traitant les données manquantes pour la variable d'intérêt, selon le scénario le plus défavorable. En cas d'association positive entre les LA et la variable d'intérêt, nous avons attribué une exposition positive aux témoins avec des données manquantes et une exposition négative aux cas avec des données manquantes ; en cas d'association négative nous avons attribué une exposition négative aux témoins avec des données manquantes et une exposition positive aux cas avec des données manquantes.

En répétant les analyses génotypiques en pondérant les modèles de régression logistique par les probabilités d'imputation a posteriori de chaque génotype afin de tenir compte des incertitudes de l'imputation.

### **2.5.5 Test de tendance linéaire**

Pour tester la tendance linéaire des associations avec les variables d'exposition quantitatives, nous avons généré une variable continue prenant la valeur médiane de chaque classe des variables catégorielles pour chacun des sujets de cette classe. L'écart à la linéarité a ensuite été éprouvé par le test du maximum de vraisemblance comparant le modèle comportant cette variable quantitative au modèle comportant la variable catégorielle. En cas de non rejet de l'hypothèse de linéarité, la tendance linéaire était testée par l'écart à 0 de la pente associée à la variable quantitative.

## 2.6 Aspects réglementaires

Le protocole de l'enquête ESCALE a été approuvé pour sa conformité aux règles éthiques (n° DGS 2003/0259) et informatique et liberté (CNIL). Les participants de l'étude ont donné leur consentement oral, après avoir été informés des modalités de l'étude.

## 2.7 Puissance de l'étude

Pour une puissance  $1-\beta=80\%$  en situation bilatérale et un risque de première espèce  $\alpha=5\%$ , la taille de l'étude permettait de détecter des Odds Ratios (OR) positifs minimums allant de 1.3 à 2.7 pour les LAL, de 1.8 à 5.7 pour les LANL, pour des fréquences d'exposition chez les témoins variant de 30% à 1% (tableau 2.3). Les odds ratios négatifs minimums détectables se situaient entre 0.7 et 0.1 pour les LAL, et entre 0.5 et moins de 0.01 pour les LANL toujours pour des fréquences d'exposition chez les témoins variant de 30% à 1%.

Tableau 2.3 Odds ratios (OR) minimums détectables pour  $\alpha=5\%$  et  $1-\beta=80\%$ , en situation bilatérale.

Fréquence d'exposition chez les témoins	Exemple d'exposition <sup>3</sup>	OR minimum positif		OR minimum négatif	
		LAL <sup>1</sup>	LANL <sup>2</sup>	LAL	LANL
30%	Supplémentation maternelle en acide folique pendant la grossesse	1.3	1.8	0.7	0.5
20%	MTRR 66 AA (homozygote pour l'allèle variant) Exposition élevée au NO <sub>2</sub> Exposition élevée au trafic routier	1.4	1.9	0.7	0.5
10%	MTHFR 677TT (homozygote pour l'allèle variant) MTHFR 1298 AA (homozygote pour l'allèle variant) MTRR 524 CC (homozygote pour l'allèle variant)	1.5	2.2	0.6	0.3
5%	Exposition maternelle professionnelle aux solvants pendant la grossesse	1.7	2.7	0.5	0.2
3%	Exposition maternelle professionnelle aux pesticides pendant la grossesse	1.9	3.3	0.4	0.1
1%	Exposition maternelle professionnelle aux rayonnements ionisants pendant la grossesse	2.7	5.7	0.1	<0.01

<sup>1</sup> LAL : leucémies aiguës lymphoblastiques ; <sup>2</sup>LANL : leucémies aiguës non lymphoblastiques

<sup>3</sup> Les fréquences choisies pour ces expositions correspondent à l'ordre de grandeur de ce qui a été observé dans la littérature au sein de groupes témoins

### **3. Résultats**



### 3.1 Comparabilité des cas et des témoins

Le tableau 3.1 présente la distribution des cas et des témoins selon la variable de stratification combinée âge x sexe. La répartition des cas était conforme à la répartition attendue, avec une large majorité de LAL (85%), une prédominance masculine (414 garçons pour 350 filles, sex ratio de 1,2) et une forte représentation des cas de moins de 5 ans (54%).

La distribution des témoins par âge et sexe était comparable à celle de l'ensemble des cas inclus dans ESCALE (leucémies, lymphomes, tumeurs cérébrales et neuroblastomes), avec une moins forte surreprésentation des classes d'âges de 2 à 6 ans correspondant au pic d'incidence des LAL ce qui explique qu'elle diffère nettement significativement de celle des LA (moyenne d'âge de  $5,2 \pm 3,7$  ans pour les cas et de  $5,5 \pm 4,3$  ans pour les témoins). Néanmoins, chaque strate d'âge comportait au moins un témoin par cas, avec plus de témoins par cas dans les strates les plus jeunes.

Le niveau paternel d'éducation et la catégorie socioprofessionnelle du foyer étaient plus élevés chez les témoins que chez les cas. En revanche, les cas et les témoins ne différaient pas significativement selon les caractéristiques de leur lieu d'habitation au moment de l'interview, ni en termes de type de logement, ni en termes de statut urbain/rural. Cependant, la proportion des enfants ayant déménagé au moins une fois était significativement plus élevée chez les cas (65%) que chez les témoins (54%). Dans l'ensemble, la précision des coordonnées était inférieure ou égale à 100 m dans une proportion similaire pour les cas (97%) et les témoins (98%), mais elle était moins souvent inférieure ou égale à 20 m pour les cas (73%) que pour les témoins (79%) (tableau 3.2).

Tableau 3.1 Distribution des cas et des témoins selon la variable de stratification âge x sexe.

		Témoins (N=1681)		Toutes LA (N=764)		LAL (N=646)		LANL (N=118)		Témoins par cas
		N	%	N	%	N	%	N	%	
<b>Garçons</b>	< 2 ans	201	12	53	7	34	5	19	16	<b>3,8</b>
	2 ans	79	5	54	7	49	8	5	4	<b>1,5</b>
	3 ans	87	5	59	8	56	9	3	3	<b>1,5</b>
	4 ans	89	5	48	6	42	7	6	5	<b>1,9</b>
	5-6 ans	126	8	60	8	51	8	9	8	<b>2,1</b>
	7-8 ans	96	6	35	5	29	5	6	5	<b>2,7</b>
	9-11 ans	137	8	59	8	49	8	10	8	<b>2,3</b>
	12-14 ans	117	7	47	6	37	6	10	8	<b>2,5</b>
<b>Filles</b>	< 2 ans	168	10	59	8	41	6	18	15	<b>2,8</b>
	2 ans	74	4	49	6	46	7	3	3	<b>1,5</b>
	3 ans	79	5	50	7	47	7	3	3	<b>1,6</b>
	4 ans	56	3	38	5	35	5	3	3	<b>1,5</b>
	5-6 ans	102	6	60	8	55	9	5	4	<b>1,7</b>
	7-8 ans	67	4	40	5	33	5	7	6	<b>1,7</b>
	9-11 ans	88	5	34	4	26	4	8	7	<b>2,6</b>
	12-14 ans	115	7	19	2	16	2	3	3	<b>6,1</b>

Tableau 3.2 Comparaison des cas de leucémie aiguë (LA) et des témoins selon leurs caractéristiques sociodémographiques au moment du diagnostic (cas) ou de l'interview (témoins).

	Témoins (N=1681)		LA (N=764)		OR <sup>1</sup>	[IC 95%]
		%	n	%		
<b>Niveau d'étude maternel</b>						
BAC+2 et diplôme de l'enseignement supérieur	701	42%	299	39%	1.0	Réf.
BAC	320	19%	138	18%	1.0	[0.8-1.3]
CAP, BEP	500	30%	247	32%	1.2	[0.9-1.4]
Aucun diplôme	159	9%	80	10%	1.2	[0.9-1.6]
<b>Niveau d'étude paternel</b>						
BAC+2 et diplôme de l'enseignement supérieur	601	36%	230	30%	1.0	Réf.
BAC	236	14%	114	15%	1.3	[1.0-1.7]
CAP, BEP	662	40%	313	41%	1.2	[1.0-1.5]
Aucun diplôme	165	10%	99	13%	1.6	[1.2-2.2]
<b>Catégorie socioprofessionnelle du foyer</b>						
Directeurs, professions intellectuelles et intermédiaires	715	43%	279	37%	1.0	Réf.
Métiers administratifs et commerciaux	477	28%	224	29%	1.2	[1.0-1.5]
Métiers de services	215	13%	96	13%	1.2	[0.9-1.5]
Ouvriers d'usine et agricoles, sans emploi	274	16%	165	22%	1.5	[1.2-1.9]
<b>Type de logement lors de l'interview</b>						
Appartement	48	29%	248	32%	1.0	Réf.
Maison	1173	70%	506	66%	0.9	[0.7-1.0]
Exploitation agricole	23	1%	10	1%	0.8	[0.4-1.7]
<b>Zone de résidence lors de l'interview</b>						
Rurale	601	36%	250	33%	1.0	Réf.
Intermédiaire	391	23%	183	24%	1.1	[0.9-1.4]
Urbaine	689	41%	329	43%	1.1	[0.9-1.4]
<b>Nombre de déménagements depuis la conception</b>						
Aucun	766	46%	264	35%	1.0	Réf.
1	613	36%	292	38%	1.4	[[1.1-1.7]
≥ 2	302	18%	207	27%	2.4	[1.9-3.1]
<b>Précision des coordonnées résidentielles</b>						
≤ 15m	1 320	79%	558	73%	1.0	Réf.
16-100m	324	19%	184	24%	1.3	[1.1-1.6]
> 100m	37	2%	21	3%	1.3	[0.7-4.3]

<sup>1</sup> OR estimé par régression logistique ajustée sur les variables de stratification âge-sexe

## **3.2 Supplémentation maternelle en acide folique, polymorphismes du métabolisme des folates, et leucémie de l'enfant**

### **3.2.1 Supplémentation maternelle périconceptionnelle en acide folique**

Dans notre échantillon, 16% des mères des témoins et 11% des mères des cas ont déclaré avoir pris une supplémentation en acide folique ou en multivitamines en phase préconceptionnelle ou pendant la grossesse (tableau 3.3). La supplémentation en acide folique n'était rapportée que pour 10,2% des témoins et 4,2% des cas, mais elle était plus fréquente pour les grossesses plus récentes (16,5% des mères des témoins âgés de moins de 2 ans).

Le risque de LA de l'enfant était significativement négativement associé avec une supplémentation en acide folique (OR=0.4 [0.3-0.6]), même lorsque la supplémentation avait débuté au delà du premier trimestre de grossesse. Les relations étaient similaires pour les LAL et LANL (tableau 3.3) et pour les principaux sous-types de LAL (tableau 3.4).

Les témoins dont les mères avaient reçu une supplémentation périconceptionnelle en acide folique avaient été allaités plus souvent que les autres témoins (64.5% vs. 49.9%) et présentaient plus souvent une anomalie congénitale (4.7% vs. 2.9%). En revanche, les rangs de naissance et les poids de naissance n'étaient pas liés à la supplémentation (tableau 3.5). Les mères des témoins ayant reçu une supplémentation périconceptionnelle en acide folique avaient un niveau d'éducation plus élevé, appartenaient à une catégorie socioprofessionnelle plus élevée et tendaient à résider plus souvent en zone urbaine que les autres témoins (cf. annexes tableau 2).

Les résultats des analyses n'étaient pas modifiés après ajustement sur l'allaitement et les facteurs liés aux LA dans l'étude ESCALE : anomalies congénitales avec une variable catégorielle selon les sous-types d'anomalie et une autre variable selon la sévérité de l'anomalie congénitale (mineure ou majeure), et le rang de naissance. L'exclusion des cas de trisomie 21 et/ ou d'anomalies congénitales ne changeaient pas les associations.

Les analyses stratifiées sur la catégorie socioprofessionnelle ne montraient pas d'hétérogénéité de l'association entre LA et supplémentation maternelle en acide folique (OR=0.6 [0.4-1.0] pour les Directeurs et professions intellectuelles et intermédiaires ; OR=0.1 [0.04-0.5] pour les Métiers administratifs et commerciaux ; OR=0.3 [0.1-0.7] pour les Métiers de service, ouvriers d'usine et agricoles, sans emploi).

Tableau 3.3 Supplémentation périconceptionnelle et risque de leucémie aiguë de l'enfant pour toutes les LA et par type cytologique.

	Témoins (n=1681)		Toutes LA <sup>1</sup> (n=764)		LAL <sup>1</sup> (n=648)		LANL <sup>1</sup> (n=116)		
		%		%	OR	[IC 95%] <sup>2</sup>	OR	[IC 95%] <sup>3</sup>	
<b>Supplémentation en acide folique ou multivitamines</b>									
non	1350	80,3	643	84,2	<b>1.0</b>	Réf.	548	<b>1.0</b>	Réf.
oui	276	16,4	83	10,9	<b>0.6</b>	[0.5-0.8]	72	<b>0.7</b>	[0.5-0.9]
données manquantes	55	3,3	38	5,0			28		10
<b>Supplémentation en acide folique</b>									
non	1439	85,6	689	90,2	<b>1.0</b>	Réf.	586	<b>1.0</b>	Réf.
oui	172	10,2	32	4,2	<b>0.4</b>	[0.3-0.6]	28	<b>0.4</b>	[0.3-0.6]
données manquantes	70	4,2	43	5,6			34		9
<b>Début de la prise d'acide folique</b>									
préconception/1 <sup>er</sup> trimestre	70	4,2	10	1,3	<b>0.3</b>	[0.2-0.6]	9	<b>0.3</b>	[0.2-0.7]
à partir du 2 <sup>nd</sup> trimestre	56	3,3	15	2,0	<b>0.6</b>	[0.3-1.0]	13	<b>0.6</b>	[0.3-1.1]
à partir du 3 <sup>ème</sup> trimestre	37	2,2	4	0,5	<b>0.3</b>	[0.1-0.7]	3	<b>0.2</b>	[0.1-0.8]
données manquantes	79	4,7	46	6,0			37		9

<sup>1</sup>LA : leucémie aiguë, LAL: leucémie aiguë lymphoblastique, LANL : leucémie aiguë non lymphoblastique

<sup>2</sup> OR et IC95% estimés par régression logistique inconditionnelle et ajustés sur la variable de stratification âge-sexe et la CSP

<sup>3</sup> OR et IC95% estimés par régression polytomique inconditionnelle et ajustés sur la variable de stratification âge-sexe et la CSP

Tableau 3.4 Lien entre le risque de LAL de l'enfant et la supplémentation maternelle périconceptionnelle en acide folique pour les sous-types immunologiques et cytogénétiques et par statut TEL-AML1 ou MLL.

	Supplémentation des cas (oui/non)	OR <sup>1</sup>	[IC 95%]
Toutes LAL <sup>2</sup>	(28/586)	<b>0.4</b>	[0.3-0.6]
<b>Immunophénotype</b>			
LAL communes/pré-B	(24/461)	<b>0.4</b>	[0.3-0.7]
LAL de Burkitt	(1/29)	<b>0.3</b>	[0.0-2.5]
LAL à cellule T	(2/63)	<b>0.4</b>	[0.1-1.5]
<b>Cytogénétique classique</b>			
Caryotype normal	(12/161)	<b>0.6</b>	[0.3-1.2]
Pseudodiploïdie	(6/171)	<b>0.3</b>	[0.1-0.7]
Hyperdyploïdie modérée	(1/73)	<b>0.1</b>	[0.0-0.9]
Hyperdyploïdie massive	(9/157)	<b>0.5</b>	[0.2-1.0]
<b>Biologie moléculaire</b>			
TEL-AML1	(6/110)	<b>0.5</b>	[0.2-1.1]
MLL	(0/22)	—	

<sup>1</sup> OR estimé par régression logistique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

<sup>2</sup>LAL: leucémie aiguë lymphoblastique

Tableau 3.5 Lien entre les caractéristiques périnatales des enfants et la supplémentation périconceptionnelle en acide folique chez les témoins

	Supplémentation des témoins (oui/non)	OR [IC 95%] <sup>1</sup>
<b>Anomalies congénitales</b> (oui vs. non)	(8/41)	<b>2.2</b> [1.0-5.0]
<b>Allaitement</b> (oui vs. non)	(111/714)	<b>1.5</b> [1.1-2.1]
<b>Rang de naissance</b> ( $\geq 3$ vs. 1)	(314/36)	<b>0.9</b> [0.6-1.3]
<b>Poids de naissance</b> < 2500 g vs. 2500-4000 g	(8/83)	<b>0.8</b> [0.4-1.8]
<b>Poids de naissance</b> > 4000 g vs. 2500-4000 g	(17/110)	<b>1.4</b> [0.8-2.5]

<sup>1</sup> OR estimé par régression logistique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

L'association entre supplémentation maternelle en acide folique et LA était similaire chez les enfants nés avant 1996 (OR= 0.4 [0.2–1.0]), de 1996 à 2000 (OR=0.3 [0.2–0.6]) et de 2001 à 2005 (OR=0.5 [0.3–0.9]).

Les résultats n'étaient pas modifiés lorsque les analyses excluaient les cas de trisomie 21 et les anomalies congénitales. Les analyses de sensibilité montraient que l'association restait significative lorsqu'on affectait toutes les données manquantes des témoins à la catégorie non supplémentée et qu'on imposait arbitrairement aux données manquantes des cas une fréquence de supplémentation 5 fois supérieure à la fréquence de la supplémentation chez les témoins (OR= 0.7 [0.5–0.9], toutes LA confondues).

Les résultats étaient du même ordre de grandeur lorsque l'on restreignait les analyses aux 703 cas et 1 532 témoins considérés comme d'origine caucasienne, c'est à dire ayant au moins 2 grands-parents nés en Europe (tableau 3.6). Enfin, lorsque l'on restreignait les analyses aux 493 cas et 441 témoins inclus pour l'analyse des polymorphismes de *MTHFR* et *MTRR*, c'est à dire aux enfants considérés comme d'origine caucasienne et génotypés avec un call rate >95%, les associations étaient du même ordre de grandeur que celle de l'échantillon complet.

Tableau 3.6 Lien entre le risque de LA de l'enfant et la supplémentation maternelle périconceptionnelle en acide folique selon la sélection de l'échantillon.

	Toutes LA		LAL		LANL	
	OR	[IC 95%] <sup>1</sup>	OR	[IC 95%] <sup>2</sup>	OR	[IC 95%] <sup>2</sup>
<b>Supplémentation en acide folique</b>						
Echantillon complet, avec ou sans prélèvement	<b>0.4</b>	[0.3-0.6]	<b>0.4</b>	[0.3-0.6]	<b>0.3</b>	[0.1-0.9]
Origine européenne	<b>0.4</b>	[0.3-0.6]	<b>0.4</b>	[0.3-0.6]	<b>0.3</b>	[0.1-0.8]
Echantillon d'analyse des polymorphismes	<b>0.3</b>	[0.2-0.6]	<b>0.4</b>	[0.3-0.6]	<b>0.2</b>	[0.2-1.0]

<sup>1</sup>LA: leucémie aigue, LAL: leucémie aigue lymphoblastique, LANL: leucémie aigue non lymphoblastique

<sup>2</sup> OR et IC95% estimés par régression logistique inconditionnelle et ajustés sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

<sup>3</sup> OR et IC95% estimés par régression polytomique inconditionnelle et ajustés sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

### 3.2.2 Relation entre les génotypes de *MTHFR* et *MTRR* et le risque de leucémie aigue

Les analyses concernant les génotypes de rs1801131 (C677T) et rs1801133 (A1298C) de *MTHFR* et rs1801394 (A66G) et rs1532268 (C524T) de *MTRR* ont été restreintes aux 493 cas et 441 témoins d'origine caucasienne génotypés avec un call-rate >95%. Pour l'enzyme *MTHFR*, 14 témoins pour le SNP rs1801133 et 31 cas pour le SNP rs1801131 n'ont pas pu être génotypés. Tandis que pour *MTRR*, seuls 28 cas n'avaient pas de données pour le SNP rs1801394.

Dans l'échantillon témoin, nous n'avons pas mis en évidence de déviation à l'équilibre d'Hardy-Weinberg pour chacun des 4 SNPs candidats dans *MTHFR* et *MTRR*.

- *Lien entre les SNPs rs1801131 et rs1801133 de MTHFR et le risque de LA (tableau 3.7)*

L'allèle variant C de rs180131 n'était pas lié au risque de LA et l'allèle variant T de rs1801133 n'était associé aux LA (ou aux LAL) ni en codage dominant ni en codage co-dominant. Cependant, une association à la limite de la significativité était observée entre l'homozygotie pour l'allèle T de rs1801133 et les LANL (OR=2.2 [1.0-4.8]).

La variable combinant les SNPs de *MTHFR* et *MTRR* n'était pas associée au risque de LA ou d'un sous-type de LA. Aucun porteur de 2 allèles variants de l'un des SNPs de *MTHFR* n'était porteur d'un allèle variant de l'autre de ces SNPs.

- *Lien entre les SNPs de MTRR rs1801394 et rs1532268 et le risque de LA (tableau 3.8)*

Aucun des polymorphismes génétiques A66G et C524T de *MTRR* n'était associé au risque de LA. La variable combinant les 2 polymorphismes de *MTRR* n'était pas non plus associée au risque de LA ou de sous-types de LA

- *Lien conjoint entre les SNPs de MTHFR et MTRR et le risque de LA (tableau 3.9)*

Etre conjointement homozygote pour l'un des allèles variants de *MTHFR* et porteur de 2 allèles variants de *MTRR* était positivement associé au risque de LAL et de LANL.

Tableau 3.7 Polymorphismes de *MTHFR* et risque de leucémie aiguë de l'enfant.

	Témoins LA			LAL			LANL		
	(n=441)	(n=493)	OR IC95% <sup>1</sup>	(n=434)	OR IC95% <sup>2</sup>	(n=59)	OR IC95% <sup>2</sup>		
<b>rs1801133 (C677T)</b>									
CC	178	191	1.0 Réf.	172	1.0 Réf.	19	1.0 Réf.		
CT	193	234	1.1 [0.8-1.4]	208	1.0 [0.8-1.4]	26	1.2 [0.6-2.2]		
TT	56	68	1.1 [0.7-1.8]	54	1.0 [0.6-1.6]	14	2.1 [1.0-4.8]		
CT/TT	249	302	1.1 [0.8-1.4]	262	1.1 [0.8-1.4]	40	1.4 [0.8-2.4]		
<b>rs1801131 (A1298C)</b>									
AA	208	212	1.0 Réf.	181	1.0 Réf.	30	1.0 Réf.		
AC	188	200	0.9 [0.7-1.3]	179	1.0 [0.7-1.3]	21	0.7 [0.4-1.4]		
CC	45	50	1.0 [0.6-1.7]	45	1.1 [0.7-1.8]	5	0.8 [0.3-2.1]		
AC/CC	233	250	0.9 [0.7-1.3]	224	1.0 [0.7-1.4]	26	0.7 [0.4-1.3]		
<b>rs1801133 et rs1801331</b>									
CC et AA	48	39	1.0 Réf.	34	1.0 Réf.	5	1.0 Réf.		
CT ou AC, ni TT ni CC	278	306	1.2 [0.7-2.0]	273	1.3 [0.8-2.2]	33	0.9 [0.3-2.6]		
TT ou CC	101	117	1.4 [0.8-2.3]	99	1.3 [0.8-2.4]	19	1.5 [0.5-4.5]		

<sup>1</sup>OR estimé par régression logistique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

<sup>2</sup>OR estimé par régression polytomique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

Tableau 3.8 Polymorphismes de *MTRR* et risque de leucémie aiguë de l'enfant.

	Témoins (n=441)	LA (n=493)	OR IC95% <sup>1</sup>	LAL (n=434)	OR IC95% <sup>2</sup>	LANL (n=59)	OR IC95% <sup>2</sup>
<b>rs1801394 (A66G)</b>							
AA	95	122	1.0 Réf.	112	1.0 Réf.	10	1.0 Réf.
AG	226	211	0.7 [0.5-1.0]	187	0.7 [0.5-1.0]	24	1.0 [0.5-2.2]
GG	120	132	0.9 [0.6-1.3]	109	0.8 [0.5-1.2]	22	1.8 [0.8-4.1]
AG/GG	346	343	0.8 [0.6-1.1]	297	0.7 [0.5-1.0]	46	1.3 [0.6-2.7]
<b>rs1532268 (C524T)</b>							
CC	181	180	1.0 Réf.	155	1.0 Réf.	25	1.0 Réf.
CT	192	236	1.3 [0.9-1.7]	209	1.3 [0.9-1.8]	28	1.1 [0.6-2.0]
TT	68	77	1.0 [0.7-1.6]	70	1.1 [0.7-1.7]	7	0.7 [0.3-1.8]
CT/TT	260	313	1.2 [0.9-1.6]	279	1.2 [0.9-1.6]	34	1.0 [0.6-1.8]
<b>rs1532268 et rs1801394</b>							
CC et AA	44	52	1.0 Réf.	45	1.0 Réf.	7	1.0 Réf.
CC et AG/GG	137	117	0.8 [0.5-1.3]	99	0.8 [0.4-1.3]	18	0.9 [0.4-2.5]
CT/TT et AA	51	70	1.2 [0.7-2.2]	67	1.4 [0.7-2.5]	3	0.5 [0.1-2.0]
CT/TT et AG/GG	209	226	0.9 [0.6-1.5]	198	0.9 [0.6-1.6]	28	0.9 [0.4-2.4]

<sup>1</sup>OR estimé par régression logistique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

<sup>2</sup>OR estimé par régression polytomique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

Tableau 3.9 Association conjointe entre les polymorphismes de *MTHFR* et *MTRR* et le risque de LA

		Témoins (n=441)	LA (n=493)	OR IC95% <sup>1</sup>	LAL (n=434)	OR IC95% <sup>2</sup>	LANL (n=59)	OR IC95% <sup>2</sup>
<b><i>MTHFR</i><sup>3</sup></b>	<b><i>MTRR</i><sup>4</sup></b>							
CC et AA		48	39	1.0 Réf.	34	1.0 Réf.	5	1.0 Réf.
CT ou AC, ni TT ni CC		278	306	1.2 [0.8-2.0]	273	1.3 [0.8-2.1]	33	1.0 [0.3-2.6]
	0 ou 1 variant	58	53	1.1 [0.6-2.0]	41	1.0 [0.5-1.8]	12	1.6 [0.5-5.1]
TT ou CC	> 1 variant	43	57	1.6 [0.9-3.1]	50	1.7 [0.9-3.2]	7	1.5 [0.4-5.1]

<sup>1</sup>OR estimé par régression logistique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

<sup>2</sup>OR estimé par régression polytomique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP



### **3.3 Professions et expositions professionnelles des mères lors de la grossesse et risque de LA de l'enfant**

#### **3.3.1 Professions maternelles**

Le métier exercé par les mères pendant la grossesse index appartenait moins souvent aux grands groupes BIT 0/1 (professions scientifiques, techniques, libérales et assimilées) et 6 (agriculteurs, éleveurs, forestiers, pêcheurs et chasseurs) chez les cas que chez les témoins (Tableau 3.11). Les métiers des autres groupes BIT n'étaient pas associés au risque de LA, mais un OR élevé (OR=1.9 [0.9-4.1]) était observé avec les métiers du groupe BIT 5-7 des coiffeuses, spécialistes des soins de beauté et travailleurs assimilés.

Le lien inverse observé avec l'emploi en BIT0/1 pendant la grossesse était dû à l'influence du groupe BIT 1-3, correspondant aux métiers d'enseignants (OR= 0.6 [0.4–0.9]). En effet, 97,5% des mères des témoins et 96,0% des mères des cas exerçant un métier du groupe BIT 0/1 pendant la grossesse appartenaient, au moment du diagnostic, à la catégorie socioprofessionnelle la plus élevée des directeurs, professions intellectuelles et intermédiaires. Toutefois, au sein de cette catégorie socioprofessionnelle, seulement 48,6% des mères des témoins et 42,6% des mères des cas avaient exercé, au moment de leur grossesse, une profession classée dans le groupe BIT 0/1.

L'analyse ne faisait pas apparaître de spécificité par type de LA ou par tranche d'âge.

#### **3.3.2 Expositions professionnelles déclarées par les mères**

Les analyses suivantes concernent les expositions liées à l'emploi pendant la grossesse, déclarées par les mères lors de l'interview.

##### *3.3.2.1 Exposition aux teintures de cheveux (tableau 3.12)*

L'utilisation professionnelle maternelle de teintures de cheveux lors de la grossesse était significativement liée aux LA (LAL : OR=2.9 [1.6–5.3]; LANL : OR=4.9 [1.9–12.6]). Cette association n'était pas spécifique d'une tranche d'âge. Elle n'était pas plus marquée pour le groupe BIT 5-7 des coiffeurs, spécialistes des soins de beauté et travailleurs assimilés.

L'exposition n'était pas exclusivement rapportée dans le cadre des professions du groupe BIT 5-7 et ne semblait donc pas spécifique de ce groupe. Cependant, les mères déclarant une exposition d'au moins une heure par semaine faisaient toutes partie du groupe BIT 5-7 (coiffeurs, spécialistes des soins de beauté et travailleurs assimilés). Réciproquement, aucune des mères employées dans le

groupe 5-7 n'avait déclaré une fréquence d'exposition inférieure. L'analyse n'a donc pas pu dissocier la fréquence d'au moins 1 heure par semaine et le métier de coiffeuse.

Tableau 3.11 Professions des mères lors de la grossesse et risque de LA de l'enfant (Classification CITP 68).

BIT emploi mère pendant grossesse <sup>3</sup>	Témoins	LA	OR <sup>1</sup>	[IC 95%]	LAL	OR <sup>2</sup>	[IC 95%]	LANL	OR <sup>2</sup>	[IC 95%]
	N=1681	N=764			N=648			N=116		
0/1 Personnel des professions scientifiques, techniques, libérales et assimilées	354	123	<b>0.7</b>	[0.6-0.9]	107	<b>0.7</b>	[0.6-0.9]	16	<b>0.6</b>	[0.4-1.0]
0-71/0-72 Infirmières	47	23	<b>1.1</b>	[0.7-1.9]	19	<b>1.1</b>	[0.6-1.9]	4	<b>1.4</b>	[0.5-3.9]
0-6105/6120/6190 Médecins ou 0-6710 pharmaciens	18	6	<b>0.7</b>	[0.3-1.7]	6	<b>0.8</b>	[0.3-2.1]	0	–	
1-3 Personnel enseignant	121	32	<b>0.6</b>	[0.4-0.9]	28	<b>0.6</b>	[0.4-1.0]	4	<b>0.4</b>	[0.2-1.2]
2 Directeurs et cadres administratifs supérieurs	54	25	<b>1.1</b>	[0.7-1.8]	20	<b>1.1</b>	[0.6-1.8]	5	<b>1.2</b>	[0.5-3.2]
3 Personnel administratif et travailleurs assimilés	357	159	<b>1.0</b>	[0.8-1.2]	142	<b>1.1</b>	[0.9-1.4]	17	<b>0.6</b>	[0.4-1.1]
3-1 à 3-4 Secrétaires	130	63	<b>1.1</b>	[0.8-1.6]	56	<b>1.2</b>	[0.9-1.7]	7	<b>0.8</b>	[0.4-1.7]
4 Personnel commercial et vendeurs	119	60	<b>1.1</b>	[0.8-1.6]	47	<b>1.0</b>	[0.7-1.5]	13	<b>1.7</b>	[0.9-3.1]
5 Travailleurs spécialisés dans les services	180	100	<b>1.3</b>	[1.0-1.7]	84	<b>1.3</b>	[1.0-1.7]	16	<b>1.3</b>	[0.8-2.3]
5-7 Coiffeuses, spécialistes des soins de beauté et travailleurs assimilés	16	14	<b>1.9</b>	[0.9-4.1]	12	<b>1.9</b>	[0.9-4.2]	2	<b>1.8</b>	[0.4-8.5]
6 Agriculteurs, éleveurs, forestiers, pêcheurs et chasseurs	17	3	<b>0.4</b>	[0.1-1.2]	3	<b>0.4</b>	[0.1-1.4]	0	–	
7/8/9 Ouvriers, manœuvres non agricoles et conducteurs d'engins de transport	64	29	<b>1.0</b>	[0.6-1.6]	21	<b>0.9</b>	[0.5-1.4]	8	<b>1.8</b>	[0.8-3.8]

<sup>1</sup> OR estimé par régression logistique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe

<sup>2</sup>OR estimé par régression polytomique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe

<sup>3</sup>La catégorie de référence inclut tous les groupes BIT autres que le groupe BIT analysé

Tableau 3.12 Exposition professionnelle des mères à des teintures de cheveux lors de la grossesse et risque de LA.

	Témoins	LA <sup>2</sup>	OR <sup>1</sup>	[IC 95%]
<b>Enfants 0-14 ans</b>				
Pas d'exposition	1658	734	1.0	Réf.
Toute fréquence d'exposition	23	30	3.0	[1.7-5.2]
< 1 heure/semaine (non BIT 5.7) <sup>3</sup>	11	19	3.9	[1.8-8.4]
≥ 1 heure/semaine (BIT 5.7) <sup>3</sup>	12	11	2.1	[0.9-4.9]
<b>Enfants 0-4 ans</b>				
Pas d'exposition	817	394	1.0	Réf.
Toute fréquence d'exposition	16	17	2.3	[1.1-4.6]
< 1 heure/semaine (non BIT 5.7) <sup>3</sup>	7	14	4.7	[1.8-11.9]
≥ 1 heure/semaine (BIT 5.7) <sup>3</sup>	9	3	0.6	[0.2-2.3]

<sup>1</sup> OR estimé par régression logistique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP en 4 catégories:(1) directeurs, professions intellectuelles et intermédiaires (codes 0, 1 et 2); (2) métiers administratifs et commerciaux (codes 3, 4 et 5.0-5.2); (3) métiers de service (codes 5.3-5.5) ; (4) ouvriers d'usine et agricoles (codes 6 à 9) et parents sans emploi

<sup>2</sup> LA : leucémies aiguës

<sup>3</sup>La fréquence d'exposition n'est pas dissociable du BIT (voir texte)

### 3.3.2.2 Exposition à des peintures ou vernis et/ou colles

L'exposition professionnelle à des peintures ou vernis ou colles était déclarée par 5,4% des mères des témoins et 7,5% des mères des cas(tableau 3.15). L'exposition conjointe aux peintures ou vernis et aux colles était rapportée pour 2% des témoins et 2,2% des cas. Les mères qui se déclaraient exposées avaient exercé des emplois variés (cf. annexes tableau 1). Les métiers les plus fréquents parmi les emplois exposés étaient les métiers de l'éducation (9% des exposées chez les cas et 19% chez les témoins) et de la production manufacturière (17% des exposées chez les cas et 11% chez les témoins).

L'exposition professionnelle maternelle à des peintures ou vernis ou à des colles pendant la grossesse, toutes fréquences confondues, était associée positivement aux LA (OR=1.5 [1.1–2.2]), et aux sous-types de LA (tableau 3.15). Pour les LAL, les associations étaient plus nettes pour les fréquences d'exposition les moins élevées (moins d'1h/semaine). En revanche, les LANL étaient plus fortement associées à des fréquences d'exposition de plus d'1h/semaine (OR=2.5 [1.2-5.2]). La même tendance était observée chez les enfants de moins de 5 ans.

Tableau 3.15 Exposition professionnelle des mères à des peintures ou vernis et/ou colle pendant la grossesse et risque de LA.

	Témoins	LA	OR <sup>1</sup>	[IC 95%]	LAL	OR <sup>2</sup>	[IC 95%]	LANL	OR <sup>2</sup>	[IC 95%]
<b>Enfants 0-14 ans</b>										
Peintures ou vernis	68	41	<b>1.4</b>	[1.0-2.2]	31	<b>1.3</b>	[0.8-2.0]	10	<b>2.3</b>	[1.1-4.5]
Colle	57	33	<b>1.4</b>	[0.9-2.2]	27	<b>1.4</b>	[0.9-2.3]	6	<b>1.4</b>	[0.6-3.4]
Peintures ou vernis et/ou colle :										
Pas d'exposition	1590	707	<b>1.0</b>	Réf.	604	<b>1.0</b>	Réf.	103	<b>1.0</b>	Réf.
Toute fréquence d'exposition	91	57	<b>1.5</b>	[1.1-2.2]	44	<b>1.4</b>	[1.0-2.1]	13	<b>2.1</b>	[1.1-3.9]
< 1 heure/semaine	37	25	<b>1.7</b>	[1.0-2.8]	22	<b>1.7</b>	[1.0-3.0]	3	<b>1.4</b>	[0.4-4.5]
≥ 1 heure/semaine	54	32	<b>1.4</b>	[0.9-2.3]	22	<b>1.2</b>	[0.7-2.0]	10	<b>2.5</b>	[1.2-5.2]
<b>Enfants 0-4 ans</b>										
Pas d'exposition	786	379	<b>1.0</b>	Réf.	324	<b>1.0</b>	Réf.	55	<b>1.0</b>	Réf.
Toute fréquence d'exposition	47	32	<b>1.6</b>	[1.0-2.6]	27	<b>1.6</b>	[1.0-2.7]	5	<b>1.3</b>	[0.5-3.4]
< 1 heure/semaine	19	16	<b>2.0</b>	[1.0-4.1]	12	<b>2.6</b>	[1.3-5.3]	0	–	
≥ 1 heure/semaine	28	16	<b>1.3</b>	[0.7-2.4]	15	<b>1.1</b>	[0.5-2.2]	5	<b>2.0</b>	[0.7-5.5]

<sup>1</sup>OR estimé par régression logistique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

<sup>2</sup>OR estimé par régression polytomique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

### 3.3.2.3 Exposition aux pesticides

Globalement, une exposition professionnelle aux pesticides lors de la grossesse n'était rapportée que par 2.9% des mères des cas et 2.6% des mères des témoins (tableau 3.17). L'exposition n'était pas associée au risque de LA. Une association positive et significative était par contre retrouvée chez les enfants de moins de 5 ans pour les LAL (OR=2.5 [1.1–5.5]). Cette association n'était observée que pour des expositions déclarées de moins d'1h/semaine (OR=5.0 [1.4-17.4] pour les LAL).

L'utilisation maternelle domestique de pesticides, en revanche, était associée au risque de LA. Elle était rapportée par 55% des mères des cas et 38% des mères des témoins, et l'association était observée que les mères soient ou non exposées professionnellement aux pesticides (tableau 3.18). Inversement, l'exposition professionnelle aux pesticides, un petit peu plus fréquente chez les mères qui utilisaient des pesticides à domicile (4.5% des mères des cas et 4.0% des mères des témoins), n'était pas liée aux LA après stratification sur l'utilisation domestique de pesticides. Chez les enfants de moins de 5 ans, les effectifs étaient faibles, mais l'association observée avec l'exposition

professionnelle aux pesticides semblait limitée aux enfants dont les mères avaient également utilisé des pesticides à domicile (tableau 3.19).

Tableau 3.17 Exposition professionnelle des mères à des pesticides pendant la grossesse et risque de LA.

	Témoins	LA	OR <sup>1</sup>	[IC 95%]	LAL	OR <sup>2</sup>	[IC 95%]	LANL	OR <sup>2</sup>	[IC 95%]
<b>Enfants 0-14 ans</b>										
Pas d'exposition	1639	743	1.0	Réf.	630	1.0	Réf.	113	1.0	Réf.
Toute fréquence d'exposition	42	21	1.1	[0.6-1.9]	18	1.1	[0.6-2.0]	3	1.0	[0.3-3.3]
< 1 heure/semaine	22	13	1.3	[0.7-2.6]	11	1.3	[0.6-2.7]	2	1.3	[0.3-5.7]
≥ 1 heure/semaine	20	8	0.9	[0.4-2.1]	7	1.0	[0.4-2.3]	1	0.7	[0.1-5.0]
<b>Enfants 0-4 ans</b>										
Pas d'exposition	820	397	1.0	Réf.	338	1.0	Réf.	59	1.0	Réf.
Toute fréquence d'exposition	13	14	2.2	[1.0-4.7]	13	2.5	[1.1-5.5]	1	1.0	[0.1-7.6]
< 1 heure/semaine	4	9	4.7	[1.4-15.9]	8	5.0	[1.4-17.4]	1	3.8	[0.4-35.9]
≥ 1 heure/semaine	9	5	1.1	[0.4-3.3]	5	1.4	[0.4-4.2]	0	—	

<sup>1</sup> OR estimé par régression logistique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

<sup>2</sup> OR estimé par régression polytomique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

Tableau 3.18 Analyses stratifiées de l'exposition des mères à des pesticides au domicile pendant la grossesse et du risque de LA sur l'exposition professionnelle à des pesticides.

	Exposition professionnelle							
	non				oui			
	Témoins	LA	OR <sup>1</sup>	[IC 95%]	Témoins	LA	OR <sup>1</sup>	[IC 95%]
<b>Utilisation domestique</b>								
non	998	324	1.0	Réf.	17	3	1.0	Réf.
oui	595	383	2.0	[1.7-2.4]	25	18	7.6	[1.0-58]

<sup>1</sup> OR estimé par régression logistique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

Tableau 3.19 Analyses stratifiées de l'exposition professionnelle des mères à des pesticide et du risque de LA sur l'exposition domestique à des pesticides.

Exposition professionnelle	Utilisation domestique							
	Témoins	non			oui			
		LA	OR <sup>1</sup>	[IC 95%]	Témoins	LA	OR <sup>1</sup>	[IC 95%]
<b>Tous</b>								
non	998	324	1.0	Réf.	595	383	1.0	Réf.
oui	17	3	0.6	[0.2-1.9]	25	18	1.2	[0.6-2.2]
<b>Enfants 0-4 ans</b>								
non	545	176	1.0	Réf.	255	204	1.0	Réf.
oui	6	2	1.2	[0.2-6.4]	7	12	2.1	[0.8-5.6]

<sup>1</sup> OR estimé par régression logistique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

#### 3.3.2.4 Exposition aux rayonnements ionisants

L'exposition professionnelle maternelle déclarée à des rayonnements ionisants lors de la grossesse était fortement associée aux LA (tableau 3.13), toutes LA confondues (OR=2.4 [1.3–4.6]) et par sous-type LAL (OR=2.1 [1.1–4.3]) et LANL (OR=3.6 [1.3–9.9]). Ces associations étaient limitées aux faibles fréquences d'exposition.

Le port d'un dosimètre était déclaré par moins de la moitié des femmes ayant rapporté une exposition à des rayonnements ionisants lors de leur grossesse. La proportion de femmes exposées avec port de dosimètre était moins importante chez les cas (26%) que chez les témoins (43%). Les femmes qui se déclaraient exposées avaient majoritairement exercé un métier du secteur de la santé (tableau 3.14). L'association entre les LA et l'exposition aux rayonnements ionisants n'était observée qu'en l'absence de port de dosimètre. Les associations étaient similaires chez les enfants de moins de 5 ans et chez les enfants plus âgés.

Tableau 3.13 Exposition professionnelle des mères aux rayonnements ionisants lors de la grossesse et risque de LA.

	Témoins	LA	OR <sup>1</sup>	[IC 95%]	LAL	OR <sup>2</sup>	[IC 95%]	LANL	OR <sup>2</sup>	[IC 95%]
<b>Enfants 0-14 ans</b>										
Pas d'exposition	1660	745	<b>1.0</b>	Réf.	634	<b>1.0</b>	Réf.	111	<b>1.0</b>	Réf.
Toute fréquence d'exposition	21	19	<b>2.4</b>	[1.3-4.6]	14	<b>2.1</b>	[1.1-4.3]	5	<b>3.6</b>	[1.3-9.9]
< 1 heure/semaine	9	13	<b>4.3</b>	[1.8-10.4]	9	<b>3.6</b>	[1.4-9.3]	4	<b>7.2</b>	[2.1-24.7]
≥ 1 heure/semaine	12	6	<b>1.2</b>	[0.4-3.2]	5	<b>1.2</b>	[0.4-3.4]	1	<b>1.2</b>	[0.2-9.1]
Pas de port de dosimètre	12	14	<b>3.2</b>	[1.4-7.0]	9	<b>2.4</b>	[1.0-5.9]	5	<b>6.1</b>	[2.1-18.2]
< 1 heure/semaine	7	10	<b>4.2</b>	[1.6-11.3]						
≥ 1 heure/semaine	5	4	<b>1.9</b>	[0.5-7.0]						
Port de dosimètre	9	5	<b>1.4</b>	[0.5-4.4]	5	<b>1.7</b>	[0.6-5.4]	0	–	
< 1 heure/semaine	2	3	<b>4.7</b>	[0.7-30.5]						
≥ 1 heure/semaine	7	2	<b>0.7</b>	[0.1-3.3]						
<b>Enfants 0-4 ans</b>										
Pas d'exposition	823	400	<b>1.0</b>	Réf.	344	<b>1.0</b>	Réf.	56	<b>1.0</b>	Réf.
Toute fréquence d'exposition	10	11	<b>3.1</b>	[1.3-7.5]	7	<b>2.4</b>	[0.9-6.7]	4	<b>5.1</b>	[1.5-17.4]
< 1 heure/semaine	5	7	<b>4.0</b>	[1.2-13.0]	4	<b>2.8</b>	[0.7-11.0]	3	<b>7.7</b>	[1.7-34.4]
≥ 1 heure/semaine	5	4	<b>2.1</b>	[0.6-8.3]	3	<b>2.0</b>	[0.5-9.0]	1	<b>2.6</b>	[0.3-23.2]
Pas de port de dosimètre	6	8	<b>3.7</b>	[1.2-10.9]						
Port de dosimètre	4	3	<b>2.1</b>	[0.5-9.9]						

<sup>1</sup>OR estimé par régression logistique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

<sup>2</sup>OR estimé par régression polytomique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

Tableau 3.14 Métier exercé par les mères déclarant une exposition aux rayonnements ionisants lors de la grossesse.

Professions pendant la grossesse	Codes BIT	Pas de port de dosimètre				Port d'un dosimètre			
		<1 h/semaine		≥1h/semaine		<1 h/semaine		≥1h/semaine	
		Témoins	Cas	Témoins	Cas	Témoins	Cas	Témoins	Cas
Professions de santé		7	7	1	2	2	3	6	1
Médecins	6105, 6120	2	0	0	0	0	0	1	0
Dentistes	6310, 6320	2	1	0	1	0	1	0	0
Assistants dentaires	59940	1	1	1	0	0	0	2	0
Infirmières	7110, 7120	1	4	0	1	2	1	0	0
Manipulatrices	7710	0	0	0	0	0	0	2	1
Auxiliaire vétérinaire	59960	0	1	0	0	0	0	0	0
Techniciennes en biologie	1400, 5420, 5430	1	0	0	0	0	1	1	0
Autres		0	3	4	2	0	0	1	1
Analyste nucléaire	8310	0	0	0	0	0	0	0	1
Electricienne nucléaire	96190	0	0	0	0	0	0	1	0
Secrétaires	39430, 32120	0	1	2	0	0	0	0	0
Auxiliaire de vie	54020	0	0	0	1	0	0	0	0
Ouvrières	94990, 85330	0	2	1	0	0	0	0	0
Serveuse	53210	0	0	0	1	0	0	0	0
Chercheuse en chimie	1110	0	0	1	0	0	0	0	0

### 3.3.3 Analyses complémentaires et études de sensibilité

Aucun des résultats précédents n'était modifié après exclusion des cas de trisomie 21 et/ou d'anomalies congénitales.

Les résultats étaient également inchangés quand les enfants dont les mères étaient exposées moins d'1 heure par semaine étaient classés avec les non exposés (tableau 3.20)

Tableau 3.20 Résultats des analyses de sensibilité pour les expositions professionnelles maternelles lors de la grossesse.

Exposition maternelle professionnelle	Toute fréquence OR <sup>1</sup> [IC 95%]	Plus d'1 h/semaine vs non exposé OR <sup>1</sup> [IC 95%]	Plus d'1 h/semaine vs moins d'1h semaine + non exposé OR <sup>1</sup> [IC 95%]
Teintures de cheveux	<b>3.0</b> [1.7-5.2]	<b>2.1</b> [0.9-4.9]	<b>2.1</b> [0.9-4.8]
Rayonnements ionisants	<b>2.4</b> [1.3-4.6]	<b>1.2</b> [0.4-3.2]	<b>1.2</b> [0.4-3.1]
Peintures ou vernis ou colle	<b>1.5</b> [1.1-2.2]	<b>1.4</b> [0.9-2.3]	<b>1.4</b> [0.9-2.2]
Pesticides	<b>1.1</b> [0.6-1.9]	<b>0.9</b> [0.4-2.1]	<b>0.9</b> [0.4-2.1]

<sup>1</sup> OR estimé par régression logistique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

### 3.4 Exposition au trafic routier et risque de leucémie aigue

Les résultats sont présentés pour trois indicateurs d'exposition au trafic routier et une combinaison de ces trois indicateurs.

#### 3.4.1 Proximité des routes à fort trafic

Une association positive à la limite de la significativité a été mise en évidence entre le risque de LA et l'existence de routes de classe 1 et 2 à moins de 500 mètres du lieu d'habitation (OR=2.0 [1.0-3.6]). Cette association était observée pour les LAL comme pour les LANL. Les effectifs ne permettaient pas un découpage progressif au sein de ce rayon de 500 m. Seulement 11 cas et 10 témoins résidaient à moins de 300 m de routes de classes 1 (OR=2.4 [1.0-5.7]) et 7 cas et 5 témoins étaient à moins de 100 m d'une route de classe 1 (OR=3.7 [1.1-12.2]) (tableau 3.21).

#### 3.4.2 Densité en routes à fort trafic de la zone de 500 m autour du domicile

Dans un rayon de 500 m, 7,7% des cas et 6,2% des témoins ont une route de classe 1 avec ou sans route de classe 2 et pour seulement 1,2% des cas et 0,5% des témoins, la portion de routes de classe 1 est supérieure à 1 380 m (50ème percentile) et de classe 2 est supérieure à 1 380 m (75ème percentile).

On observait une association positive et significative entre une exposition à plus de 750 m de routes de classes 1 et 2 et le risque de leucémie aiguë (OR=2.2 [1.1-4.2]), avec une tendance linéaire croissante avec la densité. Les estimations étaient similaires pour les LAL et LANL (tableau 3.21).

Tableau 3.21 Indicateur d'exposition aux routes et trafic (proximité et densité) et risque de LA de l'enfant

	Fonction Navteq			Témoins (n=1681)	LA		LAL			LANL			
	Classe 1	Classe 2	Classe 3		Cas (n=763)	OR <sup>1</sup>	[IC 95%]	Cas (n=647)	OR <sup>2</sup>	[IC 95%]	Cas (n=116)	OR <sup>2</sup>	[IC 95%]
<b>Proximité aux routes principales (mètres)</b>													
Non exposé	≥ 500 m	≥ 500 m	≥ 500 m	672	282	<b>1.0</b>	Réf.	237	<b>1.0</b>	Réf.	45	<b>1.0</b>	Réf.
Faible	≥ 500 m < 500 m	≥ 500 m ≥ 500 m	< 500 m	905	422	<b>1.1</b>	[0.9-1.4]	360	<b>1.1</b>	[0.9-1.4]	62	<b>1.0</b>	[0.7-1.5]
Intermédiaire	< 500 m	≥ 500 m		78	37	<b>1.2</b>	[0.8-1.8]	32	<b>1.2</b>	[0.8-1.9]	5	<b>1.0</b>	[0.4-2.6]
Elevée	< 500 m	< 500 m		26	22	<b>2.0</b>	[1.1-3.6]	18	<b>1.9</b>	[1.0-3.6]	4	<b>2.3</b>	[0.8-6.9]
<b>Densité de routes à fort trafic dans un rayon de 500m centré sur la résidence</b>													
Non exposé	aucune	aucune		1255	547	<b>1.0</b>	Réf.	463	<b>1.0</b>	Réf.	84	<b>1.0</b>	Réf.
Faible	autres combinaisons			345	163	<b>1.1</b>	[0.9-1.4]	139	<b>1.1</b>	[0.9-1.4]	24	<b>1.0</b>	[0.7-1.7]
Intermédiaire	≥750 m	<750 m		61	34	<b>1.3</b>	[0.8-2.0]	29	<b>1.3</b>	[0.8-2.1]	5	<b>1.3</b>	[0.5-3.3]
Elevée	≥750 m	≥750 m		20	19	<b>2.2</b>	[1.1-4.2]	16	<b>2.2</b>	[1.1-4.3]	3	<b>2.1</b>	[0.6-7.3]

<sup>1</sup> OR estimé par régression logistique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

<sup>2</sup>OR estimé par régression polytomique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

### **3.4.3 Pollution liée au trafic - concentration atmosphérique en NO<sub>2</sub>**

Une association positive et significative a été mise en évidence entre le risque de LA et l'estimation de la concentration de NO<sub>2</sub> de fond lié au trafic à sa zone d'habitation, et il existait une tendance linéaire significative croissante avec la concentration (tableau 3.22).

### **3.4.4 Variable combinant indicateurs de route et pollution liée au trafic**

On observait une association positive significative entre le risque de LA et cette variable d'exposition avec un OR de 2.6 [1.2-5.3] pour les sujets les plus exposés comparés aux non exposés. Une association du même ordre de grandeur était retrouvée pour les LAL et LANL (tableau 3.22).

Tableau 3.22 Pollution liée au trafic, combinaison des 3 indicateurs d'exposition: proximité des routes à fort trafic, densité en routes à fort trafic, et pollution liée au trafic et risque de LA.

Variables d'exposition	Témoins (n=1681)	LA			LAL			LANL						
		Cas (n=763)	OR <sup>1</sup>	[IC 95%]	Cas (n=647)	OR <sup>2</sup>	[IC 95%]	Cas (n=116)	OR <sup>2</sup>	[IC 95%]				
<b>Concentration de NO2 de fond lié au trafic</b>														
Basse (<12.2 µg/m <sup>3</sup> )	840	337	<b>1.0</b>	Réf.	288	<b>1.0</b>	Réf.	49	<b>1.0</b>	Réf.				
Intermédiaire (12.2 – 16.1µg/m <sup>3</sup> )	421	220	<b>1.3</b>	[1.1-1.6]	189	<b>1.3</b>	[1.0-1.6]	31	<b>1.4</b>	[0.9-2.2]				
Elevée (≥16.2µg/m <sup>3</sup> )	420	204	<b>1.3</b>	[1.0-1.6]	169	<b>1.2</b>	[1.0-1.5]	35	<b>1.5</b>	[1.0-2.4]				
données manquantes	0	2			1			1						
p test de tendance			<0.05											
<b>Indicateurs combinés d'exposition aux routes et au trafic</b>														
	<b>Proximité</b>	<b>Densité</b>	<b>NO2 lié au trafic</b>											
Non exposé	Non exposé	Non exposé	Bas		424	166	<b>1.0</b>	Réf.	140	<b>1.0</b>	Réf.			
Intermédiaire		autre combinaisons		1241	581	<b>1.2</b>	[1.0-1.5]	494	<b>1.2</b>	[1.0-1.5]	87	<b>1.2</b>	[0.8-1.9]	
Elevé	Elevée	Elevée	Elevé/intermédiaire		16	16	<b>2.6</b>	[1.2-5.3]	13	<b>2.4</b>	[1.2-5.3]	3	<b>3.2</b>	[0.9-12.0]

<sup>1</sup> OR estimé par régression logistique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

<sup>2</sup> OR estimé par régression polytomique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

### **3.4.5 Influence des caractéristiques socio-démographiques et du type de logement sur le niveau d'exposition**

Chez les témoins, l'exposition aux indicateurs de trafic était significativement associée à la catégorie socioprofessionnelle du foyer, à la zone d'habitation ainsi qu'au type de logement. En effet, les sujets les plus exposés au trafic routier appartenaient plus souvent à une catégorie socioprofessionnelle plus élevée que les sujets les moins exposés, ils habitaient davantage en appartement qu'en maison et plus souvent en zone urbaine qu'en zone rurale ou semi-urbaine. Les relations étaient encore plus nettes pour la concentration de NO<sub>2</sub>, également associée au niveau d'étude, que pour les indicateurs de trafic.

Par ailleurs, le nombre de déménagements était très lié au rang de naissance. Parmi les témoins, 69% des enfants uniques ou aînés avaient déménagés au moins une fois, tandis que cette proportion était de 52 % pour les enfants de rang 2, de 41% pour les enfants de rang 3 et de 40% au-delà. Le nombre de déménagement était également très lié à l'âge. Chez les témoins, la proportion d'enfants ayant déménagé était de 40% avant l'âge de 5 ans, 65% de 5 à 9 ans, et de 73% de 10 à 14 ans (tableau 3.23).

### **3.4.6 Influence des indicateurs de trafic sur la concentration de NO<sub>2</sub>**

Chez les témoins, l'exposition à des concentrations de NO<sub>2</sub> liées au trafic supérieures à 12.2 µg/m<sup>3</sup> était significativement associée à la proximité et à la densité de routes à grande circulation. Le risque d'être exposé à une concentration moyenne ou élevée de NO<sub>2</sub> était d'autant plus élevé que les expositions au trafic étaient élevées (tableau 3.24).

Tableau 3.23 Influence des caractéristiques socio-démographiques et du type de logement sur le niveau d'exposition.

	<b>Présence<sup>1</sup></b>	<b>Densité<sup>2</sup></b>	<b>NO<sub>2</sub><sup>3</sup></b>
	<b>OR<sup>4</sup> [IC 95%]</b>	<b>OR<sup>4</sup> [IC 95%]</b>	<b>OR<sup>4</sup> [IC 95%]</b>
<b>Catégorie socioprofessionnelle du foyer</b>			
Directeurs, professions intellectuelles et intermédiaires	<b>1.6</b> [0.9-2.9]	<b>1.3</b> [0.7-2.6]	<b>2.1</b> [1.6-2.8]
Métiers administratifs et commerciaux	<b>1.1</b> [0.6-2.1]	<b>1.0</b> [0.5-2.2]	<b>1.9</b> [1.4-2.5]
Métiers de services	<b>1.0</b> [0.4-2.3]	<b>0.7</b> [0.3-1.9]	<b>1.4</b> [1.0-2.0]
Ouvriers d'usine et agricoles, sans emploi	<b>1.0</b> Réf.	<b>1.0</b> Réf.	<b>1.0</b> Réf.
<b>Niveau d'études maternel</b>			
< BAC	<b>1.0</b> Réf.	<b>1.0</b> Réf.	<b>1.0</b> Réf.
≥ BAC	<b>1.1</b> [0.7-1.8]	<b>0.9</b> [0.5-1.6]	<b>1.2</b> [1.0-1.5]
<b>Zone de résidence lors de l'interview</b>			
Rurale	<b>0.3</b> [0.2-0.5]	<b>0.3</b> [0.2-0.6]	<b>0.1</b> [0.04-0.1]
Semi-urbaine	<b>0.5</b> [0.3-0.9]	<b>0.5</b> [0.3-0.9]	<b>0.2</b> [0.1-0.2]
Urbaine	<b>1.0</b> Réf.	<b>1.0</b> Réf.	<b>1.0</b> Réf.
<b>Type de logement lors de l'interview</b>			
Appartement	<b>2.3</b> [1.5-3.4]	<b>2.2</b> [1.4-3.6]	<b>6.4</b> [4.9-8.2]
Maison	<b>1.0</b> Réf.	<b>1.0</b> Réf.	<b>1.0</b> Réf.
Exploitation agricole	- -	- -	<b>0.3</b> [0.1-1.1]
<b>Déménagements</b>			
0	<b>1.0</b> Réf.	<b>1.0</b> Réf.	<b>1.0</b> Réf.
≥ 1	<b>1.1</b> [0.7-1.8]	<b>1.0</b> [0.6-1.7]	<b>1.1</b> [0.9-1.3]

<sup>1</sup> Exposition forte vs exposition faible ou non exposé

<sup>2</sup> Densité forte vs densité moyenne ou faible ou non exposé

<sup>3</sup> Concentration de NO<sub>2</sub> moyenne ou élevée vs non exposé

<sup>4</sup>OR et IC95% estimés à l'aide de modèles de régression logistique inconditionnelle, incluant les variables de stratification âge-sexe et CSP

Tableau 3.24 Influence des indicateurs de trafic sur la concentration de NO<sub>2</sub> lié au trafic estimée

	NO <sub>2</sub> <sup>1</sup>	
	OR <sup>2</sup>	[IC 95%] <sup>2</sup>
<b>Présence de routes à fort trafic</b>		
Exposition forte	8.2	[2.8-24.2]
Exposition moyenne	1.6	[1.0-2.6]
Exposition faible	2.1	[1.7-2.5]
Non exposés	1.0	Réf.
<b>Densité de routes</b>		
Densité forte	6.0	[1.7-20.8]
Densité moyenne	1.2	[0.7-2.1]
Densité faible	1.6	[1.3-2.0]
Non exposés	1.0	Réf.

<sup>1</sup>Concentration de NO<sub>2</sub> lié au trafic moyenne ou élevée vs non exposés

<sup>2</sup>OR et IC95% estimés à l'aide de modèles de régression logistique inconditionnelle, incluant les variables de stratification âge x sexe et CSP

### 3.4.7 Ajustements sur les facteurs de confusion

Les ajustements sur l'habitat et le type de logement et sur les facteurs liés aux LA dans les études précédentes, c'est-à-dire le rang de naissance, le nombre élevé d'infections banales avant l'âge de un an, l'utilisation de pesticides par la mère et le tabagisme paternel préconceptionnel n'ont pas modifié les résultats.

Les analyses réalisées en excluant les cas porteurs d'une trisomie 21 (11 cas), ou excluant les cas et les témoins habitant un logement mitoyen d'une station-service (35 cas et 42 témoins) n'ont pas non plus modifié les résultats.

Les analyses stratifiées sur l'habitat pour le risque de LA et les variables d'exposition ont fourni des estimations similaires en zone rurale ou semi-urbaine et en zone urbaine. Cependant, l'association entre l'exposition au NO<sub>2</sub> de fond lié au trafic et le risque de LA semblait un peu plus élevée en milieu urbain (tableau 3.25).

Tableau 3.25 Exposition au NO<sub>2</sub> de fond lié au trafic et risque de LA selon l'habitat

	Témoins (n=1680)	Cas (n=761)	OR <sup>1</sup>	[IC 95%]
<b>Tout habitat</b>				
Basse (<12.2 µg/m <sup>3</sup> )	840	337	<b>1.0</b>	Réf.
Intermédiaire (12.2 – 16.1 µg/m <sup>3</sup> )	421	220	<b>1.3</b>	[1.0-1.6]
Elevée (≥16.2 µg/m <sup>3</sup> )	420	204	<b>1.2</b>	[1.0-1.5]
<b>Habitat rural ou semi-urbain</b>				
Basse (<12.2 µg/m <sup>3</sup> )	689	284	<b>1.0</b>	Réf.
Intermédiaire (12.2 – 16.1 µg/m <sup>3</sup> )	240	116	<b>1.1</b>	[0.9-1.5]
Elevée (≥16.2 µg/m <sup>3</sup> )	63	29	<b>1.2</b>	[0.7-1.9]
<b>Habitat urbain</b>				
Basse (<12.2 µg/m <sup>3</sup> )	151	53	<b>1.0</b>	Réf.
Intermédiaire (12.2 – 16.1 µg/m <sup>3</sup> )	181	104	<b>1.6</b>	[1.1-2.4]
Elevée (≥16.2 µg/m <sup>3</sup> )	357	175	<b>1.4</b>	[0.9-2.0]

<sup>1</sup>OR et IC95% estimés à l'aide de modèles de régression logistique inconditionnelle, incluant les variables de stratification âge x sexe

### 3.4.8 Analyses complémentaires et études de sensibilité

- *Analyse par tranches d'âge*

Les associations avec les indicateurs de trafic étaient plus marquées lorsque l'analyse était restreinte aux enfants de moins de 5 ans, avec des OR comparables pour les LAL et les LANL. En revanche, elles disparaissaient pour les classes d'âge 5-9 ans et 10-14 ans.

Cependant, lorsque les analyses étaient restreintes aux enfants n'ayant pas déménagé, l'association entre LA et indicateurs de trafic était du même ordre de grandeur pour les trois tranches d'âge, avec des OR plus élevés que dans l'analyse des 0-14 ans.

- *Restriction aux enfants n'ayant pas déménagé*

Les associations entre LA et indicateurs de trafic étaient légèrement plus marquées après restriction aux enfants n'ayant pas déménagé que dans les analyses réalisées sur la totalité des sujets (tableau 3.26).

Les OR associés aux catégories les plus exposées, qui reposaient sur de faibles nombres de sujets, étaient très élevés mais non significatifs avec des intervalles de confiance larges et les OR associés aux catégories d'exposition plus faibles restaient élevés et devenaient significatifs. En revanche, le lien avec la concentration de NO<sub>2</sub> lié au trafic était moins net et perdait sa significativité.

Tableau 3.26 Exposition du domicile au trafic routier et risque de LA chez les enfants n'ayant pas déménagé

	Témoins (n=769)	LA (n=278)	OR <sup>1</sup> [IC 95%]
<b>Présence de routes à fort trafic</b>			
Exposition forte	8	8	<b>3.4</b> [1.2-9.7]
Exposition moyenne	32	18	<b>1.8</b> [1.0-3.5]
Exposition faible	413	149	<b>1.1</b> [0.8-1.5]
Non exposés	316	103	<b>1.0</b> Réf.
<b>Densité de routes</b>			
Densité forte	8	7	<b>2.9</b> [1.0-8.4]
Densité moyenne	26	17	<b>2.0</b> [1.0-3.9]
Densité faible	160	59	<b>1.1</b> [0.8-1.6]
Non exposés	575	195	<b>1.0</b> Réf.
<b>Concentration de NO<sub>2</sub></b>			
Elevée ( $\geq 16.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )	190	77	<b>1.4</b> [1.0-1.9]
Intermédiaire ( $12.2 - 16.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )	184	75	<b>1.2</b> [0.9-1.7]
Basse ( $< 12.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )	395	125	<b>1.0</b> Réf.
<b>Exposition combinée</b>			
Exposition forte	7	7	<b>4.2</b> [1.4-13.0]
Exposition intermédiaire	561	212	<b>1.4</b> [1.0-1.9]
Non exposés	201	59	<b>1.0</b> Réf.

<sup>1</sup>OR et IC95% estimés à l'aide de modèles de régression logistique inconditionnelle, incluant les variables de stratification âge x sexe et CSP

- *Restriction aux adresses géocodées à 20 mètres de précision*

Globalement, la restriction de l'analyse aux sujets dont l'adresse était géocodée avec une précision inférieure ou égale à 20 mètres ne changeait pas les résultats (tableau 3.27). Après restriction supplémentaire aux enfants n'ayant pas déménagé (199 cas et 592 témoins) les OR étaient plus élevés mais avec des intervalles de confiance plus larges.

Tableau 3.27 Exposition du domicile au trafic routier et risque de LA chez les sujets ayant une adresse géocodée à une précision inférieure ou égale à 20 mètres.

	<b>Témoins</b> (n=1320)	<b>LA</b> (n=558)	<b>OR<sup>1</sup></b> [IC 95%]
<b>Présence de routes à fort trafic</b>			
Exposition forte	23	20	<b>2.2</b> [1.2-4.1]
Exposition moyenne	62	30	<b>1.2</b> [0.8-2.0]
Exposition faible	750	312	<b>1.0</b> [0.8-1.3]
Non exposés	485	196	<b>1.0</b> Réf.
<b>Densité de routes</b>			
Densité forte	18	18	<b>2.5</b> [1.3-4.9]
Densité moyenne	48	26	<b>1.4</b> [0.8-2.2]
Densité faible	283	121	<b>1.1</b> [0.8-1.3]
Non exposés	971	393	<b>1.0</b> Réf.
<b>Concentration de NO2</b>			
Elevée ( $\geq 16.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )	379	175	<b>1.4</b> [1.1-1.7]
Intermédiaire ( $12.2 - 16.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )	342	170	<b>1.4</b> [1.1-1.8]
Basse ( $< 12.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )	599	212	<b>1.0</b> Réf.
<b>Variable combinée</b>			
Exposition forte	14	16	<b>3.2</b> [1.5-6.9]
Exposition intermédiaire	1021	440	<b>1.2</b> [0.9-1.6]
Non exposés	285	102	<b>1.0</b> Réf.

<sup>1</sup>OR et IC95% estimés à l'aide de modèles de régression logistique inconditionnelle, incluant les variables de stratification âge x sexe et CSP

## **4. DISCUSSION**



#### 4.1 Rappel des principaux résultats

Les principaux résultats observés dans le cadre de cette thèse étaient les suivants :

- Une association fortement négative et significative entre le risque de LA de l'enfant et **une supplémentation maternelle périconceptionnelle en acide folique**. Elle était plus marquée pour les supplémentations à une dose supérieure ou égale à la dose journalière recommandée que pour les supplémentations à dose inférieure ou les prises de multivitamines.
- Une association positive entre le risque de LA de l'enfant et le fait d'être à la fois porteur homozygote des allèles variants de l'un des **polymorphismes rs1801133 et 1801131 de *MTHFR***, et porteur de deux allèles variants des **polymorphismes rs1801394 et rs1532268 de *MTRR***.
- Des associations positives et significatives entre le risque de LA avec les expositions déclarées comme **expositions professionnelles maternelles pendant la grossesse**, aux teintures de cheveux, à des peintures, vernis ou colles, et à des rayonnements ionisants. Ces associations étaient limitées aux fréquences d'exposition de mois d'1 heure par semaine.
- Des associations positives significatives entre le risque de LA et **différents indicateurs d'exposition au trafic routier de la résidence au moment du diagnostic**. Ces associations étaient plus marquées lorsque l'analyse était restreinte aux enfants n'ayant pas déménagé.

## 4.2 Validité interne

### 4.2.1 Sélection des cas et des témoins

- *Sélection des cas*

Les cas ont été identifiés en utilisant le système de recueil des données du Registre National des Hémopathies malignes de l'Enfant, qui repose sur une moyenne de près de 3 sources de signalement par cas (Clavel *et al*, 2004b; Lacour *et al*, 2010). Le nombre de cas identifiés en 2003 et en 2004 par les enquêteurs d'ESCALE était conforme au nombre attendu d'après l'incidence des autres années. Il est donc peu probable qu'un biais de sélection des cas ait pu se produire au niveau de l'identification des cas.

La participation des mères des cas était très élevée (91%) et la cause principale de non inclusion des cas était le mauvais état de santé de l'enfant ou son décès. Cette sélection pourrait induire un biais pour les expositions liées, directement ou indirectement, à la gravité des leucémies aigües. Cependant, sa portée est a priori très limitée puisque seulement 4% des cas LA identifiés dans le registre n'ont pas été éligibles dans ESCALE du fait d'un décès. Les 15 cas qui étaient décédés dans les 6 mois suivant l'interview n'avaient pas un profil d'exposition différent de ceux qui avaient survécu plus d'un an. Ils n'étaient pas porteurs d'un génotype particulier de *MTHFR* et *MTRR*. Une supplémentation maternelle en acide folique n'était rapportée pour aucun d'entre eux, ce qui exclut que la survie ait plus rendre compte du lien négatif observé. De même, leur catégorie socioprofessionnelle n'était pas moins élevée que celle des survivants, et n'a probablement pas induit de sélection d'expositions particulières.

S'il est peu probable que le fait d'être exposé à un fort trafic routier soit lié à la sévérité de la maladie, il est par contre possible qu'il soit lié au statut urbain ou rural de la zone d'habitation, si celle-ci a une influence sur le délai entre les premiers symptômes et le diagnostic et la prise en charge. Toutefois, nous n'avons pas mis en évidence de différence majeure selon que l'association était estimée en zone urbaine ou en zone rurale ou semi-urbaine. D'après les données du registre, les cas inclus dans l'étude ESCALE étaient légèrement plus jeunes et résidaient plus souvent en zone rurale que les cas diagnostiqués sur la même période et non inclus dans ESCALE. Ils avaient également tendance à résider moins près de routes à fort trafic (2.9% vs. 5.3% dans un rayon de 500 m) et à être moins exposés au NO<sub>2</sub> (28% vs. 37% au-delà du 70<sup>ème</sup> percentile) que les cas non inclus. Ces comparaisons ne

montraient pas d'indication d'une surreprésentation des enfants exposés parmi les cas qui pourrait avoir généré les observations observées.

- ***Sélection des témoins***

Les témoins ont été échantillonnés dans la population française, sur la base de l'annuaire téléphonique. Les foyers ne disposant pas d'une ligne de téléphone fixe, mais uniquement d'un téléphone portable n'ont donc pas été contactés alors que les cas étaient éligibles qu'ils disposent ou non d'une ligne fixe. L'impact de la sélection de parents avec ligne fixe sur les caractéristiques des logements est difficile à prédire. D'après l'INPES (Baromètre santé 2005), les possesseurs de portable seul étaient à l'époque du recrutement de condition plus modeste que ceux qui disposaient d'une ligne fixe. Ils étaient moins nombreux dans les familles avec enfants, un peu plus installées que les personnes célibataires de la même tranche d'âge.

Le taux de participation des témoins était de 71% et le refus de participer est habituellement lié à une CSP plus élevée. D'après les enquêtes nationales périnatales (Blondel 1997)(Blondel *et al*, 2001; Blondel *et al*, 2006), les témoins étaient de mère un peu plus âgée et un peu plus diplômées en moyenne que les nouveau-nés français des enquêtes périnatales. Dans l'étude nationale périnatale, la proportion de femmes ayant passé le baccalauréat était en effet de 38.7% en 1998 et de 42.6% en 2003. Dans l'étude ESCALE, conduite en 2003-2004, ces proportions étaient de 38% et 49% pour les mères des témoins nés en 1998 et 2003 respectivement (42% pour le groupe témoin entier). Une sélection de mères plus éduquées est par conséquent possible, mais limitée. L'allaitement qui peut également être sensible à un biais d'éducation maternelle était similaire dans l'étude périnatale (52% en 1998 et 62% en 2003) et dans l'étude ESCALE (51% pour les naissances en 1998 et 62% en 2003).

La sélection de témoins de CSP plus élevée ou de niveau d'éducation plus élevé conduirait à sélection des expositions liées à la CSP. Elle amènerait ainsi

- à sélectionner des témoins dont les mères ont été plus supplémentées en acide folique, et donc à surestimer le lien avec la supplémentation maternelle en acide folique.
- à sélectionner des témoins dont les mères ont plus souvent exercé une profession d'enseignante pendant leur grossesse, mais moins souvent des professions moins qualifiées et exposant aux teintures à cheveux ou aux pesticides. Dans ce cas, cette sélection a pu nous amener à sous-estimer la relation avec ces expositions.

- à sélectionner des témoins résidant plus près des routes à grande circulation, ce qui aurait pu nous amener à sous-estimer la relation avec ces expositions.

Les ajustements et les analyses stratifiées ont permis de prendre en compte les caractéristiques sociodémographiques du foyer (CSP, éducation) et du logement (habitat, statut rural/urbain).

- ***Sélection des sujets génotypés***

Les analyses des interactions entre la supplémentation maternelle en acide folique et le génotype de l'enfant étaient restreintes aux sujets génotypés, qui ont notamment été sélectionnés par le consentement des parents à participer. Les parents des enfants génotypés étaient plus diplômés que ceux de l'échantillon initial, mais cette sélection n'a pas eu pour autant de retentissement sur la fréquence de la supplémentation en acide folique.

La restriction aux sujets caucasiens, approchée par le fait d'avoir au moins 2 grands-parents nés en Europe, avait pour but de réduire un éventuel biais de stratification. De fait, la distribution des génotypes des témoins ne déviait pas de l'équilibre d'Hardy-Weinberg.

#### **4.2.2 Erreurs de classement des expositions**

Le recueil des informations par l'interrogatoire des mères étant exclusivement rétrospectif, des erreurs de classement non différentielles entre les cas et les témoins ont obligatoirement eu lieu dans Escalé. Des erreurs de classement différentielles sont également possibles si les mères des cas ont sur- ou sous-déclaré l'exposition dans des proportions différentes de celles des mères des témoins. Cependant, ces erreurs ont été limitées par le fait que le questionnaire d'Escalé était standardisé, avec des questions fermées et posées de la même façon aux mères des cas et des témoins (Mitchell *et al*, 1986; Teschke *et al*, 1994; Teschke *et al*, 2000).

- ***Supplémentation maternelle en acide folique***

La supplémentation maternelle en acide folique n'est pas habituellement évoquée par le médecin au moment d'un diagnostic de leucémie. Elle n'est pas supposée être un facteur de risque pour la maladie et n'est pas non plus socialement considérée comme indésirable. Les erreurs de classements différentielles ne sont donc pas les plus probables pour cette variable.

La campagne d'information de promotion de la supplémentation en acide folique a été lancée tardivement en France, en décembre 2004, soit à la fin de l'étude ESCALE. Il est cependant

possible que les médecins aient commencé à modifier leur pratique de recommandation avant que celle-ci ne devienne officielle, à la lecture de la littérature sur la prévention des malformations congénitales. Contrairement à d'autres pays, notamment les États-Unis et le Canada (<http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/faaf/chap3-fra.php>) qui l'ont autorisé en 1998, la fortification en acide folique des produits alimentaires n'a pas été autorisée en France.

Dans ESCALE, les mères rapportaient moins souvent une supplémentation en acide folique (11% pour l'acide folique et 17% pour la prise d'acide folique et de multivitamines chez les témoins) que dans la plupart des études les plus récentes. Il est possible que la supplémentation maternelle ait été sous-reportée puisqu'elle faisait appel à la mémoire et nous pouvons penser qu'elle l'est davantage pour les enfants les plus âgés puisque la grossesse a pu être jusqu'à 15 années antérieure au moment de l'interview. Cependant, l'âge et la période de la naissance sont indissociables et les cas les plus jeunes sont aussi ceux dont la naissance est plus récente et a pu s'accompagner d'une recommandation de supplémentation.

Chez les témoins d'ESCALE, la prévalence de la supplémentation augmentait avec l'année de naissance, et elle était donc plus élevée chez les enfants les plus jeunes (<1993: 5% ; 1993-1997: 9.1% ; 1998-2002: 11.7% ;  $\geq$  2003: 15.5%). Une étude cas-témoins multicentrique en France (Rouget *et al*, 2005) entre début 1998 et fin 1999, rapportait une prise de suppléments vitaminiques contenant de l'acide folique chez seulement 0.8% des mères des témoins pendant le mois précédant la grossesse et chez 24% d'entre elles au premier trimestre de la grossesse. Dans une autre étude conduite en 1999 uniquement dans des maternités parisiennes, 24.3% des mères déclaraient avoir pris un produit contenant de l'acide folique entre 1 mois avant et 2 mois après le début de la grossesse. Dans notre étude, la fréquence de la supplémentation maternelle en acide folique ou en multivitamines (incluant une supplémentation en acide folique inférieure à la dose journalière recommandée de 400mg/j) était proche, de 27%, pour le sous-ensemble des témoins nés à Paris sur la période 1997-2001.

- ***Professions et expositions professionnelles maternelles lors de la grossesse***

Le recueil de la profession des mères lors de la grossesse, en elle-même est une information peu sujette à un risque de biais de mémoire, mais elle peut être rapportée de façon trop imprécise pour être bien classée. Nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'un éventuel biais de classement, a priori non différentiel.

Les expositions maternelles professionnelles lors de la grossesse sont des variables moins objectives que les emplois. Elles sont plus sujettes à des biais de mémoire, qui peuvent être plus marqués pour les grossesses les plus anciennes. Cependant, les prévalences des expositions variaient peu par tranches d'âge de 5 ans. Il est possible que les mères des cas aient plus sur-déclaré certaines expositions que les mères des témoins. C'est vraisemblablement le cas pour les expositions aux rayonnements ionisants, rapportées plus souvent sans dosimètre par les mères des cas que par celles des témoins.

Certaines mères semblent avoir confondu exposition professionnelle et exposition domestique. Cette confusion paraît plus importante pour les expositions aux teintures de cheveux et aux pesticides. Cependant, toutes les mères exposées au moins 1 heure /semaine aux teintures de cheveux faisaient partie du groupe BIT 5-7 des coiffeuses et esthéticiennes et aucune des mères déclarant une exposition moins fréquente n'en faisait partie. Ce seuil d'une heure/semaine semble donc être un bon indicateur d'exposition professionnelle aux teintures de cheveux. Toutefois, il ne discriminait pas aussi bien les expositions professionnelles aux peintures ou vernis et/ou colles, ou aux pesticides. Dans le cas des peintures, il est aussi possible que les mères aient fait allusion à des travaux de rénovation ou de décoration de leur lieu de travail.

Dans le cas des radiations ionisantes, le port d'un dosimètre est un bon indicateur d'une réelle exposition professionnelle et il est vraisemblablement moins sujet à un risque de biais de mémoire. Toutefois, des expositions plus sporadiques ont pu aussi se produire sans dosimètre.

- ***Trafic routier***

L'exposition des enfants au trafic routier a été déterminée à partir de l'adresse du logement occupé au moment de l'interview des mères des cas et des témoins. Cette donnée objective, servant directement à déterminer l'exposition des enfants au trafic routier, n'était pas sujette à un risque de biais de mémoire. Les adresses de tous les cas et témoins ont été obtenues et pour 98% des témoins et 97% des cas le géocodage a généré les coordonnées de la résidence avec une précision minimale de 100 mètres. Des erreurs de classement d'exposition différentielles ont pu survenir car la proportion d'adresses géocodées avec la meilleure précision ( $\leq 20$  mètres) était un peu plus élevée chez les témoins (79%) que chez les cas (73%). Cette différence était faible et les résultats ne changeaient pas considérablement sous l'hypothèse où 6% des cas non exposés seraient exposés. Cependant, si de telles erreurs se sont produites, elles devraient être moins importantes pour l'estimation de l'exposition des enfants au NO<sub>2</sub> lié

au trafic que pour les indicateurs d'exposition au trafic. En effet, la concentration de NO<sub>2</sub> a été estimée à partir d'une carte dont les mailles avaient 4 km de côté et elle était donc moins sensible aux imprécisions de géocodage. La restriction de l'analyse aux sujets dont l'adresse était géocodée avec une précision inférieure à 20 mètres ne changeait pas les résultats.

Nous supposons que les concentrations de NO<sub>2</sub> au moment de l'interview (2003-2004) étaient correctement estimées par les mesures faites en 2000, ou, du moins, que les résidences étaient correctement classées en utilisant ces mesures. De plus, nous avons utilisé un indicateur de pollution de fond qui n'est pas conçu pour rendre compte de l'exposition au NO<sub>2</sub> en proximité de voirie (à moins de 200 m d'après le profil de dispersion de ce polluant). Les erreurs de classements résultantes sont a priori non différentielles, non liées au statut cas-témoins, et auraient plus probablement pour conséquence une atténuation plutôt qu'un renforcement des associations.

Nous ne disposons pas de données chiffrées de trafic, mais d'un classement des routes établi par Navteq en fonction du type de route et de niveaux de trafic présumés. Toutefois les estimations de concentration de NO<sub>2</sub> étaient positivement liées aux indicateurs de trafic Navteq (tableau 4.4), ce qui était conforme avec une étude conduite en Californie (Reynolds *et al*, 2002a) dans laquelle des indicateurs plus précis étaient disponibles et montraient une forte corrélation. Une étude danoise (RaaschouNielsen *et al*, 1997) montrait que les concentrations à la porte d'entrée ne reflétaient pas correctement l'exposition personnelle au NO<sub>2</sub> dans la plupart des zones rurales où la densité de trafic était négligeable. Dans cette étude, le ratio des concentrations de NO<sub>2</sub> de fond sur les concentrations de NO<sub>2</sub> lié au trafic était stable parmi les différentes catégories d'urbanisation.

Un autre type d'erreur de classement ayant pu survenir au cours de cette étude, concerne le choix de la fenêtre d'exposition. La période d'exposition pertinente pour la leucémogénèse peut être la vie intra-utérine, les mois précédant le diagnostic, ou toute autre période. Nous ne disposons que de l'adresse au moment du diagnostic, et nous n'avions que les communes de résidences antérieures pour les enfants qui avaient déménagé au moins une fois (65% des cas et 54% des témoins). Ainsi, si la fenêtre d'exposition pertinente était antérieure au diagnostic (période prénatale ou petite enfance), nous avons induit des erreurs de classement non différentielles en approchant l'exposition par celle du logement occupé au moment de l'enquête. De fait, les analyses restreintes aux enfants n'ayant pas déménagé ou ayant vécu au moins 2 ans dans leur dernière résidence montraient des associations entre LA et indicateurs

de trafic légèrement plus marquées, ce qui pourrait suggérer que la période d'exposition la plus récente ne soit pas la plus pertinente. Les résultats de l'analyse restreinte aux enfants n'ayant pas déménagé et dont l'adresse était géocodée avec la meilleure précision étaient également renforcés.

- ***Données de géotypage***

Les cas et les témoins ont été géotypés séparément en utilisant différentes plateformes. Cependant, la concordance entre les deux plateformes était totale pour les SNPs qu'elles avaient en commun. Chez les cas, les géotypes de deux des quatre SNPs candidats, rs1801131 dans *MTHFR* et rs1801394 dans *MTRR*, ont été imputés à partir du programme IMPUTE largement utilisé et connu pour avoir une bonne efficacité et précision (Marchini & Howie, 2010; Nothnagel *et al*, 2009). Les géotypes ont été imputés avec une probabilité à priori supérieure à 0.90 et avec de bons critères de qualité. Nous nous sommes assurés de la stabilité de nos résultats en analysant nos données dans un modèle de régression logistique pondéré sur cette probabilité à priori.

Les données de la littérature sur l'impact des polymorphismes de *MTHFR* sur les niveaux d'homocystéine plasmatique suggèrent un modèle codominant (Friso *et al*, 2002; Weisberg *et al*, 2001). Nous avons donc choisi de combiner les deux polymorphismes de *MTHFR*, en prenant pour hypothèse que la dernière catégorie (homozygotes pour un des variants de *MTHFR*) donnait lieu à la plus forte diminution de l'activité de l'enzyme. Dans notre échantillon de population, nous avons pu observer que tous les individus homozygotes pour un variant d'un polymorphisme de *MTHFR*, étaient homozygotes pour l'allèle ancestral de l'autre polymorphisme. Les données publiées sur les polymorphismes de *MTRR* suggèrent qu'ils diminuent l'affinité de l'enzyme pour la méthionine synthase (MS) (Olteanu *et al*, 2002), sans indication qu'ils s'écartent d'un modèle codominant. Les deux polymorphismes ont ainsi été combinés avec l'idée qu'être porteur de deux variants pouvait avoir plus d'impact sur le métabolisme. Pour la variable combinant les polymorphismes de *MTHFR* et *MTRR*, la dernière catégorie de la variable combinée de *MTHFR* a été divisée selon le statut *MTRR*, afin de distinguer la classe avec l'impact attendu le plus élevé sur le métabolisme des folates.

### **4.2.3 Risque de première espèce**

La multiplicité des tests statistiques augmente le risque de première espèce. Ce qui pourrait aussi en partie expliquer les associations observées entre les expositions maternelles professionnelles pour les plus faibles fréquences d'exposition et le risque de LA qui ne sont pas retrouvées pour des fréquences d'exposition supérieures.

### **4.2.4 Prise en compte des facteurs de confusion**

Les facteurs de confusion potentiels liés aux facteurs socio-démographiques ou au type de logement ont systématiquement été pris en compte par ajustement ou stratification. Pour toutes les analyses, les facteurs liés aux leucémies dans les analyses précédentes c'est-à-dire le rang de naissance, le nombre élevé d'infections banales avant l'âge de un an, l'utilisation de pesticides par la mère et le tabagisme paternel préconceptionnel ont également été pris en compte par ajustement, exclusion ou stratification. Les analyses ont aussi été refaites en excluant les enfants porteurs d'une trisomie 21. A l'heure actuelle, il n'existe pas d'autres facteurs de risque connus susceptibles d'expliquer les relations observées.

### 4.3 Validité externe-comparaison des résultats aux données de la littérature

#### 4.3.1 Supplémentation maternelle en acide folique et risque de LA de l'enfant - interaction avec les polymorphismes de MTRR et MTHFR

##### - *Supplémentation maternelle en acide folique*

Seule la première étude cas-témoins australienne publiée a montré une association proche de la nôtre avec la supplémentation maternelle en acide folique (OR=0.4 [0.2-0.7]) (Thompson *et al*, 2001). Les études publiées ultérieurement n'ont pas retrouvé cette association (Dockerty *et al*, 2007; Milne *et al*, 2010), de même que 2 autres études, qui se sont intéressées à la supplémentation en acide folique sans distinguer la prise d'acide folique de celle d'autres vitamines (Schuz *et al*, 2007; Shaw *et al*, 2004).

##### - *Polymorphismes de MTRR et MTHFR*

De nombreuses études ont exploré la relation entre les LA et les polymorphismes C677T ou A1298C de *MTHFR* (Alcasabas *et al*, 2008; Balta *et al*, 2003; Chan *et al*, 2010; Chatzidakis *et al*, 2006; de Jonge *et al*, 2009; Kamel *et al*, 2007; Kim *et al*, 2006; Krajinovic *et al*, 2004; Lightfoot *et al*, 2010; Oliveira *et al*, 2005; Petra *et al*, 2007; Reddy & Jamil, 2006; Schnakenberg *et al*, 2005; Thirumaran *et al*, 2005; Tong *et al*, 2010; Wiemels *et al*, 2001; Yang *et al*, 2011; Yeoh *et al*, 2010; Zanrosso *et al*, 2006). La plupart des articles publiés sur les polymorphismes C677T et A1298C de *MTHFR* comparaient des séries de cas avec des séries de témoins non appariés. Peu d'études ont pris en compte les facteurs de confusion potentiels associés aux leucémies de l'enfant et notamment les facteurs de risques environnementaux.

Les méta-analyses publiées ont rapporté une association inverse (Koppen *et al*, 2010; Yan *et al*, 2011; Zintzaras *et al*, 2006) ou nulle (Pereira *et al*, 2006a; Vijayakrishnan & Houlston, 2010a; Wang *et al*, 2010) entre les LAL et le polymorphisme C677T de *MTHFR* et aucune association avec le polymorphisme A1298C de *MTHFR*. Les discordances de résultats entre les méta-analyses s'expliquent par le choix des critères de sélection des études qui peuvent être responsables de biais ainsi que le nombre de bases de recherche d'articles utilisées (Pereira *et al*, 2006b).

La seule étude sur le polymorphisme *MTRR* C524T ne trouvait pas d'association avec les LAL (Gast *et al*, 2007), mais dans cette étude basée sur une série de cas et une série de

témoins non comparables, la distribution des génotypes s'écarte de l'équilibre de Hardy Weinberg. Le polymorphisme *MTRR* A66G n'était pas associé aux LAL dans une étude (Yang *et al*, 2011) et inversement lié aux LAL dans trois études, significativement (Gast *et al*, 2007) ou non (de Jonge *et al*, 2009; Metayer *et al*, 2011). Une autre étude ne retrouvait pas d'association (Petra *et al*, 2007). Parmi ces études, seule l'étude californienne (Metayer *et al*, 2011) était une étude cas-témoins appariée sur l'âge et le sexe.

Dans notre étude, où les témoins ont été soigneusement sélectionnés dans la même population dont les cas sont issus, et où les facteurs de confusion ont été pris en compte, nous ne retrouvons d'association pour aucun des quatre SNPs analysés séparément.

Les combinaisons de polymorphismes ont été peu étudiées. L'étude de Petra *et al* montrait une association inverse non significative avec le fait d'être à la fois homozygote pour l'allèle variant (T) de C677T de *MTHFR* et porteur de l'allèle variant (G) A66G de *MTRR*. Une publication récente sur l'étude californienne NCCLS (Metayer *et al*, 2011) s'intéressait à un ensemble de polymorphismes dans des gènes impliqués dans la voie du métabolisme des folates et suggérait une association positive entre le risque de LAL et un bloc haplotypique spécifique de 3 SNPs dans *MTRR* chez les hispaniques. Les variants étudiés dans notre étude ne sont pas inclus dans ce bloc. Dans cette étude californienne, l'OR de l'association entre rs1801394 et les LA était de 0.9 [0.6-1.4], proche du résultat que nous reportons. Notre étude est la première à considérer ensemble les SNPs rs1801133 (C677T) et rs1801131 (A1298C) dans *MTHFR* et rs1801394 (A66G) et rs1532268 (C524T) dans *MTRR*, qui ont un impact sur l'activité des enzymes *MTRR* et *MTHFR*.

#### - ***Interaction supplémentation acide folique x polymorphismes de MTRR et MTHFR***

Des études suggèrent de possibles interactions biologiques pouvant être liées au risque de LA (Blount *et al*, 1997; Friso *et al*, 2002; Rozen, 1997). Dans notre étude, les polymorphismes de *MTHFR* et *MTRR* et leurs combinaisons n'interagissaient pas avec le lien entre les LA et la supplémentation en acide folique. L'étude australienne, en analyse cas-seuls (Milne *et al*, 2006) ne montrait pas non plus d'interaction entre le génotype de *MTHFR* et la supplémentation en acide folique.

L'étude californienne (Metayer *et al*, 2011) trouvait une interaction entre les polymorphismes rs162031, rs162037, rs327588 de *MTRR* et la quantité moyenne de folates de l'alimentation maternelle, ces SNPs étant positivement associés aux LAL pour des apports en folates

inférieurs à la médiane, et négativement pour des apports supérieurs. Il n'y avait pas, par contre, d'interaction entre la prise de folates et les polymorphismes de *MTHFR* ou le polymorphisme A66G de *MTRR*.

#### **4.3.2 Profession et expositions maternelles professionnelles lors de la grossesse et risque de LA**

- ***Profession maternelle lors de la grossesse et risque de LA de l'enfant***

- *Métiers de la santé*

Plusieurs études ont retrouvé un lien entre la LA de l'enfant et une profession maternelle dans le secteur de la santé, sur des périodes plus anciennes. Il s'agissait des métiers de pharmacienne dans une étude finlandaise (Hemminki *et al*, 1981), de médecin dans une étude de Shanghai (OR=5.7 [1.3-24.5]) (Shu *et al*. 1988) et des métiers d'aide-soignante (SIR=1.6 [1.1-2.2]) et d'infirmière (SIR=1.5 [0.9-2.5]) (Mutanen & Hemminki, 2001) dans une étude de cohorte suédoise. A l'inverse, dans une étude cas-témoins du Royaume Uni, les métiers de la santé étaient négativement associés aux LA (OR=0.8 [0.6-1.0]) (McKinney *et al*, 2003). Dans notre étude, aucune de ces professions de santé n'était associée au risque de LA.

- *Métiers de l'agriculture*

A l'inverse de notre étude, dans laquelle nous observons une association non significative mais fortement négative avec les métiers d'agriculteurs, deux études rapportaient des associations non significatives mais positives : il s'agissait de l'étude de Shanghai, avec les métiers de l'agriculture au moment de la grossesse (OR=2.3 [0.9-6.3]) (Shu *et al*. 1988) et de celle du Royaume-Uni, pour les métiers groupés dans la catégorie « agriculture », correspondant à la vie à la ferme et à une exposition aux animaux périconceptionnelle (OR=1.4 [0.6-3.3]) (McKinney *et al*, 2003).

- *Autres métiers et secteurs*

Une seule étude, celle de Shanghai, a montré une association avec un emploi maternel dans le "secteur de l'industrie chimique et/ou des professions apparentées (OR=3.3 [1.6-6.8]). Malheureusement, l'information sur les secteurs industriels n'était pas accessible dans notre étude.

Trois études ont retrouvé une association positive significative (Buckley *et al*. 1989, McKinney *et al*. 2003) ou non (Shu *et al*. 1988) avec un emploi dans le secteur de la

métallurgie. Dans notre étude, aucune mère n'était employée lors de sa grossesse dans le sous-groupe 7-2 des ouvriers de la production et du traitement des métaux.

- ***Expositions professionnelles maternelles déclarées et risque de LA de l'enfant***

- *Expositions maternelles professionnelles aux peintures et/ou aux solvants lors de la grossesse*

L'association positive et significative que nous observions entre le risque de LA et une exposition maternelle professionnelle des mères à des peinture ou vernis ou colle semblait cohérente avec les données de la littérature.

Entre 1989 et 2012, 7 études cas-témoins se sont intéressées à l'exposition des mères ou des parents aux peintures et/ou aux solvants en milieu professionnel (Abadi-Korek *et al*, 2006; Buckley *et al*, 1989; Infante-Rivard *et al*, 2005; McKinney *et al*, 2003; Reid *et al*, 2011; Schuz *et al*, 2000; Shu *et al*, 1999). Pour la plupart, ces études montraient une association positive avec l'exposition maternelle à des peintures sur une période couvrant la grossesse avec le risque de LA de l'enfant.

Deux études de grande taille ont trouvé une association significative entre le risque de LAL et une exposition maternelle professionnelle à des « peintures ou diluants » (OR=1.7 [1.2-2.3]) pour l'étude américaine (Shu *et al*, 1999) et à des « peintures ou laques » (OR=2.0 [1.2-3.3]) pour l'étude allemande (Schuz *et al*, 2000). Une étude plus ancienne conduite aux USA et au Canada sur les LANL rapportait une association non significative pour une exposition à des « peintures et pigments » (Buckley *et al*, 1989). Enfin, une étude australienne récente ne trouvait aucune association pour une exposition, un an avant la naissance, à des « peintures et colorants » ainsi qu'à des « colles et résines » (Reid *et al*, 2011). Cette exposition était déterminée par un expert à partir de la description des tâches exécutées dans l'emploi.

L'exposition professionnelle de la mère aux solvants a été étudiée dans 7 études cas-témoins. Trois d'entre elles ont rapporté une association positive : l'étude américaine, spécifiquement pendant la grossesse (OR=1.6 [1.1-2.3]) (Shu *et al*, 1999), une étude israélienne, pour une exposition estimée sur toute l'histoire professionnelle (Abadi-Korek *et al*, 2006), et l'étude australienne pour une exposition un an avant la naissance (OR=1.6 [0.9-2.9]) (Reid *et al*, 2011). L'association n'était pas retrouvée dans l'étude allemande, pour une exposition lors de la grossesse (Schuz *et al*, 2000), ni dans celle du Royaume-Uni pour une exposition un an avant la naissance (McKinney *et al*, 2003). Elle n'était pas retrouvée non plus dans l'étude des

USA et du Canada sur les LANL (Buckley et al. 1989). L'étude canadienne ne retrouvait pas d'association globalement, tous solvants confondus, mais elle montrait une association avec les hydrocarbures aromatiques mononucléés (OR=1.7 [1.1-2.7]), plus particulièrement avec le toluène (OR=2.3 [1.0-5.0]), pendant la grossesse (Infante-Rivard *et al*, 2005). Enfin, une étude de cohorte rétrospective incluant les premiers enfants nés d'une grossesse simple entre 1978 et 2001 de mères travaillant dans une entreprise d'électronique taïwanaise, montrait une association positive et significative pour une exposition périconceptionnelle potentielle à des solvants organiques (RR=3.8 [1.2-12.6]) (Sung *et al*, 2008).

- *Expositions maternelles professionnelles aux pesticides lors de la grossesse*

A ce jour, 3 méta-analyses incluant des études publiées entre 1985 et 2008, sur l'exposition maternelle professionnelle aux pesticides ont été réalisées (Van Maele-Fabry *et al*, 2010; Vinson *et al*, 2011; Wigle *et al*, 2009). En raison des critères de sélection des études relatifs à chaque méta-analyse, le nombre d'études inclus variaient, cependant chaque méta-analyse trouvait une association positive et significative entre l'exposition des mères aux pesticides en période prénatale et le risque de LA. Contrairement à ces méta-analyses, nous n'observons pas d'association entre le risque de LA et des expositions professionnelles maternelles lors de la grossesse aux pesticides. Une étude-cas témoins récente n'a pas non plus mis en évidence d'association entre le risque de LA et une exposition maternelle professionnelle aux pesticides un an avant la naissance de l'enfant (OR=0.7 [0.1-6.4]), déterminée par expertise individuelle des histoires professionnelles maternelles (Glass *et al*, 2012).

- *Expositions maternelles professionnelles aux rayonnements ionisants lors de la grossesse*

Aucune des 7 études publiées, sur l'exposition professionnelle maternelle aux rayonnements ionisants, n'a mis en évidence d'association significative avec le risque de LA. Dans notre étude, nous observons une association positive et significative entre l'exposition professionnelle maternelle aux rayonnements ionisants et le risque de LA, mais ce lien n'était plus observé pour des fréquences d'exposition auto-déclarées de plus d'1 heure /semaine. Une étude américaine sur une cohorte de manipulateurs radio, plus protégée des biais de mémoire et des sur-déclarations, n'observait pas d'association entre une exposition in utero à des radiations ionisantes et le risque de LA (Johnson *et al*, 2008).

### 4.3.3 Trafic routier et risque de LA de l'enfant

Les études ayant estimé le lien entre le risque de LA et l'exposition au trafic routier ont utilisé des méthodologies variées pour quantifier l'exposition des enfants: la proximité des routes à grande circulation, le trafic routier, la densité de trafic, ainsi que des concentrations en NO<sub>2</sub> et benzène. Pour un même indicateur de trafic, l'estimation de l'exposition variait également suivant la définition des routes à grande circulation, l'aire considérée autour du domicile ou la distance domicile-axe routier, la fenêtre d'exposition considérée et la prise en compte ou non d'autres variables. La méthodologie d'estimation des indicateurs de pollution (concentrations de NO<sub>2</sub> ou de benzène) était également variable. Elle pouvait utiliser des modèles d'estimation des concentrations de polluants ou bien des données provenant de stations de mesure. Les indicateurs de trafic utilisés pour déterminer l'exposition des enfants de notre étude ne correspondaient à aucun des indicateurs rencontrés dans ces études.

Dans notre étude, nous avons déterminé une concentration de NO<sub>2</sub> de fond lié au trafic d'après une carte de l'ADEME basée sur des mesures effectuées en 2000. Nous avons mis en évidence une augmentation du risque de LA avec la concentration de NO<sub>2</sub>. Dans l'étude de Weng à Taïwan (Weng *et al*, 2008), les concentrations de fond de NO<sub>2</sub> étaient estimées à partir de stations de mesure, et les concentrations les plus élevées étaient significativement associées aux LA avec un OR de 2.3 [1.5-3.5]. Cette association était plus élevée que celle observée dans notre étude, mais l'étude taïwanaise, en moyenne, couvrait des régions plus urbanisées. Deux études scandinaves étaient basées sur des modèles estimant les concentrations de NO<sub>2</sub> liées au trafic (Feychting *et al*, 1998; Raaschou-Nielsen *et al*, 2001). Feychting *et al*, en Suède, ont mis en évidence une association non significative entre le risque de LA et l'exposition au NO<sub>2</sub>, basée sur 39 cas de LA sur 25 ans (Feychting *et al*, 1998). Au Danemark, l'étude de Raaschou-Nielsen *et al* n'a pas mis en évidence de lien entre le risque de leucémie et l'exposition au NO<sub>2</sub> au logement occupé in utero ou pendant l'enfance dans une étude cas-témoins assez large et accompagnée d'une étude de validation comparant des concentrations de NO<sub>2</sub> estimées à des mesures de concentration de NO<sub>2</sub> au pas de porte pour 204 sujets pendant 6 mois (Raaschou-Nielsen *et al*, 2001). La concentration de NO<sub>2</sub> provient du trafic mais également de la production d'énergie, ce qui pourrait expliquer les différences de concentrations de NO<sub>2</sub> rencontrées selon les pays en fonction de la part de NO<sub>2</sub> liée au trafic. D'autres indicateurs de pollution liés au trafic ont été étudiés. Aucune association n'était retrouvée dans l'étude de Raaschou-Nielsen entre le risque de LA et des concentrations de benzène estimées à partir de modèles, tandis que trois autres études, une étude écologique

(Whitworth *et al*, 2008) et deux cas-témoins (Crosignani *et al*, 2004; Vinceti *et al*, 2012) montraient des associations positives et significatives entre le risque de LA et les niveaux de benzène les plus élevés estimés par des modèles.

Dans notre étude, nous ne disposions pas de mesure directe du trafic quotidien à proximité, mais du classement par Navteq des routes du pays en fonction de leur trafic. Nous avons donc approché la quantification du trafic routier par l'existence à moins de 500 mètres de routes à grande circulation et par la longueur de ces routes dans un rayon de 500 mètres. Les études, ayant pris comme indicateur la proximité de routes à forte circulation (Harrison *et al*, 1999; Steffen *et al*, 2004b; Visser *et al*, 2004) et le nombre de véhicules par jour à proximité du domicile (Langholz *et al*, 2002; Pearson *et al*, 2000; Reynolds *et al*, 2001; Savitz & Feingold, 1989), afin d'étudier le lien entre l'exposition au trafic routier et le risque de LA, ont toutes mis en évidence une association positive, significative ou non. Dans l'étude de Steffen *et al*, précédemment réalisée par notre équipe, la distance aux routes à grande circulation était exclusivement déclarative, basée sur l'interview des mères et particulièrement sujette aux erreurs de classement. Les odds ratios étaient du même ordre de grandeur que ceux que nous avons mis en évidence pour les expositions les plus élevées au trafic (Steffen *et al*, 2004a). Dans une étude pilote basée sur de petits effectifs et sur l'exposition au trafic au domicile à la naissance, Reynolds *et al* n'ont pas observé d'association (Reynolds *et al*, 2001). Dans l'étude de Langholz *et al* (Langholz *et al*, 2002), l'exposition des enfants était déterminée à partir de l'adresse du logement occupé le plus longtemps, en utilisant des informations sur le trafic très postérieures (10-20 ans) à la période d'occupation du logement, ce qui a pu générer des erreurs de classement non différentielles importantes.

Nous avons essayé d'estimer le niveau de pollution environnementale liée au trafic en combinant nos indicateurs de trafic et la concentration de NO<sub>2</sub>. Cet indicateur est nettement lié aux LA. Dans la littérature, aucune étude n'a utilisé ce type de variable, mais plusieurs études ont étudié la densité de trafic qui pourrait mieux refléter une pollution de fond que le trafic lui-même. L'étude écologique de Reynolds *et al* conduite en Californie mettait en évidence une association significative faible entre le risque de LA et les enfants les plus exposés à une densité de trafic (OR=1.2 [1.0-1.4]) mais l'exposition était déterminée en assignant l'adresse des sujets à une unité géographique et un réseau de routes ce qui a pu produire une estimation moins fiable que si elle avait été déterminée individuellement (Reynolds *et al*, 2002b). Une large étude cas-témoins également de Reynolds *et al* n'a pas mis en évidence d'association entre risque de LA et l'exposition à des niveaux de densité de trafic

estimé à 150 mètres du domicile de l'enfant à la naissance (Reynolds *et al*, 2004). Dans la Northern California Childhood Leukemia Study, Von Behren *et al* ont mis en évidence une très faible association, non significative, entre LA et une forte densité de trafic (OR=1.2 [0.8-1.8]) (Von Behren *et al*, 2008).

D'autres études utilisant comme indicateurs la densité de véhicules (Norlinder 1997, Reynolds 2002), la densité de stations-service (Weng *et al*, 2009), la présence d'une station-service à proximité (Harrison *et al*, 1999) ou mitoyenne au domicile (Brosselin *et al*, 2009; Steffen *et al*, 2004b) ont toutes mis en évidence une association positive avec le risque de LA, ce qui est également évocateur d'un lien entre leucémie de l'enfant et exposition à des polluants émis par le trafic routier.

#### **4.4 Perspectives et conclusion**

Pour plusieurs des questions traitées, la littérature reste encore limitée et nos résultats nécessitent réplique et approfondissement. Une nouvelle enquête nationale, l'étude ESTELLE, a été conduite par l'équipe sur la période 2010-2011. Elle a inclus environ 750 cas de leucémie et 1500 témoins et des prélèvements ont été obtenus pour 93% des cas et 63 % des témoins, ce qui est mieux que dans nos enquêtes précédentes. ESTELLE a été conçue pour pouvoir être poolée à ESCALE et gagner ainsi de la puissance pour des expositions rares, pour des diagnostics ou sous-types diagnostiques rares, ou pour l'étude des interactions gène-environnement. Bon nombre de variables sont ainsi communes aux 2 enquêtes notamment les questions relatives aux suppléments vitaminiques pendant la grossesse.

*Le consortium international CLIC* met en commun les données d'une vingtaine de pays. L'une des analyses en cours concerne la supplémentation en folates et retrouve une association moins forte que dans notre étude avec les LAL (OR=0.82 [0.72-0.94]) et les LAM (OR= 0.52 [IC 95%: 0.31-0.88]) (Métayer *et al*., abstract soumis à l'AACR 2013). Cette analyse doit être consolidée et les interactions avec *MTHFR* et *MTRR* devraient être possibles sur au moins 3 études.

*L'étude GEOCAP*, également menée par l'équipe, constitue une approche complémentaire de celle d'ESCALE pour l'étude des expositions environnementales, notamment au trafic routier et au benzène. GEOCAP concerne l'ensemble des cas enregistrés dans le Registre National

des Hémopathies malignes de l'Enfant, sans sélection, et un échantillon représentatif de la population française de moins de 15 ans. Les expositions y sont estimées par la distance entre le domicile et les sources d'exposition, déterminée par géocodage. Des modélisations d'exposition permettent dans certains cas d'estimer un niveau d'exposition. L'étude du lien avec le trafic routier et avec la pollution de l'air liée au trafic est en cours sur les données 2002-2007 (3 000 cas et 30 000 témoins).

En conclusion, cette thèse apporte des arguments en faveur du rôle protecteur d'une supplémentation maternelle périconceptionnelle en acide folique. Elle suggère également un rôle d'une combinaison des polymorphismes de *MTHFR* et *MTRR* dans le risque des LA, sans interaction toutefois avec la supplémentation. Elle apporte des éléments cohérents en faveur d'une augmentation du risque de leucémie de l'enfant avec le trafic routier, en utilisant différents indicateurs de trafic et de pollution. Pour ces questions, les données de la littérature ne sont pas encore très nombreuses et les études en cours dans l'équipe et au CLIC permettront de prolonger la réflexion.

Nos résultats suggèrent aussi un rôle de l'exposition in utero à des produits chimiques utilisés professionnellement, comme les teintures de cheveux et les peintures ou vernis ou colles, pour lesquels la littérature est plus étoffée. L'interprétation de ces résultats est difficile du fait du faible nombre de mères exposées, de l'hétérogénéité des études précédemment publiées, et du risque de sur-déclaration des mères des cas pour des expositions professionnelles. La réflexion et les travaux (mise en commun des données) menés actuellement au sein du Childhood Leukemia International Consortium permettront d'aller plus loin dans l'interprétation de nos résultats et de ceux de la littérature.

## **5. BIBLIOGRAPHIE**



Abadi-Korek I, Stark B, Zaizov R, Shaham J (2006) Parental occupational exposure and the risk of acute lymphoblastic leukemia in offspring in Israel. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* **48** (2): 165-174

Ahlbom A, Day N, Feychting M, Roman E, Skinner J, Dockerty J, Linet M, McBride M, Michaelis J, Olsen JH, Tynes T, Verkasalo PK (2000) A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. *British Journal of Cancer* **83** (5): 692-698

AIRPARIF. Bilan: la qualité de l'air en Ile-de-France en 2009.

Alcasabas P, Ravindranath Y, Goyette G, Haller A, del Rosario L, Lesaca-Medina MY, Darga L, Ostrea EM, Taub JW, Everson RB (2008) 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and the risk of acute lymphoblastic leukemia (ALL) in Filipino children. *Pediatric Blood & Cancer* **51** (2): 178-182

Ali R, Yu CL, Wu MT, Ho CK, Pan BJ, Smith T, Christiani DC (2004) A case-control study of parental occupation, leukemia, and brain tumors in an industrial city in Taiwan. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* **46** (9): 985-992

Bagley PJ, Selhub J (1998) A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95** (22): 13217-13220

Bailey HD, Armstrong BK, de Klerk NH, Fritschi L, Attia J, Lockwood L, Milne E, Aus ALLC (2010) Exposure to Diagnostic Radiological Procedures and the Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **19** (11): 2897-2909

Bailey HD, de Klerk NH, Fritschi L, Attia J, Daubenton JD, Armstrong BK, Milne E (2011) Refuelling of vehicles, the use of wood burners and the risk of acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Paediatr Perinat Epidemiol* **25** (6): 528-39

Balta G, Yuksek N, Ozyurek E, Ertem U, Hicsonmez G, Altay C, Gurgey A (2003) Characterization of MTHFR, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes in childhood acute leukemia. *Am J Hematol* **73** (3): 154-60

Bellec S, Clavel J (2008) Reply: Childhood leukaemia and population movements in France, 1990-2003. *British Journal of Cancer* **99** (7): 1191-1191

Blondel B, Norton J, du Mazaubrun C, Breart G (2001) [Development of the main indicators of perinatal health in metropolitan France between 1995 and 1998. Results of the national perinatal survey]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **30** (6): 552-64

Blondel B, Supernant K, Du Mazaubrun C, Breart G (2006) [Trends in perinatal health in metropolitan France between 1995 and 2003: results from the National Perinatal Surveys]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **35** (4): 373-87

Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, Everson RB, Ames BN (1997) Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94** (7): 3290-3295

Bollati V, Baccarelli A, Hou LF, Bonzini M, Fustinoni S, Cavallo D, Byun HM, Jiang J, Marinelli B, Pesatori AC, Bertazzi PA, Yang AS (2007) Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. *Cancer Research* **67** (3): 876-880

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

Buckley JD, Robison LL, Swotinsky R, Garabrant DH, Lebeau M, Manchester P, Nesbit ME, Odom L, Peters JM, Woods WG, Hammond GD (1989) OCCUPATIONAL EXPOSURES OF PARENTS OF CHILDREN WITH ACUTE NONLYMPHOCYTIC LEUKEMIA - A REPORT FROM THE CHILDRENS-CANCER-STUDY-GROUP. *Cancer Research* **49** (14): 4030-4037

Buffler PA, Kwan ML, Reynolds P, Urayama KY (2005) Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: Appraising the evidence. *Cancer Investigation* **23** (1): 60-75

Bunch KJ, Muirhead CR, Draper GJ, Hunter N, Kendall GM, O'Hagan JA, Phillipson MA, Vincent TJ, Zhang W (2009) Cancer in the offspring of female radiation workers: a record linkage study. *British Journal of Cancer* **100** (1): 213-218

Chan JY, Ugrasena DG, Lum DW, Lu Y, Yeoh AE (2010) Xenobiotic and folate pathway gene polymorphisms and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia in Javanese children. *Hematol Oncol*

Chang JS, Selvin S, Metayer C, Crouse V, Golembesky A, Buffler PA (2006) Parental smoking and the risk of childhood leukemia. *American Journal of Epidemiology* **163** (12): 1091-1100

Chatzidakis K, Goulas A, Athanassiadou-Piperopoulou F, Fidani L, Kolioukas D, Mirtsou V (2006) Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism: Association with risk for childhood acute lymphoblastic leukemia and response during the initial phase of chemotherapy in Greek patients. *Pediatric Blood & Cancer* **47** (2): 147-151

Clavel J, Bellec S, Rebouissou S, Menegaux F, Feunteun J, Bonaiti-Pellie C, Baruchel A, Kebaili K, Lambilliotte A, Leverger G, Sommelet D, Lescoeur B, Beaune P, Hemon D, Lorient MA (2005) Childhood leukaemia, polymorphisms of metabolism enzyme genes, and interactions with maternal tobacco, coffee and alcohol consumption during pregnancy. *Eur J Cancer Prev* **14** (6): 531-40

Clavel J, Goubin A, Auclerc MF, Auvrignon A, Waterkeyn C, Patte C, Baruchel A, Leverger G, Nelken B, Philippe N, Sommelet D, Vilmer E, Bellec S, Perrillat-Menegaux F, Hemon D. Incidence of childhood leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma in France: National Registry of Childhood Leukaemia and Lymphoma, 1990-1999. 13, 2004a

Clavel J, Goubin A, Auclerc MF, Auvrignon A, Waterkeyn C, Patte C, Baruchel A, Leverger G, Nelken B, Philippe N, Sommelet D, Vilmer E, Bellec S, Perrillat-Menegaux F, Hemon D (2004b) Incidence of childhood leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma in France: National Registry of Childhood Leukaemia and Lymphoma, 1990-1999. *Eur J Cancer Prev* **13** (2): 97-103

Crosignani P, Tittarelli A, Borgini A, Codazzi T, Rovelli A, Porro E, Contiero P, Bianchi N, Tagliabue G, Fissi R, Rossitto F, Berrino F (2004) Childhood leukemia and road traffic: A population-based case-control study. *International Journal of Cancer* **108** (4): 596-599

de Jonge R, Tissing WJE, Hooijberg JH, Jansen G, Kaspers GJL, Lindemans J, Peters GJ, Pieters R (2009) Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **113** (10): 2284-2289

Dehe, S, Vodovar, V, Verite, V, Goujard, J (2000) Prévention primaire des anomalies de fermeture du tube neural par supplémentation périconceptionnelle en acide folique. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* **21**

Deraisme J. et Jeannée N. Géovariances. National cartography of the pollution by NO<sub>2</sub> and PM<sub>10</sub> in France. Décembre 2003.

Dockerty JD, Herbison P, Skegg DC, Elwood M (2007) Vitamin and mineral supplements in pregnancy and the risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: a case-control study. *BMC Public Health* **7**: 136

Dorak MT, Owen G, Galbraith I, Henderson N, Webb D, Mills KI, Darke C, Burnett AK (1995) Nature of HLA-associated predisposition to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **9** (5): 875-8

Drummond JT, Huang S, Blumenthal RM, Matthews RG (1993) ASSIGNMENT OF ENZYMATIC FUNCTION TO SPECIFIC PROTEIN REGIONS OF COBALAMIN-DEPENDENT METHIONINE SYNTHASE FROM ESCHERICHIA-COLI. *Biochemistry* **32** (36): 9290-9295

Duarte-Davidson R, Courage C, Rushton L, Levy L (2001) Benzene in the environment: an assessment of the potential risks to the health of the population. *Occupational and Environmental Medicine* **58** (1): 2-13

Feychting M, Svensson D, Ahlbom A (1998) Exposure to motor vehicle exhaust and childhood cancer. *Scandinavian Journal of Work Environment & Health* **24** (1): 8-11

Freedman DM, Stewart P, Kleinerman RA, Wacholder S, Hatch EE, Tarone RE, Robison LL, Linet MS (2001) Household solvent exposures and childhood acute lymphoblastic leukemia. *American Journal of Public Health* **91** (4): 564-567

French AE, Grant R, Weitzman S, Ray JG, Vermeulen MJ, Sung L, Greenberg M, Koren G (2003) Folic acid food fortification is associated with a decline in neuroblastoma. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **74** (3): 288-294

Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, Olivieri O, Jacques PF, Rosenberg IH, Corrocher R, Selhub J (2002) A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99** (8): 5606-5611

Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al. (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* **10** (1): 111-3

Gast A, Bermejo JL, Flohr T, Stanulla M, Burwinkel B, Schrappe M, Bartram CR, Hemminki K, Kumar R (2007) Folate metabolic gene polymorphisms and childhood acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Leukemia* **21** (2): 320-5

Glass DC, Reid A, Bailey HD, Milne E, Fritschi L (2012) Risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia following parental occupational exposure to pesticides. *Occupational and Environmental Medicine* **69** (11): 846-849

Greaves MF (1988) SPECULATIONS ON THE CAUSE OF CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC-LEUKEMIA. *Leukemia* **2** (2): 120-125

Greaves MF (1997) Aetiology of acute leukaemia. *Lancet* **349** (9048): 344-349

Grupp SG, Greenberg ML, Ray JG, Busto U, Lanctot KL, Nulman I, Koren G (2011) Pediatric Cancer Rates After Universal Folic Acid Flour Fortification In Ontario. *Journal of Clinical Pharmacology* **51** (1): 60-65

Harrison RM, Leung PL, Somervaille L, Smith R, Gilman E (1999) Analysis of incidence of childhood cancer in the West Midlands of the United Kingdom in relation to proximity to main roads and petrol stations. *Occupational and Environmental Medicine* **56** (11): 774-780

Hemminki K, Saloniemi I, Salonen T, Partanen T, Vainio H (1981) CHILDHOOD-CANCER AND PARENTAL OCCUPATION IN FINLAND. *Journal of Epidemiology and Community Health* **35** (1): 11-15

Ikeda S, Koyama H, Sugimoto M, Kume S (2012) Roles of One-carbon Metabolism in Preimplantation Period-Effects on Short-term Development and Long-term Programming. *Journal of Reproduction and Development* **58** (1): 38-43

Infante-Rivard C, Krajinovic M, Labuda D, Sinnett D (2000a) Parental smoking, CYP1A1 genetic polymorphisms and childhood leukemia (Quebec, Canada). *Cancer Causes Control* **11** (6): 547-53

Infante-Rivard C, Krajinovic M, Labuda D, Sinnett D (2002) Childhood acute lymphoblastic leukemia associated with parental alcohol consumption and polymorphisms of carcinogen-metabolizing genes. *Epidemiology* **13** (3): 277-81

Infante-Rivard C, Mathonnet G, Sinnett D (2000b) Risk of childhood leukemia associated with diagnostic irradiation and polymorphisms in DNA repair genes. *Environ Health Perspect* **108** (6): 495-8

Infante-Rivard C, Siemiatycki J, Lakhani R, Nadon L (2005) Maternal exposure to occupational solvents and childhood leukemia. *Environmental Health Perspectives* **113** (6): 787-792

Infante-Rivard C, Weichenthal S (2007) Pesticides and childhood cancer: An update of Zahm and Ward's 1998 review. *J Toxicol Env Health-Pt b-Crit Rev* **10** (1-2): 81-99

Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R (1996) Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* **93** (1): 7-9

Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, Ying DM, Jin F (1997) Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *Journal of the National Cancer Institute* **89** (3): 238-244

Johnson KJ, Alexander BH, Doody MM, Sigurdson AJ, Linet MS, Spector LG, Hoffbeck RW, Simon SL, Weinstock RM, Ross JA (2008) Childhood cancer in the offspring born in 1921-1984 to US radiologic technologists. *British Journal of Cancer* **99** (3): 545-550

Kamel AM, Moussa HS, Ebid GT, Bu RR, Bhatia KG (2007) Synergistic effect of methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphism as risk modifiers of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Egypt Natl Canc Inst* **19** (2): 96-105

Kheifets L, Ahlbom A, Crespi CM, Draper G, Hagihara J, Lowenthal RM, Mezei G, Oksuzyan S, Schuz J, Swanson J, Tittarelli A, Vinceti M, Wunsch V (2010) Pooled analysis of recent studies on magnetic fields and childhood leukaemia. *British Journal of Cancer* **103** (7): 1128-1135

Kim NK, Chong SY, Jang MJ, Hong SH, Kim HS, Cho EK, Lee JA, Ahn MJ, Kim CS, Oh D (2006) Association of the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in Korean patients with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Res* **26** (4B): 2879-81

Kim YI (2000) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutr Rev* **58** (7): 205-9

Kinlen L (1988) Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a Scottish new town with nuclear reprocessing sites in Britain. *Lancet* **2** (8624): 1323-7

Kluijtmans LAJ, Boers GHJ, Trijbels FJM, vanLithZanders HMA, vandenHeuvel L, Blom HJ (1997) A common 844INS68 insertion variant in the cystathionine beta-synthase gene. *Biochemical and Molecular Medicine* **62** (1): 23-25

Knox EG (1994) LEUKEMIA CLUSTERS IN CHILDHOOD - GEOGRAPHICAL ANALYSIS IN BRITAIN. *Journal of Epidemiology and Community Health* **48** (4): 369-376

Koppen IJ, Hermans FJ, Kaspers GJ (2010) Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* **148** (1): 3-14

Krajcinovic M, Lamothe S, Labuda D, Lemieux-Blanchard E, Theoret Y, Moghrabi A, Sinnott D (2004) Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **103** (1): 252-7

Kruglyak L, Nickerson DA (2001) Variation is the spice of life. *Nature Genet* **27** (3): 234-236

Lacour B, Guyot-Goubin A, Guissou S, Bellec S, Desandes E, Clavel J (2010) Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000-2004. *European Journal of Cancer Prevention* **19** (3): 173-181

Langholz B, Ebi KL, Thomas DC, Peters JM, London SJ (2002) Traffic density and the risk of childhood leukemia in a Los Angeles case-control study. *Annals of Epidemiology* **12** (7): 482-487

Lightfoot TJ, Johnston WT, Painter D, Simpson J, Roman E, Skibola CF, Smith MT, Allan JM, Taylor GM (2010) Genetic variation in the folate metabolic pathway and risk of childhood leukemia. *Blood* **115** (19): 3923-9

Lyons RA, Monaghan SP, Heaven M, Littlepage BNC, Vincent TJ, Draper GJ (1995) INCIDENCE OF LEUKEMIA AND LYMPHOMA IN YOUNG-PEOPLE IN THE VICINITY OF THE PETROCHEMICAL PLANT AT BAGLAN BAY, SOUTH WALES, 1974 TO 1991. *Occupational and Environmental Medicine* **52** (4): 225-228

Marchini J, Howie B (2010) Genotype imputation for genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* **11** (7): 499-511

McKinney PA, Fear NT, Stockton D, Investigat UKCCS (2003) Parental occupation at periconception: findings from the United Kingdom Childhood Cancer Study. *Occupational and Environmental Medicine* **60** (12): 901-909

Meinert R, Kaletsch U, Kaatsch P, Schuz J, Michaelis J (1999) Associations between childhood cancer and ionizing radiation: Results of a population-based case-control study in Germany. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **8** (9): 793-799

Metayer C, Scelo G, Chokkalingam AP, Barcellos LF, Aldrich MC, Chang JS, Guha N, Urayama KY, Hansen HM, Block G, Kiley V, Wiencke JK, Wiemels JL, Buffler PA (2011) Genetic variants in the folate pathway and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Causes & Contro* **22** (9): 1243-1258

Milne E, de Klerk NH, van Bockxmeer F, Kees UR, Thompson JR, Baker D, Armstrong BK (2006) Is there a folate-related gene-environment interaction in the etiology of childhood acute lymphoblastic leukemia? *International Journal of Cancer* **119** (1): 229-232

Milne E, Royle JA, Miller M, Bower C, de Klerk NH, Bailey HD, van Bockxmeer F, Attia J, Scott RJ, Norris MD, Haber M, Thompson JR, Fritschi L, Marshall GM, Armstrong BK (2010) Maternal folate and other vitamin supplementation during pregnancy and risk of acute lymphoblastic leukemia in the offspring. *Int J Cancer* **126** (11): 2690-9

Mitchell AA, Cottler LB, Shapiro S (1986) Effect of questionnaire design on recall of drug exposure in pregnancy. *Am J Epidemiol* **123** (4): 670-6

Mutanen P, Hemminki K (2001) Childhood cancer and parental occupation in the Swedish family-cancer database. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* **43** (11): 952-958

Nordlinder R, Jarvholm B (1997) Environmental exposure to gasoline and leukemia in children and young adults - An ecology study. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **70** (1): 57-60

- Nothnagel M, Ellinghaus D, Schreiber S, Krawczak M, Franke A (2009) A comprehensive evaluation of SNP genotype imputation. *Hum Genet* **125** (2): 163-71
- Oliveira E, Alves S, Quental S, Ferreira F, Norton L, Costa V, Amorim A, Prata MJ (2005) The MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia in Portugal. *J Pediatr Hematol Oncol* **27** (8): 425-9
- Olteanu H, Munson T, Banerjee R (2002) Differences in the efficiency of reductive activation of methionine synthase and exogenous electron acceptors between the common polymorphic variants of human methionine synthase reductase. *Biochemistry* **41** (45): 13378-85
- Orsi L, Rudant J, Bonaventure A, Goujon-Bellec S, Corda E, Evans TJ, Petit A, Bertrand Y, Nelken B, Robert A, Michel G, Sirvent N, Chastagner P, Ducassou S, Riolland X, Hemon D, Milne E, Scott RJ, Baruchel A, Clavel J (2012) Genetic polymorphisms and childhood acute lymphoblastic leukemia: GWAS of the ESCALE study (SFCE). *Leukemia* **26** (12): 2561-2564
- Papaemmanuil E, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, Price A, Olver B, Sheridan E, Kinsey SE, Lightfoot T, Roman E, Irving JAE, Allan JM, Tomlinson IP, Taylor M, Greaves M, Houlston RS (2009) Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genet* **41** (9): 1006-U73
- Pearson RL, Wachtel H, Ebi KL (2000) Distance-weighted traffic density in proximity to a home is a risk factor for leukemia and other childhood cancers. *Journal of the Air & Waste Management Association* **50** (2): 175-180
- Pereira TV, Rudnicki M, Pereira AC, Pombo-De-Oliveira MS, Franco RF (2006a) 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and acute lymphoblastic leukemia risk: A meta-analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **15** (10): 1956-1963
- Pereira TV, Rudnicki M, Pereira AC, Pombo-De-Oliveira MS, Franco RF (2006b) Do polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene affect the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia? *European Journal of Epidemiology* **21** (12): 885-886
- Petra BG, Janez J, Vita D (2007) Gene-gene interactions in the folate metabolic pathway influence the risk for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leuk Lymphoma* **48** (4): 786-92
- Raaschou-Nielsen O, Hertel O, Thomsen BL, Olsen JH (2001) Air pollution from traffic at the residence of children with cancer. *American Journal of Epidemiology* **153** (5): 433-443
- RaaschouNielsen O, Skov H, Lohse C, Thomsen BL, Olsen JH (1997) Front-door concentrations and personal exposures of Danish children to nitrogen dioxide. *Environmental Health Perspectives* **105** (9): 964-970

Reddy H, Jamil K (2006) Polymorphisms in the MTHFR gene and their possible association with susceptibility to childhood acute lymphocytic leukemia in an Indian population. *Leukemia & Lymphoma* **47** (7): 1333-1339

Reid A, Glass DC, Bailey HD, Milne E, Armstrong BK, Alvaro F, Fritschi L (2011) Parental occupational exposure to exhausts, solvents, glues and paints, and risk of childhood leukemia. *Cancer Causes Control* **22** (11): 1575-85

Reynolds P, Elkin E, Scalf R, Von Behren J, Neutra RR (2001) A case-control pilot study of traffic exposures and early childhood leukemia using a geographic information system. *Bioelectromagnetics*: S58-S68

Reynolds P, Von Behren J, Gunier RB, Goldberg DE, Hertz A (2004) Residential exposure to traffic in California and childhood cancer. *Epidemiology* **15** (1): 6-12

Reynolds P, Von Behren J, Gunier RB, Goldberg DE, Hertz A, Smith D (2002a) Traffic patterns and childhood cancer incidence rates in California, United States. *Cancer Causes Control* **13** (7): 665-73

Reynolds P, Von Behren J, Gunier RB, Goldberg DE, Hertz A, Smith D (2002b) Traffic patterns and childhood cancer incidence rates in California, United States. *Cancer Causes & Control* **13** (7): 665-673

Rinsky RA (1989) BENZENE AND LEUKEMIA - AN EPIDEMIOLOGIC RISK ASSESSMENT. *Environmental Health Perspectives* **82**: 189-191

Roman E, Doyle P, Ansell P, Bull D, Beral V (1996) Health of children born to medical radiographers. *Occupational and Environmental Medicine* **53** (2): 73-79

Roman E, Watson A, Beral V, Buckle S, Bull D, Baker K, Ryder H, Barton C (1993) CASE-CONTROL STUDY OF LEUKEMIA AND NON-HODGKINS-LYMPHOMA AMONG CHILDREN AGED 0-4 YEARS LIVING IN WEST-BERKSHIRE AND NORTH-HAMPSHIRE HEALTH DISTRICTS. *British Medical Journal* **306** (6878): 615-621

Ross JA, Spector LG, Robison LL, Olshan AF (2005) Epidemiology of leukemia in children with Down syndrome. *Pediatr Blood Cancer* **44** (1): 8-12

Rouget F, Monfort C, Bahuau M, Nelva A, Herman C, Francannet C, Robert-Gnansia E, Cordier S (2005) Periconceptional folates and the prevention of orofacial clefts: role of dietary intakes in France. *Revue D Epidemiologie Et De Sante Publique* **53** (4): 351-360

Rozen R (1997) Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: Deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thrombosis and Haemostasis* **78** (1): 523-526

Rudant J, Baccaini B, Ripert M, Goubin A, Bellec S, Hemon D, Clavel J (2006a) Population-mixing at the place of residence at the time of birth and incidence of childhood leukaemia in France. *Eur J Cancer* **42** (7): 927-33

Rudant J, Baccaini B, Ripert M, Goubin A, Bellec S, Hemon D, Clavel J (2006b) Population mixing at the place of residence at the time of birth and incidence of childhood leukemia in France. *Epidemiology* **17** (6): S115-S116

Sans S, Elliott P, Kleinschmidt I, Shaddick G, Pattenden S, Walls P, Grundy C, Dolk H (1995) CANCER INCIDENCE AND MORTALITY NEAR THE BAGLAN BAY PETROCHEMICAL WORKS, SOUTH WALES. *Occupational and Environmental Medicine* **52** (4): 217-224

Savitz DA, Feingold L (1989) ASSOCIATION OF CHILDHOOD-CANCER WITH RESIDENTIAL TRAFFIC DENSITY. *Scandinavian Journal of Work Environment & Health* **15** (5): 360-363

Scelo G, Metayer C, Zhang LP, Wiemels JL, Aldrich MC, Selvin S, Month S, Smith MT, Buffler PA (2009) Household Exposure to Paint and Petroleum Solvents, Chromosomal Translocations, and the Risk of Childhood Leukemia. *Environmental Health Perspectives* **117** (1): 133-139

Schnakenberg E, Mehles A, Cario G, Rehe K, Seidemann K, Schlegelberger B, Elsner HA, Welte KH, Schrappe M, Stanulla M (2005) Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and susceptibility to pediatric acute lymphoblastic leukemia in a German study population. *Bmc Medical Genetics* **6**

Schulze-Rath R, Hammer GP, Blettner M (2008) Are pre- or postnatal diagnostic X-rays a risk factor for childhood cancer? A systematic review. *Radiation and Environmental Biophysics* **47** (3): 301-312

Schuz J, Kaletsch U, Meinert R, Kaatsch P, Michaelis J (2000) Risk of childhood leukemia and parental self-reported occupational exposure to chemicals, dusts, and fumes: Results from pooled analyses of German population-based case-control studies. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **9** (8): 835-838

Schuz J, Wehkopf T, Kaatsch P (2007) Medication use during pregnancy and the risk of childhood cancer in the offspring. *European Journal of Pediatrics* **166** (5): 433-441

Shaw AK, Infante-Rivard C, Morrison HI (2004) Use of medication during pregnancy and risk of childhood leukemia (Canada). *Cancer Causes & Control* **15** (9): 931-937

Shu XO, Gao YT, Brinton LA, Linet MS, Tu JT, Zheng W, Fraumeni JF (1988) A POPULATION-BASED CASE CONTROL STUDY OF CHILDHOOD LEUKEMIA IN SHANGHAI. *Cancer* **62** (3): 635-644

Shu XO, Ross JA, Pendergrass TW, Reaman GH, Lampkin B, Robison LL (1996) Parental alcohol consumption, cigarette smoking, and risk of infant leukemia: A childrens cancer group study. *Journal of the National Cancer Institute* **88** (1): 24-31

Shu XO, Stewart P, Wen WQ, Han DH, Potter JD, Buckley JD, Heineman E, Robison LL (1999) Parental occupational exposure to hydrocarbons and risk of acute lymphocytic leukemia in offspring. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **8** (9): 783-791

Sinnott D, N'Diaye N, Labuda D, Krajcinovic M (2006) [Genetic determinants of childhood leukemia]. *Bull Cancer* **93** (9): 857-65

Sorahan T, Lancashire RJ, Hulten MA, Peck I, Stewart AM (1997) Childhood cancer and parental use of tobacco: Deaths from 1953 to 1955. *British Journal of Cancer* **75** (1): 134-138

Sorahan T, McKinney PA, Mann JR, Lancashire RJ, Stiller CA, Birch JM, Dodd HE, Cartwright RA (2001) Childhood cancer and parental use of tobacco: findings from the inter-regional epidemiological study of childhood cancer (IRESCC). *British Journal of Cancer* **84** (1): 141-146

Steffen C, Auclerc MF, Auvrignon A, Baruchel A, Kebaili K, Lambilliotte A, Leverger G, Sommelet D, Vilmer E, Hemon D, Clavel J (2004a) Acute childhood leukaemia and environmental exposure to potential sources of benzene and other hydrocarbons; a case-control study. *Occup Environ Med* **61** (9): 773-8

Steffen C, Auclerc MF, Auvrignon A, Baruchel A, Kebaili K, Lambilliotte A, Leverger G, Sommelet D, Vilmer E, Hemon D, Clavel J (2004b) Acute childhood leukaemia and environmental exposure to potential sources of benzene and other hydrocarbons; a case-control study. *Occupational and Environmental Medicine* **61** (9): 773-778

Stiller CA (2004) Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene* **23** (38): 6429-44

Sung TI, Wang JD, Chen PC (2008) Increased risk of cancer in the offspring of female electronics workers. *Reproductive Toxicology* **25** (1): 115-119

Teschke K, Kennedy SM, Olshan AF (1994) Effect of different questionnaire formats on reporting of occupational exposures. *Am J Ind Med* **26** (3): 327-37

Teschke K, Smith JC, Olshan AF (2000) Evidence of recall bias in volunteered vs. prompted responses about occupational exposures. *Am J Ind Med* **38** (4): 385-8

Thirumaran RK, Gast A, Flohr T, Burwinkel B, Bartram C, Hemminki K, Kumar R (2005) MTHFR genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **106** (7): 2590-1; author reply 2591-2

Thompson JR, Gerald PF, Willoughby ML, Armstrong BK (2001) Maternal folate supplementation in pregnancy and protection against acute lymphoblastic leukaemia in childhood: a case-control study. *Lancet* **358** (9297): 1935-40

Tong N, Fang Y, Li J, Wang M, Lu Q, Wang S, Tian Y, Rong L, Sun J, Xu J, Zhang Z (2010) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, serum methylenetetrahydrofolate reductase levels, and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population. *Cancer Sci* **101** (3): 782-6

Trevino LR, Yang WJ, French D, Hunger SP, Carroll WL, Devidas M, Willman C, Neale G, Downing J, Raimondi SC, Pui CH, Evans WE, Relling MV (2009) Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genet* **41** (9): 1001-U67

Turner MC, Wigle DT, Krewski D (2011) Residential pesticides and childhood leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Ciencia & Saude Coletiva* **16** (3): 1915-1931

Urayama KY, Wiencke JK, Buffler PA, Chokkalingam AP, Metayer C, Wiemels JL (2007) MDR1 gene variants, indoor insecticide exposure, and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16** (6): 1172-7

Van Maele-Fabry G, Lantin A-C, Hoet P, Lison D (2010) Childhood leukaemia and parental occupational exposure to pesticides: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes & Control* **21**( 6): 787-809

Vijayakrishnan J, Houlston RS (2010a) Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Haematologica* **95** (8): 1405-14

Vijayakrishnan J, Houlston RS (2010b) Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Haematologica-the Hematology Journal* **95** (8): 1405-1414

Vinceti M, Rothman KJ, Crespi CM, Sterni A, Cherubini A, Guerra L, Maffei G, Ferretti E, Fabbi S, Teggi S, Consonni D, De Girolamo G, Meggiato A, Palazzi G, Paolucci P, Malagoli C (2012) Leukemia risk in children exposed to benzene and PM10 from vehicular traffic: a case-control study in an Italian population. *European Journal of Epidemiology* **27** (10): 781-790

Vinson F, Merhi M, Baldi I, Raynal H, Gamet-Payrastre L (2011) Exposure to pesticides and risk of childhood cancer: a meta-analysis of recent epidemiological studies. *Occupational and Environmental Medicine* **68** (9): 694-702

Visser O, van Wijnen JH, van Leeuwen FE (2004) Residential traffic density and cancer incidence in Amsterdam, 1989-1997. *Cancer Causes & Control* **15** (4): 331-339

Von Behren J, Reynolds P, Gunier RB, Rull RP, Hertz A, Urayama KY, Kronish D, Buffler PA (2008) Residential traffic density and childhood leukemia risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **17** (9): 2298-2301

Wang J, Zhan P, Chen B, Zhou R, Yang Y, Ouyang J (2010) MTHFR C677T polymorphisms and childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Leuk Res* **34** (12): 1596-600

Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R (1998) A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Molecular Genetics and Metabolism* **64** (3): 169-172

Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Curtis Ellison R, Eckfeldt JH, Rozen R (2001) The 1298A-->C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* **156** (2): 409-15

Weng HH, Tsai SS, Chen CC, Chiu HF, Wu TN, Yang CY (2008) Childhood leukemia development and correlation with traffic air pollution in Taiwan using nitrogen dioxide as an air pollutant marker. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* **71** (7): 434-438

Weng HH, Tsai SS, Chiu HF, Wu TN, Yang CY (2009) Childhood Leukemia and Traffic Air Pollution in Taiwan: Petrol Station Density as an Indicator. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* **72** (2): 83-87

Whitworth KW, Symanski E, Coker AL (2008) Childhood Lymphohematopoietic Cancer Incidence and Hazardous Air Pollutants in Southeast Texas, 1995-2004. *Environmental Health Perspectives* **116** (11): 1576-1580

Wiemels J (2012) Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chemico-Biological Interactions* **196** (3): 59-67

Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF (2001) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (7): 4004-9

Wigle DT, Turner MC, Krewski D (2009) A Systematic Review and Meta-analysis of Childhood Leukemia and Parental Occupational Pesticide Exposure. *Environmental Health Perspectives* **117** (10): 1505-1513

Wilkinson P, Thakrar B, Walls P, Landon M, Falconer S, Grundy C, Elliott P (1999) Lymphohaematopoietic malignancy around all industrial complexes that include major oil refineries in Great Britain. *Occup Environ Med* **56** (9): 577-80

Yan J, Yin M, Dreyer ZE, Scheurer ME, Kamdar K, Wei Q, Okcu MF (2011) A meta-analysis of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and risk of acute lymphoblastic leukemia in children. *Pediatr Blood Cancer*

Yang L, Liu L, Wang JX, Qiu LG, Mi YC, Ma XT, Xiao ZJ (2011) Polymorphisms in folate-related genes: impact on risk of adult acute lymphoblastic leukemia rather than pediatric in Han Chinese. *Leukemia & Lymphoma* **52** (9): 1770-1776

Yeoh AEJ, Lu Y, Chan JYS, Chan YH, Ariffin H, Kham SKY, Quah TC (2010) Genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia shows protection in Malay boys: Results from the Malaysia-Singapore ALL Study Group. *Leukemia Research* **34** (3): 276-283

Zanrosso CW, Hatagima A, Emerenciano M, Ramos F, Figueiredo A, Felix TM, Segal SL, Guigliani R, Muniz MTC, Pombo-de-Oliveira MS (2006) The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population. *Leukemia Research* **30** (4): 477-481

Zintzaras E, Koufakis T, Ziakas PD, Rodopoulou P, Giannouli S, Voulgarelis M (2006) A meta-analysis of genotypes and haplotypes of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Epidemiol* **21** (7): 501-10

## **6. ANNEXES**



Tableau 1. Métier exercé par les mères déclarant une exposition aux peintures ou vernis et/ou colle lors de la grossesse.

Professions exposées aux peintures ,verniss ou colles lors de la grossesse	Codes BIT	<1 h/semaine		≥1 h/semaine	
		Témoins	Cas	Témoins	Cas
<b>Education, social</b>		<b>11</b>	<b>5</b>	<b>20</b>	<b>5</b>
Enseignantes	13000, 13320, 13200, 13250, 13145	6	3	11	2
Animatrices, éducatrices, assistantes maternelles, ATSEM	19330, 13490, 19390, 54090, 54035	5	1	7	3
AMP, assistantes sociales	19390, 19310	0	1	2	0
Architectes, dessin industriel, graphistes, modélistes	2120, 16230, 3220, 16240	2	1	3	0
Peintres, décoratrices, tapissière ameublement, costumière	16230, 16130, 16290, 79620, 79190	0	1	4	1
Chargée de production (théâtre)	17420	1	0	0	0
Laqueur vernisseur sur bois	93920	0	0	0	1
Coordinatrice sur chantier	2890	0	0	1	0
Pose enseigne publicitaire	85590	0	0	0	1
Chef équipe usine, ouvrières, agent de production	70090, 79640, 75000, 85390, 85320, 85330, 80200, 81120, 87200, 97145, 74990, 89900, 94990, 97145, 70060, 70000	2	1	8	9
<b>Secteur médical, paramédical et recherche</b>		<b>3</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>2</b>
Monteur optique, prothésiste dentaire	7530, 84250	0	0	2	0
Infirmières, aides soignantes, gynécologue	7130, 59940, 6120	2	4	1	1
Auxiliaires de puériculture, psychomotricienne, ergothérapeute	7630, 54090	1	0	3	0
Chercheuse, technicienne de labo	7110	0	1	1	0
Préparatrice pharmacie	6810	0	0	0	1
Déléguée médicale	43220	1	0	0	0
Chercheuse, technicienne de labo	1110, 5430	0	1	1	0
<b>Administration</b>		<b>11</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>6</b>
Documentaliste scientifique, magasinier bibliothèque	19190, 39520	0	0	1	1
Employé de bureau, secrétaire	31010, 32120, 39430	4	4	2	2
Comptables, aide comptables	33110, 33120	1	1	0	3
Clerc de notaire	39340	0	0	1	0
Gestionnaire	21950	1	0	0	0
Gérante de portefeuilles	33940	1	0	0	0
Responsable administrative	21940	1	0	0	0
Chargée de clientèle	21990	1	1	0	0
Rédactrice	31010	1	0	0	0
Rédactrice technique	15965	0	1	0	0
Intermittente à la poste	33170	1	0	0	0
Militaire	31010	1	0	0	0

Professions exposées aux peintures , vernis ou colles lors de la grossesse	Codes BIT	<1 h/semaine		≥1 h/semaine	
<b>Vente, commerce, distribution</b>		<b>4</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2</b>
Chef de produit tourisme, conseillère en tourisme	39440, 19990	0	1	1	0
Assistante commerce	42190	0	0	1	0
Vendeuses, commerçantes, caissières	43120, 45130, 33160, 41030	3	1	0	1
Chef de rayon hypermarché, employé de rayon	42130, 45190	1	0	1	0
Adjointe service expédition maroquinerie, chef de file	39120, 42130	0	0	1	1
<b>Services</b>		<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>5</b>
Coiffeuse, esthéticienne	57020, 57040	0	1	1	1
Femme de ménage, agent de service, gardienne d'immeuble	55220, 55120, 53220	1	1	2	4
Commissaire de parcours club golf	53210	0	1	0	0

Tableau 2. Comparaison chez les témoins des enfants dont les mères avaient pris une supplémentation en acide folique lors de la grossesse par rapport à ceux dont les mères n'avaient pas été supplémentées.

	pas prise d'acide folique par les mères		prise d'acide folique par les mères		p (Khi-2)
	n	%	n	%	
<b>Niveau d'étude maternel</b>					
BAC+2 et diplôme de l'enseignement supérieur	572	40%	94	55%	
BAC	275	19%	35	20%	
CAP, BEP	450	31%	29	17%	
Aucun diplôme	141	10%	14	8%	<0.001
<b>Catégorie socioprofessionnelle du foyer</b>					
Directeurs, professions intellectuelles et intermédiaires	593	41%	88	51%	
Métiers administratifs et commerciaux	410	29%	46	27%	
Métiers de services	192	13%	14	8%	
Ouvriers d'usine et agricoles, sans emploi	244	17%	24	14%	0.05
<b>Zone de résidence lors de l'interview</b>					
Rurale	527	37%	55	32%	
Intermédiaire	340	24%	34	20%	
Urbaine	572	41%	83	48%	0.1

Tableau 3. Analyses stratifiées de la supplémentation maternelle périconceptionnelle en acide folique et le risque de leucémie aigüe de l'enfant sur les polymorphismes de *MTHFR* et *MTRR* en 2 catégories.

	homozygotes ancestraux				hétérozygotes ou homozygotes mutés			
	Témoins	LA <sup>1</sup>	OR	[IC 95%] <sup>2</sup>	Témoins	LA <sup>1</sup>	OR	[IC 95%] <sup>2</sup>
<b>rs1801133 (C677T)</b>								
non	154	173	<b>1.0</b>	Réf.	206	274	<b>1.0</b>	Réf.
oui	15	4	<b>0.2</b>	[0.1-0.8]	29	14	<b>0.3</b>	[0.2-0.7]
données manquantes	9	14			14	14		
<b>rs1801131 (A1298C)</b>								
non	178	193	<b>1.0</b>	Réf.	195	227	<b>1.0</b>	Réf.
oui	21	11	<b>0.5</b>	[0.2-1.1]	23	6	<b>0.2</b>	[0.1-0.5]
données manquantes	9	8			15	17		
<b>rs1801394 (A66G)</b>								
non	82	111	<b>1.0</b>	Réf.	291	310	<b>1.0</b>	Réf.
oui	9	5	<b>0.4</b>	[0.1-1.5]	35	12	<b>0.3</b>	[0.1-0.6]
données manquantes	4	5			20	21		
<b>rs1532268 (C524T)</b>								
non	147	164	<b>1.0</b>	Réf.	226	283	<b>1.0</b>	Réf.
oui	23	7	<b>0.3</b>	[0.1-0.7]	21	11	<b>0.4</b>	[0.2-1.0]
données manquantes	11	9			13	19		

<sup>1</sup>OR estimé par régression logistique et ajusté sur les variables de stratification âge-sexe et la CSP

## Folic acid supplementation, *MTHFR* and *MTRR* polymorphisms, and the risk of childhood leukemia: the ESCALE study (SFCE)

Alicia Amigou · Jérémie Rudant · Laurent Orsi · Stéphanie Goujon-Bellec · Guy Leverger · André Baruchel · Yves Bertrand · Brigitte Nelken · Geneviève Plat · Gérard Michel · Stéphanie Haouy · Pascal Chastagner · Stéphane Ducassou · Xavier Rialland · Denis Hémon · Jacqueline Clavel

Received: 14 February 2012 / Accepted: 24 May 2012 / Published online: 16 June 2012  
 © Springer Science+Business Media B.V. 2012

### Abstract

**Purpose** Fetal folate deficiency may increase the risk of subsequent childhood acute leukemia (AL), since folates are required for DNA methylation, synthesis, and repair, but the literature remains scarce. This study tested the hypothesis that maternal folic acid supplementation before or during pregnancy reduces AL risk, accounting for the SNPs rs1801133 (C677T) and rs1801131 (A1298C) in *MTHFR* and rs1801394 (A66G) and rs1532268 (C524T) in *MTRR*, assumed to modify folate metabolism.

**Methods** The nationwide registry-based case–control study, ESCALE, carried out in 2003–2004, included 764

AL cases and 1,681 controls frequency matched with the cases on age and gender. Information on folic acid supplementation was obtained by standardized telephone interview. The genotypes were obtained using high-throughput platforms and imputation for untyped polymorphisms. Odds ratios (OR) were estimated using unconditional regression models adjusted for potential confounders.

**Results** AL was significantly inversely associated with maternal folic acid supplementation before and during pregnancy (OR = 0.4; 95 % confidence interval: [0.3–0.6]). *MTHFR* and *MTRR* genetic polymorphisms were not associated with AL. However, AL was positively associated with homozygosity for any of the *MTHFR* polymorphisms and carriership of both *MTRR* variant

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10552-012-0004-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Amigou (✉) · J. Rudant · L. Orsi · S. Goujon-Bellec · D. Hémon · J. Clavel  
 Environmental Epidemiology of Cancer, Inserm, U1018, CESP, Villejuif, France  
 e-mail: alicia.amigou@inserm.fr

A. Amigou · J. Rudant · L. Orsi · S. Goujon-Bellec · D. Hémon · J. Clavel  
 Registre National des Hémopathies malignes de l'Enfant, Université Paris-Sud 11, UMRS 1018, 16, avenue Paul Vaillant-Couturier, 94807 Villejuif, France

J. Rudant · S. Goujon-Bellec · J. Clavel  
 RNHE, National Registry of Childhood Hematopoietic Malignancies, Villejuif, France

G. Leverger  
 AP-HP, Hôpital Armand Trousseau, Paris, France

G. Leverger  
 Université Paris 6 Pierre et Marie Curie, Paris, France

A. Baruchel  
 AP-HP, Hôpital Robert Debré, Paris, France

A. Baruchel  
 Université Paris 7, Paris, France

Y. Bertrand  
 Institut d'Hémo-Oncologie Pédiatrique, Lyon, France

B. Nelken  
 Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU, Lille, France

B. Nelken  
 Université Lille Nord de France, 59000 Lille, France

G. Plat  
 Hôpital des Enfants, Toulouse, France

G. Michel  
 AP-HM, Hôpital la Timone, Marseille, France

alleles (OR = 1.6 [0.9–3.1]). No interaction was observed between *MTHFR*, *MTRR*, and maternal folate supplementation.

**Conclusion** The study findings support the hypothesis that maternal folic acid supplementation may reduce the risk of childhood AL. The findings also suggest that the genotype homozygous for any of the *MTHFR* variants and carrying both *MTRR* variants could be a risk factor for AL.

**Keywords** Childhood leukemia · Folic acid · Metabolism · *MTHFR* · *MTRR* · Gene–environment interaction

## Introduction

Leukemia is the most common childhood cancer with about 470 new cases diagnosed each year in France [1, 2]. A few cases are explained by high doses of ionizing radiation, Down syndrome, a few rare genetic disorders, and certain chemotherapies, but the etiology of most cases of childhood leukemia remains largely unknown [3–5].

Several studies, 5 case–control studies [6, 9–12] and one incidence study [7, 8], investigated the hypothesis that maternal folic acid supplementation before or during pregnancy reduces the risk of childhood acute leukemia (AL), since folates are required for DNA methylation, synthesis, and repair. In addition, many studies [13–33] have attempted to correlate genetic polymorphisms of the folate metabolism pathway, mostly *MTHFR* polymorphisms, with susceptibility to childhood AL. They yielded inconsistent results. Most of them did not take maternal folic acid supplementation levels or folate status into account and did not investigate gene–environment interactions.

*MTHFR* activity is reduced in carriers of *MTHFR* C677T variant polymorphisms, and the reduction is greater among homozygotes (60–70 %) than among heterozygotes (35–40 %) [34].

The A1298C variant of *MTHFR* also reduces *MTHFR* activity, albeit less markedly than the C677T variant [35]. Individuals carrying the A1298C variant allele do not appear to have higher serum homocysteine levels than homozygotes for the common allele A [36], but another study has suggested that heterozygosity for both variants A1298C and C677T has the same biochemical profile as homozygosity for the C677T variant [35].

The *MTRR* polymorphisms have been less studied. The *MTRR* A66G polymorphism decreases enzyme affinity for methionine synthase MTR [37].

The association between maternal folic acid supplementation before and during pregnancy and the risk of childhood AL in the national population-based case–control study, ESCALE, was analyzed. The roles of *MTHFR* and *MTRR* common polymorphisms, which are assumed to modify folate metabolism, were investigated.

## Materials and methods

The ESCALE study was a national study conducted in 2003 and 2004 in mainland France (11 million children aged less than 15 years old) to investigate the role of infectious, environmental, and genetic factors in four childhood neoplastic diseases (AL, lymphoma, neuroblastoma, and brain tumor) [38–42]. This paper focuses on AL.

### Case and control ascertainment

#### Cases

The cases were identified directly by the investigators of the French National Registry of Childhood Hematopoietic Malignancies (NRCH) [1] assigned to each pediatric oncology hospital department (Sect. Appendix). Eligible cases were children first diagnosed with one of the cancers under study between 1 January 2003 and 31 December 2004, aged less than 15 years, and resident in mainland France at the time of diagnosis. Cases who had been adopted, or whose biological mother could not be interviewed because she had died (10 cases), did not speak French (29 cases), or presented with a serious psychiatric disorder (15 cases), were not eligible. For ethical reasons, the mothers of children who had died (34 cases) or who were receiving hospital palliative care (7 cases) were not contacted. Of the 937 cases of AL identified during the study period, 843 cases were eligible. Out of the 843 eligible AL cases, 764 cases, consisting in 648 cases of acute lymphoblastic leukemia (ALL), 101 cases of acute myeloblastic leukemia (AML), and 15 cases of undifferentiated or biphenotypic AL, consented to participate (91 %). The cases were confirmed, documented, and classified by

S. Haouy  
Hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France

P. Chastagner  
CHU de Nancy, Vandoeuvre, France

S. Ducassou  
Hôpital Pellegrin Tripode, Bordeaux, France

X. Rialland  
Hôpital Mère-Enfant, CHU-Nantes, Nantes, France

X. Rialland  
CHU d'Angers, Angers, France

leukemia cytological and immunological subtype by the NRCH.

### Controls

The controls were selected from the French population in the years 2003 and 2004 using a quota-sampling method. A base of 60,000 phone numbers was randomly extracted from the national telephone directory. The set was representative of the population in terms of the administrative regions and urbanization. By incrementing each number by 1, a new set of 60,000 numbers was generated. The new set included unlisted numbers and had geographic and demographic distributions similar to those of the initial set (same first six digits, which determine the location of the line). Quotas were applied to make the age and gender distribution of the controls similar to that of all the ESCALE cases, based on estimates from the NRCH [1] and the Regional Childhood Cancer Registries [43], with age group: 0–1, 2, 3, 4, 5–6, 7–8, 9–11, and 12–14 years. The number of children <15 years of age in the household was forced to reflect that of the population by using quotas to prevent bias in the distribution of birth order, which may occur if the probability of a control being selected among phone subscribers depends on the size of the sibship. The expected number of children <15 years of age living in the household for a given age was obtained from the 1999 population census [INSEE (National Institute for Statistics and Economic Studies) 1999]. Thus, there were 48 quota strata: age (8 strata), gender (2 strata), and the number of children per household (1, 2, 3, or more). The controls were children free from cancer, who had not been adopted, whose biological mother was alive, who were free from serious psychiatric disorders, and who were French speaking. Out of the 50,217 phone numbers dialed, 22,584 did not connect to a household, 24,411 connected to ineligible households, and 862 to respondents who hung up before eligibility could be checked. The 2,361 remaining numbers were considered to be those of eligible households, 679 of which refused to participate. Thus, 1,681 mothers were interviewed (71.2 %).

### Data collection

Using structured questionnaires, the same trained interviewers carried out the telephone interviews of the biological mothers of the cases and controls. Half of the cases' mothers were interviewed <4 months after the diagnosis (range: 1–24 months). The telephone questionnaire elicited information on demographic and socioeconomic characteristics, childhood medical history, childhood environment and lifestyle, and birth characteristics. The interviews also elicited parental occupational history, maternal exposure,

and familial history of cancer, allergy and autoimmune disease, as well as the grandparent's countries of birth. The mothers were also asked to indicate whether they had taken folic acid or multivitamin supplements in the month preceding conception and in the first, second, and last quarter of the pregnancy. "Maternal folic acid supplementation" refers to maternal courses of supplements containing folic acid at a minimum dosage of 0.4 mg/day, while "multivitamin supplementation" refers to vitamin supplementation potentially containing folic acid at any dosage. The professional category of the parents was the higher of the maternal and paternal occupations at interview and was coded using the two-digit ILO classification (International Labor Organization, 1988). This variable was used as an indicator of socioeconomic status (SES).

With the parents' consent, blood samples were obtained from 729 (95.4 %) of the AL cases. Genome-wide genotyping was carried out on an Illumina 370 K Quad platform for the 588 AL cases from whom sufficient DNA had been obtained. The 6 cases with Down's syndrome and the 47 cases who did not comply with the quality control requirements were excluded from the analyses. The remaining 535 cases were successfully typed for 339,258 SNPs, with individual call rates of at least 97 %.

Saliva samples were obtained from 810 (48.2 %) of the controls, with parental consent, but 240 of the samples did not contain quantitatively or qualitatively sufficient DNA. The 570 remaining controls were genotyped for 4,551 selected SNPs using Infinium iSelect custom BeadChips, in compliance with the Illumina Infinium protocol. The individual call rate was greater than 95 % for 461 of the controls (80.9 %).

The comparability of the genotyping methods used for the cases and controls was checked by re-genotyping 96 cases on the platform used for the controls. The genotypes obtained by the 2 platforms were totally concordant.

Four polymorphisms were considered candidates in the present study because they were located within the genes *MTHFR* [rs1801131 (A1298C) and rs1801133 (C677T)] and *MTRR* [rs1801394 (A66G) and rs1532268 (C524T)] involved in folate metabolism. The SNPs rs1801133 and rs1532268 were genotyped for both the cases and controls, while rs1801131 and rs1801394 were only genotyped for the controls. The latter 2 SNPs were imputed for the cases using IMPUTE Version 2 software [44] from the SNPs located in the gene of interest or on either side of it ( $\pm 100,000$  bp), provided that they did not deviate significantly from the Hardy–Weinberg equilibrium in the controls. The CEU individuals of the 1000 Genomes Project (low coverage database) and the HapMap Project (Phases I + II + III release #28 database) were taken as a reference. One hundred iterations were performed, the first 20 of which (burn-in) were dropped. Imputation quality was assessed using the IMPUTE criteria *Info*

and *Certainty* >0.9. The imputed genotypes were considered if they were inferred with a probability  $\geq 0.90$  or considered missing values otherwise. In order to account for the imputation uncertainty, the analyses were also performed using regression logistic models weighted by the post-imputation probability of each genotype.

In order to control for potential population stratification bias, the analyses were restricted to the 493 cases and 441 controls who had at least two European-born grandparents. This indicator has been shown to predict, with 98.2 % sensitivity and 94.3 % specificity, the Caucasian status of the cases as determined by principal component analysis on 96,609 SNPs by the CEPH.

The 493 cases included in this analysis consisted in 434 cases of ALL (365 common B-cell ALL, 19 mature B-cell ALL, 40 T-cell ALL, and 10 unspecified ALL (ICCC codes: I.10: 98263, 98353, 98363, 98373, 99483) and 59 cases of ANLL [51 AML (ICCC codes: I.b: 98403, 98613, 98663, 98673, 98713, 98723, 98733, 98743, 98913, 98953, 98963, 98973, 99103) and 8 undifferentiated or biphenotypic leukemia (ICCC codes: I.e.: 98053, 99303)].

#### Statistical analysis

The SNPs of interest were individually analyzed under codominant and dominant coding, and grouped into combined variables for *MTHFR* (no *MTHFR* variant SNP; at least one heterozygous variant and no homozygous variant; homozygosity for any of the *MTHFR* variants) and *MTRR* (no *MTRR* variant SNP; at least one variant in rs1801394 and none in rs1532268; at least one variant in rs1532268 and none in rs1801394; at least one variant in both SNPs). The *MTHFR* and *MTRR* statuses were also combined to yield a *MTHFR*–*MTRR* variable.

Odds ratios (OR) and their 95 % confidence intervals (95 % CI) were estimated using unconditional logistic regression models (all AL) or polychotomous logistic regression (AL types) including the stratification variable used for quota-sampling age  $\times$  gender (eight age groups for each gender) and the SES variable. The stability of the results was tested after additional adjustments and/or stratum analysis for factors related to childhood leukemia in the literature or in the ESCALE study (birth order, birth weight and breastfeeding, indoor maternal use of pesticides). The variables were not retained in the models if they did not change the first decimal of the estimated odds ratio.

The SAS<sup>®</sup> software package (version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used for all the analyses.

The research was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (World Medical Association, 2004) and complied with all applicable international regulatory requirements including submission to an ethics committee (DGS No. 2003/0259).

## Results

### Case and control comparability

The distribution of the controls by age and gender was similar to that of the whole ESCALE case group but the controls were significantly older than the AL cases with a mean age ( $\pm$ SD) of  $5.2 \pm 3.7$  for the cases and  $5.5 \pm 4.3$  years for the controls (supplemental material, Table 1). All the strata contained more than one control per case for adjustment, with the most controls per case in the youngest strata. The control mothers reported higher paternal education and more qualified parental professional status than the case mothers (Table 1).

### Maternal supplementation during the index pregnancy and risk of acute leukemia

In the ESCALE study, 172 (10.7 %) of the control mothers and 32 (4.4 %) of the case mothers reported folic acid supplementation during the preconception period or index pregnancy. The mothers of 43 cases (5.6 %) and 70 controls (4.1 %) could not remember whether they took folic acid or not.

Childhood leukemia was negatively and significantly associated with folic acid supplementation (OR = 0.4, 95 % CI = [0.3–0.6]) but the association was not limited to supplementation initiated before or during the first trimester of pregnancy (Table 2). The relationships with ALL and ANLL seemed similar, but were based on small numbers for ANLL (ALL: OR = 0.4, 95 % CI = [0.3–0.6]; NALL: OR = 0.3, 95 % CI = [0.1–0.9]). The OR did not vary substantially across immunological or ploidy subtypes or according to TEL-AML1 or MLL status (Table 3). The association was also negatively significant when we considered the risk of childhood AL and the maternal folic acid or multivitamin supplementation (OR = 0.6, 95 % CI = [0.5–0.8]) (Table 2).

Some perinatal characteristics may introduce confounding in the relationship between maternal folic acid supplementation and AL. The controls whose mothers received folic acid supplementation had the same birth order and birth weight as the other controls, but they had been breastfed more often (64.5 % vs. 49.9 %) and presented with birth defects more often (4.7 % vs. 2.9 %). Neither adjustment for those factors in addition to the stratification variable age  $\times$  gender and parental SES, nor exclusion of the cases with Down's syndrome changed the results.

Moreover, stratifying by period of birth did not show any heterogeneity of the negative association between AL and maternal folate supplementation over time (before 1996: OR = 0.4 [0.2–1.0]; 1996–2000: OR = 0.3

**Table 1** Distribution of cases and controls by educational level, professional category, and area of residence

	Controls		AL <sup>a</sup>		OR <sup>b</sup>	95 % CI
	(N = 1681)		(N = 764)			
	N	(%)	N	(%)		
<b>Maternal educational level</b>						
Baccalaureate +2 years or advanced degree	701	42	299	39	1.0	Ref.
Baccalaureate	320	19	138	18	1.0	[0.8–1.3]
Vocational training (CAP, BEP)	500	30	247	32	1.2	[0.9–1.4]
None	159	9	80	10	1.2	[0.9–1.6]
<b>Paternal educational level</b>						
Baccalaureate +2 years or advanced degree	601	36	230	30	1.0	Ref.
Baccalaureate	236	14	114	15	1.3	[1.0–1.7]
Vocational training (CAP, BEP)	662	40	313	41	1.2	[1.0–1.5]
None	165	10	99	13	1.6	[1.2–2.2]
<b>Parental professional category</b>						
Managers, intellectual/intermediate professions	715	43	279	37	1.0	Ref.
Administrative and sales workers	477	28	224	29	1.2	[1.0–1.5]
Service workers	215	13	96	13	1.2	[0.9–1.5]
Factory/agricultural workers, unemployed	274	16	165	22	1.5	[1.2–1.9]
<b>Area of residence at interview</b>						
Rural	601	36	250	33	1.0	Ref.
Mixed	391	23	183	24	1.1	[0.9–1.4]
Urban	689	41	329	43	1.1	[0.9–1.4]

<sup>a</sup> AL Acute leukemia  
<sup>b</sup> OR: (odds ratio) and 95 % confidence interval (95 % CI) estimated by unconditional logistic regression models including the stratification variable age × gender

[0.2–0.6]; 2001–2005: OR = 0.5 [0.3–0.9]). The results by socioeconomic category were also similar (“Managers, intellectual/intermediate professions”: OR = 0.6 [0.4–1.0]; “Administrative and sales workers”: OR = 0.1 [0.04–0.5]; “Service workers/Factory/agricultural workers, unemployed”: OR = 0.3 [0.1–0.7]).

Selection of Caucasian children whose parents agreed for the child DNA sampling may have biased the results. The subsample used for the analysis of *MTHFR* and *MTRR* polymorphisms selected parents who were more educated and in more qualified socioeconomic categories, but the results for folate supplementation were the same as those for the entire sample.

The sensitivity analyses showed that the inverse relationship with folic acid supplementation remained when the controls with missing values were included in the group without supplementation and the cases with missing values were included in the supplemented group in a proportion such that maternal supplementation was 5 times as prevalent as that of the controls (OR 0.7 [0.5–0.9]).

**Associations between *MTHFR* and *MTRR* polymorphisms and AL**

In the control sample, there was no evidence of a deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium for the candidate SNPs in *MTHFR* and *MTRR*.

*MTHFR* polymorphisms rs1801131 (A1298C) and rs1801133 (C677T) were not individually associated with ALL (Table 4). Homozygosity for any of the two variant alleles was associated with increased odds ratios (OR = 1.3 [0.8–2.4]) but the difference was not statistically significant. However, there was a positive relationship between homozygosity for the variant allele of rs1801133 and ANLL, and the relationship was on the borderline of significance. Interestingly, none of the homozygotes for the variant allele of one SNP carried a variant allele for the other SNP.

*MTRR* polymorphisms rs1801394 (A66G) and rs1532268 (C524T) were not significantly associated with AL taken as a whole, but the variant allele of rs1801394 tended to be inversely associated with ALL, although on the borderline of significance (Table 4). Being homozygous for one *MTHFR* polymorphism and carrying both *MTRR* variant alleles were positively associated with AL, ALL, and ANLL, albeit not significantly (OR = 1.6 [0.9–3.1] for AL) (Table 4). There were no interactions between maternal folic acid supplementation and any of the SNPs under study or with the combination of *MTHFR* and *MTRR* polymorphisms ( $p = 0.90$ ). In a multivariate model, the association was stronger and of borderline significance after adjustment for maternal folic acid supplementation (OR = 1.8 [1.0–3.4] for AL) (Table 5).

**Table 2** Relationship between childhood leukemia and periconception supplementation

	Any AL <sup>c</sup>				ALL <sup>c</sup>			ANLL <sup>c</sup>		
	Controls [n = 1681]	Cases [n = 764]	OR <sup>a</sup>	95 % CI	Cases (n = 648)	OR <sup>b</sup>	95 % CI	Cases (n = 116)	OR <sup>b</sup>	95 % CI
Folic acid supplementation										
No	1,439	689	1.0	Ref.	586	1.0	Ref.	103	1.0	Ref.
Yes	172	32	0.4	[0.3–0.6]	28	0.4	[0.3–0.6]	4	0.3	[0.1–0.9]
Missing	70	43	–		34	–		9	–	
First supplementation										
No folic acid supplementation	1,439	689	1.0	Ref.	584	1.0	Ref.	105	1.0	Ref.
Preconception or first trimester	70	10	0.3	[0.2–0.6]	9	0.3	[0.2–0.7]	1	0.2	[0.0–1.4]
Second trimester	56	15	0.6	[0.3–1.0]	13	0.6	[0.3–1.1]	2	0.5	[0.1–2.0]
Third trimester	37	4	0.3	[0.1–0.7]	3	0.2	[0.1–0.8]	1	0.4	[0.1–2.8]
Missing	79	46	–		37	–		9	–	
Folic acid or multivitamin supplementation										
No	1,350	643	1.0	Ref.	548	1.0	Ref.	95	1.0	Ref.
Yes	276	83	0.6	[0.5–0.8]	72	0.7	[0.5–0.9]	11	0.6	[0.3–1.1]
Missing	55	38	–		28	–		10	–	

<sup>a</sup> Odds ratio (OR) and 95 % confidence interval (95 % CI) estimated by unconditional logistic regression models including the stratification variable age × gender and socioeconomic status

<sup>b</sup> Odds ratio (OR) and 95 % confidence interval (95 % CI) estimated by polychotomous regression models including the stratification variable age × gender and socioeconomic status

<sup>c</sup> AL Acute leukemia, ALL acute lymphoblastic leukemia, ANLL acute non-lymphoblastic leukemia

**Discussion**

Overall, the results suggest that childhood AL is strongly negatively and significantly associated with maternal folic acid supplementation during the index pregnancy. The strengths of the association for ALL and ANLL were very similar. The association with maternal folic acid supplementation was stronger for mothers reporting having used supplements containing folic acid at the recommended dosage than for mothers reporting folic acid and/or multivitamin supplementation. Carrying both *MTRR* (rs1801394 and rs1532268) variant alleles while being homozygous for any variant allele of the *MTHFR* (rs1801133 and rs1801131) polymorphisms was positively associated with ALL and ANLL.

The cases were identified using the data collection system of the NRCH and the case mother participation rate was very high (91 %), which limited case selection bias. The main reason for non-inclusion was the child's poor state of health or death. Maternal folic acid supplementation is unlikely to be directly related to the severity of the disease or short-term survival. In addition, with regard to ESCALE, maternal supplementation was reported for none of the 15 children who died after their inclusion.

The quota-sampling process used for selecting population controls successfully ensured that the responding controls had the same distribution as the case group with regard to gender and age, and the same distribution as the overall population with regard to region and birth order: 41 and 37 % of the ESCALE controls born in 1995, or 2003 were first- and second-born children compared with 43 and 34 % in the French national perinatal surveys [45, 46]. With regard to parental education, 43 % of the children had graduate mothers, compared with 39 % in the perinatal surveys. Selection of more educated mothers is therefore possible, but limited.

The control parents appeared to belong to slightly higher socioeconomic categories than the case parents, which is likely to reflect slightly biased selection of the controls who agreed to participate in the study. Selection through acceptance of biological sample donation slightly increased the differential. Since parental SES was positively and significantly associated with folic acid supplementation among controls, under-representation of poorer households may have resulted in over-representation of maternal supplementation in the controls and overestimation of the relationship. However, the impact is unlikely to be marked since adjustments for (or stratification by) maternal,

**Table 3** Relationship between childhood leukemia and periconception supplementation in immunological and ploidy subtypes and by TEL-AML1 or MLL status

	Folic acid		OR <sup>a</sup>	95 % CI
	Yes	No		
All ALL <sup>b</sup>	28	586	0.4	[0.3–0.6]
Immunophenotype				
Common/pre-B ALL	24	461	0.4	[0.3–0.7]
Burkitt ALL	1	29	–	
T-cell ALL	2	63	0.4	[0.1–1.5]
Ploidy				
Normal karyotype	12	161	0.6	[0.3–1.2]
Pseudodiploidy	6	171	0.3	[0.1–0.7]
Moderate hyperdiploidy	1	73	–	
Massive hyperdiploidy (>50 chromosomes)	9	157	0.5	[0.2–1.0]
TEL-AML1 status				
Negative	15	334	0.4	[0.2–0.7]
Positive	6	110	0.5	[0.2–1.1]
MLL status				
No	16	414	0.3	[0.2–0.6]
Yes	0	22	–	

<sup>a</sup> Odds ratio (OR) and 95 % confidence interval (95 %CI) estimated by polychotomous regression models including the stratification variable age × gender and socioeconomic status

<sup>b</sup> ALL: acute lymphoblastic leukemia

paternal education or parental SES did not change the results. Moreover, the associations were quite stable across strata of parental education and SES.

Data on maternal folic acid supplementation were collected retrospectively by interview, and misclassifications are therefore likely to have occurred. The use of a standardized questionnaire and the very similar conditions for the interviews of case and control mothers should have limited differential misclassifications, particularly since folic acid supplementation is not usually elicited by the physician at the time of diagnosis. In addition, the question of the relationship between maternal folic acid supplementation and childhood AL is not usually a public concern, while differential recall bias is more likely to occur for exposures assumed to be a risk for the disease or socially considered undesirable [47].

Maternal folic acid supplementation during the index pregnancy was less often reported in the present study (11 % for folic acid and 17 % for folic acid and multivitamins for the controls) than in most of the recent studies. Maternal supplementation may have been under-reported, particularly since it was elicited by interview some time after the pregnancy. The French campaign to promote folic acid supplementation was launched later, in December 2004, at the end of the ESCALE study. No folate

fortification of the food supply is implemented in France. In a survey conducted in maternity wards in Paris area in 1999 [48], 24.3 % of the mothers had taken a supplement containing folic acid for 1 month before conception and for 2 months after the beginning of pregnancy. In the present study, maternal folic acid or multivitamin supplementation (including folic acid supplementation with less than the 400 mg/day currently recommended) was reported for 27 % of the controls born in the Paris area in 1997–2001.

Restricting the sample to subjects of European ancestry, based on the grandparents' country of birth, reduced the potential for population stratification bias. The distribution of the genotypes of the controls did not deviate from the Hardy–Weinberg equilibrium. The controls who were genotyped did not differ from the other controls in terms of maternal folic acid supplementation. Confounding by other factors related to AL in the previous analyses was accounted for by adjustment, exclusion, and stratum-specific analyses. The results were not substantially changed.

The cases and controls were genotyped separately using different platforms. However, the concordance between the two platforms was total for the SNPs they had in common. For the cases, the genotypes of two of the four candidate SNPs, rs1801131 in *MTHFR* and rs1801394 in *MTRR*, were imputed with the widely used IMPUTE program, which is known to be of a good efficacy and accuracy [49, 50]. The genotypes were imputed with an a posteriori probability greater than 0.90 and with good-quality criteria. The results remained stable when the a posteriori probabilities were considered in a weighted logistic regression analysis.

The published data on the impact of the two *MTHFR* polymorphisms on plasma homocysteine levels suggest they comply with a codominant model [36, 51]. They were therefore combined in that manner, assuming that the last category (homozygosity for any of the *MTHFR* variants) gives rise to the greatest decrease in *MTHFR* enzyme activity. It is noteworthy that all the individuals homozygous for the variant of one of the *MTHFR* polymorphisms were homozygous for the ancestral allele for the other polymorphism. Published data on the *MTRR* polymorphisms suggest that they lower enzyme affinity for methionine synthase [52], with no indication that they depart from codominant models. They were therefore combined with the assumption that carrying the 2 variants might have more impact on metabolism. For the combined variable, *MTHFR* and *MTRR* polymorphisms, the last category of the *MTHFR* combined variable was split by *MTRR* status, in order to distinguish the class with the highest expected impact on folate metabolism.

Three case–control studies have analyzed the association between ALL and folic acid supplementation, alone or in combination with other supplements, during the index

**Table 4** Relationship between childhood leukemia and *MTHFR* and *MTRR* polymorphisms

	AL <sup>c</sup>				ALL <sup>c</sup>			ANLL <sup>c</sup>		
	Controls (n = 441)	Cases (n = 493)	OR <sup>a</sup>	95 % CI	Cases (n = 434)	OR <sup>b</sup>	95 % CI	Cases (n = 59)	OR <sup>b</sup>	95 % CI
<i>MTHFR</i> polymorphisms										
<i>MTHFR</i> rs1801133 (C677CT)										
CC	178	191	1.0	Ref.	172	1.0	Ref.	19	1.0	Ref.
CT	193	234	1.1	[0.8–1.4]	208	1.0	[0.8–1.4]	26	1.1	[0.6–2.2]
TT	56	68	1.1	[0.7–1.8]	54	1.0	[0.6–1.6]	14	2.2	[1.0–4.8]
CT + TT	249	302	1.1	[0.8–1.4]	262	1.0	[0.8–1.4]	40	1.4	[0.8–2.5]
Missing	14	0	–			–			–	
<i>MTHFR</i> rs1801131 (A1298C) <sup>d</sup>										
AA	208	212	1.0	Ref.	182	1.0	Ref.	30	1.0	Ref.
AC	188	200	0.9	[0.7–1.3]	179	1.0	[0.7–1.3]	21	0.7	[0.4–1.4]
CC	45	50	1.0	[0.6–1.7]	45	1.1	[0.7–1.8]	5	0.8	[0.3–2.1]
AC + CC	233	250	0.9	[0.7–1.3]	224	1.0	[0.7–1.4]	26	0.7	[0.4–1.3]
Missing	0	31	–		28	–		3	–	
<i>MTHFR</i> rs1801133 and rs1801131										
Both ancestral	48	39	1.0	Ref.	34	1.0	Ref.	5	1.0	Ref.
At least one variant but none homozygous	278	306	1.2	[0.7–2.0]	273	1.3	[0.8–2.2]	33	0.9	[0.3–2.6]
Homozygous for any of the <i>MTHFR</i> variants	101	117	1.4	[0.8–2.3]	99	1.3	[0.8–2.4]	19	1.5	[0.5–4.5]
Missing	14	31	–		28	–		3	–	
<i>MTRR</i> polymorphisms										
<i>MTRR</i> rs1801394 (A66G) <sup>d</sup>										
AA	95	122	1.0	Ref.	112	1.0	Ref.	10	1.0	Ref.
AG	226	211	0.7	[0.5–1.0]	187	0.7	[0.5–1.0]	24	1.0	[0.4–2.2]
GG	120	132	0.9	[0.6–1.3]	110	0.8	[0.5–1.2]	22	1.7	[0.8–4.0]
AG + GG	346	343	0.8	[0.6–1.1]	297	0.7	[0.5–1.0]	46	1.2	[0.6–2.6]
Missing	0	28	–		25	–		3	–	
<i>MTRR</i> rs1532268 (C524T)										
CC	181	180	1.0	Ref.	155	1.0	Ref.	25	1.0	Ref.
CT	192	236	1.3	[0.9–1.7]	209	1.3	[0.9–1.7]	27	1.1	[0.6–2.0]
TT	68	77	1.0	[0.7–1.6]	70	1.1	[0.7–1.7]	7	0.7	[0.3–1.8]
CT + TT	260	313	1.2	[0.9–1.6]	279	1.2	[0.9–1.6]	34	1.0	[0.6–1.8]
<i>MTRR</i> rs1801394 and rs1532268										
Both ancestral	44	52	1.0	Ref.	45	1.0	Ref.	7	1.0	Ref.
rs1801394 variant only	51	70	1.2	[0.7–2.2]	67	1.4	[0.7–2.5]	3	0.5	[0.1–2.0]
rs1532268 variant only	137	117	0.8	[0.5–1.3]	99	0.8	[0.4–1.3]	18	0.9	[0.4–2.5]
Both variants	209	226	0.9	[0.6–1.5]	198	0.9	[0.6–1.6]	28	0.9	[0.4–2.4]
Missing	0	28	–		25	–		3	–	
<i>MTHFR</i> and <i>MTRR</i> polymorphisms										
Both <i>MTHFR</i> SNPs ancestral	48	39	1.0	Ref.	34	1.0	Ref.	5	Ref.	
At least one <i>MTHFR</i> variant but none homozygous	278	306	1.2	[0.8–2.0]	273	1.3	[0.8–2.1]	33	1.0	[0.3–2.6]
Homozygous for any of the <i>MTHFR</i> variants										
No <i>MTRR</i> variant or only one <i>MTRR</i> variant	58	53	1.1	[0.6–2.0]	41	1.0	[0.5–1.8]	12	1.6	[0.5–5.1]

**Table 4** continued

	AL <sup>c</sup>				ALL <sup>c</sup>			ANLL <sup>c</sup>		
	Controls (n = 441)	Cases (n = 493)	OR <sup>a</sup>	95 % CI	Cases (n = 434)	OR <sup>b</sup>	95 % CI	Cases (n = 59)	OR <sup>b</sup>	95 % CI
Both <i>MTRR</i> variants	43	57	1.6	[0.9–3.1]	50	1.7	[0.9–3.2]	7	1.5	[0.4–5.1]

<sup>a</sup> Odds ratio (OR) and 95 % confidence interval (95 % CI) estimated by unconditional logistic regression models including the stratification variable age × gender and socioeconomic status

<sup>b</sup> Odds ratio (OR) and 95 % confidence interval (95 % CI) estimated by polychotomous regression models including the stratification variable age × gender and socioeconomic status

<sup>c</sup> AL acute leukemia, ALL acute lymphoblastic leukemia, ANLL acute non-lymphoblastic leukemia

<sup>d</sup> SNPs imputed for cases and genotyped for controls

pregnancy. An Australian study showed a strong and significant inverse association of the same order of magnitude as that reported herein (OR = 0.40 [0.21–0.73]) [12], but the two subsequent studies in New Zealand [6] and Australia [9] reported a null association. Two other case–control studies considered folic acid supplementation, but did not distinguish between folic acid and other vitamins. Supplementation with vitamins including folic acid was not associated with ALL in a Canadian case–control study [11], but a German study reported an inverse relationship with vitamins, folic acid, and/or iron supplementation [10]. A study in Ontario conducted to evaluate changes in ALL incidence found no change in ALL incidence after a folic acid food fortification program, first in infant leukemia [7] and later in older children [8].

Several studies investigated the relationship between AL and *MTHFR* polymorphisms C677T or A1298C [13–17, 19–22, 24–33]. Published meta-analyses reported inverse or null association between ALL and *MTHFR* C677T [53–57], and no association with *MTHFR* A1298C polymorphism.

*MTRR* polymorphisms have been less investigated. The only study on C524T found no association with ALL [18]. The A66G polymorphism was not associated with ALL in one study [31] and inversely related to ALL in three studies, significantly [18] or not [17, 23]. No association was found in another study [25]. Most of the published papers on *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms compared case series with unmatched control series. Potential confounders were only considered in a few studies. In the present study where controls were carefully selected from the population which has given rise to cases, and in which potential confounders were taken into account, no association was observed for any of the four SNPs.

Few studies investigated combinations of polymorphisms. The study of Petra et al. [25] showed a non-significant inverse association with both homozygosity for the *MTHFR* C677T variant allele (*T*) and carriership of the *MTRR* A66G variant allele (*G*). Interestingly, a recent publication on the Californian NCCLS study [23] reported on a comprehensive ensemble of polymorphisms in genes

involved in the folate pathway and suggested a positive association between ALL and a specific 3-SNPs haplotype block in *MTRR* among Hispanics.

The variants analyzed herein are not included in that block. However, in this Californian study, the OR of association between rs1801394 and AL was 0.9 [0.6–1.4], close to the result reported herein. The present study is the first to consider together the SNPs rs1801133 (C677T) and rs1801131 (A1298C) in *MTHFR* and rs1801394 (A66G) and rs1532268 (C524T) in *MTRR*, which are assumed to modify the activity of the enzymes.

Folic acid supplementation may influence blood homocysteine levels, as suggested in a study [58] in which homozygotes for the *MTHFR* C677T variant allele tended to have normal blood homocysteine levels when folate intake was adequate. In that case, the decreased activity of *MTHFR* may not lead to DNA hypomethylation [51] or misincorporation of uracil in DNA [59]. Thus, the C677T polymorphism may reduce cancer risk if folate intake is adequate or, on the contrary, increase cancer risk if folate intake is inadequate [60]. In the present study, *MTHFR* and *MTRR* polymorphisms and their combinations did not interact with the relationship between AL and maternal folic acid supplementation. A case-only analysis [61] observed also no interaction between the *MTHFR* genotype and folate supplementation in association with ALL.

The Californian study [23] found an interaction between some *MTRR* polymorphisms and maternal dietary and supplemental folate intake, since the *MTRR* SNPs were positively associated with ALL in the group with the lowest maternal intake and inversely associated with ALL in the other group. There was no interaction between folate intake and any of the *MTHFR* polymorphisms or the *MTRR* A66G polymorphism. Two studies stratified the analyses of *MTHFR* polymorphisms before and after a folate supplementation recommendation campaign and found no association for the German study [28] and a negative association restricted to the period preceding the campaign for the Canadian study [21].

**Table 5** Relationship between childhood leukemia and combinations of *MTHFR* and *MTRR* polymorphisms with maternal folate supplementation

	Controls (n = 404)	AL <sup>c</sup>			ALL <sup>c</sup>			ANLL <sup>c</sup>		
		Cases (n = 430)	OR <sup>a</sup>	95 % CI	Cases (n = 434)	OR <sup>b</sup>	95 % CI	Cases (n = 59)	OR <sup>b</sup>	95 % CI
<i>Multivariate analysis</i>										
Folic acid supplementation										
No folic acid supplementation	360	421	1.0	Ref.	368	1.0	Ref.	53	1.0	Ref.
Folic acid supplementation	44	17	0.3	[0.2–0.6]	16	0.3	[0.2–0.6]	1	0.2	[0.0–1.0]
<i>MTHFR/MTRR</i> status										
Both <i>MTHFR</i> SNPs ancestral	48	39	1.0	Ref.	34	1.0	Ref.	5	1.0	Ref.
At least one <i>MTHFR</i> variant but none homozygous	278	306	1.3	[0.8–2.1]	273	1.4	[0.8–2.3]	33	1.0	[0.6–2.8]
Homozygous for any of the <i>MTHFR</i> variants										
No <i>MTRR</i> variant or only one <i>MTRR</i> variant	58	53	1.2	[0.6–2.2]	41	1.0	[0.5–2.0]	12	1.9	[0.6–6.0]
Both <i>MTRR</i> variants	43	57	1.8	[1.0–3.4]	50	1.8	[0.9–3.5]	7	1.7	[0.5–6.0]

<sup>a</sup> Odds ratio (OR) and 95 % confidence interval (95 % CI) estimated by unconditional logistic regression models including the stratification variable age × gender and socioeconomic status

<sup>b</sup> Odds ratio (OR) and 95 % confidence interval (95 % CI) estimated by polychotomous regression models including the stratification variable age × gender and socioeconomic status

<sup>c</sup> AL acute leukemia, ALL acute lymphoblastic leukemia, ANLL acute non-lymphoblastic leukemia

In conclusion, the results reported herein support the hypothesis that maternal folic acid supplementation before or during pregnancy may reduce the risk of AL. They also suggest that the genotype homozygous for any of the *MTHFR* variants and carrying both *MTRR* variants may be a risk factor for AL.

**Acknowledgments** The authors are grateful to Claire Mulot, who was in charge of the biological collection at the Biological Resource Center of Saints-Pères, INSERM U775; the CEPH and the Centre National du Génotypage, which genotyped the cases; and IntegraGen, which genotyped the controls. The authors would also like to express their gratitude to Marie-Hélène Da Silva, Christophe Steffen, and Florence Menegaux (INSERM U1018, Environmental Epidemiology of Cancer), who contributed to the recruitment of the cases; Aurélie Guyot-Goubin and the staff of the French National Registry of Childhood Blood Malignancies, who contributed to case detection and verification; Sabine Méléze and Marie-Anne Noel (Institut CSA), who coordinated the selection of the controls and the interviews; and Catherine Tricoche (Callson) and the team of interviewers, who interviewed the cases and controls.

The authors would also like to thank all of the Société Française de lutte contre les Cancérs de l'Enfant et de l'Adolescent (SFCE) principal investigators: André Baruchel (Hôpital Saint-Louis/Hôpital Robert Debré, Paris), Claire Berger (Centre Hospitalier Universitaire, Saint-Etienne), Christophe Bergeron (Centre Léon Bérard, Lyon), Jean-Louis Bernard (Hôpital La Timone, Marseille), Yves Bertrand (Hôpital Debrousse, Lyon), Pierre Bordigoni (Centre Hospitalier Universitaire, Nancy), Patrick Boutard (Centre Hospitalier Régional Universitaire, Caen), Gérard Couillault (Hôpital d'Enfants, Dijon), Christophe Pigué (Centre Hospitalier Régional Universitaire, Limoges), Anne-Sophie Defachelles (Centre Oscar Lambret, Lille), François Demeocq (Hôpital Hôtel-Dieu, Clermont-Ferrand), Alain Fischer (Hôpital des Enfants Malades, Paris), Virginie Gandemer

(Centre Hospitalier Universitaire—Hôpital Sud, Rennes), Dominique Valteau-Couanet (Institut Gustave Roussy, Villejuif), Jean-Pierre Lamagnere (Centre Gatién de Clocheville, Tours), Françoise Lapiere (Centre Hospitalier Universitaire Jean Bernard, Poitiers), Guy Leverger (Hôpital Armand-Trousseau, Paris), Patrick Lutz (Hôpital de Haute-pierre, Strasbourg), Geneviève Marguerite (Hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier), Françoise Mechinaud (Hôpital Mère et Enfants, Nantes), Gérard Michel (Hôpital La Timone, Marseille), Frédéric Millot (Centre Hospitalier Universitaire Jean Bernard, Poitiers), Martine Münzer (American Memorial Hospital, Reims), Brigitte Nelken (Hôpital Jeanne de Flandre, Lille), Hélène Pacquement (Institut Curie, Paris), Brigitte Pautard (Centre Hospitalier Universitaire, Amiens), Stéphane Ducassou (Hôpital Pellegrin Tripode, Bordeaux), Alain Pierre-Kahn (Hôpital Enfants Malades, Paris), Emmanuel Plouvier (Centre Hospitalier Régional, Besançon), Xavier Rialland (Centre Hospitalier Universitaire, Angers), Alain Robert (Hôpital des Enfants, Toulouse), Hervé Rubie (Hôpital des Enfants, Toulouse), Stéphanie Haouy (Hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier), Christine Soler (Fondation Lénal, Nice), and Jean-Pierre Vannier (Hôpital Charles Nicolle, Rouen).

This work was supported by grants from INSERM, the Fondation de France, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS), the Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (AFSSET), the association Cent pour sang la vie, the Institut National du Cancer (INCa), the Agence Nationale de la Recherche (ANR), and Cancéropôle Ile de France.

**Conflict of interest** No potential conflicts of interest were disclosed.

**Appendix**

See Table 6.

**Table 6** SFCE investigators of the ESCALE study

Principal investigator	Hospital	City (France)
André Baruchel	Hôpital Saint-Louis/Hôpital Robert Debré	Paris
Claire Berger	Centre Hospitalier Universitaire	Saint-Etienne
Christophe Bergeron	Centre Léon Bérard	Lyon
Jean-Louis Bernard	Hôpital La Timone	Marseille
Yves Bertrand	Hôpital Debrousse	Lyon
Pierre Bordigoni	Centre Hospitalier Universitaire	Nancy
Patrick Boutard	Centre Hospitalier Régional Universitaire	Caen
Gérard Couillault	Hôpital d'Enfants	Dijon
Anne-Sophie Defachelles	Centre Oscar Lambret	Lille
François Demeocq	Hôpital Hôtel-Dieu	Clermont-Ferrand
Stéphane Ducassou	Hôpital Pellegrin Tripode	Bordeaux
Alain Fischer	Hôpital des Enfants Malades	Paris
Virginie Gandemer	Centre Hospitalier Universitaire—Hôpital Sud	Rennes
Stéphanie Haouy	Hôpital Arnaud de Villeneuve	Montpellier
Charlotte Jubert Hôpital Pellegrin Tripode	Bordeaux	
Jean-Pierre Lamagnere	Centre Gatien de Clocheville	Tours
Françoise Lapiere	Centre Hospitalier Universitaire Jean Bernard	Poitiers
Guy Leverger	Hôpital Armand-Trousseau	Paris
Patrick Lutz	Hôpital de Haute-pierre	Strasbourg
Geneviève Margueritte	Hôpital Arnaud de Villeneuve	Montpellier
Françoise Mechinaud	Hôpital Mère et Enfants	Nantes
Gérard Michel	Hôpital La Timone	Marseille
Frédéric Millot	Centre Hospitalier Universitaire Jean Bernard	Poitiers
Martine Münzer	American Memorial Hospital	Reims
Brigitte Nelken	Université Lille Nord de France Lille	
Hélène Pacquement	Institut Curie	Paris
Brigitte Pautard	Centre Hospitalier Universitaire	Amiens
Alain Pierre-Kahn	Hôpital Enfants Malades	Paris
Christophe Piguet	Centre Hospitalier Régional Universitaire	Limoges
Geneviève Plat	Hôpital des Enfants	Toulouse
Emmanuel Plouvier	Centre Hospitalier Régional	Besançon
Xavier Rialland	Centre Hospitalier Universitaire	Angers
Hervé Rubie	Hôpital des Enfants	Toulouse
Christine Soler	Fondation Lenal	Nice
Dominique Valteau-Couanet	Institut Gustave Roussy	Villejuif
Jean-Pierre Vannier	Hôpital Charles Nicolle	Rouen

## References

- Clavel J, Goubin A, Auclerc MF et al (2004) Incidence of childhood leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma in France: National Registry of Childhood Leukaemia and Lymphoma, 1990–1999. *Eur J Cancer Prev* 13:97–103
- Lacour B, Guyot-Goubin A, Guissou S, Bellec S, Desandes E, Clavel J (2010) Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000–2004. *Eur J Cancer Prev* 19:173–181
- Anderson LM (2006) Environmental genotoxicants/carcinogens and childhood cancer: bridgeable gaps in scientific knowledge. *Mutat Res-Genet Toxicol Environ Mutagen* 608:136–156
- Buffler PA, Kwan ML, Reynolds P, Urayama KY (2005) Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. *Cancer Invest* 23:60–75
- McNally RJ, Parker L (2006) Environmental factors and childhood acute leukemias and lymphomas. *Leuk Lymphoma* 47:583–598
- Dockerty JD, Herbison P, Skegg DC, Elwood M (2007) Vitamin and mineral supplements in pregnancy and the risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: a case-control study. *BMC Public Health* 7:136
- French AE, Grant R, Weitzman S et al (2003) Folic acid food fortification is associated with a decline in neuroblastoma. *Clin Pharmacol Ther* 74:288–294

8. Grupp SG, Greenberg ML, Ray JG et al (2011) Pediatric cancer rates after universal folic acid flour fortification in Ontario. *J Clin Pharmacol* 51:60–65
9. Milne E, Royle JA, Miller M et al (2010) Maternal folate and other vitamin supplementation during pregnancy and risk of acute lymphoblastic leukemia in the offspring. *Int J Cancer* 126:2690–2699
10. Schuz J, Weihkopf T, Kaatsch P (2007) Medication use during pregnancy and the risk of childhood cancer in the offspring. *Eur J Pediatr* 166:433–441
11. Shaw AK, Infante-Rivard C, Morrison HI (2004) Use of medication during pregnancy and risk of childhood leukemia (Canada). *Cancer Causes Control* 15:931–937
12. Thompson JR, Gerald PF, Willoughby ML, Armstrong BK (2001) Maternal folate supplementation in pregnancy and protection against acute lymphoblastic leukaemia in childhood: a case-control study. *Lancet* 358:1935–1940
13. Alcasabas P, Ravindranath Y, Goyette G et al (2008) 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and the risk of acute lymphoblastic leukemia (ALL) in Filipino children. *Pediatr Blood Cancer* 51:178–182
14. Balta G, Yuksek N, Ozyurek E et al (2003) Characterization of MTHFR, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes in childhood acute leukemia. *Am J Hematol* 73:154–160
15. Chan JY, Ugrasena DG, Lum DW, Lu Y, Yeoh AE (2010) Xenobiotic and folate pathway gene polymorphisms and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia in Javanese children. *Hematol Oncol* 29:116–123
16. Chatzidakis K, Goulas A, Athanassiadou-Piperopoulou F, Fidani L, Kolioukas D, Mirtsou V (2006) Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism: Association with risk for childhood acute lymphoblastic leukemia and response during the initial phase of chemotherapy in Greek patients. *Pediatr Blood Cancer* 47:147–151
17. de Jonge R, Tissing WJE, Hooijberg JH et al (2009) Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 113:2284–2289
18. Gast A, Bermejo JL, Flohr T et al (2007) Folate metabolic gene polymorphisms and childhood acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Leukemia* 21:320–325
19. Kamel AM, Moussa HS, Ebid GT, Bu RR, Bhatia KG (2007) Synergistic effect of methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphism as risk modifiers of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Egypt Natl Canc Inst* 19:96–105
20. Kim NK, Chong SY, Jang MJ et al (2006) Association of the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in Korean patients with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Res* 26:2879–2881
21. Krajcinovic M, Lamothe S, Labuda D et al (2004) Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 103:252–257
22. Lightfoot TJ, Johnston WT, Painter D et al (2010) Genetic variation in the folate metabolic pathway and risk of childhood leukemia. *Blood* 115:3923–3929
23. Metayer C, Scelo G, Chokkalingam AP et al (2011) Genetic variants in the folate pathway and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Causes Control* 22:1243–1258
24. Oliveira E, Alves S, Quental S et al (2005) The MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia in Portugal. *J Pediatr Hematol Oncol* 27:425–429
25. Petra BG, Janez J, Vita D (2007) Gene-gene interactions in the folate metabolic pathway influence the risk for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leuk Lymphoma* 48:786–792
26. Reddy H, Jamil K (2006) Polymorphisms in the MTHFR gene and their possible association with susceptibility to childhood acute lymphocytic leukemia in an Indian population. *Leuk Lymphoma* 47:1333–1339
27. Schnakenberg E, Mehles A, Cario G et al. (2005) Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and susceptibility to pediatric acute lymphoblastic leukemia in a German study population. *Bmc Med Genet* 6:23
28. Thirumaran RK, Gast A, Flohr T et al. (2005) MTHFR genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 106:590–591; author reply 1–2
29. Tong N, Fang Y, Li J et al (2010) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, serum methylenetetrahydrofolate reductase levels, and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population. *Cancer Sci* 101:782–786
30. Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF (2001) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4004–4009
31. Yang L, Liu L, Wang JX et al (2011) Polymorphisms in folate-related genes: impact on risk of adult acute lymphoblastic leukemia rather than pediatric in Han Chinese. *Leuk Lymphoma* 52:1770–1776
32. Yeoh AEJ, Lu Y, Chan JYS et al (2010) Genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia shows protection in Malay boys: results from the Malaysia–Singapore ALL Study Group. *Leuk Res* 34:276–283
33. Zanrosso CW, Hatagima A, Emerenciano M et al (2006) The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population. *Leuk Res* 30:477–481
34. Frosst P, Blom HJ, Milos R et al (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10:111–113
35. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R (1998) A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 64:169–172
36. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J et al (2001) The 1298A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 156:409–415
37. Han D, Shen C, Meng X et al (2012) Methionine synthase reductase A66G polymorphism contributes to tumor susceptibility: evidence from 35 case-control studies. *Mol Biol Rep* 39:805–816
38. Brosselin P, Rudant J, Orsi L et al (2009) Acute childhood leukaemia and residence next to petrol stations and automotive repair garages: the ESCALE study (SFCE). *Occup Environ Med* 66:598–606
39. Rudant J, Menegaux F, Leverger G et al (2008) Childhood hematopoietic malignancies and parental use of tobacco and alcohol: the ESCALE study (SFCE). *Cancer Causes Control* 19:1277–1290
40. Rudant J, Menegaux F, Leverger G et al (2007) Household exposure to pesticides and risk of childhood hematopoietic malignancies: the ESCALE study (SFCE). *Environ Health Perspect* 115:1787–1793
41. Rudant J, Orsi L, Menegaux F et al (2010) Childhood acute leukemia, early common infections, and allergy: the ESCALE study. *Am J Epidemiol* 172:1015–1027
42. Amigou A, Sermage-Faure C, Orsi L et al (2011) Road traffic and childhood leukemia: the ESCALE study (SFCE). *Environ Health Perspect* 119:566–572
43. Desandes E, Clavel J, Berger C et al (2004) Cancer incidence among children in France, 1990–1999. *Pediatr Blood Cancer* 43:749–757
44. Howie BN, Donnelly P, Marchini J (2009) A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS Genet* 5:e1000529

45. Blondel B, Norton J, du Mazaubrun C, Breart G (2001) Development of the main indicators of perinatal health in metropolitan France between 1995 and 1998. Results of the national perinatal survey. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 30:552–564
46. Blondel B, Supernant K, Du Mazaubrun C, Breart G (2006) Trends in perinatal health in metropolitan France between 1995 and 2003: results from the National Perinatal Surveys. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 35:373–387
47. Infante-Rivard C, Jacques L (2000) Empirical study of parental recall bias. *Am J Epidemiol* 152:480–486
48. Dehe S, Vodovar et al. (2000) Prévention primaire des anomalies de fermeture du tube neural par supplémentation périconceptionnelle en acide folique. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* 21:87–89
49. Marchini J, Howie B (2010) Genotype imputation for genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 11:499–511
50. Nothnagel M, Ellinghaus D, Schreiber S, Krawczak M, Franke A (2009) A comprehensive evaluation of SNP genotype imputation. *Hum Genet* 125:163–171
51. Friso S, Choi SW, Girelli D et al (2002) A common mutation in the 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Nat Acad Sci USA* 99:5606–5611
52. Olteanu H, Munson T, Banerjee R (2002) Differences in the efficiency of reductive activation of methionine synthase and exogenous electron acceptors between the common polymorphic variants of human methionine synthase reductase. *Biochemistry* 41:13378–13385
53. Koppen IJ, Hermans FJ, Kaspers GJ (2010) Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 148:3–14
54. Zintzaras E, Koufakis T, Ziakas PD, Rodopoulou P, Giannouli S, Voulgarelis M (2006) A meta-analysis of genotypes and haplotypes of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Epidemiol* 21:501–510
55. Pereira TV, Rudnicki M, Pereira AC, Pombo-De-Oliveira MS, Franco RF (2006) 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and acute lymphoblastic leukemia risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 15:1956–1963
56. Vijaykrishnan J, Houlston RS (2010) Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Haematologica* 95:1405–1414
57. Wang J, Zhan P, Chen B, Zhou R, Yang Y, Ouyang J (2010) MTHFR C677T polymorphisms and childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Leuk Res* 34:1596–1600
58. Rozen R (1997) Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost* 78:523–526
59. Blount BC, Mack MM, Wehr CM et al (1997) Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Nat Acad Sci USA* 94:3290–3295
60. Kim YI (2000) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutr Rev* 58:205–209
61. Milne E, de Klerk NH, van Bockxmeer F et al (2006) Is there a folate-related gene–environment interaction in the etiology of childhood acute lymphoblastic leukemia? *Int J Cancer* 119:229–232

## Road Traffic and Childhood Leukemia: The ESCALE Study (SFCE)

Alicia Amigou,<sup>1,2</sup> Claire Sermage-Faure,<sup>1,2</sup> Laurent Orsi,<sup>1,2</sup> Guy Leverger,<sup>3</sup> André Baruchel,<sup>4</sup> Yves Bertrand,<sup>5</sup> Brigitte Nelken,<sup>6</sup> Alain Robert,<sup>7</sup> Gérard Michel,<sup>8</sup> Geneviève Margueritte,<sup>9</sup> Yves Perel,<sup>10</sup> Françoise Mechinaud,<sup>11</sup> Pierre Bordigoni,<sup>12</sup> Denis Hémon,<sup>1,2</sup> and Jacqueline Clavel<sup>1,2,13</sup>

<sup>1</sup>INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), CESP (Centre de recherche en Epidémiologie et Santé des Populations) Environmental Epidemiology of Cancer, Villejuif, France; <sup>2</sup>Université Paris-Sud 11, UMRS-1018, Villejuif, France; <sup>3</sup>AP HP (Assistance Publique des Hôpitaux de Paris), Hôpital Armand Trousseau, Paris, France; <sup>4</sup>AP HP (Assistance Publique des Hôpitaux de Paris), Hôpital Saint-Louis and Hôpital Robert-Debré, Paris, France; <sup>5</sup>Hôpital Debrousse, Lyon, France; <sup>6</sup>Université Lille Nord de France, Lille, France; <sup>7</sup>Hôpital des Enfants, Toulouse, France; <sup>8</sup>Hôpital La Timone, Marseille, France; <sup>9</sup>Hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France; <sup>10</sup>Hôpital Pellegrin Tripode, Bordeaux, France; <sup>11</sup>Hôpital Mere-Enfant, CHU-Nantes, France; <sup>12</sup>Hôpital d'enfants de Brabois, Nancy, France; <sup>13</sup>National Registry of Childhood Blood Malignancies, Villejuif, France

**BACKGROUND:** Traffic is a source of environmental exposures, including benzene, which may be related to childhood leukemia.

**OBJECTIVES:** A national registry-based case-control study [ESCALE (Etude Sur les Cancers et les Leucémies de l'Enfant, Study on Environmental and Genetic Risk Factors of Childhood Cancers and Leukemia)] carried out in France was used to assess the effect of exposure to road traffic exhaust fumes on the risk of childhood leukemia.

**METHODS:** Over the study period, 2003–2004, 763 cases and 1,681 controls < 15 years old were included, and the controls were frequency matched with the cases on age and sex. The ESCALE data were collected by a standardized telephone interview of the mothers. Various indicators of exposure to traffic and pollution were determined using the geocoded addresses at the time of diagnosis for the cases and of interview for the controls. Indicators of the distance from, and density of, main roads and traffic nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) concentrations derived from traffic emission data were used. Odds ratios (ORs) were estimated using unconditional regression models adjusted for potential confounders.

**RESULTS:** Acute leukemia (AL) was significantly associated with estimates of traffic NO<sub>2</sub> concentration at the place of residence > 27.7 µg/m<sup>3</sup> compared with NO<sub>2</sub> concentration < 21.9 µg/m<sup>3</sup> [OR = 1.2; confidence interval (CI), 1.0–1.5] and with the presence of a heavy-traffic road within 500 m compared with the absence of a heavy-traffic road in the same area (OR = 2.0; 95% CI, 1.0–3.6). There was a significant association between AL and a high density of heavy-traffic roads within 500 m compared with the reference category with no heavy-traffic road within 500 m (OR = 2.2; 95% CI, 1.1–4.2), with a significant positive linear trend of the association of AL with the total length of heavy-traffic road within 500m.

**CONCLUSION:** This study supports the hypothesis that living close to heavy-traffic roads may increase the risk of childhood leukemia.

**KEY WORDS:** acute leukemia, benzene, children, environment, epidemiology, road traffic. *Environ Health Perspect* 119:566–572 (2011). doi:10.1289/ehp.1002429 [Online 8 December 2010]

Leukemia is the most common childhood cancer, and there are about 470 new cases each year in France (Clavel et al. 2004; Lacour et al. 2010). Except for high doses of ionizing radiation, Down syndrome, a few rare genetic disorders, and certain chemotherapies, which explain few cases, the etiology of childhood leukemia remains largely unknown (Anderson et al. 2006; Buffler et al. 2005; McNally and Parker 2006).

Road traffic is a source of environmental exposure to aromatic compounds, particularly low doses of benzene (Duarte-Davidson et al. 2001; Smith and Zhang 1998). In adults, occupational exposure to high doses of benzene is an established cause of acute leukemia, especially acute nonlymphoblastic leukemia (ANLL). In 1982, the International Agency for Research on Cancer (IARC) assigned benzene to group 1 of the agents carcinogenic to humans. Diesel and gasoline exhaust fumes were classified as probably (group 2A) and possibly (group 2B) carcinogenic to humans

(IARC 1989), respectively. A few studies have investigated the role of road traffic in the risk of childhood leukemia, using a variety of traffic indicators to assess exposure.

The indicators were proximity to heavy-traffic roads in two ecological studies and one case-control study, which found no association between acute leukemia (AL) and the presence of a heavy-traffic road within 50 m (Steffen et al. 2004; Visser et al. 2004) or 100 m of the residence (Harrison et al. 1999); daily road traffic in three case-control studies, assessed as the daily number of cars on the road of residence (Savitz and Feingold 1989) or on the road with the highest daily traffic within < 165 m (Reynolds et al. 2001), or weighted by the road-dwelling distance (Langholz et al. 2002; Pearson et al. 2000), which reported a positive association, significant in two studies (Pearson et al. 2000; Savitz and Feingold 1989); traffic density within 150 m in two case-control studies (Reynolds et al. 2004; Von Behren et al. 2008) or traffic

density at the residence in another case-control study (Raaschou-Nielsen et al. 2001), with no association; and an ecological study, which found a weak significant association (Reynolds et al. 2002).

A more indirect indicator, the number of cars owned in the area, was associated with leukemia in one ecological study (Nordlinder and Jarvholm 1997) but not in another (Reynolds et al. 2002). Estimates of nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) concentration were used in three case-control studies (Feychting et al. 1998; Raaschou-Nielsen et al. 2001; Weng et al. 2009), and estimates of benzene concentration were used in two case-control studies (Crosignani et al. 2004; Raaschou-Nielsen et al. 2001) and one ecological study (Whitworth et al. 2008).

All the studies based on pollutant estimates tended to show an association with

Address correspondence to J. Clavel, Epidémiologie environnementale des cancers UMRS-1018, Equipe 6 INSERM, Université Paris-Sud (ex-U754) Centre de recherche en Epidémiologie et Santé des Populations (CESP), 16, Avenue Paul Vaillant-Couturier, F-94807 Villejuif Cedex, France. Telephone: +33 1 45 59 50 37. Fax: +33 1 45 59 51 51. E-mail: jacqueline.clavel@inserm.fr

Supplemental Material is available online (doi:10.1289/ehp.1002429 via <http://dx.doi.org/>).

The authors are grateful to F. Menegaux, M-H Da Silva, and C. Steffen (INSERM U1018), who contributed to the recruitment of the cases; A. Guyot-Goubin and the staff of the French National Registry of Childhood Blood Malignancies, who contributed to case detection and verification; the Geocible Company, who geocoded the addresses; the Institut Géographique National (IGN), who provided vectorial maps; S. Méléze and M-A Noel (Institut CSA), who coordinated the selection of the controls and the interviews; and C. Tricoche (Callson) and the team of interviewers, who interviewed the cases and the controls.

This work was supported by grants from INSERM, the Fondation de France, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS), the Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (AFSSET), the association Cent pour sang la vie, the Institut National du Cancer (INCa), and the Institut de Veille Sanitaire (InVS).

The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Received 12 May 2010; accepted 8 December 2010.

leukemia, except the Danish study (Raaschou-Nielsen et al. 2001), which was based on particularly reliable data estimated by inclusion of measured NO<sub>2</sub> and benzene concentrations, traffic patterns, and many other parameters in a model. In addition, a validation study of exposure assessment was conducted on a subgroup. Two case-control studies (Brosselin et al. 2009; Steffen et al. 2004), including our current study, reported positive and significant associations between AL and living next to a gas station. A further case-control study (Harrison et al. 1999) found a positive but nonsignificant association with gas stations within 100 m of the residence.

The national population-based case-control study, ESCALE [Etude Sur les Cancers et les Leucémies de l'Enfant (Study on Environmental and Genetic Risk Factors of Childhood Cancers and Leukemia)] has been used to investigate the relationship between the risk of childhood AL and various indicators of exposure to traffic derived from the address of the subject at the time of the study.

## Materials and Methods

The ESCALE study is a national study conducted in 2003 and 2004 in mainland France (11 million children < 15 years of age) to investigate the role of infectious, environmental, and genetic factors in four childhood neoplastic diseases (acute leukemia, lymphoma, neuroblastoma, and brain tumor) (Brosselin et al. 2009; Rudant et al. 2007, 2008, 2010). In this article we focus on AL.

**Case and control ascertainment.** **Cases.** The cases were identified directly by the investigators of the French National Registry of Childhood Blood Malignancies (RNHE) (Clavel et al. 2004) assigned to each pediatric oncology hospital department (Appendix 1). Eligible cases were children first diagnosed with one of the cancers under study between 1 January 2003 and 31 December 2004, age < 15 years, and residence in mainland France at the time of diagnosis. Cases who had been adopted, whose biological mother had died, whose mother did not speak French, or whose mother presented with a serious psychiatric disorder were not eligible. For ethical reasons, the mothers of children who had died or who were receiving hospital palliative care were not contacted. Of the 937 cases of AL identified during the study period, 842 cases were eligible. The reasons for noneligibility consisted of the death of the child (34 cases), hospital palliative care (7 cases), death of the biological mother (10 cases), non-French-speaking mother (29 cases), and mother with a serious psychiatric disorder (15 cases). In all, 763 cases [645 cases of acute lymphoblastic leukemia (ALL), 102 of acute myeloblastic leukemia (AML), and 16 of undifferentiated or biphenotypic AL] of the 842 eligible cases

consented to participate (91%). The cases were confirmed, documented, and classified by leukemia cytological and immunological subtype by the RNHE.

**Controls.** Using a quota-sampling method, we randomly selected the controls from the French population over the years 2003 and 2004. We randomly extracted a base of 60,000 phone numbers representative of French telephone subscribers from the national telephone directory. This set was representative of the population in terms of the administrative regions and urbanization. By incrementing each number by 1, we generated a new set of 60,000 numbers, which included unlisted numbers and had geographic and demographic distributions similar to those of the initial set (same first six digits, which determine the location of the line). Quotas were applied to make the age and sex distribution of the controls similar to that of all ESCALE cases, based on estimates from the RNHE (Clavel et al. 2004) and the Regional Childhood Cancer Registries (Desandes et al. 2004), with age group quotas 0–1, 2, 3, 4, 5–6, 7–8, 9–11, and 12–14 years. The number of children < 15 years of age in the household was forced to reflect that of the population by using quotas to prevent a bias in the distribution of birth order, which may happen if the probability of a control being selected among phone subscribers depends on the size of the sibship. We obtained the expected number of children < 15 years of age living in the household for a given age from the 1999 population census [INSEE (National Institute for Statistics and Economic Studies) 1999]. Thus, there were 48 quota strata of age (8 strata), sex (2 strata), and number of children by household (1, 2, 3, or more). The controls were children who were free from cancer, had not been adopted, whose biological mother was alive, free from serious psychiatric disorders, and French-speaking. Of the 50,217 phone numbers dialed, 22,584 did not connect to a household, 24,411 connected to ineligible households, and 862 connected to respondents who hung up before eligibility could be checked. The 2,360 remaining numbers were considered to be those of eligible households, 679 of which refused to participate. Thus, 1,681 mothers were interviewed (71.2%).

**Data collection.** Using structured questionnaires, the same trained interviewers carried out the telephone interviews with the biological mothers of the cases and controls. Half of the mothers of the cases were interviewed < 4 months after the diagnosis (range: 1–24 months). The telephone questionnaire elicited information on demographic and socioeconomic characteristics, childhood medical history, childhood environment, lifestyle, and residential history. The interviews also elicited parental occupational history,

maternal exposure, and familial history of cancer, allergy, and autoimmune disease. For each residence inhabited since the conception of the index child, the mothers were asked the name of the municipality and its ZIP/area code, type of housing (apartment, house, or farm) and whether a business adjoined it. Only the exact address of the last residence was collected. The degree of urbanization of the municipalities of residence (rural: < 5,000 inhabitants; mixed: 5,000–100,000 inhabitants; urban: > 100,000 inhabitants) was derived from the 1999 census data. Professional category of the parents was the higher of the maternal and paternal occupations at interview and was coded using the two-digit ILO classification (International Labour Organization 1988). This variable was used as an indicator of socioeconomic status (SES).

**Exposure assessment.** We used a geographic information system (Mapinfo, Pitney Bowes Software Inc., Troy, NY, USA) to generate the Lambert II coordinates of the residence at the time of diagnosis or interview and automatically match the address with the Navteq (Navteq, Paris, France; <http://www.navteq.com/>) vector map of the road network. Whenever possible, we manually located addresses that could not be automatically linked. At the end of the process, 2.4% of the subjects could not be located more precisely than by their municipality of residence. Because no quantitative indicators of road traffic on a national scale are available, Navteq function classes were used to characterize the roads on the basis of their importance in the network: Class 1 consisted of high-speed freeways and bypasses, class 2 of main roads connecting class 1 roads, and class 3 of secondary roads. Class 4 and 5 roads, consisting of moderate-speed roads connecting neighborhoods, were not considered in this study. National estimates of NO<sub>2</sub> concentrations were used as indicators of background air pollution. The National Environmental and Energy Agency (ADEME) (Jeannée et al. 2004) provided a smoothed map of annual traffic NO<sub>2</sub> concentrations, estimated for the year 2000 by a multiple determinant model using road, transport, and emissions data. The map shows NO<sub>2</sub> concentrations for mainland France on a 4-km<sup>2</sup> grid.

We derived various indicators. Proximity to main roads was defined as the presence of heavy-traffic roads within 500 m of the residence. The unexposed category indicated the absence of class 1, 2, and 3 roads. The low-exposure category indicated the presence of at least one class 2 road but no class 1 road or of a class 3 road with no class 1 or class 2 road. The intermediate-exposure category indicated the presence of at least one class 1 road but no class 2 road. The high-exposure

category indicated the presence of both class 1 and class 2 roads. The density of heavy-traffic roads was defined as the cumulative lengths of class 1 and 2 roads within 500 m of the residence. Cutoffs were defined *a priori*, based on the joint distribution of the road lengths within 500 m. The unexposed category indicated that the lengths of class 1 and class 2 roads were both equal to zero; the low-density category indicated that the length of class 1 roads was < 750 m (25th percentile); the intermediate-density category indicated that the length of class 1 roads was > 750 m (25th percentile) and the length of class 2 roads was < 750 m (25th percentile); the high-density category indicated that the lengths of class 1 and class 2 roads were both > 750 m (25th percentile). The indicator of traffic-related NO<sub>2</sub> concentration was extracted from the ADÈME map. We assigned to each residence the average of the traffic NO<sub>2</sub> concentrations at the grid square centers located within 3 km, weighted by the inverse of the distances to the grid square centers. The cutoffs were based on the distribution of the NO<sub>2</sub> concentration. The low-concentration category

consisted in concentrations > 50th percentile (12.2 µg/m<sup>3</sup>), the intermediate-concentration category in concentrations between the 50th and 75th percentiles (between 12.2 µg/m<sup>3</sup> and 16.2 µg/m<sup>3</sup>), and the high-concentration category in concentrations ≥ 75th percentile.

We then constructed composite exposure indicators by crossing the three variables: proximity to heavy-traffic roads, density of heavy-traffic roads, and traffic NO<sub>2</sub> concentration. The unexposed category consisted of the intersection of the unexposed categories of the three variables; the high-exposure category in the intersection of the high-exposure categories of the first two variables and the high- or intermediate-exposure category of the last variable. The intermediate-exposure category consisted of the remaining exposure combinations.

Case parents were recruited by the physician attending their child. The parents completed a standardized form indicating that they provided informed consent for participation and that their acceptance or refusal would have no impact on the health care of their child. Control parents provided informed consent by telephone.

**Statistical analysis.** We estimated odds ratios (ORs) and their 95% confidence intervals (CIs) using unconditional logistic regression models (all AL) or polychotomous logistic regression (AL types) including the stratification variable used for quota sampling (eight age groups for each sex) and the socioeconomic status variable. We also performed the analyses by AL type and 5-year age group. We tested the stability of the results after additional adjustments and/or stratum analysis for maternal and paternal education, type of housing, degree of urbanization of the municipality of residence, and factors previously related to childhood leukemia in the literature and in the ESCALE study (birth order, early common infections (Rudant et al. 2010), preconception paternal smoking (Rudant et al. 2008), maternal domestic use of pesticides during pregnancy (Rudant et al. 2007), and residence next to a gas station (Brosselin et al. 2009).

We computed tests for trend, when appropriate, from categorical variables. The subjects of each class of the categorical variables were assigned the median value of that class, thus creating a new quantitative and discrete variable from the quantitative and continuous variable of interest. We then tested the linear trend by a likelihood ratio test, comparing the model with the newly generated quantitative and discrete variable with the categorical variable. If linearity was not rejected, the *p*-value of the trend was obtained by testing the slope of the quantitative and continuous variable of interest.

The SAS software package (version 9; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used for all the analyses.

The research was conducted in accordance with principles of the Declaration of Helsinki (World Medical Association 2004) and complied with all applicable international regulatory requirements including submission to an ethics committee (DGS No. 2003/0259).

## Results

A total of 763 cases were included, consisting of 645 ALL cases (544 common B-cell ALL, 30 mature B-cell ALL, 67 T-cell ALL, and 4 unspecified ALL) and 118 ANLL cases (102 AML and 16 undifferentiated or biphenotypic leukemia).

**Case and control comparability.** ALL distribution showed the expected male predominance (54.3%) and incidence peak at 2–6 years of age (54.8%) [see Supplemental Material, Table 1 (doi:10.1289/ehp.1002429)].

The distribution of controls by age and sex was similar to that of the whole ESCALE case group, but the controls were significantly younger than the AL cases, with a mean age (± SD) of 5.2 ± 3.7 for the cases and 5.5 ± 4.3 years for the controls. However, all the strata contained more than one control per case for

**Table 1.** Distribution of the cases and controls by parental education and professional category, and characteristics of the place of residence at the time of diagnosis (cases) or interview (controls) [n (%)].

Social and residential characteristics	Controls (n = 1681)	Cases (n = 763)	Percent OR (95% CI) <sup>a</sup>
<b>Maternal educational level</b>			
No secondary school	159 (9)	81 (11)	1.2 (0.9–1.6)
Secondary school	500 (30)	246 (32)	1.2 (0.9–1.4)
High school graduation	320 (19)	138 (18)	1.0 (0.8–1.3)
Higher education	701 (42)	298 (39)	1.0 (Ref)
<b>Paternal educational level</b>			
No secondary school	165 (10)	99 (13)	1.6 (1.2–2.2)
Secondary school	662 (40)	313 (41)	1.2 (1.0–1.5)
High school graduation	236 (14)	114 (15)	1.3 (1.0–1.7)
Higher education	601 (36)	229 (30)	1.0 (Ref)
<b>Parental professional category</b>			
Managers, intellectual/intermediate professions	715 (43)	278 (36)	1.0 (Ref)
Administrative and sales workers	477 (28)	224 (29)	1.2 (1.0–1.5)
Service workers	215 (13)	95 (13)	1.2 (0.9–1.5)
Factory/agricultural workers, unemployed	274 (16)	166 (22)	1.5 (1.2–1.9)
<b>Birth order</b>			
1	708 (42)	376 (49)	1.0 (Ref)
2	608 (36)	246 (32)	0.7 (0.6–0.9)
≥ 3	365 (22)	141 (19)	0.7 (0.5–0.8)
<b>Type of home at interview</b>			
Apartment	484 (29)	249 (33)	1.0 (Ref)
House	1,173 (70)	504 (66)	0.9 (0.7–1.0)
Farm	23 (1)	10 (1)	0.8 (0.4–1.7)
<b>Area of residence at interview</b>			
Rural	601 (36)	249 (33)	1.0 (Ref)
Mixed	391 (23)	182 (24)	1.1 (0.9–1.4)
Urban	689 (41)	330 (43)	1.1 (0.9–1.4)
<b>No. of house moves</b>			
None	766 (46)	264 (35)	1.0 (Ref)
1	613 (36)	292 (38)	1.4 (1.1–1.7)
≥ 2	302 (18)	207 (27)	2.4 (1.9–3.1)
<b>Precision of the coordinates</b>			
≤ 15 m	1,320 (79)	558 (73)	1.0 (Ref)
16–100 m	324 (19)	184 (24)	1.3 (1.1–1.6)
> 100 m	37 (2)	21 (3)	1.3 (0.7–4.3)

Ref, reference.

<sup>a</sup>ORs and 95% CIs estimated by unconditional logistic regression models including the stratification variable age × sex.

adjustment, with the most controls per case in the youngest strata. Fathers of the controls had a slightly higher educational level than fathers of the cases, and parents of the controls had a slightly more qualified professional status than parents of the cases (Table 1). SES was therefore included in logistic regressions relating AL to traffic indicators. There was no significant difference between cases and controls with regard to housing or urbanization at the place of residence at the time of interview. The cases had significantly more often moved at least once (65%) than had the controls (54%). Among the controls, 69% of the only and first-born children had moved at least once, whereas this proportion was 52% for second-born, 41% for third-born, and 40% for at least fourth-born. Overall, the case and control coordinates were obtained with a precision of  $\leq 100$  m for 97% of the cases and 98% of the controls, but the cases were less often located with a precision of  $\leq 15$  m (73% vs. 79%).

**Exposure determinants.** Among the controls, the most-exposed children in terms of proximity and density of main roads were more often in a higher socioeconomic category than the least-exposed children. However,

this relationship was true in the less urban ( $< 100,000$  inhabitants) and most urban ( $\geq 1,000,000$  inhabitants) areas, but not in the intermediate strata of rural/urban status, where the least-exposed children belonged to the highest socioeconomic category. The rural/urban status, closely related to population density, was a strong determinant of traffic NO<sub>2</sub> concentrations, which ranged from 10.1 to 20.4  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  in the rural areas and Paris area, respectively. The traffic NO<sub>2</sub> concentration indicator was significantly associated with the indicators of the proximity and density of heavy-traffic roads. However, almost 40% of the controls who lived  $> 500$  m from a main road were estimated to be exposed to traffic NO<sub>2</sub> at an intermediate (23%) or high (16%) level.

**Exposure to road traffic and risk of childhood acute leukemia.** AL was associated with the indicators of proximity and density of heavy-traffic roads (Table 2) and, overall, the associations were similar for ALL and ANLL. The presence of class 1 and 2 roads within 500 m and their presence within 300 m were associated with ORs of 2.0 (95% CI, 1.0–3.6; 22 cases vs. 26 controls) and 2.4 (95% CI,

1.0–5.7; 11 cases vs. 10 controls), respectively. The presence of a class 1 road within 100 m was associated with an OR of 3.7 (95% CI, 1.1–12.2; 7 cases vs. 5 controls).

The density of heavy-traffic roads was significantly related to ALL. The OR associated with the risk of AL increased significantly with increasing density.

AL was also significantly associated with the estimated traffic-related NO<sub>2</sub> concentrations at the place of residence, with a significant positive linear trend ( $p < 0.05$ ).

The variable combining the heavy-traffic road proximity and density with traffic NO<sub>2</sub> was significantly associated with AL, with an OR of 2.6 (95% CI, 1.2–5.3) for the most-exposed category versus the unexposed category (Table 3).

**Adjustments for potential confounders.** The results were unchanged after adjustment for degree of urbanization, type of housing, and factors related to AL in the ESCALE study: birth order, early common infections in childhood (at least one infection per quarter before 1 year of age), maternal pesticide use during pregnancy, and paternal smoking before conception. Exclusion from the

**Table 2.** Relationship between childhood leukemia and indicators of proximity and density of heavy-traffic road traffic NO<sub>2</sub> concentration at the place of residence.

Indicators of exposure to roads and traffic	Navteq function <sup>a</sup>			Controls (n = 1,681)	All AL		ALL		ANLL	
	Class 1	Class 2	Class 3		Cases (n = 763)	OR (95% CI) <sup>b</sup>	Cases (n = 645)	OR (95% CI) <sup>c</sup>	Cases (n = 118)	OR (95% CI) <sup>c</sup>
<b>Proximity to main roads (meters)</b>										
Unexposed	$\geq 500$ m	$\geq 500$ m	$\geq 500$ m	672	282	1.0 (Ref)	236	1.0 (Ref)	46	1.0 (Ref)
Low	$\geq 500$ m	$\geq 500$ m	$< 500$ m	905	422	1.1 (0.9–1.4)	359	1.1 (0.9–1.4)	63	1.0 (0.7–1.5)
	$\geq 500$ m	$< 500$ m								
Intermediate	$< 500$ m	$\geq 500$ m		78	37	1.2 (0.8–1.8)	32	1.2 (0.8–1.9)	5	1.0 (0.4–2.6)
High	$< 500$ m	$< 500$ m		26	22	2.0 (1.0–3.6)	18	1.9 (1.0–3.7)	4	2.2 (0.7–6.8)
<b>Density of heavy-traffic roads within 500 m of the residence</b>										
Unexposed	None	None		1,255	547	1.0 (Ref)	462	1.0 (Ref)	85	1.0 (Ref)
Low	Other exposed combinations			345	163	1.1 (0.9–1.4)	138	1.1 (0.9–1.4)	25	1.1 (0.7–1.7)
Intermediate	$\geq 750$ m	$< 750$ m		61	34	1.3 (0.8–2.0)	29	1.3 (0.8–2.1)	5	1.3 (0.5–3.3)
High	$\geq 750$ m	$\geq 750$ m		20	19	2.2 (1.1–4.2)	16	2.2 (1.1–4.3)	3	2.1 (0.6–7.3)
<b>Traffic-related NO<sub>2</sub> concentration</b>										
Low ( $< 12.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )				840	337	1.0 (Ref)	287	1.0 (Ref)	50	1.0 (Ref)
Intermediate ( $12.2\text{--}16.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )				421	220	1.3 (1.0–1.6)	188	1.3 (1.0–1.6)	32	1.4 (0.9–2.2)
High ( $\geq 16.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )				420	204	1.2 (1.0–1.5)	169	1.2 (1.0–1.5)	35	1.5 (1.0–2.4)
Missing				0	2		1		1	
<i>p</i> -Value for trend test						$< 0.05$				

Ref, reference.

<sup>a</sup>Class 1 consisted of high-speed freeways and bypass, class 2 of main roads connecting class 1 roads, and class 3 of secondary roads. Class 4 and 5 roads, corresponding to other roads connecting neighborhoods with moderate speed, were not considered in this study. <sup>b</sup>ORs and 95% CIs estimated by unconditional logistic regression models including the stratification variable age  $\times$  sex and socioeconomic status. <sup>c</sup>ORs and 95% CIs estimated by polychotomous logistic regression models including the stratification variable age  $\times$  sex and socioeconomic status.

**Table 3.** Relationship between childhood leukemia and the composite exposure indicators (heavy-traffic road proximity and density and traffic NO<sub>2</sub> concentration).

Composite group	Combined indicator of exposure to roads and traffic			Controls (n = 1,681)	All AL		ALL		ANLL	
	Proximity	Density	Traffic NO <sub>2</sub>		Cases (n = 763)	OR (95% CI) <sup>a</sup>	Cases (n = 645)	OR (95% CI) <sup>b</sup>	Cases (n = 118)	OR (95% CI) <sup>b</sup>
Unexposed	Unexposed	Unexposed	Low	424	166	1.0 (Ref)	139	1.0 (Ref)	27	1.0 (Ref)
Intermediate	Other less-exposed combinations			1,241	581	1.2 (1.0–1.5)	493	1.2 (1.0–1.6)	88	1.2 (0.7–1.8)
High	High	High	High/intermediate	16	16	2.6 (1.2–5.3)	13	2.4 (1.1–5.3)	3	3.1 (0.8–11.6)
Missing				0	0		0		0	

Ref, reference.

<sup>a</sup>ORs and 95% CIs estimated by unconditional logistic regression models including the stratification variable age  $\times$  sex and socioeconomic status. <sup>b</sup>ORs and 95% CIs estimated by polychotomous logistic regression models including the stratification variable age  $\times$  sex and socioeconomic status.

analysis of the 11 cases with Down syndrome and the 35 cases and 42 controls having lived in a residence adjoining a gas station did not modify the results.

Results showed the same trends when the analyses were stratified on the urban/rural status of the residence [see Supplemental Material, Table 2 (doi:10.1289/ehp.1002429)]. However, the associations with the proximity and density of heavy-traffic roads were slightly more pronounced in urban areas.

The associations with the indicators of the proximity and density of heavy-traffic roads were also stronger when the analyses were restricted to the children who had never moved [see Supplemental Material, Table 3 (doi:10.1289/ehp.1002429)]. Similarly, restriction of the analysis to the children who had lived for at least 2 years in the house they inhabited at the time of diagnosis or interview (548 cases and 1,282 controls) strengthened all the relationships. Finally, the results were unchanged after exclusion of the cases and controls for whom the precision of the residence coordinates was > 15 m.

## Discussion

Overall, the results suggest that childhood leukemia is related to traffic. For both ALL and ANLL, the relationship was observed for the indicators of proximity or density of main roads and of NO<sub>2</sub> concentration. Cases were identified using the data collection system of the RNHE, which makes case selection bias at the identification stage unlikely. The case mother participation rate was very high (91%). The main reason for noninclusion was a child's poor state of health or death. However, the exposure to a heavy-traffic road is unlikely to have been related to the severity of the disease or short-term survival, particularly because the associations were similar for rural, semi-urban, and urban places of residence, in which health care may differ.

According to the data available from the national registry, cases included in the ESCALE study were slightly younger and more often resided in a rural area than cases diagnosed at the same period and not included in ESCALE. They also tended to reside less close to heavy-traffic roads (2.9% vs. 5.3% within 500 m) and be less exposed to NO<sub>2</sub> (28% vs. 37% above the 70th percentile) than the cases not included. These comparisons give no indication of any overrepresentation of exposed children among the cases that might have generated the observed association.

Controls were randomly selected from the overall population using the national telephone directory. The quota-sampling process successfully ensured that the responding controls had the same distribution as the case group with regard to sex and age and the same distribution as the overall population with

regard to region, birth order, and maternal education: 41% and 37% of the ESCALE controls born in 1995, 1998, or 2003 were first- and second-born children compared with 43% and 34% in the French national perinatal surveys (Blondel et al. 1997, 2001, 2006); 43% had graduate mothers, compared with 39% for the newborns of the perinatal surveys. Unlisted telephone numbers were randomly generated to prevent selection bias by exclusion of controls in higher socioeconomic categories. People with only cell phones could not be contacted and included as controls, but the effect of the resulting selection of parents with a landline on residence characteristics is difficult to predict. For the selection to be able to explain the results, unselected controls with only a cell phone would have to reside close to main roads more often than the selected controls with a landline. According to the National Institute for Prevention and Health Education (INPES), owners of only cell phones would be of more modest social status than the landline owners at the time of the ESCALE study (Beck et al. 2007), whereas in the ESCALE study, the highest socioeconomic categories were more exposed than the more modest categories.

Overall, on the basis of the national perinatal survey, the controls were comparable with the French population in terms of social category and parental education. However, parental socioeconomic status appeared to be slightly higher for controls than cases, which may be because of the absence of the eligible controls who refused to participate. Parental socioeconomic status was positively and significantly associated with the traffic indicators. Therefore, deficient selection of more modest households is unlikely to have underrepresented exposed children among controls and overestimated the relationship. In addition, adjustment and stratification on parental socioeconomic status did not change the results. The cases and controls were also similarly distributed in terms of housing and rural/urban status, which determine traffic exposure. The associations remained consistent when the analyses were stratified or adjusted on these variables.

The exposures were derived from residential address, which is not subject to recall bias. The addresses of all the cases and controls were obtained and the geocoding process mainly generated the residential coordinates with a minimum precision of 100 m. However, the proportion of addresses geocoded with the greatest precision ( $\leq 15$  m) was slightly lower for the cases (73%) than for the controls (79%); the difference was small and the results did not change dramatically under the extreme hypothesis that 6% of the cases were exposed instead of unexposed. Moreover, the ADEME map used for

the NO<sub>2</sub> concentration indicator used 4-km grid squares, which makes it less sensitive to geocoding imprecision. Restriction of the analyses to the subjects with the most precise coordinates did not change the results. We assumed that NO<sub>2</sub> concentrations at the time of the interviews (2003–2004) were correctly estimated by the measurements made in 2000, or, at least, that the residences were correctly classified using those measurements. A departure from this assumption would be nondifferential and would attenuate the associations if these associations were true. The NO<sub>2</sub> concentration indicator was positively related with the Navteq traffic indicators, in line with a study conducted in California (Reynolds et al. 2002) in which more precise indicators were available and shown to be very correlated. A Danish study (Raaschou-Nielsen et al. 1997) showed that the front-door concentration did not properly reflect personal exposure to NO<sub>2</sub> in most of the rural areas, where traffic density was negligible. It is noteworthy that, in this study, the ratio of background NO<sub>2</sub> concentrations to traffic-related NO<sub>2</sub> concentrations was stable across the urbanization categories.

In this study, municipalities of residence were available for the whole residential history, but only the last address was complete and could be geocoded, which might be a source of misclassification if the relevant exposure period is prenatal or during early childhood. The fact that the results were strengthened after restricting the analyses to children who had never moved or had lived at least 2 years in their last residence suggests that the most recent period may not be the most relevant.

The potential confounding factors related to socioeconomic factors or the type of residence were systematically taken into account by adjustment and also by stratification on these variables. In the same way, the leukemia-related factors in previous studies were considered by adjustment, exclusion, and also stratum-specific analyses.

The indicators used to assess and quantify the exposure to heavy-traffic roads or air pollution vary markedly from one study to another, which makes comparisons between studies difficult. The indicators used in our study are not exactly the same as those in previously published studies. A Taiwanese study (Weng et al. 2009) based on monitoring stations evidenced an association between AL and the highest background NO<sub>2</sub> concentrations. The association (OR = 2.3; 95% CI, 1.5–3.5) was stronger than the association observed in this study, which may be related to the fact that the Taiwanese study, on average, covered more urbanized areas. A Swedish study (Feychting et al. 1998) used model-based estimates of NO<sub>2</sub> concentrations as an indicator of traffic exposure in a nested case-control study over

a 25-year period and on the basis of 39 cases showed a nonsignificant association between AL and NO<sub>2</sub> concentration. A Danish study (Raaschou-Nielsen et al. 2001) used validated modeling of traffic-related NO<sub>2</sub> and benzene concentrations to assess lifelong exposure to traffic and evidenced no association with AL. An Italian study (Crosignani et al. 2004) evidenced an association between the highest estimates of benzene concentration and the risk of childhood leukemia (OR = 3.9; 95% CI, 1.4–11.3) and showed that OR significantly increased with estimated benzene concentration. A U.S. ecological study (Whitworth et al. 2008) used model-based benzene and 1,3-butadiene concentrations as indicators of traffic. The study showed an increased risk of AL in the census tracts with the highest benzene concentrations (relative risk = 1.4; 95% CI, 1.1–1.8) and similar associations with the highest 1,3-butadiene levels.

The studies that investigated the relationship between AL and the proximity of heavy-traffic roads (Harrison et al. 1999; Steffen et al. 2004; Visser et al. 2004) or the number of vehicles next to the residence daily (Langholz et al. 2002; Pearson et al. 2000;

Reynolds et al. 2001; Savitz and Feingold 1989) reported positive associations, which were significant in two of the studies (Savitz and Feingold 1989; Visser et al. 2004). The RRs calculated were similar in magnitude to those detected for the highest traffic exposures in our study.

Three studies used traffic density as an indicator of traffic. An ecological study conducted in California (Reynolds et al. 2002) found a weak significant association between the risk of AL and traffic density (OR = 1.2; 95% CI, 1.0–1.4). A case-control study, also conducted in California (Reynolds et al. 2004), showed no association with high levels of traffic density assessed 150 m from the residence of the child at birth. The Northern California Childhood Leukemia study (Von Behren et al. 2008) showed a slight positive nonsignificant association (OR = 1.2; 95% CI, 0.8–1.8).

Other studies, which used vehicle density (Nordlinder and Jarvholm 1997; Reynolds et al. 2002), gas station density (Weng et al. 2009), presence of a gas station in the vicinity (Harrison et al. 1999), or a gas station adjoining the residence (Brosselin et al. 2009;

Steffen et al. 2004) as indicators, have shown a positive association with AL and thus also suggest a link between childhood AL and exposure to pollutants emitted by road traffic.

## Conclusion

This study supports the hypothesis that living close to heavy-traffic roads may increase the risk of childhood leukemia. Our study has several assets that reinforce the reliability of its results. It is a registry-based study, with good participation rates, conducted on a national scale (11 million children < 15 years of age) with heterogeneity in housing, rural/urban status and road density. The controls were successfully representative of the French pediatric population in terms of social categories and rural/urban status. The exposure was assessed on an objective basis, using a geographic information system, with comparable quality for all the included children, at least within a given stratum of rural/urban status. The observation of slight dose-risk relationships also argues in favor of a causal association. The issue warrants further research with enhanced ability to trace lifelong exposure to traffic and benzene.

## REFERENCES

- Anderson LM. 2006. Environmental genotoxins/carcinogens and childhood cancer: bridgeable gaps in scientific knowledge. *Mutat Res* 608(2):136–156.
- Beck F, Guilbert P, Gautier A. 2007. Baromètre santé 2005, attitudes et comportements de santé. Saint-Denis, France:Inpes.
- Blondel B, Breart G, du Mazaubrun C, Badeyan G, Wcislo M, Lordier A, et al. 1997. La situation périnatale en France. Evolution entre 1981 et 1995 [in French]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 26(8):770–780.
- Blondel B, Norton J, du Mazaubrun C, Breart G. 2001. Evolution des principaux indicateurs de santé périnatale en France métropolitaine entre 1995 et 1998. Résultats des enquêtes nationales périnatales [in French]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 30(6):552–564.
- Blondel B, Supernant K, Du Mazaubrun C, Breart G. 2006. La santé périnatale en France métropolitaine de 1995 à 2003. Résultats des enquêtes nationales périnatales [in French]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 35(4):373–387.
- Brosselin P, Rudant J, Orsi L, Leverger G, Baruchel A, Bertrand Y, et al. 2009. Acute childhood leukaemia and residence next to petrol stations and automotive repair garages: the ESCALE study (SFCE). *Occup Environ Med* 66(9):598–606.
- Buffler PA, Kwan ML, Reynolds P, Urayama KY. 2005. Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. *Cancer Invest* 23(1):60–75.
- Clavel J, Goubin A, Auclerc MF, Auvrignon A, Waterkeyn C, Patte C, et al. 2004. Incidence of childhood leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma in France: National Registry of Childhood Leukaemia and Lymphoma, 1990–1999. *Eur J Cancer Prev* 13(2):97–103.
- Crosignani P, Tittarelli A, Borgini A, Codazzi T, Rovelli A, Porro E, et al. 2004. Childhood leukemia and road traffic: a population-based case-control study. *Int J Cancer* 108(4):596–599.
- Desandes E, Clavel J, Berger C, Bernard JL, Blouin P, de Lumley L, et al. 2004. Cancer incidence among children in France, 1990–1999. *Pediatr Blood Cancer* 43(7):749–757.
- Duarte-Davidson R, Courage C, Rushton L, Levy L. 2001. Benzene in the environment: an assessment of the potential risks to the health of the population. *Occup Environ Med* 58(1):2–13.
- Feychting M, Svensson D, Ahlbom A. 1998. Exposure to motor vehicle exhaust and childhood cancer. *Scand J Work Environ Health* 24(1):8–11.

### Appendix I. SFCE investigators of the ESCALE study.

Principal investigator	Hospital	City (France)
André Baruchel	Hôpital Saint-Louis/Hôpital Robert Debré	Paris
Claire Berger	Centre Hospitalier Universitaire	Saint-Etienne
Christophe Bergeron	Centre Léon Bérard	Lyon
Jean-Louis Bernard	Hôpital La Timone	Marseille
Yves Bertrand	Hôpital Debrousse	Lyon
Pierre Bordigoni	Centre Hospitalier Universitaire	Nancy
Patrick Boutard	Centre Hospitalier Régional Universitaire	Caen
Gérard Couillault	Hôpital d'Enfants	Dijon
Christophe Piguet	Centre Hospitalier Régional Universitaire	Limoges
Anne-Sophie Defachelles	Centre Oscar Lambret	Lille
François Demeocq	Hôpital Hôtel-Dieu	Clermont-Ferrand
Alain Fischer	Hôpital des Enfants Malades	Paris
Virginie Gandemer	Centre Hospitalier Universitaire – Hôpital Sud	Rennes
Charlotte Jubert	Hôpital Pellegrin Tripode	Bordeaux
Dominique Valteau-Couanet	Institut Gustave Roussy	Villejuif
Jean-Pierre Lamagnere	Centre Gatién de Clocheville	Tours
Françoise Lapierre	Centre Hospitalier Universitaire Jean Bernard	Poitiers
Guy Leverger	Hôpital Armand-Trousseau	Paris
Patrick Lutz	Hôpital de Haute-pierre	Strasbourg
Geneviève Margueritte	Hôpital Arnaud de Villeneuve	Montpellier
Françoise Mechinaud	Hôpital Mère et Enfants	Nantes
Gérard Michel	Hôpital La Timone	Marseille
Frédéric Millot	Centre Hospitalier Universitaire Jean Bernard	Poitiers
Martine Münzer	American Memorial Hospital	Reims
Brigitte Nelken	Université Lille Nord de France	Lille
Hélène Pacquement	Institut Curie	Paris
Brigitte Pautard	Centre Hospitalier Universitaire	Amiens
Yves Perel	Hôpital Pellegrin Tripode	Bordeaux
Alain Pierre-Kahn	Hôpital Enfants Malades	Paris
Emmanuel Plouvier	Centre Hospitalier Régional	Besançon
Xavier Rialland	Centre Hospitalier Universitaire	Angers
Alain Robert	Hôpital des Enfants	Toulouse
Hervé Rubie	Hôpital des Enfants	Toulouse
Nicolas Sirvent	L'Archet	Nice
Christine Soler	Fondation Lenval	Nice
Jean-Pierre Vannier	Hôpital Charles Nicolle	Rouen

SFCE, Société Française de lutte contre les Cancers et Leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent.

- Harrison RM, Leung PL, Somerville L, Smith R, Gilman E. 1999. Analysis of incidence of childhood cancer in the West Midlands of the United Kingdom in relation to proximity to main roads and petrol stations. *Occup Environ Med* 56(11):774–780.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1989. Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum 46.
- ILO (International Labour Organization). 1988. International Standard Classification of Occupations. Geneva:ILO.
- INSEE [National Institute for Statistics and Economic Studies (Institut national de la statistique et des études économiques)]. 1999. Recensement de la population. Mars 1999. Available: [http://www.recensement-1999.insee.fr/RP99/rp99/page\\_accueil.paccueil](http://www.recensement-1999.insee.fr/RP99/rp99/page_accueil.paccueil) [accessed 23 February 2011].
- Jeannée N, Nedellec V, Bouallala S, Deraisme J, Desqueyroux H. 2004. Geostatistical assessment of long term human exposure to air pollution. Available: [http://www.geovariances.com/IMG/pdf/GEENV\\_2004\\_Jeannée.pdf](http://www.geovariances.com/IMG/pdf/GEENV_2004_Jeannée.pdf) [accessed 8 March 2011].
- Lacour B, Guyot-Goubin A, Guissou S, Bellec S, Désandes E, Clavel J. 2010. Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000–2004. *Eur J Cancer Prev* 19:173–181.
- Langholz B, Ebi KL, Thomas DC, Peters JM, London SJ. 2002. Traffic density and the risk of childhood leukemia in a Los Angeles case-control study. *Ann Epidemiol* 12(7):482–487.
- McNally RJ, Parker L. 2006. Environmental factors and childhood acute leukemias and lymphomas. *Leuk Lymphoma* 47(4):583–598.
- Nordlinder R, Jarvholm B. 1997. Environmental exposure to gasoline and leukemia in children and young adults—an ecology study. *Int Arch Occup Environ Health* 70(1):57–60.
- Pearson RL, Wachtel H, Ebi KL. 2000. Distance-weighted traffic density in proximity to a home is a risk factor for leukemia and other childhood cancers. *J Air Waste Manag Assoc* 50(2):175–180.
- Raaschou-Nielsen O, Hertel O, Thomsen BL, Olsen JH. 2001. Air pollution from traffic at the residence of children with cancer. *Am J Epidemiol* 153(5):433–443.
- Raaschou-Nielsen O, Skov H, Lohse C, Thomsen BL, Olsen JH. 1997. Front-door concentrations and personal exposures of Danish children to nitrogen dioxide. *Environ Health Perspect* 105:964–970.
- Reynolds P, Elkin E, Scalf R, Von Behren J, Neutra RR, Gunier RB, et al. 2001. A case-control pilot study of traffic exposures and early childhood leukemia using a geographic information system. *Bioelectromagnetics Suppl* 5(1):S58–68.
- Reynolds P, Von Behren J, Gunier RB, Goldberg DE, Hertz A. 2004. Residential exposure to traffic in California and childhood cancer. *Epidemiology* 15(1):6–12.
- Reynolds P, Von Behren J, Gunier RB, Goldberg DE, Hertz A, Smith D. 2002. Traffic patterns and childhood cancer incidence rates in California, United States. *Cancer Causes Control* 13(7): 665–673.
- Rudant J, Menegaux F, Leverger G, Baruchel A, Lambilliotte A, Bertrand Y, et al. 2008. Childhood hematopoietic malignancies and parental use of tobacco and alcohol: the ESCALE study (SFCE). *Cancer Causes Control* 19(10):1277–1290.
- Rudant J, Menegaux F, Leverger G, Baruchel A, Nelken B, Bertrand Y, et al. 2007. Household exposure to pesticides and risk of childhood hematopoietic malignancies: The ESCALE study (SFCE). *Environ Health Perspect* 115:1787–1793.
- Rudant J, Orsi L, Menegaux F, Petit A, Baruchel A, Bertrand Y, et al. 2010. Childhood acute leukemia, early common infection and allergy: the ESCALE study. *Am J Epidemiol* 172(9):1015–1027.
- Savitz DA, Feingold L. 1989. Association of childhood cancer with residential traffic density. *Scand J Work Environ Health* 15(5):360–363.
- Smith MT, Zhang LP. 1998. Biomarkers of leukemia risk: benzene as a model. *Environ Health Perspect* 106:937–946.
- Steffen C, Auclerc MF, Auvrignon A, Baruchel A, Kebaili K, Lambilliotte A, et al. 2004. Acute childhood leukaemia and environmental exposure to potential sources of benzene and other hydrocarbons; a case-control study. *Occup Environ Med* 61(9):773–778.
- Visser O, van Wijnen JH, van Leeuwen FE. 2004. Residential traffic density and cancer incidence in Amsterdam, 1989–1997. *Cancer Causes Control* 15(4):331–339.
- Von Behren J, Reynolds P, Gunier RB, Rull RP, Hertz A, Urayama KY, et al. 2008. Residential traffic density and childhood leukemia risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(9):2298–2301.
- Weng HH, Tsai SS, Chiu HF, Wu TN, Yang CY. 2009. Childhood leukemia and traffic air pollution in Taiwan: petrol station density as an indicator. *J Toxicol Environ Health A* 72(2):83–87.
- Whitworth KW, Symanski E, Coker AL. 2008. Childhood lymphohematopoietic cancer incidence and hazardous air pollutants in southeast Texas, 1995–2004. *Environ Health Perspect* 116:1576–1580.
- World Medical Association. 2004. Declaration of Helsinki. Available: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/17c.pdf> [accessed 23 February 2011].

## Supplemental Material

### **Road Traffic and Childhood Leukemia: The ESCALE Study (SFCE)**

#### **Authors**

Alicia Amigou<sup>1,2</sup>, Claire Sermage-Faure<sup>1,2</sup>, Laurent Orsi<sup>1,2</sup>, Guy Leverger<sup>3</sup>, André Baruchel<sup>4</sup>, Yves Bertrand<sup>5</sup>, Brigitte Nelken<sup>6</sup>, Alain Robert<sup>7</sup>, Gérard Michel<sup>8</sup>, Geneviève Margueritte<sup>9</sup>, Yves Perel<sup>10</sup>, Françoise Mechinaud<sup>11</sup>, Pierre Bordigoni<sup>12</sup>, Denis Hémon<sup>1,2</sup>, Jacqueline Clavel<sup>1,2,13</sup>

<sup>1</sup>INSERM, CESP Environmental epidemiology of cancer, U1018, Villejuif, France

<sup>2</sup>Université Paris-Sud 11, UMRS-1018, Villejuif, France

<sup>3</sup>AP HP, Hôpital Armand Trousseau, Paris, France

<sup>4</sup>AP HP, Hôpital Saint-Louis and Hôpital Robert-Debré, Paris, France

<sup>5</sup>Hôpital Debrousse, Lyon, France.

<sup>6</sup> Université Lille Nord de France, Lille, France

<sup>7</sup>Hôpital des Enfants, Toulouse, France

<sup>8</sup>Hôpital La Timone, Marseille, France

<sup>9</sup>Hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France

<sup>10</sup>Hôpital Pellegrin Tripode, Bordeaux, France

<sup>11</sup>Hôpital mere-Enfant, CHU-Nantes, France

<sup>12</sup> Hôpital d'enfants de Brabois, Nancy, France

<sup>13</sup>National Registry of Childhood Blood malignancies (RNHE), Villejuif, France

**Supplemental Material, Table 1. Distribution of the cases and controls by the stratification variable age\*gender**

used for quota sampling.

Age (year)	Controls (N=1681)		AL (N=763)		ALL (N=645)		ANLL (N=118)		Controls per case
	N	%	n	%	N	%	n	%	
<b>Boys</b>									
< 2	201	12	53	7	34	5	19	16	3.8
2	79	5	54	7	49	8	5	4	1.5
3	87	5	59	8	56	9	3	3	1.5
4	89	5	48	6	42	7	6	5	1.9
5-6	126	8	60	8	51	8	9	8	2.1
7-8	96	6	35	5	29	5	6	5	2.7
9-11	137	8	59	8	49	8	10	8	2.3
12-14	117	7	46	6	36	6	10	8	2.5
<b>Girls</b>									
< 2	168	10	59	8	41	6	18	15	2.8
2	74	4	49	6	46	7	3	3	1.5
3	79	5	50	7	47	7	3	3	1.6
4	56	3	38	5	35	5	3	3	1.5
5-6	102	6	60	8	55	9	5	4	1.7
7-8	67	4	40	5	33	5	7	6	1.7
9-11	88	5	34	4	26	4	8	7	2.6
12-14	115	7	19	2	16	2	3	3	6.1
				***		***			

\*\*\* p<0.001

**Supplemental Material, Table 2. Relationship between childhood leukemia and traffic indicators by urban/rural status of the residence.**

Indicators of exposure to roads and traffic	Rural and semi-urban areas				Urban areas			
	Controls	Cases	OR <sup>a</sup>	95% CI	Controls	Cases	OR <sup>a</sup>	95% CI
	n=992	n=431			n=689	n=332		
Traffic-related NO <sub>2</sub> concentration								
Low (<12.2 µg/m <sup>3</sup> )	689	284	1.0	Ref.	151	53	1.0	Ref.
Intermediate (12.2 – 16.1 µg/m <sup>3</sup> )	240	116	1.1	(0.9-1.5)	181	104	1.6	(1.1-2.4)
High (≥16.2 µg/m <sup>3</sup> )	63	29	1.2	(0.7-1.9)	357	175	1.4	(0.9-2.0)
Density of heavy-traffic roads within 500 meters of the residence								
Unexposed	777	333	1.0	Ref.	478	214	1.0	Ref.
Low	188	83	1.1	(0.8-1.4)	160	82	1.1	(0.8-1.6)
Intermediate	23	13	1.5	(0.7-3.0)	35	21	1.3	(0.7-2.3)
High	4	2	1.3	(0.2-7.6)	16	15	2.1	(1.0-4.5)
Proximity to main roads (meter)								
Unexposed	482	193	1.0	Ref.	190	89	1.0	Ref.
Low	470	222	1.2	(1.0-1.6)	435	200	1.0	(0.7-1.3)
Intermediate	34	14	1.2	(0.6-2.3)	44	23	1.1	(0.6-1.9)
High	6	2	1.0	(0.2-5.4)	20	20	2.1	(1.1-4.2)
Composite exposure indicator								
Unexposed	368	144	1.0	Ref.	56	21	1.0	Ref.
Intermediate	621	285	1.2	(0.9-1.5)	620	295	1.2	(0.7-2.1)
High	3	2	1.9	(0.3-12.2)	13	14	2.8	(1.1-7.0)

<sup>a</sup>Odds ratios (OR) and their 95% confidence intervals (CI) estimated by unconditional logistic regression models including the stratification variable age\*gender and socioeconomic status

**Supplemental Material, Table 3. Relationship between childhood leukemia and traffic indicators restricted to the children who had never moved and to the children who had lived for at least 2 years in the house they inhabited at the time of diagnosis or interview.**

Indicators of exposure to roads and traffic	All				Never moved since conception				Had not moved in the preceding 2 years			
	Controls n=1681	Cases n=763	OR <sup>a</sup>	95% CI	Controls n=769	Cases n=278	OR <sup>a</sup>	95% CI	Controls n=1282	Cases n=548	OR <sup>a</sup>	95% CI
Proximity to main roads (meter)												
Unexposed	672	282	1.0	Ref.	316	103	1.0	Ref.	522	191	1.0	Ref.
Low	905	422	1.1	(0.9-1.4)	413	149	1.1	(0.8-1.5)	685	310	1.3	(1.0-1.6)
Intermediate	78	37	1.2	(0.8-1.8)	32	18	1.8	(1.0-3.5)	60	31	1.4	(0.9-2.3)
High	26	22	2.0	(1.0-3.6)	8	8	3.4	(1.2-9.7)	15	16	3.0	(1.4-6.2)
Density of heavy-traffic roads within 500 meters (meter)												
Unexposed	1255	547	1.0	Ref.	575	195	1.0	Ref.	955	384	1.0	Ref.
Low	345	163	1.1	(0.9-1.4)	162	59	1.1	(0.8-1.6)	268	123	1.1	(0.9-1.5)
Intermediate	61	34	1.3	(0.8-2.0)	24	17	2.2	(1.1-4.3)	46	29	1.5	(0.9-2.4)
High/very high	20	19	2.2	(1.1-4.2)	8	7	2.9	(1.0-8.4)	13	12	2.4	(1.1-5.5)
Composite exposure indicator												
Unexposed	675	166	1.0	Ref.	200	56	1.0	Ref.	336	112	1.0	Ref.
Low Intermediate	990	581	1.3	(1.1-1.5)	559	202	1.3	(0.9-1.9)	935	425	1.4	(1.1-1.8)
High	16	16	2.4	(0.6-9.3)	6	7	3.9	(1.2-12.3)	11	11	3.3	(1.4-8.1)
Traffic NO <sub>2</sub> concentration												
Low (<12.2 µg/m <sup>3</sup> )	840	337	1.0	Ref.	392	121	1.0	Ref.	647	238	1.0	Ref.
Intermediate (12.2 – 16.1 µg/m <sup>3</sup> )	421	220	1.3	(1.0-1.6)	184	69	1.1	(0.8-1.6)	317	164	1.3	(1.0-1.7)
High (≥16.2 µg/m <sup>3</sup> )	420	204	1.2	(1.0-1.5)	190	74	1.3	(0.9-1.9)	318	145	1.4	(1.1-1.8)
Missing	0	2			0	2			0	2		

<sup>a</sup>Odds ratios (OR) and their 95% confidence intervals (CI) estimated by unconditional logistic regression models including the stratification variable age\*gender and socioeconomic status