

Université de Montréal

Polymorphismes dans des gènes de métabolisme des corticostéroïdes :
rôle dans la réponse thérapeutique.

par

Isabelle Fleury

Service d'hématologie-oncologie, Département de pédiatrie de l'Hôpital Sainte-
Justine

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences Biomédicales

Décembre 2003

© Isabelle Fleury, 2003



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Polymorphismes dans des gènes de métabolisme des corticostéroïdes :
rôle dans la réponse thérapeutique.

présenté par

Isabelle Fleury

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Dr. Richard L. Momparler, président-rapporteur

Dr. Maja Krajinovic, directrice de recherche

Dr. Daniel Sinnett, codirecteur

Dr. Edgard Delvin, membre du jury

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS

Avant-propos Les glucocorticoïdes synthétiques (GCs) constituent un pilier du traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA), la principale néoplasie chez l'enfant. Bien que contribuant à un taux de survie supérieur à 80% à 5 ans, l'efficacité des GCs est limitée par leur toxicité potentielle, par une variabilité inter-individuelle marquée et par une proportion croissante de patients résistants.

Buts et hypothèses Nous proposons que des polymorphismes fonctionnels dans les gènes de la régulation des gènes de réponse aux GCs ou dans le métabolisme des GCs influencent la réponse thérapeutique et l'issue de la LLA. Nous avons étudié les polymorphismes G220A, A1220G et le polymorphisme de longueur de fragment de restriction Bcl I du gène du récepteur des GCs (RG), qui sont associés à des manifestations cliniques d'une dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalienne, et le polymorphisme A-290G du cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), qui modifie l'expression du CYP3A4 et est associé à des leucémies post-traitement.

Méthodes L'identification du polymorphisme Bcl I, par séquençage, a permis de développer une technique de génotypage basée sur le PCR pour estimer sa fréquence dans les populations du monde. Les quatre polymorphismes ont été testés par hybridation allèle-spécifique-à-l'oligonucléotide chez 213 enfants atteints de LLA et leur impact sur l'issue de la LLA a été évalué par l'analyse de la survie.

Résultats Le polymorphisme Bcl I est formé de la substitution C646G dans l'intron 2. Nos analyses confrontant les polymorphismes du GR et du CYP3A4 à l'issue de la LLA démontrent que seul le variant 646G du GR semble associé, puisque les individus 646GG ont une probabilité réduite de survenue d'événements, tant aux modèles univariés que multivariés (HR=2,2, 95% IC=1,0-4,7; HR=3,5, 95% IC=1,4-8,7, respectivement). Cette association semble refléter un impact sur la survie globale. Les autres variants n'ont pas atteint un seuil d'association significatif.

Conclusion La répétition de cette étude et l'analyse d'autres polymorphismes vont contribuer à identifier les polymorphismes les plus déterminants de la réponse aux GCs.

Mots clés Pharmacogénétique, leucémie lymphoblastique aiguë, récepteur des glucocorticoïdes, cytochrome P450 3A4, Bcl I, Arg23Lys, Asn363Ser, A-290G.

ABSTRACT AND KEYWORDS

Background Glucocorticoids (GCs) are an essential part of the treatment of acute lymphoblastic leukemia(ALL), the most common childhood malignancy. Although GCs contribute to a remission rate beyond 80% at 5 years, the benefits are limited by their potential toxicity, a considerable variability in their sensitivity and a rising proportion of patients resistant to their action.

Aims and hypothesis We hypothesize that functional polymorphisms in genes involved in regulation of GCs responsive genes or metabolism of GCs influence the therapeutic response and thus ALL outcome. We studied polymorphisms G220A, A1220G and the restriction fragment length polymorphism Bcl I of the glucocorticoid receptor (GR) gene, that are associated with clinical manifestations of hypothalamic-pituitary-adrenal axis alterations, and the polymorphism A-290G of the cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) gene, that alters CYP3A4 expression and is associated with treatment-related leukemia.

Methods Bcl I polymorphism was identified by sequencing allowing development of a PCR-based genotyping approach used to estimate its frequency in worldwide populations. All four polymorphisms were tested by allele specific oligonucleotide hybridization in 213 French-Canadian children diagnosed with ALL and their impact on ALL outcome has been addressed by survival analysis.

Results Bcl I polymorphism stands for C646G substitution in intron 2. Our analysis correlating the GR and CYP3A4 polymorphisms with ALL outcome showed that only the GR 646G variant appeared associated with disease outcome, as illustrated by 646GG individuals' lower probability of event free survival in both univariate and multivariate models (HR=2,2, 95% CI=1,0-4,7; HR=3,5, 95% CI=1,4-8,7, respectively). This association seems to reflect an impact on overall survival. The others polymorphisms did not reach a significant level of association.

Conclusion Replication of this study and analysis of other polymorphisms will help to identify those that are most relevant for therapeutic response to GCs.

Keywords : Pharmacogenetic, acute lymphoblastic leukemia, glucocorticoid receptor, cytochrome P450 3A4, Bcl I, Arg23Lys, Asn363Ser, A-290G.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS.....	iii
ABSTRACT AND KEYWORDS	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
DÉDICACE.....	x
REMERCIEMENTS	xi
PRÉAMBULE.....	xii
A INTRODUCTION.....	1
A.1 LEUCÉMIE.....	1
A.1.1 <i>Classification de la leucémie</i>	1
A.1.2 <i>Épidémiologie de la LLA chez l'enfant</i>	2
A.1.3 <i>Facteurs de risque de la LLA chez l'enfant</i>	3
A.1.4 <i>Pronostic de la LLA chez l'enfant</i>	4
A.1.5 <i>Influence de polymorphismes fonctionnels sur l'évolution de la LLA</i>	9
A.2 LES GCs ET LA LLA CHEZ L'ENFANT	10
A.2.1 <i>Les glucocorticoïdes endogènes et exogènes</i>	10
A.2.1.1 <i>Cortex surrénalien</i>	10
A.2.1.2 <i>Régulation et synthèse des GCEs</i>	10
A.2.1.3 <i>Transport et métabolisme des GC(E)s</i>	14
A.2.1.4 <i>Fonction des GC(E)s</i>	16
A.2.1.5 <i>Toxicité liée à l'exposition aux GCs lors du traitement de LLA</i>	19
A.2.1.6 <i>Comparaison des GCs et GCEs</i>	20
A.2.2 <i>Efficacité du traitement incluant les GCs</i>	21
A.2.3 <i>Apoptose induite par les GCs</i>	22
A.2.4 <i>Résistance aux GC(E)s</i>	23
A.3 DESCRIPTION DU RG	26
A.3.1 <i>Polymorphismes du RG</i>	29
A.3.1.1 <i>Le polymorphisme Bcl I</i>	29
A.3.1.2 <i>Les polymorphismes Arg23Lys et Asn363Ser</i>	31
A.4 DESCRIPTION DU CYTOCHROME P450.....	32
A.4.1 <i>CYP3A4</i>	33
A.4.1.1 <i>Le polymorphisme CYP3A4 A-290G</i>	33
B OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES.....	36
C PRÉSENTATION DES ARTICLES.....	38
D DISCUSSION	65
D.1 RÉCEPTEUR DES GLUCOCORTICOÏDES (RG)	66
D.1.1 <i>Polymorphisme G646C dans le RG</i>	66
D.1.2 <i>Polymorphisme Arg23Lys du RG</i>	68

D.1.3	<i>Le polymorphisme Asn363Ser du RG</i>	69
D.2	CYP3A4.....	71
D.2.1	<i>Le polymorphisme A-290G du CYP3A4</i>	71
D.3	ANALYSE COMBINÉE DES POLYMORPHISMES	72
D.4	RÉPONSE AUX GCS.....	72
E	CONCLUSION	76
F	RÉFÉRENCES	78

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
I	Classification immunophénotypique des lymphocytes	2
II	Protocoles de traitement de la LLA selon le Dana Farber Cancer Institute (DFCI)	5
III	Comparaison des profils de toxicité de la prednisone et de la dexaméthasone lorsqu'administrés pendant la phase d'induction de rémission des LLA de type B	20

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	Représentation schématique de l'hématopoïèse normale	1
2	Interactions au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien	11
3	Stéroïdogénèse surrénalienne	13
4	Métabolisme des corticostéroïdes	15
5	Structure chimique des GCEs et des principaux GCs	21
6	Mode d'action intracellulaire des GC(E)s	28

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abréviation	Description
ACTH	Hormone adrénocorticotropine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADRA2A	Récepteur adrénergique de type 2A
ARN	Acide ribonucléique
AVP	Hormone antidiurétique
CRH	Hormone libératrice de corticotropine
CYP2E1	Cytochrome P450 2E1
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
DFCI	Dana Farber Cancer Institute
GC	Glucocorticoïde synthétique
GC(E)	Glucocorticoïde endogène et exogène
GCE	Glucocorticoïde endogène
GRE	Élément de réponse aux glucocorticoïdes
GST	Glutathione-S-transférase
HHS	hypothalamo-hypophysaire-surrénalien
HSD	Hydroxystéroïde déshydrogénase
Kb	Kilobase
LLA	Leucémie lymphoblastique aiguë
MDR	Résistance aux multi-médicaments
MLH1	MutL Homologue
NAD(P)H	Nicotine-adénine dinucléotide phosphate
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
POMC	Pro-opiomélanocortine
PTH	Parathormone
RG	Récepteur des Glucocorticoïdes
RPX	Récepteur Pregnane-X
StAR	Protéine régulatrice aiguë de stéroïdogénèse

DÉDICACE

À tous les patients et leurs proches qui sont confrontés aux limites de la Médecine.

À toute ma famille et mes amis, particulièrement Solange, Michel et Jean-Raphaël, afin de les remercier pour leur constant support, les discussions enrichissantes et leur confiance depuis le tout début.

À mon fiancé pour tout son amour.

« Pour tirer le meilleur parti des connaissances acquises, pour en extraire toute la richesse, il importe de ne pas s'y habituer trop vite, de se laisser le temps de la surprise et de l'événement», Hubert Reeves.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice, Dr. Maja Krajinovic, et mon co-directeur, Dr. Daniel Sinnett, de m'avoir permis de réaliser ce projet de M.D./M.Sc.. J'apprécie qu'ils aient rendu si bénéfique à mon égard cette formation par leurs conseils, leur expérience scientifique, leur soutien moral, leur générosité et leur milieu, lesquels m'ont permis de grandir comme étudiante autant que comme personne.

Je suis très reconnaissante au Dr. Damian Labuda pour les discussions constructives et le partage du matériel biologique et aux Dr. Albert Moghrabi, Dr. Mark Berstein, Dr. Caroline Laverdière et Dr. Irina Costea pour l'accès aux bases de données.

Je remercie également le Fonds de la Recherche en Santé du Québec et la Faculté de Médecine de l'université de Montréal de m'avoir décerné des bourses de recherche de deuxième cycle et le Centre de Recherche de l'Hôpital Ste-Justine et le Cancer Research Society pour le support financier du projet.

Je remercie également tous mes collègues de laboratoire, particulièrement Irina Costea, Mélanie Primeau et Sonia Chiasson, qui par leurs discussions, leurs expériences et leurs qualités personnelles ont favorisé la réalisation de ce projet dans un environnement des plus agréables et stimulants.

PRÉAMBULE

La leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) constitue le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez l'enfant[1]. Une combinaison d'agents chimiothérapeutiques complétée d'une radiothérapie prophylaxique permettent d'atteindre un taux de rémission à 5 ans supérieur à 80%[2, 3]. Cette thérapie comprend entre autres des glucocorticoïdes synthétiques (GCs) qui contribuent au traitement en réduisant la prolifération cellulaire et en induisant l'apoptose[4-6]. Cependant, la thérapie aux GCs complique souvent la prise en charge du patient. En effet, les GCs comportent des effets secondaires multisystémiques significatifs[7, 8], il existe une variation inter-individuelle quant à la sensibilité aux GCs[9, 10] et finalement, le taux d'enfants résistants aux GCs passe de 20% au diagnostic à 70% lors de rechutes[11]. Par ailleurs, suite à la survenue d'une rechute, la survie est significativement altérée[12, 13]. L'individualisation du traitement constitue dès lors une avenue intéressante, puisqu'elle permettrait d'ajuster le traitement selon le risque et le statut de résistance du patient concerné.

Une façon d'y parvenir serait d'étudier des polymorphismes fonctionnels retrouvés dans des gènes pertinents comme ceux codant pour le récepteur des glucocorticoïdes (RG) et le cytochrome P450 3A4 (CYP3A4)[14-16]. Ces gènes sont impliqués respectivement dans le transport intracellulaire, la régulation de gènes de réponse aux GCs et le métabolisme des GCs.

L'étude de l'influence de ces polymorphismes, retrouvés chez des enfants atteints de LLA, sur l'issue d'un traitement comportant des GCs constitue une opportunité à saisir. En effet, elle pourrait permettre non seulement de préciser les connaissances du mécanisme sous-jacent à la variation inter-individuelle à la réponse aux GCs chez la population étudiée, mais elle pourrait également être applicable à tous les autres patients chez qui les GCs constituent une indication si fréquente. De surcroît, cette étude établit une des prémisses à une éventuelle élaboration d'un plan de traitement

personnalisé où la guérison pourrait s'obtenir dans un contexte amélioré de tolérance immédiate et de survie à long terme.

A INTRODUCTION

A.1 Leucémie

A.1.1 Classification de la leucémie

La leucémie provient d'une expansion clonale dérégulée d'une cellule à destinée lymphoïde, myéloïde ou mixte, tel que présenté à la figure 1[17].

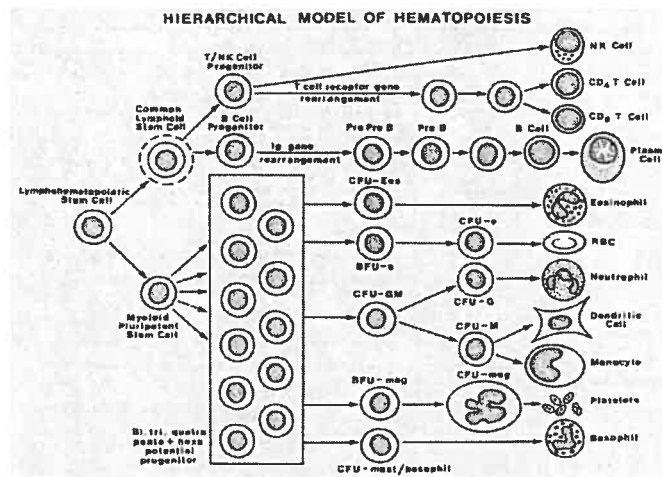


Figure 1. Représentation schématique de l'hématopoïèse normale[18]; Ig : immunoglobuline; CFU : unité formatrice de colonies; BFU : unité formatrice de blastes; E : erythroïde; G : granulocyte; M : macrophage; meg : mégakaryocytes; mast : mastocytes

La leucémie aiguë, par opposition à la leucémie chronique, se définit par la présence d'au moins 30% de blastes médullaires[19]. La classe de leucémie est ensuite définie par le stade auquel s'est arrêté la différenciation de la cellule initiatrice[20, 21]. Des systèmes de classification ont été définis à partir de caractéristiques morphologiques, cytochimiques, cellulaires, immunophénotypiques et à l'aide de la génétique moléculaire[20]. La classification selon l'immunophénotype est très souvent utilisée en clinique pour diriger le traitement[17]. Selon des antigènes de surface, soit l'immunophénotype, on définit la lignée du lymphoblaste, soit B, T ou mixte[18]. Ensuite, les lymphoblastes sont étiquetés selon leur stade de différenciation, tel que présenté au tableau 1[17, 18]. La

lignée mixte réfère à l'expression de marqueurs en provenance des deux lignées, on précisera alors une prédominance lymphoïde ou myéloïde[17].

Tableau I. Classification immunophénotypique des lymphocytes[17, 18]

Classe	Marqueurs
Lignée B	CD19+ et au moins 1 des suivants : CD20+, CD21+, CD22+ ou CD79+; CD10+ dans 90-95% des cas
pré-B précoce	cCD22+, cCD79a+, CD19+, CD22+, cIgμ- et sIg-
pré-B	cIgμ+
pré-B transitionnel	cIgμ+, sIg+, sIgκ- sIgλ-
B	sIg+, sIgκ+ ou sIgλ+
Lignée T	cCD3+, CD7+ et CD5+ ou CD2+
Prothymocyte	CD7+, CD34+ et cAg T3+
Thymocyte précoce	CD7+, CD34+ , cAg T3+, CD2+ et CD5 +
Thymocyte intermédiaires	CD7+, CD34+ , cAg T3+, CD2+, CD5 +, CD1+, CD4+ et CD8+
Thymocyte mature	CD7+, CD34+ , cAg T3, CD2+, CD5 +, CD3+ et CD4+ ou CD8+

La classification ayant le meilleur reflet au niveau du pronostic semble passer par une combinaison des différentes caractéristiques[22].

A.1.2 Épidémiologie de la LLA chez l'enfant

La LLA représente 23% des cancers diagnostiqués chez les moins de 15 ans, ce qui en fait le cancer le plus fréquent chez l'enfant[1]. Près de 80% des cas de LLA sont de type B[17]. L'incidence est de 3,7 pour 100 000 enfants et le taux de mortalité est de 0,4 pour 100 000 enfants [23]. La LLA est, pour une raison encore inexpliquée, trois fois plus fréquente chez les enfants de race blanche que chez ceux de race noire à l'âge de deux à trois ans[24].

A.1.3 Facteurs de risque de la LLA chez l'enfant

Les facteurs de risque environnementaux reliés au développement d'une leucémie incluent une exposition pré-natale aux radiations ultra-violettes, aux benzènes ou aux agents pouvant engendrer une aplasie médullaire chez la mère, ainsi que l'exposition aux pesticides chez l'enfant ou ses deux parents[17, 25-27]. L'influence de l'exposition aux champs électromagnétiques demeure controversée[28-30]. L'étude de Infante-Rivard et al. 2000 n'a pas démontré de causalité entre l'exposition à la cigarette *in utero* et le développement de la leucémie chez l'enfant[31]. L'allaitement pourrait toutefois conférer une protection au développement de la LLA[32]. Par ailleurs, la consommation paternelle de spiritueux augmenterait le risque, contrairement à la consommation maternelle de vin ou de bière pendant le troisième trimestre de grossesse qui semble plutôt être un facteur protecteur[33]. L'exposition de l'enfant à plus de deux reprises à des radiographies diagnostiques semble accroître le risque de développer une leucémie, quoique l'effet puisse être altéré par des variants dans les gènes de réparation d'acide désoxyribonucléique, ADN, dont le gène MutL Homologue1 (MLH1)[34].

Des polymorphismes fonctionnels dans les gènes métabolisant les produits exogènes pourraient théoriquement moduler l'influence carcinogénique de ceux-ci. Ceci a été démontré à plusieurs niveaux, dont avec la forme P1 de la glutathione-S-transférase (GST). La forme P1 est la principale GST du tissu foetal et elle est impliquée dans le métabolisme de plusieurs carcinogènes. Par conséquent, une altération de son activité pourrait entraîner une exposition induite à des métabolites carcinogènes qui devraient normalement être inactivés. Certains polymorphismes fonctionnels sont d'ailleurs associés à une susceptibilité accrue à la leucémie[35]. Les enfants porteurs du variant *B de la GST P1, portant la substitution Ile105Ala114 pour Val105Ala114, ont plus de risque de développer une leucémie[35]. La présence de variants fonctionnels dans des enzymes impliquées dans le métabolisme des radicaux libres et de l'alcool, soit le GST M1 et le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)

respectivement, influence le risque associé à cette exposition prénatale[33]. Par ailleurs, des variants de CYP2E1 et du NAD(P)H:quinone oxydo-réductase 1, deux enzymes impliquées dans le métabolisme de produits exogènes, sont associés à une susceptibilité accrue à la leucémie[36].

L'étude combinée de variants à plusieurs loci semble plus représentative du risque de leucémie que celles sur les variants isolés, tel que démontré par l'interaction entre deux formes de la GST[35, 37].

A.1.4 Pronostic de la LLA chez l'enfant

Le taux de survie sans événement, soit sans la survenue d'une rechute, le développement d'une néoplasie secondaire ou le décès relié à la LLA, est supérieur à 70-80% à 5 ans[2, 3, 38, 39]. La majorité des patients, soit 85%, atteignent une rémission complète après un mois d'induction lorsque soumis aux traitements du Dana Farber Cancer Institute (DFCI) 87-01 et 91-01 (cf tableau 1)[12]. Bien que ces enfants puissent atteindre une deuxième rémission après une rechute, leur pronostic à long terme est moindre[12, 13]. Les rechutes constituent donc une préoccupation majeure dans l'amélioration du pronostic.

Les rechutes surviennent le plus fréquemment au niveau médullaire, mais sont aussi présentes au niveau du système nerveux central et des testicules dans une proportion équivalente; le taux de survie à 6 ans devient alors de 20%, 48% et 70% respectivement[40-43].

Tableau II. Protocoles de traitement de la LLA selon le Dana Farber Cancer Institute (DFCI)

Protocole	Groupe de risque	Fenêtre d'investigation (3 jours)	Induction (4 semaines)	Thérapie du CNS Intensification (30 semaines)	Continuation (jusqu'à deux ans de rémission complète)
Boston 87-01	Standard	<u>L-Asparaginase</u> 25 000 IU/m ² (E. Coli ou Erwinia)	<u>Prednisone</u> 40 mg/m ² /d <u>Vincristine</u> 1.5 mg/m ² /sem <u>Doxorubicine</u> 30 mg/m ² au d 1 et 2 <u>Cytarabine</u> i.t.* d 17	<u>MTX-STD</u> 40 mg/m ² ou <u>MTX-HD</u> 4 g/m ² <u>Leucovorin</u>	<u>Cycles de 3 semaines</u> <u>Prednisone</u> 40 mg/m ² /d x 5 jours <u>MTX</u> 30 mg/m ² i.v./i.m. q sem <u>6-MP</u> 50 mg/m ² /d x 14 jours <u>Vincristine</u> 2 mg/m ² q 3 sem <u>L-ASPA</u> 25 000 IU/m ² q sem (E.coli ou Erwinia)
	Élevé		<u>MTX-STD</u> 40 mg/m ² ou <u>MTX-HD</u> 4 g/m ² <u>Leucovorin</u>	<u>(MTX+ Ara C) i.t.** x 4</u> RoRx standard ou hyperfractionnée <u>Cycles de 3 sem</u> <u>Prednisone</u> 120 mg/m ² /d x 5 jours <u>6-MP</u> 50 mg/m ² /d x 14 jours <u>Vincristine</u> 2 mg/m ² q 3 sem <u>L-ASPA</u> 25 000 IU/m ² q sem (E.coli ou Erwinia) <u>Doxorubicine</u> 30 mg/m ² q 3 sem (infusion continue sur 48 h)	<u>Cycles de 3 semaines</u> <u>Prednisone</u> 40 mg/m ² /d x 5 jours <u>MTX</u> 30 mg/m ² i.v./i.m. q sem <u>6-MP</u> 50 mg/m ² /d x 14 jours <u>Vincristine</u> 2mg/m ² q 3 sem
	Très élevé		<u>MTX-STD</u> 40 mg/m ² ou <u>MTX-HD</u> 4 g/m ² <u>Leucovorin</u>	<u>(MTX+ Ara C) i.t.** x 4</u> RoRx standard ou hyperfractionnée <u>MTX-HD</u> 4 g/m ² <u>Leucovorin</u> <u>Cycles de 3 sem</u> <u>Pas de prednisone</u> <u>6-MP</u> 50 mg/m ² /d x 14 jours <u>Vincristine</u> 2 mg/m ² q 3 sem <u>L-ASPA</u> 25 000 IU/m ² q sem (E.coli ou Erwinia) <u>Cytarabine</u> 3 g/m ² i.v. la 3 ^{ème} sem	

Tableau II. Protocoles de traitement de la LLA selon le Dana-Farber Cancer Institute (DFCI) (suite)

Protocole	Groupe de risque	Fenêtre d'investigation (3 jours)	Induction (4 semaines)	Thérapie du CNS Intensification (30 semaines)	Continuation (jusqu'à deux ans de rémission complète)
Boston 91-01	Standard	<u>Prednisone</u> 40 mg/m ² /d OU <u>Dexa-méthasone</u> 6,8, 150 mg/m ² /d	<u>Prednisone</u> 40 mg/m ² /d <u>Vincristine</u> 1.5 mg/m ² /sem <u>Doxorubicine</u> 30 mg/m ² au jour 1 et 2 <u>Cytarabine</u> i.t.*/jour 17 MTX-HD 4g/m ² + Leucovorin	Réservé aux filles avec risque standard (<u>MTX+Ara C</u>) i.t.** x 4 <u>Cycles de 3 sem</u> <u>Dexaméthasone</u> 6 mg/m ² /d x 5 jours <u>MTX</u> 30 mg/m ² i.v./i.m. q sem <u>6-MP</u> 50 ou 1 000 mg/m ² /d x 14 jours <u>Vincristine</u> 2 mg/m ² q 3 sem <u>L-ASPA</u> 25 000 IU/m ² q sem (E.coli ou Erwinia)	<u>Cycles de 3 semaines</u> <u>Dexaméthasone</u> 6mg/m ² /d x 5 jours <u>MTX</u> 30 mg/m ² i.v./i.m. q sem <u>6-MP</u> 50 mg/m ² /d x 14 jours <u>Vincristine</u> 2mg/m ² q 3 sem
	Élevé	<u>Cytarabine</u> i.t.* au jour 0		Réservé aux garçons à risque standard et aux deux sexes à risque élevé (<u>MTX+Ara C</u>) i.t.** x 4 RoRx standard ou hyperfractionnée <u>Cycles de 3 sem</u> <u>Dexaméthasone</u> 18 mg/m ² /d x 5 jours <u>6-MP</u> 50 ou 1 000 mg/m ² /d x 14 jours <u>Vincristine</u> 2 mg/m ² q 3 sem <u>L-ASPA</u> 25 000 IU/m ² q sem (E.coli ou Erwinia) <u>Doxorubicine</u> 30 mg/m ² q 3 sem (infusion continue sur 48 h ou bolus i.v.)	(<u>MTX+ARA-C</u>) i.t.** q18 sem

Tableau II. Protocoles de traitement de la LLA selon le Dana Farber Cancer Institute (DFCI) (suite 2)

Protocole	Groupe de risque	Fenêtre d'investigation (3 jours)	Induction (4 semaines)	Thérapie du CNS Intensification (30 semaines)	Continuation (jusqu'à deux ans de rémission complète)
Boston 95-01	Standard	Jour 0 Cytarabine i.t.* Doxorubicine 30 mg/m ² bolus Jour 1 Doxorubicine 30 mg/m ² bolus	Prednisone 40 mg/m ² /d Vincristine 1.5 mg/m ² /sem Leucovorin Jour 4 L-ASPA (E.coli ou Erwinia)	(MTX+Ara C) i.t.** x 4 RoRx hyperfractionnée OU (MTX+Ara C+HC) i.t.* , i.t.** et i.t.*** x 4 q 9 sem Cycles de 3 sem Prednisone 40 mg/m ² /d x 5 jours MTX 30 mg/m ² i.v./i.m. q sem 6-MP 50 mg/m ² /d x 14 jours Vincristine 2 mg/m ² q 3 sem L-ASPA 25 000 IU/m ² q sem (E.coli ou Erwinia)	Cycles de 3 semaines Dexaméthasone 6 mg/m ² /d x 5 jours MTX 30 mg/m ² i.v./i.m. q sem 6-MP 50 mg/m ² /d x 14 jours Vincristine 2mg/m ² q 3 sem (MTX+ARA-C) i.t.** q 18 semaines
	Élevé				

Légende

*i.t. Cytarabine (Ara-C) : Posologies <1 an : 15mg ; Σ1 an à < 2 ans : 20mg ; Σ2 ans à < 3 ans : 30mg ; Σ3 ans : 40mg

**i.t. Méthotrexate (MTX) : Posologies : <1 an : 6mg ; Σ1 an à < 2 ans : 8mg ; Σ2 ans à < 3 ans : 10mg ; Σ3 ans : 12mg

***i.t. Hydrocortison (HC) : Posologies : <2 ans : 9mg ; Σ2 an à <3 ans : 12mg ; Σ3 ans : 15mg

Leucovorin 200 mg/m² STAT + 24 mg/m² q 6 h jusqu'à ce que les niveaux de MTX soient <0.1 µM.

La définition des facteurs influençant le pronostic revêt une importance majeure, puisqu'ils peuvent orienter la nature et l'intensité du traitement. Par exemple, la résistance à la prednisone in vitro est reconnue comme le meilleur indicateur de l'issue du traitement[44].

Parmi les facteurs de bon pronostic figurent le sexe féminin, la race blanche, être âgé entre 1 et 9 ans, la leucémie de type B, la translocation t(12;21)(p12-13;q22) [présente dans près de 25 % de l'ensemble des cas], la translocation t(11;19)(q23;p13.3) MLL-ENL, la présence du marqueur CD10, un décompte lymphocytaire au diagnostic inférieur à $50 \times 10^9/L$ et l'hyperploïdie constituée de 51 à 65 chromosomes[26, 45-51]. La rapidité de la réduction du décompte de blastes périphériques, par une thérapie combinée incluant des GCs, constitue un autre marqueur de bon pronostic dans les cas de LLA de type T[52].

Les facteurs de mauvais pronostic sont le sexe masculin, la leucémie de type T, une hyperploïdie inférieure à 51 chromosomes, la présence de MDR1, ainsi que des translocations t(9;22)[BCR-ABL], t(11q23)[MLL-AF4, MLL-AF10 et MLL-1q], t(4;11)(q21-23)[MLL/ALL-1/HRX-Htrx avec AF4/FEL] [26, 45, 47, 53-57]. La persistance d'au moins 10^5 blastes / L au niveau sanguin, après avoir été soumis à une dose de méthotrexate intrathécale, suivie de prednisone pendant 7 jours, constitue également un marqueur de mauvais pronostic et ceci, peu importe le décompte initial de blastes sanguins dans le groupe Berlin-Frankfurt-Munster[44, 58]. Différentes études ont mis en évidence des facteurs de pronostic supplémentaires. La résistance évaluée in vitro à la prednisolone, à la L-asparaginase et à la vincristine constitue un autre marqueur de mauvais pronostic de la LLA chez l'enfant[59]. De plus, l'absence de rémission complète après un mois d'induction du protocole DFCI 87-01 et 91-01 est un autre marqueur de mauvais pronostic; ce facteur persistant indépendamment du délai subséquent d'atteinte de rémission complète[12]. L'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) du réarrangement spécifique du T-cell receptor (TCR) γ et du TCR δ et des réarrangements de la chaîne lourde des immunoglobulines permet de détecter de façon plus sensible la persistance de leucémie résiduelle[60,

61]. Cette persistance constitue un autre marqueur de risque significativement supérieur de rechute[60, 62].

A.1.5 Influence de polymorphismes fonctionnels sur l'évolution de la LLA

La délétion homozygote du génotype GST T1 est associée à un risque de rechute 5,9 fois inférieur relativement aux hétérozygotes et homozygotes[63]. De façon individuelle, les patients porteurs des variants NQO1, dont le produit du gène NQO est impliqué dans la réduction de substrats dont les quinones, et CYP1A1 ont aussi un pronostic inférieur[64]. Par ailleurs, un mauvais pronostic est associé aux patients porteurs du variant 870A du gène CCND1, dont le produit est impliqué dans l'épissage de l'ARN messenger, et aux patients homozygotes pour une triple répétition d'un tandem dans la région du promoteur du gène de la thymidylate synthase, dont le produit est impliqué dans la conversion du déoxyuridylate monophosphate en déoxythymidylate monophosphate. L'importance de ces deux facteurs de risque de mauvais pronostic est d'autant plus marqué lorsqu'ils sont retrouvés en association chez le même patient[65, 66]. Ceci pourrait se justifier par la variation dans le produit du gène CCND1 qui modifierait la régulation de la protéine du gène du rétinoblastome induisant ainsi une augmentation de la thymidylate synthétase, de la dihydrofolate réductase et une réduction de la sensibilité au méthotrexate, un agent de chimiothérapie associé au traitement de la LLA[65]. D'autres associations sont rapportées. Parmi celles-ci, la délétion simultanée de deux polymorphismes du gène GST, soit GSTM1 et GSTT1, est un facteur prédictif de rechute précoce qui semble plus significatif que ceux connus jusqu'à maintenant chez les patients atteints de LLA à précurseurs B[67]. Le variant MLH1, de cette enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN, est relié à une augmentation du risque de rechute lorsqu'il est associé au variant CYP1A1*2A[68]. La délétion simultanée de deux gènes suppresseurs de tumeurs, p16INK4/p15INK4B, est aussi associée à un mauvais pronostic[69].

A.2 Les GCs et la LLA chez l'enfant

A.2.1 Les glucocorticoïdes endogènes et exogènes

A.2.1.1 Cortex surrénalien

Les GCs sont des analogues des glucocorticoïdes endogènes (GCEs) sécrétés par le cortex surrénalien, d'où l'appellation de corticostéroïdes. Les deux hormones principales du cortex surrénalien sont les GCEs et les minéralocorticoïdes. Le cortex surrénalien est constitué de trois zones. La zone glomerulosa, constituant 15% de la glande, est responsable de la sécrétion d'aldostérone, un minéralocorticoïde favorisant la réabsorption de sodium et l'excrétion de potassium par les cellules du tubule collecteur rénal. Une réabsorption d'eau secondaire s'en suit et est responsable de l'expansion du liquide intracellulaire qui entraîne l'augmentation de pression artérielle. La zona fasciculata, représentant 75% de la glande, sécrète principalement le cortisol et la corticostérone, ainsi qu'une faible proportion d'androgènes et d'estrogènes. La zona reticularis sécrète surtout les androgènes suivants : la déhydroépiandrostérone et l'androstènedione. Cette zone sécrète également une faible proportion de cortisol et d'estrogènes. Les deux dernières zones citées sont sous l'influence de l'hormone adrénocorticotrope, soit l'ACTH.[7]

A.2.1.2 Régulation et synthèse des GCEs

La sécrétion des GCEs par le cortex surrénalien est régulée à plusieurs niveaux. En effet, elle est sous l'influence de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (HHS), tel que résumé à la figure 2, de neurones ainsi que des hormones antidiurétique (AVP) et de la pro-opiomélanocortine (POMC)[70].

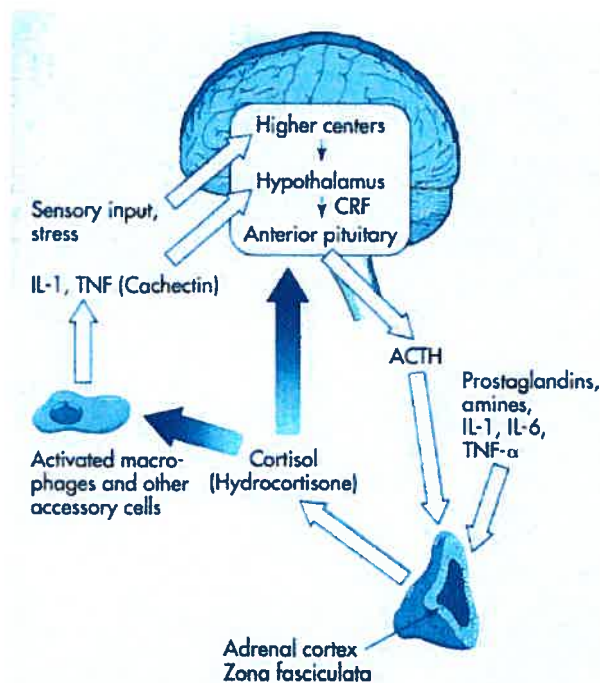


Figure 2. Interactions au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien[71].

Lors de stimulation cérébrale, telle que celle générée par le stress, l'hormone libératrice de corticotropine (CRH) et l'AVP sont sécrétées de l'hypothalamus dans le sang portal hypothalamo-hypophysaire et transportées vers l'hypophyse où elles stimulent la sécrétion d'ACTH responsable, au niveau surrénalien, de la stimulation de la sécrétion des GCEs. Une boucle de rétroaction négative est ensuite complétée par l'action des GCEs au niveau hypophysaire et hypothalamique[70].

Plusieurs interactions existent entre le système immunitaire et l'axe HHS. D'abord, les interleukines 1 et 6, sécrétées par les monocytes stimulés, favorisent la libération de CRH au niveau hypothalamique. Le facteur de nécrose tumorale (TNF α) libéré par les macrophages en réponse à l'infection, stimule directement la libération d'ACTH. Cette sécrétion semble toutefois insuffisante pour influencer de manière significative l'axe HHS[8, 70].

L'ACTH est synthétisée à partir du précurseur POMC. Ce précurseur contient également les séquences pour la lipotropine (LPH), l'hormone stimulatrice des

mélanocytes (MSH), ainsi que la β -endorphine. La fonction de la LPH et de la β -endorphine périphérique demeure inconnue, alors que celle du MSH est de stimuler la synthèse de mélanine, favorisant le brunissement de la peau[7, 70].

L'ACTH, constituée de 39 acides aminés, stimule principalement la sécrétion des GCEs et des stéroïdes androgéniques et légèrement celle des minéralocorticoïdes au cortex surrénalien[7]. Les 24 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale sont conservés à travers les espèces, contrairement à la portion C-terminale. La demi-vie de l'ACTH est d'environ 5 minutes. Les 18 premiers acides aminés en N-terminal constituent la portion biologiquement active. Bien qu'initialement considérée comme exclusive à l'hypophyse, l'expression du POMC a aussi été détectée au niveau du cerveau, de l'hypothalamus, du foie, du rein, du tractus gastro-intestinal, des gonades, du placenta, des lymphocytes et des monocytes. Toutefois, à l'exception du placenta, les concentrations dosées sont si faibles que leur contribution au niveau circulant d'ACTH est peu probable[70].

L'action de l'ACTH s'exerce par le récepteur de mélanocortin de type 2. L'ACTH stimule aussi l'expression de son récepteur, augmentant ainsi la réponse stéroïdogénique. Les effets de l'ACTH peuvent être perceptibles en quelques minutes ou seulement après quelques heures ou jours. L'action immédiate de l'ACTH est de favoriser la conversion du cholestérol en delta-pregnenolone par la protéine régulatrice aiguë de la stéroïdogénèse (StAR), produit du gène du cytochrome P450 1A1[72]. Cette première étape est limitante dans la stéroïdogénèse et est permise par l'activation du transport du cholestérol à la membrane mitochondriale interne où l'enzyme StAR est située[7, 8].

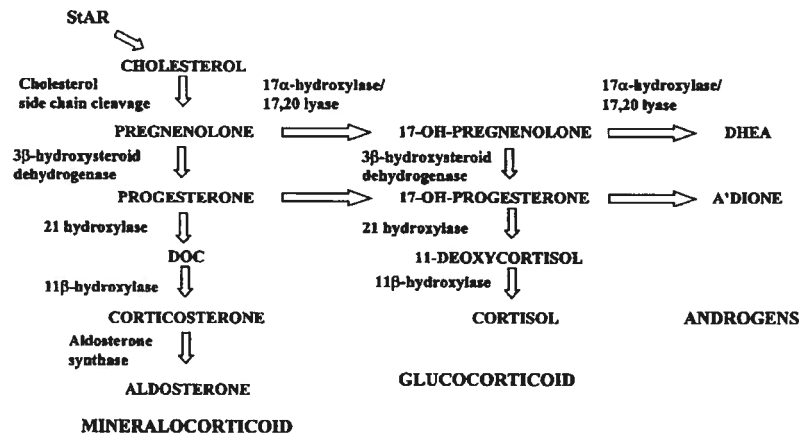


Figure 3. Stéroïdogénèse surrénalienne[72].

L'action plus chronique de l'ACTH implique une stimulation de la synthèse de la plupart des enzymes de la stéroïdogénèse, de la synthèse non-spécifique d'acide ribonucléique (ARN) et d'ADN, de la croissance des cellules du cortex surrénalien et de l'apport au cortex de cholestérol[70].

Chez le rat, la boucle de rétroaction négative exercée dans l'axe HHS apparaît en deux phases. D'abord, une première action qui survient en quelques secondes à quelques minutes et qui est proportionnelle au taux d'accroissement de la concentration de GC(E)s circulants et non à la valeur absolue. Cette action serait associée à un effet stabilisateur sur les membranes. Quant à l'effet retardé, il survient en quelques heures à quelques jours et est proportionnel à la dose de GC(E)s, à l'activité et à la durée d'administration, donc aux niveaux plasmatiques. On observe donc une inhibition initiale de la sécrétion de CRH et d'ACTH qui est suivie de la réduction de transcription de CRH et de POMC[70].

Les détails connus de la boucle de rétroaction chez l'humain sont limités. Tous les GC(E)s peuvent supprimer la sécrétion d'ACTH, mais le degré de suppression dépend de la dose, du potentiel de suppression et de la durée d'action du stéroïde, ainsi que de la durée et du temps d'administration. L'effet supprimeur sera d'autant plus élevé que l'administration sera rapprochée du pic matinal d'ACTH. Une courte boucle de répression semble exister, par l'observation d'un effet inhibiteur

direct sur la stéroïdogénèse sur des cellules surrenaliennes en culture. Cet effet semble toutefois minimal *in vivo* puisque l'administration de dexaméthasone n'inhibe pas la production de cortisol stimulée par l'ACTH dans ces conditions[70].

La suppression surrenalienne survient lors de l'administration de GCs pendant au moins deux semaines. Dans ce cas, le patient doit être supplémenté en GCs de façon quotidienne. La dose doit en plus être augmentée en période de stress physique ou psychique. La dose peut être doublée s'il s'agit d'un stress mineur, alors qu'il peut être nécessaire de décupler la dose en cas de chirurgie ou de trauma majeurs[73, 74]. L'axe peut prendre de deux à plus de 12 mois pour redevenir fonctionnel suite à la cessation de la prise de GCs et la cortisolémie peut prendre de six à neuf mois supplémentaires pour se retrouver dans l'intervalle normal, d'où la nécessité du sevrage graduel de GCs[73]. L'arrêt de la supplémentation peut être envisagée lorsque la dose administrée correspond à 7,5mg/d de prednisone[72].

L'intégrité de l'axe HHS peut être vérifiée, entre autres, par un test de suppression à la dexaméthasone. Il s'agit d'administrer un mg de dexaméthasone à 23h pour ensuite déterminer la cortisolémie à huit heures le lendemain matin. Les sujets porteurs d'un axe HHS fonctionnel devraient avoir une cortisolémie inférieure à 50nmol/L. Des faux positifs peuvent survenir chez les sujets recevant des médicaments qui accélèrent le métabolisme de la dexaméthasone, tel la phénytoïne, un anticonvulsivant, en présence d'insuffisance rénale ou chez des sujets expérimentant un stress physique ou mental sévère[72].

A.2.1.3 Transport et métabolisme des GC(E)s

Plus de 90% du cortisol endogène circule lié à l' α_2 -globuline spécifique au cortisol, alors que l'affinité pour les GCs est négligeable[72]. Les taux des transporteurs sont augmentés dans les états d'hyperestrogénisme gestationnel,

d'hyperthyroïdie, de cirrhose et de néphrose. La demi-vie du cortisol sérique est de 70-120 minutes[72].

Le métabolisme hépatique du cortisol implique plusieurs enzymes, tel que présenté à la figure 4. Le cortisol peut être transformé en cortisone par la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase(HSD). Ces deux substances sont ensuite transformées par les mêmes enzymes. Il peut y avoir réduction du lien C4-C5 par la 5 α ou β -réductase, pour former les 5 α ou β -dihydrocortisol qui sont ensuite transformés en 5 α ou β -tétrahydrocortisol par la 3 α -HSD. Le tétrahydrocortisol et la tétrahydrocortisone sont ensuite métabolisés en cortols et en cortolones par la 20 α ou 20 β -HSD, pour être oxydés en acides cortolique et cortolonique, des produits très hydrosolubles facilitant leur excrétion urinaire. Le cortisol et la cortisone peuvent également être hydroxylés en 6 β -hydroxycortisol/one qui sont aussi hydrosolubles. Plus de 95% des métabolites du cortisol et de la cortisone sont conjugués au niveau hépatique, ce qui permet leur re-circulation afin d'être excrétés dans l'urine. La conjugaison est réalisée surtout par l'ajout d'acide glucuronique en position 3 α -hydroxyl, mais également par l'ajout d'un groupement sulfate en position 21-hydroxyl[8, 72, 75].

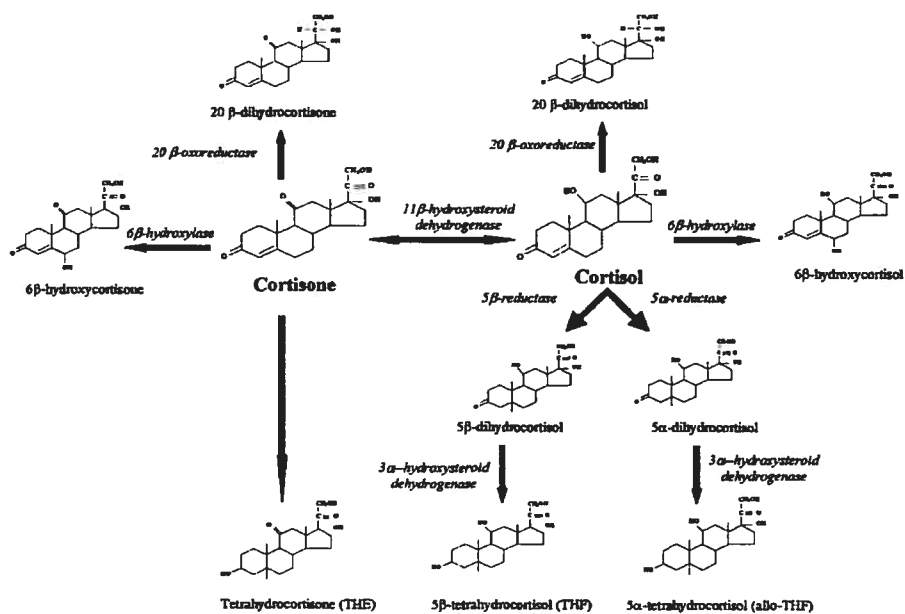


Figure 4. Métabolisme des corticostéroïdes[72].

Le cortisol est également inactivé au niveau rénal par sa conversion en cortisone par la 11 β -HSD. Cette inactivation revêt une importance primordiale, puisqu'elle protège les récepteurs minéralocorticoïdes rénaux d'être activés par le cortisol[8, 73].

Le métabolisme des GCs suit celui des GCEs[73].

A.2.1.4 Fonction des GC(E)s

Les GC(E)s ont une action multisystémique. Leur effet métabolique est minimal chez un patient nutri adéquatement. Cependant, durant le jeûne, ils contribuent à préserver l'euglycémie par l'augmentation de six à dix fois du taux de néoglucogenèse hépatique, par la synthèse de glycogène et par la réduction de l'utilisation de glucose par les cellules en inhibant la translocation par le transporteur de glucose GLUT-4[7, 76]. Les GC(E)s réduisent également la sensibilité des tissus à l'action hypoglycémiante de l'insuline[7]. Les GC(E)s augmentent la synthèse d'ARN et de protéines hépatiques[8]. Par ailleurs, les GCs stimulent la lipoprotéine lipase des tissus adipeux, inhibent l'activité de la lipoprotéine lipase du muscle squelettique et réduisent la captation de triglycérides circulants, contribuant ainsi à la dyslipidémie et à la création d'un profil athérogène bien reconnu[8, 76, 77]. Leurs actions s'étendent à plusieurs autres tissus.

L'excès de GC(E)s inhibe les fibroblastes, conduisant à des ecchymoses spontanées, à une guérison sub-optimale des plaies et à une réduction du taux de collagène entraînant un amincissement cutané.[8]

Bien que le rôle physiologique exact des GC(E)s au niveau des os et du métabolisme calcique demeure inconnu, les GC(E)s en excès réduisent la formation osseuse en inhibant les ostéoblastes, ainsi que la synthèse d'ARN, de protéines, de

collagène et d'acide hyaluronique. Ces changements favorisent le développement de l'ostéopénie et de l'ostéoporose associées aux GC(E)s. Les GC(E)s favorisent par ailleurs l'ostéonécrose et la résorption osseuse[78, 79]. De plus, les GC(E)s potentialisent l'action de la parathormone (PTH) et de la 1,25-dihydroxycholecalciférol (vitamine D active) sur l'os, contribuant également à la résorption osseuse. Par ailleurs, les GC(E)s sont hypocalcémiantes par une réduction de l'absorption intestinale de calcium, réalisée en stimulant directement la synthèse de la PTH et de la 1α -hydroxylase, cette dernière enzyme est impliquée dans l'activation de la vitamine D, et par l'augmentation de l'excrétion rénale. Les GC(E)s contribuent également à l'hypophosphatémie en diminuant la réabsorption tubulaire de phosphate, ce qui stimule la synthèse de vitamine D active, aggravant l'hypocalcémie[7, 8, 72].

Même si les GC(E)s constituent un facteur de croissance et de différenciation dans plusieurs tissus fœtaux, en excès ils inhibent la croissance des enfants. Cet effet pourrait être secondaire à un effet direct sur la croissance osseuse ou sur la réduction de la sécrétion d'hormone de croissance.[8] Les GC(E)s constituent également un facteur inducteur et répresseur de l'expression de plusieurs gènes des systèmes immunitaires, endocriniens, osseux, métaboliques, du développement fœtal et de certains gènes de transporteurs d'électrolytes[72].

Les GC(E)s ont des propriétés anti-inflammatoires et immunologiques très sollicitées en thérapie. Ils limitent la migration de cellules inflammatoires au site cible et stabilisent les membranes lysosomiales, réduisant ainsi la réaction inflammatoire évoquée [7, 73]. Ils réduisent la synthèse des immunoglobulines, favorisent l'apoptose des lymphocytes, inhibent la maturation des monocytes, la phagocytose des macrophages et leur pouvoir cytotoxique[72]. Ces effets ont toutefois l'effet délétère d'accroître la susceptibilité aux infections des sujets soumis chroniquement aux GC(E)s[8]. Par ailleurs, les GC(E)s favorisent la résolution de l'inflammation par deux moyens. D'abord en bloquant la sécrétion des médiateurs perpétuants l'inflammation, tel NF- κ B, et ensuite en favorisant la guérison tissulaire

en rendant disponible des acides aminés, des acides gras et du glucose[7, 72]. Les effets anti-inflammatoires des GC(E)s sont maximaux six heures après l'administration, puis se dissipent graduellement sur 24 heures[73].

Des doses importantes de GCs sont associées aux ulcères peptiques, possiblement par suppression de la réaction immunitaire contre Helicobacter pylori[73].

Les GC(E)s augmentent le débit cardiaque et le tonus vasculaire périphérique, deux déterminants majeurs d'une hausse de tension artérielle. Ils augmentent la sensibilité aux médiateurs adrénérgiques et la synthèse de l'angiotensinogène, directement impliqués aussi dans l'élévation de la tension artérielle. Le cortisol peut également jouer directement au niveau des récepteurs minéralocorticoïdes rénaux en surpassant la capacité inhibitrice de la 11β -HSD[8, 72, 80].

Les GC(E)s affectent l'équilibre hydrique et électrolytique par la liaison au récepteur des minéralocorticoïdes, médiant ainsi la rétention sodique, l'hypokaliémie et l'hypertension. Les GC(E)s favorisent aussi l'augmentation du taux de filtration glomérulaire secondaire à l'augmentation du débit cardiaque ou aux effets rénaux de la rétention d'eau et de sodium.[8]

L'entrée des GC(E)s au système nerveux central est documentée, quoique leur rôle physiologique demeure à préciser. L'excès de GCs est associé initialement à l'euphorie. Suite à une exposition prolongée, il est possible d'observer de l'irritabilité, une labilité émotionnelle, ainsi que la dépression. Les fonctions cognitives de mémoire et de concentration seraient également atteintes[81]. L'augmentation de l'appétit, la réduction de la libido et l'insomnie sont d'autres symptômes rapportés[8].

Au niveau endocrinien, les axes gonadique et thyroïdien sont aussi influencés par les GC(E)s. On observe une réduction de la pulsativité de la GnRH et une

suppression de l'hormone stimulatrice de la thyroïde conduisant éventuellement à l'aménorrhée et à l'hypothyroïdie respectivement[8, 72].

Le traitement aux GCs favorise l'élévation de la pression intraoculaire chez les patients atteints de glaucome et peut être associé à la formation de cataracte.[8]

A.2.1.5 Toxicité liée à l'exposition aux GCs lors du traitement de LLA

En raison de leur action multisystémique, les GCs sont responsables de plusieurs effets secondaires toxiques. Parmi ceux-ci, on dénombre une altération typique du tissu adipeux (faciès Cushinoïde), l'obésité, une intolérance au glucose, l'hypertension, une gastrite, une myosite, une myopathie, la nécrose avasculaire osseuse et une immunosuppression, qui rend le patient plus susceptible aux infections opportunistes, particulièrement celles fongiques (cf tableau III)[82]. De plus, tel que suggéré par son potentiel anti-inflammatoire accru, la dexaméthasone a un profil de toxicité plus important que celui de la prednisone[82]. Il est d'ailleurs rapporté que les patients traités avec le protocole DFCI 91-01, qui comprend exclusivement de la dexaméthasone pendant une fenêtre d'investigation, portent un risque accru de décès septique pendant la période d'induction (4 décès sur 369 patients; $p=0,0035$), que les patients traités avec le protocole DFCI 87-01, où il n'y a pas de GC pendant la fenêtre d'investigation (1 décès sur 377 patients; $p=0,0003$)(cf tableau I)[83]. Le taux d'infections opportunistes semble toutefois similaire dans les deux groupes[82]. Le traitement est associé à une incidence cumulative à 5 ans de $30 \pm 4\%$ de morbidité osseuse, de $28 \pm 3\%$ de fractures et de $7 \pm 2\%$ d'ostéonécrose. La dexaméthasone est associée à un risque plus élevé de fracture que la prednisone($p=0,01$)[84]. La dexaméthasone est également reliée à des séquelles neurologiques plus marquées que celles pour la prednisone[81]. La dexaméthasone est toutefois associée à une amélioration de la survie à 5 ans dans le protocole DFCI 91-01, relativement au protocole DFCI 87-01, qui utilisait plus la prednisone[85]. L'ajout de daunomycine accroît la toxicité globale du traitement ($p<0,01$) et est plus marquée lorsqu'utilisée

avec la dexaméthasone. Cependant, malgré la toxicité reliée aux GCs, les effets secondaires n'ont pas compromis l'administration du traitement[82].

Tableau III. Comparaison des profils de toxicité de la dexaméthasone lorsqu'administrés avec ou sans daunorubicine, pendant la phase d'induction de rémission des LLA de type B[82].

Toxicité	Dexaméthasone (%)		Valeur p
	Avec Daunorubicine	Sans Daunorubicine	
Toutes	39	5	0,006
Infection	29	3	0,08
Hyper-glycémie	8	2	0,78
Gain de poids		+11,9	0,002
Gastrite	20	3	0,63
Hypertension	4	1	-
Myopathie	3	1	-

A.2.1.6 Comparaison des GCs et GCEs

Le cortisol réalise près de 95% de l'activité GCE, par opposition à la corticostérone qui n'en représente que 4%[7]. La prednisone et la dexaméthasone sont respectivement quatre et 25 fois plus active que le cortisol endogène[71]. La dexaméthasone offre par ailleurs l'avantage d'avoir une activité minéralocorticoïde pratiquement nulle, évitant ainsi les effets secondaires reliés.[7] La présence du lien double 1,2 augmente l'activité GCE relativement à l'activité minéralocorticoïde de la prednisone et de la dexaméthasone[71]. Par ailleurs, la dexaméthasone a une action suppressive de l'axe et anti-inflammatoire respectivement 17 et 26 fois plus importante que le cortisol endogène[72].

pourrait être biaisé par l'intensité des doses de dexaméthasone qui est supérieure à celle pour la prednisone[26].

La dexaméthasone semble induire une meilleure survie sans événement que la prednisone dans des conditions comparables[86]. Cette différence pourrait être liée au fluor ajouté dans la dexaméthasone qui augmente son potentiel en ralentissant son métabolisme et en augmentant l'affinité pour le RG[4]. Par ailleurs, la substitution de la dexaméthasone pour la prednisone ou la méthylprednisolone dans le traitement d'enfants atteints de LLA est associée à une incidence accrue d'épisodes septiques et de décès toxiques[83].

Une bonne réponse au traitement se traduit par une réduction d'au moins 15% du taux de blastes médullaires et d'au moins 85% du niveau absolu de blastes périphériques[87].

A.2.3 Apoptose induite par les GCs

Les GC(E)s induisent l'apoptose des cellules néoplasiques hématologiques[4, 5, 88]. Ce mécanisme de mort cellulaire est très intéressant en chimiothérapie, puisqu'il permet l'élimination de cellules néoplasiques par phagocytose, donc sans réaction inflammatoire[21]. Bien que les sentiers exacts de signalisation intracellulaire ne soient pas élucidés, plusieurs hypothèses sont évoquées.

Les GC(E)s pourraient intervenir sur la translocation de p53 au noyau[89], sur son activation[90] ou sur l'activation de sa transcription conjointement à Bax[91]. L'implication de p53 dans l'apoptose induite par les GC(E)s est toutefois controversée[92, 93]. La dexaméthasone pourrait également favoriser l'accumulation cytoplasmique de SMAC, où ce dernier pourrait activer la caspase-9, indépendamment de la libération de cytochrome c et d'Apaf-1[94]. Les GC(E)s pourraient aussi activer la caspase-3 et ainsi la cascade apoptotique, mais la

surexpression de Bcl-2 inhibe l'induction de l'apoptose[95, 96]. L'implication de la caspase-3 dans l'apoptose induite par les GC(E)s demeure critiquée au profit de la caspase-6[97].

Les gènes candidats à la répression par les GC(E)s incluent NF- κ B, AP-1 et c-myc. Le RG pourrait induire l'apoptose des cellules soumises à un choc thermique, en devenant activé sans la liaison de son ligand[98]. Par ailleurs, une interaction directe entre le RG et la sous-unité p65 de NF- κ B ou AP-1 bloquerait la transcription associée à ces derniers facteurs, empêchant ainsi l'expression de gènes nécessaires respectivement à l'inflammation d'une part et à la survie et à la croissance cellulaire d'autre part[21, 99-101]. Les GC(E)s supprimeraient directement la transcription de c-myc, induisant ainsi l'apoptose[4, 102, 103].

Les GC(E)s pourrait par ailleurs induire l'arrêt cellulaire en G1 par une expression réduite de c-myc et de la cycline D3 et par une augmentation de l'expression de CDK1, CDK4 et CDK6[104, 105].

A.2.4 Résistance aux GC(E)s

La variabilité de la sensibilité aux GC(E)s est bien reconnue, pouvant se traduire par un syndrome d'hyperréactivité aux GC(E)s ou par une résistance[106-109]. Tel que mentionné précédemment, la résistance aux GCs *in vivo* et *in vitro* est un indice de mauvais pronostic[86, 110]. Le taux de résistance aux GCs passe en fait de 20% lors du diagnostic initial à 70% lors des rechutes[11]. Cette résistance pourrait être causée par plusieurs phénomènes.

D'abord, elle pourrait être reliée à une altération fonctionnelle du RG et/ou une réduction de son nombre[86, 111]. Les substitutions Val729Ile et Asp641Val du RG, situées dans le domaine de liaison des GCs, altèrent l'affinité du RG pour la

dexaméthasone et contribuent probablement à la résistance aux GCs relevée chez les sujets de l'étude[112, 113]. La délétion de 4 paires de bases en 3' de l'exon 6 du RG, identifiée chez des individus résistants aux GCs, est probablement associée à un transcrit instable, conduisant à une réduction de 50% du nombre de RG intracellulaire, mécanisme ainsi suggéré de résistance[114]. Les polymorphismes Asn363Ser et Asn766Asn du RG ont été investigués quant à leur contribution à la résistance aux GCs dans les tumeurs hypophysaires sécrétant l'ACTH, sans toutefois qu'une relation ait été mise en évidence avec la présentation clinique, la taille tumorale et l'issue thérapeutique[115]. Le polymorphisme 23Lys semble associé à la résistance aux GCs, tel qu'observé par la réduction de la sensibilité de la rétroaction surrénalienne et le meilleur profil métabolique des sujets concernés[116]. La perte d'hétérozygotie du RG serait un phénomène fréquemment rencontré avec les adénomes hypophysaires de la maladie de Cushing, ce qui pourrait suggérer la résistance aux GCs qui y est associée[117].

La résistance pourrait aussi être reliée à l'interruption, par Bcl-2 ou l'interleukine-6, de l'apoptose initiée par les GC(E)s[104, 118-122]. Un autre mécanisme de résistance pourrait provenir de la translocation au noyau du RG réalisée sans la liaison du ligand en présence de méthotrexate ou de cytarabine[123].

Une variation inter-individuelle à la sensibilité aux GCs est bien reconnue[9, 124, 125]. Cette variation pourrait être reliée à l'affinité du RG, rendant jusqu'à 6,6% de la population hypersensible et 2,3% relativement résistants aux GCs[9, 10]. Il semble par ailleurs exister une variation inter-tissulaire de la sensibilité chez un même individu, quoique ceci soit controversé[126]. Cette variation ne serait pas associée à l'âge[125].

L'arthrite rhumatoïde est une pathologie auto-immune à laquelle est associée la substitution d'une adénine pour une guanine dans la région non exprimée en amont de l'exon 9 β , codant pour la région non exprimée en 3' de l'ARN messager de l'isoforme β du récepteur[127]. Cette isoforme inhibe la forme active du RG, soit

l'isoforme α . Puisque ce polymorphisme est associé à une stabilité de l'ARN messager et à une expression protéique accrues de l'isoforme β , il contribue potentiellement à la résistance aux GCs[127, 128]. Une variation de l'ARN messager du RG est également retrouvé chez des patients atteints d'un myélome multiple résistant à l'actions des GCs[129]. L'hyposensibilité aux GCs pourrait aussi être reliée à la néphrite lupique, une autre pathologie auto-immune. L'insertion d'une adénine en position 2439 du gène RG est un polymorphisme retrouvé chez des patients atteints de néphrite lupique et engendre l'expression de 20 acides aminés supplémentaires. Ce polymorphisme pourrait être associé à une réduction du nombre de RG sur les cellules mononuclées du système immunitaire, favorisant ainsi la résistance aux GCs[130]. La forme β est un autre mécanisme de résistance proposé et détaillé à la section 2.3.

Le gène de la GST est également associé à la résistance aux GCs. La délétion homozygote du génotype GST T1 confère un risque de 6,7 fois inférieur de mauvaise réponse à la prednisone et un risque de rechute 5,9 fois inférieur chez les patients atteints de LLA, comparativement aux hétérozygotes et homozygotes pour GST T1[63]. Le gène du récepteur adrénergique de type 2A (ADRA2A) constitue un autre gène où des polymorphismes fonctionnels altèrent la réponse aux GCs. On se rappellera que la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalienne fait intervenir le cortisol, mais également des voies adrénergiques. La substitution C-1291G du ADRA2A est ainsi associée à des taux salivaires de cortisol anormalement élevés en réponse à la dexaméthasone et une glycémie à jeûn élevée[131]. La substitution d'une guanine pour une adénine en 5' de la région non exprimée du gène du TNF- α est aussi associée à des manifestations cliniques d'une dérégulation de l'axe HHS[132].

L'identification de facteurs pouvant expliquer le mécanisme responsable de cette résistance et de cette variation de sensibilité constitue certainement une avancée vers un traitement plus optimal.

A.3 Description du RG

La localisation du gène du RG a été redéfinie par hybridation in situ en 5q31-32, ce qui a été confirmé par des analyses de liaison et Southern[133-136]. Le gène contient 10 exons dispersés sur au moins 80 kilobases (kb)[137]. Le premier exon n'est pas traduit et la partie amino-terminale se retrouve à l'exon 2[137]. Ce récepteur fait partie de la famille des récepteurs stéroïdiens comportant les trois domaines classiques et porte une analogie aux proto-oncogènes erb-A[8, 138]. La région N-terminale, soit les acides aminés 1 à 420, constitue le domaine immunogénique, le domaine de liaison à l'ADN est formé des acides aminés 421-488 et le domaine de liaison au ligand comprend les acides aminés 527-577, soit les 50 derniers acides aminés provenant de l'exon 9 α pour la forme α [127].

Par l'épissage alternatif, cinq produits du gène du RG sont formés. La forme α , constituant le récepteur fonctionnel, comporte les exons 2 à 9 α , formant ainsi un ARN messenger de 5,5kb[135, 139]. La forme β comporte l'exon 9 β au lieu de l'exon 9 α , ce qui provoque la perte du domaine de liaison au ligand et ainsi la perte de fonction[135]. Le troisième produit est la forme γ , où l'exon 4 est épissé et trois paires de bases introniques sont conservées, engendrant l'ajout d'une arginine dans le domaine de liaison à l'ADN[140]. Cet ajout réduit l'activité transcriptionnelle à 48% de l'activité de la forme α [140]. La forme GR-P est constituée des exons 2 à 7, auxquels sont ajoutés quelques paires de bases introniques[141]. Cette modification provoque la perte du domaine de liaison au ligand. Cette forme est fortement exprimée dans les néoplasies hématologiques[142]. Bien que sa fonction exacte demeure inconnue, des études de co-transfection démontrent une augmentation de l'activité de la forme α , générant ainsi un mécanisme de résistance potentiel[142]. La forme GR-A ne comprend pas les exons 5 à 7 inclusivement[141]. Sa fonction et son niveau d'expression demeurent à préciser[141]. La proportion relative des différentes formes n'a pas été investiguée, quoique la forme α soit reconnue comme étant la principale[138]. Deux sites d'initiation de la traduction ont été identifiés dans hGR α ,

conduisant à la formation de hGR-A et hGR-B, ce dernier étant traduit à partir d'un deuxième ATG situé 71pb en aval du premier dans l'exon 2[127]. Les deux formes sont présentes en quantité similaire, mais HGR-B semble être près de deux fois plus efficace que HGR-A dans l'activation de gènes transcrits suite à la liaison des GC(E)s à l'élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE)[127].

L'ARN messager du hGR-A a été détecté dans les tissus suivants présentés en ordre décroissant de concentration : cerveau ($3.83 \pm 0.80 \times 10^6$ ADN complémentaire/ μg total d'ARN), muscle squelettique, macrophages, poumons, reins, foie, cœur, éosinophiles, polymorphonucléaires périphériques, muqueuse nasale, neutrophiles et côlon($0.33 \pm 0. \times 10^6$ ADN complémentaire/ μg total d'ARN)[143]. L'ARN messager du hGR-B a un niveau d'expression moindre que l'ARN messager du hGR-A[143]. Il se retrouve, en ordre décroissant de concentration : éosinophiles ($1.55 \pm 0.58 \times 10^6$ ADN complémentaire/ μg total d'ARN), polymorphonucléaires périphériques, foie, muscle squelettique, reins, macrophages, poumons, neutrophiles, cerveau, muqueuse nasale et du cœur($0.15 \pm 0.08 \times 10(6) \times 10^6$ ADN complémentaire/ μg total d'ARN)[143]. La protéine hGR-A a été retrouvée dans tous les tissus, contrairement à la protéine hGR-B qui n'a pas été détectée[143-146].

La forme α inactive est située dans le cytoplasme[147]. Cette forme lie alors HSP90, HSP70, HSP40, p23, p60 ainsi qu'un immunophiline de 56kDa, cette dernière étant facultative[127, 148] HSP90 semble nécessaire pour obtenir la conformation de hRG α permettant la liaison du ligand[148]. Le domaine de liaison du ligand contient 12 hélices α qui forment une poche hydrophobique qui se refermera pour emprisonner le ligand suite à son contact[127]. Le RG lie l'ADN sous forme de dimères[8]. La dimérisation survient par le domaine de liaison à l'ADN, celle-ci étant dépendante de la liaison à l'ADN, et par des domaines à l'extérieur du domaine de liaison à l'ADN, ceux-ci se dimérisant avant la liaison à l'ADN[127].

Bien que le mécanisme exact de translocation au noyau du RG activé reste à déterminer, deux régions semblent impliquées[127]. D'abord la région NL1, très

conservée, qui est située en C-terminal du domaine de liaison à l'ADN[127]. Cette région est soumise à une inhibition par le domaine de liaison au ligand qui est levée lors de la liaison du récepteur à son ligand[127]. Une deuxième région nommée NL2 se retrouve dans le domaine de liaison au ligand est présentement étudiée[127].

Le GRE, le site de liaison à l'ADN, est un site palindromique portant la séquence : 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3'[149]. Une fois liée, la forme α exerce une transactivation médiée les domaines $\tau 1$ et $\tau 2$, situés entre les acides aminés 7 à 262 ainsi qu'entre les acides aminés 526 à 556 respectivement[127]. L'activation de la transcription est assistée de co-activateurs, tels CBP et p300, qui médient l'acétylation des histones et de BRG-1, permettant ainsi le déplacement de l'histone H1[127]. Une représentation schématique de l'action intracellulaire des GCs est présenté à la figure 6.

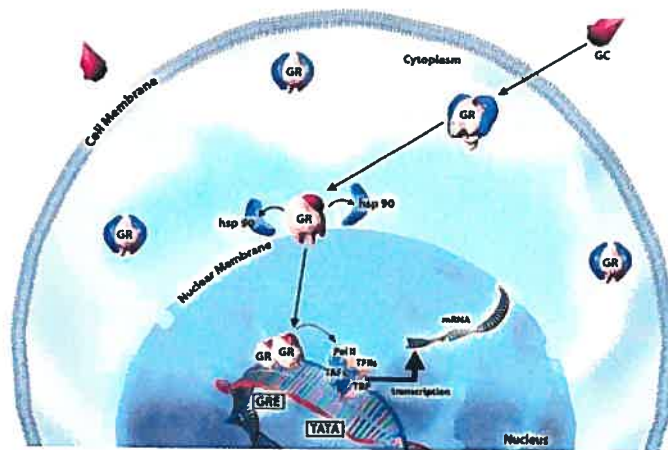


Figure 6. Mode d'action intracellulaire des GC(E)s[150].

La forme β serait responsable de l'inhibition de la forme α par la compétition pour les GREs ou par l'hétérodimérisation avec la forme α portant son ligand de façon à agir comme un inhibiteur dominant négatif[10, 151]. La liaison du ligand serait un autre élément régulateur de l'action du récepteur. En effet, l'occupation prolongée du site de liaison pour le ligand entraînerait une accélération du recyclage de l'ARN messager du RG[152]. Par ailleurs, en présence de concentrations

croissantes de cortisol, il y a inhibition de la forme α et augmentation de la concentration de la forme β , ce qui entraîne la diminution du ratio α/β et ainsi une réduction de l'activité du RG[152]. Il est d'ailleurs suggéré que dans les cellules de lignée T, le mauvais pronostic qui lui est associé pourrait être attribué à la faible concentration de la forme α et à des concentrations normale à élevée de la forme β [129]. De plus, la disponibilité des GCs actifs, déterminée par la 11- β HSD de type I, constitue un autre site de régulation de l'activité du RG[152]. On propose de façon complémentaire que la 11- β HSD de type I contribue à maintenir la sensibilité aux cortisol devant un ratio hGR- α/β diminuant, par la réduction de la concentration intracellulaire de cortisol[152]. Le polymorphisme A3669G du RG est par ailleurs associé à l'arthrite rhumatoïde, possiblement par une stabilité accrue de la forme β qui altère la sensibilité aux GCs[153].

A.3.1 Polymorphismes du RG

Puisque les GC(E)s exercent leur action par le RG, nous proposons qu'un polymorphisme fonctionnel du RG pourrait être associé à une altération de la sensibilité aux GCs. Dans le cadre du projet présenté, notre attention s'est portée plus particulièrement sur trois polymorphismes du RG, soit le polymorphisme de longueur de fragment de restriction Bcl I et les substitutions Arg23Lys et Asn363Ser.

A.3.1.1 Le polymorphisme Bcl I

Ce polymorphisme de longueur de fragment de restriction, initialement identifié par Murray et al. en 1987[14], est caractérisé par des fragments de restriction Bcl I de 4,5 et 2,3kb observés avec une fréquence allélique respective de 55% et 45%. Rosmond et al. rapporte une fréquence de 40,1% pour les homozygotes porteurs du fragment de 2,3kb, 46,2% pour les hétérozygotes et 13,7% pour les homozygotes

porteurs du fragment de 4,5kb dans une population Suédoise[154]. Ce polymorphisme est considéré fonctionnel, car le fragment de 4,5kb est associé à une réduction significative de la rétroaction inhibitrice régulatrice de l'axe HHS, qui se traduit par une augmentation de l'indice de masse corporelle, du ratio taille-hanche, du diamètre sagittal abdominal, de la leptine, de la tension artérielle systolique, du niveau de cortisol salivaire post-prandial[154, 155] et à une augmentation du tissu adipeux viscéral abdominal[156]. Le fragment de 4,5kb serait également associé à l'hyperinsulinémie chez des femmes obèses, tel que suggéré par l'observation d'une élévation de l'insuline à jeûn et de l'index de résistance à l'insuline chez ces sujets[157].

Une étude a démontré que les individus homozygotes 2,3/ 2,3 kb tolèrent moins bien une suralimentation que les hétérozygotes[158]. En effet, ils concluent à l'induction d'un profil athérogène par la suralimentation en observant un gain de poids supérieur, des niveaux de cholestérol total et de LDL supérieurs, une élévation de la tension artérielle systolique et une augmentation du tissu adipeux viscéral abdominal[158].

L'étude de Panarelli et al. est plus nuancée quant à l'effet de ce polymorphisme[159]. Ils ont en effet vérifiés ses répercussions sur le cortisol plasmatique et urinaire, les lipides plasmatiques, les électrolytes plasmatiques et urinaires, la clairance de la créatinine, la tension artérielle, l'indice de masse corporelle, le pli cutané ajusté pour l'âge (indice d'obésité), la sensibilité *in vivo* par la vasoconstriction cutanée secondaire à l'exposition à la budesonide, un GC, pendant 18 heures, et la sensibilité *in vitro* par l'étude des leucocytes au niveau de leurs caractéristiques de liaison aux GCs et de la libération de lysozyme lorsque soumis aux GCs[159]. La seule différence significative a été observée avec le test de sensibilité *in vivo* qui était supérieur chez les porteurs du fragment de 4,5kb[159]. Ils proposent alors que l'altération de la fonction du RG pourrait dépendre du tissu[159], ils suggèrent l'existence d'autres facteurs qui pourraient compenser pour l'altération

de la capacité de liaison et finalement, ils proposent que ce polymorphisme est un marqueur de la dysfonction d'un gène séparé qui influencerait le RG[159].

A.3.1.2 Les polymorphismes Arg23Lys et Asn363Ser

Koper et al. ont identifié cinq nouveaux polymorphismes du RG, dont Arg23Lys et Asn363Ser sont les seuls menant à une substitution de la séquence codante en position G200A et A1220G de l'exon 2 respectivement[15]. La nouvelle sérine, située dans un élément régulateur du RG, peut devenir phosphorylée et être associée à activité accrue de transactivation des gènes cibles[160]. Ils rapportent une fréquence allélique de 3,7% pour le variant 23Lys et de 3,0% pour le variant 363Ser, ce qui est équivalent à la fréquence allélique de 3,0% pour le variant 363Ser rapporté par Dobson et al., mais légèrement inférieure à celle rapportée par Huizenga et al. soit 6.0%[160, 161]. La fréquence du variant 363Ser observée dans un groupe de sujets Australiens normotendus et hypertendus est de 7,4% et de 6,0% respectivement[162]. La fréquence du variant 23Lys observée par Van Rossum et al. est de 8,9%, dans une population équivalente à celle de Koper et al.[116].

La fonction de ces polymorphismes est controversée. En effet, les études de Koper et al. et de Echwald et al. ne permettent pas de conclure à une résistance clinique aux GCs, représentée par l'hirsutisme, l'hypokaliémie ou l'hypertension, ni à une altération du test de suppression à la dexaméthane pour ces polymorphismes. De façon analogue, l'étude de de Lange et al. ne permet pas d'observer un impact au niveau de la transcription des gènes cibles du GRE pour le variant 363Ser ou 23Lys[15, 163, 164]. Van Rossum et al. démontrent toutefois que les porteurs du variant 23Lys semblent être plus résistants à l'action des GCs, tel que démontré par le test de suppression à la dexaméthane à haute dose, le niveau d'insuline à jeûn et la concentration de LDL totale, et ce, dans la même population que celle de Koper et al.[15, 116]. Ils rapportent en effet que, dans cette population, le variant Ser serait associé à une sensibilité accrue aux GCs[161]. En effet, chez les porteurs du variant

Ser, l'administration d'une faible dose de dexaméthasone, soit 0,25mg, est suffisante pour induire une suppression adéquate de l'axe HHS et nécessite même la sécrétion d'insuline pour contrôler l'hyperglycémie secondaire à l'administration de GCs[161]. Cette étude rapporte également une élévation de l'indice de masse corporelle chez les porteurs du variant, alors qu'aucune différence significative n'est notée au niveau de la densité osseuse ou de la tension artérielle[161]. L'étude de Lin et al. obtient des résultats parallèles à ceux d'Huizenga et al.. En effet, ils observent une pénétrance de 83% et 100% de l'obésité chez les porteurs du variant 363Ser parmi des Australiens normotendus et hypertendus et l'association de ce variant avec des facteurs de risque d'athérosclérose, favorisant dès lors le développement de la maladie cardiaque athérosclérotique[162, 165, 166]. L'étude de Dobson et al. démontre également, chez une population d'Européen vivant dans le nord-est du Royaume-Uni, une association du variant 363Ser avec une augmentation du ratio taille-hanche seulement chez les hommes, mais aucune association avec la tension artérielle, l'indice de masse corporelle, les lipides sériques et la tolérance au glucose[160]. Des résultats parallèles sont obtenus par Roussel et al. qui rapportent l'association avec un surpoids chez des sujets atteints de diabète de type deux[167]. De plus, Di Blasio et al. observent que les obèses porteurs du variant 363Ser sont davantage sujets à devenir plus obèses en raison d'une hypersensibilité de la réponse à l'insuline[168]. Il ajoute que les individus porteurs des polymorphismes 363Ser et Bcl I ont une tension artérielle plus élevée et un mauvais profil lipidique, favorisant ainsi le développement d'athérosclérose[168].

A.4 Description du cytochrome P450

Les médicaments exogènes sont soumis à deux réactions principales, celles de phase I et II[73]. Les réactions de phase I conduisent à la formation d'un métabolite polaire par l'ajout ou le dévoilement d'un groupement fonctionnel dont les hydroxyles, les amines et les sulfydryles[73]. Certains métabolites sont inactivés à cette étape et cette polarisation est suffisante à leur excrétion rénale[73]. La plupart

des enzymes de phase I métabolisant les médicaments se situent dans les membranes lipophiles du réticulum endoplasmique[73]. Deux types d'enzymes oxydantes y sont retrouvées : le NADPH-cytochrome c réductase et le cytochrome P450[73]. Pour les autres médicaments non excrétés, les enzymes de la phase II les modifient en leur ajoutant un substrat endogène tel l'acide glucuronique, l'acide sulfurique, l'acide acétique ou un acide aminé[73]. Les principales enzymes de phase II sont la glutathione-S transférase et la N-acétyltransférase[73]. Dans certains cas, la phase II peut précéder la phase I[73]. Plusieurs organes ont la possibilité de métaboliser les médicaments, dont le tractus gastro-intestinal, les poumons, la peau et les reins, et principalement le foie[73]. Plusieurs isoformes ont été identifiées pour le cytochrome dont le 3A4[73].

A.4.1 CYP3A4

En plus de constituer près de 30% du cytochrome P450, soit la majorité de ces isoenzymes, CYP3A4 est responsable du métabolisme des GCs par une 6 β -hydroxylation et du métabolisme de plus de 60% des médicaments[73, 169-173]. Les GCs sont par ailleurs un inducteur du CYP3A4 ayant une action synergique sur le récepteur pregnane-X (RPX)[174-176]. L'action des GCs sur le CYP3A4 est en effet médiée par le RPX, puisque le gène de CYP3A4 est dépourvu d'un élément de réponse aux GCs[73, 175, 177]. Le niveau d'expression du CYP3A4 est très variable d'un individu à l'autre[169, 178-180]. Certains polymorphismes fonctionnels présents au niveau du RPX expliquent une partie de cette variabilité[181].

A.4.1.1 Le polymorphisme CYP3A4 A-290G

Un des polymorphismes identifiés dans le promoteur du CYP3A4 génère la substitution A-290G, située dans un élément de réponse à la nifédipine[16]. Des

fréquences de 3-4%, 8%, 9%, 54-67%, 78% et 81% sont observées respectivement chez une population de Finlandais, de Caucasiens, d'Hispaniques-Américains, d'Africains-Américains, de Sénégalais et de Ghanéens respectivement[182-184]. Ce polymorphisme n'a pas été détecté dans les populations asiatiques[182, 184, 185].

CYP3A4 métabolise la testostérone, qui représente l'androgène le plus important dans la fonction et la croissance prostatique. La réduction du métabolisme de la testostérone, associée à des taux sériques supérieurs, pourrait ainsi contribuer au développement du cancer prostatique[16]. La relation entre ce polymorphisme et le risque de cancer de prostate n'a toutefois pas été étudié[183]. D'autre part, CYP3A4 exprimé dans le tissu mammaire, est impliqué dans le métabolisme de plusieurs stéroïdes sexuels et contribue à la formation d'un métabolite carcinogénique de l'estrogène[186]. Cependant, le polymorphisme A-290G n'est pas associé à un risque accru de cancer du sein ou de l'ovaire chez des femmes australiennes âgées de moins de 60 ans[187]. De plus, le polymorphisme n'est pas relié à une ménarche précoce, après ajustement pour l'origine ethnique[188].

L'influence du variant A-290G sur l'expression de CYP3A4 est controversée. Dans des lignées cellulaires tumorales hépatique et mammaire, le variant est associé à une expression accrue[189]. Toutefois, aucune différence significative dans l'activité de CYP3A4 selon la distribution allélique du polymorphisme est reportée, tel qu'observé par l'hydroxylation de la testostérone par des microsomes hépatiques *in vitro*[190]. Les études *in vivo* ne permettent de mettre en évidence un impact majeur du variant sur l'expression de CYP3A4, puisque ne sont observés qu'une réduction mineure du métabolisme hépatique de la midazolam et aucune différence significative dans la déméthylation de l'érythromycine et la formation dépendante de nifédipine d'un métabolite du CYP3A4[191, 192]. De plus, l'évaluation de la présence du variant, chez des individus de race blanche sélectionnés par une faible activité enzymatique de CYP3A4, ne permet pas d'établir une relation entre le polymorphisme A-290G et l'activité enzymatique[193].

Les individus porteurs du variant CYP3A4 –290A seraient à risque plus élevé, par rapport aux porteurs du variant CYP3A4 –290G, de développer une leucémie post-traitement[194]. Ceci est observé particulièrement avec l'utilisation de l'épipodophyllotoxine, un agent chimiothérapeutique, associée aux leucémies aiguës secondaires portant la translocation du gène MLL en 11q23[195]. Les auteurs proposent que le CYP3A4 –290A ait une activité accrue par rapport au variant, conduisant à la formation accélérée de quinones potentiellement dommageables pour l'ADN[194]. Cependant, aucune différence significative n'a été observé dans la distribution allélique de ce polymorphisme chez deux populations de patients, tous en rémission de LLA, l'un avec et l'autre sans survenue de LMA ou de syndrome myélodysplasique, malgré la considération des différences ethniques[196].

B OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

Les GCs sont un atout majeur dans la chimiothérapie de la LLA chez l'enfant. En effet, les GCs permettent d'atteindre des taux de survie à 5 ans supérieurs à 80%, lorsque combinés à d'autres agents chimiothérapeutiques. Ces bienfaits doivent cependant être nuancés par trois aspects.

D'abord, les GCs sont associés à des effets secondaires multisystémiques non négligeables qui peuvent devenir un obstacle à la poursuite du traitement. Par ailleurs, une variation inter-individuelle significative dans la sensibilité aux GCs est rapportée et finalement, le taux d'enfants résistants aux GCs passe de 20% au diagnostic à 70% lors des rechutes.

La connaissance des déterminants de la réponse aux GCs dans une population d'enfants atteints de LLA revêt donc une importance primordiale dans l'amélioration du traitement actuel. L'étude de polymorphismes fonctionnels dans certains gènes clés impliqués dans la réponse aux GCs pourrait contribuer à une meilleure compréhension de cette dynamique, dans l'optique de parvenir à des traitements plus efficaces.

L'hypothèse soutenue est donc que les polymorphismes fonctionnels du RG, soit Arg23Lys, Asn363Ser et Bcl I, ainsi que le polymorphisme fonctionnel A-290G de CYP3A4 altèrent la réponse aux GCs et par conséquent soient associés à un taux de rechute et une toxicité accrus. Il est d'ailleurs envisagé que les polymorphismes du gène du RG associés à une réduction de l'activité du RG au niveau de l'axe HHS, c'est-à-dire le variant 23Lys, 363Ser et le variant avec le fragment long de Bcl I, soient associés à davantage d'événements. Il faut toutefois ajouter un bémol à cette hypothèse, puisque les études qui la soutiennent ne sont pas consensuelles. Pour ce qui est du polymorphisme A-290G du CYP3A4, puisque le variant -290A est associé au développement de leucémie post-traitement, il est possible qu'il soit également associé à un taux supérieur de survenue d'événements.

Les objectifs de cette étude peuvent être résumés comme suit :

1. Polymorphismes Arg23Lys et Asn363Ser du RG et A-290G de CYP3A4 :
 - 1.1. développement d'une technique de génotypage à grande échelle par l'approche PCR-hybridation allèle spécifique[197-201];
 - 1.2. évaluation de la fréquence de ce polymorphisme dans une population d'enfants atteints de LLA;
 - 1.3. évaluation de la fréquence de ce polymorphisme dans une population d'individus contrôle non atteints de LLA;
 - 1.4. analyse de l'influence de ce polymorphisme sur l'issue du traitement de la LLA et sa réponse blastique[66, 202].

2. Polymorphisme Bcl I du gène du RG :
 - 2.1. localisation et caractérisation du polymorphisme à l'aide d'outils bio-informatiques et de séquençage;
 - 2.2. développement d'une technique de génotypage à grande échelle par l'approche PCR-hybridation allèle spécifique;
 - 2.3. détermination de la fréquence de ce polymorphisme dans une population multi-ethnique;
 - 2.4. corrélation de la fréquence retrouvée avec celle rapportée dans la littérature;
 - 2.5. évaluation de la fréquence de ce polymorphisme dans une population d'enfants atteints de LLA;
 - 2.6. analyse de l'influence de ce polymorphisme sur l'issue du traitement de la LLA et sa réponse blastique.

C PRÉSENTATION DES ARTICLES

1) Polymorphisms in genes relevant for corticosteroid response and the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia

Isabelle Fleury¹, Melanie Primeau¹, Irina Costea¹, Albert Moghrabi^{1,2}, Daniel Sinnett^{1,2} and Maja Krajinovic^{1,2}

¹Centre de Recherche, Hôpital Sainte-Justine, Centre Hospitalier Universitaire Mère-Enfant; ²Département de Pédiatrie, Université de Montréal, Québec, Canada.

Running title: CYP3A4 and GR gene polymorphisms and childhood ALL outcome

Acknowledgements

We are indebted to all patients and their parents who consented to participate in this study. We are grateful to our colleagues Damian Labuda for discussion and biological material, Mark Bernstein for facilitating access to clinical data and Alan Lovell for critical reading of the manuscript. I.F. has a studentship and M.K. and D.S. scholarships of the Fonds de la recherche en santé du Québec. The Cancer Research Society, Inc. and the Centre de Recherche, Hôpital Ste-Justine supported this study.

Corresponding author:

Maja Krajinovic, Centre de recherche, Hôpital Sainte-Justine, 3175 Côte-Ste-Catherine, Montréal (Québec), H3T 1C5, Canada. Tel: (514) 345-4931/ext. 6259; secretary 3282, Fax: (514) 345-4731 [REDACTED]

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Kaplan-Meier estimates of survival probabilities for ALL patients in the function of genotypes of Bcl I polymorphism of GR gene.

Event free survival (EFS)(a), disease free survival (DFS) (b) and overall survival (OS) (c) curves for patients who are GG homozygous (lower curves) or have other genotypes for the same polymorphism (upper curve). The number of patients in each

curve, numbers of individuals with an event, disease or death (in the parenthesis), as well as the p value, estimated by log-rank test for the survival differences between the patients groups, are indicated on each plot.

Abstract

Introduction: Considerable variability in sensitivity to corticosteroids has been observed among individuals with regard to both natural and synthetic compounds. The role of genetic polymorphisms in modulating the function of natural corticosteroids, and hence in disease susceptibility, has been extensively analyzed, but their impact on therapeutic response remains to be explored. The role of cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) in corticosteroid metabolism, and that of glucocorticoid receptor (GR) in regulation of GR responsive genes, renders the CYP3A4 and GR polymorphisms potential modulators of therapeutic response.

Methods: Towards this aim we analyzed the CYP3A4 A-290G substitution and three GR polymorphisms (G200A, A1220G and C IVS2+ 646G, or Bcl I) in 213 ALL children treated with corticosteroids.

Results: Only the GR 646G variant appeared associated with disease outcome, as illustrated by 646GG individuals' lower probability of event free survival in both univariate and multivariate models (HRs=2.2, 95% CI=1.0-4.7 and 3.5, 95% CI=1.4-8.7, respectively).

Conclusion: This association seems to reflect an impact on overall survival (OS) because the positive correlation has been found between homozygosity for allele G of Bcl I polymorphism and OS, but not with disease free survival probabilities. Further analyses are required to understand the mechanisms needed to explain the observed association.

Introduction

Corticosteroids (CS) modulate a large number of physiological functions that, along with their anti-proliferative effect, explain the wide therapeutic spectrum of synthetically derived compounds used in the treatment of malignant, inflammatory and autoimmune diseases. A considerable variability in CS sensitivity has been

observed across individuals. Altered sensitivity to natural CS has been reported in a range of diseases[106] with the most extreme examples being cortisol hyperreactive syndrome and cortisol resistance.[107, 108] Likewise, resistance to synthetic CS can hamper the efficacy of treatment, whereas increased sensitivity might lead to drug-associated toxicity.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent malignancy of childhood whose treatment is composed of multiple chemotherapeutics that have led to a remarkable improvement in cure rates, which today are of 70 to 80%.[26] However, these figures disguise varying success rates that are dependent upon different disease or host features. Indeed several pharmacogenetic studies showed that functional polymorphisms relevant for metabolism of 6-MP or action of methotrexate can influence toxicity of event free survival (EFS) probabilities in ALL patients.[203, 204] Beside those drugs, important components of ALL treatment protocols are also corticosteroids because they reduces cell proliferation, promotes cell cycle arrest and induces cell death by apoptosis.[75, 86, 88] At relapse, loss of *in vitro* sensitivity to CS is common, whereas various toxic effects have also been reported, including inhibition of the immune system, longer recovery of hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis,[26, 74, 83, 205, 206] the development of late neurocognitive effects,[81] and particularly the decrease in bone mineral density.[78]

CS exert their action via binding to the glucocorticoid receptor (GR), which then acts as a transcriptional regulator of responsive genes. The different GR forms, resulting from GR gene variability, can modify CS effect, thus deregulating biological functions and therefore the underlying susceptibility to many diseases.[4, 80, 109] Likewise, functional GR variability might affect the therapeutic response to CS drugs.[80] Support for GR involvement in CS sensitivity also comes from the recent findings suggesting that resistance to CS in hematological malignancies might be mediated by different level of GR isoforms, each with different functional properties.[129, 142, 207] These differences in GR function might also depend on GR gene polymorphisms whose role as potential modulators of outcome of diseases treated with CS drugs has not yet been addressed.

Several polymorphisms are described in the GR gene.[106] Bcl I polymorphism, corresponding to a C to G substitution in intron 2, located 646 bp from exon/intron boundary,[208] has been associated with high blood pressure, hyperinsulinemia and obesity.[77, 154, 156, 157, 159] The G to A polymorphisms at position 200 results in the amino acid replacement of an arginine to a lysine (Arg23Lys).[15] The Lys23 variant has been correlated with subtle cortisol resistance and a better metabolic health profile.[116] An A1220 to G transition causing an asparagine to serine substitution at codon 363 (Asn363Ser)[15] has been assessed in several studies.[127] Individuals carrying the Ser363 allele had higher sensitivity to exogenously administrated CS with respect to both cortisol suppression and insulin response.[209] Other interesting candidates whose polymorphisms might correlate with differential disease outcome in ALL patients are those located in the cytochrome P-450 3A4 (CYP3A4) gene. CYP3A4 is highly inducible by CS, and beside its role in the metabolism of a variety of drugs and carcinogens, it catalyzes the 6-beta hydroxylation of steroids.[171-173, 180] Inter-individual variability in CYP3A4 activity can partly be explained by an A-290G polymorphism in the promoter,[210] which disrupts a putative nifedipin-specific element altering RNA and protein expression.[211] This polymorphism has been implicated in the development of treatment related leukemia.[194]

To assess whether variants of CYP3A4 and GR genes might correlate with ALL outcome, we analyzed their association with event and disease free survival (EFS and DFS), as well as with overall survival (OS) probabilities in patients with childhood ALL.

Materials and Methods

Study population

The patients (n=213) included in this study are all children with ALL of French-Canadian origin treated at Sainte-Justine Hospital, Montreal, Canada, between 1988 and 2000, with the multi-agent Consortium protocols of the Dana-Farber Cancer Institute (DFCI 87-01, 91-01 or 95-01).[66] Patients DNA samples were obtained as described elsewhere[202] after obtained informed consent in accordance with

protocol approved by the Hospital Ethics Committee. Briefly, regarding the corticosteroid administration, in DFCI 87-01 and DFCI 95-01 treatment protocols, prednisone was given for remission induction (3 weeks) at doses of $40\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$. Prednisone was also administered for 5 days during the intensification and maintenance phase of treatment in cycles of 3 weeks, at doses of 40 or $120\text{mg}/\text{m}^2$ for standard or high-risk patients, respectively. In the DFCI 91-01 treatment protocol, during the intensification and maintenance phase, prednisone was replaced by dexamethasone at doses of 6 or $18\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$, according to risk classes. In addition, in the DFCI 91-01 treatment protocols, CS were also given as a single drug during the treatment window, which lasted 3 days and preceded the usual treatment for relapse induction. Patients were randomized to receive either prednisone at a dose of $40\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$ or dexamethasone at 6, 18 or $150\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$. Intrathecal administration of hydrocortisone is introduced in the DFCI 95-01 protocol. The dose is age dependent and varies from 9 to 15 mg.

The distribution of prognostic factors at diagnosis: sex, age, white blood cell (WBC) count, immunophenotype, treatment protocol, risk group and DNA index, among individuals with and without event was as previously described.[202] For the analysis, patients were categorized according to relapse risk prediction (boys or girls; age below 1 year, 1-10 and above 10; WBC below or above 50×10^9 ; B or T cell type; standard, high or very high risk and DNA index above or below 1.16, corresponding to 50 chromosomes).[202] Children who relapsed or had a fatal outcome due to the disease were defined to have had an event.

Genotyping

DNA segments containing the polymorphic sites were amplified by PCR using 15ng of genomic DNA, $0.5\mu\text{M}$ of each primer, $100\mu\text{M}$ dNTPs, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 2mM MgCl_2 , (except for GR1220 where 1.5mM MgCl_2 was used instead) 50mM KCl, and 1U of Taq polymerase (Platinum, InVitroGene) in a total volume of $50\mu\text{l}$ for 40 cycles composed of 30s at 94°C , 30s at 60°C (for CYP3A4 -290 and GR 1220 sites) or at 58°C (for GR 200 site) and 45s at 72°C . The sequence of forward and reverse primer pairs used for amplification of the regions encompassing the CYP3A4

-290, GR 200 and GR 1220 polymorphisms were: ctgtaggtgtggcttgttg and aagggtctctccaccttg, ttaggattgatattcactgatg and caaaagtcttcgctgcttg, and ttcattgtgtgagtacctctgg and gaccaggaagttcagagtcc, respectively. PCR conditions, as well as primers sequences for the GR C IVS2+646 G (Bcl I) polymorphism, were as described in Fleury et al.[208]

The resulting PCR products were dot-blotted in duplicate on a nylon membrane and assayed for the presence or absence of a given variant by allele specific oligonucleotide (ASO) hybridization, as described in Labuda et al.[197] ASO probes specific for the CYP3A4 A -290 (caagggaAgagaga), CYP3A4 G -290 (caagggaGgagaga) GR G200 (ggagaGgggagatgt), GR A200 (ggagaAgggagatgt), GR A1220 (cggttccgaaaAttg) and GR G1220 (cggttccgaaaGttg) alleles were designed. Hybridizations with ASO-specific labeled probes were carried out at 45° C in an excess (10-20 fold) of the non-labeled ASO probe corresponding to the other variant allele of the same polymorphism.[208, 212] ASO probe hybridization conditions for the GR C646G polymorphism were as previously described.[208]

Statistics

Chi-squared tests were used to examine the differences in the frequency of CYP3A4 and GR genotypes across categories of different prognostic factors (sex, age, WBC count, cell type, treatment protocol, risk group and DNA index) as well as between groups who received different type and dose of CS drugs during the investigation window. CYP3A4 or GR genotypes are tested as dichotomous variables in EFS, DFS and OS analysis. The genotypes are grouped together either because of their low frequency or due to the frequency difference observed between the event and non-event groups. Homozygous and heterozygous individuals for the minor allele are combined and compared to major allele homozygotes for the CYP3A4 polymorphism, as well as for GR 200 and 1220 polymorphic sites. For the Bcl I polymorphism, GG individuals (homozygous for the larger allele) are compared to those without this genotype group. Survival differences obtained by Kaplan-Meier for patients with different genotypes were determined using a log-rank test. The hazard ratio (HR with a 95% confidence interval, CI) of the analyzed variants was estimated by Cox regression analysis, with and without the enclosure of the prognostic factors

listed above, using the forced entry of all variables in the model. In EFS analysis, survival time corresponded to the time between diagnosis and event (n=36), whereas for the censored cases it corresponded to time between diagnosis and the end of follow-up (5 years post treatment), last visit to the hospital, or February 2002 (for patients receiving therapy or those who have entered the follow-up period). In the event group, the survival time ranged from 1 to 84 months with a median of 20.5 months, and in the non-event group, it ranged from 2 to 84 months with a median of 62 months. In DFS analysis (n=31), survival time corresponded to the time between diagnosis and relapse (range 1-84 and median of 24 months), while in OS analysis (n=19), it corresponded to the time between diagnosis and fatal outcome (range 1-84 and median of 20 months). All analyses were carried out using the SPSS statistical package (Version 10.0). Linkage disequilibrium between three GR loci sites was tested with the EH software.[35]

Results

Linkage disequilibrium observed between GR sites suggested that haplotypes bearing any combination of minor alleles (i.e. 200A, 1220G and Bcl I G) were unlikely. Remaining haplotypes are essentially the same, as if each individual GR gene variant were regarded separately. Accordingly, results of the GR gene analysis are presented for each polymorphic site. The frequency of genotypes for both CYP3A4 and GR genes in patients with and without an event is given in Table I. No significant difference in distribution of CYP3A4, GR220 or GR1220 genotypes was observed between event and non-event group of ALL patients (Table I). In contrast, homozygous Bcl I GG individuals were significantly over-represented among patients with an event (22 % vs. 10% in non-event group). Likewise, EFS analysis revealed the reduction of survival probabilities (p=0.05, Fig.1a) and an association with increased risk of event when compared to individuals with other genotype groups (HR=2.2, 95% CI=1.0-4.7, p=0.05). The risk estimate associated with the GG genotype remained significant in multivariate analysis when the other prognostic factors (see Materials and Methods) were included in the model (HR=3.5, 95% CI=1.4-8.7, p=0.008), and did not change if correction for multiple testing is

considered ($p < 0.01$). We further explored the correlation of the GG646 genotype with DFS and OS (Fig.1 b and c), which pointed to an absence of association with DFS ($p = 0.2$, univariate HR = 1.8, 95 % CI = 0.8-4.5), whereas, in contrast, the association with OS was highly significant ($p = 0.008$, univariate HR = 3.4, 95% CI = 1.3-9.0 and $p = 0.003$, multivariate HR = 6.0, 95 % CI = 1.8-19.9). No correlation was observed between the C646G polymorphism and prognostic factors, different CS doses given within the investigation window, or type of CS drug used. In regard to the latter, the results stayed the same as in the whole group of patients, if the patients who underwent treatment with the DFCI 91-01 treatment protocol, which included dexamethasone instead of prednisone for maintenance and 3-days CS monotherapy (see study population), were excluded from the analysis. In such case univariate HR was 3.0 (95% CI = 1.2-7.7, $p = 0.02$) and multivariate HR was 3.7 (95% CI = 1.2-12.1, $p = 0.03$). No other variants showed any correlation with either EFS, DFS or OS probabilities in this group of ALL patients.

Table I. The frequency of CYP3A4 and glucocorticoid receptor gene polymorphisms in ALL children with and without event

Genotypes	Event N (%)	Non-event N (%)	Log- rank test ^a	HR (95% CI); p ^a	HR' (95%CI);p ^a
CYP3A4-290	AA	35 (94,6)	168 (93,9)	1,0	1,0
	AG	2 (5,4)	10 (5,6)		
	GG	0 (0)	1 (0,6)	0,7	0,7 (0,2-3,1);0,7
GR 220	GG	38 (100,0)	177 (94,1)	1,0	1,0
	GA	0 (0)	11 (5,9)		
	AA	0(0)	0(0)	0,2	0,05 (0-34,3);0,4
GR1220	AA	36 (94,7)	182 (97,3)	1,0	1,0
	AG	2 (5,3)	5 (2,7)		
	GG	0(0)	0(0)	0,6	1,5 (0,3-6,0);0,6
GR IVS2 +646	CC	13 (36,1)	70 (39,5)		
	CG	15 (41,7)	89 (50,3)	1,0	1,0
	GG	8 (22,2)	18 (10,2)	0,05	2,2 (1,0-4,7);0,05

^a Log-rank test reflect the difference between EFS estimated obtain by Kaplan Meier.

Hazard ratio estimates from univariate (HR) and multivariate (HR') Cox regression

analysis. n.d. not done due to the small number of observation. Grouping of genotypes is defined by bold vertical lines: For the CYP3A4 polymorphism, as well as those of GR gene on the positions 200 and 1220, homozygous and heterozygous individuals for the minor allele are combined and compared to major allele homozygotes. For the IVS 2 polymorphism at the position + 646 (or Bcl I) GG individuals are compared to those without this genotype (see methods) HR, hazard ratio, CI, confidence interval

Discussion

The response of leukemic cells to CS is highly predictive of outcome in childhood ALL. At relapse, loss of *in vitro* sensitivity is common and much higher than when compared to the loss of sensitivity to other agents[86] and strongly correlates to the reduced EFS probability in childhood ALL patients.[59, 213] Consequently, the percentage of children that are resistant to CS drugs rises from 20% at diagnosis to 70% during relapse.[11] In general, clinical observations reveal a considerable fluctuation among subjects in their sensitivity regarding the efficacy of the treatment, as well as in prevalence and severity of side effects.[9, 125] It is possible that functional polymorphisms in genes, whose protein product interferes with GR response, underlie these differences by modifying CS metabolism, as in the case of CYP3A4, or by modifying the access of CS to target cells, as in the case of GR. CYP3A4 catalyzes 6-hydroxylation of a number of steroids including dexamethasone and prednisone.[171-173, 180] In addition, expression of the CYP3A4 gene is markedly induced by glucocorticoids[176] that may influence the transformation of other CYP3A4 substrates.[175] In our study, we failed to detect any role of the CYP3A4 A-290G polymorphism with childhood ALL outcome, confirming the results of a recent study by Aplenc et al.,[214] who found that neither the CYP3A4 A-290G nor the CYP3A5 polymorphism were associated with the risk of relapse in childhood ALL patients. The frequency, of 3.2%, of the minor allele of the CYP3A4 polymorphism in our group of patients was comparable to several studies reporting the frequency of this CYP3A4 allele in Caucasians, ranging from 3.8% to 5.3%.[182, 190, 215]

Acting through the HPA axis, altered expression of the GR gene could alter levels of plasma and urinary cortisol, depending on whether GR function is impaired or enhanced, thus affecting the factors controlling blood pressure of other aspects of intermediary metabolism[80] explaining the association of these factors with GR polymorphisms. In spite of the absence of functional significance *in vitro* for GR G200A and A1220G polymorphisms,[164] important association was found between the GR G1220 variant, obesity and cardiovascular disease,[160, 162, 209, 216] whereas A200 allele correlated to the resistance to the feedback regulation of the HPA axis, as manifested with a favorable metabolic profile.[116, 125] Similarly, numerous studies found the association of Bcl I polymorphisms with indicators of metabolic health profile, and particularly with obesity, indicating a clear correlation of this polymorphism with the disturbances in HPA axis regulation.[77, 154, 156, 157, 159] Our analysis of GR polymorphisms, that were otherwise found at the same frequency as reported by others for Europeans,[15, 116, 154] showed no significant difference in the survival probabilities between ALL patients with and without the G1220 or A200 variants, whereas Bcl I GG individuals were associated with EFS, and particularly OS probabilities.

Although association of Bcl I polymorphism with altered GR function is quite obvious,[77, 154, 156, 157, 159] it remains unclear what is the exact effect of this polymorphism on CS sensitivity. Recent study by van Rossum et al.,[217] showed that the G carriers are associated with hypersensitivity to CS as demonstrated by dexamethasone suppression test (DST). Similar conclusion was drawn from *in vivo* vascular response to CS.[159] On the other hand, previous report failed to find significant reduction in cortisol levels following DST.[154] On the other hand, responsiveness to CS *in vitro*, as estimated by white blood cell lysosime release, showed that GG individuals tend to have lower sensitivity for inhibitory effects of dexamethasone suggesting that the association of steroid sensitivity with Bcl I polymorphism might be a tissue specific.[159] In the light of the latter study[159] lower CS sensitivity could be expected to explain the association between Bcl I polymorphism and ALL outcome. It would be mainly due to the cases with worse disease progression, since a positive correlation was found with OS, but not with DFS

probabilities. On the other hand, if higher CS sensitivity for GG individuals were assumed, as documented by van Rossum et al.,[217] toxicity to CS medication in ALL individuals with this genotype would rather underlie observed association. In that regard it is worth noting that lower OS (but not DFS) probabilities of acute myeloid leukemia were observed for patients who have glutathione S-transferase theta (GSTT1) null genotype and thus presumably higher sensitivity to chemotherapy due to the lower GSTT1 detoxification capabilities.[218, 219]

Recently it was found that polymorphisms at the GR locus could cooperate in their action. The carriers of both the G1220 variant and the Bcl I allele had a more unfavorable cardiovascular profile than the carriers of either of these variants alone.[220] No combined effect of these two variants was observed here (data not shown).

Here we documented the association of the Bcl I polymorphism with ALL outcome. However, further and larger studies are required to replicate this finding and to understand the exact impact of this polymorphism on CS sensitivity, as indicated, for example, by *in vitro* cell sensitivity or blast response. In regard to the latter, particularly bad prognosis manifested in EFS reduction was observed in children with poor prednisone response, as estimated by high peripheral blast count following monotherapy with prednisone.[52, 59] Similarly, a good correlation was found between *in vitro* cell viability and reduction in blast counts following 3-day CS treatment as a part of DFCI 91-01 protocol, as shown in collaborative study by Schwartz et al.[87] The number of patients who underwent such treatment at St-Justine Hospital, and for whom all data were available, were too low (n=47) to allow any conclusive results. And finally, further studies are also needed to explain the reasons why there is an association of this intronic polymorphism with altered GR function.

References

1. Bray PJ and Cotton RG. Variations of the human glucocorticoid receptor gene (NR3C1): pathological and in vitro mutations and polymorphisms. *Hum Mutat* 2003; 21: 557-68
2. Iida S, Nakamura Y, Fujii H, et al. A patient with hypocortisolism and Cushing's syndrome-like manifestations: cortisol hyperreactive syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 729-37
3. Lamberts SW, Koper JW, Biemond P, et al. Cortisol receptor resistance: the variability of its clinical presentation and response to treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 313-21
4. Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Curr Opin Oncol*. 2000; 12: 3-12
5. Krynetski EY and Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: molecular mechanisms and clinical importance. *Pharmacology* 2000; 61: 136-46.
6. Krajinovic M, Labuda D and Sinnett D. Pharmacogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr Pharmacogenetics* 2003; 1: 87-100
7. Gaynon PS and Carrel AL. Glucocorticosteroid therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Adv Exp Med Biol* 1999; 457: 593-605
8. Kofler R. The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells. *Histochem Cell Biol* 2000; 114: 1-7
9. Siebe H, Baude G, Lichtenstein I, et al. Metabolism of dexamethasone: sites and activity in mammalian tissues. *Ren Physiol Biochem* 1993; 16: 79-88
10. Chabner BA, Allegra CA, Curt GA, et al. Antineoplastic agents. In: Hardman JG, Gilman AG and Limbird LE, (Hardman JG, Gilman AG and Limbird LE(Hardman JG, Gilman AG and Limbird LEs). *Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 1996:
11. Felner EI, Thompson MT, Ratliff AF, et al. Time course of recovery of adrenal function in children treated for leukemia. *J Pediatr* 2000; 137: 21-4
12. Hurwitz CA, Silverman LB, Schorin MA, et al. Substituting dexamethasone for prednisone complicates remission induction in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2000; 88: 1964-9

13. Schimmer BP and Parker KL. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs. In: Hardman JG, Limbird LE and Gilman AG, (Hardman JG, Limbird LE and Gilman AG(Hardman JG, Limbird LE and Gilman AGs). The pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill, 1996: 1649-1678
14. Waber DP, Carpentieri SC, Klar N, et al. Cognitive sequelae in children treated for acute lymphoblastic leukemia with dexamethasone or prednisone. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000; 22: 206-13
15. Mattano LA, Jr., Sather HN, Trigg ME, et al. Osteonecrosis as a complication of treating acute lymphoblastic leukemia in children: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3262-72
16. Greenstein S, Ghias K, Krett NL, et al. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1681-94
17. Arai K and Chrousos GP. Hormone-nuclear receptor interactions in health and disease. Glucocorticoid resistance. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1994; 8: 317-31.
18. Panarelli M and Fraser R. The glucocorticoid receptor and hypertension. *Endocr Res* 1994; 20: 101-16.
19. de Lange P, Segeren CM, Koper JW, et al. Expression in hematological malignancies of a glucocorticoid receptor splice variant that augments glucocorticoid receptor-mediated effects in transfected cells. *Cancer Res* 2001; 61: 3937-41
20. Krett NL, Pillay S, Moalli PA, et al. A variant glucocorticoid receptor messenger RNA is expressed in multiple myeloma patients. *Cancer Res* 1995; 55: 2727-9
21. Longui CA, Vottero A, Adamson PC, et al. Low glucocorticoid receptor alpha/beta ratio in T-cell lymphoblastic leukemia. *Horm Metab Res* 2000; 32: 401-6
22. Fleury I, Beaulieu P, Primeau M, et al. Characterization of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene. *Clin Chem* 2003; 49: 1528-31
23. Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, et al. A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary- adrenal axis. *Obes Res* 2000; 8: 211-8.

24. Panarelli M, Holloway CD, Fraser R, et al. Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction, and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1846-52.
25. Ukkola O, Perusse L, Chagnon YC, et al. Interactions among the glucocorticoid receptor, lipoprotein lipase and adrenergic receptor genes and abdominal fat in the Quebec Family Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25: 1332-9.
26. Buemann B, Vohl MC, Chagnon M, et al. Abdominal visceral fat is associated with a BclI restriction fragment length polymorphism at the glucocorticoid receptor gene locus. *Obes Res* 1997; 5: 186-92.
27. Weaver JU, Hitman GA and Kopelman PG. An association between a BclI restriction fragment length polymorphism of the glucocorticoid receptor locus and hyperinsulinaemia in obese women. *J Mol Endocrinol* 1992; 9: 295-300.
28. Koper JW, Stolk RP, de Lange P, et al. Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. *Hum Genet* 1997; 99: 663-8
29. van Rossum EF, Koper JW, Huizenga NA, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes* 2002; 51: 3128-34
30. DeRijk RH, Schaaf M and de Kloet ER. Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 81: 103-22.
31. Huizenga NA, Koper JW, De Lange P, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 144-51
32. Abel SM, Maggs JL, Back DJ, et al. Cortisol metabolism by human liver in vitro-- I. Metabolite identification and inter-individual variability. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 43: 713-9
33. Tomlinson ES, Lewis DF, Maggs JL, et al. In vitro metabolism of dexamethasone (DEX) in human liver and kidney: the involvement of CYP3A4 and CYP17 (17,20 LYASE) and molecular modelling studies. *Biochem Pharmacol* 1997; 54: 605-11

34. Garg V and Jusko WJ. Simultaneous analysis of prednisone, prednisolone and their major hydroxylated metabolites in urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1991; 567: 39-47
35. Gentile DM, Tomlinson ES, Maggs JL, et al. Dexamethasone metabolism by human liver in vitro. Metabolite identification and inhibition of 6-hydroxylation. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277: 105-12
36. Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, et al. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1225-9
37. Amirimani B, Walker AH, Weber BL, et al. RESPONSE: re: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1588-90
38. Felix CA, Walker AH, Lange BJ, et al. Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 13176-81
39. Krajcinovic M, Costea I and Chiasson S. Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2002; 359: 1033-1034
40. Laverdiere C, Chiasson S, Costea I, et al. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 100: 3832-3834
41. Labuda D, Krajcinovic M, Richer C, et al. Rapid detection of CYP1A1, CYP2D6, and NAT variants by multiplex polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide assay. *Anal Biochem* 1999; 275: 84-92
42. Bourgeois S and Labuda D. Dynamic allele-specific oligonucleotide hybridization on solid support (DASO). *Anal Biochem* 2004; 324: 309-311
43. Krajcinovic M, Labuda D and Sinnett D. Glutathione S-transferase P1 genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 655-8
44. Hongo T, Yamada S, Yajima S, et al. Biological characteristics and prognostic value of in vitro three-drug resistance to prednisolone, L-asparaginase, and vincristine in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol* 1999; 70: 268-77

45. Kaspers GJ, Veerman AJ, Pieters R, et al. In vitro cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997; 90: 2723-9
46. Bailey S, Hall AG, Pearson AD, et al. Glucocorticoid resistance and the AP-1 transcription factor in leukaemia. *Adv Exp Med Biol* 1999; 457: 615-9
47. Huizenga NA, Koper JW, de Lange P, et al. Interperson variability but intraperson stability of baseline plasma cortisol concentrations, and its relation to feedback sensitivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to a low dose of dexamethasone in elderly individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 47-54
48. Lamberts SW, Huizenga AT, de Lange P, et al. Clinical aspects of glucocorticoid sensitivity. *Steroids* 1996; 61: 157-60
49. Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, et al. The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1619: 243-53
50. El-Sankary W, Plant NJ, Gibson GG, et al. Regulation of the CYP3A4 gene by hydrocortisone and xenobiotics: role of the glucocorticoid and pregnane X receptors. *Drug Metab Dispos* 2000; 28: 493-6
51. Aplenc R, Glatfelter W, Han P, et al. CYP3A genotypes and treatment response in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 122: 240-4
52. van Schaik RH, de Wildt SN, van Iperen NM, et al. CYP3A4-V polymorphism detection by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis and its allelic frequency among 199 Dutch Caucasians. *Clin Chem* 2000; 46: 1834-6
53. Westlind A, Lofberg L, Tindberg N, et al. Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259: 201-5
54. Sata F, Sapone A, Elizondo G, et al. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 67: 48-56
55. de Lange P, Koper JW, Huizenga NA, et al. Differential hormone-dependent transcriptional activation and -repression by naturally occurring human glucocorticoid receptor variants. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 1156-64

56. Lin RC, Wang WY and Morris BJ. High penetrance, overweight, and glucocorticoid receptor variant: case-control study. *Bmj* 1999; 319: 1337-8
57. Lin RC, Wang XL and Morris BJ. Association of coronary artery disease with glucocorticoid receptor N363S variant. *Hypertension* 2003; 41: 404-7
58. Dobson MG, Redfern CP, Unwin N, et al. The N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor: potential contribution to central obesity in men and lack of association with other risk factors for coronary heart disease and diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2270-4
59. van Rossum EF, Koper JW, van den Beld AW, et al. Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; 59: 585-92
60. Davies SM, Robison LL, Buckley JD, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and outcome of chemotherapy in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1279-87
61. Naoe T, Tagawa Y, Kiyoi H, et al. Prognostic significance of the null genotype of glutathione S-transferase-T1 in patients with acute myeloid leukemia: increased early death after chemotherapy. *Leukemia* 2002; 16: 203-8
62. Di Blasio AM, van Rossum EF, Maestrini S, et al. The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; 59: 68-74
63. Griffin TC, Shuster JJ, Buchanan GR, et al. Slow disappearance of peripheral blood blasts is an adverse prognostic factor in childhood T cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia* 2000; 14: 792-5
64. Schwartz CL, Thompson EB, Gelber RD, et al. Improved response with higher corticosteroid dose in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1040-6

2) The characterization of Bcl I polymorphism in the glucocorticoid receptor gene

Running head: Bcl I polymorphism and *GR* gene

Isabelle Fleury¹, Patrick Beaulieu¹, Melanie Primeau¹, Damian Labuda^{1,2} Daniel Sinnett^{1,2}, Maja Krajinovic^{1,2}

¹Service d'Hématologie-Oncologie, Centre de Recherche, Hôpital Sainte-Justine;

²Département de Pédiatrie, Université de Montréal, Canada

Correspondence to:

Maja Krajinovic, Centre de recherche, Hôpital Sainte-Justine

3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec), H3T 1C5, Canada

Tel: (514) 345-4931 ext. 6259 (sec. 3282); Fax: (514) 345-4731;

[REDACTED]

Supported by the Cancer Research Society, Inc. and the Centre de Recherche, Hôpital Ste-Justine. I.F. has a studentship and M.K. and D.S. scholarships of the Fonds de la recherche en santé du Québec.

Abstract

Glucocorticoids modulate a large number of physiological functions, while their anti-proliferative effect explains the wide therapeutic use of synthetically derived compounds. The action of glucocorticoids is dependent on a glucocorticoid receptor, whose alteration can result in the impairment of a variety of biological processes or can lead to adverse drug reactions. Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene, associated with altered GR function, might therefore underlie disease susceptibility or variable therapeutic response. One such polymorphism, Bcl I, has been used in several studies of disease susceptibility, though an underlying nucleotide

substitution has not yet been described. Using bioinformatic tools, we found the putative Bcl I polymorphic site and designed flanking PCR primers. Digestion of the PCR products with Bcl I confirmed the presence of a polymorphism, and direct sequencing led to the identification of a G to C substitution, 646bp downstream from the exon2/intron2 junction. We developed two genotyping assays, PCR-RFLP and PCR allele-specific-oligonucleotide (ASO) hybridization, and used them to estimate the frequency of the Bcl I polymorphism in worldwide populations.

Key Words: glucocorticoid receptor, Bcl I, polymorphism, characterization, genotyping assay

Abbreviations: GCs, glucocorticoids; GR, glucocorticoid receptor

Glucocorticoids (GCs) are steroid hormones that are secreted by the adrenal gland and have a variety of effects ranging from immune responses, metabolism, cell growth and proliferation to development and reproduction [206]. GCs have a significant anti-proliferative effect, which has led to the use of their synthetic homologues for immunosuppression, treatment of inflammation and induction of cytotoxicity [4, 206]. GCs exert their effect by binding to an intracellular glucocorticoid receptor (GR), forming a complex which translocates to the nucleus, where GCs then regulate the expression of target genes interacting with promoter glucocorticoid responsive elements [206]. The different GR forms, resulting from GR gene variability, can affect the regulation of many biological functions, such as hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis regulation and GC responsiveness, thereby underlying susceptibility to many diseases. Indeed, GR mutations have been associated with altered cardiovascular function, metabolic disturbances, and hematological malignancies [80, 109, 127]. Likewise, functional GR variability might affect the therapeutic response to corticosteroid drugs [127]. Identification of different GR gene variants may thus be helpful, either in assessing the role of GR genes in disease susceptibility, or in adjudging predisposition to corticosteroid-associated adverse drug reactions.

Several polymorphisms of the GR gene, which might have an impact on GC sensitivity, have been reported [128, 154, 209]. Among these, the Bcl I polymorphism

was identified by Southern blotting using human GR-cDNA specific probes [14] identifying two alleles with fragment lengths of 4.5kb and 2.3kb. Several clinical investigations have subsequently suggested that this GR polymorphism is linked to altered GR function [77, 154-159]. An association between Bcl I polymorphism and changes in tissue-specific corticosteroid sensitivity, as well as with poor feedback regulation of the HPA axis, has been reported [154, 159]. This was further documented by association of the Bcl I polymorphism with abdominal obesity [77, 156], insulin resistance [154, 157] and development of an atherogenic profile [154, 158]. In accordance with this is the finding that the larger allele of Bcl I is more frequent in a group of individuals genetically predisposed to develop hypertension [155]. The molecular identity of this polymorphism, however, is still unclear, and its analysis has been based on the laborious and time consuming Southern blot approach, which requires high quantities of DNA and is difficult to apply for large-scale genotyping [77, 154-159].

Here we present the characterization of the Bcl I polymorphism, as well as the application of two simple genotyping assays for its detection: PCR-RFLP and allele specific oligonucleotide (ASO) hybridization. Using these approaches, we assessed the frequency of this polymorphism in populations of different origin.

It has previously been suggested that the Bcl I site was situated in either the first or second intron of the GR gene [154]. To search for Bcl I sites in these gene segments we used the genomic sequence derived from human chromosome 5 contig (GenBank accession number NT_029289), on which the exon/intron boundaries were positioned according to the GR mRNA sequence information (GenBank accession number NM_000176.1) and BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). The genomic sequence corresponding to the first two introns was analyzed for Bcl I restriction sites using WebCutter 2.0 software (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>). We found three Bcl I sites, one in intron 1 and two in intron 2, whose relative position to the exon2/intron2 boundary is indicated in Figure 1a. Only the polymorphic Bcl I site in intron 2, 647bp from exon/intron junction, resulted in the fragment sizes corresponding to those obtained

by Southern blot experiments (i.e. a fragment of 2.2kb generated with the presence, and 3.9kb with the absence of the Bcl-I site; Fig.1a). Although the size of the larger allele would be slightly different than previously reported [14], no other Bcl I site produced a fragment of similar size. Using this information, we designed primers flanking Bcl I site at position +647: forward, 5'-AAATTGAAGCTTAACAATTTTGGC-3' and reverse, 5'-GCAGTGAACAGTGTACCAGACC-3', and amplified genomic DNA samples from the Institutional DNA bank of healthy volunteers, recruited for the study of human genomic sequences variability (the study was approved by Institutional Ethical Committee and informed consent was obtained from all participating individuals). The PCR product of 206bp was amplified in 20 μ l containing 20ng of genomic DNA, 0.5 μ M of each amplifier, 100 μ M dNTPs, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, and 0.5U of Taq polymerase (Platinum, InVitrogen) using the following conditions: initial denaturation at 94°C for 5 min, 40 cycles of denaturation at 94°C for 30s, annealing at 59°C for 30s and extension at 72°C for 45s, followed by a final extension at 72°C for 7 min. To confirm the presence of the Bcl I polymorphism the PCR products (10 μ l) were digested with 4U of Bcl I (New England BioLabs) for 6 h at 50°C, and the resulting digested fragments separated on a 3% agarose gel. The digestion of the PCR product gave the following predicted fragment sizes: 90 and 116bp in the case of homozygotes for the smaller allele, additional band of 206bp for heterozygous individuals, and only a band of 206bp for larger allele homozygotes (Fig. 1b). To characterize the underlying base substitution of the Bcl I polymorphism, the PCR product was directly sequenced using the Thermo SequenaseTM Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit following manufacturer (USB Corporation) instructions. We found a G to C transition in the second intron, 646 bp from the exon2/intron2 junction (Fig. 1c), that abolished the Bcl I restriction site (TGATCA to TCATCA), resulting thus in the larger allele. Similar efforts to replace Southern blot analysis by PCR-based methods in analysis of different polymorphisms have been reported in the literature [199, 200].

The identification of the underlying base substitution allowed us to apply a PCR-ASO genotyping assay that, in addition to PCR-RFLP, has been widely used to analyze gene mutations and variations in a number of genes [201]. We previously reported the successful use of this approach for large-scale genotyping [197]. For this method, PCR products were denatured in 0.33M NaOH and 16.5mM EDTA in a total volume of 200 μ l and subsequently transferred, in duplicate, to a HYBOND-N+ membrane (Amersham Pharmacia Biotech) and UV cross-linked to the membrane. Blots were pre-hybridized for 30 min at 37°C in a 10ml solution containing 1xSSPE (150mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄, 1.1mM EDTA, pH 7.4), 0.75M NaCl, 70mM Tris/HCl (pH 7.4), 1% SDS and 200 μ g/ml heparin. ASO-probes (50 pmols) were 5'-labeled using γ -[³²P]-ATP (6,000 Ci/mmol) and T4 kinase (Life Technologies Inc) to a specific activity of 1-3 x 10⁶ cpm/pmol. Hybridization with the 5 pmol of ASO specific probe was carried out for 30 min at 42°C in an excess (10X) of the non-labelled probe for the other variant allele of the same polymorphism. The membranes were then washed with 2xSSPE containing 0.1% SDS for 10 min at room temperature, and exposed overnight at -80°C with intensifying screens. Identical twin membranes were hybridized with the allelic probes specific for the G (gag att Gat cag cag) or C (gag att Cat cag cag) variant of the Bcl I polymorphism and read in parallel. DNA samples of known genotypes served as controls. Representative examples of genotypes obtained by the ASO approach are presented in Figure 1d.

Using these two genotyping assays, we analyzed DNA samples of individuals from a number of populations, including Africans, Asians (both South-East and East Asia), Amerindians, Middle-Easterners, and Europeans. Both methods generated concordant results, thus validating the usefulness of both assays. The number of individuals with different genotypes, as well as the frequency of allele C in the tested populations, is given in Table 1; the highest frequency of allele C was observed in Asians (32.8 \pm 8.7%) and the lowest in Amerindians (15.2 \pm 6.2%). The frequency observed here for Europeans is similar to the one reported for the larger allele in Sweden [154].

We conclude that the characterization of the Bcl I polymorphism, together with the availability of PCR based genotyping approaches, will allow fast screening of this polymorphism in both disease susceptibility and therapeutic response variability. Further studies clarifying the reason for an association of this polymorphism with altered GR function will provide additional insight into the variability of GR locus and the role of Bcl I polymorphism.

Acknowledgement

We are grateful to Alan Lovell for critical reading of the manuscript.

References

1. Schimmer BP, Parker KL. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. *The pharmacological basis of therapeutics*. 10th edition ed. New York: McGraw-Hill, 1996:1649-1678.
2. Greenstein S, Ghias K, Krett NL, Rosen ST. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin Cancer Res* 2002;8:1681-94.
3. Arai K, Chrousos GP. Hormone-nuclear receptor interactions in health and disease. Glucocorticoid resistance. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1994;8:317-31.
4. Panarelli M, Fraser R. The glucocorticoid receptor and hypertension. *Endocr Res* 1994;20:101-16.
5. DeRijk RH, Schaaf M, de Kloet ER. Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;81:103-22.
6. Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, Chagnon M, Perusse L, Lindell K, et al. A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary- adrenal axis. *Obes Res* 2000;8:211-8.
7. Huizenga NA, Koper JW, De Lange P, Pols HA, Stolk RP, Burger H, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:144-51.

8. Schaaf MJ, Cidlowski JA. AUUUA motifs in the 3'UTR of human glucocorticoid receptor alpha and beta mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression. *Steroids* 2002;67:627-36.
9. Murray JC, Smith RF, Ardinger HA, Weinberger C. RFLP for the glucocorticoid receptor (GRL) located at 5q11-5q13. *Nucleic Acids Res* 1987;15:6765.
10. Panarelli M, Holloway CD, Fraser R, Connell JM, Ingram MC, Anderson NH, et al. Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction, and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1846-52.
11. Ukkola O, Perusse L, Chagnon YC, Despres JP, Bouchard C. Interactions among the glucocorticoid receptor, lipoprotein lipase and adrenergic receptor genes and abdominal fat in the Quebec Family Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:1332-9.
12. Buemann B, Vohl MC, Chagnon M, Chagnon YC, Gagnon J, Perusse L, et al. Abdominal visceral fat is associated with a BclI restriction fragment length polymorphism at the glucocorticoid receptor gene locus. *Obes Res* 1997;5:186-92.
13. Weaver JU, Hitman GA, Kopelman PG. An association between a BclI restriction fragment length polymorphism of the glucocorticoid receptor locus and hyperinsulinaemia in obese women. *J Mol Endocrinol* 1992;9:295-300.
14. Ukkola O, Rosmond R, Tremblay A, Bouchard C. Glucocorticoid receptor Bcl I variant is associated with an increased atherogenic profile in response to long-term overfeeding. *Atherosclerosis* 2001;157:221-4.
15. Watt GC, Harrap SB, Foy CJ, Holton DW, Edwards HV, Davidson HR, et al. Abnormalities of glucocorticoid metabolism and the renin-angiotensin system: a four-corners approach to the identification of genetic determinants of blood pressure. *J Hypertens* 1992;10:473-82.
16. Grenett HE, Khan N, Jiang W, Booyse FM. Identification of the Hind III polymorphic site in the PAI-1 gene: analysis of the PAI-1 Hind III polymorphism by PCR. *Genet Test* 2000;4:65-8.

17. Metes D, Gambotto AA, Nellis J, Ruscin A, Stewart-Akers AM, Morel PA, et al. Identification of the CD32/FcγRIIc-Q13/STP13 polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion assay. *J Immunol Methods* 2001;258:85-95.
18. Gold B. Origin and utility of the reverse dot-blot. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:143-52.
19. Labuda D, Krajinovic M, Richer C, Skoll A, Sinnott H, Yotova V, et al. Rapid detection of CYP1A1, CYP2D6, and NAT variants by multiplex polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide assay. *Anal Biochem* 1999;275:84-92.

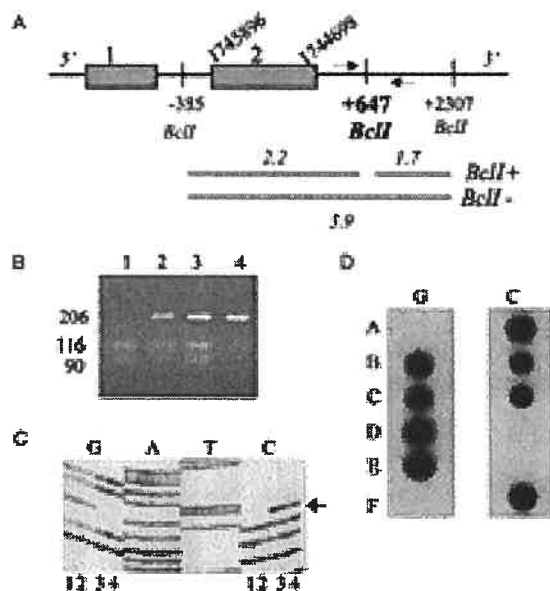


Figure legends

Fig.1 Molecular characterization and genotyping of the Bcl I polymorphism in the *GR* gene. (a) *Schematic representation of the Bcl I polymorphic locus.* The predicted positions of Bcl I sites in the first and second introns are given relative to exon 2, whose boundaries positions on the chromosome 5 contig (GenBank accession number NT_029289) is also indicated. The predicted polymorphic Bcl I site is marked in the bold character. Exons 1 and 2 are represented as boxes. The arrows indicate the positions of the PCR amplimers. The expected restriction fragment lengths, obtained using Southern blot, are shown below. (b) *PCR-RFLP of the Bcl I polymorphism.* The pattern of PCR product digestion in lane 1 indicates a homozygous individual for the smaller allele, lanes 2 and 3 contain heterozygous subjects, and lane 4 a homozygote for the larger allele. (c) *Nature of the underlying DNA variant.* Four individuals were sequenced: two homozygotes for the smaller allele (lanes 1 and 2) and two homozygotes for the larger allele (lanes 3 and 4). The G to C substitution in intron 2 at position +646 is indicated by the arrow. (d) *PCR-ASO hybridization assay of Bcl I polymorphism.* PCR products containing the Bcl I polymorphic site were dot-blotted in duplicate. Membranes were hybridized with ASO for the G (left panel) or C (right panel) variant. Hybridization signals in rows D and E indicate homozygous GG individuals, in rows B and C heterozygotes, whereas those in rows A and F indicate individuals with the CC genotype.

Table 1. The allele and genotype frequency of Bcl I polymorphism in the GR gene among different populations

Population	African	<i>C.I Amer- r- indi an</i>	European	Asian	Middle East
N of individuals	42	33	38	29	36
Genotype N (%)					
GG	27 (64.3)	23 (69.7)	18 (47.4)	12 (41.4)	24 (66.7)
GC	13 (31.0)	10 (30.3)	18 (47.4)	15 (51.7)	12 (33.3)
CC	2 (4.8)	0 (0.0)	2 (5.3)	2 (6.9)	0 (0)
Allele C (% ± SD*)	20.2±6.2	15.2±6.2	28.9 ±7.4	32.8±8.7	16.7±6.2

Genotyping was performed using both PCR-RFLP and PCR-ASO assays. *SD, standard deviation.

D DISCUSSION

Les GCs constituent un pilier du traitement de la LLA chez l'enfant. Ils contribuent, avec d'autres agents chimiothérapeutiques, à un taux de survie à cinq ans supérieur à 80%[2, 3, 38, 39].

L'utilisation des GCs est toutefois suboptimale pour certains individus. Elle est associée à une tolérance parfois limitée[26, 74, 83, 221, 222] et à une variabilité inter-individuelle au niveau de la sensibilité[9, 106-108, 124, 125]. Cette variabilité inter-individuelle se traduit par une fluctuation inter-individuelle significative quant à l'efficacité du traitement, à la prévalence et à la sévérité des effets secondaires[9, 125]. Par ailleurs, lors de rechutes, la perte de sensibilité *in vitro* est fréquente et plus élevée par rapport aux autres agents thérapeutiques, souvent reliée à une réduction du nombre et de la fonction du RG[44, 52, 59, 86]. La proportion d'enfants est d'ailleurs plus élevée parmi les enfants ayant eu une rechute[42].

Les modalités de la réponse individuelle aux GCs consistent alors en une avenue de recherche intéressante; d'autant plus que les modifications de posologie appliquées uniformément à tous les sujets, tel qu'étudié dans les recherches cliniques classiques, semblent ne pas convenir à l'amélioration du pronostic d'une portion minoritaire, mais significative, de patients. La pharmacogénétique s'avère donc un outil supplémentaire et indispensable à l'amélioration du rendement du traitement. En effet, il serait des plus judicieux qu'au moment du traitement, le patient reçoive une posologie individualisée qui serait définie par son profil de polymorphismes fonctionnels.

D.1 Récepteur des glucocorticoïdes (RG)

Le RG permet la translocation nucléaire et l'activité des GCs, médiée par la liaison du complexe RG-GCs sur l'ADN au site GRE[8]. Les mécanismes régulant son activité incluent : la forme β qui inhibe la forme α active et l'ajustement de sa concentration intracellulaire selon la durée de son occupation et la concentration active intracellulaire de GCs[10, 151, 152]. L'effet de polymorphismes fonctionnels du RG sur la réponse aux GCs est bien documentée[4, 106, 127]. Puisque le RG intervient au niveau de l'axe HHS, des dysfonctions cardio-vasculaires sont, entre autres, attribuées à des polymorphismes du RG[116, 159, 161, 162, 168]. L'impact de ces polymorphismes sur la résistance aux GCs a été relativement toutefois peu étudiée.

Un des obstacles à l'étude de la résistance aux GCs provient de la discordance entre les phénomènes in vivo et in vitro. En effet, bien qu'une association in vivo soit démontrée à plusieurs niveaux entre les polymorphismes G200A et A1220G du RG et des manifestations cliniques témoignant d'une modification de l'axe HHS, la démonstration de cet effet in vitro semble moins évidente pour les polymorphismes RG G200A et RG A1220G [164]. Ceci pourrait s'expliquer par la complexité des mécanismes de régulation de l'activité du RG qu'il est difficile de reproduire in vitro, en l'absence de protéines critiques dans certaines lignées cellulaires[161]. Parmi celles-ci, mentionnons celles reliées aux voies impliquant le GRE, AP-1 et NF- κ B[161]. Cependant, toute modification de sensibilité aux GCs in vitro demeure un indice pronostic majeur[86, 110].

D.1.1 Polymorphisme G646C dans le RG

La caractérisation du polymorphisme Bcl I du RG a mené à l'identification de la substitution d'une cytosine pour une guanine en position 646 de l'intron 2 par rapport à la jonction avec l'exon 2. Cette substitution entraîne la perte du site de

reconnaissance de l'enzyme. Cette identification a été rendue possible par l'élaboration d'une technique de génotypage à grande échelle par l'approche PCR-hybridation allèle-spécifique[197]. La fiabilité des résultats obtenus par cette technique a été démontrée par la confrontation des résultats obtenus avec ceux obtenus par digestion enzymatique.

Suite au génotypage d'individus de différentes origines soient l'Afrique, le Sud et l'Est de l'Asie, l'Amérique, le Moyen-Orient et l'Europe, nous avons constaté que la fréquence observée pour l'allèle 646G des Européens, soit 28,9%, est similaire à celle rapportée pour une population de Suédois, soit 36,8%, par Rosmond et al.[154]. La fréquence la plus élevée de l'allèle 646C est observée chez les Asiatiques, soit 32,8%, alors que celle la plus faible est représentée chez les Amérindiens, soit 15,2%. La fréquence de ce polymorphisme dans notre population d'enfants atteints de LLA est de 36,6%.

Les homozygotes GG étaient significativement plus présents dans le groupe ayant vécu un événement, soit 22%, par rapport au groupe qui n'en avait pas vécu, soit 10%. L'analyse de la survie sans événement démontre d'ailleurs une réduction significative de la survie, $p=0,05$, et une augmentation de la probabilité de survenue d'un événement lorsque comparé aux autres génotypes étudiés ($HR = 2,2$, $95\% IC=1,0-4,7$, $p=0,05$). L'association de l'allèle 646G, soit celui du long fragment, avec des manifestations cliniques d'une dérégulation de l'axe HHS est reconnue[154]. De plus, l'allèle 646G est associée à une hypersensibilité aux GCs, tel que démontré par un test de suppression à la dexaméthasone et par une vasoconstriction cutanée accrue lors d'exposition à la budésonide[159, 217]. Puisque l'axe HHS est régulée à partir de l'hypothalamus, où s'exerce une rétroaction négative par le RG, les hauts niveaux de cortisol chez les patients homozygotes pour l'allèle 646G suggèrent une inhibition insuffisante de l'hypothalamus causée par un RG altéré[154]. En supposant que ce récepteur porte également une réponse réduite à l'administration de GCs dans un contexte de LLA, on peut envisager un pronostic moindre chez les patients porteurs de l'allèle 646G. Notre étude suggère une absence d'association avec la survie sans

maladie ($p=0,2$, univariée $HR = 1,8$, $95\% IC=0,8-4,5$), alors que de façon opposée, nous observons une association significative avec la survie globale ($p=0,008$, univariée, $HR=3,4$, $95\% IC=1,3-9,0$ and $p=0.003$, multivariée $HR=6,0$, $95\% IC=1,8-19,9$). Il peut dès lors être supposé qu'une sensibilité réduite aux GCs puisse expliquer cette association entre le polymorphisme Bcl I et l'issue de la LLA, présumant le phénomène surtout relié aux cas de mauvaise progression de la maladie, puisque la corrélation positive est présente avec la survie globale, mais non la survie sans événement. On peut dès lors suggérer que selon la réponse aux GCs évaluée *in vitro* chez les patients porteurs de l'allèle 646G, une modification de la posologie en conséquence pourra être bénéfique[44]. Cependant, d'autres études de nos résultats seront nécessaires avant de traduire cette information par un ajustement de la posologie.

Le mécanisme par lequel ce polymorphisme modifie la réponse aux GCs demeure inconnu. Puisque ce polymorphisme se situe dans une région intronique, il pourrait indiquer la présence d'un polymorphisme fonctionnel à proximité. Certains gènes se situant par exemple dans la région du promoteur, pourraient être reliés par déséquilibre de liaison au polymorphisme Bcl I et ainsi être responsables du phénotype observé[161]. Il existe aussi la possibilité d'un défaut du processus normal d'épissage. Bien que les porteurs de ce polymorphisme et du variant 363Ser soient davantage enclins à développer un mauvais profil cardio-vasculaire, une telle synergie n'a pu atteindre une valeur significative dans notre étude.

D'autres études seront donc nécessaires afin de préciser la voie empruntée par ce polymorphisme pour contribuer à la résistance aux GCs.

D.1.2 Polymorphisme Arg23Lys du RG

Lorsque Koper et al. ont identifié la substitution Arg23Lys du RG, ils n'ont pu conclure à un polymorphisme fonctionnel[15], quoique ceci soit contesté par Van

Rossum et al., qui rapportent que les porteurs du variant 23Lys seraient moins sensibles aux effets cardio-vasculaires délétères des GCs[116]. Il serait possible que la différence observée puisse refléter un échantillonnage non superposable, tel que suggéré par une fréquence du variant 23Lys de 3,7% pour Koper et al., mais de 8,9% pour Van Rossum et al.. Toutefois, les sujets des deux études ont été recrutés à partir de la même étude déjà en cours, soit l'étude Rotterdam; la technique de génotypage étaient équivalente et les critères de sélection étaient similaires. Nous proposons dès lors que cette différence soit reliée : soit à la fréquence plus élevée nécessaire à l'observation d'un effet masqué par une pénétrance incomplète, soit à l'existence d'une variable confondante encore non identifiée qui justifie la différence entre les sujets inscrits aux études. Cette variable pourrait résider dans les habitudes de vie des sujets, qui pourraient favoriser ou non l'expression du phénotype.

La fréquence du polymorphisme observée chez les enfants atteints de LLA de notre cohorte atteint 2,4%, ce qui est similaire aux résultats déjà obtenus[161]. Bien que nos résultats ne permettent d'atteindre une différence significative au niveau de la survie sans événement selon le variant, ceci pourrait aussi être relié à une puissance inadéquate de l'étude[15]. Notons toutefois que les porteurs du variant 200A étaient absents du groupe ayant vécu un événement, alors qu'ils représentaient jusqu'à 6% des patients n'en ayant pas vécu. Une différence significative entre le groupe ayant ou non vécu un événement n'a pu être mise en évidence par l'analyse univariée (HR 0,05, 95% CI=0-34,3, p=0,4). L'analyse multivariée n'a pu être réalisée en présence d'un échantillon de taille insuffisant. Individuellement, ce polymorphisme ne peut donc être reconnu comme contribuant à la résistance aux GCs dans le groupe d'enfants atteints de LLA étudié.

D.1.3 Le polymorphisme Asn363Ser du RG

Dans certaines études le polymorphisme Asn363Ser du RG n'est pas associé à la résistance aux GCs[15, 114, 115, 163]. Cependant, Huizenga et al. rapporte une

hypersensibilité associée au variant 363Ser, qui a été plus tard appuyée[161]. En effet, ces derniers rapportent une réponse accrue chez les porteurs du variant 363Ser pour la suppression à la cortisone et la réponse d'insuline[161], probablement secondaire à l'apparition d'une sérine qui, une fois phosphorylée, permet une transactivation accrue des gènes cibles[160]. Plusieurs études observent un aspect fonctionnel pour ce polymorphisme. Elles rapportent également des associations à un mauvais profil lipidique et à l'obésité, deux facteurs de risque majeurs de maladie cardiaque athérosclérotique[162, 165, 166]; une association avec une élévation du ratio taille-hanche chez les hommes[160]; une association avec la surcharge pondérale chez des sujets atteints de diabète de type 2[167] et une plus grande susceptibilité à devenir davantage obèse[160, 167, 168].

Encore une fois, la fréquence du polymorphisme varie avec les études, celle d'Huizenga et al. représentant près du double, soit 6,0%, de celle de Koper et al. ou de Dobson et al., qui est de 3,0%. Nous observons une fréquence de 1,6% chez une population d'enfants atteints de LLA. La différence d'effet observé pourrait donc être expliquée par les mêmes mécanismes que ceux évoqués précédemment pour le polymorphisme Arg23Lys.

Nos résultats suggèrent une tendance des individus porteurs du variant 363Ser à être davantage atteints par les événements, dont l'importance n'a su atteindre une valeur significative, tant au niveau de l'analyse univariée (HR 1,5, 95% CI=0,3-6,0, $p=0,6$), qu'au niveau de l'analyse multivariée (HR 1,1, 95% CI=0,3-5,0, $p=0,9$). Par conséquent, ce polymorphisme ne peut pas être utilisé afin de prévoir l'évolution de la LLA. Cependant, d'autres études, dont les paramètres et conditions de réalisation seront différentes, pourraient démontrer une relation, dont l'existence peut être masquée dans notre étude en présence d'une taille de population réduite. De façon analogue, Anderer et al. n'avaient initialement pas démontré de relation entre la réponse aux GCs et les polymorphisme de la GST, mais d'autres études ont plus tard permis de documenter une association avec le risque de rechute[63, 223].

D.2 CYP3A4

CYP3A4 est responsable du métabolisme de plus de 60% des médicaments, incluant la 6 β -hydroxylation de la dexaméthasone et de la prednisone[66, 73, 169, 170, 189]. Par ailleurs, les GCs induisent le CYP3A4 et ainsi le métabolisme des nombreux substrats de ce dernier[175, 176, 224].

D.2.1 Le polymorphisme A-290G du CYP3A4

Ce polymorphisme a été retrouvé avec une fréquence très variable au sein de différentes populations étudiées. Étant absent chez les Asiatiques, la fréquence de ce polymorphisme atteint 81% chez des Ghanéens[182, 183, 192]. Notre étude montre une fréquence de 3,2% dans une population d'enfants Canadiens-Français atteints de LLA, fréquence similaire aux 3,8% à 5,3% rapportés chez les Caucasiens[182, 190, 215], quoique inférieure aux 9% déjà rapportés chez des Caucasiens des États-Unis[16, 189]. Par ailleurs, cette fréquence n'est pas significativement différente de celle retrouvée chez une population de Canadien-Français contrôle, soit 2,5%.

Le variant -290A est associé à une incidence accrue de leucémie post-traitement, possiblement secondaire à une activité accrue du CYP3A4, qui augmenterait la formation de carcinogènes actifs[194]. Par ailleurs, le variant -290G est associé à des cancers de prostate de stade avancé lors du diagnostic[187, 193]. Notre étude ne permet pas d'apprécier une relation de ce polymorphisme avec la réponse thérapeutique chez des enfants atteints de LLA (analyse univarié : HR 0,7, 95% CI=0,2-3,1, p=0,7) et analyse multivariée (HR 1,3, 95% CI=0,3-5,7, p=0,8), tel que déjà rapporté par Aplenc et al.[214]. La contribution individuelle de ce polymorphisme est donc mineure, si présente, dans la réponse aux GCs chez des enfants atteints de LLA.

D.3 Analyse combinée des polymorphismes

Le protocole de traitement inclut une combinaison d'agents chimiothérapeutiques, chacun impliquant des voies distinctes, mais complémentaires. La définition du profil de réponse au traitement devrait donc faire intervenir une série de polymorphismes dans des gènes candidats pertinents afin de mieux représenter la complexité de cette réalité. Ceci a d'ailleurs déjà été rapporté par la présence d'une synergie entre le variant CYP1A1*2A et le variant homozygote pour la délétion GST M1 ou le variant N-acétyltransférase 2 associé à une acétylation « lente » quant au risque de développer la leucémie[37, 225]. D'autres associations, déjà discutées dans l'introduction, sont associées à un mauvais pronostic, dont l'association d'une triple répétition d'un tandem dans le promoteur de la thymidylate synthase et CCND1 et l'association encore de cette triple répétition avec l'haplotype T677A1298 du 5,10-méthylentétrahydrofolate réductase ou l'allèle A1958 de la méthylentétrahydrofolate déhydrogénase, deux gènes dont les produits sont impliqués dans le métabolisme du folate et modulent potentiellement l'action des chimiothérapie antifolate[65, 226]. Aucune association parmi les polymorphismes étudiés n'a atteint de valeur significative.

D.4 Réponse aux GCs

Des doses accrues de GCs améliorent la réponse thérapeutique au niveau des blastes médullaires, probablement en surmontant un mécanisme de résistance relié à un nombre réduit de RG en périphérie[87]. Ceci a été démontré chez des patients soumis au protocole DFCI 91-01, où les trois premiers jours de traitement incluent exclusivement des GCs à des posologies différentes. Une différence significative de la réponse thérapeutique, mesurée par la réduction de blastes médullaires, chez ceux ayant reçu une dose standard de GCs selon le protocole du DFCI 91-01, est notée

selon le niveau de sensibilité aux GCs évalué *in vitro* par le nombre de RG et la concentration de dexaméthasone requise à la réduction de 50% de la viabilité des cellules leucémique *in vitro*[87]. Cette différence disparaît cependant en augmentant la dose[87]. Nous observons une tendance similaire chez un groupe de 47 patients ayant reçu le même protocole, soit une meilleure réponse en augmentant la dose de GCs($p=0,03$). Cependant, les polymorphismes étudiés ne semblent pas associés à cette tendance, que ce soit au niveau du groupe ayant reçu la dose standard que pour l'ensemble des patients. La taille réduite de la population ne peut être éliminée comme cause contribuant à l'absence de relation observée. Il est également possible que la période de trois jours constitue une exposition insuffisante pour mettre en évidence l'influence des polymorphismes étudiés. Par ailleurs, l'étude de Schwartz et al. n'observaient pas de différence significative entre la survie et la réponse mesurée par la réduction du nombre de blastes médullaires[87]. Il est donc possible que les polymorphismes étudiés entraînent une modification du pronostic chez une minorité de patients non perceptible par l'étude du décompte blastique.

Les différentes protéines permettant l'action des GCs, que ce soit en amont ou en aval de la liaison du récepteur aux GCs, constituent des cibles potentiellement responsables de résistance. L'interaction des GCs avec les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 sont d'ailleurs d'une importance certaine dans leur action. L'étude du variant du gène NF- κ B portant l'insertion d'une adénine en position 2314, associé à une réduction de l'effet inhibiteur sur NF- κ B des GCs, pourrait justifier une réponse suboptimale chez des patients atteints de l'une des multiples pathologies inflammatoires où les GCs synthétiques constituent un traitement de choix[227]. Par exemple, une réponse inadéquate au traitement de GCs est une indication opératoire dans 50% des cas de maladie de Crohn et dans 20% des cas de colite ulcéreuse[228].

Un autre mécanisme de résistance a été proposé en lien avec AP-1. Il a été initialement supposé qu'une élévation des taux d'AP-1, dont l'action est antagoniste à celle des GCs au niveau inflammatoire, serait observée davantage chez les patients atteints de LLA résistants aux GCs que chez ceux sensibles. Toutefois, et ce,

paradoxalement, le niveau d'AP-1 chez les patients atteints de LLA et résistants aux GCs était supérieure à celui retrouvé chez les patients sensibles aux GCs[11]. De plus, une autre étude menée chez des patients atteints de LLA et leucémie lymphoïde chronique n'a pu mettre en évidence une association entre le taux d'AP-1 et la résistance aux GCs[229]. Puisque la base moléculaire de la résistance par une hausse des taux d'AP-1 semble plausible via l'inhibition de l'apoptose[230], malgré les résultats rapportés, la recherche de ce phénomène chez des patients atteints de LLA pourrait tout de même fournir la possibilité de caractériser un nouveau polymorphisme.

Des polymorphismes dans les gènes responsables du métabolisme des GCs, tels la 11 β -HSD, la 3 α -HSD et la 5 α - ou 5 β -réductase, pourraient aussi contribuer à la résistance aux GCs par une activité enzymatique accrue, réduisant ainsi la concentration sérique efficace. Des polymorphismes fonctionnels dans ces gènes n'ont toutefois pas encore été caractérisés.

D'autres variants du gène du RG pourraient aussi être étudiés. Parmi ceux-ci, les variants S651F et T504S, identifiés chez des patients atteints de dermatite atopique et dont la réponse thérapeutique aux GCs est respectivement réduite et accrue, pourraient se retrouver chez les patients atteints de LLA dont la réponse aux GCs est altérée[227]. Un polymorphisme de longueur de fragment de restriction, Tth111I, situé dans la région 5' du gène du RG est associé à une sécrétion basale élevée de cortisol qui pourrait être secondaire à une sensibilité altérée aux GCs modulée par le RG et pourrait justifier une modification de la réponse aux GCs chez des enfants de LLA[154].

L'étude de l'influence des variants V140M, D163G et A370T du gène du RPX pourrait également être intéressante. Puisque, suite à l'administration de GCs, le RPX induit l'expression du CYP3A4, des variations de son affinité pour les GCs ou le CYP3A4, telles que rapportées pour ces polymorphismes, pourraient modifier de façon significative l'expression du CYP3A4 et ensuite des produits métabolisés[181].

La résistance aux GCs constitue un obstacle majeur à l'amélioration du pronostic de la LLA. La résistance aux GCs est également observée chez près de 20% des cas de maladie de Crohn et 16% des cas de colite ulcéreuse, 5% des patients asthmatiques et certains patients atteints d'arthrite rhumatoïde[228, 231, 232]. Une résistance médiée par des polymorphismes responsables de la surexpression du gène de résistance aux multi-drogues, provoquant la sortie des GCs hors des cellules, est observée dans les cellules visées dans le traitement des maladies inflammatoires intestinales[228]. Il serait dès lors intéressant d'étudier l'application de ce mécanisme chez les enfants atteints de LLA et résistants à l'actions des GCs et d'en caractériser le polymorphisme fonctionnel sous-jacent. Par ailleurs, la combinaison d'une faible expression du récepteur fonctionnel GR- α et d'une expression normale à élevée de sa forme inhibitrice complémentaire, GR- β , est rapportée comme un autre mécanisme de sensibilité altérée aux GCs qu'il serait intéressant d'explorer[6].

E CONCLUSION

La LLA représente la néoplasie la plus fréquente chez l'enfant. Les GCs forment une des pierres angulaires du traitement de la LLA qui permet d'atteindre une survie à 5 ans supérieure à 80%. La réponse aux GCs constitue d'ailleurs le meilleur indicateur de l'issue du traitement. Cependant, les GCs sont associés à une résistance, à une variabilité inter-individuelle significative et à une toxicité qui limitent leur efficacité.

L'influence de polymorphismes dans des gènes du métabolisme des corticostéroïdes a été investiguée dans la présente étude afin de préciser les modalités de la réponse aux GCs dans un contexte de LLA chez l'enfant.

Les polymorphismes Arg23Lys et Asn363Ser du RG et A-290G du CYP3A4 ont été étudiés et aucune distribution significative parmi les groupe avec ou sans événement n'a pu être mis en évidence, ni aucune association à l'évolution de la LLA. Ce projet a permis l'identification et la localisation du polymorphisme de longueur de fragment de restriction Bcl I défini par la substitution d'une cytosine pour une guanine en position 646 de l'intron 2 par rapport à la jonction avec l'exon 2, entraînant la perte du site de reconnaissance de l'enzyme de restriction. Les individus homozygotes 646GG étaient significativement plus représentés dans la population d'enfants ayant subi un événement, quoique l'association avec un risque accru d'événement n'ait atteint un seuil statistique. L'influence de ce polymorphisme pourrait toutefois être évaluée d'abord à plus grande échelle, puis en clinique lors d'une étude prospective, où les patients seraient divisés en groupes dont le traitement serait adapté ou non au profil génétique. Il s'impose qu'une définition plus précise du profil génétique, obtenue par la caractérisation de polymorphismes fonctionnels supplémentaires, augmenterait l'efficacité d'une telle avenue de traitement.

Tel que mentionné précédemment, le polymorphisme Bcl I du gène du RG est situé dans une région intronique. Il serait dès lors intéressant, par des analyses de liaison, d'évaluer l'existence potentielle d'un polymorphisme fonctionnel pouvant

expliquer les manifestations cardio-vasculaires observées, ainsi que toutes les modifications de l'intégrité de l'axe HHS rapportées.

En définitive, la poursuite de l'étude des polymorphismes fonctionnels déterminant la réponse aux GCs permettra d'approfondir nos connaissances sur les bases moléculaires de l'action intracellulaire des GCs afin, éventuellement, d'en faire bénéficier la recherche clinique dans les multiples pathologies dont le traitement sollicite les GCs.

F RÉFÉRENCES

1. http://seer.cancer.gov/csr/1973_1998/child.pdf, (February 15th, 2002).
2. Conter, V., et al., Intensive BFM chemotherapy for childhood ALL: interim analysis of the AIEOP-ALL 91 study. *Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica. Haematologica*, 1998. **83**(9): p. 791-9.
3. Schorin, M.A., et al., Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Cancer Institute/Children's Hospital Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium Protocol 85-01. *J Clin Oncol*, 1994. **12**(4): p. 740-7.
4. Greenstein, S., et al., Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(6): p. 1681-94.
5. Schuler, D. and B. Szende, Apoptosis and acute lymphocytic leukemia in children. *Ann N Y Acad Sci*, 1997. **824**: p. 28-37.
6. Kofler, R., et al., Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoblastic leukemia. *J Endocrinol*, 2003. **178**(1): p. 19-27.
7. Guyton, A.C., Hall, J.E., *Textbook of Medical Physiology*. 10th ed, ed. W.B.S. Company. 2000, Philadelphie. 869-883.
8. Greenspan, F.S., Gardner, D.G., *Basic and Clinical Endocrinology*. 6th ed, ed. L.M. Books/McGraw-Hill. 2001, New York. 334-351.
9. Lamberts, S.W., et al., Clinical aspects of glucocorticoid sensitivity. *Steroids*, 1996. **61**(4): p. 157-60.
10. Bamberger, C.M., H.M. Schulte, and G.P. Chrousos, Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev*, 1996. **17**(3): p. 245-61.
11. Bailey, S., et al., Glucocorticoid resistance and the AP-1 transcription factor in leukaemia. *Adv Exp Med Biol*, 1999. **457**: p. 615-9.
12. Silverman, L.B., et al., Induction failure in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Cancer*, 1999. **85**(6): p. 1395-404.
13. Atrá, A., et al., Outcome of relapsed or refractory childhood B-cell acute lymphoblastic leukaemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma treated with the UKCCSG 9003/9002 protocols. *Br J Haematol*, 2001. **112**(4): p. 965-8.
14. Murray, J.C., et al., RFLP for the glucocorticoid receptor (GRL) located at 5q11-5q13. *Nucleic Acids Res*, 1987. **15**(16): p. 6765.
15. Koper, J.W., et al., Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. *Hum Genet*, 1997. **99**(5): p. 663-8.
16. Rebbeck, T.R., Jaffe, J.M., Walker, A.H., Wein, A.J., Malkowicz, S.B., Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst*, 1998. **90**(16): p. 1225-9.

17. Hoffman, R., Benz, E. J., Shattil, S. J., Furie, B., Cohen, H. J., Silberstein, L. E. and McGlave, P., HEMATOLOGY Basic Principles and Practice. 3rd ed, ed. C. Livingstone. 2000, New York. 1052-1062.
18. Goldman, L., Bennett, J.C., Cecil Textbook of Medicine. 21 ed, ed. W.B.S. company. 2000, Philadelphia. 838.
19. Hoffbrand, A.V., Pettit, J.E., Essential Haematology. 4th ed, ed. B.S. Ltd. 2001, Osney Mead. 162-179.
20. Pui, C.H., Childhood leukemias. N Engl J Med, 1995. **332**(24): p. 1618-30.
21. Cotran R.S., K., V and Collins T., Robbins Pathologic Basis of Disease. 6th ed. 1999, Philadelphia: W.B. Saunders Company. 650-658.
22. Pui, C.H. and W.E. Evans, Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med, 1998. **339**(9): p. 605-15.
23. http://seer.cancer.gov/csr/1973_1999/child.pdf.
24. Smith MA, R.L., Gurney JG, et al.: Leukemia. In: Ries LA, Smith MA, , et al.
25. Infante-Rivard, C. and D. Sinnett, Preconceptional paternal exposure to pesticides and increased risk of childhood leukaemia. Lancet, 1999. **354**(9192): p. 1819.
26. Pui, C.H., Acute lymphoblastic leukemia in children. Curr Opin Oncol, 2000. **12**(1): p. 3-12.
27. Infante-Rivard, C., et al., Risk of childhood leukemia associated with exposure to pesticides and with gene polymorphisms. Epidemiology, 1999. **10**(5): p. 481-7.
28. Schuz, J., et al., Residential magnetic fields as a risk factor for childhood acute leukaemia: results from a German population-based case-control study. Int J Cancer, 2001. **91**(5): p. 728-35.
29. Brain, J.D., et al., Childhood Leukemia: Electric and Magnetic Fields as Possible Risk Factors. Environ Health Perspect, 2003. **111**(7): p. 962-970.
30. Preece, A.W., et al., Power frequency electromagnetic fields and health. Where's the evidence? Phys Med Biol, 2000. **45**(9): p. R139-54.
31. Infante-Rivard, C., et al., Parental smoking, CYP1A1 genetic polymorphisms and childhood leukemia (Quebec, Canada). Cancer Causes Control, 2000. **11**(6): p. 547-53.
32. Infante-Rivard, C., I. Fortier, and E. Olson, Markers of infection, breast-feeding and childhood acute lymphoblastic leukaemia. Br J Cancer, 2000. **83**(11): p. 1559-64.
33. Infante-Rivard, C., et al., Childhood acute lymphoblastic leukemia associated with parental alcohol consumption and polymorphisms of carcinogen-metabolizing genes. Epidemiology, 2002. **13**(3): p. 277-81.

34. Infante-Rivard, C., G. Mathonnet, and D. Sinnett, Risk of childhood leukemia associated with diagnostic irradiation and polymorphisms in DNA repair genes. *Environ Health Perspect*, 2000. **108**(6): p. 495-8.
35. Krajcinovic, M., D. Labuda, and D. Sinnett, Glutathione S-transferase P1 genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics*, 2002. **12**(8): p. 655-8.
36. Krajcinovic, M., et al., Role of NQO1, MPO and CYP2E1 genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Cancer*, 2002. **97**(2): p. 230-6.
37. Krajcinovic, M., et al., Genetic polymorphisms of N-acetyltransferases 1 and 2 and gene-gene interaction in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000. **9**(6): p. 557-62.
38. Uckun, F.M., et al., Clinical significance of Philadelphia chromosome positive pediatric acute lymphoblastic leukemia in the context of contemporary intensive therapies: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer*, 1998. **83**(9): p. 2030-9.
39. Silverman, L.B., et al., Results of Dana-Farber Cancer Institute Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1981-1995). *Leukemia*, 2000. **14**(12): p. 2247-56.
40. Gaynon, P.S., et al., Survival after relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: impact of site and time to first relapse--the Children's Cancer Group Experience. *Cancer*, 1998. **82**(7): p. 1387-95.
41. LeClerc, J.M., et al., Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber ALL Consortium Protocol 87-01. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(1): p. 237-46.
42. Miniero, R., et al., Relapse after first cessation of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia: a 10-year follow-up study. *Italian Association of Pediatric Hematology-Oncology (AIEOP)*. *Med Pediatr Oncol*, 1995. **24**(2): p. 71-6.
43. Lawson, S.E., et al., The UK experience in treating relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia: a report on the medical research council UKALLR1 study. *Br J Haematol*, 2000. **108**(3): p. 531-43.
44. Dordelmann, M., et al., Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1999. **94**(4): p. 1209-17.
45. outlines, p.
46. Liang, D.C., et al., High incidence of TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia in Taiwan. *Leukemia*, 1996. **10**(6): p. 991-3.

47. Pui, C.H. and W.E. Evans, Genetic abnormalities and drug resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Adv Exp Med Biol*, 1999. **457**: p. 383-9.
48. Rubnitz, J.E., et al., Genetic studies of childhood acute lymphoblastic leukemia with emphasis on p16, MLL, and ETV6 gene abnormalities: results of St Jude Total Therapy Study XII. *Leukemia*, 1997. **11**(8): p. 1201-6.
49. Rubnitz, J.E., et al., Childhood acute lymphoblastic leukemia with the MLL-ENL fusion and t(11;19)(q23;p13.3) translocation. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(1): p. 191-6.
50. Rubnitz, J.E., et al., TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: a new genetic marker with prognostic significance. *J Clin Oncol*, 1997. **15**(3): p. 1150-7.
51. Felice, M.S., et al., Childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic value of initial peripheral blast count in good responders to prednisone. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2001. **23**(7): p. 411-5.
52. Griffin, T.C., et al., Slow disappearance of peripheral blood blasts is an adverse prognostic factor in childhood T cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia*, 2000. **14**(5): p. 792-5.
53. Pui, C.H., et al., Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11)(q21;q23): a collaborative study of 40 cases. *Blood*, 1991. **77**(3): p. 440-7.
54. Lenormand, B., et al., PreB1 (CD10-) acute lymphoblastic leukemia: immunophenotypic and genomic characteristics, clinical features and outcome in 38 adults and 26 children. The Groupe d'Etude Immunologique des Leucemies. *Leuk Lymphoma*, 1998. **28**(3-4): p. 329-42.
55. Frestedt JL, H.J., Kersey JH., AF4/FEL, a gene involved in infant leukemia: sequence variations, gene structure, and possible homology with a genomic sequence on 5q31. *DNA Cell Biol*, 1996. **15**(8): p. 669-78.
56. Pui, C.H., et al., Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. *Leukemia*, 2003. **17**(4): p. 700-6.
57. Watanabe, N., et al., Cryptic insertion and translocation or nondividing leukemic cells disclosed by FISH analysis in infant acute leukemia with discrepant molecular and cytogenetic findings. *Leukemia*, 2003. **17**(5): p. 876-82.
58. Lauten, M., et al., Clinical outcome of patients with childhood acute lymphoblastic leukaemia and an initial leukaemic blood blast count of less than 1000 per microliter. *Klin Padiatr*, 2001. **213**(4): p. 169-74.
59. Hongo, T., et al., Biological characteristics and prognostic value of in vitro three-drug resistance to prednisolone, L-asparaginase, and vincristine in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol*, 1999. **70**(4): p. 268-77.

60. Cave, H., et al., Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med*, 1998. **339**(9): p. 591-8.
61. Dolken, G., Detection of minimal residual disease. *Adv Cancer Res*, 2001. **82**: p. 133-85.
62. Roberts, W.M., et al., The clinical significance of residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia as detected by polymerase chain reaction amplification by antigen-receptor gene sequences. *Leuk Lymphoma*, 1996. **20**(3-4): p. 181-97.
63. Anderer, G., et al., Polymorphisms within glutathione S-transferase genes and initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics*, 2000. **10**(8): p. 715-26.
64. Krajinovic, M., D. Labuda, and D. Sinnett, Childhood acute lymphoblastic leukemia: genetic determinants of susceptibility and disease outcome. *Rev Environ Health*, 2001. **16**(4): p. 263-79.
65. Costea, I., A. Moghrabi, and M. Krajinovic, The influence of cyclin D1 (CCND1) 870A>G polymorphism and CCND1-thymidylate synthase (TS) gene-gene interaction on the outcome of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics*, 2003. **13**(9): p. 577-80.
66. Krajinovic, M., I. Costea, and S. Chiasson, Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 2002. **359**(9311): p. 1033-4.
67. Takanashi, M., et al., Impact of glutathione S-transferase gene deletion on early relapse in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 2003. **88**(11): p. 1238-44.
68. Krajinovic, M., et al., Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(3): p. 802-10.
69. Heyman, M., et al., Prognostic importance of p15INK4B and p16INK4 gene inactivation in childhood acute lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 1996. **14**(5): p. 1512-20.
70. Wilson, J.D., Foster, D.W., Kronenberg, H.M., Larsen, P.R., Williams Textbook of Endocrinology. 9th ed, ed. W.B.S. Company. 1998, Philadelphia. 526-533.
71. Middleton, E.J., Ellis, E.F., Yunginger, J.W., Reed, C.E., Adkinson, N.K.Jr., Busse, W.W., Allergy, Principles & Practice. 5 ed, ed. M.-Y. Book. 1998, Toronto. 640.
72. Larsen, P.R., Kronenberg, H.M., Melmed, S., Polonsky, K.S., Williams Textbook of Endocrinology. 10 ed, ed. Saunders. 2003, Philadelphia. 495.

73. Katzung, B.G.e.a., *Basic and Clinical Pharmacology*. 8th ed. 2001, Montreal: Lange Medical Books/McGraw-Hill. 51-63; 365-367.
74. Felner, E.I., et al., Time course of recovery of adrenal function in children treated for leukemia. *J Pediatr*, 2000. **137**(1): p. 21-4.
75. Siebe, H., et al., Metabolism of dexamethasone: sites and activity in mammalian tissues. *Ren Physiol Biochem*, 1993. **16**(1-2): p. 79-88.
76. Whorwood, C.B., et al., Regulation of glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms and type I 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in human skeletal muscle cells: a key role in the pathogenesis of insulin resistance? *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(5): p. 2296-308.
77. Ukkola, O., et al., Interactions among the glucocorticoid receptor, lipoprotein lipase and adrenergic receptor genes and abdominal fat in the Quebec Family Study. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2001. **25**(9): p. 1332-9.
78. Mattano, L.A., Jr., et al., Osteonecrosis as a complication of treating acute lymphoblastic leukemia in children: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol*, 2000. **18**(18): p. 3262-72.
79. Barr, R.D., S.A. Atkinson, and J.M. Halton, Bone mineral density in survivors of cancer in childhood. *J Pediatr Hematol Oncol*, 1999. **21**(3): p. 249-50.
80. Panarelli, M. and R. Fraser, The glucocorticoid receptor and hypertension. *Endocr Res*, 1994. **20**(2): p. 101-16.
81. Waber, D.P., et al., Cognitive sequelae in children treated for acute lymphoblastic leukemia with dexamethasone or prednisone. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2000. **22**(3): p. 206-13.
82. Belgaumi, A.F., et al., Dexamethasone-associated toxicity during induction chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia is augmented by concurrent use of daunomycin. *Cancer*, 2003. **97**(11): p. 2898-903.
83. Hurwitz, C.A., et al., Substituting dexamethasone for prednisone complicates remission induction in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 2000. **88**(8): p. 1964-9.
84. Strauss, A.J., et al., Bony morbidity in children treated for acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(12): p. 3066-72.
85. Silverman, L.B., et al., Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood*, 2001. **97**(5): p. 1211-8.
86. Gaynon, P.S. and A.L. Carrel, Glucocorticosteroid therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Adv Exp Med Biol*, 1999. **457**: p. 593-605.
87. Schwartz, C.L., et al., Improved response with higher corticosteroid dose in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(4): p. 1040-6.

88. Kofler, R., The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells. *Histochem Cell Biol*, 2000. **114**(1): p. 1-7.
89. Crochemore, C., et al., Enhancement of p53 activity and inhibition of neural cell proliferation by glucocorticoid receptor activation. *Faseb J*, 2002. **16**(8): p. 761-70.
90. Sengupta, S., et al., Negative cross-talk between p53 and the glucocorticoid receptor and its role in neuroblastoma cells. *Embo J*, 2000. **19**(22): p. 6051-64.
91. Denis, G., et al., p53, Bax and Bcl-2 in vivo expression in the murine thymus after apoptogenic treatments. *Anticancer Res*, 1998. **18**(5A): p. 3315-21.
92. Meng, R.D. and W.S. El-Deiry, p53-independent upregulation of KILLER/DR5 TRAIL receptor expression by glucocorticoids and interferon-gamma. *Exp Cell Res*, 2001. **262**(2): p. 154-69.
93. Schreiber, L., et al., Induction of apoptosis and p53 expression in immature thymocytes by direct interaction with thymic epithelial cells. *Scand J Immunol*, 1996. **44**(4): p. 314-22.
94. Chauhan, D., Hideshima, T., Rosen, S., Reed, J.C., Kharbanda, S., Anderson, K.C., Apaf-1/cytochrome c-independent and Smac-dependent induction of apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem*, 2001. **276**(27): p. 24453-24456.
95. McColl, K.S., et al., Apoptosis induction by the glucocorticoid hormone dexamethasone and the calcium-ATPase inhibitor thapsigargin involves Bcl-2 regulated caspase activation. *Mol Cell Endocrinol*, 1998. **139**(1-2): p. 229-38.
96. Chandra, J., et al., Protease activation is required for glucocorticoid-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemic lymphocytes. *Blood*, 1997. **90**(9): p. 3673-81.
97. Miyashita, T., et al., Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: processing of caspase-6 but not caspase-3. *Cell Death Differ*, 1998. **5**(12): p. 1034-41.
98. Smets, L.A., et al., Involvement of the glucocorticoid receptor in stress-induced apoptosis of leukemic cells. *Leukemia*, 1998. **12**(3): p. 406-13.
99. De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Vermeulen, L., Plaisance, S., Boone, E., Haegeman, G., Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(8): p. 3919-3924.
100. De Bosscher, K., et al., Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(25): p. 13504-9.

101. Gougat, C., et al., Overexpression of the human glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms inhibits AP-1 and NF-kappaB activities hormone independently. *J Mol Med*, 2002. **80**(5): p. 309-18.
102. Thulasi, R., Harbour, D.V., Thompson, E.B., Suppression of c-myc is a critical step in glucocorticoid-induced human leukemic cell lysis. *J Biol Chem*, 1993. **268**(24): p. 18306-18312.
103. Zhou, F., R.D. Medh, and E.B. Thompson, Glucocorticoid mediated transcriptional repression of c-myc in apoptotic human leukemic CEM cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2000. **73**(5): p. 195-202.
104. Baghdassarian, N., et al., Role of BCL-2 and cell cycle regulatory proteins for corticosteroid sensitivity assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 2000. **109**(1): p. 109-16.
105. King, K.L. and J.A. Cidlowski, Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 1998. **60**: p. 601-17.
106. Bray, P.J. and R.G. Cotton, Variations of the human glucocorticoid receptor gene (NR3C1): pathological and in vitro mutations and polymorphisms. *Hum Mutat*, 2003. **21**(6): p. 557-68.
107. Lamberts, S.W., et al., Cortisol receptor resistance: the variability of its clinical presentation and response to treatment. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992. **74**(2): p. 313-21.
108. Iida, S., et al., A patient with hypocortisolism and Cushing's syndrome-like manifestations: cortisol hyperreactive syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990. **70**(3): p. 729-37.
109. Arai, K. and G.P. Chrousos, Hormone-nuclear receptor interactions in health and disease. Glucocorticoid resistance. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 1994. **8**(2): p. 317-31.
110. Pieters, R., et al., Relation between age, immunophenotype and in vitro drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia--implications for treatment of infants. *Leukemia*, 1998. **12**(9): p. 1344-8.
111. Pui, C.H., et al., The relationship of blast cell glucocorticoid receptor levels to response to single-agent steroid trial and remission response in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, 1984. **8**(4): p. 579-85.
112. Malchoff, D.M., et al., A mutation of the glucocorticoid receptor in primary cortisol resistance. *J Clin Invest*, 1993. **91**(5): p. 1918-25.
113. Hurley, D.M., et al., Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *J Clin Invest*, 1991. **87**(2): p. 680-6.
114. Karl, M., et al., Familial glucocorticoid resistance caused by a splice site deletion in the human glucocorticoid receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. **76**(3): p. 683-9.

115. Antonini, S.R., et al., Glucocorticoid receptor gene polymorphisms in ACTH-secreting pituitary tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2002. **57**(5): p. 657-62.
116. van Rossum, E.F., et al., A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes*, 2002. **51**(10): p. 3128-34.
117. Huizenga, N.A., et al., Human adrenocorticotropin-secreting pituitary adenomas show frequent loss of heterozygosity at the glucocorticoid receptor gene locus. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(3): p. 917-21.
118. Smets, L.A. and J.D. van den Berg, Bcl-2 expression and glucocorticoid-induced apoptosis of leukemic and lymphoma cells. *Leuk Lymphoma*, 1996. **20**(3-4): p. 199-205.
119. Huang, S.T. and J.A. Cidlowski, Glucocorticoids inhibit serum depletion-induced apoptosis in T lymphocytes expressing Bcl-2. *Faseb J*, 1999. **13**(3): p. 467-76.
120. Hartmann, B.L., et al., Bcl-2 interferes with the execution phase, but not upstream events, in glucocorticoid-induced leukemia apoptosis. *Oncogene*, 1999. **18**(3): p. 713-9.
121. Chauhan, D., et al., SHP2 mediates the protective effect of interleukin-6 against dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *J Biol Chem*, 2000. **275**(36): p. 27845-50.
122. Hardin, J., et al., Interleukin-6 prevents dexamethasone-induced myeloma cell death. *Blood*, 1994. **84**(9): p. 3063-70.
123. Catts, V.S., et al., High level resistance to glucocorticoids, associated with a dysfunctional glucocorticoid receptor, in childhood acute lymphoblastic leukemia cells selected for methotrexate resistance. *Leukemia*, 2001. **15**(6): p. 929-35.
124. Knutsson, U., et al., Circadian cortisol rhythms in healthy boys and girls: relationship with age, growth, body composition, and pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. **82**(2): p. 536-40.
125. Huizenga, N.A., et al., Interperson variability but intraperson stability of baseline plasma cortisol concentrations, and its relation to feedback sensitivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to a low dose of dexamethasone in elderly individuals. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(1): p. 47-54.
126. Ebrecht, M., et al., Tissue specificity of glucocorticoid sensitivity in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(10): p. 3733-9.
127. DeRijk, R.H., M. Schaaf, and E.R. de Kloet, Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2002. **81**(2): p. 103-22.
128. Schaaf, M.J. and J.A. Cidlowski, AUUUA motifs in the 3'UTR of human glucocorticoid receptor alpha and beta mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression. *Steroids*, 2002. **67**(7): p. 627-36.

129. Krett, N.L., et al., A variant glucocorticoid receptor messenger RNA is expressed in multiple myeloma patients. *Cancer Res*, 1995. **55**(13): p. 2727-9.
130. Jiang, T., et al., The phase-shift mutation in the glucocorticoid receptor gene: potential etiologic significance of neuroendocrine mechanisms in lupus nephritis. *Clin Chim Acta*, 2001. **313**(1-2): p. 113-7.
131. Rosmond, R., C. Bouchard, and P. Bjorntorp, A C-1291G polymorphism in the alpha2A-adrenergic receptor gene (ADRA2A) promoter is associated with cortisol escape from dexamethasone and elevated glucose levels. *J Intern Med*, 2002. **251**(3): p. 252-7.
132. Rosmond, R., et al., G-308A polymorphism of the tumor necrosis factor alpha gene promoter and salivary cortisol secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(5): p. 2178-80.
133. Francke, U., Foellmer, B.E., The glucocorticoid receptor gene is in 5q31-q32 [corrected]. *Genomics*, 1989. **4**(4): p. 610-2.
134. Giuffra, L.A.K., J.L., Castiglione, C.M., Evans, R.M., Wasmuth, J.J., Kidd, K.K., Glucocorticoid receptor maps to the distal long arm of chromosome 5. *Cytogenet Cell Genet*, 1988. **49**: p. 313-314.
135. Hollenberg, S.M., et al., Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*, 1985. **318**(6047): p. 635-41.
136. Theriault, A., Boyd, E., Harrap, S.B., Hollenberg, S.M., Connor, J.M., Regional chromosomal assignment of the human glucocorticoid receptor gene to 5q31. *Hum Genet*, 1989. **83**: p. 289-291.
137. Encio, I.J. and S.D. Detera-Wadleigh, The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*, 1991. **266**(11): p. 7182-8.
138. Weinberger, C., et al., Human steroid receptors and erb-A gene products form a superfamily of enhancer-binding proteins. *Clin Physiol Biochem*, 1987. **5**(3-4): p. 179-89.
139. Oakley, R.H., Sar, M., Cidlowski, J.A., The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *J Biol Chem*, 1996. **271**(16): p. 9550-9559.
140. Rivers, C., et al., Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. **84**(11): p. 4283-6.
141. Moalli, P.A., et al., Alternatively spliced glucocorticoid receptor messenger RNAs in glucocorticoid-resistant human multiple myeloma cells. *Cancer Res*, 1993. **53**(17): p. 3877-9.
142. de Lange, P., et al., Expression in hematological malignancies of a glucocorticoid receptor splice variant that augments glucocorticoid receptor-mediated effects in transfected cells. *Cancer Res*, 2001. **61**(10): p. 3937-41.

143. Pujols, L., et al., Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **283**(4): p. C1324-31.
144. Pujols, L., et al., Expression of the human glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in human respiratory epithelial cells and their regulation by dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. **24**(1): p. 49-57.
145. Beavan, S., et al., Colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in human bone. *J Bone Miner Res*, 2001. **16**(8): p. 1496-504.
146. Korn, S.H., et al., Alpha and beta glucocorticoid receptor mRNA expression in skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 1998. **19**(7): p. 757-65.
147. Oakley, R.H., et al., Immunocytochemical analysis of the glucocorticoid receptor alpha isoform (GRalpha) using GRalpha-specific antibody. *Steroids*, 1999. **64**(10): p. 742-51.
148. Goodman, S.G.
149. Beato, M., et al., DNA regulatory elements for steroid hormones. *J Steroid Biochem*, 1989. **32**(5): p. 737-47.
150. Bloom, J.W., New insights into the molecular basis of glucocorticoid action. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 1999. **19**(4): p. 653-670.
151. de Castro, M., et al., The non-ligand binding beta-isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR beta): tissue levels, mechanism of action, and potential physiologic role. *Mol Med*, 1996. **2**(5): p. 597-607.
152. Burnstein, K.L., et al., Intragenic sequences of the human glucocorticoid receptor complementary DNA mediate hormone-inducible receptor messenger RNA down-regulation through multiple mechanisms. *Mol Endocrinol*, 1994. **8**(12): p. 1764-73.
153. Derijk, R.H., et al., A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 2001. **28**(11): p. 2383-8.
154. Rosmond, R., et al., A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Obes Res*, 2000. **8**(3): p. 211-8.
155. Watt, G.C., et al., Abnormalities of glucocorticoid metabolism and the renin-angiotensin system: a four-corners approach to the identification of genetic determinants of blood pressure. *J Hypertens*, 1992. **10**(5): p. 473-82.
156. Buemann, B., et al., Abdominal visceral fat is associated with a BclI restriction fragment length polymorphism at the glucocorticoid receptor gene locus. *Obes Res*, 1997. **5**(3): p. 186-92.
157. Weaver, J.U., G.A. Hitman, and P.G. Kopelman, An association between a BclI restriction fragment length polymorphism of the glucocorticoid receptor locus and hyperinsulinaemia in obese women. *J Mol Endocrinol*, 1992. **9**(3): p. 295-300.

158. Ukkola, O., et al., Glucocorticoid receptor Bcl I variant is associated with an increased atherogenic profile in response to long-term overfeeding. *Atherosclerosis*, 2001. **157**(1): p. 221-4.
159. Panarelli, M., et al., Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction, and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(6): p. 1846-52.
160. Dobson, M.G., et al., The N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor: potential contribution to central obesity in men and lack of association with other risk factors for coronary heart disease and diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(5): p. 2270-4.
161. Huizenga, N.A., Koper, J.W., De Lange, P., Pols, H.A., Stolk, R.P., Burger, H., Grobbee, D.E., Brinkmann, A.O., De Jong, F.H., Lamberts, S.W., A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with an increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(1): p. 144-151.
162. Lin, R.C., W.Y. Wang, and B.J. Morris, High penetrance, overweight, and glucocorticoid receptor variant: case-control study. *Bmj*, 1999. **319**(7221): p. 1337-8.
163. Echwald, S.M., et al., The Asn363Ser variant of the glucocorticoid receptor gene is not associated with obesity or weight gain in Danish men. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2001. **25**(10): p. 1563-5.
164. de Lange, P., et al., Differential hormone-dependent transcriptional activation and -repression by naturally occurring human glucocorticoid receptor variants. *Mol Endocrinol*, 1997. **11**(8): p. 1156-64.
165. Lin, R.C., Wang, W.L., Morris, B.J., Association of coronary artery disease with glucocorticoid receptor N363S variant. *Hypertension*, 2003. **41**(3): p. 404-7.
166. Lin, R.C., Wang, W.L., Dalziel, B., Caterson, I.D., Morris, B.J., Association of obesity, but non diabetes or hypertension, with glucocorticoid receptor N363S variant. *Obes Res*, 2003. **11**(6): p. 802-808.
167. Roussel, R., et al., The N363S polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is associated with overweight in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003. **59**(2): p. 237-241.
168. Di Blasio, A.M., van Rossum, E.F., Maestrini, S., Berselli, M.E., Tagliaferri, M., Podesta, F., Koper, J.W., Liuzzi, A., Lamberts, S.W., The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients. *Clin Endocrinol*, 2003. **59**(1): p. 68-74.
169. Shimada, T., et al., Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. **270**(1): p. 414-23.

170. Tomlinson, E.S., et al., Dexamethasone metabolism in vitro: species differences. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1997. **62**(4): p. 345-52.
171. Abel, S.M., et al., Cortisol metabolism by human liver in vitro--I. Metabolite identification and inter-individual variability. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1992. **43**(7): p. 713-9.
172. Tomlinson, E.S., et al., In vitro metabolism of dexamethasone (DEX) in human liver and kidney: the involvement of CYP3A4 and CYP17 (17,20 LYASE) and molecular modelling studies. *Biochem Pharmacol*, 1997. **54**(5): p. 605-11.
173. Garg, V. and W.J. Jusko, Simultaneous analysis of prednisone, prednisolone and their major hydroxylated metabolites in urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1991. **567**(1): p. 39-47.
174. Pascussi, J.M., et al., Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: consequences on cytochrome P450 gene regulation. *Mol Pharmacol*, 2000. **58**(6): p. 1441-50.
175. El-Sankary, W., et al., Regulation of the CYP3A4 gene by hydrocortisone and xenobiotics: role of the glucocorticoid and pregnane X receptors. *Drug Metab Dispos*, 2000. **28**(5): p. 493-6.
176. Pascussi, J.M., et al., The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1619**(3): p. 243-53.
177. El-Sankary, W., et al., Glucocorticoid-mediated induction of CYP3A4 is decreased by disruption of a protein: DNA interaction distinct from the pregnane X receptor response element. *Drug Metab Dispos*, 2002. **30**(9): p. 1029-34.
178. Lown, K.S., et al., Interpatient heterogeneity in expression of CYP3A4 and CYP3A5 in small bowel. Lack of prediction by the erythromycin breath test. *Drug Metab Dispos*, 1994. **22**(6): p. 947-55.
179. Lampen, A., et al., Metabolism of the immunosuppressant tacrolimus in the small intestine: cytochrome P450, drug interactions, and interindividual variability. *Drug Metab Dispos*, 1995. **23**(12): p. 1315-24.
180. Gentile, D.M., et al., Dexamethasone metabolism by human liver in vitro. Metabolite identification and inhibition of 6-hydroxylation. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996. **277**(1): p. 105-12.
181. Hustert, E., et al., Natural protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward CYP3A4. *Drug Metab Dispos*, 2001. **29**(11): p. 1454-9.
182. Sata, F., et al., CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clin Pharmacol Ther*, 2000. **67**(1): p. 48-56.

183. Zeigler-Johnson, C.M., et al., Ethnic Differences in the Frequency of Prostate Cancer Susceptibility Alleles at SRD5A2 and CYP3A4. *Hum Hered*, 2002. **54**(1): p. 13-21.
184. Ball, S.E., Scatina, J., Kao, J., Ferron, G.M., Fruncillo, R., Mayer, P., Weinryb, I., Guida, M., Hopkins, P.J., Warner, N., Hall, J., Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promotor region of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther*, 1999. **66**(3): p. 288-294.
185. Naoe, T., et al., Analysis of genetic polymorphism in NQO1, GST-M1, GST-T1, and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(10): p. 4091-5.
186. Zhu, B.T., Conney, A.H., Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis*, 1998. **19**(1): p. 1-27.
187. Spurdle, A.B., et al., The CYP3A4*1B polymorphism has no functional significance and is not associated with risk of breast or ovarian cancer. *Pharmacogenetics*, 2002. **12**(5): p. 355-66.
188. Lai, J., et al., CYP gene polymorphisms and early menarche. *Mol Genet Metab*, 2001. **74**(4): p. 449-57.
189. Amirimani, B., Walker, A.H., Weber, B.L., Rebbeck, T.R., RESPONSE: re: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst*, 1999. **91**(18): p. 1588-90.
190. Westlind, A., et al., Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **259**(1): p. 201-5.
191. Wandel, C., et al., CYP3A activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4*1B5'-promoter region polymorphism. *Clin Pharmacol Ther*, 2000. **68**(1): p. 82-91.
192. Ball, S.E., et al., Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther*, 1999. **66**(3): p. 288-94.
193. Garcia-Martin, E., et al., CYP3A4 variant alleles in white individuals with low CYP3A4 enzyme activity. *Clin Pharmacol Ther*, 2002. **71**(3): p. 196-204.
194. Felix, C.A., et al., Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(22): p. 13176-81.
195. Li, A.P., Kaminski, D.L., Rasmussen, A., Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. *Toxicology*, 1995. **104**: p. 1-8.
196. Blanco, J.G., et al., Genetic polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4 and NQO1 in children who developed therapy-related myeloid malignancies. *Pharmacogenetics*, 2002. **12**(8): p. 605-11.

197. Labuda, D., et al., Rapid detection of CYP1A1, CYP2D6, and NAT variants by multiplex polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide assay. *Anal Biochem*, 1999. **275**(1): p. 84-92.
198. Bourgeois, S. and D. Labuda, Dynamic allele-specific oligonucleotide hybridization on solid support. *Anal Biochem*, 2004. **324**(2): p. 309-11.
199. Grenett, H.E., et al., Identification of the Hind III polymorphic site in the PAI-1 gene: analysis of the PAI-1 Hind III polymorphism by PCR. *Genet Test*, 2000. **4**(1): p. 65-8.
200. Metes, D., et al., Identification of the CD32/FcgammaRIIc-Q13/STP13 polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion assay. *J Immunol Methods*, 2001. **258**(1-2): p. 85-95.
201. Gold, B., Origin and utility of the reverse dot-blot. *Expert Rev Mol Diagn*, 2003. **3**: p. 143-52.
202. Laverdiere, C., et al., Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2002. **100**(10): p. 3832-4.
203. Krynetski, E.Y. and W.E. Evans, Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: molecular mechanisms and clinical importance. *Pharmacology*, 2000. **61**(3): p. 136-46.
204. Krajcinovic, M., D. Labuda, and D. Sinnett, Pharmacogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr Pharmacogenetics*, 2003. **1**: p. 87-100.
205. Chabner, B.A., et al., Antineoplastic agents, in Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics, L.E. Limbird, Editor. 1996, McGraw-Hill: New York.
206. Schimmer, B.P. and K.L. Parker, Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs, in The pharmacological basis of therapeutics, A.G. Gilman, Editor. 1996, McGraw-Hill: New York. p. 1649-1678.
207. Longui, C.A., et al., Low glucocorticoid receptor alpha/beta ratio in T-cell lymphoblastic leukemia. *Horm Metab Res*, 2000. **32**(10): p. 401-6.
208. Fleury, I., et al., Characterization of the BclII polymorphism in the glucocorticoid receptor gene. *Clin Chem*, 2003. **49**(9): p. 1528-31.
209. Huizenga, N.A., et al., A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(1): p. 144-51.
210. Rebbeck, T.R., et al., Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst*, 1998. **90**(16): p. 1225-9.
211. Amirimani, B., et al., RESPONSE: re: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst*, 1999. **91**(18): p. 1588-90.

212. Bourgeois, S. and D. Labuda, Dynamic allele-specific oligonucleotide hybridization on solid support (DASO). *Anal Biochem*, 2004. **324**: p. 309-311.
213. Kaspers, G.J., et al., In vitro cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1997. **90**(7): p. 2723-9.
214. Aplenc, R., et al., CYP3A genotypes and treatment response in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 2003. **122**(2): p. 240-4.
215. van Schaik, R.H., et al., CYP3A4-V polymorphism detection by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis and its allelic frequency among 199 Dutch Caucasians. *Clin Chem*, 2000. **46**(11): p. 1834-6.
216. Lin, R.C., X.L. Wang, and B.J. Morris, Association of coronary artery disease with glucocorticoid receptor N363S variant. *Hypertension*, 2003. **41**(3): p. 404-7.
217. van Rossum, E.F., et al., Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003. **59**(5): p. 585-92.
218. Davies, S.M., et al., Glutathione S-transferase polymorphisms and outcome of chemotherapy in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(5): p. 1279-87.
219. Naoe, T., et al., Prognostic significance of the null genotype of glutathione S-transferase-T1 in patients with acute myeloid leukemia: increased early death after chemotherapy. *Leukemia*, 2002. **16**(2): p. 203-8.
220. Di Blasio, A.M., et al., The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003. **59**(1): p. 68-74.
221. Chabner BA, A.C., Curt GA, Calabrese P, Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 10th ed, ed. G.A. Hardman JG, Limbird LE, editors. 1996, New York: McGraw-Hill.
222. Schimmer, B.P., Parker, K.L., Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs. 10th ed. 1649-1678, ed. L.L. Hardman JG, Gilman AG, editors. 1996, New York: McGraw-Hill.
223. Stanulla, M., et al., Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Blood*, 2000. **95**(4): p. 1222-8.
224. van de Poll, M.E., et al., The effect of atovaquone on etoposide pharmacokinetics in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2001. **47**(6): p. 467-72.
225. Sinnett, D., M. Krajcinovic, and D. Labuda, Genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2000. **38**(5-6): p. 447-62.

226. Krajinovic, M., et al., Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*, 2004. **4**(1): p. 66-72.
227. Koyano, S., et al., Functional analysis of three genetic polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. **307**(1): p. 110-6.
228. Farrell, R.J. and D. Kelleher, Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *J Endocrinol*, 2003. **178**(3): p. 339-46.
229. Bailey, S., et al., The role of AP-1 in glucocorticoid resistance in leukaemia. *Leukemia*, 2001. **15**(3): p. 391-7.
230. Tissing, W.J., et al., Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2003. **17**(1): p. 17-25.
231. Adcock, I.M. and S.J. Lane, Corticosteroid-insensitive asthma: molecular mechanisms. *J Endocrinol*, 2003. **178**(3): p. 347-55.
232. Chikanza, I.C., Mechanisms of corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: a putative role for the corticosteroid receptor beta isoform. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **966**: p. 39-48.