

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

POLYMORPHISMES DES GÈNES IMPLIQUÉS DANS LE MÉTABOLISME ET LA VOIE D'ACTION DES GLUCOCORTICOÏDES CHEZ LES ENFANTS ATTEINTS DE LEUCÉMIE LYMPHOBLASTIQUE AIGUË

Par
Annabel Gahier

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)
En biologie moléculaire

Janvier 2006

©, Annabel Gahier, 2006



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.

UNIVERSITE DE MONTREAL
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
POLYMORPHISMES DES GÈNES IMPLIQUÉS DANS LE MÉTABOLISME ET LA
VOIE D'ACTION DES GLUCOCORTICOÏDES CHEZ LES ENFANTS ATTEINTS DE
LEUCÉMIE LYMPHOBLASTIQUE AIGUË

Présenté par :
Annabel Gahier

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Alain Moreau

.....
président-rapporteur

Dr Maja Krajinovic

.....
directrice de recherche

Dr Jean-François Gauchat

.....
membre du jury

Résumé

La leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) est le cancer pédiatrique le plus fréquent, avec 20% des enfants échappant aux traitements. Les glucocorticoïdes (GCs) sont utilisés dans le traitement de la LLA pour leur puissante action apoptotique sur les blastes et la réponse *in vitro* et *in vivo* aux GCs est un facteur pronostic d'évolution de la maladie. Pourtant, du fait de la variabilité interindividuelle, la réponse des enfants au traitement est inégale. Une variabilité de réponse aux GCs pourrait être due à l'existence de polymorphismes au sein des gènes impliqués dans le métabolisme et l'action des GCs. Dans le but d'une étude pharmacogénétique de la réponse aux GCs, nous avons désigné 2 gènes candidats afin d'en identifier les variants. Le 1^{er} gène est celui de la 11 bêta-hydroxystéroïde déhydrogénase de type 1 (11 β HSD1), enzyme qui active les GCs physiologiques comme la cortisone, ainsi que les GCs de synthèse comme la prednisone, en les réduisant respectivement en cortisol et prednisolone. Le 2nd gène est celui du récepteur aux GCs (GR), protéine essentielle à la liaison des GCs à l'ADN et à leur répression/transactivation des gènes cibles. Les 6 exons de l'enzyme ainsi que les 2kb en amont du site d'initiation de la transcription des 2 gènes ont été séquencés et les 10 variants identifiés (1 dans l'exon 6 et 1 dans l'intron 4 de l'enzyme, 4 dans chacune des régions promotrices des 2 gènes) ont été génotypés parmi 184 volontaires sains de diverses populations ethniques. Un SNP situé à 627 pb en amont du site d'initiation de la transcription du gène de GR (NR3C1 –627A/G) a été retrouvé avec une fréquence allélique de 19% dans la population de descendance européenne, et a été génotypé au sein de notre cohorte de patients LLA de l'hôpital Ste-Justine. Les analyses d'association ainsi que les analyses de survie retrouvent moins de risque de toxicité glucocortico-induite pour les patients possédant l'allèle majeur A et un risque significatif plus élevé de survenue de rechutes pour les individus homozygotes pour ce même allèle ($p=0.02$). Ce risque est significativement majoré pour les patients sous prednisone ($p=0.04$). De plus, les études de survie de ce SNP, en combinaisons haplotypiques avec un autre SNP du même gène (NR3C1 IVSB +646G/C) associé à une réduction de survie totale dans la LLA, retrouvent un risque significatif de moins bonne évolution de la LLA pour un des groupes d'haplotypes ($p=0.02$). L'impact fonctionnel du variant NR3C1 –627A/G reste à être établi par des études complémentaires (RT-PCR, MTT-Test). Les résultats de notre étude ont contribué à l'établissement des fréquences alléliques de ces variants au sein de populations ethniques différentes. Ils permettent de suggérer un rôle du SNP NR3C1 –627A/G sur l'expression des autres variants du GR, et donc sur la réponse aux GCs dans la LLA.

Mots-clés : Leucémie lymphoblastique aiguë (LLA), glucocorticoïdes, pharmacogénétique, polymorphismes, SNP, toxicité, event free survival (EFS).

Abstract

The acute lymphoblastic leukaemia (ALL) is the most important cancer of the childhood, with still 20% of treatment failure. Glucocorticoids (GCs) are powerful drugs used in ALL because of their strong apoptotic effects on blasts, and *in vivo* and *in vitro* GCs response is a prognostic factor of the disease outcome. However, because of the interindividual variability, children's response to treatments is not identical. GCs response variability could be explained by the presence of polymorphisms within the genes related to the GCs pathway. Using a pharmacogenetic approach to study the GCs response, we targeted 2 candidate genes and studied their variants. The 1st gene is coding for the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β HSD1), the enzyme which activates biological GCs like cortisone, as well as synthetic GCs like prednisone, in respectively cortisol and prednisolone. The 2nd gene is coding for the GC receptor (GR), a critical protein for the GCs DNA binding and targeted genes repression-transactivation. The 6 exons of the enzyme as well as the 2kb upstream from the transcription start site of both genes were sequenced and the 10 identified variants (1 in exon 6 and 1 in exon 4 of the enzyme, 4 in each promoter region of both genes) were genotyped within 184 healthy individuals of various ethnic populations. One SNP located at 627 bp upstream from the transcription start site of the GR gene (NR3C1 -627 A/G) presented an allele frequency of 19% in the European descent population and was further genotyped in our ALL patients cohort of Ste-Justine Hospital. Association studies as well as survival analysis find less GCs toxicity risk for the patients with the major allele A and a higher relapse risk for individuals homozygous for the same allele ($p=0.02$). This risk is significantly increased for those patients treated by prednisone ($p=0.04$). Moreover, survival analysis of the combination of this SNP with another SNP of the same gene (NR3C1 IVSB +646G/C), found associated with an overall survival reduction in ALL, recover a significant risk of worst ALL outcome for one of the haplotypes groups ($p=0.02$). Functional impact of the NR3C1 -627 A/G variant still remains to be established by further studies (RT-PCR, MTT-Test). Results of our study contributed to establish allele frequencies of those 10 variants within different ethnic populations. They suggest an impact of the SNP NR3C1 -627 A/G on the expression of other GR variants and therefore on the GCs response in the ALL.

Key Words: Acute lymphoblastic leukaemia (ALL), Glucocorticoids (GCs), pharmacogenetics, polymorphisms, SNP, toxicity, event free survival (EFS).

Table des Matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
REMERCIEMENTS	VIII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
PRÉAMBULE	XIII
I. INTRODUCTION	1
A. LA LEUCÉMIE LYMPHOBLASTIQUE AIGUË	1
1. Présentation clinique	1
2. Étiologies	2
3. Critères diagnostiques	2
4. Facteurs de risques pronostiques	4
5. Thérapeutiques	5
B. RÔLES DES GLUCOCORTICOÏDES (GCs)	7
1. Généralités	7
a. Actions des glucocorticoïdes	7
b. Toxicité des glucocorticoïdes	9
2. Rôles spécifiques dans la LLA	10
C. STRATÉGIE PHARMACOGÉNÉTIQUE	12
1. Approche par gènes candidats	12
2. Exemples appliqués à la médecine	12
3. Contributions pharmacogénétiques antérieures dans la LLA.	13
a. Méthotrexate et LLA.	13
b. La thiopurine-S-méthyl transférase (TPMT) et la LLA	15
c. Autres études pharmacogénétiques concernant la LLA.	16

<u>II. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS</u>	17
<u>III. GENES CANDIDATS</u>	19
A. HSD11B 1 : GÈNE DE L'ENZYME 11βHSD1	19
1. Famille des SDR (Short chain steroid Dehydrogenase/Reductase)	19
2. Structure et activité enzymatique	19
3. Implications pathologiques	20
B. NR3C1 : GÈNE DE RÉCEPTEUR AUX GCs (NUCLEAR RECEPTOR SUBFAMILY 3, GROUP C, MEMBER 1)	22
1. Introduction	22
2. Structure du gène NR3C1	22
3. Mode d'action du GR, facteurs de transcription et gènes cibles.	23
<u>IV. MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>	24
A. SPÉCIMENS BIOLOGIQUES	24
B. IDENTIFICATION DES POLYMORPHISMES ET GÉNOTYPAGE	24
1. Stratégie de recherche des SNPs	24
a. SNPs de la région codante du gène HSD11B1	24
b. SNPs de la région régulatrice des gènes HSD11B1 et NR3C1	25
2. Génotypage et fréquences alléliques	25
a. Hybridation allèle spécifique ASO (Allele Specific Oligonucleotide Hybridization)	25
b. Fréquences alléliques	26
C. PATIENTS ET PROTOCOLES	27
1. Critères d'éligibilité des protocoles DFCI	27
2. Critères d'inclusion de notre étude	27
3. Critères cliniques de toxicité imputables aux glucocorticoïdes.	28
D. ANALYSES STATISTIQUES	29
<u>V. RÉSULTATS</u>	33
A. HSD11B1	33
1. SNPs identifiés	33
2. Fréquences alléliques	34
B. NR3C1	35
1. SNPs étudiés et fréquences alléliques	35
2. Impact du génotype NR3C1 -627 A/G	35
a. Évolution de la LLA : Analyses de survie en fonction du génotype NR3C1 -627 A/G	35

b. Toxicité des glucocorticoïdes : Études d'association NR3C1 –627 A/G et critères cliniques de toxicité des GCs.	38
3. Impact des haplotypes NR3C1-627/BCLI	44
a. Répartition des haplotypes	44
b. Évolution de la LLA et haplotypes NR3C1-627/BCLI	46
c. Toxicité des GCs et haplotypes NR3C1-627/BCLI	48

VI. DISCUSSION **52**

A. VARIANTS DU GÈNE HSD11B1 ET RÉPONSE AUX GCs	52
B. VARIANTS DU GÈNE NR3C1 ET ACTIONS DES GLUCOCORTICOÏDES	54
1. Variants connus du gène NR3C1	54
a. <i>Variants d'épissage pré-transcriptionnel</i>	54
b. <i>Variants d'épissage alternatif</i>	55
c. <i>Variants traductionnels</i>	56
d. <i>Variants post-traductionnels</i>	57
e. <i>Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)</i>	57
2. Variant NR3C1 – 627 A/G et réponse des enfants LLA aux glucocorticoïdes	60
3. Combinaisons haplotypiques NR3C1 – 627 A/G +646G/C et évolution de la LLA.	62
C. PERSPECTIVES	64
1. Facteurs en amont du GR	64
a. <i>Biodisponibilité sanguine</i>	64
b. <i>Biodisponibilité tissulaire</i>	64
c. <i>Biodisponibilité cellulaire</i>	65
2. Facteurs en aval du GR	65
D. CONCLUSION	67

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES **69**

ANNEXES **78**

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier la Société de Recherche sur le Cancer (*the Research Cancer Society*) ainsi que le département de Biologie Moléculaire de l'Université de Montréal pour l'apport financier de ce projet.

Je remercie profondément ma directrice de recherche, le Dr Maja Krajinovic, pour sa confiance, sa patience, l'échange de ses connaissances et ses exigences motivantes, qui m'ont guidée et influencée tout au long de ma maîtrise.

Je remercie également le Dr Daniel Sinnett et le Dr Damian Labuda, autant pour le dynamisme des activités scientifiques (labmeetings, journal clubs, journées scientifiques et congrès) que pour les activités sociales très fédératrices (games de Hockey, célébrations d'anniversaires).

Je remercie évidemment mes amies Jasmine et Catherine, sœurs de maîtrises, sœurs québécoises, sœurs à vie.

Je remercie toute ma famille outre-atlantique et particulièrement ma mère et Naïm pour leur soutien virtuel intense, tout comme celui de ma mamy internet, mon p'tit Pivot personnel.

Je remercie affectueusement Marian pour sa tendre présence et ses blagues quotidiennes inégales, mais très réconfortantes.

Je remercie chaleureusement tous mes amis, et surtout Florence, Stéphanie et Sandra, pour leurs *modjos* qui m'alimentent un peu chaque jour, ainsi que Florin pour son ironie pétillante.

Je remercie sincèrement toutes les personnes du laboratoire, notamment Mélanie Primeau, mère avant l'heure avec nous tous, étudiants perdus devant des successions sans fin d'A,T,C,G... ainsi que toutes les personnes des laboratoires des Drs Sinnett et Labuda pour leur entière collaboration et leur grande sympathie.

Je remercie enfin Patrick Meyer pour la coordination entre l'organisation du service clinique et celle des laboratoires de recherche, ainsi que tous les enfants et leurs familles qui participent aux protocoles du DFCI, avec tout l'espoir que peut représenter cet investissement.

Liste des Tableaux

<i>Ordre</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
I	Critères morphologiques de la classification FAB.	3
II	Principales anomalies du caryotypes retrouvées dans la LLA [Armstrong and Look, 2005].	4
III	Molécules dont le métabolisme est influencé par les variants du CYP2D6 et du CYP2C19 [IUSM].	13
IV	Répartition des patients en fonction des facteurs de risque.	28
V	Facteurs pronostiques intervenant dans les régressions logistiques et de Cox.	30
VI	Protocoles du DFCI des patients LLA de notre cohorte [Dalle et al., 2005].	31
VII	Fréquences alléliques des variants du gène HSD11B1 génotypés.	34
VIII	Fréquences alléliques des variants du gène NR3C1 génotypés.	35
IX	Répartitions des évènements, rechutes et décès en fonction du génotype NR3C1 -627 A/G.	36
X	Association du génotype avec des rechutes pour les patients traités par prednisone	38
XI	Analyses d'association : génotype et diabète.	39
XII	Régression logistique : génotype et diabète.	39
XIII	Analyses d'association : génotype et obésité.	40
XIV	Analyses d'association : génotype et infections.	40
XV	Analyses d'association : génotype et a) infections bactériennes générales, b) infections bactériennes grades 3 et 4.	41
XVI	Analyses d'association : génotype et mucites.	41
XVII	Régression logistique : génotype et mucites.	42
XVIII	Analyses d'association : génotype et a) ostéonécrose, b) fracture.	43
XIX	Analyses d'association : génotype et troubles du comportement.	43
XX et XXI	Répartition des haplotypes et fréquence en fonction de la survenue d'événement.	44
XXII	Association des patients du groupe d'haplotypes 2 à la survenue d'un événement.	45
XXIII	Régression de Cox : Groupes d'haplotypes et réduction d'EFS.	46
XXIV	Diabète et haplotypes	47
XXV et XXVI	Association obésité-haplotypes et conservation après régression logistique.	47
XXVII, XXVIII	Infections et haplotypes	48

et XIX XXX	Mucites et haplotypes	49
XXXI et XXXII	Complications osseuses et haplotypes	49
XXXIII	Troubles du comportement et haplotypes	50

Liste des Figures

<i>Ordre</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
1	Immunophénotypes des lymphocytes en fonction du type et de la maturation. [Bene, 2005].	3
2	Possibles voies de transactivation (TA) ou transrépression (TR) des GCs induisant la mort cellulaire par apoptose [Kofler, 2000].	9
3	Voies d'action du méthotrexate [Herrlinger et al., 2005].	14
4	Gènes candidats du métabolisme des glucocorticoïdes.	18
5	Métabolisme des GCs physiologiques et de synthèse par les enzymes 11 β HSD1 et 11 β HSD2.	21
6	Répartition des patients en fonction des protocoles du DFCI de 1987 à 2000.	27
7	a) Association significative de l'allèle G avec une réduction d'EFS chez les enfants LLA. b) Absence d'association significative de l'allèle G avec l'OS des enfants LLA. c) Conservation de l'association du génotype AA à la réduction d'EFS après régression de Cox.	37
8	a) Association significative de la présence de l'allèle G avec une augmentation d'EFS pour les patients traités par prednisone. b) Absence d'association significative pour les patients traités par dexaméthasone.	38
9	Combinaisons d'haplotypes et réduction d'EFS	45
10	Analyses de survie avec a) réduction significative d'EFS pour les patients du groupe d'haplotypes 2 (p=0.02) et b) absence de réduction significative d'OS (P=0.1).	46
11	Variants transcriptionnels, traductionnels et post-traductionnels du gène NR3C1 - [Zhou and Cidlowski, 2005].	55
12	Polymorphismes du gène NR3C1.	58

Liste des Abréviations

11 β HSD1	11 bêta-hydroxystéroïde déhydrogénase de type 1
11 β HSD2	11 bêta-hydroxystéroïde déhydrogénase de type 2
6MP	6-mercaptopurine
ASO	Allele specific oligonucleotide hybridization
DBD	DNA binding domain
DFCI	Dana Farber cancer institute
DFS	Disease free survival
EFS	Event free survival
GC	Glucocorticoïdes
GR	Récepteur aux GCs
GRE	Glucocorticoid responsive element
HAT	Histones acétylases
hGR	HumanGR
HPLC	High performance liquid chromatography
LBD	Ligand binding domain
LLA	Leucémie lymphoblastique aiguë
MTX	Méthotrexate
nGRE	Negative GRE
NR3C1	Nuclear receptor subfamily 3, Group C, member 1
OS	Overall survival
PCR	Polymerase chain reaction
rSNP	Regulatory SNP
SNP	Single nucleotide polymorphism
TAD	Transactivation domain
TPMT	Thiopurine-S-méthyl transférase
UTR	Untranslated region

PRÉAMBULE

La leucémie lymphoblastique aigue (LLA) est le cancer pédiatrique le plus fréquent. C'est aussi une maladie dont la survie a énormément bénéficié des avancées thérapeutiques au cours des trois dernières décennies. Les protocoles de recherche clinique ont permis de progresser dans le traitement de nombreuses pathologies, notamment dans le domaine des polychimiothérapies anti-cancéreuses. La Dana Farber Cancer Institute (DFCI) est une de ces institutions internationales qui contribuent à ces progrès, en particulier depuis le consortium de 1981 pour ce qui concerne la LLA.

Cependant, environ 20% des enfants traités présentent une rechute, une absence de rémission complète ou bien décèdent de la LLA (Silverman et al., 2000). L'origine de l'échappement au traitement est en grande partie due aux variabilités interindividuelles de réponse aux médicaments. Il existe des paramètres clinico-biologiques permettant d'anticiper sur l'évolution de la LLA. Parmi eux, la bonne réponse aux glucocorticoïdes (GCs), en particulier la prednisone, est un facteur de bon pronostic (Pieters et al., 1994).

Les GCs jouent un rôle primordial dans l'obtention et le maintien de la rémission, de par leur action apoptotique prépondérante sur les lymphoblastes. Pourtant, ils sont aussi responsables d'une toxicité dont la susceptibilité varie également d'un individu à l'autre.

La pharmacogénétique est un outil relativement récent dans la quête d'une médecine personnalisée, adaptée au patient, à ses fonctions physiologiques, à son patrimoine génétique. Il s'agit d'étudier les polymorphismes au sein de gènes candidats et leur impact sur la variabilité interindividuelle de réponse à un traitement donné. Les premières applications médicales de génotypage concernent le cytochrome p450 et ont été mises sur le marché cette année (Roche, 2005).

Concernant la LLA, des projets de pharmacogénétiques ont déjà débuté depuis une dizaine d'années, principalement reliés au méthotrexate (MTX) (Krajinovic and Moghrabi, 2004). Notre laboratoire a également initié la pharmacogénétique des GCs dans la LLA et démontré l'impact d'un polymorphisme de leur voie d'action dans le traitement et l'évolution de la LLA chez l'enfant (Fleury et al., 2004).

I. Introduction

A. La leucémie lymphoblastique aiguë

1. Présentation clinique

La leucémie lymphoblastique aiguë correspond à la prolifération clonale d'une cellule médullaire maligne, précurseur de la lignée lymphocytaire, et bloquée au cours de son processus de différenciation. Les cellules cancéreuses issues de ce clone prolifératif sont appelées blastes ou lymphoblastes.

Cet envahissement central de la moelle osseuse se fait au détriment des cellules matures et des autres lignées hématopoïétiques. Les cellules blastiques peuvent atteindre le système périphérique sanguin et donner lieu à une blastose sanguine. Elles peuvent aussi se localiser dans les ganglions lymphatiques ou dans d'autres tissus et organes comme les méninges, la rate ou le foie, pour former des masses tumorales.

Les présentations cliniques sont très variées et les symptômes précèdent le diagnostic de 2 à 6 semaines. Ils peuvent être (Denis R. Miller, 1995):

- Une altération de l'état général avec asthénie et fièvre.
- Des troubles de l'hémostase avec des saignements variés (épistaxis, gingivorragies), ecchymoses et hématomes.
- Des infections persistantes ou récidivantes malgré un traitement approprié.
- Un syndrome douloureux avec arthralgies, douleurs osseuses entraînant la boiterie.
- Des symptômes plus divers comme des vomissements, des céphalées, une dyspnée ou un rash cutané.

L'examen clinique retrouve souvent une pâleur, une tachycardie, une hépatosplénomégalie, des adénopathies. Parfois, il existe une hypertrophie testiculaire, une parésie des nerfs crâniens, des pétéchies ou une éruption maculopapuleuse signant l'infiltration des vaisseaux et des tissus sous-cutanés par les lymphoblastes.

Les clichés radiologiques recherchent un élargissement du médiastin, et des lésions corticales et trabéculaires ostéolytiques, d'infiltrations leucémiques ou de fracture pathologiques présentent dans 50% des cas.

2. Étiologies

Malgré les avancées thérapeutiques, peu d'éléments sont connus sur l'étiologie même de la LLA. Par ailleurs, de nombreux facteurs de risques biologiques et environnementaux ont été identifiés (Colby-Graham and Chordas, 2003).

Les expositions aux radiations ionisantes, à certains produits chimiques et anticancéreux sont aussi des facteurs de risques identifiés de LLA.

Certaines maladies d'anomalie du nombre ou de structure des chromosomes comme la trisomie 21 sont associées à un risque élevé de leucémie.

Les instabilités chromosomiques retrouvées dans certaines maladies génétiques comme l'ataxie-télangiectasie (déficit immunitaire humorale avec hypoimmunoglobulinémies IgA, IgG et IgE et ataxie cérébelleuse progressive) ont également démontré une association avec un risque de leucémie.

Des réarrangements chromosomiques pouvant aboutir à la formation de proto-oncogènes sont aussi ciblés dans le mécanisme d'oncogénèse de la LLA. La translocation t(9:22) ou chromosome de Philadelphia, mène à la formation de l'oncogène BCR-ABL avec une hyperactivité tyrosine kinase. Des variants des gènes suppresseurs de tumeurs comme celui de la protéine du rétinoblastome (pRB), de p53 ou de p16, sont aussi fréquemment retrouvés dans les lignées blastiques (Rubnitz and Crist, 1997).

Des polymorphismes au niveau des gènes codant pour des enzymes de détoxification et d'activation des carcinogènes (CYP2E1, CYP1A1, GSTM1, NAT2 et NQO1) ont également été retrouvés en association avec un risque de LLA (Krajinovic et al., 1999; Krajinovic et al., 2000; Krajinovic et al., 2002b).

3. Critères diagnostiques

Le diagnostic positif est établi par myélogramme avec un taux de blastes > 30% dans la moelle osseuse.

Des tests immunophénotypiques permettent de classifier les leucémies à lignées myéloïdes et à lignées lymphoblastiques. Ils établissent également le type cellulaire concerné et le stade de différenciation (Bene, 2005).

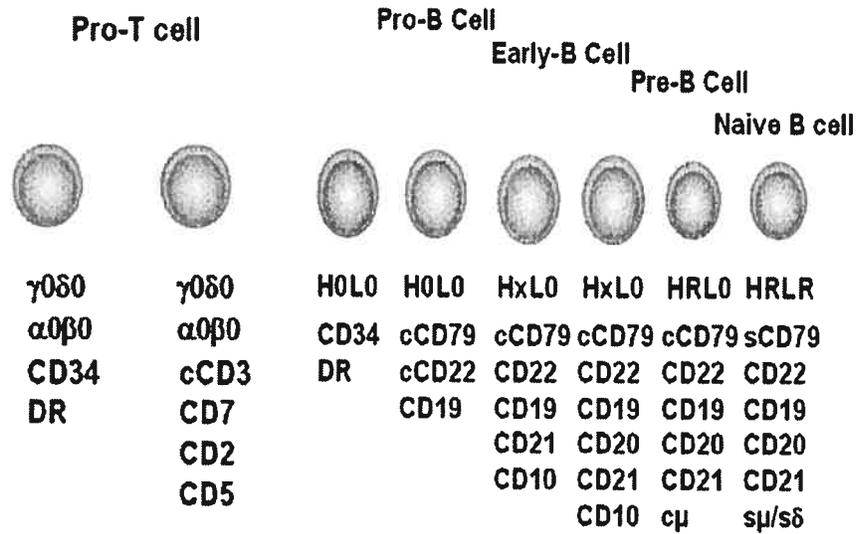


Fig 1. Immunophénotypes des lymphocytes en fonction du type et de la maturation [Bene, 2005].

Les LLA pré-B prédominent avec 86 à 87% des cas, contre 12% pour les T et 1 à 2% pour les B (Chessells, 1995).

Le nombre et la morphologie des cellules du frottis sanguin et du myélogramme a permis d'établir la classification FAB (french-british-american) (Lilleyman et al., 1986), dont les critères sont présentés dans la tableau 1.

Tableau I: Critères morphologiques de la classification FAB. Score 0 ou + : L1, score - : L2

Critères morphologiques	Scores
Rapport nucléocytoplasmique élevé dans + de 75% des cellules	+
Rapport nucléocytoplasmique faible dans + de 25% des cellules	-
Nucléoles : 0 à 1 dans plus de 75% des cellules	+
1 ou + dans plus de 25% des cellules	-
Irrégularité dans + de 25% des cellules	-
Grande taille dans + de 50% des cellules	-

On recherche également des anomalies chromosomiques (hypo-hyperdiploïdie) et des translocations associées à différents pronostics de la LLA par analyses moléculaires (Armstrong and Look, 2005).

Tableau II: Principales anomalies du caryotypes retrouvées dans la LLA [Armstrong and Look, 2005].

Lignée B	TEL-AML1 (25%)	MLL (9%)	MYC (2%)	BCR- ABL (4%)	E2A- PBX1 (5%)	Hyper- diploïdie (30%)	Autres (25%)
Lignée T	TAL-1 (58%)	MLL- ENL (2%)	LYL1 (58%)	HOX11 (3%)	HOX11L2 (20%)	-	Autres (5%)

4. Facteurs de risques pronostiques

Ces éléments cliniques et biologiques du diagnostique de LLA participent à l'identification de facteurs de risques pronostiques. Ceux-ci permettent d'établir des groupes de patients à risque de plus ou moins bonne réponse aux traitements et d'anticiper sur l'adaptation des différentes thérapeutiques.

Les LLAs non T, le sexe féminin, l'âge entre 1 et 9 ans, un taux de leucocytes au diagnostic inférieur à 50 000/mm³, une bonne réponse à la prednisone, les translocations TEL-AML1 t(12;21), l'hyperdiploïdie de 51 à 65 chromosomes avec un index ADN blastique > 1,16, la cytomorphologie non FAB L2 et moins de 5% de blastes médullaires en fin d'induction sont des facteurs reconnus de bon pronostic (Chessells, 1995; Chessells et al., 1995; Reiter et al., 1994; Ribeiro and Pui, 1993).

Les protocoles de traitements de la LLA du Dana Farber Cancer Institute (DFCI) consortium de 1981 à 1995 ont pris en compte plusieurs de ces facteurs de risque afin de proposer le meilleur traitement aux patients (Silverman et al., 2000):

- Le risque standard était défini par l'âge (2-9ans), le nombre de leucocytes au diagnostic (< 50 000/ mm³), le phénotype des blastes (non T), et l'absence de translocation t(9;22), d'atteinte du système nerveux central ou de masse médiastinale.
- Tous les patients ne remplissant pas les critères de risque standard appartenaient au groupe à risque élevé.

- Les patients des protocoles 1985 à 1991 ayant moins de un an et/ou un taux leucocytes supérieur à $100\,000 / \text{mm}^3$ au diagnostic appartenait au groupe à risque très élevé.

Cependant, cette stratification n'a pas démontré de différence significative pour les patients à risque très élevé, notamment les nourrissons de moins d'un an. Ceux-ci ont d'ailleurs été intégrés dans un autre protocole international plus spécifique, et donc ne font plus parti de ce protocole DFCI depuis 91-01.

Deux autres facteurs pronostiques ont été évalués dans le protocole DFCI 2000-01 :

- La réponse médullaire précoce aux traitements avec l'analyse du pourcentage de blastes au septième jour de traitement.
- L'estimation de la maladie résiduelle minime (MRD : minimal residual disease), par PCR des gènes codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines du clone blastique, qui représente un facteur pronostic de plus en plus étudié (Brisco et al., 1994; Knechtli et al., 1998).

5. Thérapeutiques

Le traitement de la LLA est une chimiothérapie comprenant cinq classes de médicaments : anthracyclines (doxorubicine), anti-métabolites (méthotrexate, cytarabine et 6-mercaptopurine), glucocorticoïdes (prednisone, dexaméthasone), vinca alcaloïdes (vincristine) et L-asparaginase (Erwinia ou E.Coli, pegaspargase).

Le type des médicaments, les posologies et le rythme des administrations, déterminés en fonctions des différents groupes à risques des patients, sont en perpétuelle optimisation par l'intermédiaire de plusieurs protocoles à travers le monde.

C'est surtout en 1976, avec le protocole BMF (Berlin-Frankfurt-Munster), que le traitement de la LLA connaît un progrès légendaire avec 70% de survie des enfants (au lieu de 40% du protocole EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer)) (Otten et al., 2002). Élaboré par les Drs Riehm et Langermann, ce protocole comprenait une chimiothérapie plus intense en terme de doses et de fréquence de traitement, et surtout était stratifié en plusieurs groupes à risque. Par la suite, ce protocole BMF-1976 a servi de référence aux autres protocoles internationaux. Dès lors,

l'association prednisone-vincristine en cours d'induction, la radiothérapie crânienne et le méthotrexate intra-thécal prophylactiques des rechutes du système nerveux central et l'association asparaginase-méthotrexate-6-mercaptopurine en intensification et maintenance sont préconisés, et l'identification de facteurs de risques pronostiques est de plus en plus affinée (Furman et al., 1976).

Les protocoles reçus par les patients de notre cohorte sont ceux du DFCI consortium, c'est-à-dire du DFCI 87-01 au DFCI 2000-01, que nous présentons tableau VI p 31 (Dalle et al., 2005).

L'organisation de ces protocoles de traitement de la LLA comporte quatre phases majeures :

- L'induction de rémission : période de 4 semaines pendant lesquelles l'intensité des traitements visent à obtenir une rémission complète de la leucémie objectivée par l'absence de blastes sanguins et <5% dans la moelle osseuse.
- Le traitement du système nerveux central : période de 2 semaines de traitement et de prévention des rechutes méningées, par radiothérapie per-crânienne et chimiothérapie intra-thécale.
- L'intensification (ou consolidation) : période de 30 à 40 semaines (permettant de compléter 30 injections d'asparaginase) de traitement composée de cycles de 3 semaines de chimiothérapie répétés visant à consolider la rémission de la LLA.
- La maintenance (ou continuation) : période de 60 à 70 semaines poursuivant l'entretien de la rémission jusqu'à un total de 2 ans de traitement.

La survie sans événement (EFS : event free survival) à 5 ans du protocole DFCI 91-01 (1991-1995) est de 83% (Silverman et al., 2000).

B. Rôles des Glucocorticoïdes (GCs)

1. Généralités

Les GCs physiologiques sont des hormones aux multiples actions contribuant à l'homéostasie. Leurs mécanismes d'action concernent à peu près tous les tissus du corps humain et interagissent avec des nombreuses voies de signalisation, de l'inflammation à l'apoptose, en passant par la régulation glycémique, la vasodilatation ou la prolifération cellulaire. Leur sécrétion est assurée par les glandes corticosurrénales et modulée par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Les dérivés biliaires animaliers de la cortisone, ont été les premières molécules thérapeutiques de synthèse à être administrées à but anti-inflammatoire, dès 1948 à la Clinique Mayo. Ils valurent le prix Nobel de médecine et de physiologie aux Drs Philip S. Hench, Edward C. Kendall et Tadeus Reichstein (Lundberg et al., 2004).

a. Actions des glucocorticoïdes

Leur mode d'action est principalement dépendante du récepteur aux GCs (GR) (cf. Chap.III, Parg.B3) par internalisation nucléaire et modulation transcriptionnelle. Cependant, il a été proposée une action des GCs GR-indépendante, conduite par une altération de la membrane plasmique et menant à interaction directe avec certains canaux et récepteurs membranaires (Stellato, 2004).

Sur le plan systémique, les GCs présentent une activité pléiotropique :

- Ils influencent l'hyposensibilité à l'insuline et favorisent le déséquilibre glycémique.
- Ils interviennent sur le métabolisme et la distribution de la masse grasse en favorisant la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes.
- Ils possèdent de grandes propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives par apoptose lymphocytaire, réduction de la synthèse des immunoglobulines et inhibition de la maturation des cellules mononuclées présentatrices de l'antigène et cytotoxiques.
- Ils inhibent les ostéoblastes et la formation osseuse, potentialisent l'action de la parathormone et de la vitamine D, activant la résorption osseuse et favorisant l'ostéonécrose et l'ostéoporose.

- Ils augmentent la rétention hydrosodée par stimulation du système minéralocorticoïde, entraînant une augmentation du débit cardiaque et de la pression artérielle.
- Ils favorisent la prolifération cellulaire au dépend de la différenciation.
- Ils affectent l'équilibre psychique pouvant aboutir à des présentations maniaques ou dépressives.
- Ils participent au développement du syndrome métabolique (items soulignés), condition clinique devenue un problème majeur de santé publique dans des pays occidentaux (Duclos et al., 2005).

Toutes ces actions sur divers tissus sont bien connues sur le plan clinique, mais beaucoup de leurs mécanismes cellulaires restent à élucider.

Concernant les processus moléculaires participant à l'activité anti-inflammatoire des GCs, les trois mécanismes suivants sont les mieux connus (Rhen and Cidlowski, 2005) :

- L'induction de l'annexine I et l'inhibition de la phospholipase $A_2\alpha$ cytosolique, conduisant au blocage de la libération de l'acide arachidonique et des écosanoïdes.
- L'activation de la MAPK phosphatase 1 qui déphosphoryle la kinase N-terminale Jun, interdisant la formation de l'hétérodimère c-Jun-Fos et donc sa liaison aux séquences AP1 (activating protein 1) des gènes de l'inflammation.
- Le blocage l'activité de NF- κ B (nuclear factor κ B) et donc de la transcription de cytokines, de chimiokines, de molécules d'adhésion, de facteurs du complément et de récepteurs, ainsi que de la cyclooxygénase 2.

L'apoptose induite par les glucocorticoïdes peut être due à l'action directe du complexe GC-récepteur sur leurs éléments spécifiques de réponse GRE (glucocorticoïds responsive element) au niveau de gènes entraînant la survie ou la mort cellulaire. Les processus apoptotiques résultants activeraient aussi bien la voie extrinsèque des récepteurs de mort membranaire (caspase 8, FasL) que la voie intrinsèque mitochondriale (famille Bcl2, Bim, Bax, Bak, APAF, caspase 9,6,3) (Greenstein et al., 2002; Kofler, 2000; Schmidt et al., 2005) (Fig.2). De récents travaux suggèrent que le mécanisme apoptotique attribuable aux GCs ne peut être enclenché qu'en aval d'un autre processus de réponse

homéostatique répondant à un dérèglement mitogénique, propre aux cellules cancéreuses (Rivas Totino et al., 2005).

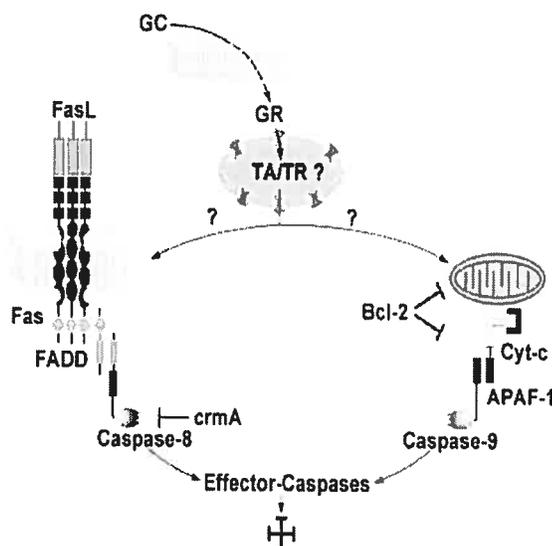


Fig. 2 : Possibles voies de transactivation (TA) ou transrépression (TR) des GCs induisant la mort cellulaire par apoptose [Kofler, 2000].

Les GCs pourraient aussi promouvoir la mort cellulaire en compromettant l'expression de certains gènes du cycle cellulaire comme $\text{Nf-}\kappa\text{B}$, Myc, cycline D3 ou p27 (Kofler, 2000; Ploner et al., 2005).

Les GCs peuvent aussi exercer un rôle vasculaire via l'activation de l'enzyme eNOS (endothelial nitric oxide synthase). L'oxyde nitrique ainsi produit présente des propriétés anti-inflammatoires, anti-athéromateuses et anti-ischémiques au niveau de la vascularisation du myocarde. Cependant, ces bénéfices coronariens des GCs sont confrontés au risque de rupture myocardique par inhibition de la différenciation et favorisation de la prolifération cellulaire des GCs entraînant la formation d'une cicatrice fibreuse rigide au siège de la lésion ischémique (Hafezi-Moghadam et al., 2002).

b. Toxicité des glucocorticoïdes

Les GCs étant utilisés depuis plus d'un demi-siècle, leurs caractéristiques thérapeutiques sont bien connues, tout comme leurs effets délétères. Dr Harvey Williams Cushing fut le premier à caractériser l'entité clinique de la maladie de Cushing, consécutive à une hypersécrétion d'ACTH (adrenocorticotrop hormone) entraînant un hypercorticisme secondaire (Jay, 2001). Exposés de façon prolongée à une corticothérapie, les patients

développent des symptômes cliniques mimant cette pathologie, que l'on nomme syndrome de Cushing iatrogénique. Ce syndrome regroupe les signes cliniques suivants :

- Endocrinologiques : Diabète, dyslipidémie, troubles ovulatoires, oligo-aménorrhée et perte de libido, hirsutisme.
- Morphologiques : Redistribution facio-tronculaire de la masse grasse, amyotrophie des racines des membres, vergetures, fragilités capillaires, fibrose cicatricielle, érythrose faciale.
- Vasculaires : Oedèmes, Hypertension.
- Osseux : Ostéonécrose, Ostéoporose.
- Psychiatriques : Dépression, accès maniaques.
- Infectieux : Déficience immunitaire.

2. Rôles spécifiques dans la LLA

Les propriétés pharmacologiques des GCs sont utilisées dans la LLA depuis plusieurs décennies. L'objectif thérapeutique premier dans ce contexte est l'apoptose lymphoblastique en vue de contribuer à l'obtention de la rémission.

L'importance du rôle des GCs dans la LLA a permis d'établir des critères de bonnes et mauvaises réponses (Dordelmann et al., 1999; Pieters et al., 1994), avec un impact relié au pronostic de la maladie.

L'objectif majeur des protocoles actuels est d'établir les effets bénéfiques autant que la toxicité des deux GCs principalement administrés dans le traitement de la LLA : la prednisone et la dexaméthasone.

Les modes d'administration des GCs dans la LLA sont bien établis et ne présentent que des modifications mineures de posologies pour ce qui concerne les protocoles du DFCI de 1987 à 2000 (tableau IV). Le protocole DFCI 91-01 est le protocole qui diffère le plus en terme de prescription des GCs, avec une fenêtre d'investigation attribuant par répartition aléatoire pendant trois jours une des trois posologies de la dexaméthasone ou bien une dose standard de méthylprednisolone. Cette fenêtre avait été réalisée dans le but d'étudier l'impact de l'apoptose lymphoblastique précoce des GCs sur l'évolution de la maladie, mais n'a pas retrouvé de différence significative en fonction de la répartition aléatoire (Silverman et al., 2001). Ce même protocole comprenait uniquement de la dexaméthasone

au cours de l'intensification de rémission et la maintenance, et a révélé une meilleure évolution de la maladie que les protocoles antérieurs, sans pour autant que la contribution de la dexaméthasone soit clairement démontrée.

Des analyses de survie *in vitro* de la réponse des blastes à la prednisone et à la dexaméthasone démontrent une activité pro-apoptotique 16 fois plus élevée de cette dernière (Kaspers et al., 1996). D'autres recherches ont fait valoir un effet bénéfique de la dexaméthasone sur les rechutes du système nerveux central et l'évolution globale de la maladie (Mitchell et al., 2005; Veerman et al., 1996). Si la dexaméthasone est associée à une meilleure issue au cours de la LLA, ses effets toxiques ont également été démontrés plus fréquents, avec notamment plus d'épisodes infectieux en cours d'induction réduisant les chances de rémission complète (Hurwitz et al., 2000), des ostéonécroses de plus hauts grades (Mattano et al., 2000) et un plus haut risque de déficience cognitive pour les enfants recevant de la dexaméthasone après une radiothérapie crânienne préalable (Silverman et al., 2000).

A date, la prednisone reste la molécule de référence au cours de l'induction de rémission. Pourtant, il a récemment été démontré une augmentation significative de la survie totale ainsi qu'une diminution du risque de rechute du système nerveux central des patients ayant reçu de la dexaméthasone au cours de l'induction et de la consolidation (Mitchell et al., 2005). Cependant, les données des études antérieures n'ont toujours pas permis de définir lequel de ces deux GCs utilisés dans la LLA est le plus approprié dans l'intensification et la maintenance. Le protocole DFCI 95-01 a repris la prednisone pour ces deux phases du traitement alors que le protocole AIEOP-ALL-95-01 (Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica), dérivé du protocole BMF (Berlin-Frankfurt-Munster), préconise la dexaméthasone (Arico et al., 2005). Les résultats de la répartition aléatoire prednisone/dexaméthasone du protocole DFCI 2000-01 ainsi que ceux d'un autre protocole de recherche actuellement en cours (NCI, 2003) permettront peut-être de prendre une décision thérapeutique plus assurée.

C. Stratégie pharmacogénétique

1. Approche par gènes candidats

Une étude pharmacogénétique correspond à la caractérisation d'un profil polymorphique par son association à un phénotype de réponse à un traitement donné. Ce profil peut être constitué d'un ou plusieurs variants au niveau d'un ou plusieurs gènes. Le traitement étudié peut être mono ou plurithérapeutique.

Devant la connaissance des gènes codant pour diverses protéines d'une voie métabolique d'un médicament donné, la stratégie de recherche d'un profil polymorphique peut être celle des gènes candidats. Les gènes codant pour des molécules critiques de la voie métabolique et des mécanismes d'action étudiés sont ciblés et définis comme les gènes candidats de l'étude. Ces gènes candidats sont retenus pour leurs implications dans la réponse au traitement d'une maladie.

2. Exemples appliqués à la médecine

AmpliChip™ CYP450 (Roche Molecular Diagnostics, Alameda, CA, USA), premier test moléculaire diagnostique approuvé, est basé sur une détection par micropuce ADN (GeneChip microarray system - Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) analysant 29 variants du gène CYP2D6 et deux des gènes CYP2C19 (Roche, 2005). Ces deux enzymes de détoxification interviennent dans le métabolisme de plusieurs classes de médicaments dont certains sont présentés tableau III (IUSM).

D'autres tests de génotypage sont aussi disponibles pour la TPMT (thiopurine méthyl transférase), enzyme clé du mécanisme d'action de la mercaptopurine, l'azathioprine ou la thioguanine, pour le CYP2C9 intervenant dans la voie d'action de la warfarine ou bien pour la UGT1A1 (irinotecan et uridine diphosphoglucuronosyl transférase 1A1) dans les traitements de certains cancers par l'irinotecan (Eichelbaum et al., 2005).

Tableau III : Molécules dont le métabolisme est influencé par les variants du CYP2D6 et du CYP2C19 [IUSM].

CYP2D6			
<u>Bêta-Bloquants:</u> métoprolol propafénone timolol	<u>Antidépresseurs:</u> amitriptyline clomipramine desipramine imipramine paroxétine	<u>Antipsychotiques:</u> halopéridol rispéridone thioridazine	<u>Autres :</u> aripiprazole codéine dextrométhorphan duloxétine flécaïnide mexilétine ondansétron tamoxifène tramadol venlafaxine
CYP2C19			
<u>Inhibiteurs de la pompe à protons:</u> oméprazole lansoprazole pantoprazole	<u>Anti-convulsivants:</u> diazépam phénytoïne phénobarbital amitriptyline clomipramine cyclophosphamide progestérone		

3. Contributions pharmacogénétiques antérieures dans la LLA.

Parmi les sept molécules constamment retrouvées dans les protocoles de traitement de la LLA (asparaginase, méthotrexate (MTX), 6-mercaptopurine (6MP), doxorubicine, vincristine, prednisonne/dexaméthasone et cytarabine), quatre sont sous la dépendance de voies métaboliques bien connues faisant l'objet d'études pharmacogénétiques dans le cadre de la LLA: le 6MP, le MTX, la doxorubicine et les GCs. Les gènes candidats sont des gènes codant pour des enzymes essentielles au métabolisme d'action de ces médicaments, des récepteurs ou bien des protéines de transports.

a. Méthotrexate et LLA.

Les gènes de la voie d'action du MTX sont les plus représentés dans les études pharmacogénétiques de la LLA. Le MTX fait parti de la classe des antimétaboliques par son action antagoniste compétitive avec les folates. Les folates sont des composants essentiels à la synthèse *de novo* des purines et donc des acides nucléiques, mais aussi à la voie métabolique homocystéine-méthionine.

Comme l'illustre la figure 3, les gènes candidats de la voie d'action du MTX sont les gènes des récepteurs aux folates (RFC1: reduced folates carrier), les gènes du métabolisme des folates (DHFR : dihydrofolate réductase, MTHFR : méthylène tétrahydrofolate réductase, MTHFD1 : 5,10- méthylène tétrahydrofolate déhydrogénase), les gènes de la synthèse des purines et pyrimidines (TYMS: thymidilate synthase), et ceux du métabolisme de l'homocystéine (MTR: méthionine synthase, MTRR : méthionine synthase réductase, CBS : cystathionine bêta-synthase, NOS3 : endothelial nitric acid synthase).

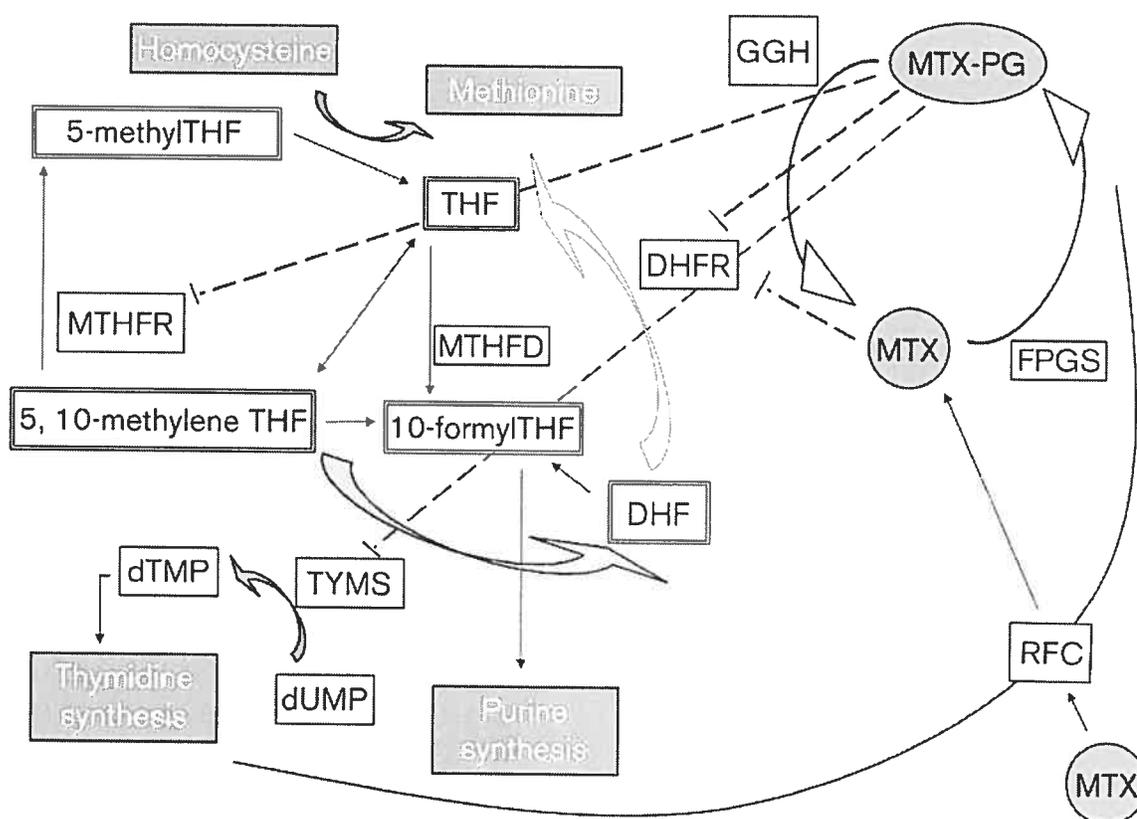


Fig. 3 : Voies d'action du méthotrexate [Herrlinger et al., 2005].

Plusieurs de ces gènes possèdent des variants ayant été reliés à la réponse au MTX et/ou à l'évolution de la LLA .

Un SNP non synonyme du gène RFC1 (G80A-His27Arg) étudié chez des patients LLA a révélé une association avec une réduction de survie sans événement ainsi que des concentrations plasmatiques de MTX plus élevées (Laverdiere et al., 2002).

Deux SNPs du gène MTHFR (C677T-Ala222Val, A1298C-Glu429Ala) sont associés à une réduction d'activité enzymatique *in vitro*. Le variant C677T-Ala222Val est aussi associé à la réponse au MTX avec une réduction d'EFS chez des patients LLA. Cet impact est particulièrement important lors de l'interaction avec d'autres gènes de la voie des folates (Aplenc et al., 2005; Krajinovic et al., 2004).

Le gène TYMS possède un polymorphisme de répétition avec une séquence de 28 pb répétées en tandem 2 (2R) ou en triplet (3R), au niveau d'un enhancer de la région 5'-UTR. La triple répétition 3R a été associée à une réduction de survie sans événement (EFS : event free survival) chez des patients LLA (Krajinovic and Moghrabi, 2004). Il existe un SNP (single nucleotide polymorphism) de substitution (G/C) au sein de la seconde répétition de 28pb, au niveau d'une séquence consensus USF (upstream stimulatory factor), entraînant la réduction de l'activité transcriptionnelle du gène TYMS. Enfin, une délétion de 6 pb en 3'-UTR (TS cDNA 1494TTAAAG/-) a également été identifiée mais n'est pas reliée de façon séparée à l'évolution de la LLA. Des analyses de survie des combinaisons de cette délétion avec le polymorphisme de répétition de TYMS retrouve un effet protecteur sur l'évolution de la LLA du variant possédant la répétition 2R avec la délétion (Krajinovic et al., 2005).

b. La thiopurine-S-méthyl transférase (TPMT) et la LLA

La TPMT (thiopurine-S-méthyl transférase), qui neutralise les métabolites actifs et toxiques du 6MP, est l'enzyme probablement la plus étudiée sur le plan pharmacogénétique. Trois de ses variants connus représentent 98% des profils déficitaires existants, dont le génotypage en clinique est maintenant disponible (Aplenc and Lange, 2004).

Chez les patients LLA, une étude a démontré l'importance de l'activité de la TPMT et des nucléotides thioguanines intra-érythrocytaires dans la résistance au traitement (Lennard et al., 1990). Dans la population générale, le variant TPMT1* est le plus fréquent (95,3%), et est associé à une hyper activité de l'enzyme, et donc une forte clearance du 6MP. Cet allèle majeur a été associé à la persistance de maladie minimale résiduelle (Stanulla et al., 2005). Les patients ne possédant pas l'allèle majeur TPMT1* ont une activité enzymatique jusqu'à 4 fois plus faible, les exposant alors au versant toxique

hématologique du 6MP. L'adaptation du traitement est encore à l'étude. Le génotypage du variant TPMT1* a d'ailleurs été inclus dans le protocole DFCI 2000-01.

c. Autres études pharmacogénétiques concernant la LLA.

Sont publiés des travaux concernant les gènes des enzymes de détoxification des phases I et II, avec ceux de la superfamille des cytochromes P450 (CYP3A4, CYP3A5) (Aplenc et al., 2003), et ceux de la famille des GSTs (gluthation-s-transférases GSTM1, GSTP1, GSTT1) (Anderer et al., 2000), qui participent à l'inactivation nombreux xénobiotiques dont les GCs et la doxorubicine.

Plus récemment, un polymorphisme de délétion de GSTT1 a été associé à une meilleure réponse précoce (1ère semaine de traitement) à la prednisone chez les enfants LLA (Meissner et al., 2004).

De façon intéressante, le CYP1A1*2A a été associé à un risque de mauvaise évolution de la LLA (Krajinovic et al., 2002a), malgré l'absence de son implication directe dans le métabolisme des molécules faisant partie du traitement. Cependant, il est suggéré que les GCs pourraient avoir un impact sur ce variant, étant donné l'existence d'un GRE (glucocorticoid responsive element) au niveau de ce gène. Une augmentation de l'induction du CYP1A1 par les GCs pourrait accroître le métabolisme de composés carcinogènes et donc faciliter la récurrence de la LLA.

Malgré le rôle crucial des GCs dans la stratégie d'obtention d'une rémission, les gènes de leurs voies métaboliques et d'action ne représentent pas une contribution majeure de la pharmacogénétique de la LLA. Certains variants de leur enzyme activatrice 11 β HSD1 (11 bêta-hydroxystéroïde déhydrogénase de type 1) ou de leur récepteur cellulaire (GR) ont été associés à divers phénotypes dans d'autres pathologies, mais un seul a pour l'instant été associé au pronostic de la LLA (Fleury et al., 2004). Il s'agit du RFLP (restriction fragment length polymorphism) *BclI* (NR3C1 IVSB +646G/C), dont les sujets homozygotes pour l'allèle mineur C présentent un plus grand risque de réduction de temps de survie totale (OS : overall survival).

II. Hypothèses et Objectifs

Parmi les enfants atteints de LLA, près de 20% échappent à la rémission complète ou présentent une rechute (Silverman et al., 2000; Silverman et al., 2001). Le rôle de la résistance aux traitements est un facteur critique de la prise en charge thérapeutique en oncologie, et donc dans la LLA (Kaspers et al., 1997; Pieters et al., 1997). Les GCs ont démontré leur place prédominante dans la chimiothérapie de la leucémie. Leurs actions pro-apoptotiques sur les lymphoblastes leur ont conféré un caractère pronostic dans l'issue de la LLA (Dordelmann et al., 1999; Pieters et al., 1994).

Devant l'importance de la contribution des GCs dans le traitement de la LLA, notre hypothèse est qu'une variabilité interindividuelle de réponse aux GCs pourrait conduire à une différence de pronostic et d'évolution de la maladie. De la même façon, cette variabilité pourrait expliquer la toxicité induite par les GCs.

Nous suggérons que cette variabilité interindividuelle pourrait correspondre à la présence d'un ou plusieurs polymorphismes au niveau des gènes impliqués dans le métabolisme et le mécanisme d'action des GCs.

L'identification de SNPs au niveau de gènes candidats de la voie d'action des GCs et leur association à des critères d'évolution de la LLA d'une part, et de toxicité des GCs d'autre part, permettront de contribuer à la définition de profils génétiques à risque de rechutes, de réduction de temps de survie sans événement (EFS : event free survival) ou d'effets secondaires du traitement de la LLA.

Avant de pouvoir agir au niveau nucléaire, les GCs doivent subir deux étapes critiques à leurs actions : franchir la membrane plasmique la cellule cible sous forme active, puis se lier à leur récepteur (Fig.4).

- L'activité de l'enzyme **11 bêta-hydroxystéroïde déhydrogénase de type 1** (11 β HSD1) contrôle la biodisponibilité tissulaire des GCs en convertissant la cortisone en cortisol actif, tout comme la prednisone en prednisolone.

- La signalisation des GCs est quasi totalement GR-dépendante. Au niveau cellulaire, les GCs doivent se fixer sur le **récepteur aux GCs** pour former un complexe GC-GR qui dimérise pour pénétrer dans le noyau et médier son signal transactivateur ou répresseur au niveau des gènes cibles.

Devant le rôle primordial de ces deux protéines dans le mécanisme d'action des GCs, le gène HSD11B1 codant pour la 11 β HSD1, ainsi que le gène NR3C1 (Nuclear Receptor subfamily 3, Group C, member 1), codant pour le hGR (humanGR) correspondent aux gènes candidats de notre étude concernant les polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme et l'action des GCs chez les enfants atteints de LLA.

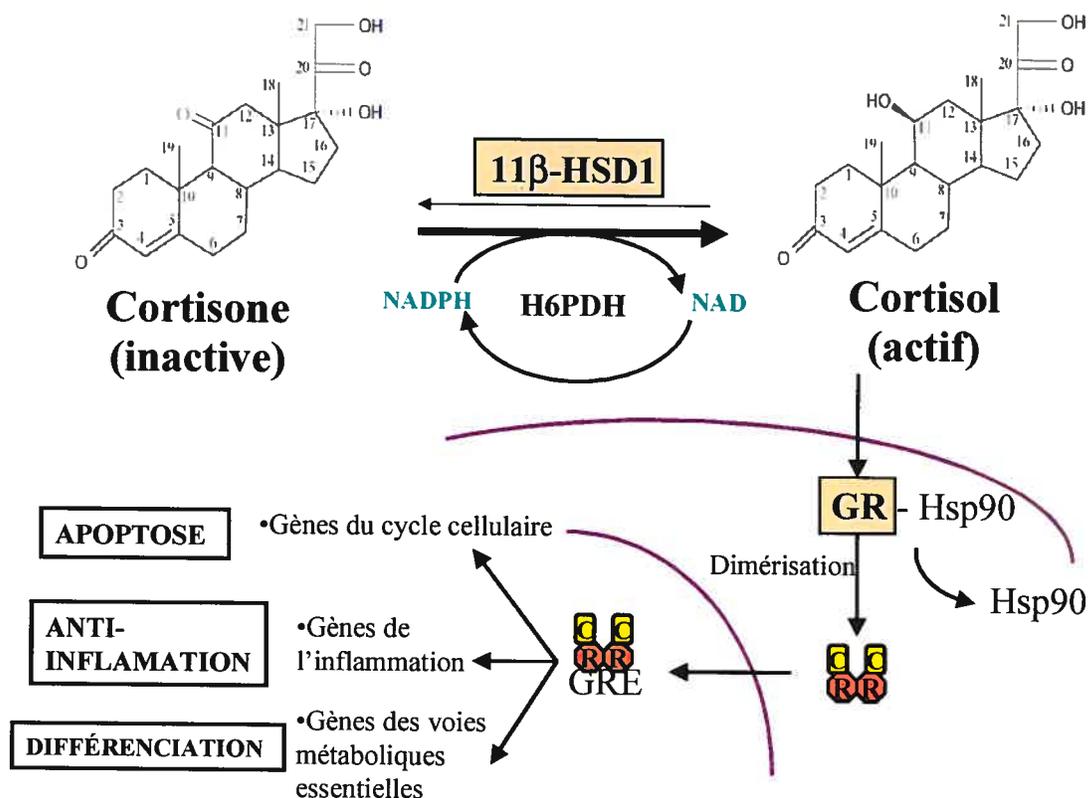


Fig. 4 : Gènes candidats du métabolisme des glucocorticoïdes.

III. Genes Candidats

A. HSD11B 1 : gène de l'enzyme 11 β HSD1

Découverte dans les années 1950, l'importance du rôle biologique de la 11 β HSD1 n'est réellement estimée que depuis une décennie si l'on se reporte aux listes des publications disponibles. Tous ces travaux ont permis d'avancer dans la caractérisation de la 11 β HSD1, élargissant le champs d'hypothèses l'impliquant dans divers processus physiopathologiques.

1. Famille des SDR (Short chain steroid Dehydrogenase/Reductase)

La 11 β HSD1 est un membre de la famille des enzymes SDR NAD(H)/NADP(H) dépendantes, formée d'une soixantaine d'enzymes chez l'homme. Elles se caractérisent par un domaine de liaison nucléotidique (GXXXGXXG) très conservé et un site catalytique comprenant trois résidus Sérine-Tyrosine-Lysine (S-Y-K) nécessaires au transfert de proton de la réaction d'oxydoréduction (Oppermann et al., 2003).

2. Structure et activité enzymatique

In vivo, la 11 β HSD1 possède une activité réductase prédominante, permettant l'activation de la cortisone en cortisol, ainsi que de ses dérivés synthétiques telle la prednisone. De façon inverse, il existe une enzyme oxydant les glucocorticoïdes, la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 β HSD2), prédominant au niveau des reins et limitant l'excès de stimulation des récepteurs aux minéralocorticoïdes. Une déficience en 11 β HSD2 entraîne un syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïdes (AME : Apparent Mineralocorticoid Excess) (White et al., 1997; Wilson et al., 2001), par défaut d'inactivation des GCs et hyperstimulation des récepteurs aux minéralocorticoïdes.

Au niveau tissulaire, la 11 β HSD1 est présente dans le foie, les tissus adipeux, les os et le cerveau. Au niveau cellulaire, la 11 β HSD1 est ancrée au réticulum endoplasmique (RE) par son extrémité N-terminale en hélice, laissant ainsi l'extrémité C-terminale possédant le site catalytique dans la lumière du RE.

L'activité enzymatique de la 11 β HSD1, comme celle de toutes les enzymes SDR, est NAD(H) dépendante, et donc modulée par la biodisponibilité de ce co-facteur. L'enzyme hexose 6-phosphate déhydrogénase (H6PD) régule l'oxydo-réduction du NADP(H) et par là même participe à la régulation de l'activité de la 11 β HSD1 (Atanasov et al., 2004).

Comme la cortisone, la prednisone est métabolisée par la 11 β HSD1 qui la convertit en prednisolone active (Fig.5). Ceci ne concerne pas la dexaméthasone (16 α -Methyl-9 α -fluoro-prednisolone), qui est directement active. Cependant, cette enzyme est physiologiquement bidirectionnelle, même si son activité réductase prédomine. L'oxydation de la prednisolone et de la dexaméthasone est majoritairement réalisée *in vivo* par l'enzyme 11 β HSD2, qui assure cette étape d'inactivation au niveau rénal, avec une forte affinité pour la prednisolone (Diederich et al., 2002; Diederich et al., 2004).

3. Implications pathologiques

De nombreuses fonctions physiopathologiques ont été associées à l'activité de la 11 β HSD1 de par son impact sur la voie métabolique des GCs. Le syndrome métabolique (diabète de type 2, insulino-résistance, hypertension et dyslipidémie) (Wake and Walker, 2004) et l'obésité (Walker, 2004) sont les axes de recherche les plus investis du fait de la problématique de santé publique majeure qu'ils soulèvent. Cependant, d'autres implications de la 11 β HSD1 sont aussi étudiées dans le glaucome (Walker and Stewart, 2003), l'ostéoporose (Cooper et al., 2003), la maladie d'Alzheimer (de Quervain et al., 2004) ou les processus de détoxification (Maser et al., 2003).

Il existe un syndrome associé à un défaut de réduction de cette enzyme (CRD : cortisone reductase deficiency), entraînant un tableau clinique d'hyperandrogénie proche du syndrome des ovaires polykystiques (Jamieson et al., 1999). Sur le plan biologique, on retrouve une cortisolémie basse associée à une clearance des dérivés urinaires « 11-oxo » du cortisol élevée.

Toutes ces implications de la 11β HSD1 ont fait de cette enzyme une cible thérapeutique afin de contrecarrer son hyperactivité. D'abord de façon non spécifique avec la carbenoxelone, puis spécifiquement avec l'arylsulphonamidothiazoles.

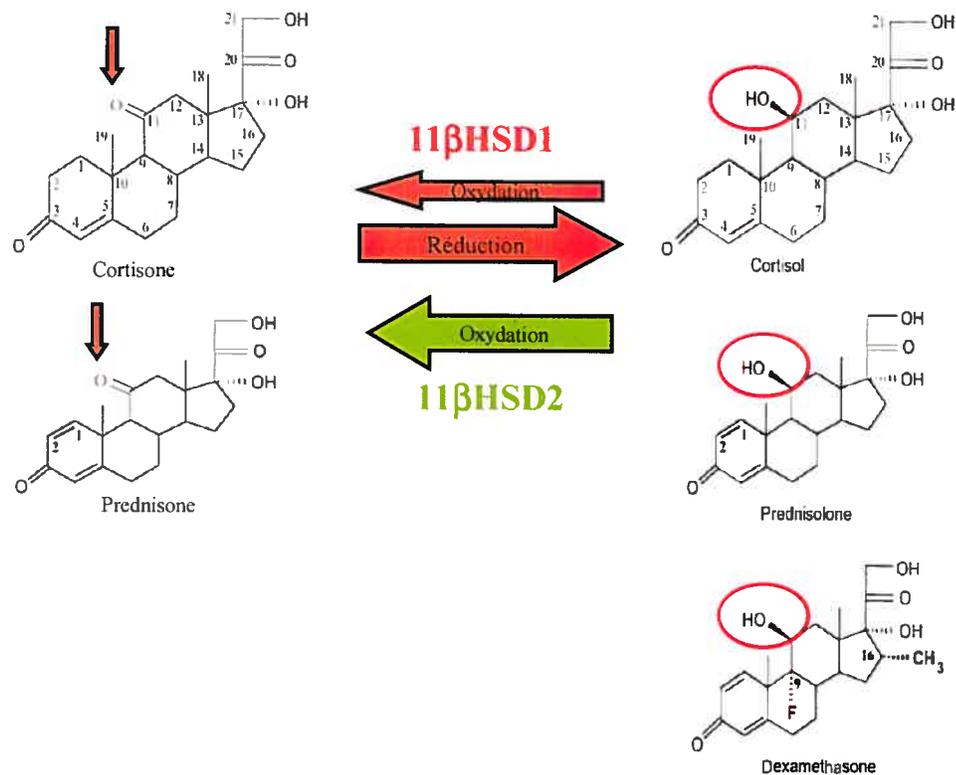


Fig. 5 : Métabolisme des GCs physiologiques et de synthèse par les enzymes 11β HSD1 et 11β HSD2.

B. NR3C1 : gène de récepteur aux GCs (Nuclear Receptor subfamily 3, Group C, member 1)

1. Introduction

Le récepteur aux GCs est la molécule la plus en aval de la voie de signalisation hormonale glucocorticotrope puisque c'est elle qui se lie à l'ADN des gènes ciblés par cette voie. La multiplicité des effets des GCs est le reflet de la variété des sites de transactivation et de répression du GR ainsi que de ses différents niveaux de régulation pré-, post-transcriptionnelle et traductionnelle (Lu and Cidlowski, 2004). Tous ces mécanismes de signalisation et de régulation font la complexité de cette molécule cruciale dont l'intégrité fonctionnelle est primordiale.

2. Structure du gène NR3C1

Le GR appartient à la super famille des récepteurs nucléaires hormonaux, incluant notamment les récepteurs aux minéralocorticoïdes et aux estrogènes, et ayant en commun trois domaines de structure. La structure du GR est donc la suivante :

- Le domaine de transactivation en N-Terminal (TAD : transactivation domain), responsable de la translocation nucléaire.
- Le domaine de liaison à l'ADN au centre (DBD : DNA binding domain), formé de deux doigts de zinc mais aussi des acides aminés nécessaires à la dimérisation et à la reconnaissance des éléments de réponse aux GCs (GRE : glucocorticoïds responsive element) des gènes cibles.
- Le domaine de liaison au ligand en C-Terminal (LBD : ligand binding domain), comprenant aussi un second domaine de transactivation.

Le gène NR3C1 possède 10 exons situés sur le bras q31 du chromosome 5 et s'étendant sur environ 110kb.

L'exon 1 code pour des séquences transcrites mais non traduites. Cet exon se subdivise en trois fragments (1A, 1B et 1C) dont la transcription est sous contrôle de promoteurs propres à chacun. L'exon 2 code pour le TAD en N-terminal de la protéine, les exons 3 et 4 codent chacun pour un doigt de zinc du DBD, et les exons 5

à 9 codent pour les séquences de dimérisation, le LBD et le second TAD (Bray and Cotton, 2003; Tissing et al., 2005a).

3. Mode d'action du GR, facteurs de transcription et gènes cibles.

Au niveau cellulaire, le GR est localisé au cytoplasme dans lequel il est maintenu par des protéines chaperonnes de choc thermique (Heat shock protein Hsp90, Hsp40 et Hsp 70) (DeRijk et al., 2002). Le GR cytoplasmique est également phosphorylé et devient hyperphosphorylé au niveau de résidus sérine en présence de son ligand (Bodwell et al., 1998). Lorsque le GC lipophile traverse la membrane plasmique et vient se fixer sur le LBD, les protéines chaperonnes se désolidarisent du récepteur, lui permettant ainsi de dimériser. Ce n'est qu'après dimérisation que le complexe récepteur-ligand est transloqué au noyau par l'intermédiaire des TADs et peut ainsi transactiver ou réprimer les gènes cibles au niveau de séquences *cis* appelées GREs et nGREs (negative GREs). Il peut également s'associer à d'autres facteurs de transcription comme la protéine d'activation AP-1 ou le facteur nucléaire NF- κ B pour former un complexe de répression. Toutes ces interactions conduisent à l'arrêt des mécanismes de prolifération et de survie en faveur de ceux de différenciation et d'apoptose (Tissing et al., 2003).

Finalement, le GR est dégradé par le protéosome via la voie de l'ubiquitination (Lu and Cidlowski, 2004).

Plusieurs facteurs de transcription du GR ont été identifiés, tels AP-1, P-2, cAMP, NF- κ B, Yin Yang 1 et Sp1 (Zhou and Cidlowski, 2005). Cette variété de transactivateurs est un élément explicatif du mécanisme moléculaire de la variabilité tissulaire d'expression du GR.

S'il a été démontrée une action GR-indépendante des GCs (Stellato, 2004), leurs actions anticancéreuses par arrêt du cycle cellulaire et apoptose, recherchées dans le traitement de la LLA, sont médiées de façon cruciale par leur association au GR (Kofler, 2000).

IV. Matériel et Méthodes

A. Spécimens biologiques

Le protocole de recherche de notre étude a été approuvé par le conseil d'éthique de l'établissement et tous les consentements signés par les volontaires et les enfants participant, leurs parents ou leur tuteur légal ont été recueillis.

Le matériel biologique utilisé correspond à l'ADN des sujets extrait avec le kit d'extraction PUREGENE DNA (Gentra Systems, Minneapolis, USA) à partir de prélèvements sanguins, de biopsies de moelle osseuse ou de frottis buccaux.

Ces spécimens sont répertoriés au niveau de la banque d'ADN du centre de cancérologie Charles Bruneau (centre de recherche de l'hôpital Ste-Justine - Montréal).

B. Identification des polymorphismes et génotypage

1. Stratégie de recherche des SNPs

Nos séquences de référence ont été les suivantes :

- Pour le gène HSD11B1 : GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) NT_021877.17 (206,24-206,29Kpb).
- Pour le gène NR3C1: GenBank NT_029289, (brin anti-sens).

a. SNPs de la région codante du gène HSD11B1

A partir d'une population contrôle non malade, les six exons de HSD11B1 ont préalablement été amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction), subdivisés en 32 différents profils par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) dénaturante (dHPLC), puis séquencés par séquençage automatique.

Le principe de la dHPLC est la détection d'hétéroduplexes au court du réappariement de fragments séparés après dénaturation. La présence d'un hétéroduplexe signe un mésappariement par hybridation de 2 fragments différents, et permet donc

l'identification de variants. Le Wave 3500 et le logiciel Wavemaker (Transgenomic) de prédiction des températures de dénaturation ont été utilisés pour cette technique. Le principe de séquençage utilisé a été celui des amorces de terminaisons marquées aux fluorochromes (dye-labelled primer set of chain terminated fragment) et effectué par le séquenceur automatique LI-COR 42 00 IR DNA Analyzer.

Les amorces de PCRs et de séquençage des six exons de HSD11B1 (l'exon 6 de 620kb a été divisé en deux fragments avec chevauchement de 339kb et 354kb) sont présentées annexes A et B ainsi que les conditions des réactions annexe C.

b. SNPs de la région régulatrice des gènes HSD11B1 et NR3C1

Les 2kb en amont du site d'initiation de la transcription des deux gènes ont été analysés par dHPLC et séquencés par séquençage automatique par le projet de génétique régulatrice de Génome Québec (*the Genome Quebec regulatory genetics project*) par les Drs Labuda et Sinnott (centre de cancérologie Charles Bruneau - centre de recherche de l'hôpital Ste-Justine - Montréal). Quatre rSNPs (regulatory SNPs) au niveau du promoteur du gène HSD11B1 (2 dans chaque fragment Prom.1 et Prom.2) et quatre autres au niveau du promoteur du gène NR3C1 (2 dans le fragment Prom.1, 1 dans chaque fragment Prom.2 et Prom.3) ont été identifiés, dont l'analyse a été poursuivie au cours de notre étude. Les amorces et conditions de PCRs de ces fragments sont présentées annexes B,C, D et E.

2. Génotypage et fréquences alléliques

a. Hybridation allèle spécifique ASO (Allele Specific Oligonucleotide Hybridization)

Pour tous les SNPs étudiés, la méthode de génotypage utilisée est celle de l'ASO après amplification du fragment porteur du variant d'intérêt par PCR. Cette technique permet de génotyper plusieurs centaines d'individus de façon aisée, fiable et peu onéreuse (Saiki et al., 1989). Brièvement, les produits de PCRs de chaque sujets, contenant la séquence de localisation d'un variant, sont fixés sur une membrane de nylon par irradiation UV, puis hybridés en présence d'amorces marquées au

phosphore radioactif (γ P32) et d'amorces non marquées (compétiteurs), pour obtenir la meilleure spécificité d'hybridation. Les amorces et les conditions d'ASO pour les SNPs de HSD11B1 et de NR3C1 étudiés sont présentées annexes F et G.

b. Fréquences alléliques

Après génotypage de chaque variant au sein d'une population de 184 individus d'origines ethniques différentes (31 moyen orientaux, 28 africains sub-sahariens, 48 européens, 31 asiatiques, 46 amérindiens), les fréquences alléliques des allèles mineurs ont été établies selon le calcul suivant :

Soit un variant défini par l'allèle majeur A et l'allèle mineur a :

$$\text{Fréquence de l'allèle mineur a} = [(2 \times N_{aa}) + (N_{aA})] \times 100 / 2N_{\text{tot}}$$

Avec :

N_{aa} = effectif des sujets homozygotes pour l'allèle mineur a

N_{aA} = effectif des sujets hétérozygotes aA

N_{tot} = effectif total des sujets

Un variant est considéré polymorphique lorsque la fréquence allélique de l'allèle mineur est supérieur à 1%.

Concernant notre étude, ont été retenus les polymorphismes ayant une fréquence allélique > 5% dans notre population d'intérêt de descendance européenne, étant donné le recrutement de la population pédiatrique de l'hôpital Ste-Justine de Montréal constituant notre cohorte.

Les combinaisons d'haplotypes ont été résolues en utilisant le logiciel Phase version 2.0.2 (Stephens and Donnelly, 2003; Stephens et al., 2001).

C. Patients et protocoles

Plus de 400 enfants ont été diagnostiqués pour une LLA à l'hôpital Ste-Justine de Montréal entre 1989 et 2000. Notre cohorte est plus restreinte puisqu'elle répond aux critères d'inclusion des protocoles du DFCI ainsi qu'aux critères spécifiques de notre étude. Les protocoles DFCI de 1987, 1991, 1995 et 2000 sont présentés tableau VI p 31. Les caractéristiques des patients sont présentées figure 6 et tableau IV.

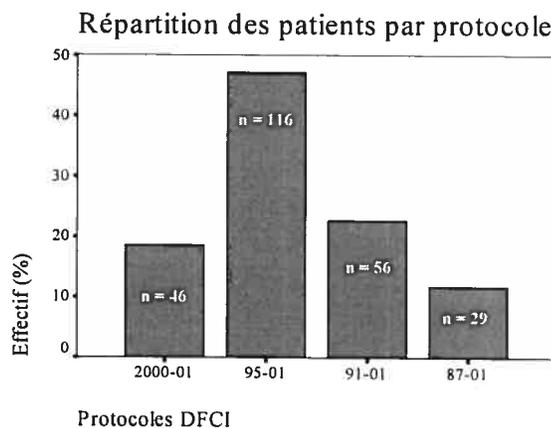


Fig. 6: Répartition des patients en fonction des protocoles du DFCI de 1987 2000.

1. Critères d'éligibilité des protocoles DFCI
 - Age : 0-18 ans.
 - Diagnostic : LLA lymphocytes B ou T à l'exclusion des LLA à lymphocytes B matures.
 - Consentement éclairé signé.
 - Absence de prise de corticoïdes dans les 8 derniers jours.

2. Critères d'inclusion de notre étude
 - Disponibilité des informations cliniques
 - Données de génotypage
 - Descendance européenne
 - Temps de suivi évolutif de la maladie au moins égal au temps moyen d'apparition de premier événement (rechute, décès ou cancer secondaire).

Tableau IV : Répartition des patients en fonction des facteurs de risque.

		Effectif	Pourcentage
Protocoles			
	2000-01	46	18.6%
	95-01	116	47.0%
	91-01	56	22.7%
	87-01	29	11.7%
Total		247	100.0%
Age			
	1 – 10 ans	187	76.0%
	> 10 ans	55	22.4%
	< 1 an	4	1.6%
Total		246	100.0%
Sexe			
	Filles	109	44.3%
	Garçons	137	55.7%
Total		246	100.0%
Leucocytes			
	< 50.10 ⁹ /L	197	80.1%
	> 50.10 ⁹ /L	49	19.9%
Total		246	100.0%
Type cellulaire			
	Lymphocytes B	216	89.6%
	Lymphocytes T	25	10.4%
Total		241	100.0%
Index ADN			
	> 1,16	36	16.6%
	< 1,16	181	83.4%
Total		217	100.0%
Risque			
	Standard	102	41.5%
	Élevé + très élevé	144	58.5%
Total		246	100.0%

3. Critères cliniques de toxicité imputables aux glucocorticoïdes.

Afin d'établir une relation entre les variants des gènes HSD11B1 et NR3C1 et la réponse au traitement chez les patients LLA, des études d'association ont été réalisées entre les profils polymorphiques identifiés et les critères évolutifs de la maladie, ainsi qu'avec des critères cliniques de toxicités des GCs.

L'exposition à fortes doses et prolongée aux GCs conduit au syndrome de Cushing iatrogène composé d'entités cliniques bien établies (Jay, 2001).

Dans le but d'évaluer cette toxicité de façon objective et constante à travers les patients des quatre protocoles de traitement de notre étude, nous avons retenu certains signes cliniques imputables à la voie signalisation du GR (par opposition aux effets secondaires attribuables à la signalisation minéralocorticoïde par excès de GCs tels l'hirsutisme et l'hypertension) :

- Diabète cortico-induit insulino-réquerant au cours de l'induction de rémission.
- Obésité : index de surface corporelle > 95ème percentile pour l'âge selon les courbes de références du NCHS (National Center for Health Statistics), après 1 an de corticothérapie prolongée.
- Troubles du comportement nécessitant la modification du traitement (posologie, mode d'administration ou molécule).
- Infections au cours de l'induction de rémission : chaque événement infectieux a été répertorié selon le type d'agent pathogène (bactérie, mycose ou inconnu) et classé par grade en respectant les critères de toxicité CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0) du NIH (National Institute of Health).
- Complications osseuses tout au long du traitement : ont été considérés les événements d'ostéonécrose et les fractures, et classés par grade selon les critères de toxicité CTCAE du NIH.

D. Analyses statistiques

L'impact du génotype des patients sur l'évolution de la LLA et la toxicité du traitement (critères toxiques de réponse aux GCs) a été estimé par études d'association et analyses de survie.

Les événements permettant d'évaluer l'évolution de la LLA sont l'échec d'induction de rémission, la survenue de rechute, d'un cancer secondaire ou le décès du patient. Le délai d'apparition de l'événement est également pris en compte et définit le temps de survie sans événement (EFS: event free survival), le temps de survie sans maladie

(DFS: disease free survival) ou bien le temps total de survie (OS : overall survival). Le temps de survie des patients n'ayant pas présenté de rechute (cas censurés des analyses de survie Kaplan-Meier) correspond la fin du suivi de notre étude (5ans après l'arrêt du traitement) ou bien à la dernière visite à l'hôpital lors de la dernière phase de surveillance médicale (avril 2005).

Tableau V: Facteurs pronostiques intervenant dans les régressions logistiques et de Cox.

Analyses	Facteurs de Régression logistique	Facteurs de Régression de Cox
Analyses de Survie		Age, sexe Phénotype LLA Nb de lymphocytes au diagnostique Index ADN Risque* Protocole**
Analyses de Toxicité : Diabète Troubles du comportement	Age, sexe Risque* Protocole**	
Analyses de Toxicité : Obésité	Age, sexe Risque* Protocole** Diabète	
Analyses de Toxicité: Mucites	Age, sexe Risque* Protocole** Diabète Nb de lymphocytes au diagnostique	

* risque attribué selon des facteurs pronostiques définis par les protocoles DFCI.

** protocoles DFCI 87-01, 91-01, 95-01 et 2000-01.

Tableau VI : Protocoles du DFCI des patients LLA de notre cohorte [Dalle et al., 2005)].

Protocol	87-01	91-01	95-01	2000-01
Investigational window	Asp x 1 dose (randomized)	Steroids x 3 days (randomized)		
Induction (4 weeks)	Vincristine 1.5 mg/m ² q week Prednisone 40 mg/m ² /day Doxorubicin 30 mg/m ² x 2 doses Mix 40 mg/m ³ 4 g/m ³ (randomized) I.T. Ara-C (dosed by age)	Vincristine 1.5 mg/m ² q week Prednisone 40 mg/m ² /day Doxorubicin 30 mg/m ² x 2 doses Mix 4 g/m ³ I.T. Ara-C (dosed by age)	Vincristine 1.5 mg/m ² q week Prednisone 40 mg/m ² /day Doxorubicin 30 mg/m ² x 2 doses Mix 4 g/m ³ Asparaginase 25,000 Ux 1 dose I.T. Ara-C (dosed by age) D0 I.T. Ara-C + Mix + Hc D16	Vincristine 1.5 mg/m ² q week Prednisone 40 mg/m ² /day Doxorubicin 30 mg/m ² x 2 doses, associated with dextrazoxane for all HR patients Mix 4 g/m ³ Asparaginase 2,500 IU x 1 dose I.T. Ara-C (dosed by age) D0 I.T. Ara-C + Mix + Hc D14 I.T. Ara-C + Mix + HC x 2/week for 2 weeks then q 9 week x 6 then q18 weeks (SR) or as HR patients in 91-01 (HR) x 2 + cranial XRT 1,200 cGy (HR CNS neg) or 1,800 cGy (HR CNS pos)
CNS treatment (3 weeks)	I.T. Mix + Ara-C x 2/ weeks for 2 weeks then q 18 weeks (SR) + cranial XRT 1,800 cGy (HR)	I.T. Mix + Ara-C x 2/week for 2 weeks then q 18 weeks (SR girls) + cranial XRT 1,800 cGy (SR boys and HR)	I.T. Mix + Ara-C x 2/week for 2 weeks then x 1/9 week for 6 weeks then q18 weeks or as HR patients in 91-01 (randomized) + cranial XRT 1,800 cGy (8 or 10 fractions, randomized)	I.T. Ara-C (dosed by age) D0 I.T. Ara-C + Mix + HC x 2/week for 2 weeks then q 9 week x 6 then q18 weeks (SR) or as HR patients in 91-01 (HR) x 2 + cranial XRT 1,200 cGy (HR CNS neg) or 1,800 cGy (HR CNS pos)
Intensification (≈30 weeks), q 3-week cycles	SR: VCR 2 mg/m ² i.v. x 1 dose 6-MP 50 mg/m ² /day P.os x 14 d Pred 40 mg/m ² /day x 5 days Mix 30 mg/m ² i.m. q week Asp 25,000 U/m ² i.m. q week x 20	SR: idem 87-01 except Dexa 6 mg/m ² /day x 5 days (instead of Pred)	SR: idem 87-01	SR: idem 87-01 except randomization between Pred and Dexa Asparaginase 25,000 U fixed dose or individualized dosing x 30
Maintenance (until 2 years following CR)	HR: idem SR patients except Pred 120 mg/m ² /day x 5 days Dox 30 mg/m ² q 3 weeks up to cumulative dose of 360 mg/m ² VHR: idem HR plus Mix 130 mg/m ² i.v. x 2 doses Ara-C 100 mg/kg q 12h x 6 Idem intensification without Asp	HR: idem 87-01 except Dexa 18 mg/m ² /days x 5 days (instead of pred) Dox cumulative dose: 360 mg/m ² VHR: idem HR plus Mix 130 mg/m ² i.v. x 2 doses Ara-C 100 mg/kg q 12h x 6 Idem 87-01	HR: idem 87-01 except randomization for dextrazoxane with Dox Dox cumulative dose: 300 mg/m ²	HR: idem 87-01 except dextrazoxane for all patients Dox cumulative dose: 300 mg/m ² Idem

Ara-C: cytarabine; Asp, asparaginase; Dexa, dexamethasone; Dox, doxorubicin; I.T., intrathecal; Mix, methotrexate; Pred, prednisolone; VCR, vincristine (maximum dose 2 mg); 6-MP, 6-mercaptopurine; SR, standard risk; HR, high risk; VHR, very high risk; CNS, central nervous system; XRT, radiotherapy.
Adapted from Silverman et al.³

Les études d'association basées sur l'analyse du chi-deux ont déterminé si les différents polymorphismes étaient reliés à l'évolution de la maladie et aux critères cliniques de toxicité des GCs. La significativité de cette association a été établie par le test exact de Fisher et sa force d'association exprimée par calcul de l'odds ratio (OR) avec intervalle de confiance (IC) à 95%.

Les analyses de survie réalisées par la méthode de Kaplan-Meier ont permis l'étude de l'évolution de la LLA en fonction du génotype des patients. La significativité de ces analyses a été établie par le facteur de comparaison Log Rank.

Les résultats significatifs des analyses d'association et de survie ont été rationalisés par régression logistique et régression de Cox avec estimation de l'OR et du hazard ratio (HR) respectivement, avec un IC à 95% et une significativité p correspondante. Les facteurs utilisés pour ces régressions sont des facteurs pronostiques décrits précédemment (Introduction, Chap A., parag. 4), et résumés dans le tableau V. Aux régressions logistiques des résultats d'association du génotype et obésité et du génotype et mucites s'ajoute le facteur de survenue de diabète.

La significativité de tous les tests a été considérée positive pour des valeurs de $p \geq 0,05$.

Toutes les analyses ont été exécutées avec le logiciel SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 11.0.

V. Résultats

A. HSD11B1

1. SNPs identifiés

Le gène HSD11B1 codant pour la 11 β HSD1 est constitué de 6 exons qui, avec la région régulatrice 5', prennent place en position q32,2 du chromosome 1.

- Le séquençage de la région codante a permis d'identifier 2 nouveaux SNPs :
 - Le variant HSD11B1 3368879 G/A, situé à 8 nucléotides en amont de l'exon 5, sans impact prédit sur l'épissage après simulation *in silico* (Genescan software).

HSD11B1 3368879 GTCAATTTAGGGAA 3368891

└─→
Exon 5

- Le variant HSD11B1 3370838 G/C, situé en position 85 de l'exon 6 et synonyme.

HSD11B1 3370838 GGGAGCTCTGCGC 3370850

→
Exon 6

- Quatre autres SNPs ont aussi été identifiés dans la région régulatrice du gène:
 - Le rSNP HSD11B1 3340765 G/T
HSD11B1 3340765 GTAAACTTTTT 3340777
 - Le rSNP HSD11B1 3340677 T/A
HSD11B1 3340677 TCCATTGCACTT 3340688

- Le rSNP HSD11B1 3340083 T/C
HSD11B1 3340083 TTGATGAATGTT 3340095
- Le rSNP HSD11B1 3339998 A/T
HSD11B1 3339998 ACCCTCACAGCT 3340010

2. Fréquences alléliques

Le génotypage des 184 individus d'origines ethniques diverses a permis d'établir les fréquences alléliques des 6 polymorphismes, essentiellement présents dans la population d'origine africaine sub-saharienne (Tableau VII). Un rSNP est présent à 25% dans cette population et est également polymorphique au sein des populations du Moyen-Orient (8%) et de l'Asie (6%). Aucun des variants étudiés n'est retrouvé polymorphique dans notre population d'intérêt européenne. Nous n'avons donc pas poursuivi leur étude au sein de notre cohorte de patients.

Tableau VII: Fréquences alléliques des variants du gène HSD11B1 génotypés.

Origine des Populations	HSD11B1 3368879 G/A	HSD11B1 3370838 G/C	HSD11B1 3340765 G/T	HSD11B1 3340677 T/A	HSD11B1 3340083 T/C	HSD11B1 3339998 A/T
<i>Afrique sub-saharienne</i>	4%	4%	4%	25%	10%	2%
<i>Moyen-Orient</i>	-	-	2%	8%	-	-
<i>Europe</i>	-	-	-	1%	-	-
<i>Asie</i>	-	-	-	6%	-	-
<i>Amériidiens</i>	-	-	-	1%	-	-

B. NR3C1

1. SNPs étudiés et fréquences alléliques

Quatre SNPs situés dans la région régulatrice du gène NR3C1 ont été génotypés parmi 184 individus de diverses origines ethniques. Ils ont été numérotés en fonction de leur localisation à partir 1^{er} nucléotide transcrit de l'exon 1C (Tableau VIII). Le SNP NR3C1 -627 A/G est retrouvé avec une fréquence allélique de 19% dans notre population d'intérêt européenne et a donc été étudié au sein de notre cohorte de patients LLA.

Tableau VIII: Fréquences alléliques des variants du gène NR3C1 génotypés.

Origine des Populations	NR3C1 - 1719 C/T	NR3C1 - 627 A/G	NR3C1 - 193 A/C	NR3C1 - 119 G/A
<i>Afrique subsaharienne</i>	-	8.9%	-	19%
<i>Moyen-Orient</i>	1.8%	16%	1.6%	-
<i>Europe</i>	1%	19%	-	-
<i>Asie</i>	5.7%	-	4.3%	-
<i>Amérindiens</i>	-	1%	1.6%	-

2. Impact du génotype NR3C1 -627 A/G

a. Évolution de la LLA : Analyses de survie en fonction du génotype NR3C1 -627 A/G

Tous les événements comprennent les rechutes ou les décès. Etant donné que tous les patients décédés de notre cohorte ont présenté une rechute, il n'existe pas de patient dont le seul événement ait été le décès. On retrouve alors un effectif de patients ayant présenté un événement identique à celui de ceux qui ont subi une rechute, et un temps

de survie sans événement (EFS : event free survival) équivalent au temps de survie sans rechute (DFS : disease free survival).

Tableaux IX: Répartitions des évènements, rechutes et décès en fonction du génotype NR3C1 -627 A/G.

			NR3C1 -627 A/G		Total
			AA	AG/GG	
Évènement	Non	Effectif %	141 69.1%	63 30.9%	204 100.0%
	Oui	Effectif %	36 87.8%	5 12.2%	41 100.0%
Total		Effectif %	177 72.2%	68 27.8%	245 100.0%

			NR3C1 -627 A/G		Total
			AA	AG/GG	
Rechutes	Non	Effectif %	141 69.1%	63 30.9%	204 100.0%
	Oui	Effectif %	36 87.8%	5 12.2%	41 100.0%
Total		Effectif %	177 72.2%	68 27.8%	245 100.0%

			NR3C1 -627 A/G		Total
			AA	AG/GG	
Décès	Non	Effectif %	160 70.8%	66 29.2%	226 100.0%
	Oui	Effectif %	17 89.5%	2 10.5%	19 100.0%
Total		Effectif %	177 72.2%	68 27.8%	245 100.0%

Parmi les 245 enfants remplissant les critères de suivi de notre étude, 41 (16,7%-donnée non exposée) ont présenté une rechute avant avril 2005, avec une augmentation d'EFS significative pour les patients possédant l'allèle mineur G (AG/GG). (test exact de Fisher : $p=0.009$, OR = 0.311, IC à 95% = 0.116-0.829) (Tableau IX). Il n'existe pas de différence significative dans la survenue de décès.

Les analyses de survie Kaplan-Meier retrouvent une différence d'EFS avec des évènements significativement moins fréquents et moins précoces pour les patients porteurs de l'allèle mineur G ($p=0.02$) (Fig. 7). Cet effet protecteur des rechutes est conservée après ajustement par calcul du hazard ratio par régression de Cox. (HR = 0.35, IC à 95% = 0.1-0.9, $p=0.03$).

L'analyse de survie Kaplan-Meier retrouve une augmentation significative d'EFS pour les patients avec l'allèle G recevant la prednisone ($p=0.04$) (Fig.8). Les courbes de survie révèlent la même tendance pour les patients recevant de la dexaméthasone, mais cette différence n'est pas retrouvée significative ($p=0.4$), probablement à cause du petit nombre de patients de ce groupe ($n=12$).

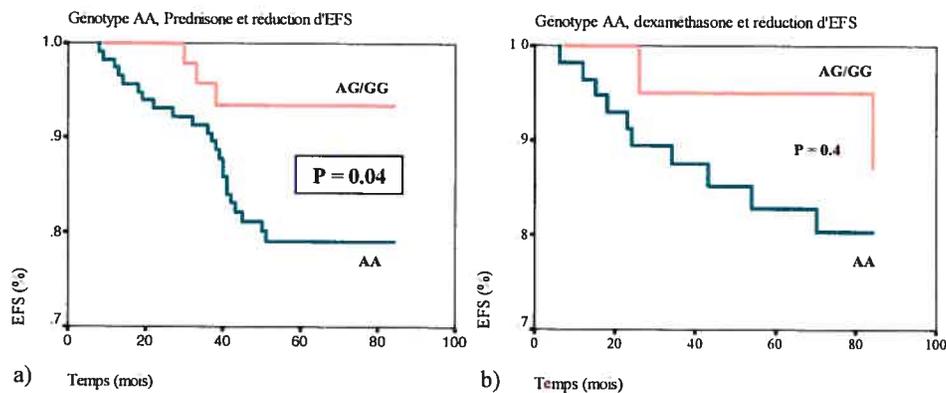


Fig 8: a) Association significative de la présence de l'allèle G avec une augmentation d'EFS pour les patients traités par prednisone. b) Absence d'association significative pour les patients traités par dexaméthasone.

b. Toxicité des glucocorticoïdes : Études d'association NR3C1 -627 A/G et critères cliniques de toxicité des GCs.

i. *Diabète cortico-induit*

Parmi les 247 patients étudiés, 17 ont présenté un déséquilibre glycémique cortico-induit insulino-réquant. On retrouve une différence de répartition des patients en fonction de leur génotype avec une tendance plus élevée au diabète cortico-induit pour les patients homozygotes pour l'allèle mineur G ($p=0.1$, OR=5, IC à 95% =0.9-27) (Tableau XI).

Tableau XI: Analyse d'association: Génotype et Diabète

	DIABÈTE		Total
	Non	Oui	
NR3C1 -627 Allèle A - (GG) Effectif A/G %	6	2	8
	2.6%	11.8%	3.2%
Allèle A+ (AA/AG) Effectif %	224	15	239
	97.4%	88.2%	96.8%
Total	230	17	247
	100.0%	100.0%	100.0%

Cette différence de susceptibilité au diabète sous corticoïdes reste significative après régression logistique (OR = 6, IC à 95% = 1- 40, $p = 0.05$) (Tableau XII).

Tableau XII : Régression logistique : génotype et diabète.

	B	E.S.	Wald	ddl	Signif.	Exp(B)	IC pour Exp(B) 95.0%	
							Inférieur	Supérieur
Protocoles	-.823	.348	5.594	1	.018	.439	.222	.868
Sexe	-.487	.545	.801	1	.371	.614	.211	1.786
Age	1.636	.595	7.571	1	.006	5.136	1.601	16.472
Risque	-.141	.761	.034	1	.853	.869	.195	3.861
NR3C1-627 allèle A + (AA/AG) vs A- (GG)	1.849	.942	3.847	1	.050	6.351	1.001	40.277
Constante	-2.903	1.178	6.077	1	.014	.055		

ii. Obésité

Concernant l'apparition d'une obésité sous corticothérapie prolongée, 29 des patients ont présenté surcharge pondérale avec un poids supérieur au 95ème percentile pour leur âge. Aucune association statistiquement significative n'a été retrouvée avec le statut génotypique de notre SNP d'intérêt (Tableau XIII).

Tableau XIII : Analyses d'association : génotype et obésité.

			OBÉSITÉ		Total
			Non	Oui	
NR3C1 -627 A/G	Allèle A - (GG)	Effectif	7	1	8
		%	3.2%	3.4%	3.2%
	Allèle A + (AA/AG)	Effectif	211	28	239
		%	96.8%	96.6%	96.8%
Total		Effectif	218	29	247
		%	100.0%	100.0%	100.0%

iii. Infections

1) Infections générales

Au cours de l'induction de rémission, 99 enfants ont présenté au moins un épisode infectieux quel qu'en soit l'agent responsable. Cette analyse générale des événements infectieux n'a pas révélé d'association significative avec le génotype NR3C1-627 A/G des patients de notre cohorte (Tableau XIV).

Tableau XIV : Analyses d'association : génotype et infections.

			Infections		Total
			Non	Oui	
NR3C1 -627 A/G	Allèle A - (GG)	Effectif	3	5	8
		%	2.0%	5.1%	3.2%
	Allèle A + (AA/AG)	Effectif	145	94	239
		%	98.0%	94.9%	96.8%
Total		Effectif	148	99	247
		%	100.0%	100.0%	100.0%

2) Infections bactériennes

Concernant les infections d'origine bactérienne, 52 enfants ont présenté au moins un événement infectieux bactérien, parmi lesquels 46 correspondaient à des infections bactériennes de grade 3 ou 4. Cependant, aucune association significative n'a corrélié notre SNP d'intérêt à l'incidence des épisodes bactériens en général, ni en fonction de leurs grades (Tableau XV).

Tableau XV: Analyses d'association : génotype et a) infections bactériennes générales, b) infections bactériennes grades 3 et 4.

a)

			Infections Bactériennes		Total
			Non	Oui	
NR3C1 -627 A/G	Allèle A - (GG)	Effectif	7	1	8
		%	3.6%	1.9%	3.2%
	Allèle A + (AA/AG)	Effectif	188	51	239
		%	96.4%	98.1%	96.8%
Total		Effectif	195	52	247
		%	100.0%	100.0%	100.0%

b)

			Infection bactérienne grade 3 ou 4		Total
			non	oui	
NR3C1 -627 A/G	Allèle A - (GG)	Effectif	7	1	8
		%	87.5%	12.5%	100.0%
	Allèle A + (AA/AG)	Effectif	194	45	239
		%	81.2%	18.8%	100.0%
Total		Effectif	201	46	247
		%	81.4%	18.6%	100.0%

3) Infections mucoales

Etant donnée la contribution du MTX dans l'émergence des mucites, 3 à 6 jours après traitement (Rask et al., 1998; Sonis, 1998), aucun patient ayant présenté une mucite dans cette période (n=7) n'a été pris en compte dans nos analyses d'association ni de régression logistique.

Ces analyses rapportent 45 cas de mucites au cours de l'induction de rémission. Le statut homozygote pour l'allèle G est associé de façon statistiquement significative à un risque de survenue de mucites plus important ($p=0.02$, OR=6, IC à 95% = 1-29) (Tableau XVI).

Tableau XVI : Analyses d'association : génotype et mucites.

			Mucite		Total
			Non	Oui	
NR3C1 -627 A/G	Allèle A - (GG)	Effectif	3	4	7
		%	1.5%	8.9%	2.9%
	Allèle A + (AA/AG)	Effectif	192	41	233
		%	98.5%	91.1%	97.1%
Total		Effectif	195	45	240
		%	100.0%	100.0%	100.0%

Cette différence de survenue de mucite en fonction du génotype NR3C1 -627 reste significative après régression logistique (OR = 7, IC à 95% = 1.5-31, p=0.012) (Tableau XVII).

Tableau XVII : Régression logistique : génotype et mucites.

	B	E.S.	Wald	ddl	Signif.	Exp(B)	IC pour Exp(B) 95.0%	
							Inférieur	Supérieur
Protocoles	-.467	.207	5.094	1	.024	.627	.418	.940
Sexe	-.045	.338	.018	1	.894	.956	.493	1.855
Age	.412	.396	1.084	1	.298	1.510	.695	3.278
Risque	.108	.403	.072	1	.789	1.114	.505	2.456
NR3C1-627 GG vs (AA+AG)	1.930	.771	6.259	1	.012	6.890	1.519	31.256
Diabète	.304	.596	.259	1	.611	1.355	.421	4.360
Constante	-1.202	.710	2.864	1	.091	.301		

iv. *Complications Osseuses*

Aucune association n'a été retrouvée entre le génotype NR3C1-627 A/G et la survenue d'ostéonécrose ou de fractures (Tableau XVIII).

Tableau XVIII : Analyses d'association : génotype et a) ostéonécrose, b) fracture.

a)

			Ostéonécrose		Total
			Non	Oui	
NR3C1 -627 A/G	Allèle A - (GG)	Effectif	8		8
		%	3.6%		3.3%
	Allèle A + (AA/AG)	Effectif	213	19	232
		%	96.4%	100.0%	96.7%
Total		Effectif	221	19	240
		%	100.0%	100.0%	100.0%

b)

			Fracture		Total
			Non	Oui	
NR3C1 -627 A/G	Allèle A - (GG)	Effectif	8		8
		%	3.5%		3.3%
	Allèle A + (AA/AG)	Effectif	223	9	232
		%	96.5%	100.0%	96.7%
Total		Effectif	231	9	240
		%	100.0%	100.0%	100.0%

v. *Troubles du comportement*

L'étude de l'apparition de troubles du comportement sous corticothérapie prolongée retrouve 18 patients ayant nécessité une adaptation ou modification de leur traitement. Il existe une tendance vers un risque plus élevé de survenue de cet événement chez les patients homozygotes GG ($p=0.1$, OR =5, IC à 95% = 0.9-25) (Tableau XIX).

Tableau XIX : Analyses d'association : génotype et troubles du comportement.

			Troubles du comportement		Total
			Non	Oui	
NR3C1 - A/G	Allèle A - (GG)	Effectif	6	2	8
		%	2.6%	11.1%	3.2%
	Allèle A + (AA/AG)	Effectif	223	16	239
		%	97.4%	88.9%	96.8%
Total		Effectif	229	18	247
		%	100.0	100.0	100.0

Cette association n'est conservée après régression logistique ($p=0.1$, $OR=4$, IC à 95% = 0.7-22).

3. Impact des haplotypes NR3C1-627/*BCL1*

Le statut homozygote CC pour le RFLP *BCL1* (NR3C1 IVS2+646G/C) ayant démontré un impact sur la survie des patients LLA (Fleury et al., 2003; Fleury et al., 2004), nous avons voulu étudier le rôle de l'haplotype formé par les deux polymorphismes NR3C1 -627A/G et IVS2+646G/C sur l'évolution de la LLA.

a. Répartition des haplotypes

L'établissement des haplotypes parmi les 217 patients génotypés pour les deux polymorphismes a été effectué par utilisation du logiciel Phase. Ces deux polymorphismes sont en apparent déséquilibre de liaison avec trois haplotypes retrouvés sur quatre possibilités.

Ces haplotypes ont été arbitrairement désignés haplotypes 1, 2 et 3 (tableau XX) et sont respectivement présents aux fréquences de 49,5%, 35,7% et 14,8%. Il existent alors 6 combinaisons de paires d'haplotypes dont la fréquence en individus, avec et sans événement, est donnée dans le tableau XXI.

Tableaux XX et XXI : répartition des haplotypes et fréquences en fonction de la survenue d'événement.

NR3C1 -627 A/G	BCL1 NR3C1 IVS2 +646 G/C	Haplotypes
A	G	1
A	C	2
G	G	3

		Évènement		Total	
		Non	Oui		
Haplotypes	11	Effectif	46	6	52
		%	25.8%	15.4%	24.0%
	12	Effectif	64	21	85
		%	36.0%	53.8%	39.2%
	13	Effectif	23	3	26
		%	12.9%	7.7%	12.0%
	22	Effectif	17	6	23
		%	9.6%	15.4%	10.6%
	23	Effectif	23	1	24
		%	12.9%	2.6%	11.1%
	33	Effectif	5	2	7
		%	2.8%	5.1%	3.2%
Total		Effectif	178	39	217
		%	100.0%	100.0%	100.0%

L'analyse de survie des 6 combinaisons d'haplotypes tend vers une différence d'EFS dépendante de la présence des l'haplotypes 2 ou 3 (Fig. 9, $p=0.06$). De ce fait, nous avons réalisé nos analyses en regroupant les haplotypes en groupes d'haplotypes comme suit :

Groupe 3 : haplotypes possédant l'haplotype 3 soit 33, 23 et 13.

Groupe 2 : haplotypes possédant l'haplotype 2 soit 22 et 12.

Groupe 1 : haplotypes possédant l'haplotype 1 soit 11.

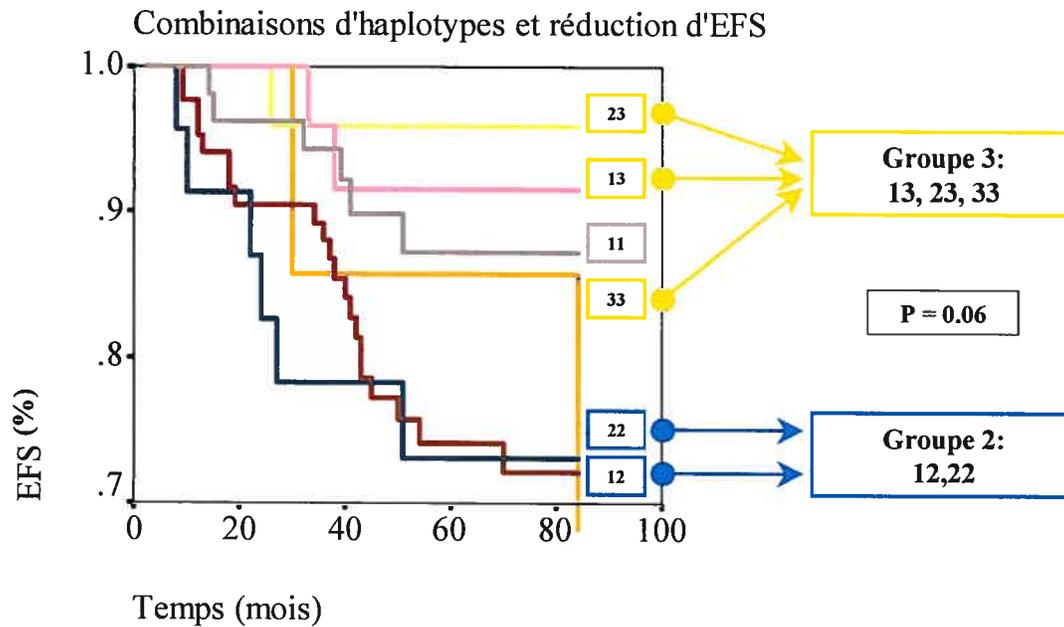


Fig 9: Les haplotypes semblent être regroupés différemment en fonction de leur influence sur la probabilité de réduction d'EFS. Les patients porteurs de l'haplotype 3 présentent une meilleure évolution de la LLA tandis que ceux portant l'haplotype 2 présentent une plus forte probabilité de réduction d'EFS.

b. Évolution de la LLA et haplotypes NR3C1-627/*BCL1*

Les patients LLA du groupe 2 sont associés de façon significative à la survenue d'un événement ($p=0.03$) (Tableau XXII).

Tableau XXII: Association des patients du groupe d'haplotypes 2 à la survenue d'un événement.

		Évènement		Total	
		Non	Oui		
Groupes	1	Effectif	46	6	52
		%	25.8%	15.4%	24.0%
2		Effectif	81	27	108
		%	45.5%	69.2%	49.8%
3		Effectif	51	6	57
		%	28.7%	15.4%	26.3%
Total		Effectif	178	39	217
		%	100.0%	100.0%	100.0%

L'analyse de survie en fonction des groupes d'haplotypes (fig.10) retrouve une différence significative de probabilité de réduction d'EFS pour les patients du groupe d'haplotypes 2 ($p=0.02$).

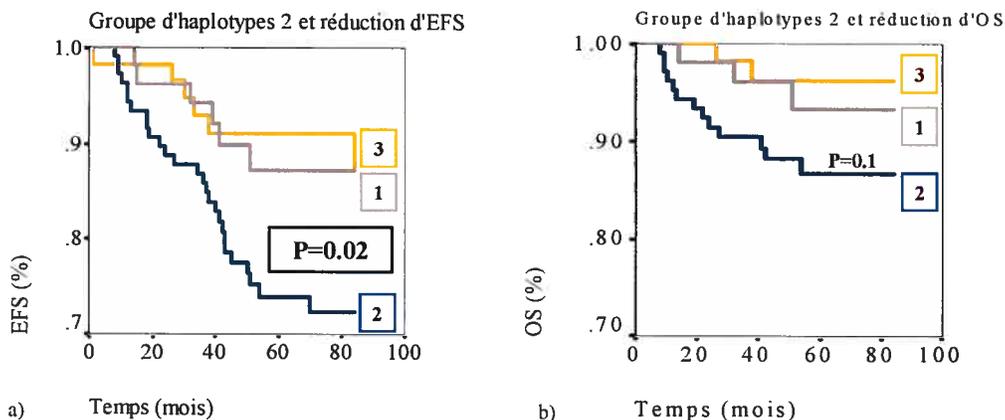


Fig. 10 : Analyses de survie avec a) réduction significative d'EFS pour les patients du groupe d'haplotypes 2 ($p=0.02$) et b) absence de réduction significative d'OS ($P=0.1$).

Cette différence reste significative après régression de Cox avec une réduction d'EFS pour les patients du groupe 2 (HR=3, IC à 95% = 1-6, $p=0,008$) (Tableau XXIII).

Tableau XXIII : régression de Cox : Groupes d'haplotypes et réduction d'EFS.

	B	E.S.	Wald	ddl	Signif.	Exp(B)	95.0% CI pour Exp(B)	
							Inférieure	Supérieure
Age	.393	.389	1.023	1	.312	1.481	.692	3.174
Sexe	-.089	.369	.058	1	.810	.915	.443	1.887
Nb Lymphocytes	.714	.468	2.331	1	.127	2.043	.817	5.110
LLA Phénotype	-.481	.682	.497	1	.481	.618	.162	2.355
Index ADN	.244	.542	.203	1	.652	1.276	.441	3.692
Risque	-.243	.450	.292	1	.589	.784	.325	1.894
Protocole	.299	.245	1.498	1	.221	1.349	.835	2.178
Groupe 2 vs (1+3)	1.061	.399	7.085	1	.008	2.889	1.323	6.310

c. Toxicité des GCs et haplotypes NR3C1-627/BCL1

1. *Diabète cortico-induit*

Les analyses réalisées au sein des 217 patients LLA génotypés pour les 2 SNPS formant les haplotypes décrits précédemment ne révèlent pas d'association significative entre les groupes d'haplotypes et l'apparition d'un diabète sous GCs ($p=0.2$, $OR=1.7$, IC à 95%=0.6-5) (Tableau XXIV).

Tableau XXIV : Diabète et haplotypes.

			DIABÈTE		Total
			Non	Oui	
Groupes d'haplotypes NR3C1	1 et 3	Effectif	103	6	109
		%	51.2%	37.5%	50.2%
	2	Effectif	98	10	108
		%	48.8%	62.5%	49.8%
Total		Effectif	201	16	217
		%	100.0%	100.0%	100.0%

2. *Obésité*

Une association significative est retrouvée chez les patients LLA appartenant au groupe d'haplotype 2 avec un effet protecteur face à l'apparition d'obésité ($p=0.07$, $OR=0.3$, IC à 95%=0.1-0.8) (tableau XXV). Cet effet est conservé après régression logistique ($p=0.02$, $OR=0.3$, IC à 95%=0.1-0.8) (tableau XXVI).

Tableaux XXV et XXVI: Association obésité-haplotypes et conservation après régression logistique.

			Obésité		Total
			Non	Oui	
Groupes d'haplotypes NR3C1	1 et 3	Effectif	89	20	109
		%	46.8%	74.1%	50.2%
	2	Effectif	101	7	108
		%	53.2%	25.9%	49.8%
Total		Effectif	190	27	217
		%	100.0%	100.0%	100.0%

	B	E.S.	Wald	ddl	Signif.	Exp(B)	IC pour Exp(B) 95.0%	
							Inférieur	Supérieur
Diabète	-6.641	24.423	.074	1	.786	.001	.000	8.0E+17
Protocole	-.215	.258	.697	1	.404	.806	.486	1.337
Age	-1.371	.766	3.204	1	.073	.254	.057	1.139
Sexe	.072	.435	.028	1	.868	1.075	.459	2.519
Risque	.609	.468	1.692	1	.193	1.839	.734	4.603
Groupe 2 vs 1+3	-1.084	.474	5.232	1	.022	.338	.134	.856
Constante	.685	1.231	.310	1	.578	1.984		

3. Infections

i. Infections générales et bactériennes

Il n'existe pas d'association entre les haplotypes et l'apparition d'infections en général ($p=0.5$, $OR=1$, IC à $95\%=0.6-2$) (tableau XXVII), ni avec les infections bactériennes ($p=0.2$, $OR=1.3$, IC à $95\%=0.7-3$) (tableau XXVIII), et ceci quelque soit leur grade ($p=0.4$, $OR=1$, IC à $95\%=0.5-2$) (tableau XXIX).

Tableaux XXVII, XXVIII et XXIX: Infections et haplotypes

			Infections		Total
			Non	Oui	
Groupes d'haplotypes NR3C1	1 et 3	Effectif	64	45	109
		%	50.0%	50.6%	50.2%
	2	Effectif	64	44	108
		%	50.0%	49.4%	49.8%
Total		Effectif	128	89	217
		%	100.0%	100.0%	100.0%

			Infections bactériennes		Total
			Non	Oui	
Groupes d'haplotypes NR3C1	1 et 3	Effectif	89	20	109
		%	51.7%	44.4%	50.2%
	2	Effectif	83	25	108
		%	48.3%	55.6%	49.8%
Total		Effectif	172	45	217
		%	100.0%	100.0%	100.0%

			Infections bactériennes de grades 3 et 4		Total
			Non	Oui	
Groupes d'haplotypes NR3C1	1 et 3	Effectif	90	19	109
		%	50.8%	47.5%	50.2%
	2	Effectif	87	21	108
		%	49.2%	52.5%	49.8%
Total		Effectif	177	40	217
		%	100.0%	100.0%	100.0%

ii. Mucites

Les analyses ne retrouvent pas d'association des groupes d'haplotypes à la survenue d'épisodes de mucites ($p=0.9$, $OR=0.6$, $IC \text{ à } 95\%=0.3-1$) (tableau XXX).

Tableau XXX : Mucites et haplotypes.

			Mucites		Total
			Non	Oui	
Groupes d'haplotypes NR3C1	1 et 3	Effectif	80	26	106
		%	47.3%	60.5%	50.0%
	2	Effectif	89	17	106
		%	52.7%	39.5%	50.0%
Total		Effectif	169	43	212
		%	100.0%	100.0%	100.0%

4. Complications Osseuses

Aucune association n'a été retrouvée entre les groupes d'haplotypes et la survenue de complications osseuses, que cela soit les ostéonécroses ($p=0.5$, $OR=1$, $IC \text{ à } 95\%=0.4-2$) (tableau XXXI) ou bien les fractures ($p=0.6$, $OR=1$, $IC \text{ à } 95\%=0.3-4$) (tableau XXXII).

Tableaux XXXI et XXXII: Complications osseuses et haplotypes.

			Ostéonécrose		Total
			Non	Oui	
Groupes d'haplotypes NR3C1	1 et 3	Effectif	99	9	108
		%	51.3%	52.9%	51.4%
	2	Effectif	94	8	102
		%	48.7%	47.1%	48.6%
Total		Effectif	193	17	210
		%	100.0%	100.0%	100.0%

			Fracture		Total
			Non	Oui	
Groupes d'haplotypes NR3C1	1 et 3	Effectif	104	4	108
		%	51.5%	50.0%	51.4%
	2	Effectif	98	4	102
		%	48.5%	50.0%	48.6%
Total		Effectif	202	8	210
		%	100.0%	100.0%	100.0%

5. Troubles du comportement

Il n'existe pas d'association entre les différents groupes d'haplotypes et le risque de survenue d'un trouble du comportement chez les patients LLA de notre étude ($p=0.2$, $OR=0.5$, $IC \text{ à } 95\%=0.2-2$) (tableau XXXIII).

Tableau XXXIII : Troubles du comportement et haplotypes.

			Troubles du comportement		Total
			Non	Oui	
Groupes d'haplotypes NR3C1	1 et 3	Effectif	100	9	109
		%	49.3%	64.3%	50.2%
	2	Effectif	103	5	108
		%	50.7%	35.7%	49.8%
Total		Effectif	203	14	217
		%	100.0%	100.0%	100.0%

VI. Discussion

A. Variants du gène HSD11B1 et réponse aux GCs

Concernant la 11 β -HSD1, plusieurs études associent un déficit enzymatique ou un profil polymorphique à un phénotype endocrinologique relié aux GCs physiologiques. D'autres travaux ont tenté d'identifier des variants génétiques du gène HSD11B1 impliqués dans le syndrome CRD (cortisone reductase deficiency), le diabète, l'obésité ou le syndrome métabolique. À date, 78 SNPs sont répertoriés sur Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), dont 75 sont introniques, 2 en régions régulatrices 5' et 3' et un seul variant synonyme (Ser204Ser) dans la région codante de l'exon 5, soulignant l'extrême conservation de cette enzyme.

Deux SNPs au niveau du 3^{ème} intron du gène HSD11B1 (une insertion d'une base adénine en position 83557 (83557insA) et une substitution T-G en position 83597 (83597T/G)), retrouvés en complet déséquilibre de liaison, ont été associés *in vitro* à un défaut d'expression de la 11 β HSD1 (Tomlinson et al., 2004). Le SNP 83557insA a aussi été retrouvé en association avec l'obésité pédiatrique (Gelernter-Yaniv et al., 2003). Le rôle de la H6PDH dans la facilitation de l'activité réductrice de la 11 β HSD1 par régulation de l'apport en co-facteur NADP(H) a été démontré *in vitro* (Atanasov et al., 2004). Ces 2 SNPs (83557insA et 83597T/G) du gène HSD11B1 ont été étudiés en association avec un variant déficient du gène H6PDH, et ont été associés *in vivo* au syndrome CRD (Draper et al., 2003), révélant la contribution mutuelle de ces variants et en soulignant l'origine polygénique de ce syndrome.

Une autre étude rapporte l'existence d'une délétion de 11pb au niveau de l'intron 1 chez 8 patients obèses (Caramelli et al., 2001). Enfin, l'étude de marqueurs microsatellites associe également le gène HSD11B1 à une élévation de la clearance urinaire des métabolites du cortisol (Draper et al., 2002). Tous ces travaux supportent l'hypothèse d'une relation entre les GCs et la distribution du tissu adipeux via l'augmentation d'activité de la 11 β HSD1.

Enfin, 1 SNP de la région 5'-UTR du gène (Genbank rs846911C-A), n'ayant pas été retrouvé à l'état homozygote pour l'allèle mineur et avec une fréquence rare d'hétérozygotie (0,5%), a révélé être en association avec une réduction de 20% d'expression du gène *in vitro* ainsi qu'un risque 6 fois plus élevé de maladie d'Alzheimer sporadique (de Quervain et al., 2004).

Notre étude a permis d'identifier 4 SNPs de la région régulatrice et 1 SNP en région codante de l'exon 6 et 1 SNP à 8 nucléotides en amont de l'exon 5 du gène HSD11B1. Seul le SNP HSD11B1 3340677 T/A est retrouvé dans toutes les populations ethniques génotypées, avec des fréquences alléliques de 1% dans les populations amérindiennes et européennes, de 6% dans la population asiatique, 8% dans la population du Moyen-Orient et 25% dans la population africaine subsaharienne (Tableau VII). Ces 6 variants n'étant pas polymorphiques dans notre population d'intérêt, leur étude n'a pas été poursuivie dans notre cohorte de patients LLA.

De par les impacts de la 11 β HSD1 sur des désordres métaboliques majeurs concernant les problèmes de santé publique (diabète, obésité et syndrome métabolique), les études pharmacologiques qui lui sont consacrées sont orientées vers la recherche d'inhibition de son activité réductrice des GCs physiologiques. Aucune étude n'associe ces profils au métabolisme ni à la biodisponibilité des GCs de synthèse.

B. Variants du gène NR3C1 et actions des glucocorticoïdes

La multiplicité des différents niveaux de régulation pré-, post-transcriptionnelle et traductionnelle du GR révèle la complexité de ses modes d'action et suggère une variabilité intra-individuelle et inter-individuelle de réponse aux GCs reliées à cette molécule. De ce fait, identifier ses variants et les associer à un profil de réponse constitue un élément majeur de compréhension des différences de réponse aux GCs et d'adaptation des traitements.

1. Variants connus du gène NR3C1

a. *Variants d'épissage pré-transcriptionnel*

Sous contrôle de 3 promoteurs différents (A, B, C), l'épissage alternatif pré-transcriptionnel de l'exon 1 permet l'émergence de 3 variants de l'exon 1A (1A1, 1A2 et 1A3), un de l'exon 1B et un de l'exon 1C. Initialement définis à partir du génome de souris (Strahle et al., 1992), ces trois promoteurs sont maintenant connus chez l'homme (Breslin et al., 2001; Lu and Cidlowski, 2004). Le promoteur 1C, situé à -4kb directement en amont du codon d'initiation de la traduction, a été caractérisé en premier (Nobukuni et al., 1995; Zong et al., 1990), suivi du promoteur 1B, situé à environ -5kb. Ils présentent tous deux une expression ubiquitaire (Nunez and Vedeckis, 2002). Les exons 1A1 et 1A2 n'ont pas d'expression tissulaire spécifique alors que l'exon 1A3 est retrouvé en plus grande abondance dans les cellules lymphoblastiques T (Geng and Vedeckis, 2004; Pedersen et al., 2004). Le rôle de ces différents transcrits non traduits de l'exon 1 n'est pas connu mais leur potentiel régulateur de la transcription et traduction est évoqué chez la souris (Strahle et al., 1992).

Toutefois, l'étude de l'exon 1A et de son promoteur (2,2kb) chez 36 sujets européens n'a pas retrouvé de polymorphismes (Stevens et al., 2004).

Tout récemment, quatre nouveaux exons 1 (1D, 1E, 1F et 1G) ont été identifiés dans le hGR et soulignent à nouveau la disparité de distribution tissulaire (Turner and Muller, 2005).

b. *Variants d'épissage alternatif*

- Les variants hGR- α et hGR- β issus d'épissage alternatif sont les plus documentés (Fig.11). Le GR issu du variant hGR- β est décrit comme incapable de liaison à l'ADN et pouvant avoir un rôle de dominant négatif par dimérisation avec le GR issu du variant hGR- α . Pourtant, concernant la LLA, il a récemment été démontré qu'il n'existe pas de corrélation entre ce ratio (Haarman et al., 2004) et la résistance *in vitro* aux GCs, mais plutôt entre le nombre de GR (Tissing et al., 2005a).
- Le variant hGR- γ correspond à l'insertion d'un résidu arginine entre l'exon 3 et l'exon 4, secondaire au déplacement du cadre de lecture par épissage alternatif (Fig.11). Bien que représentant seulement 3,8 à 8,7% de la proportion de GR transcrit, ce variant mènerait à la diminution de près de la moitié du pouvoir transactivateur du GR (Beger et al., 2003). Concernant la LLA, une corrélation entre la résistance *in vitro* aux GCs et le taux d'expression de hGR- γ des lymphoblastes a récemment été établie (Haarman et al., 2004).
- Le variant hGR-A ne possède pas les exons 5, 6 ni 7. Ce variant a été identifié à partir d'une banque d'ADNc de lignées cellulaires de myélomes, résistantes aux GCs (Moalli et al., 1993) (Fig.11).
- Le variant GR- δ (ou GR-P) ne possède pas les exons 8 et 9 (Fig.11). Ce variant a démontré, lors d'études de co-transfection dans des lignées myéloïdes malignes, des propriétés activatrices de hGR- α , avec un taux d'activité luciférase dexaméthasone-dépendante significativement plus élevé. Des variations de son expression seraient associées à des profils de résistance aux GCs (de Lange et al., 2001).

Il est intéressant de réaliser que tous ces variants d'épissage alternatifs, à part GR- β , sont associés à un profil de résistance aux GCs, et le plus souvent dans des cellules hématologiques ou bien *in vivo*.

c. *Variants traductionnels*

Deux isoformes du récepteurs ont été retrouvées pour chacun des ARNm de hGR- α et hGR- β . Ces deux protéines GR-A (94kD) et GR-B (91 KD) diffèrent par leur site d'initiation de la transcription, avec un ATG interne correspondant à la méthionine 27 de GR-A pour donner GR-B (Zhou and Cidlowski, 2005) (Fig.11). GR-B a révélé une activité transactivatrice deux fois plus importante que GR-A (Yudt and Cidlowski, 2001). Ces deux isoformes n'ont pas été démontrées pour les autres variants (hGR- δ , -A, - γ) du GR.

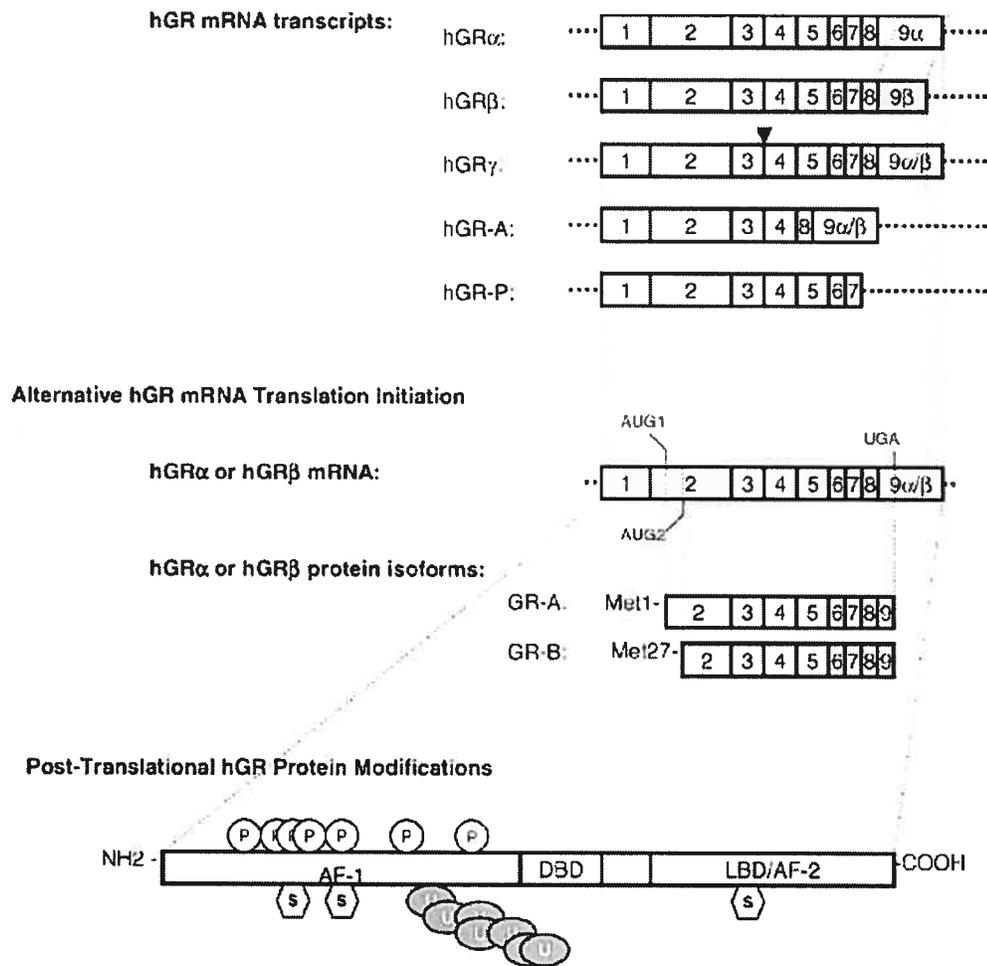


Fig.11 : Variants transcriptionnels, traductionnels et post-traductionnels du gène NR3C1 - [Zhou and Cidlowski, 2005].

d. *Variants post-traductionnels*

La phosphorylation des résidus sérine/thréonine par des enzymes comme les MAP Kinases (mitogen-activated protein kinases), les CDK (cyclin-dépendant kinases), les GSK-3 (glycogen synthetase 3) ou les JNK (c-Jun N-terminal kinase) est aussi un élément de variabilité du GR. Différents taux de phosphorylation peuvent être observés selon le variant, probablement spécifique à chaque promoteur, entraînant des variations d'expression du GR, de sa distribution et sa translocation au noyau et donc de son activité transcriptionnelle (Zhou and Cidlowski, 2005) (Fig.11). A ce processus post-traductionnel de phosphorylation s'ajoute ceux de l'ubiquitination et de la sumoylation, pouvant également intervenir dans la biodisponibilité du GR.

Au total, le seul gène NR3C1 peut, avec 9 possibilités d'exons 1 (1A1 à 1G), conduire à la formation de 7 transcrits aboutissant à l'émergence, après modifications post-traductionnelles, de multiples récepteurs. Ceux-ci ont des taux d'expression et des pouvoirs transactivateurs différents, dépendants de leurs transcrits et/ou du tissu où ils sont synthétisés.

e. *Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)*

Actuellement, 18 polymorphismes identifiés du gène NR3C1 ont été étudiés comprenant 16 SNPs et 2 RFLPs. Onze polymorphismes sont situés au niveau d'exons dont 7 concernent l'exon 2, codant pour le domaine de transactivation N-terminal du récepteur. Trois polymorphismes sont introniques et 4 sont situés en 5' ou 3'-UTR du gène (Bray and Cotton, 2003; Zhou and Cidlowski, 2005).

- Le SNP le plus étudié est N363S (1220A/G-rs6195) (Fig.12), correspondant au remplacement d'un résidu adénine en position 1220 de l'exon 2 par une guanine menant à la substitution d'une asparagine (N) par une sérine (S) au codon 363, et est associé à une augmentation de sensibilité aux GCs lors de tests de suppression à la dexaméthasone (TSD) chez l'humain (Huizenga et al., 1998; Tissing et al., 2005b; Tissing et al., 2003) cette variabilité de

réponse aux GCs n'a pas été démontrée, ni dans notre population d'étude, ni dans d'autres populations LLA (Fleury et al., 2004; Tissing et al., 2005b).

- Le SNP R23K (200G/A-rs6190) correspond à substitution non synonyme du codon 23 (G/A) entraînant le changement d'une arginine (R) pour une lysine (K) (Fig.12). Ce SNP R23K est associé à un profil de résistance aux GCs après TSD (van Rossum et al., 2002). Aucune association au cours du traitement de la LLA n'a été établie (Fleury et al., 2004; Tissing et al., 2005b).
- Le RFLP *BCLI* (NR3C1 IVSB+646G/C) correspond à une substitution d'une base guanine (G) pour une base cytosine (C) au niveau de l'intron B, a été associé à une hypersensibilité du récepteur (Fig.12). Des études ont démontré son association avec certains phénotypes d'obésité et d'hypertension et l'ont relié à un déséquilibre de régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Buemann et al., 1997; Panarelli et al., 1998; Rosmond et al., 2000; Stevens et al., 2004; van Rossum et al., 2003). De plus une combinaison haplotypique formée de *BCLI* et deux autres SNPs de l'intron B a été reliée à une plus grande sensibilité à la dexaméthasone *in vivo* (Stevens et al., 2004). Par ailleurs, des études réalisées par notre laboratoire ont permis de caractériser et d'associer ce polymorphisme à un pronostic défavorable de la LLA chez les patients homozygotes pour l'allèle mineur C (Fleury et al., 2003; Fleury et al., 2004).
- Un SNP à l'extrémité 3' de l'exon 9 (NR3C1 (hGR β) cDNA 3669A/G) a été associé à la polyarthrite rhumatoïde (Derijk et al., 2001) (Fig.12). Il se situe au niveau d'une séquence de déstabilisation de l'ARN messenger, et a été relié à une augmentation de la stabilité de l'ARNm du variant hGR β *in vitro*. (Schaaf and Cidlowski, 2002). Les études préliminaires de notre groupe n'ont pas démontré d'association de ce SNP avec l'évolution de LLA.

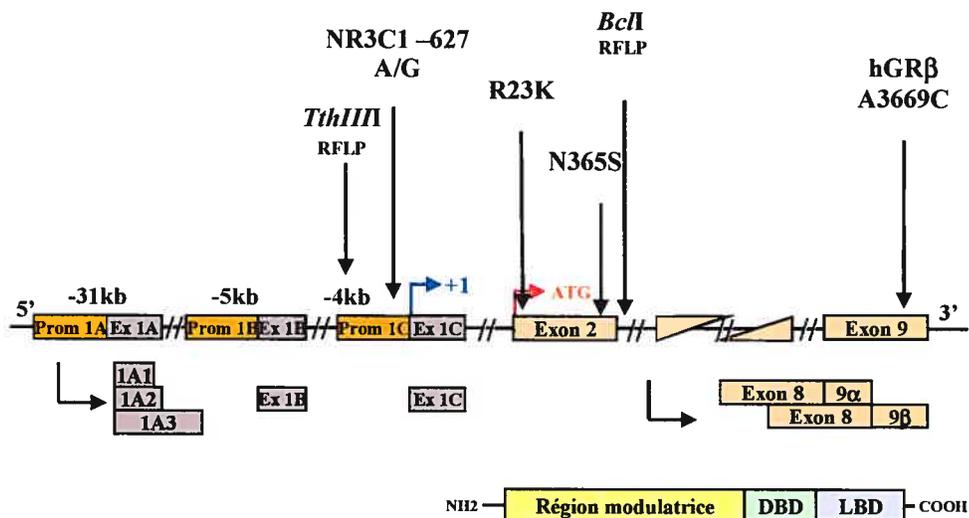


Fig. 12: Polymorphismes du gène NR3C1.

- Le RFLP *TthIII* est situé dans la région 5'UTR du gène, 3807 pb en amont du 1^{er} site de transcription (Fig.12). Ce SNP n'a pas été relié à une différence de réponse aux GCs après tests de suppression à la dexaméthasone (van Rossum et al., 2004). Nos études préliminaires n'ont pas retrouvé d'association avec l'évolution de la LLA pour ce variant.
- Le SNP de notre étude, NR3C1 -627 A/G (rs1482605), situé en 5'UTR du gène, a récemment été identifié de façon indépendante par un autre groupe et associé à l'étiologie de la dépression majeure (van West et al., 2005) (Fig.12). Il est retrouvé avec une fréquence allélique de 15 à 23% (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

2. Variant NR3C1 – 627 A/G et réponse des enfants LLA aux glucocorticoïdes

Au cours de nos analyses d'association, nous avons relié la présence de l'allèle majeur A à un plus faible risque de toxicité aux GCs, en terme de troubles du comportement, de diabète cortico-induit et surtout de mucites. Ces deux dernières associations restant significatives après ajustement, il en résulte que la présence de cet allèle A corrèle avec un profil de sensibilité plus faible au traitement par GCs. De plus, nos analyses de survie Kaplan-Meier démontrent une évolution de la LLA plus péjorative pour les patients homozygotes pour cet allèle, avec un délai plus court et une fréquence de survenue de rechutes significativement plus importante. Il a été démontré que la réponse *in vivo* aux GCs reste informative sur le pronostic de la maladie malgré certains facteurs de risques (age<1an, cellules T, chromosome de Philadelphie (t [9,22])(Dordelmann et al., 1999; Schrappe et al., 1998). Ceci est probablement une explication à la persistance significative de nos résultats après régression de Cox. Tous ces éléments orientent vers un profil moins toxique et *a fortiori* moins sensible des patients homozygotes pour l'allèle A. Les patients hétérozygotes, ne possédant donc qu'un allèle A, ne présentent pas d'effets toxiques significativement différents mais ont une évolution de la maladie moins péjorative en terme de rechute car ne possédant qu'une copie à risque.

Cette variation de sensibilité aux GCs semble être dépendante du type de corticoïdes. Il existe des études de pharmacocinétiques et de pharmacodynamiques démontrant les variations de biodisponibilité de divers GCs de synthèse. A noter par exemple l'inactivation plus importante de la prednisolone par rapport aux autres GCs synthétiques fluorés comme la dexaméthasone (Diederich et al., 2002; Diederich et al., 2004), expliquant la réduction des effets secondaires attribués à la stimulation du récepteur aux minéralocorticoïdes (MR) de la prednisolone. Cette inactivation plus importante suggère une action moins prolongée de la prednisolone par rapport à la dexaméthasone, avec en général moins de toxicité, et peut-être aussi moins d'efficacité.

Nos études de toxicités associent le génotype des patients à des événements cliniques de réponse aux GCs durant l'induction de rémission. Or, il n'existe pas de répartition aléatoire concernant les corticoïdes durant cette phase et seule la prednisone est

administrée (voire ses dérivés prednisolone et méthylprednisolone). Différents GCs sont utilisés pendant l'intensification et la maintenance, avec une répartition aléatoire prednisone versus dexaméthasone pour les protocoles DFCI 91 -01 et 2000-01. Ceci nous a permis d'évaluer, par des analyses de survie, l'influence d'un GC par rapport à l'autre sur l'EFS en fonction du génotype des patients. Cet impact s'est révélé plus important avec la prednisone, retrouvant un risque de réduction d'EFS significatif pour les patients possédant l'allèle majeur A et traités par prednisone ($p=0.04$). Ces analyses de survie corrélerent avec les études d'association de toxicité des GCs de l'induction, où tous les patients ne reçoivent que de la prednisone. Cependant, d'autres éléments de confirmation devront être établis, étant donnée qu'il existe également une différence d'évolution de la LLA pour les patients traités par dexaméthasone, non significative, probablement devant le petit nombre de patients de ce groupe.

Sur le plan moléculaire, le SNP NR3C1 -627A/G prenant position au niveau du promoteur 1C, diverses conséquences de ce polymorphisme sont envisageables. L'étude prédictive *in silico* de ce SNP révèle la substitution d'un site potentiel de transcription de la CPBP (Core promoter-binding protein) avec deux autres sites prédits : celui du complexe NMP4 (nuclear matrix protein 4) /CIZ (Cas-interacting zinc finger protein) et celui du facteur nucléaire d'activation des cellules T (Nuclear factor of activated T-cells). Ces modifications moléculaires prédites restent indicatives et plusieurs autres facteurs ou co-facteurs de transcription pourraient être concernés par cette variation. Une seule étude récente a identifié ce SNP et en démontre l'association avec la dépression majeure (van West et al., 2005). Aucune étude fonctionnelle concernant ce SNP n'a été publiée jusqu'à date. Toutefois, devant le rôle reconnu du nombre de GRs dans la résistance lymphoblastique de la LLA (Tissing et al., 2005a; Tissing et al., 2003), un impact de ce SNP sur le niveau transcriptionnel du GR est un facteur de variabilité de réponse aux GCs à ne pas négliger. Ajoutons que seul le caractère ubiquitaire des exons 1B et 1C a été démontré, et ceci pour le variant majeur actif GR- α (Nobukuni et al., 1995; Nunez and Vedeckis, 2002), mais que le ratio leur d'expression, la régulation de ce ratio et finalement leurs actions spécifiques ne sont pas établis. Par conséquent, nombreuses

sont les possibilités concernant un variant comme celui de notre étude au niveau de l'un des promoteurs, sur le taux d'expression de son propre exon, mais aussi sur l'expression des autres variants connus (exons 1A1, 1A2, 1A3, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, GR- α , GR- β , GR- γ , GR- δ ou GR-A).

De par nos résultats et les éléments de signalisation de la transcription du GR déjà établis, notre hypothèse est que l'allèle majeur A du SNP NR3C1 -627A/G entraîne une diminution de réponse aux GCs par modification de l'accès à certains facteurs et co-facteurs de transcription du promoteur 1C du GR. L'expression de celui-ci pourrait entraîner la répression d'un variant « positif » comme le GR- α , ou l'augmentation d'expression d'un variant « négatif » comme le GR- β , voire réprimer l'expression de l'exon lymphocyte spécifique 1A3. La résultante étant la diminution du nombre de GRs lymphocytaires et donc de la sensibilité aux GCs des patients LLA.

3. Combinaisons haplotypiques NR3C1 - 627 A/G +646G/C et évolution de la LLA.

Chez les enfants atteints de LLA, l'allèle mineur C du RFLP NR3C1 *BcII* a été associé à un plus grand risque de réduction de survie totale (OS) (Fleury et al., 2004). Lors de nos études de combinaisons haplotypiques (fig.9), les patients possédant l'allèle mineur C du RFLP NR3C1 *BcII* et l'allèle majeur A du SNP NR3C1 -627 A/G (haplotype 2) présentaient les risques les plus élevés de rechutes précoces ($p=0,02$) (fig. 10) ainsi que moins d'effets toxiques imputables aux GCs (tab. XXIV et XXIX). De façon opposée, les sujets porteurs de l'haplotype 3 (l'allèle mineur G de NR3C1 *BcII* et l'allèle mineur G de NR3C1 -627 A/G) ont présenté les risques de survenue d'événement les plus faibles et une toxicité plus élevée aux GCs, interrogeant sur l'impact du SNP NR3C1 -627 A/G sur le polymorphisme *BcII*.

Notre étude démontre une association entre ces deux SNPs du GR, avec un impact sur la survie sans événement des enfants LLA. Le caractère fonctionnel du SNP NR3C1 *BcII* a déjà été plusieurs fois suggéré dans des déséquilibres de l'axe

hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Buemann et al., 1997; Rosmond et al., 2000). Etant donnée la localisation en région promotrice du SNP NR3C1 -627 A/G, et tous ces impacts potentiels sur l'expression des différents variants du GR précédemment discutés, nous pouvons suggérer qu'il influence le rôle du SNP *BclII*.

La fonctionnalité derrière ces résultats et ces hypothèses reste toutefois à être établie par RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) ainsi que par des tests de viabilité et de prolifération lymphocytaire, tel le MMT(3-(4,5-diméthyl thiazole-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide)-test.

C. Perspectives

Notre étude de la variabilité de réponse aux GCs au cours du traitement de la LLA en pédiatrie a été concentrée sur 2 gènes candidats, dont les protéines jouent un rôle critique dans le métabolisme et l'action des GCs. Nos résultats permettent d'associer le rôle d'un ou plusieurs SNPs à l'évolution de la maladie et la toxicité de la corticothérapie. Ces résultats pourraient être complétés par l'étude d'autres gènes de la voie d'action des GCs codant pour des protéines clés pouvant potentiellement moduler l'action des GCs.

1. Facteurs en amont du GR

a. *Biodisponibilité sanguine*

L'action des GCs est dépendante de leur métabolisme hépatique et donc des enzymes de détoxification de cette organe. Des variations d'activité de ces enzymes, en particulier les enzymes de la famille des GST, pourraient influencer la réponse aux GCs (Cf. Chap.I, partieC3c). Cet impact n'a pourtant pas été démontré dans une population de patients faiblement répondeurs aux GCs (Anderer et al., 2000).

b. *Biodisponibilité tissulaire*

Plus directement, la biodisponibilité tissulaire des GCs est dépendante des enzymes modulant leur activation et leur inactivation. La prednisone est activée par réduction en prednisolone par la 11 β -HSD1 au niveau hépatique et la dexaméthasone directement active, est oxydée par la 11 β -HSD2 au niveau rénale avant d'être éliminée.

Notre étude du gène de la 11 β -HSD1 n'a pas retrouvé de variant polymorphique dans notre population ethnique d'intérêt (Cf. Chap. V Résultats).

Concernant la 11 β -HSD2, de nombreuses études ont identifié des variants du gène impliqués dans le syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïdes (AME : apparent mineralocorticoids excess) (Draper and Stewart, 2005). Ce syndrome correspond à une déficience 11 β -HSD2 avec excès de GCs, alors disponibles pour

stimuler la voie du MR et provoquer un tableau clinique d'hyperminéralocorticisme. Deux SNPs synonymes, au niveau de l'exon 2 (C468A) et de l'exon 3 (G534A) du gène, ont également été associés au profil d'hypertension sodium induite (Mariniello et al., 2005).

Jusqu'à présent, on ne retrouve pas de travaux associant la 11 β -HSD2 à profil de sensibilité particulier aux GCs de synthèse.

c. Biodisponibilité cellulaire

Les P-glycoprotéines A, B et C sont des protéines composant les pompes cellulaires refluant les GCs de synthèse. Elles sont encodées par le gène *mdr-1* et participent au phénomène de résistance multidrogués (MDR : multidrug resistance). L'impact de ces protéines sur la clearance cellulaire des GCs et leur signalisation est cependant controversé. En effet, certaines études retrouvent une corrélation entre le rôle des P-glycoprotéines et la résistance aux GCs (Bourgeois et al., 1993; Karssen et al., 2001), alors que d'autres travaux ne la retrouvent pas (den Boer et al., 1998).

Au niveau cytosolique, le GR est lié à des protéines chaperonnes qui le maintiennent hors du noyaux et facilitent son accès aux GCs. Parmi elles, on retrouve les protéines hsp (heat shock protein) 90 et hsp70, dont les changements de concentrations intracellulaires et les défauts de liaison au GR ont été associés à une variation de sensibilité aux GCs de cellules hématologiques malignes (Kojika et al., 1996). De plus, la protéine hsp70 est elle-même liée à une protéine co-chaperonne, BAG-1 (Bcl2-associated athanogene), qui module l'activité transcriptionnelle du GR quand elle est surexprimée (Gehring, 2004).

2. Facteurs en aval du GR

Le complexe GC-GR exerce son action transactivatrice en se liant à l'ADN des gènes cibles au niveau de séquences consensus GRE ou nGRE. Cet accès à l'ADN est dépendant de la configuration relâchée ou condensée de la chromatine et de ses mécanismes de remodelage.

Les enzymes histones acétylases (HATs) sont un des outils de régulation de la condensation chromatinienne. Elles acétylent les résidus lysines, arginines et sérines des queues N-terminales des histones, permettant le relâchement de la chromatine. De ce fait, leur activité croît avec la transcription des gènes.

Plus spécifiquement, il a été démontré que certains co-facteurs de transcription possédaient une activité HAT intrinsèque. C'est le cas du co-facteur de liaison CPB (CREB (cAMP response element binding protein)-binding protein), protéine d'échafaudage des complexes de transcription, qui assiste les facteurs de transcription dans leur liaison à l'ADN et l'appuie par son activité HAT. Le CPB est co-facteur de nombreuses molécules dont le GR (Kagoshima et al., 2001). Or, une étude au sein de patients asthmatiques a révélé une association entre les sujets atteints plus sévèrement, répondant moins bien aux traitements, et un variant de l'histone H4 au niveau de la 5^{ème} lysine (H4K5) qui représente une cible critique des GCs dans la voie apoptotique des lymphocytes T (Adcock, 2001).

L'homodimère GC-GR peut également avoir une action transrépressive qui serait majoritairement médiée via le recrutement de facteurs de transcription cibles, comme AP-1 ou de leurs inhibiteurs, comme $I\kappa$ -B α . En se formant, ce complexe de transrépression supprime l'activité transcriptionnelle de ces facteurs. Il a été suggéré qu'un déficit de formation de complexes de transrépression pourrait être un élément de diminution d'action des GCs. Pourtant, aucune variation du taux d'AP-1 ni d' $I\kappa$ -B α n'a été retrouvée chez des patients LLA présentant un profil *in vitro* et *in vivo* faiblement répondeur aux GCs (Tissing et al., 2003).

D. Conclusion

La LLA est le cancer pédiatrique le plus fréquent, dont près de 20% des enfants ne sont actuellement pas guéris, sans mentionner les conséquences à moyen et long terme des chimio- et radiothérapies des enfants en rémission complète. Élargir l'index thérapeutique des médicaments anticancéreux utilisés dans les protocoles de traitement LLA est encore une nécessité. Négocier entre d'un côté, la volonté de repousser les limites de l'échec du traitement, et de l'autre, celle d'alléger la toxicité induite par ces plurithérapies, constituent l'intérêt central des organismes de recherche comme le DFCI, dont les protocoles bénéficient entre autre aux enfants traités à l'hôpital Ste-Justine de Montréal.

Nous avons voulu, par notre étude, contribuer à cette démarche en identifiant des polymorphismes génétiques pouvant être impliqués dans la variabilité de réponse aux GCs chez ces patients LLA. Devant l'impact des GCs dans le traitement de la LLA, toute variation de la réponse aux GCs devient non négligeable. Avec une stratégie par gène candidat, notre étude pharmacogénétique a permis d'identifier 6 SNPs au niveau du gène HSD11B1 (1 SNP synonyme, 1 SNP intronique, 4 rSNPs) et 4 rSNPs au niveau du gène NR3C1.

Un SNP, NR3C1 -627A/G, retrouvé à une fréquence allélique de 19% dans une population de descendance européenne, est associé à un risque élevé de réduction d'EFS ($p=0.02$) ainsi qu'à une toxicité aux GCs plus faible.

Les analyses de survie des haplotypes formés par ce rSNP et un autre variant du GR (*BCL1* IVSB+646G/C) précédemment associé à une réduction de survie totale dans la LLA (patients CC) retrouvent un risque significativement plus important de réduction d'EFS ($p=0.02$) pour les patients porteur de l'allèle C de *BclI* et de l'allèle A de NR3C1 -627 (haplotypes 2). De façon intéressante, les patients porteurs de l'haplotype 3 (allèle G de *BclI*, allèles G de NR3C1-627) ne possèdent pas ce risque de réduction d'EFS. Ceci soulève l'hypothèse d'un effet du variant *BclI* IVSB +646 G/C sur le SNP NR3C1 -627A/G de part leur déséquilibre de liaison.

Devant les résultats de nos études d'association relative à la toxicité des GCs et de nos analyses de survie du rSNP NR3C1 -627 A/G, ainsi que des résultats de nos analyses de survie haplotypiques NR3C1 -627/BclI, nous suggérons que les variants du GR possédant l'allèle majeur A de NR3C1 -627 induisent un plus faible taux d'expression du GR, entraînant une plus faible réponse aux GCs et donc un plus faible risque de toxicité secondaire.

Une hypothèse concernant le SNP *BclI* est que les différentes associations et études fonctionnelles antérieurement démontrées sont influencées par son déséquilibre de liaison avec le rSNP -627 A/G, dont l'impact sur la transcription vient précédemment d'être évoquée.

Des études fonctionnelles de réponse *in vitro* des lymphocytes et des blastes aux GCs (MMT-test), ainsi que des analyses d'expression de ces 2 variants (RT-PCR) pourraient conforter nos hypothèses. D'autres études concernant l'impact des autres variants de transcription du GR entre eux permettraient également de mieux comprendre la complexité de régulation de ce gène ainsi que la subtilité des variations d'expression des GRs, aussi bien sur le plan tissulaire qu'interindividuel.

Finalement, une meilleure compréhension de la variabilité de réponse aux GCs aidera à l'adaptation des traitements, en particulier celle de la corticothérapie prolongée des enfants traités pour une LLA.

Références bibliographiques

- ADCOCK, I. M. (2001). Glucocorticoid-regulated transcription factors. *Pulm Pharmacol Ther*, 14:211-9.
- ANDERER, G., SCHRAPPE, M., BRECHLIN, A. M., LAUTEN, M., MUTI, P., WELTE, K. & STANULLA, M. (2000). Polymorphisms within glutathione S-transferase genes and initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics*, 10:715-26.
- APLENC, R., GLATFELTER, W., HAN, P., RAPPAPORT, E., LA, M., CNAAN, A., BLACKWOOD, M. A., LANGE, B. & REBBECK, T. (2003). CYP3A genotypes and treatment response in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 122:240-4.
- APLENC, R. & LANGE, B. (2004). Pharmacogenetic determinants of outcome in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 125:421-34.
- APLENC, R., THOMPSON, J., HAN, P., LA, M., ZHAO, H., LANGE, B. & REBBECK, T. (2005). Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and therapy response in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*, 65:2482-7.
- ARICO, M., CONTER, V., VALSECCHI, M. G., RIZZARI, C., BOCCALATTE, M. F., BARISONE, E., MESSINA, C., DE ROSSI, G., LO NIGRO, L., PESSION, A., LOCATELLI, F., MICALIZZI, C. & BASSO, G. (2005). Treatment reduction in highly selected standard-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. The AIEOP ALL-9501 study. *Haematologica*, 90:1186-91.
- ARMSTRONG, S. A. & LOOK, A. T. (2005). Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 23:6306-15.
- ATANASOV, A. G., NASHEV, L. G., SCHWEIZER, R. A., FRICK, C. & ODERMATT, A. (2004). Hexose-6-phosphate dehydrogenase determines the reaction direction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as an oxoreductase. *FEBS Lett*, 571:129-33.
- BEGER, C., GERDES, K., LAUTEN, M., TISSING, W. J., FERNANDEZ-MUNOZ, I., SCHRAPPE, M. & WELTE, K. (2003). Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in human leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach. *Br J Haematol*, 122:245-52.
- BENE, M. C. (2005). Immunophenotyping of acute leukaemias. *Immunol Lett*, 98:9-21.
- BODWELL, J. E., WEBSTER, J. C., JEWELL, C. M., CIDLOWSKI, J. A., HU, J. M. & MUNCK, A. (1998). Glucocorticoid receptor phosphorylation: overview, function and cell cycle-dependence. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 65:91-9.
- BOURGOIS, S., GRUOL, D. J., NEWBY, R. F. & RAJAH, F. M. (1993). Expression of an mdr gene is associated with a new form of resistance to dexamethasone-induced apoptosis. *Mol Endocrinol*, 7:840-51.
- BRAY, P. J. & COTTON, R. G. (2003). Variations of the human glucocorticoid receptor gene (NR3C1): pathological and in vitro mutations and polymorphisms. *Hum Mutat*, 21:557-68.
- BRESLIN, M. B., GENG, C. D. & VEDECKIS, W. V. (2001). Multiple promoters exist in the human GR gene, one of which is activated by glucocorticoids. *Mol Endocrinol*, 15:1381-95.

- BRISCO, M. J., CONDON, J., HUGHES, E., NEOH, S. H., SYKES, P. J., SESHADRI, R., TOOGOOD, I., WATERS, K., TAURO, G., EKERT, H. & ET AL. (1994). Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukaemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet*, 343:196-200.
- BUEMANN, B., VOHL, M. C., CHAGNON, M., CHAGNON, Y. C., GAGNON, J., PERUSSE, L., DIONNE, F., DESPRES, J. P., TREMBLAY, A., NADEAU, A. & BOUCHARD, C. (1997). Abdominal visceral fat is associated with a BclI restriction fragment length polymorphism at the glucocorticoid receptor gene locus. *Obes Res*, 5:186-92.
- CARAMELLI, E., STRIPPOLI, P., DI GIACOMI, T., TIETZ, C., CARINCI, P. & PASQUALI, R. (2001). Lack of mutations of type 1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene in patients with abdominal obesity. *Endocr Res*, 27:47-61.
- CHESSELLS, J. M. (1995). Risk analysis in acute lymphoblastic leukaemia: problems and pitfalls. *Eur J Cancer*, 31A:1656-9.
- CHESSELLS, J. M., RICHARDS, S. M., BAILEY, C. C., LILLEYMAN, J. S. & EDEN, O. B. (1995). Gender and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukaemia: report from the MRC UKALL trials. *Br J Haematol*, 89:364-72.
- COLBY-GRAHAM, M. F. & CHORDAS, C. (2003). The childhood leukemias. *J Pediatr Nurs*, 18:87-95.
- COOPER, M. S., BLUMSOHN, A., GODDARD, P. E., BARTLETT, W. A., SHACKLETON, C. H., EASTELL, R., HEWISON, M. & STEWART, P. M. (2003). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity predicts the effects of glucocorticoids on bone. *J Clin Endocrinol Metab*, 88:3874-7.
- DALLE, J. H., MOGHRABI, A., ROUSSEAU, P., LECLERC, J. M., BARRETTE, S., BERNSTEIN, M. L., CHAMPAGNE, J., DAVID, M., DEMERS, J., DUVAL, M., HUME, H., MEYER, P. & CHAMPAGNE, M. A. (2005). Second induction in pediatric patients with recurrent acute lymphoid leukemia using DFCI-ALL protocols. *J Pediatr Hematol Oncol*, 27:73-9.
- DE LANGE, P., SEGEREN, C. M., KOPER, J. W., WIEMER, E., SONNEVELD, P., BRINKMANN, A. O., WHITE, A., BROGAN, I. J., DE JONG, F. H. & LAMBERTS, S. W. (2001). Expression in hematological malignancies of a glucocorticoid receptor splice variant that augments glucocorticoid receptor-mediated effects in transfected cells. *Cancer Res*, 61:3937-41.
- DE QUERVAIN, D. J., POIRIER, R., WOLLMER, M. A., GRIMALDI, L. M., TSOLAKI, M., STREFFER, J. R., HOCK, C., NITSCH, R. M., MOHAJERI, M. H. & PAPASSOTIROPOULOS, A. (2004). Glucocorticoid-related genetic susceptibility for Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 13:47-52.
- DEN BOER, M. L., PIETERS, R., KAZEMIER, K. M., ROTTIER, M. M., ZWAAN, C. M., KASPERS, G. J., JANKA-SCHAUB, G., HENZE, G., CREUTZIG, U., SCHEPER, R. J. & VEERMAN, A. J. (1998). Relationship between major vault protein/lung resistance protein, multidrug resistance-associated protein, P-glycoprotein expression, and drug resistance in childhood leukemia. *Blood*, 91:2092-8.
- DENIS R. MILLER, R. L. B. (1995). *Blood Diseases of Infancy and Childhood*.
- DERIJK, R. H., SCHAAF, M. & DE KLOET, E. R. (2002). Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 81:103-22.
- DERIJK, R. H., SCHAAF, M. J., TURNER, G., DATSON, N. A., VREUGDENHIL, E., CIDLOWSKI, J., DE KLOET, E. R., EMERY, P., STERNBERG, E. M. & DETERA-

- WADLEIGH, S. D. (2001). A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 28:2383-8.
- DIEDERICH, S., EIGENDORFF, E., BURKHARDT, P., QUINKLER, M., BUMKE-VOGT, C., ROCHEL, M., SEIDELMANN, D., ESPERLING, P., OELKERS, W. & BAHR, V. (2002). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2: an important pharmacokinetic determinant for the activity of synthetic mineralo- and glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab*, 87:5695-701.
- DIEDERICH, S., SCHOLZ, T., EIGENDORFF, E., BUMKE-VOGT, C., QUINKLER, M., EXNER, P., PFEIFFER, A. F., OELKERS, W. & BAHR, V. (2004). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of synthetic mineralocorticoids and glucocorticoids: receptor transactivation and prereceptor metabolism by 11beta-hydroxysteroid-dehydrogenases. *Horm Metab Res*, 36:423-9.
- DORDELMANN, M., REITER, A., BORKHARDT, A., LUDWIG, W. D., GOTZ, N., VIEHMANN, S., GADNER, H., RIEHM, H. & SCHRAPPE, M. (1999). Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 94:1209-17.
- DRAPER, N., ECHWALD, S. M., LAVERY, G. G., WALKER, E. A., FRASER, R., DAVIES, E., SORENSEN, T. I., ASTRUP, A., ADAMSKI, J., HEWISON, M., CONNELL, J. M., PEDERSEN, O. & STEWART, P. M. (2002). Association studies between microsatellite markers within the gene encoding human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and body mass index, waist to hip ratio, and glucocorticoid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*, 87:4984-90.
- DRAPER, N. & STEWART, P. M. (2005). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *J Endocrinol*, 186:251-71.
- DRAPER, N., WALKER, E. A., BUJALSKA, I. J., TOMLINSON, J. W., CHALDER, S. M., ARLT, W., LAVERY, G. G., BEDENDO, O., RAY, D. W., LAING, I., MALUNOWICZ, E., WHITE, P. C., HEWISON, M., MASON, P. J., CONNELL, J. M., SHACKLETON, C. H. & STEWART, P. M. (2003). Mutations in the genes encoding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase interact to cause cortisolone reductase deficiency. *Nat Genet*, 34:434-9.
- DUCLOS, M., MARQUEZ PEREIRA, P., BARAT, P., GATTA, B. & ROGER, P. (2005). Increased cortisol bioavailability, abdominal obesity, and the metabolic syndrome in obese women. *Obes Res*, 13:1157-66.
- EICHELBAUM, M., INGELMAN-SUNDBERG, M. & EVANS, W. E. (2005). Pharmacogenomics and Individualized Drug Therapy. *Annu Rev Med*.
- FLEURY, I., BEAULIEU, P., PRIMEAU, M., LABUDA, D., SINNETT, D. & KRAJINOVIC, M. (2003). Characterization of the BclII polymorphism in the glucocorticoid receptor gene. *Clin Chem*, 49:1528-31.
- FLEURY, I., PRIMEAU, M., DOREAU, A., COSTEA, I., MOGHRABI, A., SINNETT, D. & KRAJINOVIC, M. (2004). Polymorphisms in genes involved in the corticosteroid response and the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pharmacogenomics*, 4:331-41.
- FURMAN, L., CAMITTA, B. M., JAFFE, N., SALLAN, S. E., CASSADY, J. R., TRAGGIS, D., LEAVITT, P., NATHAN, D. G. & FREI, E., 3RD. (1976). Development of an effective

- treatment program for childhood acute lymphocytic leukemia: a preliminary report. *Med Pediatr Oncol*, 2:157-66.
- GEHRING, U. (2004). Biological activities of HAP46/BAG-1. The HAP46/BAG-1 protein: regulator of HSP70 chaperones, DNA-binding protein and stimulator of transcription. *EMBO Rep*, 5:148-53.
- GELERNTER-YANIV, L., FENG, N., SEBRING, N. G., HOCHBERG, Z. & YANOVSKI, J. A. (2003). Associations between a polymorphism in the 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase type I gene and body composition. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27:983-6.
- GENG, C. D. & VEDECKIS, W. V. (2004). Steroid-responsive sequences in the human glucocorticoid receptor gene 1A promoter. *Mol Endocrinol*, 18:912-24.
- GREENSTEIN, S., GHAS, K., KRETT, N. L. & ROSEN, S. T. (2002). Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin Cancer Res*, 8:1681-94.
- HAARMAN, E. G., KASPERS, G. J., PIETERS, R., ROTTIER, M. M. & VEERMAN, A. J. (2004). Glucocorticoid receptor alpha, beta and gamma expression vs in vitro glucocorticoid resistance in childhood leukemia. *Leukemia*, 18:530-7.
- HAFEZI-MOGHADAM, A., SIMONCINI, T., YANG, Z., LIMBOURG, F. P., PLUMIER, J. C., REBSAMEN, M. C., HSIEH, C. M., CHUI, D. S., THOMAS, K. L., PROROCK, A. J., LAUBACH, V. E., MOSKOWITZ, M. A., FRENCH, B. A., LEY, K. & LIAO, J. K. (2002). Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med*, 8:473-9.
- 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. (1998). A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 83:144-51.
- HURWITZ, C. A., SILVERMAN, L. B., SCHORIN, M. A., CLAVELL, L. A., DALTON, V. K., GLICK, K. M., GELBER, R. D. & SALLAN, S. E. (2000). Substituting dexamethasone for prednisone complicates remission induction in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 88:1964-9.
- IUSM, I. U. S. o. M. Cytochrome P450 Drug Interaction - <http://medicine.iupui.edu/flockhart/clinlist.htm>.
- JAMIESON, A., WALLACE, A. M., ANDREW, R., NUNEZ, B. S., WALKER, B. R., FRASER, R., WHITE, P. C. & CONNELL, J. M. (1999). Apparent cortisol reductase deficiency: a functional defect in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Clin Endocrinol Metab*, 84:3570-4.
- JAY, V. (2001). The legacy of Harvey Cushing. *Arch Pathol Lab Med*, 125:1539-41.
- KAGOSHIMA, M., WILCKE, T., ITO, K., TSAPROUNI, L., BARNES, P. J., PUNCHARD, N. & ADCOCK, I. M. (2001). Glucocorticoid-mediated transrepression is regulated by histone acetylation and DNA methylation. *Eur J Pharmacol*, 429:327-34.
- KARSSSEN, A. M., MEIJER, O. C., VAN DER SANDT, I. C., LUCASSEN, P. J., DE LANGE, E. C., DE BOER, A. G. & DE KLOET, E. R. (2001). Multidrug resistance P-glycoprotein hampers the access of cortisol but not of corticosterone to mouse and human brain. *Endocrinology*, 142:2686-94.

- KASPERS, G. J., VEERMAN, A. J., PIETERS, R., VAN ZANTWIJK, C. H., SMETS, L. A., VAN WERING, E. R. & VAN DER DOES-VAN DEN BERG, A. (1997). In vitro cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 90:2723-9.
- KASPERS, G. J., VEERMAN, A. J., POPP-SNIJDERS, C., LOMECKY, M., VAN ZANTWIJK, C. H., SWINKELS, L. M., VAN WERING, E. R. & PIETERS, R. (1996). Comparison of the antileukemic activity in vitro of dexamethasone and prednisolone in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol*, 27:114-21.
- KNECHTLI, C. J., GOULDEN, N. J., HANCOCK, J. P., HARRIS, E. L., GARLAND, R. J., JONES, C. G., GRANDAGE, V. L., ROWBOTTOM, A. W., GREEN, A. F., CLARKE, E., LANKESTER, A. W., POTTER, M. N., CORNISH, J. M., PAMPHILON, D. H., STEWARD, C. G. & OAKHILL, A. (1998). Minimal residual disease status as a predictor of relapse after allogeneic bone marrow transplantation for children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 102:860-71.
- KOFLER, R. (2000). The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells. *Histochem Cell Biol*, 114:1-7.
- KOJIKI, S., SUGITA, K., INUKAI, T., SAITO, M., IJIMA, K., TEZUKA, T., GOI, K., SHIRAISHI, K., MORI, T., OKAZAKI, T., KAGAMI, K., OHYAMA, K. & NAKAZAWA, S. (1996). Mechanisms of glucocorticoid resistance in human leukemic cells: implication of abnormal 90 and 70 kDa heat shock proteins. *Leukemia*, 10:994-9.
- KRAJINOVIC, M., COSTEA, I., PRIMEAU, M., DULUCQ, S. & MOGHRABI, A. (2005). Combining several polymorphisms of thymidylate synthase gene for pharmacogenetic analysis. *Pharmacogenomics J*.
- KRAJINOVIC, M., LABUDA, D., MATHONNET, G., LABUDA, M., MOGHRABI, A., CHAMPAGNE, J. & SINNETT, D. (2002a). Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*, 8:802-10.
- KRAJINOVIC, M., LABUDA, D., RICHER, C., KARIMI, S. & SINNETT, D. (1999). Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Blood*, 93:1496-501.
- KRAJINOVIC, M., LEMIEUX-BLANCHARD, E., CHIASSON, S., PRIMEAU, M., COSTEA, I. & MOGHRABI, A. (2004). Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*, 4:66-72.
- KRAJINOVIC, M. & MOGHRABI, A. (2004). Pharmacogenetics of methotrexate. *Pharmacogenomics*, 5:819-34.
- KRAJINOVIC, M., RICHER, C., SINNETT, H., LABUDA, D. & SINNETT, D. (2000). Genetic polymorphisms of N-acetyltransferases 1 and 2 and gene-gene interaction in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9:557-62.
- KRAJINOVIC, M., SINNETT, H., RICHER, C., LABUDA, D. & SINNETT, D. (2002b). Role of NQO1, MPO and CYP2E1 genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Cancer*, 97:230-6.
- LAVERDIERE, C., CHIASSON, S., COSTEA, I., MOGHRABI, A. & KRAJINOVIC, M. (2002). Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to

- methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 100:3832-4.
- LENNARD, L., LILLEYMAN, J. S., VAN LOON, J. & WEINSHILBOUM, R. M. (1990). Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 336:225-9.
- LILLEYMAN, J. S., HANN, I. M., STEVENS, R. F., EDEN, O. B. & RICHARDS, S. M. (1986). French American British (FAB) morphological classification of childhood lymphoblastic leukaemia and its clinical importance. *J Clin Pathol*, 39:998-1002.
- LU, N. Z. & CIDLOWSKI, J. A. (2004). The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann N Y Acad Sci*, 1024:102-23.
- LUNDBERG, I. E., GRUNDTMAN, C., LARSSON, E. & KLARESKOG, L. (2004). Corticosteroids--from an idea to clinical use. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 18:7-19.
- MARINIELLO, B., RONCONI, V., SARDU, C., PAGLIERICCIO, A., GALLETI, F., STRAZZULLO, P., PALERMO, M., BOSCARO, M., STEWART, P. M., MANTERO, F. & GIACCHETTI, G. (2005). Analysis of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene (HSD11B2) in human essential hypertension. *Am J Hypertens*, 18:1091-8.
- MASER, E., FRIEBERTSHAUSER, J. & VOLKER, B. (2003). Purification, characterization and NNK carbonyl reductase activities of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: enzyme cooperativity and significance in the detoxification of a tobacco-derived carcinogen. *Chem Biol Interact*, 143-144:435-48.
- MATTANO, L. A., JR., SATHER, H. N., TRIGG, M. E. & NACHMAN, J. B. (2000). Osteonecrosis as a complication of treating acute lymphoblastic leukemia in children: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol*, 18:3262-72.
- MEISSNER, B., STANULLA, M., LUDWIG, W. D., HARBOTT, J., MORICKE, A., WELTE, K. & SCHRAPPE, M. (2004). The GSTT1 deletion polymorphism is associated with initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 18:1920-3.
- MITCHELL, C. D., RICHARDS, S. M., KINSEY, S. E., LILLEYMAN, J., VORA, A. & EDEN, T. O. (2005). Benefit of dexamethasone compared with prednisolone for childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of the UK Medical Research Council ALL97 randomized trial. *Br J Haematol*, 129:734-45.
- MOALLI, P. A., PILLAY, S., KRETT, N. L. & ROSEN, S. T. (1993). Alternatively spliced glucocorticoid receptor messenger RNAs in glucocorticoid-resistant human multiple myeloma cells. *Cancer Res*, 53:3877-9.
- NCI, C.-A. (2003). <http://www.cancer.gov/search/ViewClinicalTrials.aspx?cdrid=349182&version=patient&protocolsearchid=1963611>, 2003.
- NOBUKUNI, Y., SMITH, C. L., HAGER, G. L. & DETERA-WADLEIGH, S. D. (1995). Characterization of the human glucocorticoid receptor promoter. *Biochemistry*, 34:8207-14.
- NUNEZ, B. S. & VEDECKIS, W. V. (2002). Characterization of promoter 1B in the human glucocorticoid receptor gene. *Mol Cell Endocrinol*, 189:191-9.
- OPPERMANN, U., FILLING, C., HULT, M., SHAFQAT, N., WU, X., LINDH, M., SHAFQAT, J., NORDLING, E., KALLBERG, Y., PERSSON, B. & JORNVALL, H. (2003). Short-chain

- dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact*, 143-144:247-53.
- OTTEN, J., PHILIPPE, N., SUCIU, S., BEHAR, C., BABIN-BOILLETOT, A., THYSS, A., FERSTER, A. & VILMER, E. (2002). The Children Leukemia Group: 30 years of research and achievements. *Eur J Cancer*, 38 Suppl 4:S44-9.
- PANARELLI, M., HOLLOWAY, C. D., FRASER, R., CONNELL, J. M., INGRAM, M. C., ANDERSON, N. H. & KENYON, C. J. (1998). Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction, and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 83:1846-52.
- PEDERSEN, K. B., GENG, C. D. & VEDECKIS, W. V. (2004). Three mechanisms are involved in glucocorticoid receptor autoregulation in a human T-lymphoblast cell line. *Biochemistry*, 43:10851-8.
- PIETERS, R., KASPERS, G. J., KLUMPER, E. & VEERMAN, A. J. (1994). Clinical relevance of in vitro drug resistance testing in childhood acute lymphoblastic leukemia: the state of the art. *Med Pediatr Oncol*, 22:299-308.
- PIETERS, R., KLUMPER, E., KASPERS, G. J. & VEERMAN, A. J. (1997). Everything you always wanted to know about cellular drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 25:11-26.
- PLONER, C., SCHMIDT, S., PRESUL, E., RENNER, K., SCHROCKSNADEL, K., RAINER, J., RIML, S. & KOFLER, R. (2005). Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 93:153-60.
- RASK, C., ALBERTIONI, F., BENTZEN, S. M., SCHROEDER, H. & PETERSON, C. (1998). Clinical and pharmacokinetic risk factors for high-dose methotrexate-induced toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia--a logistic regression analysis. *Acta Oncol*, 37:277-84.
- REITER, A., SCHRAPPE, M., LUDWIG, W. D., HIDDEMANN, W., SAUTER, S., HENZE, G., ZIMMERMANN, M., LAMPERT, F., HAVERS, W., NIETHAMMER, D. & ET AL. (1994). Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood*, 84:3122-33.
- RHEN, T. & CIDLOWSKI, J. A. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*, 353:1711-23.
- RIBEIRO, R. C. & PUI, C. H. (1993). Prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Pathol*, 7:121-42.
- RIVAS TOTINO, P. R., PRATT RICCIO, E. K., CORTE-REAL, S., DANIEL-RIBEIRO, C. T. & FERREIRA-DA-CRUZ, M. D. (2005). Dexamethasone has pro-apoptotic effects on non-activated fresh peripheral blood mononuclear cells. *Cell Biol Int*.
- ROCHE, A. T. (2005). AmpliChip CYP450 test. *Med Lett Drugs Ther*, 47:71-2.
- ROSMOND, R., CHAGNON, Y. C., HOLM, G., CHAGNON, M., PERUSSE, L., LINDELL, K., CARLSSON, B., BOUCHARD, C. & BJORNTORP, P. (2000). A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Obes Res*, 8:211-8.
- RUBNITZ, J. E. & CRIST, W. M. (1997). Molecular genetics of childhood cancer: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Pediatrics*, 100:101-8.

- SAIKI, R. K., WALSH, P. S., LEVENSON, C. H. & ERLICH, H. A. (1989). Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86:6230-4.
- SCHAAF, M. J. & CIDLOWSKI, J. A. (2002). AUUUA motifs in the 3'UTR of human glucocorticoid receptor alpha and beta mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression. *Steroids*, 67:627-36.
- SCHMIDT, S., RAINER, J., RIML, S., PLONER, C., JESACHER, S., ACHMULLER, C., PRESUL, E., SKVORTSOV, S., CRAZZOLARA, R., FIEGL, M., RAIVIO, T., JANNE, O. A., GELEY, S., MEISTER, B. & KOFLER, R. (2005). Identification of glucocorticoid-response genes in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*.
- SCHRAPPE, M., ARICO, M., HARBOTT, J., BIONDI, A., ZIMMERMANN, M., CONTER, V., REITER, A., VALSECCHI, M. G., GADNER, H., BASSO, G., BARTRAM, C. R., LAMPERT, F., RIEHM, H. & MASERA, G. (1998). Philadelphia chromosome-positive (Ph+) childhood acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome. *Blood*, 92:2730-41.
- SILVERMAN, L. B., DECLERCK, L., GELBER, R. D., DALTON, V. K., ASSELIN, B. L., BARR, R. D., CLAVELL, L. A., HURWITZ, C. A., MOGHRABI, A., SAMSON, Y., SCHORIN, M. A., LIPTON, J. M., COHEN, H. J. & SALLAN, S. E. (2000). Results of Dana-Farber Cancer Institute Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1981-1995). *Leukemia*, 14:2247-56.
- SILVERMAN, L. B., GELBER, R. D., DALTON, V. K., ASSELIN, B. L., BARR, R. D., CLAVELL, L. A., HURWITZ, C. A., MOGHRABI, A., SAMSON, Y., SCHORIN, M. A., ARKIN, S., DECLERCK, L., COHEN, H. J. & SALLAN, S. E. (2001). Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood*, 97:1211-8.
- SONIS, S. T. (1998). Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol*, 34:39-43.
- STANULLA, M., SCHAEFFELER, E., FLOHR, T., CARIO, G., SCHRAUDER, A., ZIMMERMANN, M., WELTE, K., LUDWIG, W. D., BARTRAM, C. R., ZANGER, U. M., EICHELBAUM, M., SCHRAPPE, M. & SCHWAB, M. (2005). Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Jama*, 293:1485-9.
- STELLATO, C. (2004). Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. *Proc Am Thorac Soc*, 1:255-63.
- STEPHENS, M. & DONNELLY, P. (2003). A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet*, 73:1162-9.
- STEPHENS, M., SMITH, N. J. & DONNELLY, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*, 68:978-89.
- STEVENS, A., RAY, D. W., ZEGGINI, E., JOHN, S., RICHARDS, H. L., GRIFFITHS, C. E. & DONN, R. (2004). Glucocorticoid sensitivity is determined by a specific glucocorticoid receptor haplotype. *J Clin Endocrinol Metab*, 89:892-7.
- STRAHLE, U., SCHMIDT, A., KELSEY, G., STEWART, A. F., COLE, T. J., SCHMID, W. & SCHUTZ, G. (1992). At least three promoters direct expression of the mouse glucocorticoid receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89:6731-5.

- TISSING, W. J., LAUTEN, M., MEIJERINK, J. P., DEN BOER, M. L., KOPER, J. W., SONNEVELD, P. & PIETERS, R. (2005a). Expression of the glucocorticoid receptor and its isoforms in relation to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 90:1279-81.
- TISSING, W. J., MEIJERINK, J. P., DEN BOER, M. L., BRINKHOF, B., VAN ROSSUM, E. F., VAN WERING, E. R., KOPER, J. W., SONNEVELD, P. & PIETERS, R. (2005b). Genetic variations in the glucocorticoid receptor gene are not related to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*, 11:6050-6.
- TISSING, W. J., MEIJERINK, J. P., DEN BOER, M. L. & PIETERS, R. (2003). Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 17:17-25.
- TOMLINSON, J. W., WALKER, E. A., BUJALSKA, I. J., DRAPER, N., LAVERY, G. G., COOPER, M. S., HEWISON, M. & STEWART, P. M. (2004). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev*, 25:831-66.
- TURNER, J. D. & MULLER, C. P. (2005). Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene 5' untranslated region: identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1. *J Mol Endocrinol*, 35:283-92.
- VAN ROSSUM, E. F., KOPER, J. W., HUIZENGA, N. A., UITTERLINDEN, A. G., JANSSEN, J. A., BRINKMANN, A. O., GROBBEE, D. E., DE JONG, F. H., VAN DUYN, C. M., POLS, H. A. & LAMBERTS, S. W. (2002). A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes*, 51:3128-34.
- VAN ROSSUM, E. F., KOPER, J. W., VAN DEN BELD, A. W., UITTERLINDEN, A. G., ARP, P., ESTER, W., JANSSEN, J. A., BRINKMANN, A. O., DE JONG, F. H., GROBBEE, D. E., POLS, H. A. & LAMBERTS, S. W. (2003). Identification of the BclII polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 59:585-92.
- VAN ROSSUM, E. F., ROKS, P. H., DE JONG, F. H., BRINKMANN, A. O., POLS, H. A., KOPER, J. W. & LAMBERTS, S. W. (2004). Characterization of a promoter polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and its relationship to three other polymorphisms. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 61:573-81.
- VAN WEST, D., VAN DEN EEDE, F., DEL-FAVERO, J., SOUERY, D., NORRBACK, K. F., VAN DUIJN, C., SLUIJS, S., ADOLFSSON, R., MENDLEWICZ, J., DEBOUTTE, D., VAN BROECKHOVEN, C. & CLAES, S. (2005). Glucocorticoid Receptor Gene-Based SNP Analysis in Patients with Recurrent Major Depression. *Neuropsychopharmacology*.
- VEERMAN, A. J., HAHLEN, K., KAMPS, W. A., VAN LEEUWEN, E. F., DE VAAN, G. A., SOLBU, G., SUCIU, S., VAN WERING, E. R. & VAN DER DOES-VAN DER BERG, A. (1996). High cure rate with a moderately intensive treatment regimen in non-high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. Results of protocol ALL VI from the Dutch Childhood Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*, 14:911-8.
- WAKE, D. J. & WALKER, B. R. (2004). 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obesity and the metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 215:45-54.

- WALKER, B. R. (2004). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obesity. *Obes Res*, 12:1-3.
- WALKER, E. A. & STEWART, P. M. (2003). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: unexpected connections. *Trends Endocrinol Metab*, 14:334-9.
- WHITE, P. C., MUNE, T., ROGERSON, F. M., KAYES, K. M. & AGARWAL, A. K. (1997). Molecular analysis of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and its role in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Steroids*, 62:83-8.
- WILSON, R. C., NIMKARN, S. & NEW, M. I. (2001). Apparent mineralocorticoid excess. *Trends Endocrinol Metab*, 12:104-11.
- YUDT, M. R. & CIDLOWSKI, J. A. (2001). Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol*, 15:1093-103.
- ZHOU, J. & CIDLOWSKI, J. A. (2005). The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids*, 70:407-17.
- ZONG, J., ASHRAF, J. & THOMPSON, E. B. (1990). The promoter and first, untranslated exon of the human glucocorticoid receptor gene are GC rich but lack consensus glucocorticoid receptor element sites. *Mol Cell Biol*, 10:5580-5.

ANNEXES

Annexe A:

Tableau : liste des amorces de séquençage des 6 exons du gène HSD11B1

<i>HSD11B1</i>	<i>Amorces de séquençage</i> (F: forward) (R: reverse)
Amorces M13	F : CACGACGTTGTAACGAC R : GGACACACTTTAACAATAGG
Exon 1	F : CACGACGTTGTAACGACGGCTAGCACTGCCTGAGACT R : GGACACACTTTAACAATAGGTTTTGTGTCCCCACGAACTC
Exon 2	F : CACGACGTTGTAACGACCAACTTGGGTATGGTCCTCA R : GGACACACTTTAACAATAGGATGGCAGTGTACGAGTCTAC
Exon 3	F : CACGACGTTGTAACGACCCCCGTTACTTCAGAGACTA R : GGACACACTTTAACAATAGGTGGAGGAGGAGACTTGAAACG
Exon 4	F : CACGACGTTGTAACGACGGAAAGGTATCAACCCAGA R : GGACACACTTTAACAATAGGACCAGTTCATTACCCGAT
Exon 5	F : CACGACGTTGTAACGACGGCAGCCTTATTAACCCATT R : GGACACACTTTAACAATAGGTCAAGATCCCATGTACACGTCTTG
Exon 6 (1)	F : CACGACGTTGTAACGACCCCTAGTCAGATAACCCCTACTCTTCC R : GGACACACTTTAACAATAGGGTGTGGACTGTTTACCTTCCC
Exon 6 (2)	F : CACGACGTTGTAACGACGGGATTTGGGACTGTTCTG R : GGACACACTTTAACAATAGGGGACTCACCTTCTTTAGTGGG

Annexe B:

Tableau : liste des amorces des PCRs des exons et des 2 fragments de la région promotrice du gène HSD11B1

<i>HSD11B1</i>	<i>Amorces de PCR</i> (F: forward) (R: reverse)
Exon 1	F : GGCTAGCACTGCCTGAGACT R : TTTTBTBTCCCCACGAACTC
Exon 2	F : CAACTTGGGTATGGTCCTCA R : ATGGCAGTGTACGAGTCTAC
Exon 3	F : CCCCCGTTACTTCAGAGACTA R : TGGAGGAGGAGACTTGAAACG
Exon 4	F : GGAAAGGTATCAACCCAGA R : ACCAGTTCATTACCCGAT
Exon 5	F : GGCAGCCTTATTAACCCATT R : TCAAGATCCCATGTACACGTCTTG
Exon 6 (1)	F : CCTAGTCAGATAACCCCTACTCTTCC R : GTGTGGACTGTTTACCTTCC
Exon 6 (2)	F : GGGATTTTGGGACTGTTCTG R : GGACTCACCTTCTTTAGTGGG
Prom. 1 -342/-812	F : CGTCCCCAGCTAGTTTCAC R : ACTCAAACCGAGAGAAACGA
Prom. 2 -753/-1345	F : AGCCCTCAACTGTTCTCAA R : AAGAAGATGTAGTCCAGCGG

Annexe C:

Tableau : conditions de PCRs du gène HSD11B1

	Prom.1	Prom.2	Exon 1	Exon 2 – 6 (2)
DMSO	-	-	5%	-
PCR Buffer	1X	1X	1X	1X
MgCl ₂	1,8 mM	1,8 mM	2,5 mM	2 mM
DNTP	120 µM	120 µM	150 µM	150 µM
Primer F	0,5 µM	0,5 µM	0,1 µM	0,2 µM
Primer R	0,5 µM	0,5 µM	0,1 µM	0,2 µM
Taq polymerase*	1U	1U	1U	1U
ADN	15 ng	15 ng	15 ng	15 ng
Volume final	50 µL	50 µL	60 µL	60 µL
Dénaturation	94°C - 30 sec	94°C - 30 sec	94°C - 30 sec	94°C - 30 sec
Appariement	TD** 62°C-55°C	TD** 62°C-55°C	64°C – 30 sec	62°C – 30 sec
Élongation	72°C – 45 sec	72°C – 45 sec	72°C – 45 sec	72°C – 45 sec
Nombre de cycles	44	44	38	38
Produit final	470 pb	592 pb	331 pb	Ex 2=259 pb Ex 3=263 pb Ex 4=414 pb Ex 5=289 pb Ex 6 (1)=489 pb Ex 6 (2)=438 pb.

* Platinum, Invitrogen, Burlington, ONT, Canada.

** TD : Touchdown -0,5°C par cycle.

Annexe D :

Tableau : listes des amorces de PCRs des fragments du promoteur du gène NR3C1.

<i>NR3C1</i>	<i>Amorces de PCR</i>	
	<i>(F: forward)</i>	<i>(R: reverse)</i>
Prom.1 - 8/- 257	F : TAAACAGCCGCCCTTTCT	R : TCTGTGCTCGAGCGTTT
Prom.2 -453/-927	F : AACCTGTTGGTGACGCTTG	R : AGTGAAGCTTTCCCGATG
Prom.3 -1562/-1901	F : CTATCACGTTTCATAGGACCCC	R : CCAAACCCCTCCATTGAAAA

Annexe E:

Tableau : conditions de PCRs du gène NR3C1.

	Prom.1	Prom.2	Prom.3
DMSO	10%	10%	5%
PCR Buffer	1X	1X	1X
MgCl ₂	1 mM	1 mM	2,5 mM
DNTP	120 µM	100 µM	150 µM
Primer F	0,5 µM	0,2 µM	0,1 µM
Primer R	0,5 µM	0,2 µM	0,1 µM
Taq polymerase*	1U	1U	1U
ADN	15 ng	15 ng	15 ng
Volume final	70 µL	55 µL	60 µL
Dénaturation	94°C - 30 sec	94°C - 30 sec	94°C - 30 sec
Appariement	59°C - 30 sec	62°C - 45 sec	TD** 62°C - 55°C
Élongation	72°C - 45 sec	72°C - 45 sec	72°C - 45 sec
Nombre de cycles	44	42	38
Produit final	249 pb	474 pb	339 pb

* Platinum, Invitrogen, Burlington, ONT, Canada.

** TD : Touchdown -0,5°C par cycle.

Annexe F:

Tableau : liste des sondes d'ASO et conditions d'hybridation des SNPs du gène HSD11B1.

<i>HSD11B1</i>	<i>Sondes ASO</i>	<i>Conditions d'hybridation*</i>
3368879 G/A	AATCTGTCATTTAGGG	TD : 61°C - 38°C,
3370838 G/C	ATCAAAGGGGGAGCT	TD : 71°C - 50°C
3340765 G/T	GATGTTGTAATACTTTT	TD : 65°C - 37°C
3340677 T/A	AGTGTATGATCCATTG	TD : 70°C - 37°C
3340083 T/C	AGTGAAAATTTGATG	TD : 65°C - 37°C
3339998 A/T	CAAGTGACCCTCAC	TD : 70°C - 37°C

*1X (0,75 µM) de sonde marquée au γ P32, 15X de sonde compétitrice. Pré-hybridation 15 min à 70°C, hybridation par touchdown (TD), lavage 10 min à température finale du TD. Exposition sous film 12 à 16h à - 80°C.

Annexe G:

Tableau : liste des sondes d'ASO et conditions d'hybridation des SNPs du gène NR3C1.

<i>NR3C1</i>	<i>Sondes ASO</i>	<i>Conditions*</i>
-119 A/G	GCGGGTCGAGGTT	TD : 70°C - 37°C
- 193 A/C	CTTCCACCCACAGAATC	TD : 70°C - 37°C
- 627 A/G	CCAGGAAAAGGGTG	TD : 70°C - 37°C
- 1719 C/T	GGAGAGGGCCGTG	TD : 70°C - 37°C

*1X (0,75 µM) de sonde marquée au γ P32, 15X de sonde compétitrice. Pré-hybridation 15 min à 70°C, hybridation par touchdown (TD), lavage 10 min à température finale du TD. Exposition sous film 12 à 16h à - 80°C.