

2m 11. 2888.4

Université de Montréal

Rôle de la pharmacocinétique et de la pharmacogénétique en relation avec la réponse thérapeutique en milieu pédiatrique.

par

Stéphanie Lamothe

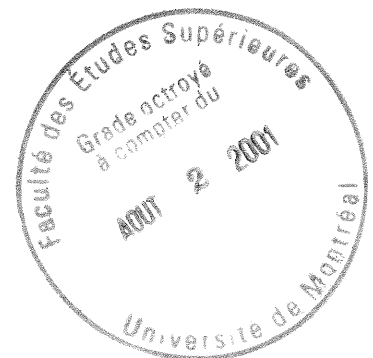
Département de pharmacologie

Faculté de médecine

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

Avril, 2001

© Stéphanie Lamothe, 2001



W

4

W58

2001

n.085

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Rôle de la pharmacocinétique et de la pharmacogénétique en relation avec la réponse thérapeutique en milieu pédiatrique.

présenté par :
Stéphanie Lamothe

a été évalué par un jury composé des suivantes :

Dre Chantal Lambert
(présidente du jury)

Dr Yves Théorêt
(directeur de recherche)

Dr Daniel Sinnett
(codirecteur)

Dr Jean-Guy Besner
(membre du jury)

Mémoire accepté le :

Sommaire

Les thiopurines telles que la 6-mercaptopurine (6-MP) et son précurseur l'azathioprine (AZA) de même que la 6-thioguanine (6-TG) jouent un rôle important dans l'immunosuppression lors du traitement des leucémies lymphoblastiques aiguës (LLA) et de certaines maladies autoimmunes, lors des greffes, ainsi que dans l'immunomodulation des patients atteints d'une maladie inflammatoire de l'intestin (MII). Bien que les thiopurines aient prouvé leur efficacité dans le traitement de ces maladies, les mécanismes responsables tant de leurs effets thérapeutiques et toxiques que de leur inefficacité chez certains patients sont toujours mal connus et font l'objet d'importantes études multicentriques afin d'optimiser les critères d'administration. À cet égard, il importe de noter la présence d'une très grande variabilité intra- et inter-individuelle dans la biotransformation des thiopurines. Cette variation se situe tant au niveau de la biodisponibilité orale que de la présence de polymorphismes génétiques fonctionnels dans le gène de la thiopurine méthyltransférase (TPMT), une enzyme clé dans la biotransformation des thiopurines. Les thiopurines produisant leurs effets thérapeutiques et toxiques via leurs métabolites intracellulaires, notamment les nucléotides de la 6-TG (6-TGN) et les ribonucléotides du 6-méthylmercaptopurine (6-MMP), la présence d'un polymorphisme enzymatique (isoforme) influencera certainement la réponse pharmacologique.

Ce mémoire vise à établir les relations qui existent entre le génotype de gènes codant pour des enzymes impliquées directement (ex., TPMT) ou indirectement (ex., MTHFR: méthylène tétrahydrofolate réductase) dans le métabolisme des thiopurines, le niveau des métabolites intracellulaires et la réponse thérapeutique ou toxique induite par ces derniers. L'ajustement des doses pourrait alors être individualisé afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique et de diminuer les risques de développer des effets secondaires.

L'étude a porté sur des enfants avec MII qui recevaient une dose initiale d'environ 1 mg/kg de 6-MP (ou 2 mg/kg d'AZA). Des enfants avec LLA qui recevaient une dose orale de 6-MP de 50 mg/m²/jour (ajustée en fonction du compte absolu en polymorphonucléaires (CAP) circulants) pour les premiers 14 jours d'un cycle de 21 jours de traitement, au sein d'un protocole qui requérait l'administration de 34 cycles de 6-MP, ont également été étudiés. Nous avons déterminé à l'aide de l'approche *polymerase chain reaction/allele specific oligonucleotide* (PCR/ASO), le génotype de la

TPMT sur l'ADN constitutif isolé de ces patients. Nous avons aussi évalué chez ces patients, les niveaux de 6-MP, 6-TGN et de 6-MMP dans les globules rouges (GR) par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et les résultats ont été exprimés en pmol/8x10⁸ GR. Finalement, la réponse thérapeutique a été évaluée soit au moyen d'un indice de la maladie ou du CAP.

Chez les patients avec une MII, nous avons observé une diminution de l'indice inflammatoire plus fréquente chez les individus hétérozygotes que chez les homozygotes sauvages pour TPMT (médiane des 6-TGN 588 pmol/8x10⁸ GR versus 255 pmol/8x10⁸ GR). De plus, les patients ayant des niveaux des 6-TGN supérieurs à 230 pmol/8x10⁸ GR démontraient une meilleure réponse clinique. Des niveaux de 6-MMP supérieurs à 5700 pmol/8x10⁸ GR étaient associés à une augmentation du risque d'hépatotoxicité. Nous avons observé une variation des niveaux de 6-MMP en fonction de l'âge et du sexe des patients, les garçons post-pubères présentant une médiane environ deux fois plus faible (1726 pmol/8x10⁸ GR) que celles observées chez les filles pré- et post-pubères et les garçons pré-pubères. Il n'existait pas de différence dans les concentrations médianes des 6-TGN entre les garçons et les filles que ceux-ci soient pré- ou post-pubères. Nous avons observé, chez les patients étudiés avec LLA (tous homozygotes sauvages pour la TPMT), une augmentation des niveaux des métabolites des 6-TGN et du 6-MMP au cours du cycle de traitement, sans toutefois observer de corrélation avec le CAP. Les niveaux des 6-TGN et du CAP n'étaient pas différents entre les garçons et les filles. Par contre, les niveaux de 6-MMP étaient plus faibles chez les garçons que chez les filles, et ce indépendamment de l'âge. Il faut souligner que les enfants avec LLA différaient des enfants avec MII quant à leur âge moyen plus faible, quant au mode d'administration cyclique de la 6-MP sur la base d'une surface corporelle et quant aux interactions médicamenteuses possibles, notamment avec un antifolate comme le méthotrexate (MTX). Ainsi, nous avons observé que les patients qui possédaient au moins un allèle mutant dans MTHFR (enzyme importante du cycle des folates), avaient des niveaux des 6-TGN plus élevés que les patients homozygotes sauvages pour ce gène. Les niveaux de 6-MMP n'étaient pas affectés par la présence ou non d'un allèle MTHFR mutant.

Nos résultats suggèrent que l'individualisation des profils pharmacocinétiques/pharmacogénétiques chez les patients atteints d'une MII ou d'une LLA puisse favoriser l'apparition d'une réponse clinique plus rapide tout en minimisant l'incidence d'effets secondaires importants.

Table des matières

Sommaire.....	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures.....	viii
Listes des sigles et abréviations.....	ix
Dédicace	xii
Avant-propos	xiii
Chapitre 1 : Introduction	1
1. Maladies inflammatoires de l'intestin (MII).....	2
1.1 Étiologie de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse	2
1.2 Caractéristiques cliniques de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse	4
1.3 Thérapie administrée lors d'une maladie de Crohn ou d'une colite ulcéreuse.....	5
1.3.1 Les aminosalicylates.....	8
1.3.2 Les antibiotiques.....	8
1.3.3 Les corticostéroïdes	8
1.3.4 Les immunomodulateurs	9
2. Leucémie lymphoblastique aiguë.....	13
2.1 Incidence, définition, caractéristiques et étiologie des différentes leucémies	13
2.2 Caractéristiques cliniques de la leucémie lymphoblastique aiguë.....	15
2.3 Thérapie administrée lors d'une leucémie lymphoblastiques aiguë de l'enfant.	16
3. Pharmacologie de la 6-Mercaptopurine et de son précurseur, l'Azathioprine.....	22
3.1 Pharmacocinétique.....	22
3.2 Pharmacodynamique.....	25
3.2.1 Effet « thérapeutique »	25
3.2.2 Effets secondaires.....	26
3.3 Pharmacologie de la 6-Thioguanine	28
3.4. Pharmacogénétique.....	32
4. But.....	35
Chapitre 2 : Articles	36
Article 1	37
Article 2	60
Article 3	80
Chapitre 3 : Discussion.....	100
Effet des polymorphismes fonctionnels dans les gènes TPMT et MTHFR sur le métabolisme des thiopurines.....	104

Fréquence mutationnelle.....	104
Niveau des métabolites	105
Effet du sexe et de l'âge sur le métabolisme des thiopurines	112
Effet des métabolites sur la réponse thérapeutique.....	114
Effet des métabolites sur la toxicité	117
Conclusions.....	122
Perspectives futures.....	123
Bibliographie	124
Annexe I : Copie du tiré à part de l'article 1	xiv
Annexe II : Indice de Harvey Bradshaw	xxiv
Remerciements	xxvi

Liste des tableaux

Tableau I	Examens cliniques et de laboratoire utilisés pour établir un diagnostic de maladie de Crohn.....	5
Tableau II	Examens de laboratoire utilisés pour établir un diagnostic de colite ulcéreuse.....	6
Tableau III	Options de thérapies médicales pour la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse incluant la nutrition, les antibiotiques, les 5-aminosalicylates, les corticostéroïdes et les immunomodulateurs.....	7
Tableau IV	Effets secondaires de la thérapie aux corticostéroïdes.....	9
Tableau V	Indications pour l'utilisation de l'AZA et de la 6-MP pour le traitement d'une MII.....	12
Tableau VI	Critères de classification du groupe de risque standard de rechute du protocole 95-01 du DFCI ALL.....	18
Tableau VII	Polymorphismes fonctionnels de la TPMT.....	33
Tableau VIII	Distribution des génotypes de MTHFR en fonction du sexe chez les patients avec une MII ou une LLA et chez un groupe d'individus sains.	105
Tableau IX	Niveaux des métabolites de la 6-MP chez les patients avec une MII en fonction des variants de MTHFR.....	110

Liste des figures

Figure 1	Schéma de la hiérarchie des progéniteurs hématopoïétiques et indication des étapes cibles des facteurs de croissance.....	14
Figure 2	Résultats les plus récents des pourcentages de survie sans événement suite à une LLA: comparaison de 6 différents protocoles.	17
Figure 3	Protocole de traitement 95-01 du DFCI ALL pour les 3 groupes de risque de rechute (Dana Farber Cancer Institute Consortium 1995).....	21
Figure 4	Voies métaboliques des analogues des guanines.	31
Figure 5	Distribution trimodale de l'activité enzymatique intraérythrocytaire de la TPMT.....	34
Figure 6	Schéma des 4 différents allèles de la TPMT étudiés.....	34
Figure 7	Schéma des 4 différents allèles de la MTHFR étudiés.....	34-B
Figure 8	Cycle d'activation des méthyles.	111

Listes des sigles et abréviations

A : distribution aléatoire
Å : Angström (10^{-10} m)
ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine diphosphate
AICAR : aminoimidazole carboxamide ribonucléotide
Ala : alanine
ALL : Acute Lymphoblastic Leukemia
ARA-C : cytosine arabinoside
ARN : acide ribonucléique
ASO: allele specific oligonucleotide
ATP : adénosine triphosphate
AZA : azathioprine
B : données brutes
BFU-E : burst-forming unit-erythroid
CAP : compte absolu en polymorphonucléaires
CCG : Children's Cancer Group
CDAI : Crohn's Disease Activity Index
cGy : centigray
CFU-Bas : colony-forming unit-basophil
CFU-E : colony-forming unit-erythroid
CFU-Eo : colony-forming unit-eosinophil
CFU-G : colony-forming unit-granulocyte
CFU-GEMM : colony-forming unit granulocyte-erythroid-macrophage-megacaryocyte
CFU-GM : colony-forming unit-granulocyte-macrophage
CFU-M : colony-forming unit-macrophage
CFU-MK : colony-forming unit-megakaryocyte
COALL : Childhood Oncology Acute Lymphoblastic Leukemia
Cys : cystéine
DCLSG : Dutch Childhood Leukemia Study Group
DFCI ALL : Dana-Farber Cancer Institute Acute Lymphoblastic Leukemia
DHF : dihydrofolate
DHFR : dihydrofolate réductase
DPK : diphosphate kinase
dUMP : désoxyuridine monophosphate
E coli : *Escherichia coli*
EPO : érythropoïétine
FAB : French-American-British Cooperative Group
FLT3-L : fetal liver tyrosine kinase-ligand
FRALLE : French Acute Lymphoblastic Leukemia
GAR : glycinamide ribonucléotide
G-CSF : granulocyte colony-stimulating factor
Glu : glutamate
GM-CSF : granulocyte-megakaryocyte colony-stimulating factor
GMPS : guanosine monophosphate synthétase
GR : globules rouges
HBI : Harvey-Bradshaw Index

HC : hydrocortisone
Hcy : homocystéine
HD : high dose
HLA-DR2 : antigène leucocytaire humain allèle HLA-DR2
hMLH1 : human mut L homologue 1
HPLC : chromatographie liquide à haute performance
HPRT : hypoxanthine phosphoribosyle transférase
IBD 1 : inflammatory bowel disease 1
IgG1 : immunoglobuline G1
IL : interleukine
IMPDH : inosine monophosphate déshydrogénase
IT : intrathécale
kb : kilobase
kg : kilogramme
l : litre
LCR : liquide céphalo-rachidien
Leu : leucine
LLA : leucémie lymphoblastique aiguë
LLC : leucémie lymphoïde chronique
LMA : leucémie myéloïde aiguë
LMC : leucémie myéloïde chronique
M : valeur moyenne
m² : mètre au carré
mm³ : millimètre cube
M-CSF : macrophage colony-stimulating factor
Met : méthionine
mg : milligramme
MII : maladie inflammatoire de l'intestin
MPK : monophosphate kinase
ml : millilitre
MTHFR : méthylène tétrahydrofolate réductase
MTX : méthotrexate
N : nombre d'échantillons
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NADH : dihydronicotinamide adénine dinucléotide
NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH : dihydronicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NK : natural killer
nmol : nano mole
pANCA : anticorps cytoplasmiques périnucléaires antineutrophiles
PCDAI : Pediatric Crohn's Disease Activity Index
PCR : polymerase chain reaction
Phe : phénylalanine
pmol : pico mole
p.o. : per os
POG : Pediatric Oncology Group
Pro : proline
PRPP : 5-phosphoribosyle 1-pyrophosphate
RC : rémission complète

RCC : rémission complète continue
RÉ : risque élevé
RÉN : risque élevé du nourisson
RR : ribonucléotide réductase
RS : risque standard
Rx : radiothérapie
S-AdoHcy : S-adénosyle-L-homocystéine
S-AdoMet : S-adénosyle-L-méthionine
SCF : stem cell factor
sem : semaine
Ser : sérine
SNC : système nerveux central
T_{H1} : lymphocyte T helper
THF : tétrahydrofolate
Thr : thréonine
TMP : thymidine monophosphate
TPMT : thiopurine méthyltransférase
TPMT^L/TPMT^L : homozygote mutant
TPMT^L/TPMT^H : hétérozygote
TPMT^H/TPMT^H : homozygote sauvage
TPO : thrombopoïétine
Tyr : tyrosine
U : unité
UKALL : United Kingdom Acute Lymphoblastic Leukaemia
VAL : valine
VEGF : vascular endothelial growth factor
XO : xanthine oxydase
5-ASA : 5-aminosalicylates
6-MP : 6-mercaptopurine
6-MMP : 6-méthylmercaptopurine
6-MTIMP : 6-méthylthioinosine 5'-monophosphate
6-TG : 6-thioguanine
6-TGN : 6-thioguanine nucléotide
6-TIMP : 6-thioinosine 5'-monophosphate
6-TX : 6-thioxanthosine 5'-monophosphate

À Daniel, Martine, Kim et Patrick

Avant-propos

La leucémie lymphoblastique aiguë et les maladies inflammatoires de l'intestin, telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, affectent de nombreux enfants chaque année. Les traitements administrés conduisent à une rémission complète continue chez 70 à 80% des patients atteints de LLA et à une diminution de l'indice inflammatoire chez les patients ayant une MII. Toutefois, certains patients manifestent des effets secondaires importants alors que d'autres ne répondent pas au traitement, ce qui justifie fréquemment l'arrêt temporaire ou permanent de l'administration des thiopurines. Cette « résistance » au traitement peut être attribuée à plusieurs facteurs dont le non respect de la posologie ou une grande variabilité dans la biodisponibilité de cette classe de médicaments.

Il existe un autre facteur majeur pouvant influencer la réponse aux traitements impliquant des thiopurines, telles que l'azathioprine et la 6-mercaptopurine, soit la différence inter-individuelle qui existe au niveau de l'activité de l'enzyme thiopurine méthyltransférase. Cette variation peut être causée par un polymorphisme génétique pouvant mener à une diminution de la biotransformation des thiopurines qui ne sont actives que par leurs métabolites. L'activité de l'enzyme thiopurine méthyltransférase peut également différer chez des individus qui possèdent le même génotype enzymatique en raison d'une différence au niveau de l'induction. La production insuffisante ou excessive de certains métabolites pourrait expliquer la résistance ou la toxicité de certains patients aux thiopurines.

À la lumière de ces observations, nous avons décidé de vérifier si le génotypage des patients traités avec les thiopurines ainsi que le dosage périodique des niveaux des métabolites permettaient d'améliorer la réponse au traitement ainsi que de diminuer l'incidence des effets secondaires.

Chapitre 1 : Introduction

1. Maladies inflammatoires de l'intestin (MII)

1.1 Étiologie de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse

La maladie de Crohn fut décrite pour la première fois en 1932 par Crohn, Ginzburg et Oppenheimer et depuis les trente dernières années son incidence en milieu pédiatrique a connu une certaine augmentation (Hyams 1999; Markowitz 1999). Par ailleurs, l'incidence de la colite ulcéreuse est demeurée stable ou a diminuée quelque peu, au cours des dernières années (Markowitz 1999). Ces maladies affectent également les hommes et les femmes et sont plus communes chez les individus d'origine européenne que chez ceux d'origine africaine. La maladie de Crohn est plus commune dans le Nord de l'Europe que dans le Sud de l'Europe et dans les milieux urbains que dans les milieux ruraux (Hyams 1999). Au Canada, on estime que 100 000 hommes et femmes souffrent d'une MII. La plupart des gens sont diagnostiqués entre l'âge de 15 et 25 ans ou de 45 et 55 ans. À l'Hôpital Sainte-Justine environ 150 nouveaux cas de MII sont diagnostiqués chaque année et 600 cas y sont suivis.

Ces maladies sont connues et étudiées depuis de nombreuses années, mais leur étiologie reste inconnue, malgré différentes observations qui fournissent des pistes pour en expliquer l'apparition. L'un des facteurs de risque important pour le développement d'une MII est la présence d'une histoire familiale, c'est-à-dire d'avoir un membre de sa famille, au premier degré, atteint de la maladie de Crohn ou d'une colite ulcéreuse (Hyams 1999; Markowitz 1999). La maladie de Crohn est une maladie complexe qui n'est pas héritée simplement de manière Mendélienne. Un modèle oligogénique (un nombre limité de gènes agissant ensemble) ainsi qu'un modèle d'hétérogénéité génétique ont été proposés. Des études d'antigènes leucocytaires humains ont révélé des évidences pour une hétérogénéité dans les MII. Il a aussi été suggéré que des loci de susceptibilité à la maladie de Crohn pourraient exister sur les chromosomes 6 et 16 (Inflammatory Bowel Disease 1, IBD1) (Hyams 1999). Récemment, la présence d'un gène majeur de IBD1 a été identifiée sur le chromosome 16 dans la région avoisinant D16S408 (Forabosco *et al.* 2000). Concernant la colite ulcéreuse, l'allèle antigénique leucocytairaire humain HLA-DR2 semble y être lié, mais il n'est pas associé à la maladie

de Crohn. Par ailleurs, le gène de susceptibilité à la maladie de Crohn, IBD1, n'apparaît pas être important pour la colite ulcéreuse. D'autres marqueurs de la maladie sont aussi utilisés, le mieux défini étant le pANCA, un sous-type distinct d'anticorps cytoplasmiques périnucléaires antineutrophiles. Ce marqueur est hautement spécifique de la colite ulcéreuse et pourrait représenter un marqueur d'immunorégulation, contrôlé génétiquement, dont l'activité et la quantité pourraient être dérégulées (Markowitz 1999). Ce dernier est présent chez 70% des patients atteints d'une colite ulcéreuse et chez seulement 6% des patients ayant une maladie de Crohn (Markowitz 1999).

Ces deux maladies pourraient aussi être liées à des infections, mais les résultats n'étant pas identiques entre les différents groupes, aucune évidence ne supporte cette théorie (Hyams 1999). La présence d'antigènes stimule le système immunitaire de la muqueuse intestinale et il se pourrait que dans des cas où l'hôte présente une certaine susceptibilité génétique ou lorsqu'il y a déjà des dommages de la muqueuse, la cascade inflammatoire ne soit pas limitée au soi et puisse ainsi endommager ses propres cellules. Dans ce cas, la production continue de médiateurs d'inflammation par les cellules immunitaires activées mènerait à un dommage tissulaire et à une fibrose caractéristique d'une MII (Hyams 1999). Des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires ainsi que des niveaux faibles d'inhibiteurs de l'IL-4 ont été retrouvés dans la muqueuse des patients atteints de la maladie de Crohn. Les effets pro-inflammatoires des cytokines incluent le recrutement de cellules inflammatoires qui, via divers mécanismes, stimulent l'inflammation et contribuent à la diarrhée. De plus, certaines évidences suggèrent que la maladie de Crohn est caractérisée par une réponse anormale des T_{H1} (T helper 1). Comparativement à la réponse immunitaire cellulaire de la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse semble être associée à une réponse humorale. L'hypothèse d'une origine auto-immune de la colite ulcéreuse est couramment favorisée. Chez les patients atteints d'une colite ulcéreuse, il y a une surproduction d'immunoglobuline G1 (IgG1) par les lymphocytes intestinaux et ceux de la circulation périphérique (Markowitz 1999). Certains auto-anticorps dirigés contre les protéines épithéliales du côlon ont été identifiés. De plus, ces auto-anticorps réagissent avec des antigènes des tissus communément affectés par les manifestations extra-intestinales de la colite ulcéreuse (Markowitz 1999). Malheureusement, le ou les facteurs initiant cette auto-immunité ne sont pas connus.

Finalement, le système neuroendocrinien pourrait être lié à la maladie de Crohn. En effet, la production des neuropeptides est influencée par les cytokines et les neuropeptides peuvent, à leur tour, altérer la production des cytokines, tout comme les fonctions intestinales. Il est donc possible que la relation entre le stress ou l'état émotionnel et l'activité de la maladie, soit liée à la modulation neuroendocrinienne de l'inflammation intestinale (Hyams 1999).

1.2 Caractéristiques cliniques de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse

Les caractéristiques cliniques observées chez les patients sont nombreuses et variables selon le patient et le niveau d'activité de la maladie. Ces caractéristiques incluent, autant chez les patients souffrant de la maladie de Crohn que ceux ayant une colite ulcéreuse: la douleur abdominale, la diarrhée, les saignements rectaux, l'anémie, la fièvre, les nausées/vomissements, la fatigue, la maladie pérectale, certaines manifestations extra-intestinales (articulaire, musculosquelettique, cutanée, orale, oculaire, vasculaire, rénale, hépatique, pancréatique, osseuse, hématologique) et la perte de poids. Les patients atteints de la maladie de Crohn peuvent aussi présenter des retards de croissance qui se retrouvent rarement chez les patients atteints d'une colite ulcéreuse. La maladie de Crohn peut être détectée dans l'œsophage, l'estomac et le duodénum chez 30% à 40% des enfants lorsque les techniques d'endoscopie et de biopsie sont utilisées. En pratique, le diagnostic de la maladie de Crohn est suspecté en présence d'une combinaison d'observations cliniques et de résultats de laboratoire. Le diagnostic est ensuite confirmé par les résultats obtenus lors de radiographies, d'endoscopies ainsi que d'examens histologiques (Tableau I) (Hyams 1999). Les raisons de la première consultation menant au diagnostic de la colite ulcéreuse sont souvent des symptômes de diarrhée avec ou sans saignements rectaux ou, encore, des symptômes moins évidents et plus difficiles à cerner (Markowitz 1999). Un examen physique complet est nécessaire et permet souvent de détecter des douleurs abdominales modérées qui sont associées à une maladie active. Des examens de laboratoire sont également effectués afin d'exclure d'autres maladies possibles et d'obtenir de plus amples évidences avant de procéder à des examens plus invasifs comme des radiographies et des endoscopies (Tableau II).

Tableau I Examens cliniques et de laboratoire utilisés pour établir un diagnostic de maladie de Crohn.

Histoire	Tests de laboratoire
Douleur abdominale	Anémie
Diarrhée	Taux de sédimentation des globules rouges (GR) élevé
Saignements rectaux	Hypoalbuminémie
Fièvre	Hyperplaquettose
Arthrite	Gaïac positif
Éruption cutanée	Radiographies
Histoire familiale de MII	Nodules
Examen physique	Alternance de zones saines et malsaines très rétrécies
Abdomen sensible	Fistules
Masse	Ulcères
Maladie périrectale	Endoscopies
Hippocratisme digital	Ulcères
Stomatite	Pierre de pavé
Érythème noueux	Rectum épargné
Idiophagédénisme géométrique	
Données de croissance	
Vitesse de croissance diminuée pour l'âge	

1.3 Thérapie administrée lors d'une maladie de Crohn ou d'une colite ulcéreuse

La thérapie administrée aux patients atteints de la maladie de Crohn ou d'une colite ulcéreuse vise à diminuer l'inflammation dans l'espoir de contrôler les symptômes, de pallier les complications et de prévenir la récurrence ou l'aggravation de la maladie, car il n'existe pas de traitement curatif. Les thérapies possibles incluent une diète contrôlée, la chirurgie et les médicaments (Tableau III).

Tableau II Examens de laboratoire utilisés pour établir un diagnostic de colite ulcéreuse.

Formule sanguine complète, différentielle, compte des réticulocytes
Taux de sédimentation des GR, protéine C-réactive
Électrolytes, biochimie (incluant protéine totale, albumine, fonctions hépatiques)
Fer séreux, capacité totale de liaison du fer, ferritine
Cultures de selles pour pathogènes entériques (incluant <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Escherichia coli</i>)
Culture de selles pour détecter les toxines de <i>Clostridium difficile</i>
Examen microscopique direct des selles pour des oeufs et des parasites, des cristaux Charcot-Leyden, des leucocytes
Anticorps cytoplasmiques périnucléaires antineutrophiles

Il faut d'abord glisser un mot à propos des thérapies complémentaires et de la nutrition. En effet, parallèlement à l'administration d'une médication spécifique (voir plus loin pour les détails), certains médicaments visant à diminuer la diarrhée, les symptômes d'un syndrome d'irritabilité de l'intestin ainsi que certains suppléments de vitamine B₁₂ et de calcium peuvent être administrés. De plus, il y a de nombreuses recherches qui sont en cours afin de développer de nouveaux agents qui interféreraient avec la cascade inflammatoire (Markowitz 1999). Au niveau de l'alimentation, un régime peut être utilisé comme point de départ sans médication ou être complémentaire à la médication chez les patients avec une maladie de Crohn (Hyams 1999). Cette thérapie n'est pas efficace chez les patients atteints de colite ulcéreuse, mais elle est souvent prescrite avec d'autres types de thérapies (Markowitz 1999). En ce qui concerne la chirurgie, elle est souvent nécessaire chez 50% à 70% des enfants ou des adultes atteints de la maladie de Crohn dans les 10 à 15 premières années suivant le diagnostic (Hyams 1999). Chez les patients atteints de colite ulcéreuse, la chirurgie représente un traitement curatif. Dans les 5 années suivant le diagnostic, 19% des enfants et des adolescents ayant des symptômes intractables ou fulminants nécessitent une colectomie (Markowitz 1999).

Tableau III Options de thérapies médicales pour la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse incluant la nutrition, les antibiotiques, les 5-aminosalicylates, les corticostéroïdes et les immunomodulateurs.

Catégories	Maladie de Crohn	Colite ulcéreuse
Nutrition		
Prise alimentaire appropriée (avec ou sans suppléments alimentaires)	oui	oui
Acides gras à courtes chaînes	---	oui
Acides gras n-3 (huiles de poissons)	oui	oui
Antibiotiques		
Metronidazole	oui	oui (quelquefois)
Ciprofloxacine	oui	non (pas bénéfique)
5-Aminosalicylates		
Sulfasalazine	oui	oui
Mesalamine	oui	oui
Olsalazine	---	oui
Balsalazide	---	oui
Corticostéroïdes		
Prednisone, prednisolone, hydrocortisone	oui	oui
Budesonide	oui	oui
Fluticasone propionate	---	oui
Immunomodulateurs		
6-mercaptopurine	oui	oui
Azathioprine	oui	oui
Méthotrexate	oui	oui
Cyclosporine	oui	oui
Tacrolimus	---	oui

Adapté de Hyams (1999) et Markowitz (1999) dans Pediatric Gastroenterology Disease : pathophysiology, diagnosis and management.

Dans cette étude nous nous intéressons particulièrement à l'aspect pharmacologique du traitement des MII. Différentes classes de médicaments telles que les aminosalicylates, les antibiotiques, les corticostéroïdes et les immunomodulateurs peuvent être utilisés chez les patients atteints d'une MII.

1.3.1 Les aminosalicylates

Les effets anti-inflammatoires des drogues 5-aminosalicylates (5-ASA) semblent être locaux et utilisent différents mécanismes qui ne seront pas discutés plus en profondeur ici.

1.3.2 Les antibiotiques

Les antibiotiques ont longtemps été utilisés comme traitement de base ainsi que pour pallier aux complications de la maladie de Crohn malgré le fait que leurs mécanismes d'action ne soient pas clairs. Par contre, dans le traitement de la colite ulcéreuse, les antibiotiques jouent un rôle mineur (Markowitz 1999).

1.3.3 Les corticostéroïdes

Les corticostéroïdes semblent agir par une inhibition de l'expression ou de la production de polypeptides impliqués dans la réponse inflammatoire (ex., molécules d'adhésion, cytokines, leukotriènes). Bien que ces drogues soient efficaces dans le traitement des MII, chez certains patients leur utilisation mène au développement d'une dépendance. Celle-ci est observée lorsqu'un patient présente une amélioration immédiate des symptômes, mais rechute rapidement après l'arrêt du traitement ou lors de la diminution de la dose (Munkholm *et al.* 1994). Cette dépendance nécessitera une continuation de la thérapie ou le passage à une thérapie alternative (ex., immunomodulateurs), afin de ne pas produire une réapparition ou une aggravation des symptômes. L'utilisation prolongée des corticostéroïdes pourra mener à la production d'effets secondaires connus (Tableau IV) qui sont largement liés aux doses administrées ainsi qu'à la fréquence et à la durée de l'administration (Hyams 1999; Spahn et Kamada 1995). Leur utilisation doit donc être titrée en fonction des effets

thérapeutiques et des effets secondaires potentiels. Par contre, de nouveaux stéroïdes synthétiques, comme le budesonide, sont maintenant utilisés dans le traitement tant de la maladie de Crohn que de la colite ulcéreuse (Hyams 1999; Markowitz 1999).

Tableau IV Effets secondaires de la thérapie aux corticostéroïdes.

Cosmétique	Musculosquelettique
Faciès lunaire	Ostéoporose
Acné	Nécrose aseptique de la tête du fémur
Hirsutisme	Collapsus vertébral
Vergeture	Myopathie
Obésité tronculaire	Psychologique
Métabolique	Changement d'humeur
Hypokaliémie	Psychose
Hyperglycémie	Autres
Hyperlipidémie	Hypertension
Endocrinologique	Glaucome
Inhibition de la croissance	Cataractes
Puberté retardée	Immunosuppression
Inhibition de la surrénale	Pseudotumeur cérébrale

1.3.4 Les immunomodulateurs

La thérapie basée sur les immunomodulateurs est très souvent utilisée dans le traitement de la maladie de Crohn et chez de plus en plus d'enfants atteints d'une colite ulcéreuse, car la chirurgie, bien qu'efficace, ne représente pas un choix qui plaît aux parents ou aux médecins (Hyams 1999; Markowitz 1999). Tous les immunomodulateurs prédisposent les patients à une augmentation du risque de développer une infection ainsi que des effets secondaires nécessitant un arrêt de traitement (Markowitz 1999).

Mon mémoire porte, en partie, sur deux immunomodulateurs qui sont utilisés dans le traitement des MII, soit la 6-mercaptopurine (6-MP) et son précurseur l'azathioprine (AZA). L'AZA est rapidement transformée en 6-MP qui sera, par la suite, biotransformée en métabolites actifs. L'efficacité et la toxicité de ces deux drogues ont longtemps provoqué des débats mais, de nos jours, leur efficacité est reconnue et ils sont les immunomodulateurs les plus utilisés (voir section 4 pour plus de détails sur la pharmacologie). La toxicité propre de ces agents peut, quant à elle, être minimisée par un suivi clinique basé sur la formule sanguine et les niveaux des métabolites de ces drogues et des enzymes hépatiques. Les doses efficaces pour le traitement d'une MII sont de 2,0-2,5 mg/kg/jour pour l'AZA et de 1,0-1,5 mg/kg/jour pour la 6-MP, selon ce qui a été démontré par des études contrôlées (Sandborn 1996). Étant donné que ces deux médicaments inhibent la synthèse d'ARN (acide ribonucléique) et d'ADN (acide désoxyribonucléique) ainsi que la synthèse *de novo* des purines (voir section 3.1 pour plus de détails), ils produiront une rétroaction négative de l'activité des cellules T cytotoxiques et un retard des réactions d'hypersensibilité. Ces deux médicaments facilitent et maintiennent le développement d'une rémission et vont promouvoir une diminution des doses de corticostéroïdes autant chez les patients ayant une maladie de Crohn que chez ceux ayant une colite ulcéreuse, selon les indications mentionnées dans le Tableau V. Il semble que l'efficacité de la 6-MP et de l'AZA, soit largement reliée à la durée du traitement reçu par les patients (Sandborn 1996). Ainsi, de 3 à 6 mois semblent requis pour que l'efficacité de ces deux drogues soit perçue (Hyams 1999; Markowitz *et al.* 2000). Selon les résultats de Sandborn *et al.* (1995) dans une étude pilote chez 12 patients atteints de la maladie de Crohn, une dose intraveineuse d'AZA au début du traitement, suivie par des doses orales, permettrait d'obtenir une réponse clinique similaire à celle observée lors d'une administration orale d'AZA, mais en moins de 4 semaines chez la plupart des patients. Le groupe de Sandborn a, par la suite, effectué une étude cas-contrôles chez 96 patients (Sandborn *et al.* 1999). Les résultats de cette étude montrent que l'administration d'une dose intraveineuse de départ ne diminue pas le temps de réponse au traitement et n'augmente pas le taux de réponse chez des patients atteints d'une maladie de Crohn active traités aux stéroïdes et qui commencent un traitement d'AZA oral. Les auteurs concluent que malgré qu'une dose intraveineuse de départ soit sécuritaire, elle n'est pas efficace pour améliorer le temps de réponse au traitement. Par contre, le temps de réponse ainsi que le temps nécessaire à l'atteinte d'un

état d'équilibre des 6-thioguanines nucléotides (6-TGN) dans les globules rouges étaient plus rapide que dans d'autres études. [La relation qui existe entre les niveaux des métabolites de la 6-MP et de l'AZA, tels que les 6-TGN, et la réponse thérapeutique sera élaborée à la section 3]. Des études additionnelles sont donc essentielles afin de confirmer ou d'infirmer ces résultats dans le but d'améliorer le traitement des patients. Récemment, une étude de Markowitz *et al.* (2000) a clairement démontré l'efficacité de la 6-MP en combinaison avec de la prednisone, lors du traitement **initial** de la maladie de Crohn chez des patients pédiatriques. Le fait d'administrer conjointement ces deux drogues favorise une réponse thérapeutique rapide, un maintien de la rémission prolongé ainsi qu'une exposition à des doses cumulatives de corticostéroïdes significativement plus faible (Markowitz *et al.* 2000).

En regard de l'utilisation de la 6-thioguanine (6-TG), un médicament étroitement relié à la 6-MP, comme une alternative potentiellement supérieure chez les enfants atteints de leucémie lymphoblastique aiguë (LLA), il y a eu, depuis quelques mois, un intérêt marqué pour son utilisation chez les patients avec une MII et ce, compte tenu du rôle que les métabolites méthylés de la 6-MP pouvaient jouer dans l'hépatotoxicité. Il en sera question plus en détails dans la section 3.

Le méthotrexate (MTX) est un analogue des folates, similaire à d'autres anti-folates comme le triméthoprime et la pyriméthamine. Le MTX et ses métabolites polyglutamates inhibent l'enzyme dihydrofolate réductase (DHFR). De plus, ces métabolites inhibent plusieurs autres enzymes dépendantes des folates (Sandborn 1996). Toutes ces activités inhibitrices résultent en une inhibition de la synthèse des purines et de la transméthylation, de même qu'à une suppression de la production des leukotriènes B₄ et de l'interleukine-1 (Sandborn 1996). Le MTX semble être efficace pour les patients ayant une maladie de Crohn modérée ou une dépendance aux stéroïdes ou pour maintenir une rémission. Par contre, pour les patients atteints d'une colite ulcéreuse, les résultats sont peu nombreux.

Tableau V Indications pour l'utilisation de l'AZA et de la 6-MP pour le traitement d'une MII.

	AZA	6-MP
Maladie de Crohn		
Inflammation légère à modérée (réfractaire aux stéroïdes)	oui	oui
Inflammation sévère (réfractaire aux stéroïdes)	non	non
Dépendance aux stéroïdes	oui	oui
Fistules	oui	oui
Maintien de la rémission	oui	oui
Colite Ulcéreuse		
Inflammation légère à modérée (réfractaire aux stéroïdes)	non	non
Inflammation sévère (réfractaire aux stéroïdes)	non	non
Dépendance aux stéroïdes	oui	oui
Maintien de la rémission	oui	oui

La cyclosporine et le tacrolimus sont des inhibiteurs potentiels de la réponse immunitaire cellulaire via une inhibition des gènes responsables de la production d'interleukine-2 et d'interleukine-4 ainsi que d'interféron γ . La fonction des cellules T et dans une moindre mesure celle des cellules B est alors affaiblie (Sandborn 1996; Markowitz 1999). La cyclosporine n'est pas efficace chez tous les patients et des doses faibles administrées oralement n'ont montré aucune efficacité. Ni le MTX ni la cyclosporine n'ont montré qu'ils pouvaient maintenir une rémission.

Tel que mentionné dans l'avant-propos, il sera maintenant question de la leucémie lymphoblastique aiguë.

2. Leucémie lymphoblastique aiguë

2.1 Incidence, définition, caractéristiques et étiologie des différentes leucémies

Chaque année au Canada, un cancer est diagnostiqué chez environ 879 enfants (0 à 14 ans) et 176 enfants en meurent. La leucémie représente le cancer le plus fréquent chez les enfants comptant pour plus de 30% des nouveaux cas et des décès (Société canadienne du cancer *et al.* 1999). À l'Hôpital Sainte-Justine environ 25 nouveaux cas de LLA sont diagnostiqués chaque année. Avant de discuter en détails des différentes leucémies, il est important de faire un rappel sur l'hématopoïèse. Cette dernière est effectuée par la moelle osseuse chez les mammifères et représente l'ensemble des mécanismes qui assurent la production continue et régulière des différentes cellules sanguines. Les cellules ainsi produites possèdent une durée de vie limitée. Toutes ces cellules sont issues d'une seule cellule souche hématopoïétique multipotente. Les cellules sanguines peuvent être classées en trois grands groupes; les plaquettes, les globules rouges et les globules blancs. Les globules blancs réfèrent à quatre catégories; les granulocytes (neutrophiles, basophiles et éosinophiles), les monocytes, les lymphocytes (lymphocytes B et lymphocytes T) et les cellules tueuses naturelles (natural killer, NK)) (Figure1).

Le terme leucémie réfère à une série de troubles malins qui peuvent affecter les cellules précurseurs de deux lignées hématopoïétiques; les myéloblastes ou les lymphoblastes. De plus, il est important de faire la distinction entre les leucémies chroniques et aiguës. Les leucémies chroniques sont caractérisées par une prolifération anormale des blastes qui ne subissent toutefois pas un arrêt de maturation. Les leucémies aiguës, quant à elles, sont caractérisées par un arrêt de maturation des blastes. Le sang contient donc une quantité anormale de globules blancs matures ou immatures. En tenant compte de ces deux niveaux de classification, les leucémies peuvent être classées en quatre catégories : la leucémie myéloïde chronique (LMC), la leucémie myéloïde aiguë (LMA), la leucémie lymphoïde chronique (LLC, envahissement par des globules blancs matures, lymphocytes) et la leucémie lymphoblastique aiguë (envahissement par des

blastés; le terme lymphoïde aurait aussi pu être utilisé mais afin de respecter l'ensemble du texte de ce mémoire, le terme lymphoblastique a été retenu).

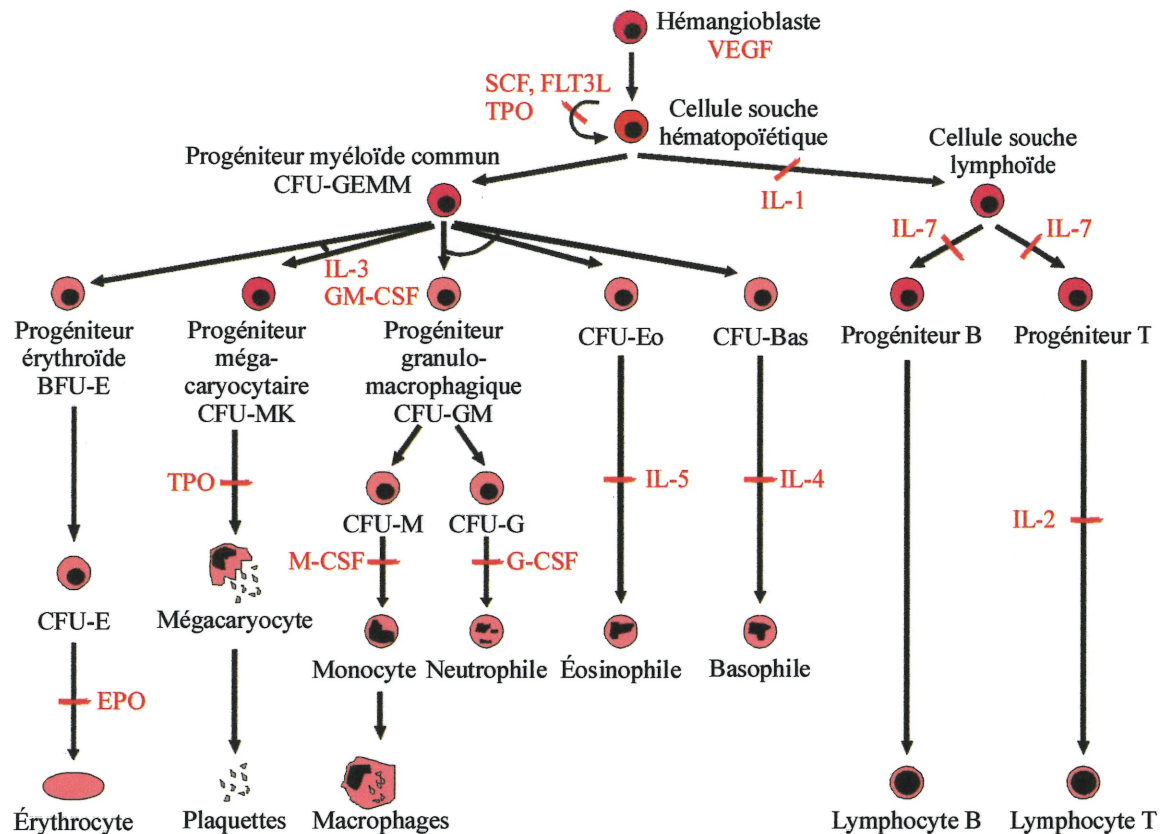


Figure 1 Schéma de la hiérarchie des progéniteurs hématopoïétiques et indication des étapes cibles des facteurs de croissance.

Les différents progéniteurs des lignées myéloïdes et lymphoïdes sont indiqués: progéniteurs pluripotents CFU-GEMM: colony-forming unit granulocyte-erythroid-macrophage-megacaryocyte. Progéniteurs déterminés des différentes lignées myéloïdes; BFU-E: burst-forming unit-erythroid; CFU-E: colony-forming unit-erythroid; CFU-MK: colony-forming unit-megakaryocyte; CFU-GM: colony-forming unit-granulocyte-macrophage; CFU-M: colony-forming unit-macrophage; CFU-G: colony-forming unit-granulocyte; CFU-Eo: colony-forming unit-eosinophil; CFU-Bas: colony-forming unit-basophil. Les facteurs de croissance sont également indiqués; VEGF: vascular endothelial growth factor; SCF: stem cell factor; FLT3-L: fetal liver tyrosine kinase ligand; TPO: thrombopoïétine; GM-CSF: granulocyte-megakaryocyte colony stimulating factor; EPO: érythropoïétine; M-CSF: macrophage CSF; G-CSF: granulocyte-CSF.

Tiré de Cortes et Labastie (2000) Médecine/Science.

2.2 Caractéristiques cliniques de la leucémie lymphoblastique aiguë

Chez les enfants de 0 à 14 ans, la LLA représente environ 75% des leucémies d'origine lymphoïde qui elles-mêmes représentent un peu plus de 75% de tous les types de leucémies (Miller 1994). Nous avons concentré nos efforts sur ce type de leucémie puisque ces patients composent la grande majorité de notre clientèle, les protocoles de traitement sont clairement préétablis (incluant l'administration de MTX et de 6-MP), les données cliniques sont archivées et le matériel biologique est facilement accessible.

Les manifestations cliniques de la LLA incluent l'anémie avec des palpitations à cause de la diminution des globules rouges, la neutropénie, la thrombopénie, des hémorragies par un manque de plaquettes et des risques d'infections par un manque de polynucléaires. Il peut y avoir un envahissement des ganglions lymphatiques et de la rate qui verront alors leur volume augmenter. La peau peut aussi être envahie et il y a alors des papules rouge-brun. Des maux de tête, une méningite, une paralysie faciale ou des troubles de conscience peuvent survenir lorsque le système nerveux est envahi. (Vernant *et al.* 1996)

Toutefois, le diagnostic de la LLA se base sur l'examen cytologique des frottis de moelle et de sang. Lorsque plus de 30% des éléments nucléés de la moelle sont des blastes, le diagnostic de leucémie aiguë est posé. Par la suite, il faut préciser l'origine de la leucémie par des analyses cytologiques qui permettront d'observer des éléments de différenciation myéloïde. Puis, s'il n'y a pas d'éléments de différenciation cytologique, la cytochimie sera utilisée afin d'obtenir des informations supplémentaires sur l'origine myéloïde (Vernant *et al.* 1996). À la suite de tous ces tests, s'il n'y a pas de certitude sur la nature myéloïde des blastes, la LLA est envisagée par défaut. Le phénotypage immunologique est alors nécessaire à la confirmation du diagnostic présumé. Si le phénotypage s'avère négatif, la microscopie électronique avec cytochimie entre en ligne de compte afin d'identifier l'origine myéloïde de blastes indifférenciés. De nos jours, la classification cytologique des leucémies aiguës la plus souvent utilisée est celle décrite par le groupe FAB (*French-American-British Cooperative Group*) (Vernant *et al.* 1996). Cette classification est basée sur des techniques morphologiques simples complétées par

les examens cytochimiques déjà cités. Les LLA sont ainsi classifiées en 3 sous-classes (L1 à L3). Les LLA sont aussi classées selon la lignée lymphocytaire impliquée, soit les lymphocytes B ou les lymphocytes T. La différence est importante pour le pronostic et a une implication thérapeutique. La fréquence des différents phénotypes possibles est variable en fonction de l'âge. Environ 80% des LLA sont rattachés à la lignée B et moins de 15% à la lignée T.

2.3 Thérapie administrée lors d'une leucémie lymphoblastiques aiguë de l'enfant

Au cours de la dernière décennie, la survie à long terme sans événement, suite à une LLA, a été évaluée entre 60% et 78%. La Figure 2 montre les pourcentages de survie sans événement, 5 ans après l'arrêt du traitement pour différents groupes à travers le monde. Les patients traités avec le protocole 91-01 de l'Institut du Cancer Dana-Farber pour la Leucémie Lymphoblastique Aiguë (DFCI ALL) ont atteint une survie sans événement à cinq ans de $83 \pm 2\%$ (Silverman *et al.* 2001). Malheureusement, il y a des effets secondaires à long terme, comme des changements non-symptomatiques à l'échographie cardiaque reliés à l'exposition antérieure à l'anthracycline, des troubles de croissance et des problèmes d'apprentissage plus ou moins sévères, probablement causés par l'exposition du système nerveux central (SNC) à la thérapie directe.

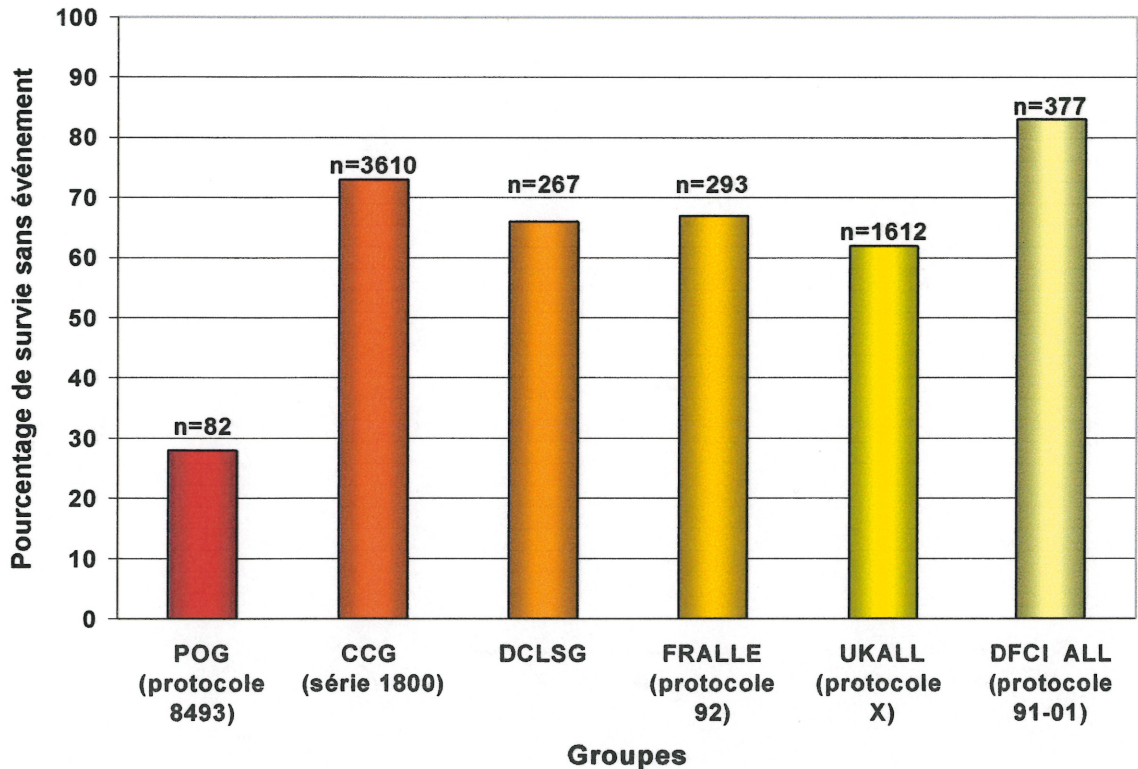


Figure 2 Résultats les plus récents des pourcentages de survie sans événement suite à une leucémie lymphoblastique aiguë: comparaison de 6 différents protocoles.

POG: Pediatric Oncology Group; CCG: Children's Cancer Group; DCLSG: Dutch Childhood Leukemia Study Group; FRALLE: French Acute Lymphoblastic Leukemia; UKALL: United Kingdom Acute Lymphoblastic Leukaemia; DFCI ALL: Dana-Farber Cancer Institute Acute Lymphoblastic Leukemia.

(Frankel *et al.* 1997; Gaynon *et al.* 1998; Van Der Does-Van Der Berg *et al.* 1998; Schaison *et al.* 1998; Saha et Eden 1998; Silverman *et al.* 2001)

Dans le cadre de mon projet, nous avons étudié les patients leucémiques traités selon le protocole 95-01 du DFCI ALL. Au moment du diagnostic, les patients étaient classés dans un des trois groupes de risque de rechute : Risque Standard (RS), Risque Élevé (RE) et Risque Élevé des Nourrissons (REN), selon les critères présentés dans le Tableau VI. Le groupe de REN inclus tous les patients de moins de douze mois.

Tableau VI Critères de classification du groupe de risque standard de rechute du protocole 95-01 du DFCI ALL.

Compte de globules blancs < 50 000/mm ³
≥ 1 an et < 9 ans
Absence de blastes leucémiques dans le liquide céphalo-rachidien (LCR)
Absence de masse médiastinale
Absence de marqueurs de cellules T sur les lymphoblastes
Absence de paralysie du nerf crânien
Durant l'induction : globules blancs < 5 sans blastes dans le LCR
À la fin de l'induction :
a) absence de translocation chromosomique (9;22)
b) sang périphérique sans lymphoblaste et < 5% de lymphoblastes dans une moelle osseuse normocellulaire avec des comptes cellulaires périphériques normaux au jour 51
c) pas de maladie extramédullaire mesurable histologiquement

Tous les patients qui ne répondaient pas aux critères mentionnés dans le Tableau VI, au moment du diagnostic ou à la fin de la période d'induction, étaient classés dans le groupe de RÉ. Les patients avec une translocation chromosomique (9;22) étaient traités selon le protocole de RÉ, mais un donneur de moelle osseuse était recherché pour une transplantation.

La stratégie de traitement de ce protocole se base sur une thérapie d'induction (30 jours) visant à obtenir une rémission complète par l'administration de la doxorubicine, du dexrazoxane, d'une formulation d'asparaginase, de la vincristine, de la prednisone et par l'administration intrathécale de MTX, de cytosine arabinoside (ARA-C) et de l'hydrocortisone. Une période d'intensification suit avec l'ajout de radiothérapie et de la 6-MP à des doses de 50 mg/m²/jour p.o. durant les quatorze premiers jours d'un cycle de vingt et un jours. Finalement, il y a la phase d'entretien qui est administrée jusqu'à l'obtention d'une rémission complète continue (RCC) de deux ans (Silverman *et al.* 2001). Cette partie du traitement a pour but d'éliminer toute maladie résiduelle. La 6-MP et le MTX sont utilisés dans tous les protocoles mentionnés à la Figure 2, afin de

prolonger les rémissions induites par les autres drogues durant la phase d'induction (Lennard *et al.* 1990). La Figure 3 montre le protocole complet pour les 3 groupes de risque tel que défini par le protocole 95-01 du DFCI ALL.

L'AZA et la 6-MP étant les drogues cibles de cette étude sur la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse ainsi que sur la leucémie lymphoblastique aiguë, leur pharmacologie fondamentale et clinique sera décrite plus en détails dans la section qui suit.

Fenêtre d'investigation (Jours 0-3) IT ARA-C RS: bolus de Doxorubicine aux jours 0 + 1 RÉ et RÉN:	Induction (Jours 4-25)	Thérapie des RÉN (Après une RC documentée)	Rx du SNC + Intensification (Après une RC documentée)	Entretien
<p>↗ A*₁</p> <p>↘ A. bolus de Doxorubicine aux jours 0 + 1, chacun précédé de Dexrazoxane</p>	<p>↗ A**₂</p> <p>↘ D. 1 dose <i>Erwinia</i> IT MTX/ARA-C/HC aux jours 11 + 25 (+ du Leucovorin au jour 12)</p>	<p>Asparaginase: C. 1 dose <i>E.coli</i> par sem x3 sem ou D. 1 dose <i>Erwinia</i> par sem x3 sem</p>	<p>RÉ et RÉN: A. bolus de Doxorubicine aux 3 sem jusqu'à une dose cumulative de 300 mg/m² ou B. bolus de Doxorubicine + Dexrazoxane aux 3 sem jusqu'à une dose cumulative de 300 mg/m² RS, RÉ et RÉN: Asparaginase: C. 1 dose <i>E.coli</i> par sem x 20 sem ou D. 1 dose <i>Erwinia</i> par sem x 20 sem RS: E. 1800 cGy hyperfractionnée + IT MTX/ARA-C aux 18 sem F. intensive intrathécale MTX/ARA-C/HC aux 9 sem pour 6x RÉ et RÉN: G. 1800 cGy conventionnelle + IT MTX/ARA-C aux 18 sem H. 1800 cGy hyperfractionnée + IT MTX/ARA-C aux 18 sem</p>	<p>E. IT MTX/ARA-C aux 18 sem ou F. IT MTX/ARA-C/HC aux 18 sem RÉ et RÉN: IT MTX/ARA-C aux 18 sem</p>
<p>↗ A***₃</p> <p>↘ A****₄</p>	<p>Vincristine 6-MP MTX (+ du Leucovorin) IT MTX HD ARA-C</p>	<p>Cycle de 3 sem: Vincristine Prednisone 6-MP MTX (RS seulement)</p>	<p>Cycle de 3 sem: Vincristine Prednisone 6-MP MTX</p>	<p>Cycle de 3 sem: Vincristine Prednisone 6-MP MTX</p>

Abréviations; IT: intrathécale; *E. coli*: *Escherichia coli*; HC: hydrocortisone; RC: rémission complète; HD ARA-C: high dose ARA-C ; A: distribution aléatoire; Rx: radiothérapie; sem: semaine; cGy: centigray.

Lorsque non spécifié, le traitement s'applique aux 3 groupes de risque.

* La distribution aléatoire de la Doxorubicine se poursuit au cours de la période d'intensification.

** La distribution aléatoire de l'Asparaginase se poursuit au cours de la période d'intensification.

*** Les filles avec un RS ayant un taux de globules blancs < 20 000 pré-traitement reçoivent de la chimiothérapie intensive intrathécale comme dans le bras F de la distribution aléatoire.

**** Les radiations commencent à l'âge de 12 mois.

Continuer jusqu'à l'obtention de 24 mois en RCC, puis arrêter.

Figure 3 Protocole de traitement 95-01 du DFCI ALL pour les 3 groupes de risque de rechute (Dana Farber Cancer Institute Consortium 1995).

3. Pharmacologie de la 6-Mercaptopurine et de son précurseur, l'Azathioprine

Les thiopurines, comme la 6-MP et l'AZA, sont utilisées dans le traitement des patients atteints de maladies néoplasiques (LLA) et auto-immunes (MII, arthrite) ainsi que dans le traitement des patients recevant une greffe d'organe. La variabilité de la réponse thérapeutique à ces drogues peut s'expliquer par une différence intra-individuelle et inter-individuelle dans la biotransformation de ces médicaments. La pharmacocinétique et la pharmacodynamique se rattachant à l'utilisation de l'AZA et de la 6-MP seront discutées dans les deux premières parties de cette section. Les avantages et les désavantages reliés à l'utilisation de la 6-TG chez les enfants souffrant de LLA ou d'une MII seront discutés dans la troisième partie de cette section. La quatrième partie est dévolue à la pharmacogénétique, notamment celle de la thiopurine méthyltransférase (TPMT), une des enzyme clé dans le métabolisme de l'AZA et de la 6-MP, ainsi que la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), une enzyme indirectement impliquée dans le métabolisme des thiopurines via le cycle des méthyles (Figure 4).

3.1 Pharmacocinétique

L'absorption de l'AZA et de la 6-MP par le tractus gastro-intestinal est influencée par la motilité gastrique et intestinale, la surface disponible pour l'absorption et les propriétés physico-chimiques de ces drogues (ex., poids moléculaire, constante d'ionisation, liposolubilité). Par exemple, les patients souffrant d'une MII sont souvent victime de diarrhée et leur transit gastro-intestinal est augmenté, ce qui pourrait diminuer l'absorption et, par conséquent, la biodisponibilité des thiopurines. De plus, des variations de pH ont été observées chez des patients atteints de colite ulcéreuse sévère ce qui peut aussi influencer l'absorption de la 6-MP dont le pKa est de 7,6 (Fallingborg *et al.* 1993). Par contre, Press *et al.* (1998) n'ont pas observé de différence au niveau du pH entre des patients atteints de la maladie de Crohn et un groupe témoin. Des facteurs enzymatiques peuvent également influencer l'absorption et ainsi jouer un rôle important dans la biodisponibilité du médicament. Le premier passage métabolique au niveau de

l'intestin (et du foie) via l'enzyme xanthine oxydase (XO) contribue aussi à la diminution et à la variation de la biodisponibilité de l'AZA et de la 6-MP. La TPMT présente au niveau de l'intestin (et du foie) contribue directement (catabolisme des thiopurines) ou indirectement (augmentation de la liposolubilité des produits méthylés) à cette variabilité. Ainsi, l'AZA et la 6-MP possèdent une biodisponibilité variable et faible de 5 à 50% (Zimm *et al.* 1983).

La demi-vie plasmatique de l'AZA et de la 6-MP est courte et varie selon l'individu entre 1 et 2 heures. L'AZA est une pro-drogue rapidement transformée en 6-MP par une attaque nucléophile non enzymatique via une molécule contenant un groupement sulfhydryle, comme le glutathion qui est présent dans le plasma, les globules rouges et d'autres tissus (Sandborn 1996) (Figure 4). Le métabolisme de la 6-MP inclut trois voies majeures: l'oxydation, la méthylation et la phosphoribosylation. La XO catalyse l'oxydation de l'anneau thiopurine menant à l'acide thiourique, un métabolite inactif. La TPMT, comme son nom l'indique, catalyse la *S*-méthylation des groupements thiols sur les thiopurines (ex., 6-MP, 6-thioinosine 5'-monophosphate (6-TIMP), 6-thioguanosine 5'-monophosphate) (voir section 3.4). Ces métabolites méthylés sont usuellement regroupés sous le vocable 6-méthylmercaptopurine (6-MMP) et sont mesurés sous forme phosphatée, puisque les métabolites méthylés non phosphatés diffusent hors des cellules (Lennard et Singleton 1992). L'hypoxanthine phosphoribosyle transférase (HPRT) est l'enzyme qui initie la voie de formation des métabolites thioguanylés. Cette première étape d'activation est essentielle, car la 6-MP ne possède aucune activité intrinsèque. Suite à cette étape, plusieurs autres enzymes sont impliquées, en commençant par l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), la guanosine monophosphate synthétase (GMPS) ainsi que les kinases responsables de la formation de divers ribonucléotides. Ces divers nucléotides sont usuellement mesurés dans les globules rouges et sont regroupés sous le vocable de nucléotides de la 6-thioguanine (Lennard et Maddocks 1983). La demi-vie des 6-TGN à l'intérieur des globules rouges est élevée, soit entre 3 et 13 jours, et le temps nécessaire pour atteindre l'état d'équilibre pour les métabolites actifs peut varier de 20 jours à 3 ans. La demi-vie biologique des polymorphonucléaires étant de quelques jours, il apparaît impossible d'étudier *in vivo* la cinétique des thiopurines leucocytaires. De plus, chez les patients traités avec des immunomodulateurs, la quantité de globules blancs circulants est très

faible, ce qui rend difficile l'accès à une quantité suffisante de cellules pour permettre le dosage, bien que Warren *et al.* (1995) aient développé une méthode permettant de doser les niveaux des 6-TGN dans les globules blancs à partir de seulement 2 ml de sang. Par contre, Cuffari *et al.* (1996a) ont démontré que les niveaux des métabolites présents dans les globules rouges corrèlent positivement avec les niveaux obtenus dans l'ADN des globules blancs. Les globules rouges étant facilement accessibles et représentant une mémoire des dernières doses qui ont été administrées, ils sont utilisés pour effectuer les dosages. Étant donné les différents facteurs impliqués tels que les variations dans l'absorption et le métabolisme, il n'est pas surprenant que la réponse thérapeutique de l'AZA et de la 6-MP puisse être variable et lente à se manifester.

Le dosage des métabolites de l'AZA et de la 6-MP représente un outil efficace de suivi des patients permettant l'ajustement individuel des doses tout en évitant de causer des problèmes d'hépatotoxicité ou de myélosuppression (voir section 3.2). Même si certains auteurs ont montré que le dosage plasmatique de la 6-MP ou de ses métabolites avait une certaine pertinence chez les patients atteints d'une LLA, la majorité des études effectuées à ce jour ont porté sur les relations qui existent entre les concentrations intraérythrocytaires (ou intracellulaires) des thiopurines et un effet biologique ou thérapeutique. Bien qu'il existe très peu de données sur les relations entre les concentrations plasmatiques, les concentrations intraérythrocytaires et la réponse thérapeutique chez des patients non leucémiques recevant la 6-MP et l'AZA (MII, greffe, maladies auto-immunes) rien ne semble indiquer que la relation pourrait être différente de celle observée chez les patients atteints d'une LLA. Les niveaux des métabolites sont très variables chez un même patient et entre plusieurs patients. Les niveaux sont exprimés en fonction des globules rouges, plus précisément en $\text{pmol}/8 \times 10^8$ GR, puisque ces cellules sont le reflet de la dose cumulative reçue plutôt que celui de la dose administrée avant l'essai (Lennard et Maddocks 1983; Lennard 1985). Des niveaux se situant entre 113-1340 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ GR pour les 6-TGN et entre 0-22 500 $\text{pmol}/8 \times 10^8$ GR pour le 6-MMP ont été rapportés dans la littérature (Lilleyman et Lennard 1994; Lennard *et al.* 1993). Balis *et al.* (1998) ont, quant à eux, mesuré les niveaux des 6-TGN en fonction de la quantité d'hémoglobine, puisqu'ils n'avaient pas accès à une quantité suffisante de GR avant la congélation et que la décongélation produit une lyse des GR. Ces variations sont souvent interprétées en fonction du polymorphisme génétique relié à

l'enzyme TPMT qui est directement impliquée dans le métabolisme de la 6-MP ou à son induction (Lennard *et al.* 1990) (voir section 3.4). Des études chez des enfants atteints de LLA ont montré que les concentrations intraérythrocytaires des 6-TGN corrèlent négativement avec les comptes absolus de neutrophiles (Lennard *et al.* 1990). De plus, Lilleyman et Lennard (1994) ont montré que les risques de rechute sont plus faibles à des niveaux de 6-TGN supérieurs à $284 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ GR}$ chez des patients atteints de LLA. Bergan *et al.* (1998), quant à eux, ont montré qu'un maintien des niveaux des 6-TGN entre 100 et $200 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ GR}$, suite à des doses élevées d'AZA (5 mg/kg/jour) diminuait l'incidence d'épisode aigu de rejet d'une greffe rénale de 21%. Cuffari *et al.* (1996b) ont trouvé une corrélation significative inverse entre les niveaux intraérythrocytaires des 6-TGN et l'activité de la maladie chez les patients atteints d'une maladie de Crohn ou d'une colite ulcéreuse. Finalement, notre étude (chapitre 2 :1^{er} article), chez des patients atteints d'une MII, a montré que des niveaux des 6-TGN supérieurs à $235 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ GR}$ favorisaient la réponse thérapeutique (Dubinsky *et al.* 2000). Les risques d'hépatotoxicité ont été montrés comme étant plus élevés à des niveaux de 6-MMP supérieurs à $5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ GR}$ chez des patients atteints d'une MII (Dubinsky *et al.* 2000). Cette valeur seuil représente une référence pour les cliniciens qui désirent ajuster individuellement les doses des patients.

3.2 Pharmacodynamique

3.2.1 Effet « thérapeutique »

Les 6-TGN agissent comme des analogues des purines en interférant avec les voies métaboliques impliquant les purines endogènes afin d'inhiber la synthèse des protéines, de l'ARN et de l'ADN et de permettre la mort cellulaire (Sandborn 1996). Les 6-TGN peuvent être mésappariées avec la thymidine et ainsi causer des mésappariements de paires de bases (Rappaport 1993; Swann *et al.* 1997). Ce type de mésappariement de bases est fréquent et les cellules possèdent des enzymes de réparation efficaces afin de reconnaître et de corriger ces défauts. La perte de ces fonctions de réparation pourrait être une cause de résistance aux effets des 6-TGN (Griffin *et al.* 1994). La résistance ne serait alors pas associée à une augmentation de

l'expression des protéines de réparation mais plutôt à une tolérance de la présence des mésappariements des 6-TGN-thymidine, car il y aurait une perte des signaux nécessaires à l'induction de l'apoptose. Une étude de Pokorny *et al.* (1997) a aussi montré une association entre trois marqueurs génétiques du gène de réparation des mésappariements *hMLH1* (*human Mut L Homologue 1*) et les MII. Bien que d'autres études soient nécessaires afin de préciser les liens existants entre les gènes de réparation de l'ADN et l'étiologie de la maladie ainsi que son traitement, ces derniers semblent jouer un rôle important. Mis à part les mésappariements, la substitution des guanines par des 6-TGN affecte considérablement la structure normale de la double hélice de Watson-Crick. Cet effet est surtout causé par la différence de longueur du lien hydrogène entre le N-H...S et le N-H...O (3,3 Å vs 2,9 Å). Une telle perturbation pourrait représenter un mécanisme par lequel les thio-analogues des purines produisent leur effet thérapeutique. Finalement, le 6-méthylthioinosine 5'-monophosphate, un métabolite méthylé de la 6-MP produit par la TPMT, possède une activité inhibitrice sur la phosphoribosyle pyrophosphate (PRPP) amidotransférase qui est la première enzyme de la synthèse *de novo* des purines (Tay *et al.* 1969).

3.2.2 Effets secondaires

Les effets secondaires reliés à l'utilisation de l'AZA et de la 6-MP peuvent être classés en deux catégories: les réactions de type allergique qui sont doses indépendantes et surviennent habituellement entre 3 à 4 semaines après le début du traitement (pancréatite, fièvre, éruptions cutanées, arthralgie, malaise, nausées, diarrhée) et les réactions de type non-allergique qui sont probablement dépendantes de la dose et des métabolites et qui peuvent survenir précocement ou tardivement après des mois et même des années de traitement (leucopénie, thrombocytopenie, infection, hépatite, cancer) (Sandborn 1996; Sandborn 1998). La myélosuppression est un effet secondaire sévère potentiel des thiopurines, le plus souvent reliée au niveau des 6-TGN. Cette dernière pourrait être plus fréquente chez les patients qui possèdent une déficience en activité de l'enzyme TPMT, lors de l'administration concomitante de MTX (par une inhibition de la synthèse *de novo* des purines) ou, lorsque l'activité enzymatique de la TPMT est élevée (Hyams 1999). L'augmentation de l'inhibition de la synthèse *de novo* des purines par le 6-TIMP, favorise la voie de récupération des purines et des thiopurines. Cette voie

métabolique, moins coûteuse énergiquement que la synthèse *de novo* des purines, se base sur une hydrolyse des acides nucléiques produisant les bases puriques qui seront par la suite recyclées par le transfert d'un ribose phosphate à partir du PRPP (Rawn 1990). En effectuant la récupération des purines, les cellules utiliseront et intégreront ainsi plus de nucléotides modifiés à l'ADN, ce qui pourra mener à l'apoptose.

L'hépatotoxicité représente aussi un effet secondaire sérieux retrouvé chez les patients traités avec ces médicaments (Burchenal *et al.* 1953; Clark *et al.* 1960; Ellison *et al.* 1959; Farber 1954; Frei 1958; Gaffney et Cooper 1954; MacKay *et al.* 1964; McIlvanie et McCarthy 1959; Schein et Winokur 1975; Shorey *et al.* 1968; Zimmerman 1978). Des études *in vitro* et *in vivo* chez des rats, des hamsters, des lapins, des porcs et des microsomes de foies humains ont révélé que la 6-MP est convertie par le cytochrome P450 en métabolites réactifs (possiblement l'acide 6-sulphénique-purine) qui se lieraient de façon irréversible aux protéines microsomales hépatiques d'humain (Hyslop et Jardine 1978, 1981a et 1981b). Cette liaison semble se produire via la formation d'un lien disulfure entre les 6-thiopurines et les protéines thiols, en présence de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) et d'oxygène. D'autre part, des études effectuées chez des patients atteints d'une LLA laissent croire à une association entre l'accumulation de métabolites méthylés et le développement d'une hépatotoxicité de 1 à 2 mois suivant le début du traitement (Berkovitch *et al.* 1996). Nos observations (chapitre 2 : 1^{er} article) supportent cette hypothèse. Il est donc primordial d'effectuer périodiquement des analyses pharmacologiques et biochimiques (incluant les niveaux des enzymes hépatiques) afin de prévenir l'apparition d'une myélosuppression ou de dommages réversibles et/ou irréversibles au foie.

En ce qui concerne les risques de cancers secondaires, ils semblent être faibles chez les patients atteints d'une MII (Korelitz 1999). Toutefois, ce risque pourrait être plus élevé chez certains patients ayant une déficience en enzyme de réparation de l'ADN. Une étude récente a identifié des patients avec une activité de la TPMT faible (<14 U¹/ml GR) ou des niveaux de métabolites méthylés élevés, comme étant à plus haut

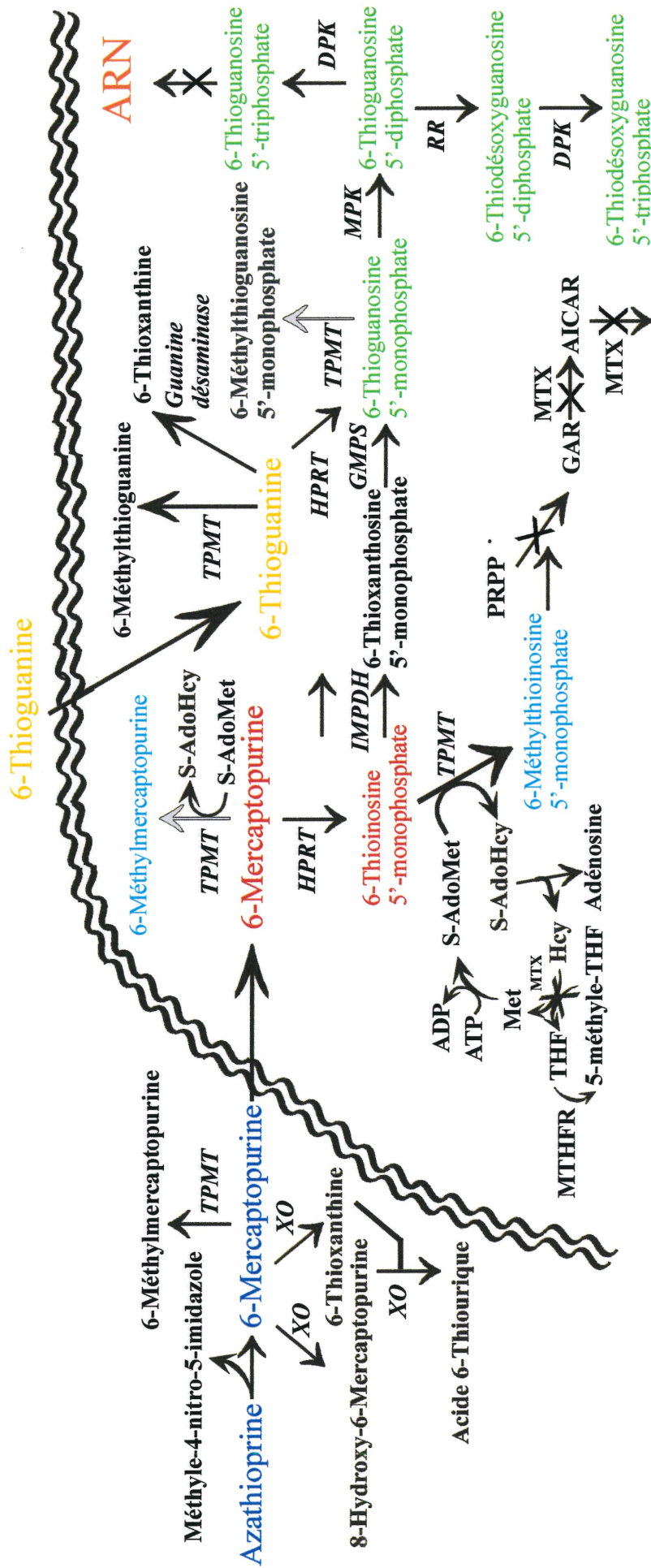
¹ 1 unité (U) d'activité de TPMT représente 1 nmol de 6-méthylmercaptapurine formé par heure/ml de culot de GR.

risque de développer une myélodysplasie secondaire ou une leucémie myéloïde aiguë (Thomsen *et al.* 1999).

3.3 Pharmacologie de la 6-Thioguanine

Au cours des 4 dernières décennies, l'utilisation préférentielle de la 6-MP en lieu de la 6-TG, un médicament étroitement relié à la 6-MP, était justifiée par des considérations historiques plutôt que scientifiques. Il y a eu un intérêt grandissant dans les dernières années pour l'utilisation de la 6-TG comme une thérapie alternative potentiellement supérieure chez les enfants atteints de MII ou d'une LLA. La 6-TG est métabolisée par 3 voies; une S-méthylation par la TPMT, une phosphoribosylation par la HPRT ou une désamination par la guanine déaminase (Lennard 1989; Deininger *et al.* 1994) (Figure 4). Lors de l'administration de la 6-TG, il y a formation, entre autres, de 6-méthylthioguanine nucléotides qui inhibent la synthèse *de novo* des purines, mais avec une efficacité au moins 10 fois plus faible que le 6-MMP (Allan et Bennett 1971). Lorsque la 6-TG est substituée à la 6-MP, les patients atteints de LLA ayant une activité élevée de la TPMT accumulent des niveaux supérieurs de 6-TGN intraérythrocytaires (Lennard *et al.* 1993). Par contre, ces niveaux de métabolites plus élevés ne corrélaient pas avec la réponse thérapeutique. Une autre étude comparant la 6-TG et la 6-MP chez des enfants atteints de LLA a montré que le groupe recevant la 6-MP présentait une corrélation inverse entre les niveaux intraérythrocytaires des 6-TGN et le comptes des neutrophiles et de globules blancs totaux, ce qui n'était pas observé pour le groupe de la 6-TG (Chrzanowska *et al.* 1999; Lennard *et al.* 1983; Schmiegelow et Bruunshuus 1990). Lancaster *et al.* (1998) ont montré qu'il n'y avait pas de différence au niveau de l'étendue de l'anémie ou de la neutropénie entre les patients recevant de la 6-MP et ceux recevant de la 6-TG. Par contre, la thrombocytopénie était plus fréquente dans le groupe recevant la 6-TG, ce qui est appuyé par les résultats du groupe COALL (Childhood Oncology Acute Lymphoblastic Leukemia) allemand, qui a observé une incidence 10 fois plus élevée de thrombocytopénie chez les patients recevant la 6-TG (Harms *et al.* 1996). De plus, la lymphopénie apparaissait plus prononcée dans le groupe traité avec la 6-TG (Lancaster *et al.* 1998).

Le développement de la pharmacogénétique ayant permis de mettre en évidence l'individualité de la réponse thérapeutique ou des manifestations toxiques en regard d'un polymorphisme génétique et d'un phénotype modifié, il n'est pas surprenant que plusieurs études, au cours des deux dernières décennies, aient porté sur la TPMT, une enzyme clé dans le métabolisme des thiopurines. Ainsi, la dose de thiopurine à être administrée à un individu devrait être ajustée *a priori* en fonction du génotype pour la TPMT. Toutefois, il ne faut pas perdre de vue que plusieurs autres protéines sont impliquées à la fois au niveau du métabolisme des thiopurines et/ou de l'action pharmacologique. Même si aucun polymorphisme fonctionnel n'a été décrit à ce jour dans ces protéines, cela ne signifie aucunement l'absence d'un tel polymorphisme. Finalement, il est possible que la pharmacocinétique et la pharmacodynamie des thiopurines soient affectées par un polymorphisme génétique qui ne soit pas directement associé (ex., MTHFR) à la voie métabolique des thiopurines. En regard de ces considérations, le présent mémoire se limitera donc à la relation qui peut exister entre les polymorphismes de la TPMT et de la MTHFR et les niveaux des métabolites de l'AZA et de la 6-MP et la réponse clinique.



Synthèse de
novo des purines
ADN

HPLC { Composés 6-Mercaptopurine
Composés 6-Méthylmercaptopurine
Composés 6-Thioguanine

HPRT: hypoxanthine phosphoribosyle transférase
IMPDH: inosine monophosphate déshydrogénase
GMPS: guanosine monophosphate synthétase
TPMT: thiopurine méthyltransférase
S-AdoMet: S-adénosyle-L-méthionine
S-AdoHcy: S-adénosyle-L-homocystéine
AICAR: aminoimidazole carboxamide ribonucléotide
GAR: glycinamide ribonucléotide
PRPP: 5-phosphoribosyle 1-pyrophosphate

ADP: adénosine diphosphate
ATP: adénosine triphosphate
MPK: monophosphate kinase
DPK: diphosphate kinase
RR: ribonucléotide réductase
XO: xanthine oxidase
Hcy: homocystéine
Met: méthionine
MTX: méthotrexate
THF: tétrahydrofolate

Figure 4 Voies métaboliques des analogues des guanines.

3.4. Pharmacogénétique

La TPMT est une enzyme cytosolique monomérique qui catalyse la S-méthylation de composés sulfurés aromatiques et hétérocycliques, grâce aux groupements méthyles fournis par la S-AdoMet (Weinshilboum *et al.* 1999). La S-méthylation est une voie de biotransformation importante pour les composés comme la 6-MP (AZA) et la 6-TG. La thiol méthyltransférase et la thioéther méthyltransférase catalysent, quant à elles, la S-méthylation des substances endogènes et de xénobiotiques tels que le captopril et la D-pénicillamine (Weinshilboum *et al.* 1999).

La TPMT est exprimée dans plusieurs tissus dont les reins, le foie et l'intestin. Les niveaux d'activité retrouvés dans les érythrocytes, qui sont facilement accessibles, sont corrélés à ceux retrouvés dans les tissus tels que les lymphocytes (Lennard 1992). Dans la population générale, il y a une variabilité inter-individuelle en ce qui a trait à l'activité de la TPMT. Selon Weinshilboum et Sladek 1980, il est improbable que les variations dans l'activité de la TPMT soient le résultat de différences héritées au niveau des activateurs, des inhibiteurs ou des systèmes enzymatiques compétitifs de cette enzyme. Approximativement 90% de la population d'origine européenne est homozygote sauvage avec une activité enzymatique élevée ($> 9,5$ U), environ 10% est hétérozygote avec une activité intermédiaire (1 à 9,5 U) et environ 1 individu sur 300 est homozygote mutant avec une activité enzymatique faible ou nulle (0 à 1 U) (Weinshilboum et Sladek 1980). Une telle distribution trimodale (Figure 5) peut être expliquée par des polymorphismes génétiques dans la séquence codante de cette enzyme.

Le gène de la TPMT est localisé sur le bras court du chromosome 6 (6p22.3), il a une longueur de 34 kb et possède 10 exons dont les exons 3 à 10 codent pour la protéine. Suite au clonage du gène de la TPMT une série de polymorphismes, associés à une diminution de l'activité enzymatique, ont été caractérisés (Tableau VII). Le variant allélique le plus commun chez les individus d'origine européenne est appelé *TPMT*3A* et est, en fait, responsable de 55 à 75% de tous les allèles mutants de cette population. Cet allèle contient deux polymorphismes en déséquilibre de liaison, le premier

changeant une alanine en thréonine (Ala→Thr) au codon 154 dans l'exon 7 et le deuxième changeant une tyrosine en cystéine (Tyr→Cys) au codon 240 dans l'exon 10 (Figure 6). Il existe aussi deux autres allèles relativement fréquents: TPMT*3B (G460A seulement) et TPMT*3C (A719G seulement).

Tableau VII Polymorphismes fonctionnels de la TPMT.

Allèle	Substitution nucléotidique	Changement d'acide aminé
TPMT*1	sauvage	-----
TPMT*2	G238C	Ala80Pro
TPMT*3A	G460A et A719G	Ala154Thr et Tyr240Cys
TPMT*3B	G460A	Ala154Thr
TPMT*3C	A719G	Tyr240Cys
TPMT*3D	G292T, G460A et A719G	Glu98Stop, Ala154Thr et Tyr240Cys
TPMT*4	G1352A (intron 9)	Altération du site d'épissage intron 9/exon 10
TPMT*5	T146C	Leu49Ser
TPMT*6	A539T	Tyr180Phe

Adapté de Weinshilboum et al. (1999) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol et Aarbakke et al. (1997) TIPS.

Cette variabilité dans la S-méthylation représente un facteur important impliqué dans la différence inter-individuelle de la réponse clinique et dans l'apparition des effets secondaires, puisqu'elle influence la production des différents métabolites responsables des effets thérapeutiques et toxiques (Weinshilboum *et al.* 1999). Il semble donc important de connaître le génotype de la TPMT des patients traités avec de l'AZA et de la 6-MP afin de prévenir les effets secondaires potentiels et de mieux traiter les patients qui seraient susceptibles de ne pas répondre aux doses habituellement administrées.

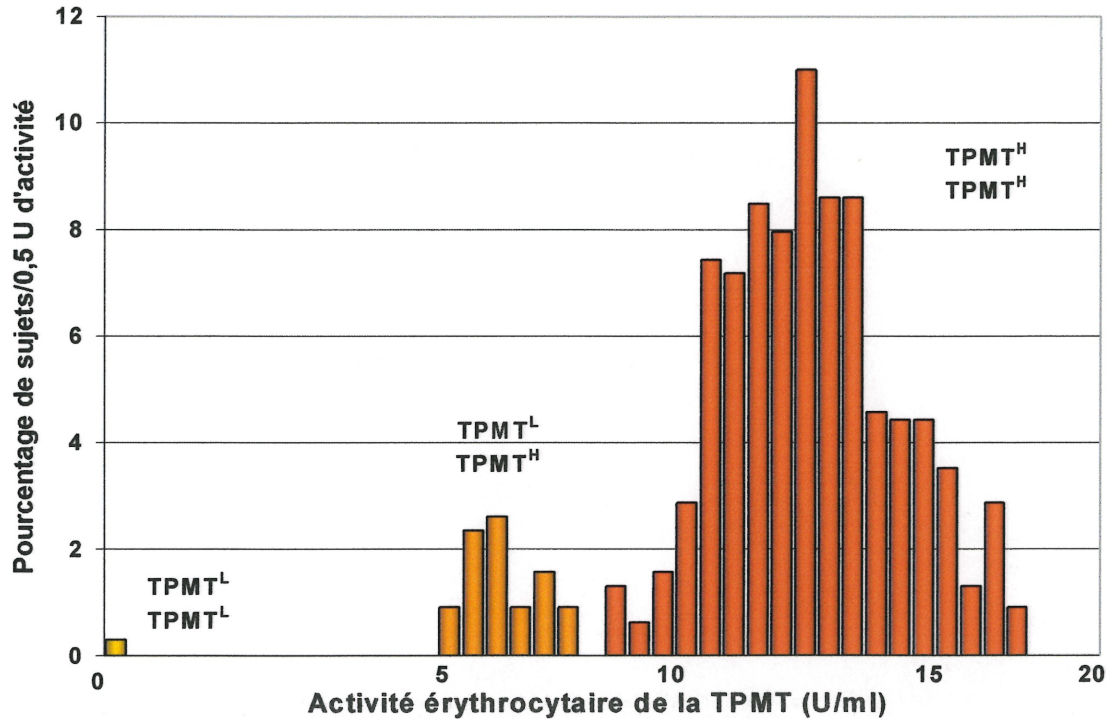


Figure 5 Distribution trimodale de l'activité enzymatique intraérythrocytaire de la TPMT.

TPMT^L/TPMT^L: homozygote mutant; TPMT^L/TPMT^H: hétérozygote; TPMT^H/TPMT^H: homozygote sauvage.

Tirée de Weinshilboum et Sladek (1980) *Am J Hum Genet*.

(Chromosome 6 région p22.3)

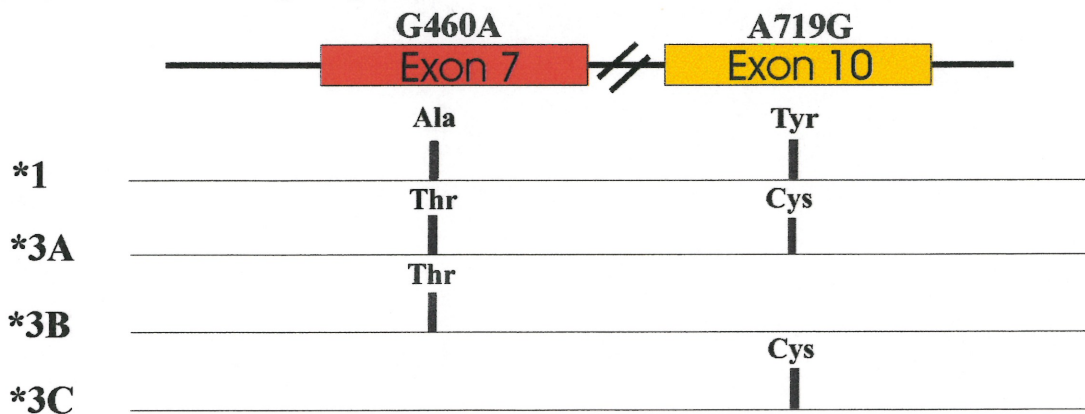


Figure 6 Schéma des 4 différents allèles de la TPMT étudiés.

L'allèle TPMT*1 (allèle sauvage) est caractérisé par l'absence de polymorphisme; *3A est défini par la présence de G460A et A719G en déséquilibre de liaison; tandis que *3B et *3C sont associés aux polymorphismes G460A et A719G, respectivement.

La biotransformation et l'action des thiopurines s'exercent également en interaction constante avec d'autres voies de biosynthèse qui peuvent elles-mêmes être tributaires d'un polymorphisme génétique fonctionnel. Les patients étudiés dans le présent mémoire ayant une LLA ou une MII sont traités avec plusieurs autres médicaments dont certains sont reconnus pour leur interférence avec les thiopurines. À cet égard, nous avons examiné le rôle que certains variants génétiques fonctionnels de l'enzyme MTHFR pouvaient avoir sur le métabolisme des thiopurines.

Le gène de la MTHFR est localisé sur le bras court du chromosome 1 (1p36.3). Les analyses génétiques récentes portent le nombre de mutations identifiées à plus de 20, dont la plupart sont des mutations rares (Sibani *et al.* 2000). Dans ce mémoire, nous avons concentré nos efforts sur 2 polymorphismes communs dans la population (Figure 7). Le premier polymorphisme se situe à la position 677 (C677T) dans le domaine catalytique N-terminal et se rapporte à un changement d'une alanine en une valine (Ala→Val) qui résulte en une enzyme thermolabile (Weisberg *et al.* 1998). Ce polymorphisme est associé, chez les homozygotes mutants, à une activité enzymatique réduite de 60-65% comparativement aux individus homozygotes sauvages. Cette diminution de l'activité enzymatique est associée, entre autres, à une hyperhomocystéinémie, un risque de maladies cardio-vasculaires ainsi qu'un risque de défaut du tube neural. Le second polymorphisme se situe à la position 1298 (A1298C) dans le domaine catalytique C-terminal et se rapporte à un changement d'un glutamate en une alanine (Glu→Ala) qui résulte en une diminution de l'activité enzymatique d'environ 65% chez les homozygotes mutants comparativement aux homozygotes sauvages (Weisberg *et al.* 1998). Cette diminution de l'activité n'affecte toutefois pas significativement les concentrations d'homocystéine. Ces 2 polymorphismes sont rarement observés sur un même allèle. Par contre, les hétérozygotes combinés pour les 2 polymorphismes peuvent être associés avec une augmentation de l'homocystéine plasmatique et des risques plus élevés de spina bifida (Sibani *et al.* 2000). Les homozygotes sauvages représentent environ 15-20% de la population, les hétérozygotes 40% et les homozygotes mutants 40%.

Le choix d'étudier cette enzyme polymorphique parmi une multitude d'autres se justifie par la raison suivante. Une modification de l'activité de la MTHFR peut entraîner une altération des équilibres d'interconversion entre les différents dérivés tétrahydrofolates qui jouent le rôle de cofacteurs donneurs de groupes monocarbonés dans de nombreuses réactions. La MTHFR catalyse effectivement la réduction du N⁵,N¹⁰-méthylène tétrahydrofolate en N⁵-méthyle tétrahydrofolate. Ce dernier dérivé est le donneur d'un groupement méthyle pour la formation de la méthionine à partir de l'homocystéine. La méthionine est requise pour la formation de la S-adénosyle-L-méthionine qui permet l'apport en groupements méthyle dans les réactions de méthylation catalysées par les diverses méthyltransférases notamment la TPMT. Alors, une activité déficiente de la MTHFR pourrait conduire à une baisse de l'apport des groupements méthyle et à une diminution de la méthylation par la TPMT.

(Chromosome 1 région p36.3)

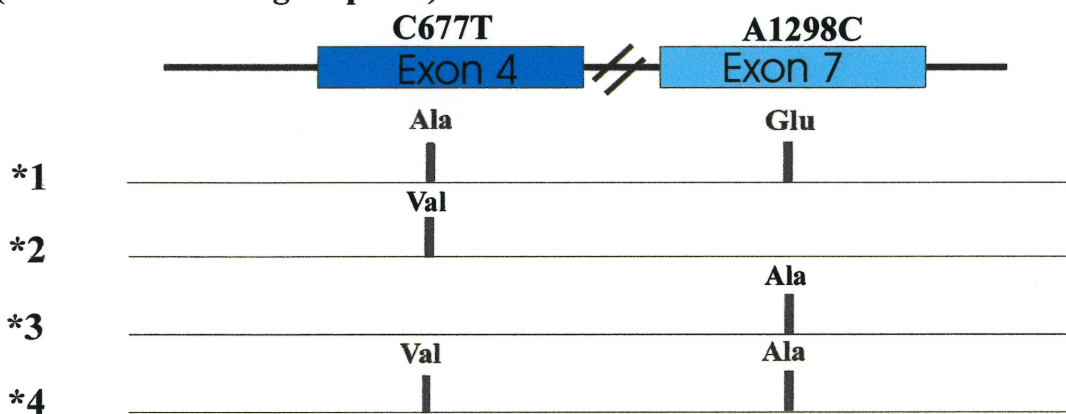


Figure 7 Schéma des 4 différents allèles de la MTHFR étudiés.

L'allèle MTHFR*1 (allèle sauvage) est caractérisé par l'absence de polymorphisme; *2 est défini par la présence de C677T; *3 est défini par la présence de A1298C; *4 est associé aux polymorphismes C677T et A1298C.

4. But

En regard des éléments mentionnés dans les sections précédentes, il nous apparaissait pertinent de vérifier si le génotypage systématique des patients atteints d'une maladie inflammatoire de l'intestin ou d'une leucémie lymphoblastique aiguë, recevant, selon le cas, de l'AZA ou de la 6-MP, ainsi qu'un dosage périodique des diverses thiopurines (6-MP, 6-TGN et de 6-MMP), permettraient :

- 1) de déterminer si les patients respectent la posologie prescrite
- 2) d'établir la relation entre le génotype de la TPMT, les niveaux des thiopurines, la réponse thérapeutique et les effets secondaires
- 3) d'optimiser les doses administrées et ainsi d'augmenter l'efficacité du traitement
- 4) de diminuer les risques potentiels de développer des effets secondaires en modifiant les doses selon les résultats du génotypage et des dosages.

Dans la section qui suit, nous présenterons 3 articles scientifiques se rapportant à ces objectifs généraux. Le premier article traite des patients atteints d'une MII et vise à déterminer les niveaux thérapeutiques optimaux des métabolites de la 6-MP ainsi que leur corrélation avec la toxicité induite par la médication et le génotype de la TPMT. Le second article traite aussi des patients souffrant d'une MII mais vise à évaluer l'effet du genre et de l'âge sur le métabolisme de la 6-MP. Finalement, le troisième article porte sur les patients atteints d'une LLA et vise à déterminer l'influence de différents polymorphismes au niveau de la TPMT et de la MTHFR sur les niveaux des métabolites de la 6-MP ainsi que sur la réponse thérapeutique.

Chapitre 2 : Articles

Article 1

Dubinsky MC, LAMOTHE S, Hui Ying Y, Targan SR, Sinnett D, Théorêt Y et Seidman EG. Pharmacogenomics and Metabolite Measurement for 6-Mercaptopurine Therapy in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2000;118:705-713. (voir Annexe I pour une copie du tiré à part)

**Pharmacogenomics and Metabolite Measurement for
6-Mercaptopurine Therapy in Inflammatory Bowel Disease**

Running Title: 6-MP Metabolites and TPMT Genotype in IBD

Marla C. Dubinsky,* Stéphanie Lamothe,† Hui Ying Yang,§ Stephan R. Targan,§ Daniel Sinnett,† ‡ Yves Théorêt,† ‡ Ernest G. Seidman*‡.

*Division of Gastroenterology & Nutrition, University of Montréal, Québec, Canada; † Centre de Cancérologie Charles Bruneau, Sainte-Justine Hospital, and Departments of Pediatrics and Pharmacology, University of Montréal, Montréal, Québec, Canada; and § Divisions of Gastroenterology and Genetics, Departments of Medicine and Pediatrics, Cedars-Sinai Medical Center, UCLA, Los Angeles, California

‡ Equal senior authorship.

Acknowledgment: This study received financial support from the Charles Bruneau Foundation (to D.S. and Y.T.), the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (Scholarships to D.S. and E.G.S.), and the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (Studentship to S.L.). The authors thank Hughes Sinnett and Sylvain Latour for their technical support.

Footnote: Dr Targan is a Founder of Prometheus Labs; Ste Justine Hospital and Drs Sinnett, Théorêt, and Seidman have a royalty agreement for the use of the described tests for the management of IBD with Prometheus Labs.

Abbreviations used in this paper: ASO, allele-specific oligonucleotide; AZA, azathioprine; CBC, complete blood count; HBI, Harvey Bradshaw Index; 6-MMP, 6-methylmercaptopurine; 6-MMPR, 6-methyl-mercaptopurine ribonucleotide; 6-MP, 6-mercaptopurine; RBC, red blood cell; 6-TG, 6-thioguanine; 6-TGN, 6-thioguanine nucleotide; 6-TIMP, 6-thioinosine monophosphate; TPMT, thiopurine methyltransferase.

Address requests for reprint to: Ernest G. Seidman, M.D., Division of Gastroenterology & Nutrition, Sainte-Justine Hospital, 5734, 3175 Cote-St-Catherine Road, Montreal, Quebec, Canada H3T 1C5. E-mail: ernest.seidman@umontreal.ca; Fax: (514)345-4999.

Abstract

Background & Aims: The effects of 6-mercaptopurine (6-MP) are mediated via its intracellular conversion to 6-thioguanine (6-TG) and 6-methylmercaptopurine (6-MMP) nucleotide metabolites, the latter genetically controlled by thiopurine methyltransferase (TPMT). We sought to determine optimal therapeutic 6-MP metabolite levels and their correlation with medication-induced toxicity and TPMT genotype. **Methods:** Therapeutic response was determined in 92 pediatric patients with inflammatory bowel disease coincidentally with hematologic, pancreatic, and hepatic laboratory parameters, and compared with erythrocyte metabolite levels and TPMT genotype. **Results:** Clinical response was highly correlated with 6-TG levels ($P < 0.0001$) but not with any other variable, including 6-MMP levels, drug dose, gender, and concurrent medications. The frequency of therapeutic response increased at 6-TG levels $> 235 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ erythrocytes ($P < 0.001$). Hepatotoxicity correlated with elevated 6-MMP levels ($> 5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ erythrocytes; $P < 0.05$). Although leukopenia was associated with higher 6-TG levels ($P < 0.03$), it was observed in only 8% of responders. Patients heterozygous for TPMT (8/92) had higher 6-TG levels ($P < 0.0001$), and all responded to therapy. **Conclusions:** 6-MP metabolite levels and TPMT genotyping may assist clinicians in optimizing therapeutic response to 6-MP and identifying individuals at increased risk for drug-induced toxicity.

Introduction

Treating inflammatory bowel disease (IBD) while limiting drug-induced toxicity is a continuous challenge. The therapeutic advantages of 6-mercaptopurine (6-MP) and its prodrug, azathioprine (AZA), are well documented in both the pediatric and adult literature.¹⁻⁸ These drugs have been used effectively for induction and maintenance of remission in corticosteroid-dependent or -resistant IBD and in the management of fistulizing Crohn's disease (CD). Retrospective studies have confirmed the generally satisfactory safety profile of these drugs.⁹⁻¹² Nevertheless, concerns regarding both short- and long-term toxicity are the most common explanation for their restricted use.¹³

6-MP (or AZA converted to 6-MP) has both cytotoxic and immunosuppressive properties via the incorporation of thiopurine nucleotide metabolites into cellular nucleic acids and inhibition of *de novo* purine synthesis.¹⁴ Plasma pharmacokinetic studies have confirmed the low and variable oral bioavailability of both 6-MP and AZA, as well as the limited therapeutic value of measuring plasma 6-MP levels.¹⁵⁻¹⁷ Only about 16 % of 6-MP is available to the systemic circulation, largely because of its extensive catabolism by xanthine oxidase, present in both enterocytes and hepatocytes but not hematopoietic tissue.¹⁴ As illustrated in Figure 1, 6-MP may be catabolized intracellularly to the inactive metabolite, 6-methylmercaptopurine (6-MMP), or anabolized to the active

metabolites, 6-thioguanine nucleotides (6-TGNs) and 6-methyl-mercaptopurine ribonucleotides (6-MMPs).^{18,19} The methylation of 6-MP and 6-thioinosine 5'-monophosphate (6-TIMP) is catalyzed by thiopurine methyltransferase (TPMT), an enzyme that exhibits interindividual variation as a result of a known genetic polymorphism of its alleles. One in 300 (0.3%) individuals have low to absent enzyme activity (homozygous $TPMT^L$), 11% have intermediate (heterozygous $TPMT^H/TPMT^L$), and 89% have normal to high levels of activity (homozygous/wild type $TPMT^H$).²⁰

Investigations on the clinical use and interpretation of intracellular 6-MP metabolite and TPMT activity measurements were initiated in childhood acute lymphoblastic leukemia.²¹⁻²³ Studies have suggested an inverse relationship between red blood cell (RBC) TPMT activity and 6-TG levels in acute lymphoblastic leukemia, corresponding clinically to a reduced risk of relapse, but a higher probability of neutropenia.^{24, 25} Our group was the first to evaluate the use of 6-MP metabolite in the setting of IBD.²⁶ The pilot results suggested a significant correlation between RBC 6-TG levels and clinical response to 6-MP/AZA. We subsequently showed that erythrocyte 6-TG and 6-MMP levels correlated with those in leukocyte DNA.²⁷

In this study, we prospectively evaluated the clinical use of erythrocyte 6-MP metabolite monitoring and TPMT genotyping in IBD. The data support the application of these beneficial laboratory measurements for optimizing therapeutic response to 6-MP and in identifying individuals at risk for drug-induced toxicity.

Materials and Methods

Patient Population

Patients less than 19 years of age followed by the clinical investigators (M.C.D. and E.G.S.) at Ste-Justine Hospital IBD Center were eligible for inclusion if they had undergone 6-MP or AZA treatment for at least 4 months. Diagnoses of CD, ulcerative colitis (UC) or indeterminate colitis were established by standard clinical, radiological, histological and endoscopic criteria.²⁸ Patients with leukopenia or increased serum hepatic or pancreatic enzyme activities before initiation of therapy were excluded from this study. The dose of AZA or 6-MP, determined by the treating physician, was stable for at least 1 month. Clinical information collected included the following: (1) patient-related data including gender, age at diagnosis, and site of disease; (2) disease activity

assessed at each visit corresponding to a 6-MP metabolite blood drawing, by calculating a validated index based on direct questioning, clinical examination, and laboratory data (modified Harvey-Bradshaw Index {HBI}²⁹ for CD, Truelove and Witts' Index for UC,³⁰ or a detailed assessment of perianal disease and fistulas, as described previously^{31,32}); (3) 6-MP related data including age at initiation, indication, and dose ($\text{mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$); (4) toxicity-related data including complete blood count (CBC) and differential, alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), bilirubin, amylase, lipase, dose of 6-MP, timing of event relative to initiation of therapy, course of action taken, and concurrent medications. Blood samples from 92 consenting patients analyzing 6-MP, 6-TG and 6-MMP moieties were obtained prospectively during the study period (1995–1998). When possible, multiple samples were obtained from the same patient separated by an interval exceeding 3 months of the first specimen. The clinical investigators remained blinded to the 6-MP metabolite levels and the results of TPMT genotyping.

Outcome Definitions

A clinical evaluation point was designated as a clinic visit corresponding to each 6-MP metabolite measurement. Primary outcomes were based on each individual patient's initial indication for 6-MP. For patients with chronic active or steroid-dependent disease, response was defined by clinical remission based on a modified HBI score < 4 for CD²⁹ or according to the criteria for remission defined by Truelove and Witts³⁰, in the absence of oral or parenteral corticosteroids. Complete fistula closure was considered a response for patients in whom fistulizing disease was the primary indication. Treatment failure applied to cases where the above-stated therapeutic goals were not achieved. In accordance with other reports,^{11,12} toxicity was defined as (1) hematological: leukocytes $< 4000/\text{mm}^3$; (2) hepatic: AST or ALT > 2 times upper limit of normal; and (3) pancreatic: amylase or lipase > 2 times upper limit of normal.

Erythrocyte 6-MP Metabolite Assay

Heparinized blood (5 mL) was obtained along with other routine blood work at the time of a scheduled clinic visit or hospitalization. RBC-free thiobase, 6-MP, 6-TG, and 6-MMP (picomoles per 8×10^8 RBC) levels were determined by a reversed-phase high-performance liquid chromatography assay, as we described previously.²⁶

TPMT Genotyping

All individuals were genotyped for 2 polymorphisms in TPMT transitions^{33,34} at position 460 (G460A, Ala-to-Thr) and at position 719 (A719G, Tyr-to-Cys) using a polymerase chain reaction allele-specific oligonucleotide (ASO) hybridization assay.³⁵ These mutations were used to define 3 distinct alleles: TMPT 3*A (both G460A and A719G), TMPT 3*B (only G460A), and TMPT 3*C (only A719G).

Statistical Methods

Statistical analysis was performed using SAS computer software (version 6.10, 1994; SAS Institute, Cary, NC). Quantitative variables are described as medians (range) throughout. Normality was tested for all quantitative variables. Both parametric and nonparametric statistic tests were used, based on the distribution of variables to evaluate correlation between 2 variables and test mean/median differences of quantitative variables between 2 groups. Statistical differences in proportion exact tests when appropriate were evaluated by using the χ^2 method or Fisher's test.

To evaluate the relationship between therapeutic response and metabolite levels, linear logistic regression was performed by the maximum-likelihood method. The dependent variable was therapeutic response or failure for an individual, either at one evaluation point or consistently over time. Independent variables were the patient characteristics detailed in Table 1, 6-MP dose and metabolite levels, as well as TPMT genotype. In this analysis, for individuals with blood drawn for metabolite levels at more than one evaluation point, mean values were used, and cases with mixed clinical responses (n = 16) were excluded. However, they were used to identify therapeutic response-associated factors within each individual with paired tests (response vs. failure). The odds ratio and confidence interval were calculated using the Woolf method.

Results

Metabolite Levels and Therapeutic Response

The study population was divided into patients with a satisfactory clinical response and those who failed therapy. In the single-sampled patient group, 27 of 46 (59%) responded and 19 of 46 (41%) failed. In the multisampled patients, 20 of 46 (43%) had a response sustained at each clinical evaluation point, 11 (24%) never achieved a clinical response, and 15 (33%) responded inconsistently over time. Among

all 173 metabolite measurements, 103 (60%) corresponded to patients with a clinical response to therapy and 70 (40%) were in patients not responding at the designated clinical evaluation points.

Overall, higher median 6-TG levels (in pmol/ 8×10^8 RBC) were observed at points of clinical response vs. nonresponse (312 vs. 199; $P < 0.0001$), as shown in Table 2. Secondary analysis of all 92 patients tested at their initial clinical evaluation point showed similar results (313 vs. 209 at 53 points of response vs. 39 nonresponse, $P < 0.004$). Quartile analysis on all samples revealed that the best probability of treatment response was not significantly increased until RBC 6-TG levels were greater than 235 (Figure 2A). The patients' 6-TG levels were evenly distributed within the third quartile, suggesting 235 as the true threshold point. Furthermore, as shown in Figure 3, only 20 of 70 (27%) measurements at times of therapeutic failure were greater than 235, compared with 69 of 103 (67%) at times of response ($P < 0.001$). Presenting the data in a clinically meaningful manner, we calculated that the odds ratio of a therapeutic response for a 6-TG level higher than our cutoff of 235 was 5.0 (95% confidence interval, 2.6-9.7; $P < 0.001$).

6-MMP levels (in pmol/ 8×10^8 RBC) did not correlate with disease activity, nor did quartile analysis demonstrate a specific level that corresponded with outcome in the primary (Figure 2B) or secondary analyses (2683 vs. 1420 for response and nonresponse). The theoretically competitive enzymatic pathways determining concentrations of 6-TG and 6-MMP suggest a negative correlation between these 2 metabolites. Nevertheless, a positive correlation between 6-TG and 6-MMP was observed ($r = 0.21$; $P < 0.007$). 6-MP moieties were undetected in most samples, indicating that 6-MP and 6-TIMP had been entirely biotransformed.

Logistic regression analysis showed that 6-TG levels were significantly associated with therapeutic response, independent of other confounding factors potentially affecting prognosis ($P=0.002$). For each of the 15 patients inconsistently responsive over time, the values of 6-TG, 6-MMP, dose, and duration of therapy were compared between points of clinical response and of nonresponse. Again, the 6-TG level was the only statistically significant variable determining therapeutic response ($P < 0.02$). Unsuspected noncompliance was confirmed in 3 patients by documenting metabolite levels below the limits of detection.

Effect of Drug Dose

A meta-analysis reported a beneficial effect of increasing 6-MP dose in treating quiescent, although not for active, CD.⁴ In our study, the median dose of 6-MP was not statistically different compared with therapeutic response (1.25 and 1.25 mg kg⁻¹ day⁻¹ for response and treatment failures, respectively). Similarly, there was no difference in dose when analyzed at the time of first clinical assessment alone (1.2 vs. 1.1 mg kg⁻¹ day⁻¹). Quartile analysis showed that the frequency of remission was not significantly different across the dose range (Figure 4). Because 6-TG levels correlated with response, the relationship between 6-MP dose and metabolite level was examined. We observed a nonlinear, very weakly positive correlation between dose and 6-TG ($r = 0.0009$) and 6-MMP ($r = 0.32$) levels.

Toxicity and Metabolite Levels

In addition to the lack of, or delay in the therapeutic response to 6-MP, drug-related toxicity has led to underutilization of this class of immunosuppressive therapy in IBD. In this study, 36 of 92 patients (39%) experienced an adverse reaction attributable to 6-MP/AZA therapy. Sixteen patients (17%) had increased amino transaminase levels. Increased amylase and lipase levels were observed in 7 cases (8%). However, only 1 patient developed clinically overt pancreatitis. Another experienced hepatic and pancreatic toxicity simultaneously. Leukopenia occurred in 13 individuals (14%). On average, hematologic toxicity occurred later in the course of 6-MP therapy compared with hepatic or pancreatic complications (means of 1.5 vs. 0.4 and 0.6 years, respectively). Permanent discontinuation of 6-MP treatment as a result of myelosuppression was deemed necessary in 1 of these patients (6-TG, 793).

Hepatic. As shown in Figure 5A, median 6-MMP levels were significantly greater at the time of a hepatotoxic event ($n = 16$). Although hepatotoxicity was observed at low 6-MMP levels, the risk increased 3-fold (18% vs. 6%) at 6-MMP levels above the third quartile (>5700). 6-TG levels did not affect hepatotoxicity, nor did the 6-MP dose (data not shown).

Hematologic. The median 6-TG level during leukopenic events in 12 individuals was 286, compared with 232 without leukopenia ($P = 0.06$). Two thirds of leukopenic events occurred during remission, representing only 8% of all therapeutic responses. The majority (92%) of clinical responses thus occurred in the absence of leukopenia. 6-TG levels correlated significantly with the presence of leukopenia at points of therapeutic

response (Figure 5B). Although 4 of 70 (6%) leukopenic events occurred during points of treatment failure, the 6-TG levels were lower (198 {101-215}). Neither the 6-MP dose nor 6-MMP levels influenced leukopenia (data not shown).

Pancreatic. No correlation between 6-MP dose or metabolite levels and pancreatic toxicity was observed (data not shown).

Effect of Mesalamine Treatment

Kinetic studies have demonstrated that derivatives of benzoic acid such as sulfasalazine and mesalamine, its active metabolite, inhibit TPMT activity in vitro.³⁷ In this study, 48 of 92 (52%) patients were treated with mesalamine concomitantly (mean, 45 mg kg⁻¹ day⁻¹). Of 173 metabolite levels measured, 77 coincided with mesalamine use. We did not observe any effect of concurrent mesalamine use on therapeutic response, 6-TG and 6-MMP determination, and levels, nor drug-related toxicity (data not shown).

TPMT Genotype

Among our patients, 8 (9%) were heterozygous for the TPMT allele (TPMT^H/TPMT^L). All heterozygotes, compared to 39 of 84 (46%) of patients homozygous for normal alleles, achieved a clinical response (single and multisampled) on 6-MP treatment. Thirty of the remaining 45 never responded, and 15 were mixed responders. As anticipated, higher 6-TG levels were found among heterozygotes (Figure 6). However 6-MMP levels were comparable among heterozygotes and normals (1115 vs. 2231). The median dose of 6-MP was not significantly different in relation to genotype (1.2 and 1.1 mg kg⁻¹ day⁻¹ for normals and heterozygotes, respectively). Only 1 of 13 patients with leukopenia was heterozygous for the TPMT allele. Overall, 35 of 36 patients with drug-related toxicity had a normal TPMT genotype.

Discussion

This study demonstrates that erythrocyte 6-TG concentration, not drug dose, is significantly and independently associated with therapeutic response to 6-MP in children with IBD. Our data corroborate our previous pilot study in IBD,²⁶ as well as reports in acute lymphoblastic leukemia, suggesting that 6-TG levels above particular cutoff points were related to disease-free survival, independent of other factors known to affect prognosis, including standardized dosing regimens.^{22,24,25} Our results also suggest that

response to 6-MP therapy was optimized at 6-TG levels greater than a cutoff of 235 pmol/ 8×10^8 RBC. Suggested target levels can thus be used as a therapeutic guide for those patients not responding to 6-MP/AZA, a therapeutic concept rarely used in gastrointestinal disorders. Similar to other medications requiring blood level monitoring, factors such as compliance, bioavailability, and the intracellular drug metabolism will ultimately determine the dose of 6-MP required to achieve clinical response. Despite the similarity among the factors determining both an individual's therapeutic 6-MP dose and 6-TG level, we did not observe a correlation between these 2 important variables. However, this study was not designed to allow the use of genotyping or metabolite levels to adjust the dose.

A major influence on 6-MP metabolism is pharmacogenetic. The activity of TPMT is genetically regulated, which influences cytotoxic activity of 6-MP.^{22,24,25} Potentially severe or even fatal toxic effects of 6-MP/AZA may occur in individuals with deficient levels of enzyme activity as a result of the absent or diminished production of methylated nucleotides and subsequent accumulation of 6-TG³⁸⁻⁴⁰ (Figure 1). Conversely, high erythrocyte TPMT activity correlates with low 6-TG levels. Although we did not assay TPMT activity, its genotyping has been shown to accurately reflect enzyme activity.⁴¹ Higher doses of 6-MP may thus be needed in those IBD patients with high TPMT activity to prevent undertreatment as a cause of therapeutic failure, as reported in children with acute lymphoblastic leukemia.²⁴

TPMT genotype analysis also identifies patients at risk for 6-MP related bone marrow toxicity and should ideally be performed on all patients prior to implementing therapy.⁴² Genotyping is particularly important for patients receiving AZA parentally on an elective basis in view of the potential life-threatening myelosuppression in TPMT-deficient individuals. In contrast to individuals with high TPMT activity, identified heterozygotes would theoretically require significantly lower doses of 6-MP to achieve a therapeutic response. In contrast, patients with a normal genotype should be able to tolerate full-dose 6-MP/AZA at initiation of therapy, without resorting to progression in dose over several months. With the exception of idiosyncratic reactions such as pancreatitis, 6-MP tolerance, appropriate dosing, and patient monitoring are dependent on the molecular analysis of TPMT.

Studies have demonstrated that derivatives of benzoic acid can inhibit the TPMT metabolic pathway of 6-MP.⁴³ Sulfasalazine and its metabolites (mesalamine) are

examples that have been shown *in vitro* to be potent inhibitors of TPMT.^{37,44} In our study, we did not find any clinically significant effects of this potential drug interaction. However, our patients did not use azo-bond-linked aminosalicylic acid compounds, such as sulfasalazine and olsalazine. *In vivo* studies in IBD are needed to validate the effect of mesalamine described *in vitro*.

The frequency of 6-MP-induced toxicity observed in this study is consistent with that previously reported in IBD.^{11,12} In all but 1 of 16 events, reduction of 6-MP dose was associated with normalization of transaminase levels within weeks. In the latter case, extensive investigations revealed steatohepatitis. Although the hepatotoxic effects of 6-MP are well documented, the underlying mechanisms remain obscure. In our study, hepatotoxicity correlated with the presence of significantly higher concentrations of 6-MMP. This suggests that high TPMT activity and the accumulation of 6-MMP could play an important role in the pathogenesis of 6-MP-induced hepatic toxicity. Erythrocyte TPMT activity levels parallel the enzyme activity in other tissues, particularly the liver.⁴⁵ Monitoring 6-MMP levels, in conjunction with liver function tests, appears to be useful in identifying patients at risk for hepatotoxicity and to determine the level at which a hepatic event has occurred in order to individualize appropriate dose adjustments. Our data suggest that 6-MMP levels below 5700 pmol/8x10⁸ RBC are less often associated with increased transaminases. The use of 6-TG has been observed to be much less often associated with hepatotoxicity in acute lymphoblastic leukemia,⁴⁶ in keeping with our data. In our leukemic patients receiving intravenous 6-MP, high 6-MMP levels (>30,000) were not uniformly associated with hepatotoxicity, suggesting that duration of exposure to high 6-MMP levels may also be an important determinant. Despite *in vitro*⁴⁷ and *in vivo*⁴⁸ evidence for the immunosuppressive or cytotoxic properties of methylated metabolites, 6-MMP levels did not correlate with therapeutic response in our study.

As in IBD, a long period of maintenance treatment with 6-MP/AZA is necessary for the successful treatment of acute lymphoblastic leukemia.²⁵ Relapse-free survival was shown to be improved when leukemic children experience myelosuppression.²⁴ In IBD, titrating the dose to induce leukopenia has been observed to improve response rate in patients not responding to 6-MP.⁴⁹ This insightful observation now has a biochemical explanation, as leukopenia is associated with higher 6-TG levels.^{21,23,24,50,51} Indeed, in this study, the median 6-TG level was 342 (mean, 490) in leukopenic individuals, well

above the threshold level of 235. However, our results clearly demonstrate that leukopenia is not a reliable marker of therapeutic response and is definitely not required to control IBD. Similar conclusions were recently found in a prospective clinical trial of 6-MP in pediatric IBD.⁵² Although it is widely recognized that mutations in TPMT can cause severe myelosuppression with 6-MP therapy, these usually occur early, and do not represent all potential factors, such as other drugs or infections. Recently, Colombel *et al.*⁵³ reported that most CD patients with cytopenia while receiving AZA had no TPMT mutations, similar to our results. The median delay between onset of therapy and cytopenia was shorter in the 9 with TPMT mutations (< 4 months) than those with normal genotypes (13.7 months). Thus, metabolite testing is not a surrogate for monitoring of CBCs, required in all patients. However, coincidental metabolite testing may help identify the potential cause. The risk of clinical bone marrow suppression outweighs its use as a clinical guide of therapeutic response in IBD. Because of the small number of patients experiencing leukopenia, we were unable to clearly identify a level of 6-TG that could predict leukopenia. Identification of the patients at high risk by genotyping and the 6-TG level at which myelosuppression occurs will permit clinicians to individualize 6-MP dosing to maximize therapeutic efficacy while minimizing myelotoxicity.

The results of this study suggest that 6-MP metabolite measurements and TPMT molecular analysis may provide clinicians with useful tools to optimize and individualize AZA/6-MP therapy in IBD. The advantages of metabolite monitoring observed in this study include the identification of the causes of failure to respond to 6-MP therapy. These include nonadherence, a potential problem in all patients, particularly adolescents, as well as inadequate dose. Another potential cause of inadequate response is excessive TPMT activity, resulting in shunting of 6-MP toward the production of 6-MMP, with inadequate levels of 6-TG achieved despite escalations in dose. Alternate strategies in such individuals may include the use of 6-TG. However, the therapeutic range of 6-TG is likely to be different and requires reassessment in terms of efficacy and toxicity, as suggested for acute lymphoblastic leukemia.⁵⁴ Further studies using genotyping before initiating therapy and metabolite measurements to adjust dose are needed to examine the use of these tests in optimizing 6-MP therapy for IBD.

Currently, dose-escalation studies are underway to examine the potential benefits of pharmacogenomics, as used by us, to achieve optimal 6-TG levels in both adults and

children with IBD. The concept of 6-MP metabolite determination and genotyping can also be applied to other disease entities that incorporate 6-MP/AZA within the therapeutic regimen (transplantation, rheumatic and autoimmune disorders). Studies are needed to validate the use of these tests in these disorders and to elucidate disease-specific target 6-TG levels.

References

1. Willoughby JMT, Kumar PJ, Beckett J, Dawson AM. Controlled trial of azathioprine in Crohn's disease. *Lancet* 1971;731:944-947.
2. Candy S, Wright J, Gerber M, Adams G, Gerig M, Goodman R. A controlled double blind study of azathioprine in the management of Crohn's disease. *Gut* 1995;37:674-678.
3. Present DH, Korelitz BI, Wisch N, Glass JL, Sachar DB, Pasternack BS. Treatment of Crohn's disease with 6-Mercaptopurine: a long-term, randomized, double blind study. *N Engl J Med* 1980;302:981-987.
4. Pearson DC, May GR, Fick GH, Sutherland LR. Azathioprine and 6-Mercaptopurine in Crohn's disease. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 1995;123:132-142.
5. Rosenberg JL, Wall AJ, Levin B, Binder HJ, Kirsner JB. A controlled trial of azathioprine in the management of ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1975;69:96-99.
6. Hawthorne AB, Logan RF, Hawkey CJ, Foster PN, Axon AT, Swarbrick ET, Scott BB, Lennard-Jones JE. Randomized controlled trial of azathioprine withdrawal in ulcerative colitis. *Br Med J* 1992;305:20-22.
7. Markowitz J, Rosa J, Grancher K, Aiges H, Daum F. Long-Term 6-Mercaptopurine treatment in adolescents with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1990;99:1347-1351.
8. Markowitz J, Grancher K, Mandel F, Daum F, and the 6-MP Collaborative group. 6-Mercaptopurine (6-MP) & prednisone therapy for newly diagnosed pediatric Crohn's disease (CD): A prospective multicenter, placebo-controlled clinical trial. *Gastroenterology* 1998; 114:A4227.
9. Present DH, Meltzer SJ, Krumholz MP, Wolke A, Korelitz BI. 6-Mercaptopurine in the management of inflammatory bowel disease: short- and long-term toxicity. *Ann Intern Med* 1989;111:641-649.
10. Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK, Lennard Jones JE. Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. *Gut* 1993;34:1081-1085.
11. Goldstein ES, Marion JF, Wheeler S, Present DH. Toxicities and infections associated with chronic 6-Mercaptopurine (6-MP) use in Crohn's disease (CD): Do we need to discontinue treatment? *Gastroenterology* 1998;114:A4042
12. Kirschner BS. Safety of azathioprine and 6-Mercaptopurine in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998;115:813-821.
13. Markowitz J, Grancher K, Mandel F, Daum F. Immunosuppressive therapy in pediatric inflammatory bowel disease: results of a survey of the North American Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition. Subcommittee on

- immunosuppressive use of the Pediatric IBD Collaborative Research Forum. *Am J Gastroenterol* 1993;88:44-48.
14. Lennard L. The clinical pharmacology of 6-Mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol* 1992;43:329-339.
 15. Zimm S, Collins JM, Riccardi R, O'Neill D, Narang PK, Chabner B, Poplack DG. Variable bioavailability of oral mercaptopurine. Is maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia being optimally delivered? *N Engl J Med* 1983;308:1005-1009.
 16. Van Os EC, Zins BJ, Sandborn WJ, Mays DC, Tremaine WJ, Mahoney DW, Zinsmeister AR, Lipsky JJ. Azathioprine pharmacokinetics after intravenous, oral, delayed release oral and rectal foam administration. *Gut* 1996;39:63-68.
 17. Lafolie P, Hayder S, Bjork O, Peterson C. Intraindividual variation in 6-mercaptopurine pharmacokinetics during oral maintenance therapy of children with acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Clin Pharmacol* 1991;40:599-601.
 18. Lennard L. Clinical implications of thiopurine methyltransferase-optimization of drug dosage and potential drug interactions. *Ther Drug Monitoring* 1998;20:527-531.
 19. Elion GB. The comparative metabolism of Imuran and 6-mercaptopurine in man. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1969;10:21.
 20. Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine Pharmacogenetics: Monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 1980;32:651-662.
 21. Lennard L, Rees CA, Lilleyman JS, Maddocks JL. Childhood leukemia: A relationship between intracellular 6-MP metabolites and neutropenia. *Br J Clin Pharmacol* 1983;16:358-363.
 22. Lennard L, Lilleyman JS. Variable 6-mercaptopurine metabolism and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1989;7:1816-1823.
 23. Lennard L, Van Loon JA, Weinshilboum RM. Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 1989;46:149-154.
 24. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1990;336:225-229.
 25. Lennard L, Lilleyman JS. Mercaptopurine metabolism and risk of relapse in childhood lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1994;343:1188-1190.
 26. Cuffari C, Théorêt Y, Latour S, Seidman EG. 6-mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut* 1996;39:401-406.
 27. Cuffari C, Seidman EG, Latour S, Théorêt Y. Quantitation of 6-thioguanine in peripheral leukocyte DNA in Crohn's disease patients on maintenance 6-mercaptopurine therapy. *Can J Physiol Pharmacol* 1996;74:580-585.
 28. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1989;24(suppl 170)2-6, 16-19.
 29. Myren J, Bouchier IAD, Watkinson G, Softley A, Clamp SE, deDombal FT. The O.M.G.E. multinational inflammatory bowel disease survey 1976-1982. A further report on 2,657 cases. *Scand J Gastroenterol* 1984;95(suppl):1-27.
 30. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis. Final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955;2:1041-1044.
 31. Korelitz BI, Present DH. Favorable Effect of 6-mercaptopurine on fistulae of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1985;30:58-64.

32. Hughes LE. Clinical classification of perianal Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 1992;35:928-932.
33. Szumlanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kellsell D, Spurr N, Lennard L, Wieben E, Weinshilboum R. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: Human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol* 1996;15:17-30.
34. Tai H-L, Krynetski EY, Yates CR, Loennechen T, Fessing MY, Krynetskaia NF, Evans WE. Thiopurine S-methyltransferase deficiency. Two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *Am J Hum Genet* 1996;58:694-702.
35. Zietkiewicz E, Yotova V, Jarnik M, Korab-Laskowska M, Kidd KK, Modiano D, Scozzari R, Stoneking M, Tishkoff S, Batzer M, Labuda D. Nuclear DNA diversity in worldwide distributed human populations. *Gene* 1997;205:161-171.
36. Sandborn WJ. A review of immune modifier therapy for inflammatory bowel disease: azathioprine, 6-mercaptopurine, cyclosporine and methotrexate. *Am J Gastroenterol* 1996;91:423-433.
37. Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Sulphasalazine inhibition of thiopurine methyltransferase: possible mechanism for interaction with 6-mercaptopurine and azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* 1995;39:456-459.
38. Evans WE, Horner M, Chu YQ, Kalwinsky D, Roberts WM. Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr* 1991;119:985-989.
39. McLeod HL, Miller DR, Evans WE. Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient heart transplant recipient. *Lancet* 1993;341:1151.
40. Lennard L, Gibson BES, Nicole T, Lilleyman JS. Congenital thiopurine methyltransferase deficiency and 6-mercaptopurine toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Arch Dis Child* 1993;69:577-579.
41. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, Relling MV, Evans WE. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: Genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med* 1997;126:608-614.
42. Black AJ, McLeod HL, Capell HA, Powrie RH, Matowe LK, Pritchard SC, Collied-Duguid ES, Reid DM. Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine. *Ann Intern Med* 1998;129:716-718.
43. Woodson LC, Ames MM, Selassie CD, Hansch C, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase: aromatic thiol substrates and inhibition by benzoic acid derivatives. *Mol Pharmacol* 1994;24:471-478.
44. Lewis LD, Benin A, Szumlanski CL, Otterness DM, Lennard L, Weinshilboum RM, Nierenberg DW. Olsalazine and 6-mercaptopurine-related bone marrow suppression: A possible drug-drug interaction. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62:464-475.
45. Szumlanski CL, Scott MC, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: Human liver enzyme activity. *Clin Pharmacol Ther* 1988;43:134.
46. Lennard L, Davies HA, Lilleyman JS. Is 6-thioguanine more appropriate than 6-mercaptopurine for children with acute lymphoblastic leukemia? *Br J Cancer* 1993;68:186-190.
47. Bennet LL, Allan PW. Formation and significance of 6-methylthiopurine ribonucleotide as a metabolite of 6-mercaptopurine. *Cancer Res* 1971;31:152.

48. Erb N, Harms DO, Janka-Schaub G. Pharmacokinetics and metabolism of thiopurines in children with acute lymphoblastic leukemia receiving 6-thioguanine versus 6-mercaptopurine. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998;42:266-272.
49. Collona T, Korelitz BI. The role of leukopenia in the 6-mercaptopurine-induced remission of refractory Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1994;89:362-366.
50. Bergan S, Rugstad HE, Bentdal O, Sodal G, Hartmann A, Leivestad T, Stokke O. Monitored high dose azathioprine treatment reduces acute rejection episodes after renal transplantation. *Transplantation* 1998;66:334-339.
51. Schütz E, Gummert J, Mohr FW, Armstrong VW, Oellerich M. Should 6-thioguanine nucleotides be monitored in heart transplant recipients given azathioprine? *Ther Drug Monitoring* 1996;18:228-233.
52. Markowitz J, Grancher K, Mandel F, Daum F, and the 6-MP Collaborative group. Relationship of leukopenia to 6-MP induced remission of Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;27:A8.
53. Colombel JF, Touze I, Catala P, Ferrari N, Libersa C, Marteau P, Gendre JP, Bonaz B, Soule JC, Modigliani R, Broly F. Genotypic analysis of the thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy (abstr). *Gastroenterology* 1999;116:A688.
54. Lennard L, Davies HA, Lilleyman JS. Is 6-thioguanine more appropriate than 6-mercaptopurine for children with acute lymphoblastic leukaemia? *Br J Cancer* 1993;68:186-190.

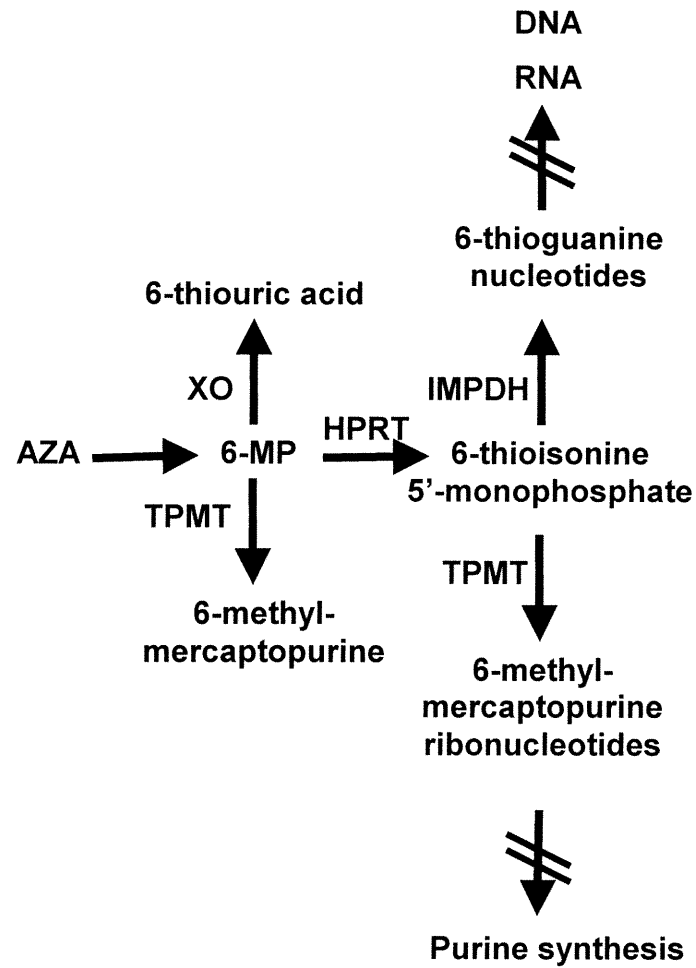


Figure 1. 6-MP metabolism. Oral AZA is rapidly converted to 6-MP by a nonenzymatic process.¹⁹ Initial 6-MP transformations occur along competing catabolic (XO, xanthine oxidase; TPMT) and anabolic (HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase) enzymatic pathways. Once formed, 6-TIMP may be transformed into 6-TGN by the rate-limiting inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) or methylated into 6-MMPR.

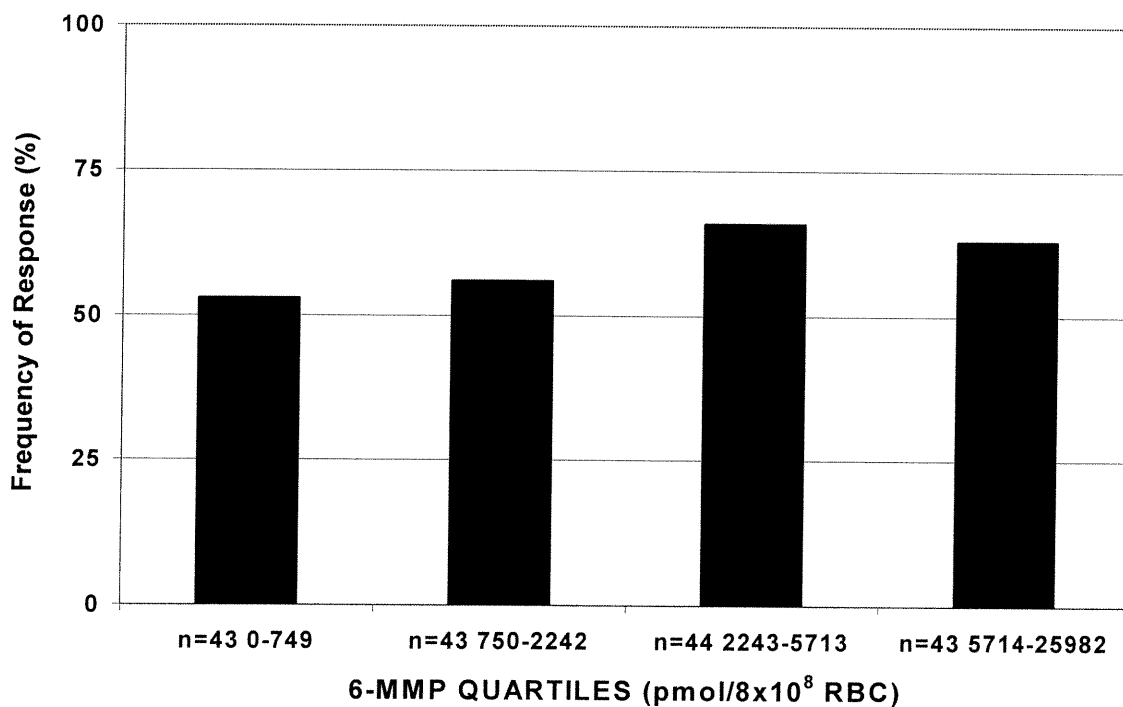
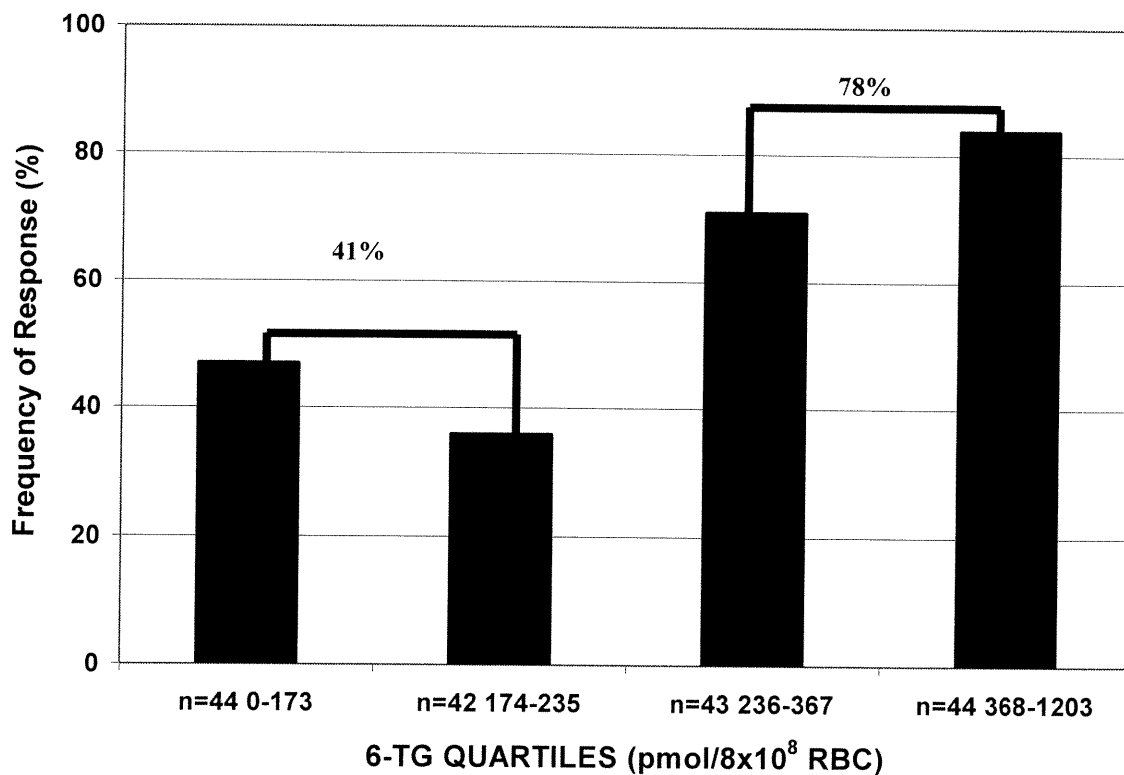


Figure 2. Correlation of quartile 6-MP metabolite levels with clinical response in IBD. (A) The frequency of clinical response was significantly higher within the upper 6-TG level quartiles (>235 pmol/8x10⁸ RBC). *P< 0.001. (B) Association between 6-MMP quartile levels and clinical response. No significant differences were observed (P=0.48). n, number of clinical evaluation points per quartile.

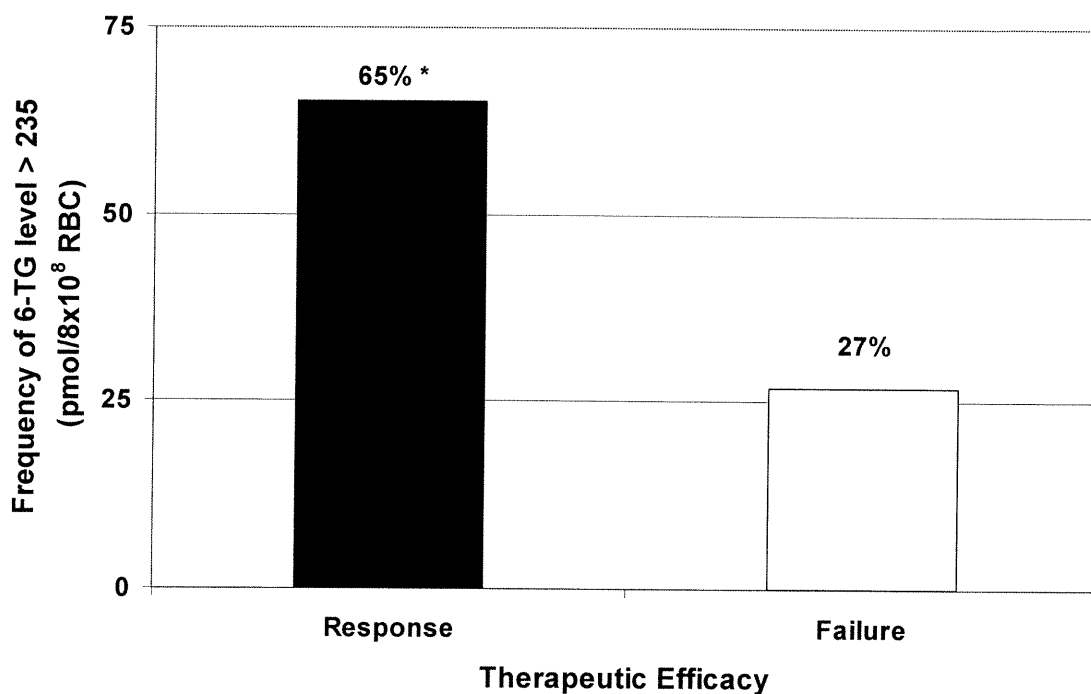


Figure 3. Frequency of 6-TG levels > 235 (pmol/8x10⁸ RBC) at clinical evaluation points corresponding to therapeutic response, compared with points of therapeutic failure. *P < 0.001.

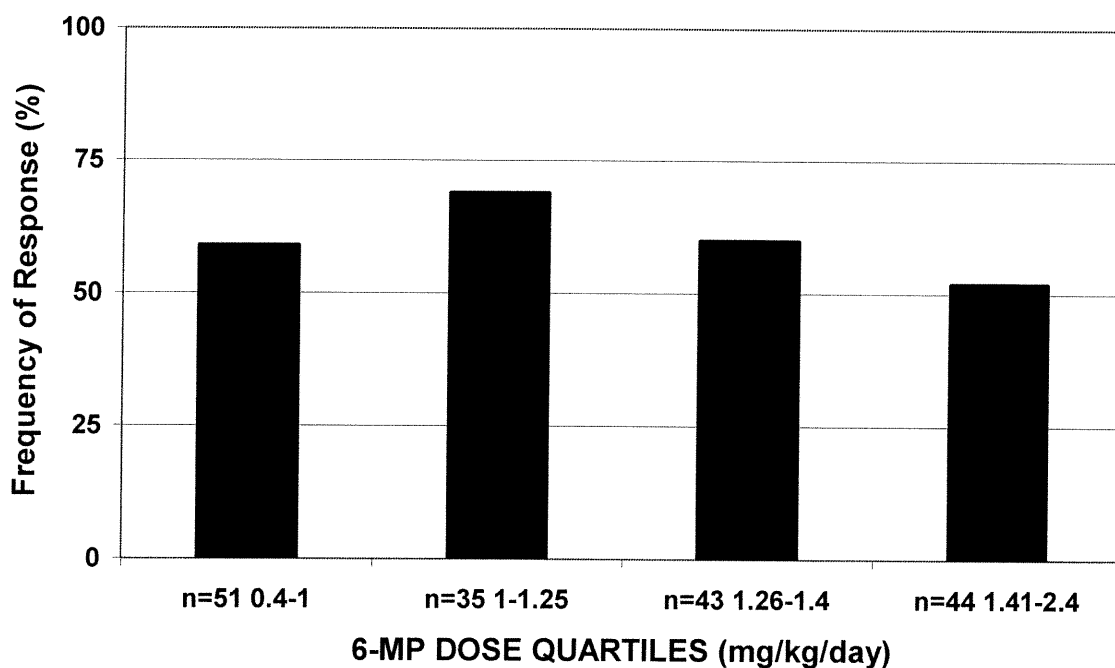


Figure 4. Relationship between 6-MP dose and clinical response in IBD. No significant differences were observed in the frequency of clinical response within 6-MP dose quartiles. AZA dose was converted to 6-MP dose by a factor of 2.07.³⁶ n, number of clinical evaluation points per quartile.

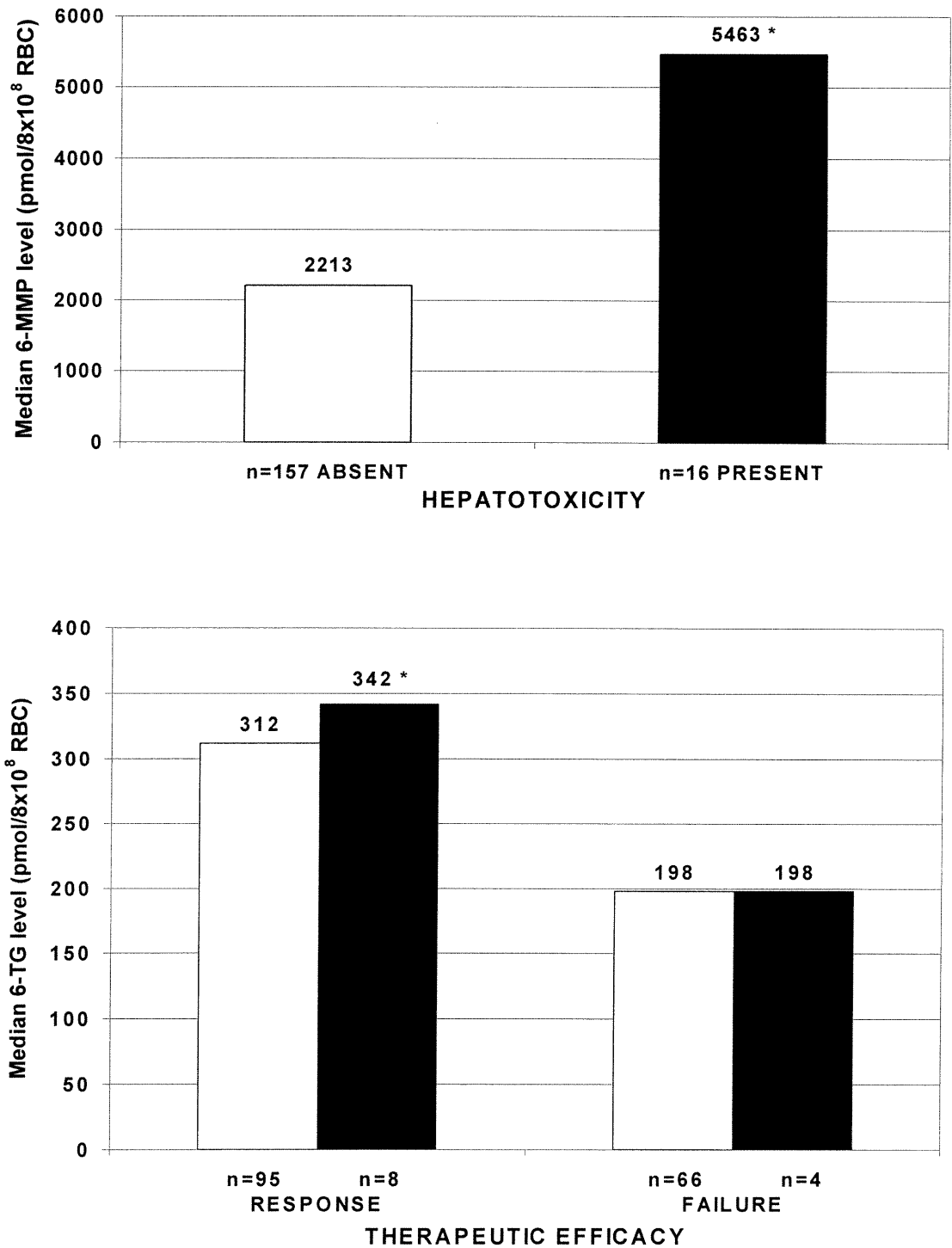


Figure 5. Correlation of erythrocyte 6-MP metabolite levels with drug-related side effects in IBD. n, number of observations. (A) Correlation of 6-MMP levels with hepatotoxicity. Hepatotoxic events were associated with higher median 6-MMP levels. * $P < 0.05$. (B) Correlation of 6-TG levels with leukopenia at times of therapeutic response and failure. * $P = 0.025$ leukopenia (■) vs. no leukopenia (□).

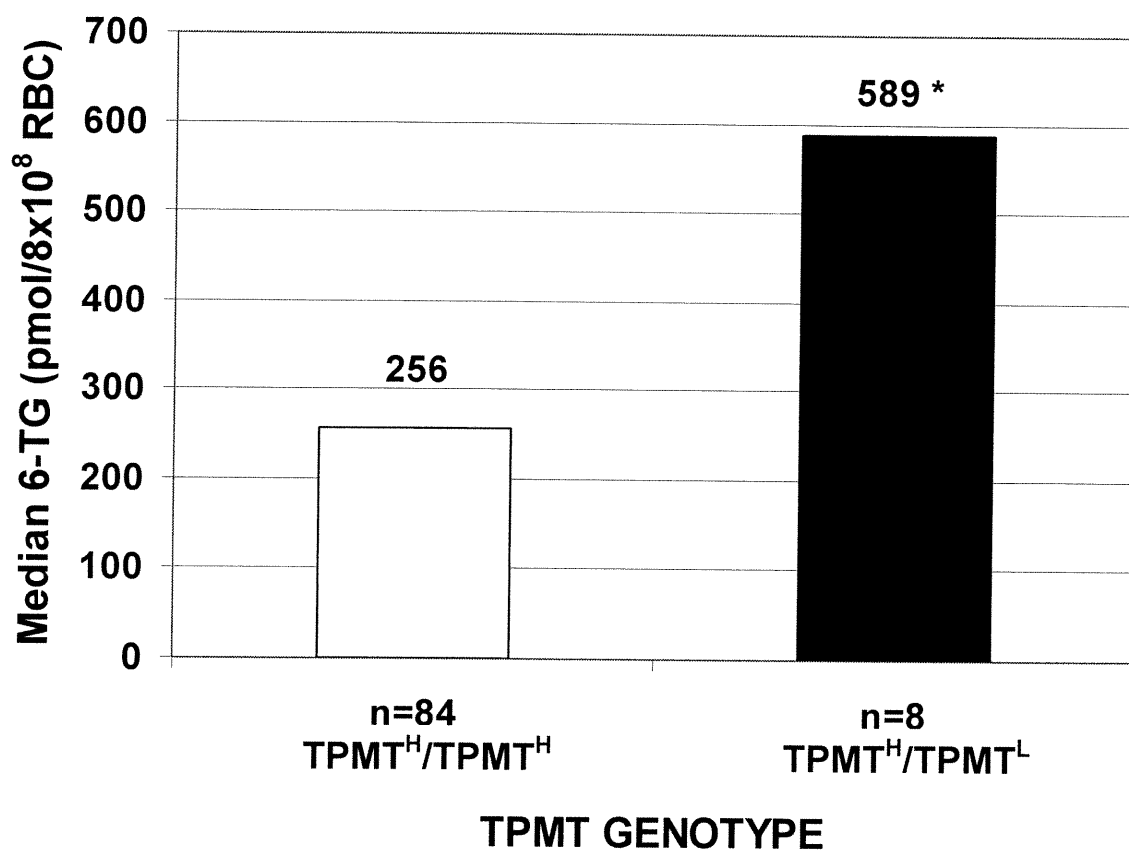


Figure 6. Relationship between TPMT genotype and 6-TG level in IBD. Median 6-TG levels were higher among heterozygotes (TPMT^H/TPMT^L) (n=8) than homozygous normals (TPMT^H/TPMT^H) (n=84) with high-activity (H) alleles. *P< 0.0001

Table 1. Characteristics of Pediatric IBD Patients Treated With 6-MP/AZA

Gender (M:F)	41:51
Mean age at diagnosis, year (range)	11.5 (1-18)
Disease classification and location	
CD (n)	79
Small bowel alone (n)	2
Small bowel + perianal +/-or duodenal involvement (n)	1
Ileocolitis (n)	33
Ileocolitis + perianal +/-or duodenal involvement (n)	21
Colitis alone (n)	13
Colitis + perianal +/-or duodenal involvement (n)	8
Perianal disease alone (n)	1
UC (n)	8
Pancolitis (n)	6
Left-sided (n)	2
Indeterminate colitis (n)	5
Mean age at initiation of 6-MP/ AZA, yr (range)	13 (4-18.5)
Delay from diagnosis to start of 6-MP/AZA yr (range)	1.5 (0-7)
Primary indication for 6-MP/AZA use	
Steroid dependent (n)	68
Steroid refractory (n)	17
Fistulizing disease (n)	7
Mean 6-MP/AZA dose, $mg\ kg^{-1}\ day^{-1}$ (range)	1.25 (0.4-2.4)

Table 2. Values of 6-TG and 6-MMP at Designated Clinical Evaluation Points Corresponding to Therapeutic Efficacy

Therapeutic efficacy	6-TG level ^b (pmol/8x10 ⁸ RBC)	6-MMP level ^b (pmol/8x10 ⁸ RBC)
Response (n=103)	312 (49-1203)	2683 (0-23,129)
Failure (n=70)	199 (0-705)	1739 (0-25,982)
p ^a	< 0.0001	0.37

^a See Materials and Methods for description of the statistical analysis.

^b Median (range).

Article 2

Cette section présente une copie de l'article *Gender differences in thiopurine metabolism in pediatric patients with inflammatory bowel disease (IBD)* tel qu'il sera soumis au "American Journal of Gastroenterology" au cours des prochaines semaines.

**Gender differences in thiopurine metabolism in pediatric patients
with inflammatory bowel disease (IBD)**

Stéphanie Lamothe, B.Sc., *Daniel Sinnett, Ph.D., *Ernest G. Seidman, M.D., *Yves Théorêt, Ph.D.

From the Centre de Cancérologie Charles Bruneau (S.L., D.S., Y.T.) and the Division of Gastroenterology & Nutrition (E.G.S.) at Ste Justine Hospital, in the Departments of Pediatrics and Pharmacology, University of Montréal, Montréal, Québec, Canada.

* Equal senior authorship.

Acknowledgment: This study received financial support from the Charles Bruneau Foundation (DS, YT), the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (Scholarship to DS, EGS), and the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (Studentship to SL). The authors thank Hughes Sinnett and Sylvain Latour for their technical support and Eef Harmsen for the editorial assistance.

Footnote: Ste Justine Hospital, Drs Sinnett, Théorêt and Seidman have a royalty agreement for the use of the described tests for the management of IBD with Promotheus Labs.

Abbreviations: IBD, inflammatory bowel disease; 6-MP, 6-mercaptopurine; AZA, azathioprine; ALL, acute lymphoblastic leukemia; TPMT, thiopurine methyltransferase; 6-TGN, 6-thioguanine nucleotide; 6-MMP, 6-methylmercaptopurine; XO, xanthine oxidase; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; IMPDH, inosine monophosphate dehydrogenase; GMPS, guanosine monophosphate synthetase; UC, ulcerative colitis; IC, indeterminate colitis; RBC, red blood cells; 6-TIMP, 6-thioinosine monophosphate.

Address reprint requests and correspondence to:

Yves Théorêt, Ph.D

Centre de Cancérologie Charles Bruneau, Sainte-Justine Hospital

Departments of Pharmacology,

University of Montréal,

3175 Cote-St-Catherine Road

Montréal, Québec, Canada.

H3T 1C5

Fax: (514)345-4731.

ABSTRACT

Purpose: The utilization of the thiopurine immunosuppressants 6-mercaptopurine (6-MP) and its pro-drug azathioprine (AZA) in patients with IBD is limited by concerns of myelosuppression and secondary neoplasia, which is more severe in males compared to females. The activity of these drugs is strongly modulated by the enzyme thiopurine methyltransferase (TPMT), in one hand by methylating 6-MP to inactive 6-methylmercaptopurine nucleotide (6-MMP) and on the other hand, by methylating the intermediate 6-thioinosine monophosphate (6-TIMP) to 6-Me-TIMP, which is in a strong inhibitor of the purine *de novo* synthesis and may increase the activation of 6-MP. The TPMT activity is strongly determined by the presence of polymorphism in the TPMT gene. Therefore, monitoring for TPMT genetic variants and measuring 6-MP metabolites levels such as 6-MMP or 6-thioguanine nucleotides (6-TGN), which is considered the major active compound, may help to optimize the doses of 6-MP and reduce the risks of myelosuppression and secondary neoplasia in the treatment of IBD.

Aim: To investigate the effect of TPMT genotype, gender and age on the metabolism of 6-MP in IBD patients. **Method:** In 174 IBD patients receiving 6-MP or AZA, TPMT polymorphisms (G460A and A719G) were detected by polymerase chain reaction/allele specific oligonucleotide hybridization. The level of 6-TGN and of 6-MMP was measured by HPLC in red blood cells (RBC) of more than 400 blood samples obtained from these patients. Pubertal age was set at 12 and 14 for females and males, respectively. **Results:** No difference in 6-TGN levels was observed in males and females homozygous for the TPMT wild type allele, whether pre- or post-pubescent. However, although there was no significant differences in 6-MMP levels between pre-pubescent females versus pre-pubescent males, the 6-MMP levels in post-pubescent males was significantly lower than in post-pubescent females (* $p < 0.001$). In addition, as anticipated, children who are heterozygous for at least one of the TPMT variants had higher 6-TGN levels than those of patients without the mutation, both in males as well as in females (* $p < 0.001$). They also had dramatically reduced 6-MMP levels, with heterozygous males having significantly lower 6-MMP levels than heterozygous females. **Conclusion:** Since we previously showed an association between high 6-MMP levels and the risk of hepatotoxicity, the present results suggest that post-pubescent males are less likely to develop this form of toxicity. In addition, we did not find the negative correlation between 6-MMP and 6-TGN levels expected from the metabolic pathway but on the contrary a significant positive correlation between 6-MMP and 6-TGN, especially in heterozygous females.

INTRODUCTION

6-Mercaptopurine (6-MP) and azathioprine (AZA) have long been used to treat conditions such as acute lymphoblastic leukemia (ALL) [38,43], inflammatory bowel disease (IBD) [9], organ transplantation [23] and autoimmune diseases[14]. AZA is a pro-drug, which *in vivo* is rapidly cleaved into 6-MP and 5-methylnitroimidazole, the metabolic pathways of AZA are thereafter identical to those of 6-MP [37]. 6-MP is

inactive and must be biotransformed to 6-thioguanine nucleotide (6-TGN) before it can exert its effects [19].

Three main enzymatic pathways are involved in the metabolism of 6-MP. The initial activation of 6-MP into 6-thioinosine monophosphate (6-TIMP) is catalyzed by the hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT), an enzyme widely distributed in the body but with different tissue activity. 6-TIMP is further converted by several consecutive enzymatic steps involving inosine monophosphate dehydrogenase, guanosine monophosphate synthetase, kinases and ribonucleotide reductase to 6-TGN [1]. The incorporation of 6-TGN into DNA is thought to play an important role in the cytotoxic effect of 6-MP [6,19,29]. In IBD, the clinical response of 6-MP is highly correlated with 6-TGN levels [10].

6-MP is catabolized as well. Xanthine oxidase, an enzyme with activity confined mainly to the gastrointestinal epithelium and liver, breaks down 6-MP to 6-thiouric acid, an inactive metabolite. Xanthine oxidase plays a major role in the high first pass deactivation of 6-MP [19].

In addition, 6-MP, but also 6-TIMP can be S-methylated by thiopurine methyltransferase (TPMT), an enzyme widely distributed in the body [22,33]. While methylation of 6-MP to 6-methylMP (6-MMP) leads to its inactivation, and therefore reduces the therapeutic effect of 6-MP, the methylation of 6-MP nucleotides such as 6-TIMP, yields active metabolites which are strong inhibitors of phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) amidotransferase and thus of *de novo* purine synthesis. This reduced *de novo* purine synthesis will enhance PRPP availability, which in turn may enhance the formation of 6-TGN [5]. High levels of TPMT may lead to low 6-TGN levels with a reduced therapeutic response, while very low levels of TPMT may lead to intolerance to 6-MP [10,28].

Over the last two decades, studies on various populations have shown that 1 in 300 patients lack TPMT activity (< 5 U/ml of packed Red Blood Cells (pRBC)), about 10% have intermediate activity (5-10 U/ml pRBC) and the rest have high activity (> 10 U/ml pRBC) [40]. Therefore, point mutations occurring alone or in combination on one or both alleles of the TPMT gene not only provide the genetic basis for TPMT polymorphisms but will have functional consequences on TPMT activity and thus on therapeutic use of 6-MP.

Although, TPMT genetic variants may explain some interindividual variability in the level of 6-MP metabolite, variability in the data appears to persist even among patients with the wild type TPMT genotype. This suggests that other factors are likely to contribute to interindividual variability. For instance, treatment of 6-MP will increase TPMT activity by nearly one-third shortly after the start of 6-MP therapy and usually returns to initial values after cessation or reduction of treatment [20,31]. In addition, the activity of other enzymes involved in 6-MP metabolism such as inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) and 5'-nucleotidase (5'-NT) may also be modified by thiopurine treatment [3,21,27,34,45]. Furthermore, other non-thiopurine drugs which may be used in the treatment of IBD, such as furosemide [4,16], methotrexate [12], allopurinol [11], 5-aminosalicylic acid and its pro-drugs (sulfasalazine, olsalazine, balsalazide) [26,39] are all known to interfere with either TPMT activity or thiopurine metabolism.

However, early data suggest that physiological factors such as age, gender, ethnicity [31], and biological rhythms [18] may also influence thiopurine biotransformation, although this still remains a controversial issue [35,36]. In this study, we have analyzed the concentrations of 6-TGN and 6-MMP metabolites in red blood cells of pre- and post-pubescent males and females treated with 6-MP/AZA and genotyped for TPMT variants. This study carried on in children with IBD will generate results that would be of importance to improve their treatment.

MATERIALS AND METHODS

Patients population

The study was carried out at the Ste-Justine Hospital's IBD Center in 174 patients with established Crohn's disease (CD), ulcerative colitis (UC) or indeterminate colitis (IC), ranging from 5 to 20 years of age and who were sampled if they had received 6-MP or AZA for at least 4 months. The females and males were subdivided in pre- and post-pubescent groups. The pubertal age was set at 12 and 14 for females and males, respectively.

TPMT genotyping

Individuals were genotyped for two polymorphisms in TPMT: A G-to-A base substitution at position 460 (G460A) that leads to an Ala-to-Thr amino acid change and

a A719G, Tyr-to-Cys change. These variants were used to define the three most prevalent alleles found in populations of European descent [46], TPMT 3*A (presence of G460A and A719G), TPMT 3*B (only G460A) and TPMT 3*C (only A719G).

DNA was isolated from peripheral blood cells with standard phenol-chloroform method [2]. The polymorphic loci were amplified by PCR in 50 μ L reaction containing 10-20 ng of genomic DNA; 0.4 μ M of primers: 460F 5'-ATA ACA GAG TGG GGA GGC TGC and 460R 5'-TTA CCA TTT GCG ATC ACC T or 719F 5'-GAG AAG GTT GAT GCT TTT G and 719R 5'-TCC ATT ACA TTT TCA GGC T; 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂; 100-200 μ M dNTPs (each) and 0.5 to 1 U of *Taq* DNA Polymerase (Gibco BRL/Life Technologies). The PCR was carried out for 35 cycles of 30s at 94°C, 30s at 60°C for G460A or 1min at 52°C for A719G and 1 min at 72°C.

Thereafter, 40 μ L of the PCR products was diluted to 100 μ L with NanopureH₂O, denatured for 3min at 94°C, cooled on ice and then neutralized with one volume of 20X SSC before being dot blotted in duplicate on a nylon membrane (HybondTM-N⁺/Amersham) using a micro-sample filtration manifold (Mini-Fold®I Dot-Blot System Acrylic/Schleicher & Schuell). The membranes were incubated for 10min in a denaturation solution (1.5M NaCl, 0.5N NaOH) followed by neutralization for 15min in 1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl (pH 7.2), 0,001M EDTA. The DNA was linked on the membrane by UV (1200 μ Joules x 100/cm²) using the UV StratalinkerTM1800 (Stratagene).

The Dot Blots were analyzed by Allele Specific Oligonucleotide (ASO) hybridization [44]. The ASO specific for each normal and mutant alleles were radiolabeled using 300 μ Ci [γ -³²P]ATP (6000Ci/mmol) with T4 Kinase (Gibco BRL/Life Technologies). The membranes were pre-hybridized for 30min at 37°C in a solution containing 1X SSPE, 0.75M NaCl, 1% SDS, 200 μ g/mL heparin and 70 mM Tris-HCl (pH 7.4) and hybridized in the same solution for 30min at 37°C with ASO at 1 000 000cpm/mL. Following hybridization the membranes were washed once in 2X SSPE and 0.1% SDS for 10-15min at 37°C or 15min at 45°C for mutation G460A and A719C, respectively. The membranes were exposed at -80°C with two screens for at least 3 hours.

Erythrocyte 6-MP metabolite assay

Heparinized blood (5mL) was obtained along with other routine blood work at the time of a scheduled clinic visit or hospitalization. From most patients more than one blood sample has been collected, see figure 1. In patients with multiple sampling, the time between sampling varies from 5-133 days, see figure 2.

0.9M NaCl was added to the blood samples and the RBC were pelleted by centrifugation (2900rpm for 4min), counted and frozen at -80°C . At the time of the analysis 50 μL of RBC were added to 500 μL water, and 300 μL 10mM DL-dithiothreitol and 500 μL 1.5mM H_2SO_4 . The tubes were heated at 100°C for 1h for 6-TGN and 6-MP and 3 h for 6-MMP in a dry bath incubator. After cooling, 500 μL 3.4M of NaOH was added, followed by 4mL 1mM of phenylmercuric chloride in methylene chloride. For 6-MMP extraction 1mL of 2M Tris-HCl (pH 9.0) was also added. The tubes were gently shaken for 10min and centrifuged at 2900rpm for 3min. Then the organic layer was back extracted with 200 μL 0.1M HCl.

For 6-TGN, 6-MP and 6-MMP, 100 μL of the acidic extract was injected through a 506 autosampler (Beckman) onto a Waters NovaPak C_{18} column (3.9x150 mm). An inline filter (0.45 μm , SSI), protected the analytical column. For 6-TGN and 6-MP the mobile phase consisted of water containing 50mM H_3PO_4 and 0.5mM DL-dithiothreitol; for 6-MMP the mobile phase consisted of methanol: water (4:96, v/v) contained 150mM triethylamine and 0.5mM DL-dithiothreitol, and was adjusted to pH 3.2 with H_3PO_4 [8,10]. 6-TGN and 6-MP were detected using a programmable UV detector module 166 (Beckman) set at 342 nm and 314 nm for 6-MMP. The metabolite levels were expressed as pmol/ 8×10^8 RBC.

Statistical methods

Because of the non-gaussian distribution of the data, all data is expressed as median (range). The non-parametric Mann-Whitney Test was used to test the difference between each group. The strength of associations between 6-TGN and 6-MMP was determined using the Spearman rank order correlation. $P < 0.05$ is considered significant. The statistical analysis was performed using SPSS computer software (version 7.5).

RESULTS

Age distribution and TPMT genotyping

In this study, 22 pre-pubescent females were included with a median age of 10.5 years (5.3-11.9) and 54 post-pubescent females with a median age of 15.8 years (12.6-20.4). For males, 28 were pre-pubescent, with a median age of 12.3 years (7.35-14) and 57 were post-pubescent with a median age of 16.4 (14-20), see table 1.

161 (92.5%) patients out of 174 are homozygous wild type (*1/*1) for the two TPMT polymorphisms that we have investigated, while 12 (6.9%) patients are heterozygous (*1/*3A) for the two TPMT polymorphisms and one (female) patient is heterozygous for the TPMT mutant at position 719 only, which classifies this patient as *1/*3C, see table 1.

6-TGN and 6-MMP levels

The 6-MP metabolite assay results were stratified according to patient gender and TPMT genotype. Since the patients were instructed to take 6-MP or AZA at night, 6-MP was rarely detected in the blood the next day.

Table 1 summarizes the median 6-TGN and 6-MMP levels (pmol/8x10⁸ RBC) in females and males as well as heterozygous patients, based on mean values for each patient. The median RBC 6-TGN levels ranged from 209-254 pmol/8x10⁸ RBC in patients without the mutated TPMT gene. Within this group, no significant differences in the RBC 6-TGN levels between females and males were found, either pre-or post pubescent. However, the median 6-TGN levels were increased up to 3 times in the TPMT heterozygous patients compared to the homozygous wild type, both in females as well as in males (p<0.0001). There was no significant difference in 6-TGN levels of heterozygous females versus heterozygous males.

The results from the 6-MMP assays are summarized in Table 1. There is no significant difference in the median levels of 6-MMP in pre-pubescent females and pre-pubescent males (3963 vs. 3443 pmol/8x10⁸ RBC). In contrast, although the median 6-MMP levels didn't change in females before and after puberty (3963 vs. 3277 pmol/8x10⁸ RBC), the median 6-MMP levels in males, decreased significantly after puberty and was reduced significantly from 3443 to 2233 pmol/8x10⁸ RBC (p< 0.05). Furthermore, the median levels of 6-MMP were lower in patients heterozygous for the TPMT mutant compared to the homozygous wild type, both in females than in males. In addition, the 6-MMP levels of male heterozygous patients (all but 1 patient were older

than 14 years) are significantly lower than that of heterozygous females (543 vs. 1230 pmol/ 8×10^8 RBC).

In figure 3 the ratio of 6-MMP/6-TGN are plotted for all patients. Here again, no significant difference is found between pre- pubescent females and males. Puberty decreases the 6-MMP/6-TGN ratio significantly in males by more than 50%, while in females this decline was non-significant. Furthermore, the presence of the TPMT mutation dramatically reduces the 6-MMP/6-TGN ratio both in females and males. A weak positive association is found between the levels of 6-MMP and 6-TGN in females ($r_s < 0.25$, see figure 4) or males ($r_s < 0.28$, see figure 5), either pre-or post-pubescent. In addition, a positive, significant association is found between 6-MMP and 6-TGN in heterozygous females ($r_s = 0.58$; $p < 0.005$, see figure 4), however, this relation is non-significant in heterozygous males ($r_s = 0.18$; $p = 0.55$, see figure 5).

DISCUSSION

Thiopurines, such as 6-MP or AZA, are used successfully in the treatment of IBD, but between males and females there still is a large differences in responses to 6-MP or AZA, such as variations in pharmacological indicators such as 6-TGN and 6-MMP, adverse reactions and toxicity [15]. To address this problem, we have evaluated in red blood cells from IBD patients differences in 6-MP metabolite levels such as 6-MMP or intracellular 6-MP metabolites such as 6-TIMP and 6-TGN. All patients were genotyped for the TPMT variants, because TPMT polymorphisms plays an important role in the sensitivity of patients for 6-MP or AZA.

The genotype frequencies of the TPMT variants (92.5% wild type and 7.5% heterozygous) are similar to what is mentioned in the literature [25,41]. We did not find any homozygous TPMT mutant patients, likely because of the small sample size.

In the wild type homozygous patients, no gender difference was observed in 6-TGN levels, see table 1. There was, however, a large and statistically significant difference between 6-TGN levels of the TPMT mutant heterozygous and wild type TPMT, which is in agreement with many studies. Part of the reason for this large increase in 6-TGN levels in patients with TPMT mutants is a higher availability of 6-MP and 6-TIMP as a result of low TPMT activity [25,30,32].

In a previous study of ALL patients, treated cyclically with 6-MP, we found that males have lower RBC 6-MMP levels than females (Lamothe *et al.*, in preparation). In the present study we stratified the males and females according to puberty. We observed that only post-pubescent males had lower 6-MMP levels when compared to pre- or post-pubescent females or pre-pubescent males (table 1). Pre-pubescent males did not have different 6-MMP levels, compared with pre-pubescent females. The reason for this finding is not totally understood, but the fact that we found only reduced 6-MMP levels in post-pubescent males compared with pre-pubescent males may indicate that increased testosterone levels during and after puberty may play a role in this phenomenon. Woodson *et al.* and Fernandez *et al.* show that males have higher basal renal TPMT activity than females. [13,42]. They also show that after hypophysectomy and removal of the sex organ, only males had decreased TPMT enzyme activity [42]. In addition, testosterone can increase renal TPMT activity in normal female and male rats and in castrated male animals [13]. We therefore postulate that in our patient population, post-pubescent males have a higher kidney TPMT activity due to increased testosterone levels. This would be in agreement with Klemetsdal *et al.* who reported that males have a slightly higher TPMT activity (8.3%) than females [17]. However, a higher TPMT activity in males would suggest higher 6-MMP levels in males versus females, which is the reverse of what we find in the present study. We therefore postulate that testosterone increases TPMT in kidney, as is found in rats [13], but not in RBCs. If so, than higher TPMT activity in kidneys and possibly in the liver may reduce the availability of 6-MP in the blood and RBCs, which would result in lower RBC 6-MMP levels. RBC 6-TGN levels should be lower as well, due to the reduced 6-MP levels, but because the enzyme IMPDH is probably the rate limiting step in the conversion of 6-TIMP to 6-TGN, as long as IMPDH remains saturated, 6-TGN levels in RBC will remain the same. This situation is therefore substantially different from patients who are heterozygous for the TPMT gene. In this case, TPMT levels are reduced in all organs and hence the overall 6-MP and 6-TIMP breakdown is reduced. This will lead to lower 6-MMP levels and a higher overall availability of 6-MP for 6-TGN synthesis and indeed higher RBC 6-TGN are found in this group [10,28].

Several authors have found a negative correlation between TPMT activity and 6-TGN levels in ALL patients, with the rationale that a high level of methylation of 6-MP and 6-TIMP would reduce the availability of these compounds for 6-TGN synthesis

[7,24]. We did not find this negative correlation, see figures 4 and 5, but found the reverse. This could be partly due to the large variations in 6-TGN and 6-MMP levels, as reported earlier, and confirms compartmentalization of thiopurine metabolism, as discussed earlier.

If we look at the sum of 6-MMP and 6-TGN levels in the wild type homozygous patients, versus mutant heterozygous, then the females without the TPMT mutant allele have converted about 3500-4000 pmol/ 8×10^8 RBC 6-MP into 6-MMP and 6-TGN. However, in heterozygous females the sum of 6-MMP and 6-TGN is only 1500 pmol/ 8×10^8 RBC. It is likely that in heterozygous females, a larger part of 6-MP is channeled through a pathway not measured by us, either by accumulation in different compartment, a higher catabolism (e.g. by xanthine oxidase or aldehyde oxidase or a higher excretion via the kidneys). A similar finding is shown in wild type homozygous pubescent males, where the sum of 6-MMP and 6-TGN is only 50 percent of that in females or pre-pubescent males and exacerbated in heterozygous males. Again, this data further indicate the complexity and compartmentalization of 6-MP metabolism.

CONCLUSION

In this study we have demonstrated that 6-MMP levels in erythrocytes are lower in post-pubescent males compared with pre- and post-pubescent females and pre-pubescent males, which could be due to a testosterone induced TPMT activity in kidneys, with a resulting lower 6-TGN levels in RBC and probably lymphocytes. This may partly explain the gender dependent relapse rate after 6-MP treatment. Those results raise questions about the treatment efficacy and risk of toxicity in post-pubescent males. In the future, it would be interesting to verify if post-pubescent males have less toxic events compared to other groups of gender and age.

REFERENCE LIST

1. Aarbakke, J., G. Janka-Schaub, and G. B. Elion. Thiopurine biology and pharmacology. *Trends Pharmacol.Sci.* 18: 3-7, 1997.
2. Baccichet, A., S. K. Qualman, and D. Sinnett. Allelic loss in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk.Res.* 21: 817-823, 1997.

3. Becher, H. J. and G. W. Lohr. Inosine 5'-phosphate dehydrogenase activity in normal and leukemic blood cells. *Klin.Wochenschr.* 57: 1109-1115, 1979.
4. Bergan, S., H. E. Rugstad, B. Klemetsdal, T. Giverhaug, O. Bentdal, G. Sodal, A. Hartmann, J. Aarbakke, and O. Stokke. Possibilities for therapeutic drug monitoring of azathioprine: 6- thioguanine nucleotide concentrations and thiopurine methyltransferase activity in red blood cells. *Ther.Drug Monit.* 19: 318-326, 1997.
5. Bokkerink, J. P., M. A. Bakker, T. W. Hulscher, R. A. De Abreu, and E. D. Schretlen. Purine de novo synthesis as the basis of synergism of methotrexate and 6-mercaptopurine in human malignant lymphoblasts of different lineages. *Biochem.Pharmacol.* 37: 2321-2327, 1988.
6. Bostrom, B. and G. Erdmann. Cellular pharmacology of 6-mercaptopurine in acute lymphoblastic leukemia. *Am.J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 15: 80-86, 1993.
7. Chrzanowska, M., P. Kolecki, B. Duczmal-Cichocka, and J. Fiet. Metabolites of mercaptopurine in red blood cells: a relationship between 6-thioguanine nucleotides and 6-methylmercaptopurine metabolite concentrations in children with lymphoblastic leukemia. *Eur.J.Pharm.Sci.* 8: 329-334, 1999.
8. Cuffari, C., E. G. Seidman, S. Latour, and Y. Theoret. Quantitation of 6-thioguanine in peripheral blood leukocyte DNA in Crohn's disease patients on maintenance 6-mercaptopurine therapy. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 74: 580-585, 1996.
9. Cuffari, C., Y. Theoret, S. Latour, and G. Seidman. 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut* 39: 401-406, 1996.
10. Dubinsky, M. C., S. Lamothe, H. Y. Yang, S. R. Targan, D. Sinnett, Y. Theoret, and E. G. Seidman. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 118: 705-713, 2000.
11. El Gamel, A., C. Evans, B. Keevil, T. Aziz, A. Rahman, C. Campbell, A. Deiraniya, and N. Yonan. Effect of allopurinol on the metabolism of azathioprine in heart transplant patients. *Transplant.Proc.* 30: 1127-1129, 1998.
12. Giverhaug, T., O. M. Fuskevaag, and J. Aarbakke. Methotrexate increases red blood cell concentrations of 6- methylmercaptopurine ribonucleotide in rats in vivo. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 40: 367-370, 1997.
13. Hernandez, J. S., J. A. Van Loon, D. M. Otterness, R. Guerciolini, and R. M. Weinshilboum. Thiopurine methyltransferase regulation in rat kidney: immunoprecipitation studies. *Xenobiotica* 21: 451-459, 1991.
14. Kerstens, P. J., J. N. Stolk, A. M. Boerbooms, L. H. Lambooy, R. de Graaf, R. A. De Abreu, and L. B. van de Putte. Purine enzymes in rheumatoid arthritis: possible association with response to azathioprine. A pilot study. *Ann.Rheum.Dis.* 53: 608-611, 1994.
15. Kirschner, B. S. Differences in the management of inflammatory bowel disease in children and adolescents compared to adults. *Neth.J.Med.* 53: S13-S18, 1998.
16. Klemetsdal, B., B. Straume, E. Wist, and J. Aarbakke. Identification of factors regulating thiopurine methyltransferase activity in a Norwegian population. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 44: 147-152, 1993.
17. Klemetsdal, B., E. Wist, and J. Aarbakke. Gender difference in red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *Scand.J.Clin.Lab Invest* 53: 747-749, 1993.
18. Koren, G., A. M. Langevin, N. Olivieri, E. Giesbrecht, A. Zipursky, and M. Greenberg. Diurnal variation in the pharmacokinetics and myelotoxicity of

- mercaptopurine in children with acute lymphocytic leukemia. *Am.J.Dis.Child* 144: 1135-1137, 1990.
19. Lennard, L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 43: 329-339, 1992.
 20. Lennard, L. Clinical implications of thiopurine methyltransferase--optimization of drug dosage and potential drug interactions. *Ther.Drug Monit.* 20: 527-531, 1998.
 21. Lennard, L., H. A. Davies, and J. S. Lilleyman. Is 6-thioguanine more appropriate than 6-mercaptopurine for children with acute lymphoblastic leukaemia? *Br.J.Cancer* 68: 186-190, 1993.
 22. Lennard, L. and J. S. Lilleyman. Individualizing therapy with 6-mercaptopurine and 6-thioguanine related to the thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Ther.Drug Monit.* 18: 328-334, 1996.
 23. Lennard, L. and H. J. Singleton. High-performance liquid chromatographic assay of human red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *J.Chromatogr.B Biomed.Appl.* 661: 25-33, 1994.
 24. Lennard, L., J. A. Van Loon, J. S. Lilleyman, and R. M. Weinshilboum. Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin.Pharmacol.Ther.* 41: 18-25, 1987.
 25. Lennard, L., J. A. Van Loon, and R. M. Weinshilboum. Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Clin.Pharmacol.Ther.* 46: 149-154, 1989.
 26. Lewis, L. D., A. Benin, C. L. Szumlanski, D. M. Otterness, L. Lennard, R. M. Weinshilboum, and D. W. Nierenberg. Olsalazine and 6-mercaptopurine-related bone marrow suppression: a possible drug-drug interaction [published erratum appears in *Clin Pharmacol Ther* 2000 Apr;67(4):431]. *Clin.Pharmacol.Ther.* 62: 464-475, 1997.
 27. Leyva, A., E. W. Holmes, Jr., and W. N. Kelley. Effect of 6-mercaptopurine on inosinic acid dehydrogenase in cultured human fibroblasts. *Biochem.Pharmacol.* 25: 527-532, 1976.
 28. Lilleyman, J. S. and L. Lennard. Mercaptopurine metabolism and risk of relapse in childhood lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 343: 1188-1190, 1994.
 29. Martin, D. S. and G. K. Schwartz. Chemotherapeutically induced DNA damage, ATP depletion, and the apoptotic biochemical cascade. *Oncol.Res.* 9: 1-5, 1997.
 30. McLeod, H. L. Commentary on interactions between 6-mercaptopurine therapy and thiopurine-methyl-transferase (TPMT) activity [letter; comment]. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 48: 85-88, 1995.
 31. McLeod, H. L., E. Y. Krynetski, J. A. Wilimas, and W. E. Evans. Higher activity of polymorphic thiopurine S-methyltransferase in erythrocytes from neonates compared to adults. *Pharmacogenetics* 5: 281-286, 1995.
 32. McLeod, H. L., M. V. Relling, Q. Liu, C. H. Pui, and W. E. Evans. Polymorphic thiopurine methyltransferase in erythrocytes is indicative of activity in leukemic blasts from children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 85: 1897-1902, 1995.
 33. Pacifici, G. M., P. Romiti, L. Giuliani, and A. Rane. Thiopurine methyltransferase in humans: development and tissue distribution. *Dev.Pharmacol.Ther.* 17: 16-23, 1991.
 34. Pieters, R., D. R. Huismans, A. H. Loonen, G. J. Peters, K. Hahlen, A. Does-Van Den Berg, E. R. van Wering, and A. J. Veerman. Relation of 5'-nucleotidase and

- phosphatase activities with immunophenotype, drug resistance and clinical prognosis in childhood leukemia. *Leuk. Res.* 16: 873-880, 1992.
35. Pui, C. H., J. M. Boyett, M. V. Relling, P. L. Harrison, G. K. Rivera, F. G. Behm, J. T. Sandlund, R. C. Ribeiro, J. E. Rubnitz, A. Gajjar, and W. E. Evans. Sex differences in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 17: 818-824, 1999.
 36. Relling, M. V., M. L. Hancock, G. K. Rivera, J. T. Sandlund, R. C. Ribeiro, E. Y. Krynetski, C. H. Pui, and W. E. Evans. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus [see comments]. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 2001-2008, 1999.
 37. Sandborn, W. J. Azathioprine: state of the art in inflammatory bowel disease. *Scand. J Gastroenterol. Suppl* 225: 92-99, 1998.
 38. Silverman, L. B. and H. J. Weinstein. Treatment of childhood leukemia. *Curr. Opin. Oncol.* 9: 26-33, 1997.
 39. Szumlanski, C. L. and R. M. Weinshilboum. Sulphasalazine inhibition of thiopurine methyltransferase: possible mechanism for interaction with 6-mercaptopurine and azathioprine. *Br. J Clin. Pharmacol.* 39: 456-459, 1995.
 40. Weinshilboum, R. M. Methylation pharmacogenetics: thiopurine methyltransferase as a model system. *Xenobiotica* 22: 1055-1071, 1992.
 41. Weinshilboum, R. M. and S. L. Sladek. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 651-662, 1980.
 42. Woodson, L. C., T. P. Maus, C. Reiter, and R. M. Weinshilboum. Rat thiopurine methyltransferase: regulation by testosterone. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 218: 734-738, 1981.
 43. Yates, C. R., C. H. Pui, and W. E. Evans. Pharmacodynamic monitoring of cancer chemotherapy: childhood acute lymphoblastic leukemia as a model. *Ther. Drug Monit.* 20: 453-458, 1998.
 44. Zietkiewicz, E., V. Yotova, M. Jarnik, M. Korab-Laskowska, K. K. Kidd, D. Modiano, R. Scozzari, M. Stoneking, S. Tishkoff, M. Batzer, and D. Labuda. Nuclear DNA diversity in worldwide distributed human populations. *Gene* 205: 161-171, 1997.
 45. Zimm, S., G. E. Johnson, and D. G. Poplack. Modulation of thiopurine cytotoxicity in the HL-60 cell line by physiological concentrations of hypoxanthine. *Cancer Res.* 46: 6286-6289, 1986.
 46. Weinshilboum, R. M., D. M. Otterness, and C. L. Szumlanski. Methylation pharmacogenetics: catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 19-52, 1999.

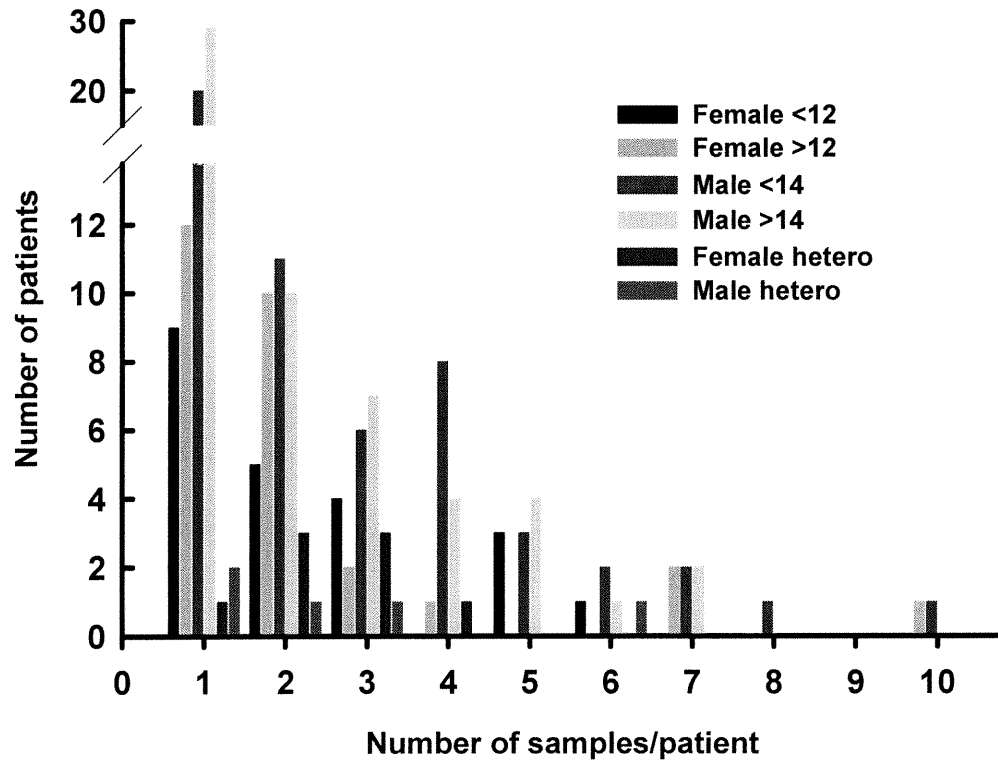


Figure 1. Number of patient per group of samples/patient.

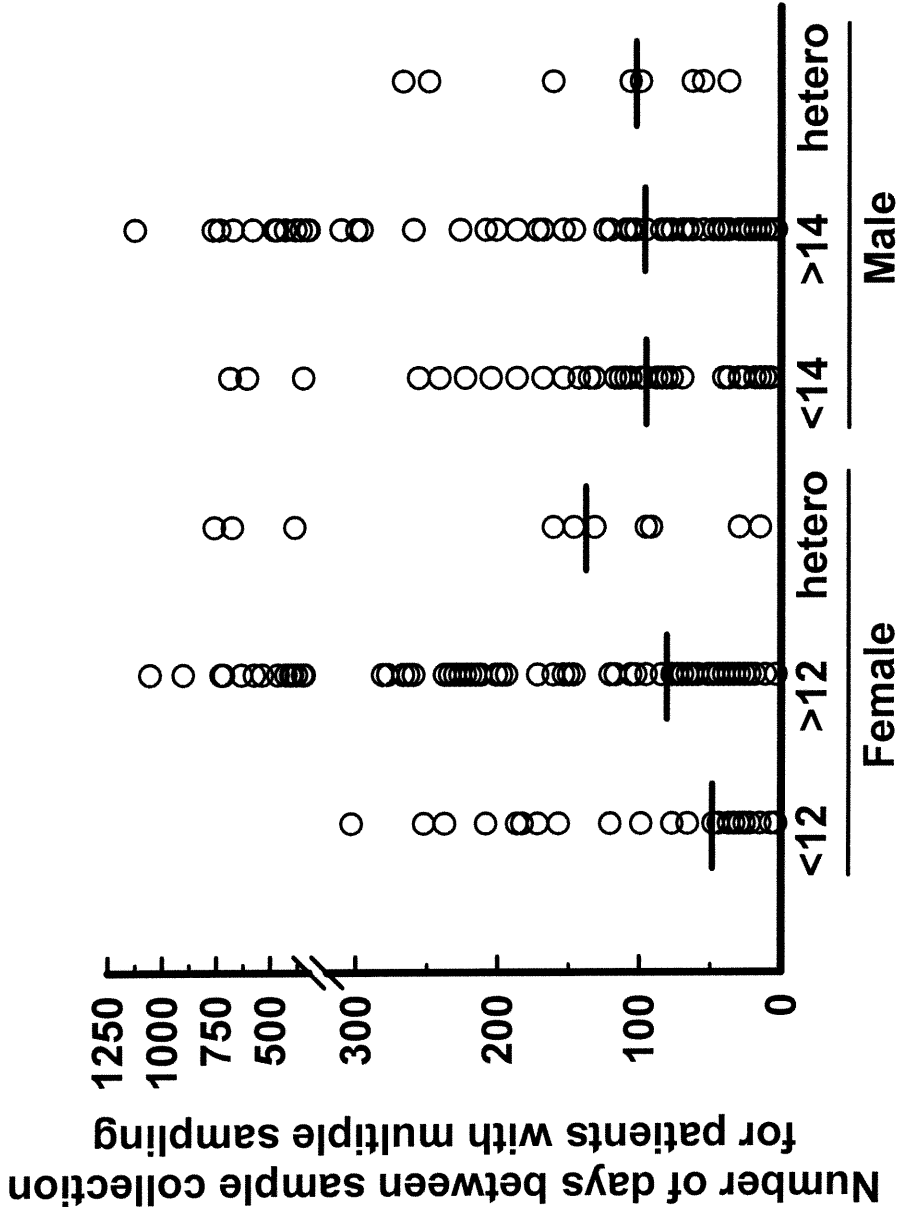


Figure 2. Number of days between sample collection in pre- and post-pubescent females and males and in heterozygous females and males. ("Hetero" are patients heterozygous for variants in the TPMT gene.)

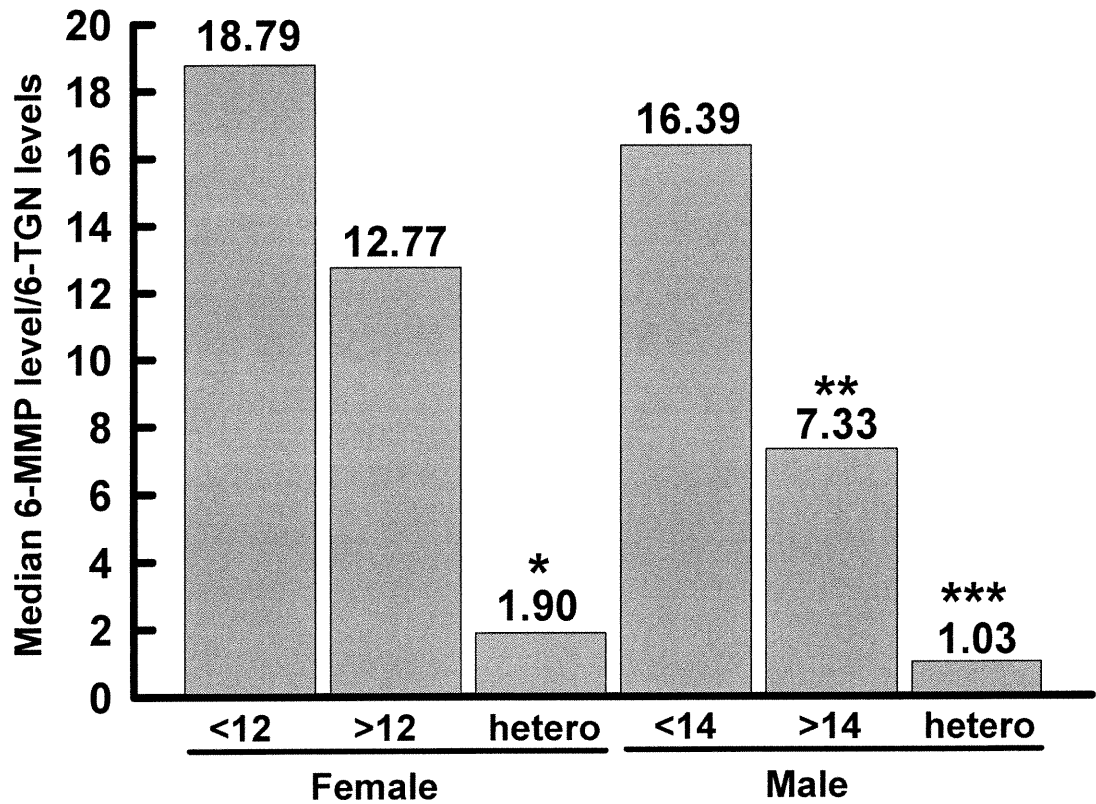


Figure 3. Median 6-MMP levels/6-TGN levels in red blood cells in pre- and post-pubescent females and males and in heterozygous females and males. ("Hetero" are patients heterozygous for variants in the TPMT gene.) * $P < 0.001$ hetero females vs. pre- or post-pubescent females. ** $P < 0.01$ hetero males vs. pre- or post-pubescent males. *** $P < 0.05$ hetero males vs. hetero females.

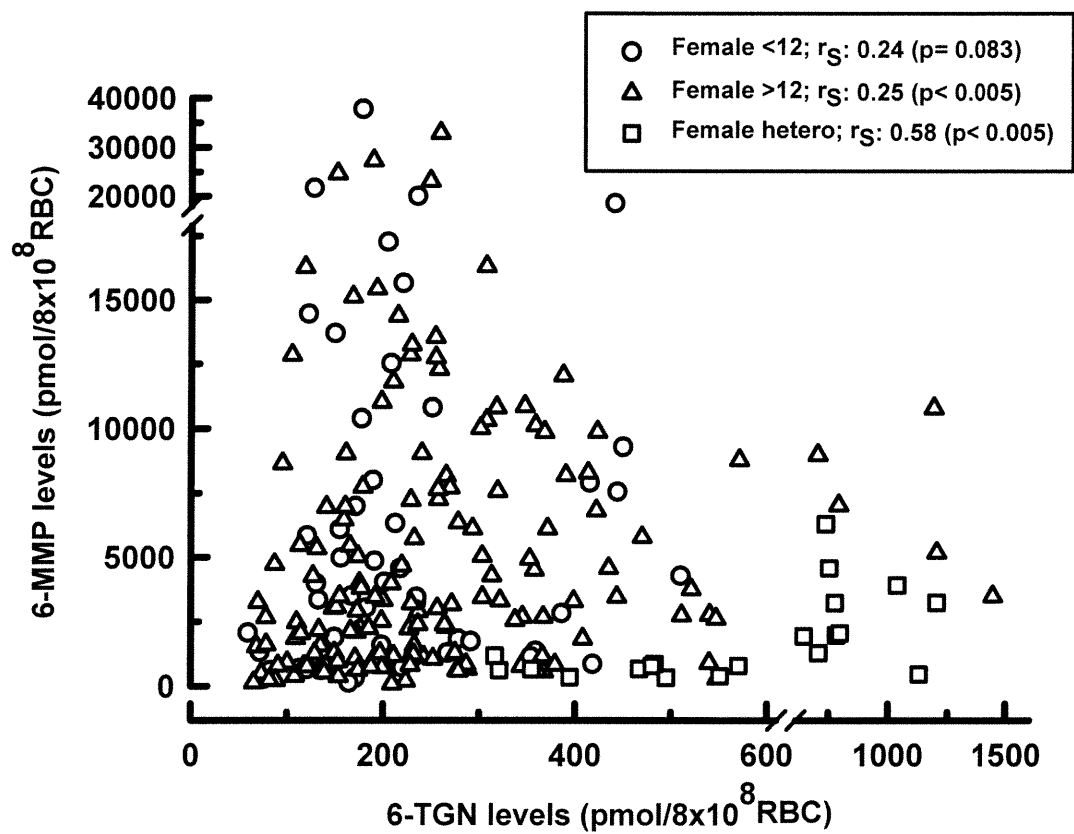


Figure 4. Relationship between 6-MMP and 6-TGN red blood cells levels in pre- and post-pubescent females and in hetero females. ("Hetero" are patients, heterozygous for variants in the TPMT gene.)

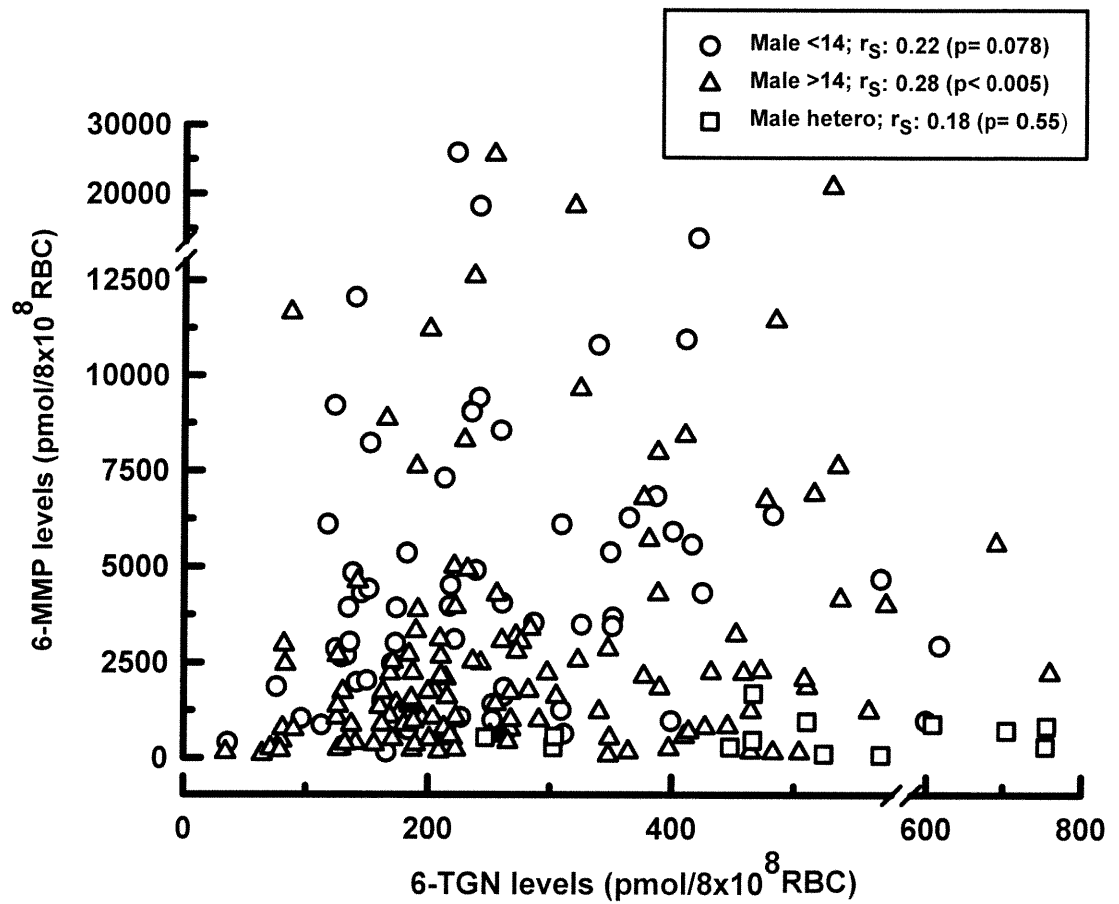


Figure 5. Relationship between 6-MMP and 6-TGN red blood cells levels in pre- and post-pubescent males and in hetero males. ("Hetero" are patients heterozygous for variants in the TPMT gene.)

Table 1. Number of patients, age, levels of 6-TGN and 6-MMP, and 6-MMP/6-TGN ratio in pre- and post pubescent females and males.

	Female			Male		
	<12	>12	hetero	<14	>14	hetero
Number of patients	22	54	8	28	57	5
Number of samples	52	152	20	64	126	13
Age (years)						
Median	10.50	15.75	15.50	12.33	16.42	15.62
Range	5.34 – 11.88	12.52 – 20.35	12.63 – 18.49	7.35 – 13.96	14.01 – 19.88	5.47 – 18.20
6-TG (pmol/8x10⁸ RBC)						
Median	209.1	254.3	629.2 ^a	226.1	236.9	522.0 ^b
Range	76.0-440.5	78.1-930.5	337.9-1130.4	96.4-599.7	79.2-559.0	247.0-704.7
6-MMP (pmol/8x10⁸ RBC)						
Median	3963	3277	1230 ^{c,d}	3443	2233 ^e	543 ^f
Range	132-37770	440-13540	467-4714	150-18265	146-25706	503-991
6-MMP/6-TG ratio						
Median	15.2	17.3	2.1 ^{g,h}	16.2	8.4 ⁱ	1.0 ^j
Range	0.8-212.5	1.8-87.3	0.4-6.2	0.9-75.8	0.3-133.9	0.8-2.6

a: vs female<12; female>12; male<14; male>14 (p<0.001 for all)

b: vs female<12; female>12; male<14; male>14 (p= 0.005; 0.013; 0.006; 0.01)

c: vs female<12; female>12; male<14; male>14 (p= 0.011; p<0.001; p= 0.046; p= 0.243)

d: vs male hetero (p= 0.093)

e: vs female<12; female>12; male<14 (p= 0.074; p= 0.004; p= 0.111)

f: vs female<12; female>12; male<14; male>14 (p= 0.011; p<0.001; p= 0.002; p= 0.025)

g: vs female<12; female>12; male<14; male>14 (p= 0.002; p<0.001; p<0.001; p= 0.002)

h: vs male hetero (p= 0.435)

i: vs female<12; female>12; male<14 (p= 0.036; 0.007; 0.049)

j: vs female<12; female>12; male<14; male>14 (p= 0.002; p<0.001; p= 0.002; p= 0.002)

“Hetero” are patients heterozygous for variants in the TPMT gene.

Article 3

Cette section présente une copie de l'article *Influence of thiopurine methyltransferase (TPMT) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotypes on the 6-Mercaptopurine metabolite levels and therapeutic response in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia* tel qu'il sera soumis au journal "Medical and Pediatric Oncology" au cours des prochaines semaines.

Influence of thiopurine methyltransferase (TPMT) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotypes on the 6-Mercaptopurine metabolite levels and therapeutic response in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia.

Stéphanie Lamothe, B.Sc., Daniel Sinnett, Ph.D., Yves Théorêt, Ph.D.

Centre de Cancérologie Charles Bruneau (S.L., D.S., Y.T.) and Research Center, Sainte-Justine Hospital; Departments of Pediatrics (DS) and Pharmacology (SL, YT), University of Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Acknowledgment: This study received financial support from the Charles Bruneau Foundation (DS, YT), the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (Scholarship to DS), and the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (Studentship to SL). The authors thank Hughes Sinnett and Sylvain Latour for their technical support and Eef Harmsen for the editorial assistance.

Abbreviations: ALL, acute lymphoblastic leukemia; 6-MP, 6-mercaptopurine; AZA, azathioprine; TPMT, thiopurine methyltransferase; 6-TGN, 6-thioguanine nucleotide; 6-MMP, 6-methylmercaptopurine; XO, xanthine oxidase; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; IMPDH, inosine monophosphate dehydrogenase; GMPS, guanosine monophosphate synthetase; MTHFR, methylene tetrahydrofolate reductase; RBC, red blood cells; APC, absolute polymorphonuclear count; PMN, polymorphonuclear; MTX, methotrexate.

Address reprint requests and correspondence to:

Yves Théorêt, Ph.D
Centre de Cancérologie Charles Bruneau, Sainte-Justine Hospital
Departments of Pharmacology,
University of Montréal,
3175 Cote-St-Catherine Road
Montréal, Québec, Canada.
H3T 1C5
Fax: (514)345-4731.

ABSTRACT

Background and Aims: The therapeutic effects of 6-mercaptopurine (6-MP) and its pro-drug azathioprine (AZA) are based upon their incorporation of into 6-TGN. This incorporation is affected by thiopurine methyltransferase (TPMT), a key enzyme involved in the biotransformation of thiopurines, and MTHFR, a key enzyme influencing methotrexate (MTX) metabolism. We investigate the effect of genetic polymorphisms of TPMT and MTHFR on 6-MP metabolism. **Method:** Genotyping of TPMT and MTHFR mutations by polymerase chain reaction/allele specific oligonucleotide hybridization was determined in 50 ALL patients receiving 6-MP (50 mg/m²/d). The level of 6-thioguanine nucleotides (6-TGN) and of 6-methylmercaptopurine nucleotides (6-MMP) was measured by HPLC in red blood cells (pmol/8x10⁸RBC) of 465 blood samples obtained from these patients. **Results:** We found 6-MMP in girls to be about twice the level of 6-MMP levels in boys. We found only one patient with a TPMT mutation, which had a higher 6-TGN and lower 6-MMP levels. Eleven patients had a mutation for MTHFR, although not all the same. They had a slightly higher 6-TGN level, however without having a significant effect in 6-MMP levels. **Conclusion:** Our results indicate a gender dependent purine metabolism, which partly may explain the gender dependent relapse rate after 6-MP treatment. In addition, both TPMT and MTHFR polymorphism interferes with 6-MP metabolism and therefore screening for these polymorphisms is warranted.

INTRODUCTION

The use of 6-mercaptopurine (6-MP) and methotrexate (MTX) has steadily improved the event-free survival rate of childhood ALL to about 70% [1,2]. However, the inter-individual variations in the absorption, metabolism, and excretion of 6-MP as well as the intracellular concentration of the corresponding metabolites are considerable [3-6]. A substantial number of patients do not respond properly to regular therapy and relapsed ALL is more difficult to cure than newly diagnosed cases [47]. Individualized treatment increases the rate of success and reduces the relapse rate [7-10]. The large variation of 6-MP metabolites, the 20% relapse rate and the improvement as a result of individualized treatment may be due to polymorphic genes, which influences its metabolism.

The thiopurine analogue 6-MP is a pro-drug, which needs to be metabolized to 6-thioguanine nucleotides (6-TGN) to be active. 6-TGN act as a GTP analogue and is incorporated into DNA and RNA [11]. This modified DNA and RNA ultimately results in cell death via apoptosis [12,13]. The first step of 6-MP activation is cellular uptake and phosphorylation to 6-thio-IMP (6-tIMP) by hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT). 6-tIMP is further phosphorylated to 6-TGN [14]. In lymphocytes

the conversion of 6-MP to 6-TGN is essential for its therapeutic effect, while in other tissues 6-TGN will exert toxic effects. The incorporation to 6-TGN in red blood cells (RBC) parallels the incorporation of 6-TGN in leukocytes (and other cells) and is used as a marker for 6-MP efficiency incorporation [15]. The efficacy of 6-MP is reduced by the action of xanthine oxidase (XO) that breaks down 6-MP to thiouric acid, mainly in the peripheral tissues. The high first pass metabolism of intestinal and hepatic XO partly explains the poor and highly variable (5-37, mean 16 %) bioavailability of orally administered 6-MP [11]. In addition, 6-MP is deactivated by methylation to 6-methylthiopurine (6-mMP) by thiopurine methyltransferase (TPMT) [9]. TPMT also converts 6-tIMP to 6-mtIMP, which also renders it unavailable for 6-TGN production. In addition, 6-mtIMP is a strong inhibitor of the *de novo* purine synthesis and its production will increase the purines and thiopurines salvage pathway [48]. This pathway is based on the transfer of a ribose phosphate from PRPP to hydrolyze nucleic acid [16]. Both the 6-MP concentration and the TPMT activity are important determinants of intracellular 6-TGN levels and therefore have an impact on the therapeutic and toxic effects of 6-MP.

Individual variation in the toxicity and therapeutic efficiency of 6-MP has been associated with functional genetic polymorphisms in the gene TPMT [17,18]. In the general population TPMT shows a tri-modal distribution, 89% having normal levels of activity (homozygous wild type), 11% have intermediate (heterozygous), and 1 in 300 subjects have low or no activity (homozygous mutant) [17]. Because of the reverse relation between TPMT activity and intracellular 6-TGN, low or no activity of TPMT as a result of functional polymorphism results to high to very high levels of 6-TGN and consequently will modify the therapeutic response [19,20].

The folate antagonist MTX is also used frequently in the treatment of ALL in combination with 6-MP. MTX competitively inhibits the enzyme dihydrofolate reductase (DHFR), thereby creating a depletion of intracellular tetrahydrofolate, which is needed a cofactors for the enzyme thymidylate synthase. This negatively affects DNA synthesis. In addition, MTX reduces the activity of the enzyme methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) via reduced folate levels. MTHFR is essential in the production of 5-methyltetrahydrofolate (5mTHF), a key ingredient in all methylation reactions as in the methylation reaction of TPMT. Therefore, a reduced MTHFR activity may reduce TPMT activity, thereby increasing the levels of 6-TGN.

Several functional polymorphisms of MTHFR have been detected causing reduced activities of MTHFR [49]. Because a reduced MTHFR activity will reduce the methylation potential in the cell and hence reduced the TPMT activity, even at normal folate levels without MTX, we expect this also to influence 6-MP metabolism and therapeutic responses.

It has been reported that the presence of MTX increases the bioavailability of 6-MP in humans as illustrated by the increased levels of 6-MP metabolites in human leukemic cells [21-23] either by inhibition of XO or of the purine *de novo* synthesis. Inhibition of XO will reduce the breakdown of 6-MP and hence enhance its availability [21], while inhibition of the purine *de novo* synthesis will enhance the availability of PRPP, the phosphorylated riboside, needed for the incorporation of 6-MP into 6-tIMP [16,24,25].

Therefore, we hypothesize that genetic heterogeneity of TPMT and MTHFR enzymes may at least partly explain the large variation in the 6-MP nucleotides and chemotherapeutic response in ALL patients. We therefore have evaluated the influence of these genotypes on 6-MP metabolites levels and therapeutic response in ALL patients, treated with 6-MP. This knowledge will form a solid basis for further individualization of the treatment of ALL patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients population

Fifty children with newly diagnosed ALL (47 pre-B and 3 T-cell) at the Hematology-Oncology clinic at the Sainte-Justine Hospital were included in this study. The patient group consisted of 25 boys and 25 girls with a median age of 4.86 years (range, 8.5 months-18 years) at the time of the study. All patients were treated under the Dana Farber Cancer Institute (DFCI) Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Consortium Protocol 95-01 [2,26-28]. In short: the newly diagnosed patients were induced with vincristine $1.5\text{mg}/\text{m}^2$ every week; prednisone ($40\text{ mg}/\text{m}^2/\text{day}$), doxorubicin ($30\text{mg}/\text{m}^2$ on the first 2 days of the induction therapy only; and E. coli asparaginase ($25,000\text{ IU}/\text{m}^2$ on day 4)). In addition, the patients received during the maintenance phase 6-MP for 14 days then stop for one week and start again. The mean 6-MP dose was $47.7\text{ mg}/\text{m}^2/\text{day}$ (range, $17\text{-}113\text{ mg}/\text{m}^2/\text{day}$). MTX was given at a dose of $4\text{g}/\text{m}^2/\text{day}$

to each patient. Blood was taken at day 0, when the treatment started, at day 7 and 14, followed by leucovorin (200 mg/m²).

TPMT and MTHFR genotyping

The patients were genotyped for two polymorphisms in TPMT, a G-to-A substitution at position 460 (G460A) leading to an Ala-to-Thr change at codon 154 (Ala154Thr) and a A to G substitution at position 719 (A719G), causing a Tyr240Cys substitution. In addition, we investigated in the MTHFR gene the following two polymorphisms, namely C677T (Ala222Val) and A1298C (Glu429Ala).

These polymorphic sites were then used to define distinct alleles (Figure 1): TPMT*1 (wild type), TPMT*3A (which has both the G460A and A719G substitution), TPMT*3B (only G460A) and TPMT*3C (only A719G). The MTHFR alleles are defined as follows: MTHFR*1 (wild type), MTHFR*2 (C677T), MTHFR*3 (A1298C) and MTHFR*4 (both C677T and A1298C) [14,29].

The DNA was amplified by PCR in 50 µL containing 10-20 ng of genomic DNA; 0.4µM of primers (see Table I), 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂; 100-200 µM dNTPs and 0.5-1 U of *Taq* DNA Polymerase (Gibco BRL/Life Technologies). The PCR was carried out for 35 cycles of 30s at 94°C, 30s at 52°C to 60°C and 1 min at 72°C (Table I).

Following PCR, 40 µL of the amplification products was diluted to 100 µL with dH₂O. The products were denatured for 3min at 94°C, cooled on ice and then adjusted to 10X SSC with the addition of one volume of 20X SSC before being dot blotted in duplicate on a nylon membrane (HybondTM-N⁺/Amersham) using a micro-sample filtration manifold (Mini-Fold®I Dot-Blot System Acrylic/Schleicher&Schuell). The membranes were incubated for 10min in a denaturation solution (1.5M NaCl, 0.5N NaOH) followed by neutralization for 15min in 1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl (pH 7.2), 0.001M EDTA. The DNA was cross-linked on the membrane with UV (1200µJoules x 100/cm²) using the UV StratalinkerTM1800 (Stratagene).

The Dot Blots were hybridized with end-labeled Allele Specific Oligonucleotide (ASO) as described in[50]. Briefly, the membranes were pre-hybridized for 30min at 37°C in a solution containing 1X SSPE, 0.75M NaCl, 1% SDS, 200 µg/mL heparin and 70 mM Tris-HCl (pH 7.4) and hybridized in the same solution for 30min at 37°C with ASO at 1 000 000cpm/mL. Following hybridization the membranes were washed once

in 2X SSPE and 0.1% SDS for 15min at 37°C to 45°C (Table I). The membranes were exposed at -80°C with two intensifying screens for at least 3 hours.

Erythrocyte 6-MP metabolites assays

Heparinized blood (5mL) was obtained along with other routine blood work at the time of a scheduled clinic visit or hospitalization. Following extraction, the RBC were frozen at -80°C [30]. 6-TGN in RBC are extracted and hydrolysed to 6-TP. 6-TP and the free thiobase, 6-MP and 6-MMP levels were determined by a reversed-phase HPLC assay as described previously [19,30]. The metabolites levels were expressed as pmol/8 X 10⁸ RBC.

Statistical methods

The data did not exhibit a normal distribution, therefore the results are expressed as median (range). The Pearson Correlation Test was used to determine the correlation between APC count and 6-TGN and 6-MMP levels. The non-parametric Mann-Whitney Test was used to test the difference between each group to be compared. P < 0.05 was considered to be statistically significant. The statistical analysis was performed using SPSS computer software (version 7.5).

RESULTS

TPMT and MTHFR genotyping

The frequencies of the different genotypes for the 4 polymorphic sites in the TPMT (n=50) and MTHFR (n=38) genes are given in Table II. Forty-nine ALL patients were homozygous for the TPMT wild type allele (TPMT*1/TPMT*1), whereas 1 patient was heterozygous for the polymorphism A719G and was classified as TPMT*1/TPMT*3C. The alleles TPMT*3A and TPMT*3B were not detected in this group.

At the MTHFR locus, 11 patients (29%) were homozygous wild type (MTHFR*1/MTHFR*1), 16 (42%) were heterozygous being MTHFR*1/MTHFR*2 (n=9) or MTHFR*1/MTHFR*3 (n=7). Eleven (29%) were homozygous or combined heterozygous for a mutant MTHFR allele (MTHFR*2/MTHFR*2 (n=3), MTHFR*3/MTHFR*3 (n=2) and MTHFR*3/MTHFR*4 (n=3)). The genotyping assay did not allowed us to distinguish between individuals being MTHFR*2/MTHFR*3 or MTHFR*1/MTHFR*4 and were therefore classified as MTHFR*2/MTHFR*3 (n=3). Of

note, the individual which was heterozygous TPMT*1/TPMT*3C for TPMT was MTHFR*1/MTHFR*2 for the MTHFR locus.

6-TGN and 6-MMP levels in childhood ALL patients.

The median values of the 6-TGN and 6-MMP were measured in the RBCs of ALL patients at day 0 (the start of the 6-MP treatment), 7, and 14 of the treatment with 6-MP. The 6-TGN levels in the RBCs increased significantly in a linear fashion from 94 pmol/ 8×10^8 RBC at day 0, to 171 and 238 pmol/ 8×10^8 RBC, at day 7 and 14, respectively (Table III). All these differences were statistically significant from each other. The median 6-MMP levels in the RBCs started at 2.4 nmol/ 8×10^8 RBC on day 0, and increased significantly to 6.2 and 7.0 nmol/ 8×10^8 RBC on day 7 and 14 respectively (see table III).

There was a significant difference between females and males in our population concerning 6-MMP levels. At day 0, the levels of 6-MMP in RBCs females was 2.3 times higher than that in males ($p < 0.001$). This ratio of 6-MMP levels in females vs. males remained more or less constant at day 7 (ratio = 1.9; $p < 0.001$) and day 14 (ratio = 2.2; $p < 0.001$, see fig. 2). However, there was no significant difference in 6-TGN between females and males on days 0, 7 and 14 of the treatment cycle ($p = 0.574$, $p = 0.152$, $p = 0.056$ respectively, data not shown).

Absolute polymorphonuclear count (APC) values in ALL patients.

There was a large variation in APC values, which are used to evaluate the 6-MP treatment in ALL patients. The APC levels increased significantly from day 0 to day 7, and declined at day 14 (Table III). There was no significant difference in APC levels between females and males on days 0, 7 and 14 of the treatment cycle ($p = 0.472$, $p = 0.746$, $p = 0.722$, respectively, data not shown).

We did not find a significant correlation between the APC values with the levels of RBC-6TGN at days 0, 7 and 14 of the treatment cycle ($r = -0.008$, $p = 0.904$; $r = -0.054$, $p = 0.560$; $r = -0.046$, $p = 0.626$ respectively). Similarly, no correlation was observed between APC and the levels of 6-MMP on days 0, 7 and 14 of the treatment cycle ($r = 0.099$, $p = 0.133$; $r = 0.087$, $p = 0.353$; $r = 0.034$, $p = 0.717$ respectively).

Variations of 6-TGN, 6-MMP and APC levels as a function of TPMT and MTHFR genotypes.

In Figures 3 and 4 the median levels of the 6-TGN and 6-MMP are plotted for each of the different polymorphisms identified in our patient group. TPMT catalyses the

methylation of 6-MP to 6-MMP and 6-tIMP to 6-mtIMP and hence its activity reduces the availability of 6-MP for the production of 6-TGN. We found 1 patient (2%), which was heterozygous for TPMT (TPMT*1/*3C, see table I). In addition, this patient was heterozygous for MTHFR as well (MTHFR*1/*2). This patient had lower 6-MMP levels at all days samples, with a higher 6-TGN.

If we combine all individuals which are either heterozygous or homozygous mutant for MTHFR, then we find a statistically significant difference in 6-TGN levels on days 7 and 14 ($p=0.111$, $p=0.043$ and $p=0.001$ respectively) (Figure 3). In fact, individuals carrying at least one mutant allele had higher 6-TGN levels compared with wild type individuals, except on day 0 where some homozygous mutant individuals had lower levels compared to homozygous wild type or heterozygous ($p=0.002$ and $p=0.005$ respectively).

The 6-MMP levels were not statistically different between each genotype groups on either of the 3 treatment days studied ($p=0.227$, $p=0.101$ and $p=0.300$ respectively, see figure 4). Here also, we observed lower 6-MMP levels on day 0 for homozygous mutant patients compared to homozygous wild type and heterozygous individuals ($p=0.014$ and $p=0.008$ respectively). Except for TPMT*1/*1: MTHFR*2/*2, TPMT*1/*1: MTHFR*3/*4 and TPMT*1/*3C: MTHFR*1/*2 where 6-MMP levels are lower on day 14 than on day 7. APC were also variable during treatment cycle. In details the levels were increasing between days 0 and 7 of the cycle, and then they were decreasing until day 14 (Figure 5). Except for TPMT*1/*1: MTHFR*2/*2 where day 7 values are lower than day 0 but higher than day 14. APC were considered statistically different between homozygous wild type patients and heterozygous-homozygous mutant combined group only on day 14 ($p=0.061$, $p=0.842$ and $p=0.046$ respectively) (Figure 5).

DISCUSSION

The improvement in ALL has been impressive over the last twenty years, but the metabolic and therapeutic indicators in patients vary hugely and there is still a 20-30 percent relapse rate. The inter-individual differences in drug response may be attributed to functional polymorphisms for the key enzymes that metabolize chemotherapeutic agents. In this study we investigated the effect of polymorphisms of TPMT and MTHFR

on 6-MP metabolites. Both 6-TGN and absolute PMN are positively associated with event free survival (EFS) and have proved to be useful to evaluate the efficiency of the treatment [31].

Inter-patient variability

We noted large variations in 6-MP levels and its metabolites 6-MMP and 6-TGN and a large variation in the absolute PMN count during the 14 days treatment cycle with 6-MP. The large variation of these parameters is found consistently in ALL patients by us and others [5,15,32-34]. We did not find a significant correlation between 6-TGN and/or 6-MMP levels with absolute PMN levels. This was unexpected because high levels of 6-TGN play a major role in the killing of the leucocytes. Lennard *et al.* found a significant correlation between 6-TGN and the absolute PMN values in ALL patients, despite the large individual variations [9,33]. However, they also noted that this relation only existed on day 14 of the treatment and not at day 0 or 7 [35]. In addition, Lennard and colleagues found that the relation between 6-TGN and PMNs disappeared when these children subsequently took folate supplements [36]. Similarly, Chrzanowska *et al.* and Schmiegelow and Bruunshuus found a correlation between 6-TGN and white blood cell counts, again with a large inter-patient variation [15,34]. It is known that PMNs does not vary immediately after 6-MP administration, cell renewal has to take place in order to observe the effect of 6-MP [51]. Because the neutrophils half-life is around 10 days, it would be more appropriate to correlate 6-TGN and 6-MMP levels with PMN levels after 14 days. However, even after 14 days we did not find a significant association between 6-TGN and absolute PMN levels in our patient population, and we speculate that non-compliance of a significant amount of patients may play a role as well. In addition, Koizumi *et al.* found that pulsed therapy is as effective as continuous therapy, despite the fact that with pulsed therapy lower 6-TGN levels are achieved [37], which could explain our findings.

Gender effect

In this study we noted that male 6-MMP levels were approximately twice as low as female levels throughout the treatment. This is an important and novel finding. Gender differences in drug response in ALL patients are well known. For instance, males have a higher relapse rate compared with females [38,39] and tolerate more 6-MP without obtaining higher mean 6-TGN levels. Klemetsdal *et al.* reported that males have slightly higher TPMT activities (8.3%) than females. [40], while Lilleyman *et al.* 1984

found an association between 6-MP with 6-TGN levels in females, but not in males [41]. All these observations are consistent with a higher 6-MP catabolism in males via a higher TPMT activity. However, our results, with males having lower 6-MMP levels than females, cannot be explained by a higher TPMT activity [40]. We therefore speculate that males may have a higher breakdown and/or excretion of 6-MMP compared to females, although we are not aware of any data supporting this explanation.

The influence of genotypes on variations of metabolites levels and the potential impact on the treatment

We found only one heterozygous TPMT individual (TPMT*1/TPMT*3C) or 2% of the studied patient population. In a different patient group, we found that 8% of the patients were heterozygous for a TPMT mutant [19], while Weinshilboum and Sladek [17] found 11% of the population was heterozygous for a TPMT mutation. The low frequency of the present study is likely due to the small sample size (n=50).

The heterozygous TPMT patient in our study had an additional mutation for MTHFR (MTHFR*1/*2), thereby making it difficult to distinguish the contribution of each of the mutant. However, the high 6-TGN levels we found in this patient, combined with reduced 6-MMP levels are in agreement with findings of Krynetski and Evans [42], and is likely due to a reduced activity of the enzyme TPMT [43]. The reduced TPMT activity results in a higher availability of 6-MP and 6-tIMP with a concomitant increase in 6-TGN levels. This can easily lead to overdoses of 6-MP with excessive toxicity and therefore screening of ALL patients for TPMT variants is essential [10].

In our study group only 29% of our patients were homozygous wild type for MTHFR, while 42% were heterozygous for a MTHFR mutation, and 29% were homozygous or combined heterozygous for a mutant allele. The frequency of homozygous wild type is higher in this study than reported elsewhere (29% vs. 13%) [44]. On the other hand, the frequency of homozygous and combined heterozygous for a mutant allele is lower in our study (29% vs. 38%) [44].

We observed that patients with at least one mutation in MTHFR have significantly increased levels of 6-TGN at day 7 and 14 compared to those who do not carry the mutation. This indicates that MTHFR polymorphisms play a role in the variations of 6-MP in ALL patients. The increased 6-TGN in MTHFR polymorphic patients is in agreement with a reduced TPMT activity, due to a reduced methylation potential. However, other mechanisms may play a role as well. For instance, a MTHFR

mutant may have a reduced affinity for its main substrate 5,10-methylene THF. This could indicate that at normal folate levels in the cell, MTFHR activity could be reduced, which could ultimately lead to a reduced TPMT activity via a reduced methylation cycle. This reduced TPMT activity would reduce the conversion of 6-MP to 6-MMP and hence increase the 6-TGN levels. However, when MTX is present, the situation is more complex. MTX will interfere with 6-MP metabolism via inhibition of xanthine oxidase, thereby increasing 6-MP and 6-TGN levels [45]. Furthermore, MTX inhibits the purine *de novo* synthesis, thereby increasing the incorporation of 6-MP via the resulting increased PRPP levels [16,24,46]. However additional mechanisms, especially if MTX is given simultaneously with 6-MP, are not excluded and further research is warranted.

CONCLUSION

A major finding of our study is that the levels of 6-MMP in females are about twice the level of 6-MMP levels in males. This indicates that there is a gender dependent purine metabolism, which partly may explain the gender dependent relapse rate after 6-MP treatment. Our results indicate that both TPMT and MTHFR polymorphism interferes with 6-MP metabolism and therefore screening for these polymorphisms is warranted. This study confirms the need to screen ALL patients for polymorphisms in the TPMT gene. Children with a polymorphic form of the TPMT gene are more sensitive to 6-MP and can develop toxic levels of 6-MP more quickly. In addition, this study confirms the interaction of MTX via the MTHFR gene with the 6-MP metabolism so that physicians can dose ALL patients more specifically with 6-MP, to reduce possible toxic effects. However, more research is needed, especially in the effects of polymorphisms of the MTHFR gene.

REFERENCE LIST

1. Yates, C. R., C. H. Pui, and W. E. Evans. Pharmacodynamic monitoring of cancer chemotherapy: childhood acute lymphoblastic leukemia as a model. *Ther. Drug Monit.* 20: 453-458, 1998.
2. Silverman, L. B. and H. J. Weinstein. Treatment of childhood leukemia. *Curr. Opin. Oncol.* 9: 26-33, 1997.

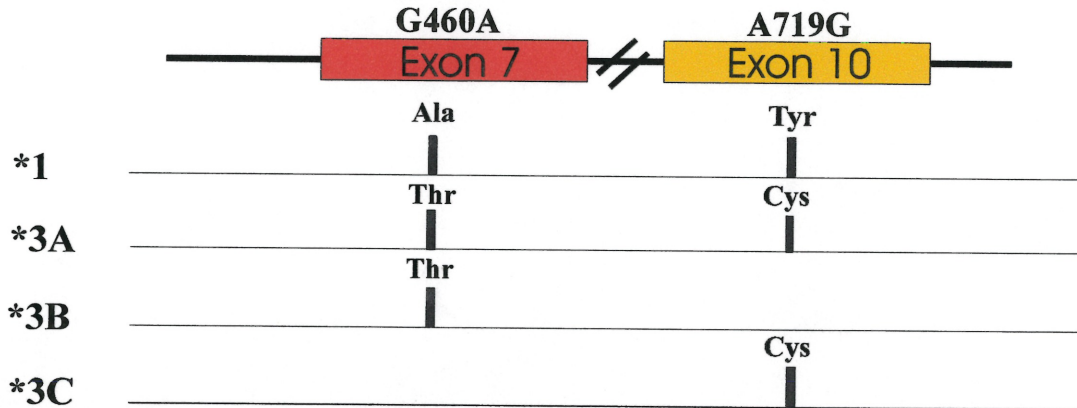
3. Lennard, L., J. S. Lilleyman, J. Van Loon, and R. M. Weinshilboum. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 336: 225-229, 1990.
4. Zimm, S., J. M. Collins, R. Riccardi, D. O'Neill, P. K. Narang, B. Chabner, and D. G. Poplack. Variable bioavailability of oral mercaptopurine. Is maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia being optimally delivered? *N.Engl.J.Med.* 308: 1005-1009, 1983.
5. Balis, F. M., J. S. Holcenberg, D. G. Poplack, J. Ge, H. N. Sather, R. F. Murphy, M. M. Ames, M. J. Waskerwitz, D. G. Tubergen, S. Zimm, G. S. Gilchrist, and W. A. Bleyer. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral methotrexate and mercaptopurine in children with lower risk acute lymphoblastic leukemia: a joint children's cancer group and pediatric oncology branch study. *Blood* 92: 3569-3577, 1998.
6. Kato, Y., T. Matsushita, K. Chiba, N. Hijiya, T. Yokoyama, and T. Ishizaki. Dose-dependent kinetics of orally administered 6-mercaptopurine in children with leukemia. *J.Pediatr.* 119: 311-316, 1991.
7. Evans, W. E., M. V. Relling, J. H. Rodman, W. R. Crom, J. M. Boyett, and C. H. Pui. Conventional compared with individualized chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *N.Engl.J.Med* 338: 499-505, 1998.
8. Krynetski, E. Y. and W. E. Evans. Pharmacogenetics as a molecular basis for individualized drug therapy: the thiopurine S-methyltransferase paradigm. *Pharm.Res.* 16: 342-349, 1999.
9. Lennard, L. and J. S. Lilleyman. Individualizing therapy with 6-mercaptopurine and 6-thioguanine related to the thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Ther.Drug Monit.* 18: 328-334, 1996.
10. Innocenti, F., L. Iyer, and M. J. Ratain. Pharmacogenetics: a tool for individualising antineoplastic therapy. *Clin.Pharmacokinet.* 39: 315-325, 2000.
11. Lennard, L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 43: 329-339, 1992.
12. Martin, D. S. and G. K. Schwartz. Chemotherapeutically induced DNA damage, ATP depletion, and the apoptotic biochemical cascade. *Oncol.Res.* 9: 1-5, 1997.
13. Bostrom, B. and G. Erdmann. Cellular pharmacology of 6-mercaptopurine in acute lymphoblastic leukemia. *Am.J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 15: 80-86, 1993.
14. Aarbakke, J., G. Janka-Schaub, and G. B. Elion. Thiopurine biology and pharmacology. *Trends Pharmacol.Sci.* 18: 3-7, 1997.
15. Schmiegelow, K. and I. Bruunshuus. 6-Thioguanine nucleotide accumulation in red blood cells during maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia, and its relation to leukopenia. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 26: 288-292, 1990.
16. Bokkerink, J. P., M. A. Bakker, T. W. Hulscher, R. A. De Abreu, and E. D. Schretlen. Purine de novo synthesis as the basis of synergism of methotrexate and 6-mercaptopurine in human malignant lymphoblasts of different lineages. *Biochem.Pharmacol.* 37: 2321-2327, 1988.
17. Weinshilboum, R. M. and S. L. Sladek. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am.J.Hum.Genet.* 32: 651-662, 1980.
18. Weinshilboum, R. M. Methylation pharmacogenetics: thiopurine methyltransferase as a model system. *Xenobiotica* 22: 1055-1071, 1992.

19. Dubinsky, M. C., S. Lamothe, H. Y. Yang, S. R. Targan, D. Sinnett, Y. Theoret, and E. G. Seidman. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 118: 705-713, 2000.
20. Lilleyman, J. S. and L. Lennard. Mercaptopurine metabolism and risk of relapse in childhood lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 343: 1188-1190, 1994.
21. Balis, F. M., J. S. Holcenberg, S. Zimm, D. Tubergen, J. M. Collins, R. F. Murphy, G. S. Gilchrist, D. Hammond, and D. G. Poplack. The effect of methotrexate on the bioavailability of oral 6-mercaptopurine. *Clin.Pharmacol.Ther.* 41: 384-387, 1987.
22. Giverhaug, T., T. Loennechen, and J. Aarbakke. Increased concentrations of methylated 6-mercaptopurine metabolites and 6-thioguanine nucleotides in human leukemic cells in vitro by methotrexate. *Biochem.Pharmacol.* 55: 1641-1646, 1998.
23. Giverhaug, T., T. Loennechen, and J. Aarbakke. The interaction of 6-mercaptopurine (6-MP) and methotrexate (MTX). *Gen.Pharmacol.* 33: 341-346, 1999.
24. Allegra, C. J., K. Hoang, G. C. Yeh, J. C. Drake, and J. Baram. Evidence for direct inhibition of de novo purine synthesis in human MCF-7 breast cells as a principal mode of metabolic inhibition by methotrexate. *J.Biol.Chem.* 262: 13520-13526, 1987.
25. Bokkerink, J. P., F. J. Damen, M. W. Hulscher, M. A. Bakker, and R. A. De Abreu. Biochemical evidence for synergistic combination treatment with methotrexate and 6-mercaptopurine in acute lymphoblastic leukemia. *Hamatol.Bluttransfus.* 33: 110-117, 1990.
26. Silverman, L. B., T. W. McLean, R. D. Gelber, M. J. Donnelly, D. G. Gilliland, N. J. Tarbell, and S. E. Sallan. Intensified therapy for infants with acute lymphoblastic leukemia: results from the Dana-Farber Cancer Institute Consortium [see comments]. *Cancer* 80: 2285-2295, 1997.
27. Silverman, L. B., R. D. Gelber, V. K. Dalton, B. L. Asselin, R. D. Barr, L. A. Clavell, C. A. Hurwitz, A. Moghrabi, Y. Samson, M. A. Schorin, S. Arkin, L. Declerck, H. J. Cohen, and S. E. Sallan. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* 97: 1211-1218, 2001.
28. Hurwitz, C. A., L. B. Silverman, M. A. Schorin, L. A. Clavell, V. K. Dalton, K. M. Glick, R. D. Gelber, and S. E. Sallan. Substituting dexamethasone for prednisone complicates remission induction in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 88: 1964-1969, 2000.
29. van der Put, N. M., F. Gabreels, E. M. Stevens, J. A. Smeitink, F. J. Trijbels, T. K. Eskes, L. P. van den Heuvel, and H. J. Blom. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? [see comments]. *Am.J.Hum.Genet.* 62: 1044-1051, 1998.
30. Cuffari, C., Y. Theoret, S. Latour, and G. Seidman. 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut* 39: 401-406, 1996.
31. Relling, M. V., M. L. Hancock, J. M. Boyett, C. H. Pui, and W. E. Evans. Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 93: 2817-2823, 1999.

32. Hayder, S., P. Lafolie, O. Bjork, and C. Peterson. 6-mercaptopurine plasma levels in children with acute lymphoblastic leukemia: relation to relapse risk and myelotoxicity. *Ther. Drug Monit.* 11: 617-622, 1989.
33. Lennard, L., H. A. Davies, and J. S. Lilleyman. Is 6-thioguanine more appropriate than 6-mercaptopurine for children with acute lymphoblastic leukaemia? *Br.J.Cancer* 68: 186-190, 1993.
34. Chrzanowska, M., P. Kolecki, B. Duczmal-Cichocka, and J. Fiet. Metabolites of mercaptopurine in red blood cells: a relationship between 6-thioguanine nucleotides and 6-methylmercaptopurine metabolite concentrations in children with lymphoblastic leukemia. *Eur.J.Pharm.Sci.* 8: 329-334, 1999.
35. Lennard, L., C. A. Rees, J. S. Lilleyman, and J. L. Maddocks. Childhood leukaemia: a relationship between intracellular 6-mercaptopurine metabolites and neutropenia. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 16: 359-363, 1983.
36. Lennard, L., J. S. Lilleyman, and J. L. Maddocks. The effect of folate supplements on 6-mercaptopurine remission maintenance therapy in childhood leukaemia. *Br.J.Cancer* 53: 115-119, 1986.
37. Koizumi, S. Impairment of methotrexate (MTX)-polyglutamate formation of MTX-resistant K562 cell lines. *Jpn.J.Cancer Res.* 79: 1230-1237, 1988.
38. Chessells, J. M., S. M. Richards, C. C. Bailey, J. S. Lilleyman, and O. B. Eden. Gender and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukaemia: report from the MRC UKALL trials. *Br.J.Haematol.* 89: 364-372, 1995.
39. Klemetsdal, B., T. Flaegstad, and J. Aarbakke. Is there a gender difference in red blood cell thiopurine methyltransferase activity in healthy children? *Med Pediatr.Oncol.* 25: 445-449, 1995.
40. Klemetsdal, B., E. Wist, and J. Aarbakke. Gender difference in red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *Scand.J.Clin.Lab Invest* 53: 747-749, 1993.
41. Lilleyman, J. S., L. Lennard, C. A. Rees, G. Morgan, and J. L. Maddocks. Childhood lymphoblastic leukaemia: sex difference in 6-mercaptopurine utilization. *Br.J.Cancer* 49: 703-707, 1984.
42. Krynetski, E. Y. and W. E. Evans. Pharmacogenetics of cancer therapy: getting personal. *Am.J.Hum.Genet.* 63: 11-16, 1998.
43. Black, A. J., H. L. McLeod, H. A. Capell, R. H. Powrie, L. K. Matowe, S. C. Pritchard, E. S. Collie-Duguid, and D. M. Reid. Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine. *Ann.Intern.Med* 129: 716-718, 1998.
44. Skibola, C. F., M. T. Smith, E. Kane, E. Roman, S. Rollinson, R. A. Cartwright, and G. Morgan. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults [see comments]. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 12810-12815, 1999.
45. Zimm, S., J. M. Collins, D. O'Neill, B. A. Chabner, and D. G. Poplack. Inhibition of first-pass metabolism in cancer chemotherapy: interaction of 6-mercaptopurine and allopurinol. *Clin.Pharmacol.Ther.* 34: 810-817, 1983.
46. Bokkerink, J. P., R. A. De Abreu, E. H. Stet, and F. J. Damen. Cell-kinetics and biochemical pharmacology of methotrexate and 6-mercaptopurine in human malignant T-lymphoblasts. *Klin.Padiatr.* 204: 293-298, 1992.
47. Vernant, J. P., M. Imbert, H. Jouault, M. Tulliez, H. Merle-Béral, C. Boucheix, C. Charrin, F. Mugneret, J. Gabert, G. Schaison, A. Baruchel, T. Leblanc, D. Fièvre, C. Danaila, J. Reiffers, F. Lacombe, M. Puntous, and C. Cordonnier. Leucémies aiguës. *La Revue du Practicien* 46: 21-79, 1996.

48. Rawn J. D. 1990 *Traité de biochimie. Biosynthèse des nucléotides.* De Boeck-Wesmael, Bruxelles. pp.627-660.
49. Sibani S., B. Christensen, E. O'Ferrall, I. Saadi, F. Hiou-Tim, D. S. Rosenblatt, and R. Rozen. Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. *Human Mutation* 15: 280-287, 2000.
50. Zietkiewicz, E., V. Yotova, M. Jarnik, M. Korab-Laskowska, K. K. Kidd, D. Modiano, R. Scozzari, M. Stoneking, S. Tishkoff, M. Batzer, and D. Labuda. Nuclear DNA diversity in worldwide distributed human populations. *Gene* 205: 161-171, 1997.
51. Lennard L., J. S. Lilleyman, J. Van Loon, R. M. Weinshilboum. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 336: 225-229, 1990.

TPMT (Chromosome 6 region p22.3)



MTHFR (Chromosome 1 region p36.3)

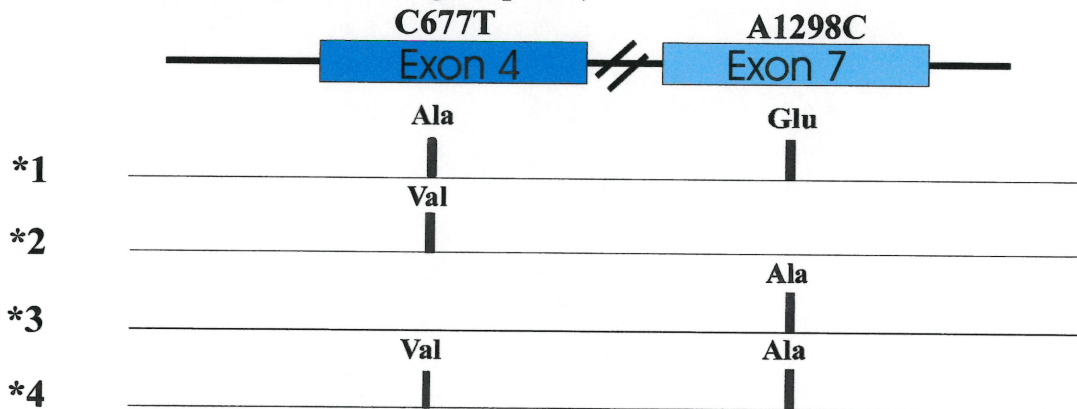


Figure 1. TPMT and MTHFR 4 different alleles.

TPMT*1 allele (Wild Type allele) is characterized by the absence of polymorphism; 3*A is defined by the presence of G460A and A719G in linkage disequilibrium; *3B and *3C are associated with polymorphisms G460A and A719G, respectively.

MTHFR*1 allele (Wild Type allele) is characterized by the absence of polymorphism; *2 is defined by the presence of C677T; *3 is defined by the presence of A1298C; *4 is associated with polymorphisms C677T and A1298C.

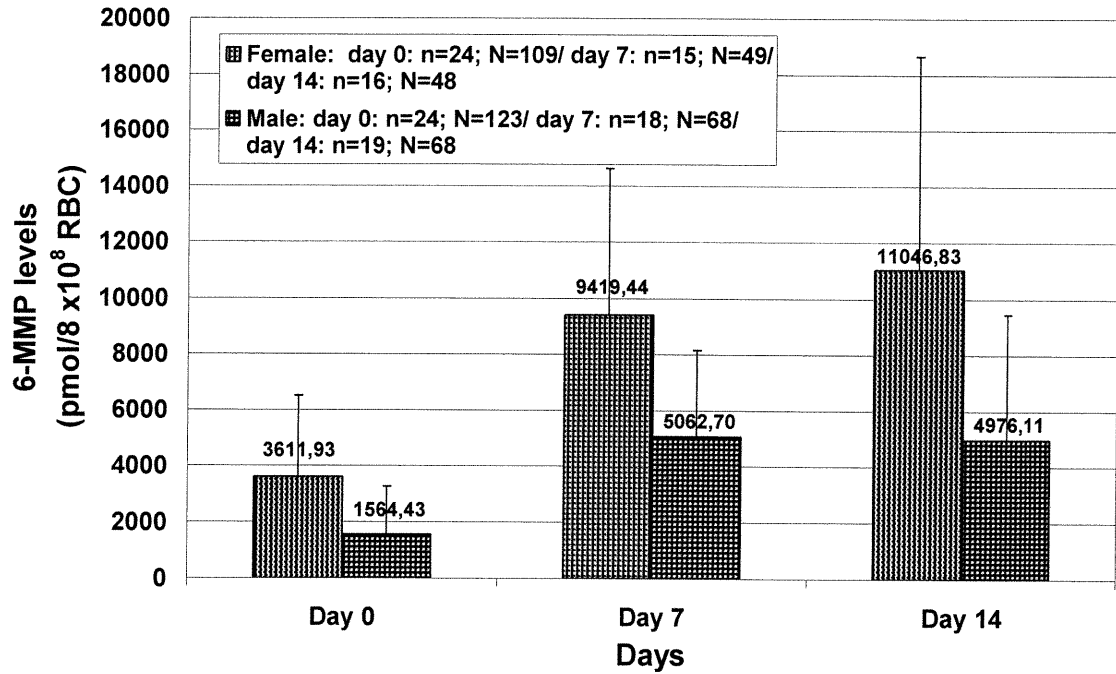


Figure 2. Median red blood cells 6-MMP levels on days 0, 7 and 14 of treatment cycle in female and male patients. n=number of patients; N=number of samples

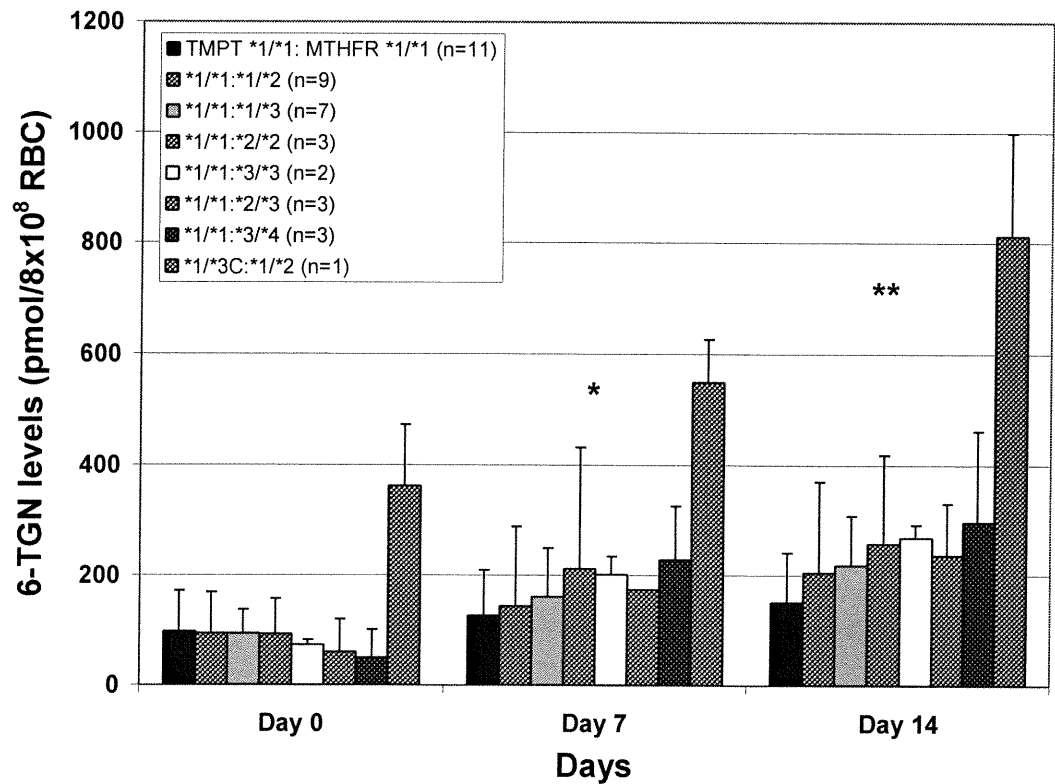


Figure 3. Median red blood cells 6-TGN levels on days 0, 7 and 14 of treatment cycle in patients with defined TPMT and MTHFR genotypes.

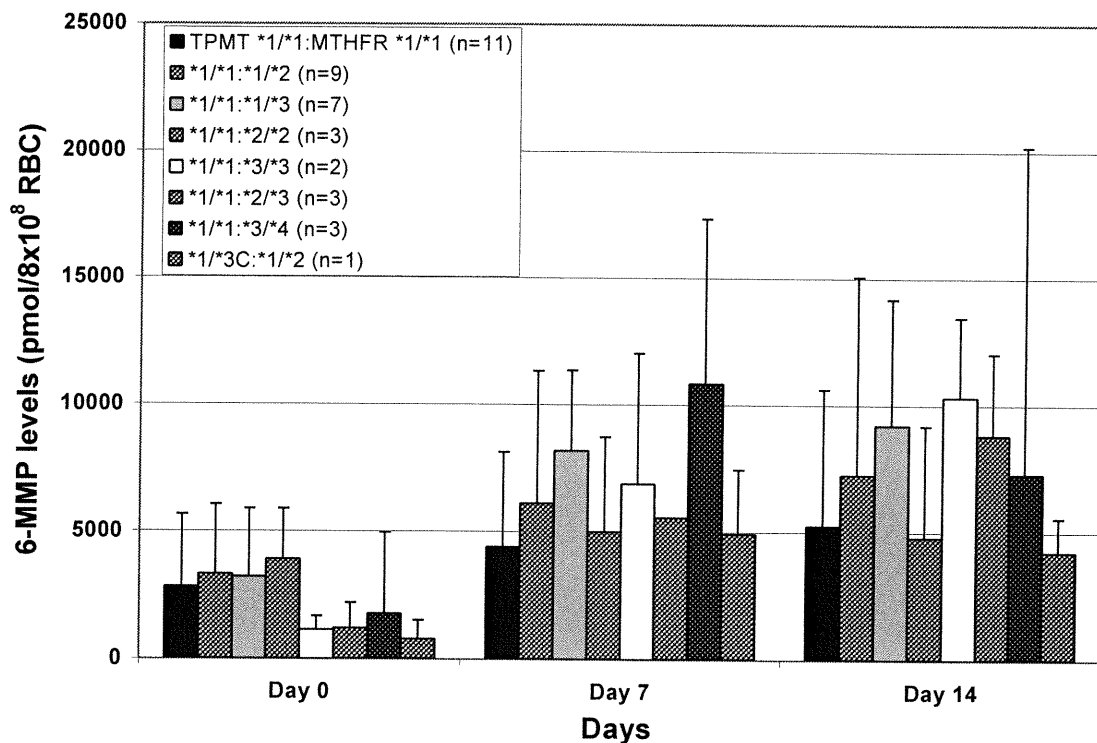


Figure 4. Median red blood cells 6-MMP levels on days 0, 7 and 14 of treatment cycle in patients with defined TPMT and MTHFR genotypes.

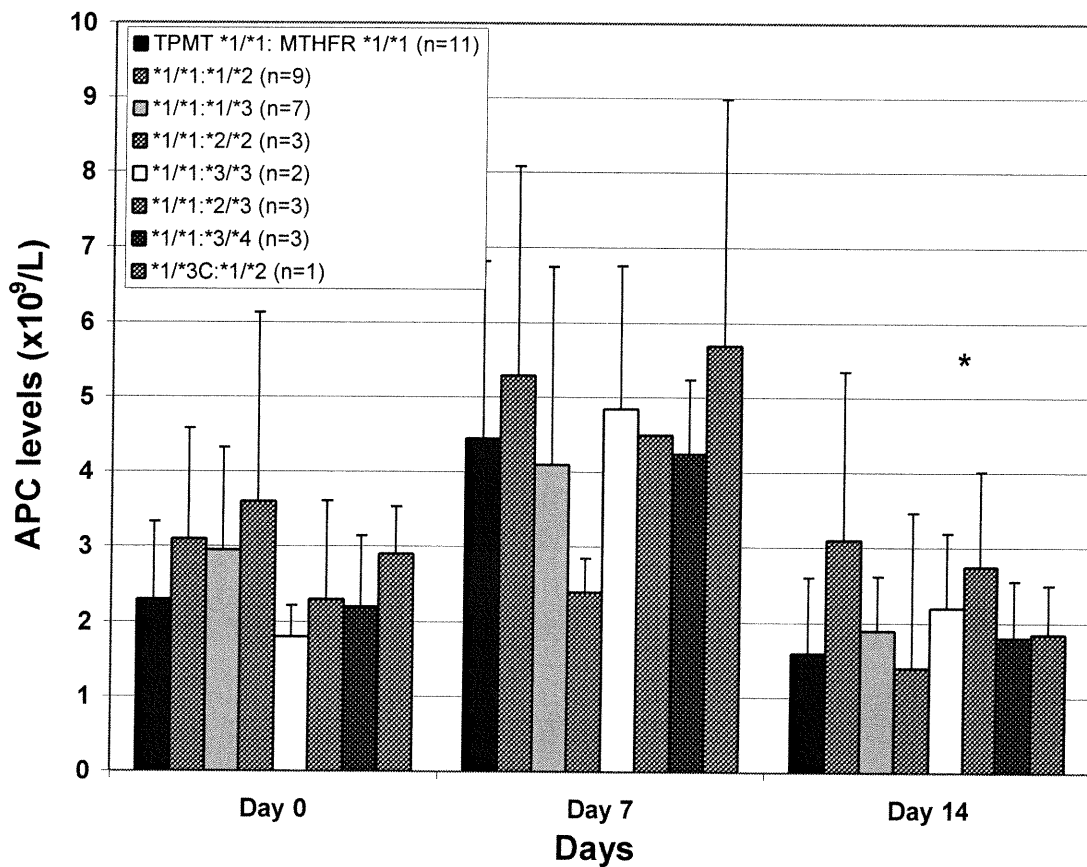


Figure 5. Median red blood cells APC levels on days 0, 7 and 14 of treatment cycle in patients with defined TPMT and MTHFR genotypes.

Table I TPMT and MTHFR variant PCR and ASO characteristics.

Locus	Variant	PCR primer	Annealing T° (°C)	Fragment size (bp)	ASO primer	Washing T° (°C)
TPMT	G460A	Fo 5'ATAACAGAGTGGGAGGCTGC3'	60	299	WT 5'AGAGGAGCATTAGTT3'	37
	Ala154Thr	Re 5'TTACCATTGCGATCACCT3'			MUT 5'AGAGGAACATTAGTT3'	
	A719G	Fo 5'GAGAAAGTTGATGCTTTTG3'	52	168	WT-5'GAAAAAGTTATATCTAC3'	45
MTHFR	Tyr240Cys	Re 5'TCCATTACATTTTCAGGCT3'			MUT-5'GAAAAGTTATGCTCTAC3'	
	C677T	Fo 5'TGAAGGAGAAGTGTGCGGGA3'	60	198	WT 5'GGGAGCCGATTTTCAT3'	44
	Ala222Val	Re 5'AGGACGGTCCGGTCAGAGTG3'			MUT 5'ATGAAAATCGACTCCCC3'	
	A1298C	Fo 5'CTTTGGGAGCTGAAGGACTACTAC3'	51	163	WT-5'GACCAGTGAAGAAAG3'	Wt 52
	Glu429Ala	Re 5'CACITTTGTGACCATTCCGGTTTG3'			MUT-5'GACCAGTGAAGCAAG3'	Mut 42

Table II Frequency genotype of TPMT and MTHFR alleles.

Locus	Patient (n=50)	Genotype frequency (%)
TPMT		
	*1/*1	49/50
	*1/*3C	1/50
MTHFR	(n=38)	2
	*1/*1	11/38
	*1/Mut	16/38
	*1/*2	9/38
	*1/*3	7/38
	Mut/Mut	11/38
Mut/Mut	*2/*2	3/38
	*3/*3	2/38
	*2/*3	3/38
	*3/*4	3/38

Table III Variations in 6-TGN, 6-MMP and APC during the treatment cycle of childhood acute lymphoblastic leukemia.

Day of the treatment cycle	Patients (n)	# of samples analyzed	Median level of 6-TGN (pmol/8x10 ⁸ RBC)	Median level of 6-MMP (pmol/8x10 ⁸ RBC)	Median level of APC (x10 ⁹ /L)
0	48	232	94.21 (0-504.80)	2413.39 (0-14416.02)	2.4 (0.7-10)
7	33	117	171.06 (0-667.76)	6258.83 (0-26803.81)	3.9 (0.2-13)
14	35	116	237.99 (0-667.59)	7078.83 (0-32018.78)	1.8 (0.3-11)

Average of 4.8, 3.5 and 3.3 analyzed for each patient during the treatment on day 0, 7 and 14 respectively.

Chapitre 3 : Discussion

Depuis plusieurs années, les thiopurines telles que la 6-MP, l'AZA et la 6-TG sont utilisées notamment dans le traitement des LLA et des MII. Toutefois, le mécanisme d'action de ces substances demeure relativement imprécis, et ce même après plusieurs décennies de recherche. Ainsi, initialement l'effet de ces médicaments a été attribué à une incorporation des nucléotides de la thioguanine dans l'ADN et l'ARN qui, par interférence avec le fonctionnement cellulaire, entraînerait la cytotoxicité. Par la suite, il a été démontré que certains métabolites des thiopurines pouvaient interférer avec la synthèse *de novo* des purines. Une altération du fonctionnement cellulaire basée sur une modification de la structure tridimensionnelle de l'ADN, suite à l'incorporation d'un analogue thiopurique, a également été mis de l'avant par certains. Finalement, les études les plus récentes ont mis en évidence le rôle des enzymes de réparation et du processus apoptotique comme déterminants de la réponse cellulaire.

Outre cette incertitude en regard du mécanisme d'action des thiopurines, les relations qui peuvent exister entre la concentration biologique d'une thiopurine et/ou de ses métabolites et la réponse thérapeutique ou toxique ont fait et continuent de faire l'objet d'études controversées. Le premier élément de controverse a sans doute trait à l'utilisation initiale des concentrations plasmatiques de la substance mère afin d'évaluer ces relations. Le manque d'applicabilité de cette approche tient surtout à la faible biodisponibilité du médicament de même qu'à la grande variabilité intra- et inter-individuelle des concentrations plasmatiques et au faible rôle prédictif du compartiment plasmatique (Innocenti *et al.* 2000). Depuis plus d'une dizaine d'années, la mesure des concentrations cellulaires (intraleucocytaires mais surtout intraérythrocytaires) des métabolites des thiopurines a permis d'établir certaines corrélations en regard de l'efficacité et de la toxicité des thiopurines. Par ailleurs, même si elle est moins importante que celle observée dans le plasma, une certaine variabilité intra- et inter-individuelle persiste au niveau des concentrations cellulaires et, conséquemment, au niveau de la réponse clinique. Le premier élément pouvant expliquer cette variabilité se doit d'être le respect de la posologie par l'enfant (ou des parents) ou par l'adolescent(e) en regard de la prise régulière du médicament. Contrairement aux concentrations du compartiment plasmatique qui peuvent être facilement faussées par la prise d'une seule dose de thiopurine, celles du compartiment cellulaire agissent comme « mémoire » et reflètent le respect de la posologie aux thiopurines dans les jours qui précèdent la

mesure. Le deuxième élément se rapporte à l'intervalle qui existe entre le début de la prise du médicament et la mesure. Une période de plusieurs jours sinon de plusieurs semaines semble être requise pour atteindre une certaine stabilité dans les niveaux intraérythrocytaires des métabolites. Le troisième élément, et sans doute le plus important, touche aux différences qui existent dans l'activité des protéines impliquées directement ou indirectement dans le métabolisme ou l'action (ex., protéines de réparation qui ne font pas l'objet du présent mémoire) des thiopurines.

Malgré l'importance de la xanthine oxidase en regard de la biodisponibilité des thiopurines, la TPMT est l'enzyme la plus étudiée pour cette classe de médicament et celle dont l'activité semble avoir, à ce jour, le plus d'impact sur la réponse thérapeutique. Ainsi lors de l'administration de 6-MP ou d'AZA, chez un individu dont l'activité de la TPMT est constitutivement (polymorphisme génétique) faible ou nulle, la production de métabolites méthylés (6-MMP), que ceux-ci soient sous forme de thiobases, de thionucléosides ou de thionucléotides (voir figure 4 de l'introduction), sera aussi faible ou nulle. Cela pourrait, par conséquent, favoriser une production plus importante des 6-TGN et un risque plus élevé de myélosuppression. De la même manière, une activité constitutive élevée de la TPMT pourrait être associée à une production moins importante des 6-TGN et possiblement à un échec thérapeutique. L'activité de la TPMT dans les érythrocytes peut être évaluée précisément par une méthode radiochimique ou chromatographique. Il importe cependant de réaliser que cette mesure reflète l'activité qui prévaut au moment du prélèvement et non une valeur stable. L'activité de la TPMT pouvant également être induite, une administration prolongée ou une augmentation de la dose (ou de la biodisponibilité) de la 6-MP ou de l'AZA pourra se traduire par une augmentation de l'activité de la TPMT et, consécutivement, pourra favoriser la production de métabolites méthylés au profit des 6-TGN. Par la même analogie, un arrêt de l'administration des thiopurines ou une réduction de leur dosage favorisera un retour de l'activité de la TPMT à une valeur de "base". Même si le génotypage de la TPMT utilisé dans le présent mémoire ne permet de prédire qu'environ 80% des individus ayant une activité réduite de l'enzyme, cette approche est informative et indépendante du métabolisme et des conditions physiologiques de l'individu.

Les voies de métabolisation des thiopurines interagissent constamment avec d'autres voies de biosynthèse qui peuvent elles-mêmes être associées à des polymorphismes génétiques fonctionnels. Nous avons donc étudié deux polymorphismes de la MTHFR. Une modification de l'activité de la MTHFR peut entraîner une altération des équilibres d'interconversion entre les différents dérivés tétrahydrofolates qui jouent le rôle de cofacteurs donneurs de groupes monocarbonés dans de nombreuses réactions. Plus spécifiquement, une activité déficiente de la MTHFR pourrait conduire à une baisse en apport des groupements requis pour les réactions de méthylation catalysées par les diverses méthyltransférases notamment la TPMT. Cette déficience pourrait ne pas être apparente chez un individu sain prenant une dose « standard » de thiopurine, mais pourrait être révélée chez un individu ayant une physiopathologie donnée (ex. modification de l'absorption intestinale de certains cofacteurs enzymatiques par la maladie) ou (et) une médication (ex. réduction de l'apport en tétrahydrofolate par le MTX) qui impose(nt) une charge fonctionnelle additionnelle à la MTHFR.

Les résultats présentés dans le présent mémoire sont novateurs sous plusieurs aspects et se résument dans les trois énoncés suivants:

- 1) Le génotype de la TPMT et de la MTHFR, de même que l'âge et le sexe des enfants avec une LLA ou une MII affectent les niveaux intraérythrocytaires des métabolites des thiopurines.
- 2) Il existe une relation entre les niveaux des métabolites des thiopurines et l'efficacité thérapeutique; Cette relation n'est toutefois pas liée à une variable hématologique.
- 3) La mesure des métabolites des thiopurines peut prévenir l'apparition de certaines formes de toxicité propres à cette classe de médicament.

Les paragraphes suivants sont consacrés à la discussion de ces énoncés en intégrant l'ensemble des résultats qui ont été présentés sous forme d'articles. Cette discussion fait également ressortir les divergences et est en quelques occasions rehaussée de résultats ou d'observations autres que ceux ou celles rapportés(es) dans les articles du présent mémoire.

Effet des polymorphismes fonctionnels dans les gènes TPMT et MTHFR sur le métabolisme des thiopurines

Fréquence mutationnelle

Avant de déterminer l'effet des variants d'ADN sur le niveau des métabolites des thiopurines, il est apparu important de déterminer si leur fréquence chez les patients avec une LLA ou une MII était la même que celle qui est observée chez des individus sains. Les fréquences que nous avons obtenues chez les patients atteints d'une LLA pour les divers génotypes de la TPMT (98% homozygotes sauvages et 2% hétérozygotes) sont légèrement différentes de celles qui sont rapportées dans la littérature (Weinshilbom et Sladek 1980; Weisberg *et al.* 1998) et ce, probablement à cause du faible nombre de patients étudiés dans notre étude. Chez les patients atteints d'une MII, la fréquence des divers génotypes de la TPMT (92,1% homozygotes sauvages et 7,9% hétérozygotes) est similaire aux fréquences rapportées dans la littérature. Nous n'avons pas trouvé de patient homozygote mutant pour la TPMT dans nos groupes de patients, ceci étant probablement dû au faible nombre de patients étudiés (environ 1 individu sur 300 est homozygote mutant pour la TPMT). Les fréquences mutationnelles notées chez les patients avec une MII ou une LLA ne diffèrent donc pas significativement de celles observées chez des individus sains.

La distribution du génotype pour la MTHFR semble par ailleurs différer entre les individus sains et les patients avec une MII ou une LLA (Tableau VIII). Ainsi, il y a une plus grande proportion d'individus avec un génotype sauvage chez les patients ayant une LLA que dans une population d'individus sains. Des différences existent également au niveau d'autres génotypes entre ces deux groupes, mais uniquement chez les personnes de sexe féminin. Aucune analyse statistique comparative n'a été effectuée à ce jour, parce que trop peu de patients avec une MII ont été génotypés. Toutefois, les zones ombragées dans le tableau VIII suggèrent que certains génotypes de la MTHFR se distinguent de ceux observés chez les individus sains ou les patients ayant une LLA. À titre d'exemple, la fréquence du génotype 2/3 chez les patients ayant une MII est environ deux fois plus grande que celle observée chez les patients leucémiques ou les individus

sains. La présence de variants sur le gène de la MTHFR étant associée à une modification de l'activité enzymatique (i.e. polymorphisme fonctionnel), ces observations font ressortir non seulement l'existence d'une interférence potentielle dans l'action des médicaments en fonction de la maladie, mais également le rôle possible de ces variants dans l'étiologie de ces maladies.

Tableau VIII **Distribution des génotypes de MTHFR en fonction du sexe chez les patients avec une MII ou une LLA et chez un groupe d'individus sains.**

Génotype de la MTHFR	LLA		MII		Sains	
	F	M	F	M	F	M
	(N=91)	(N=119)	(N=33)	(N=33)	(N=159)	(N=161)
1/1	21 (23%) ^a	28 (23.5%) ^b	3 (9.1%)	4 (12.1%)	18 (11.3%) ^a	15 (9.3%) ^b
2/2	5 (5.5%) ^{c,d}	15 (12.6%) ^d	2 (6.1%)	1 (3.1%)	23 (14.5%) ^c	24 (14.9%)
3/3	4 (4.4%) ^e	13 (10.9%)	4 (12.1%)	0 (0%)	19 (12%) ^c	24 (14.9%)
4/4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
1/2	23 (25.3%)	23 (19.3)	6 (18.2%)	3 (9.1%)	38 (23.9)	33 (20,5%)
1/3	17 (18.7%)	19 (16%)	8 (24.2%)	14 (42.4%)	29 (18.2%)	29 (18%)
2/3	16 (17.6%)	16 (13.5%)	10 (30.3%)	11 (33.3%)	26 (16.3%)	30 (18.7%)
2/4	0 (0%)	1 (0.8%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (1.3%)	0 (0%)
3/4	5 (5.5%)	4 (3.4%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (2.5%)	6 (3.7%)

F: sexe féminin; M: sexe masculin

a: p=0,018; b: p=0,001; c: p=0,036; d: p=0,099; e: p=0,067

Niveau des métabolites

Tel qu'attendu, les niveaux intraérythrocytaires des 6-TGN étaient plus élevés chez les patients hétérozygotes pour la TPMT que chez les homozygotes sauvages pour cette même enzyme. Les niveaux de 6-MMP étaient, quant à eux, plus faibles chez les patients hétérozygotes que chez les homozygotes sauvages. Les données présentées dans ce mémoire sont les premières à être obtenues chez les patients avec une MII. Même si les résultats observés chez les patients avec une LLA vont dans la même direction en

regard des variants de la TPMT, ils ont une portée limitée car ils ont été obtenus à partir de plusieurs mesures effectuées chez le seul patient hétérozygote (à la position 719) du groupe. Les niveaux médians de 6-MMP chez ce patient étaient équivalents sinon plus faibles que ceux observés chez les autres patients. Ces résultats ne sont pas surprenants compte tenu d'une diminution de l'activité enzymatique chez les patients hétérozygotes (Lennard 1992). Cet état de fait peut s'expliquer à deux niveaux. Dans un premier temps, la diminution de l'activité de la TPMT intestinale pourrait se traduire par une augmentation de la biodisponibilité de la 6-MP et donc en de plus fortes concentrations dans le plasma et, par la suite, dans les globules rouges. L'enzyme HPRT n'étant pas, selon toute vraisemblance, une étape limitante dans la biotransformation intracellulaire des thiopurines, cette augmentation en 6-MP devrait se traduire par une élévation du niveau de 6-TIMP. Cette dernière substance étant biotransformée par l'IMPDH en 6-thioxanthosine 5'-monophosphate (6-TX) ou par la TPMT en 6-méthylthioinosine 5'-monophosphate (6-MTIMP), une déficience en TPMT favorisera la formation du 6-TX au détriment du 6-MTIMP. Même si la réaction catalysée par l'IMPDH apparaît être une étape limitante dans la biotransformation de la 6-MP en 6-TGN, les aspects cinétiques de la réaction devrait permettre une augmentation dans la formation du 6-TX et, finalement, des 6-TGN. L'activité de la TPMT dans les globules rouges étant en corrélation avec celle dans les lymphocytes et les lymphoblastes, il devrait également y avoir concordance dans la formation des métabolites. Le groupe de recherche à l'Hôpital Sainte-Justine a établi une corrélation entre les niveaux des 6-TGN dans les érythrocytes et ceux dans l'ADN des cellules leucocytaires (Cuffari *et al.* 1996a).

Outre l'effet du génotype de la TPMT, l'influence d'une mutation au niveau du gène de la MTHFR sur les métabolites intraérythrocytaires des thiopurines a également été examinée chez les patients avec une LLA et une MII. Toutefois, n'ayant trouvé qu'un seul patient leucémique hétérozygote pour la TPMT, l'influence du génotype de la MTHFR n'a été examinée que chez les patients homozygotes sauvages pour la TPMT. Les patients leucémiques porteurs d'au moins un polymorphisme de l'enzyme MTHFR ont, aux jours 7 et 14 des cycles de traitement, des niveaux des 6-TGN plus élevés que ceux qui ne portent aucun polymorphisme. Toutefois, il n'existait aucune différence dans les niveaux de 6-MMP entre les patients MTHFR sauvages et les patients porteurs d'au moins un polymorphisme sur l'enzyme MTHFR. Une augmentation des niveaux

des 6-TGN et de 6-MMP a également été observée du jour 0 au jour 14 du cycle chez les patients qui portaient ou non un variant au niveau du gène de la MTHFR. Tel qu'attendu, le niveau de ces métabolites diminue jusqu'au début du cycle suivant. Comme aucune différence n'est observée entre ces patients au jour 0, cela suggère que la demi-vie intraérythrocytaire des 6-TGN est plus courte chez les patients ayant au moins un codon polymorphique dans le gène de la MTHFR. Cette différence est plus évidente chez les homozygotes mutants car ils présentent des niveaux de 6-TGN et 6-MMP plus faibles que ceux qui ont été notés chez les patients homozygotes sauvages ou hétérozygotes pour la MTHFR. Dans le cadre de cette discussion, il importe de relever les résultats obtenus chez le patient hétérozygote pour la TPMT car il est également hétérozygote à la position 677 de la MTHFR. Ce patient a des niveaux médians (obtenus suite à 5 cycles de traitement) des 6-TGN supérieurs et de 6-MMP équivalents ou inférieurs à ceux qui ont été observés chez les autres patients groupés en fonction de leur génotype. Une tendance similaire à celle observée chez les patients avec une LLA, en regard de l'effet d'un variant du gène de la MTHFR, semble se dégager des données préliminaires obtenues chez les patients avec une MII (Tableau IX). Ainsi, les patients homozygotes mutants pour la MTHFR ont des niveaux médians des 6-TGN dans les globules rouges environ 60% plus élevés que ceux qui ont été observés chez les individus hétérozygotes ou homozygotes sauvages pour cette enzyme. Tout comme chez les patients avec une LLA, les niveaux de 6-MMP chez les patients avec une MII ne semblent pas être affectés par la présence de variants de la MTHFR.

Le mécanisme par lequel une variation d'activité de la MTHFR affecte le métabolisme des thiopurines est incertain et pourrait se situer à plusieurs niveaux car cette enzyme est au cœur du cycle des méthyles (Figure 8). Chez l'humain, le tétrahydrofolate est le transporteur d'unités monocarbonés, il importe donc de connaître les équilibres d'interconversion qui conduisent à la formation des différents dérivés qui sont impliqués dans de nombreuses réactions. La sérine transhydroxyméthylase catalyse l'insertion du carbone de la sérine (au niveau de l'oxydation de la formaldéhyde) entre le N-5 et le N-10 du tétrahydrofolate pour former le N⁵,N¹⁰-méthylène tétrahydrofolate. Ce dernier dérivé est réduit (par la brisure du pont en N-10) par la MTHFR en N⁵-méthyle tétrahydrofolate. Le N⁵,N¹⁰-méthylène tétrahydrofolate peut être oxydé en N⁵,N¹⁰-méthényle tétrahydrofolate, un dérivé donneur du C-8 dans la synthèse des purines, et

par la suite être hydrolysé en N¹⁰-formyle tétrahydrofolate, un dérivé donneur du C-2 dans la synthèse des purines. Le N⁵,N¹⁰-méthylène tétrahydrofolate sert également au transfert d'un méthyle sur la désoxyuridine 5-phosphate pour former la thymine et libérer le dihydrofolate. Il importe de réaliser que ces réactions sont spécifiques et que pour la majorité des réactions biochimiques qui nécessitent un apport de méthyles (ex., méthyltransférases) ces derniers proviennent du cycle des méthyles activés ou plus précisément de la S-adénosyle-L-méthionine. Lors du transfert du méthyle, la S-adénosyle-L-homocystéine est formée et elle est par la suite hydrolysée en homocystéine. La méthionine requise pour la production par la méthionine adénosyle transférase de la S-adénosyle-L-méthionine peut être régénérée par le transfert d'un méthyle du N⁵-méthyle tétrahydrofolate à l'homocystéine, dans une réaction catalysée par l'homocystéine méthyltransférase.

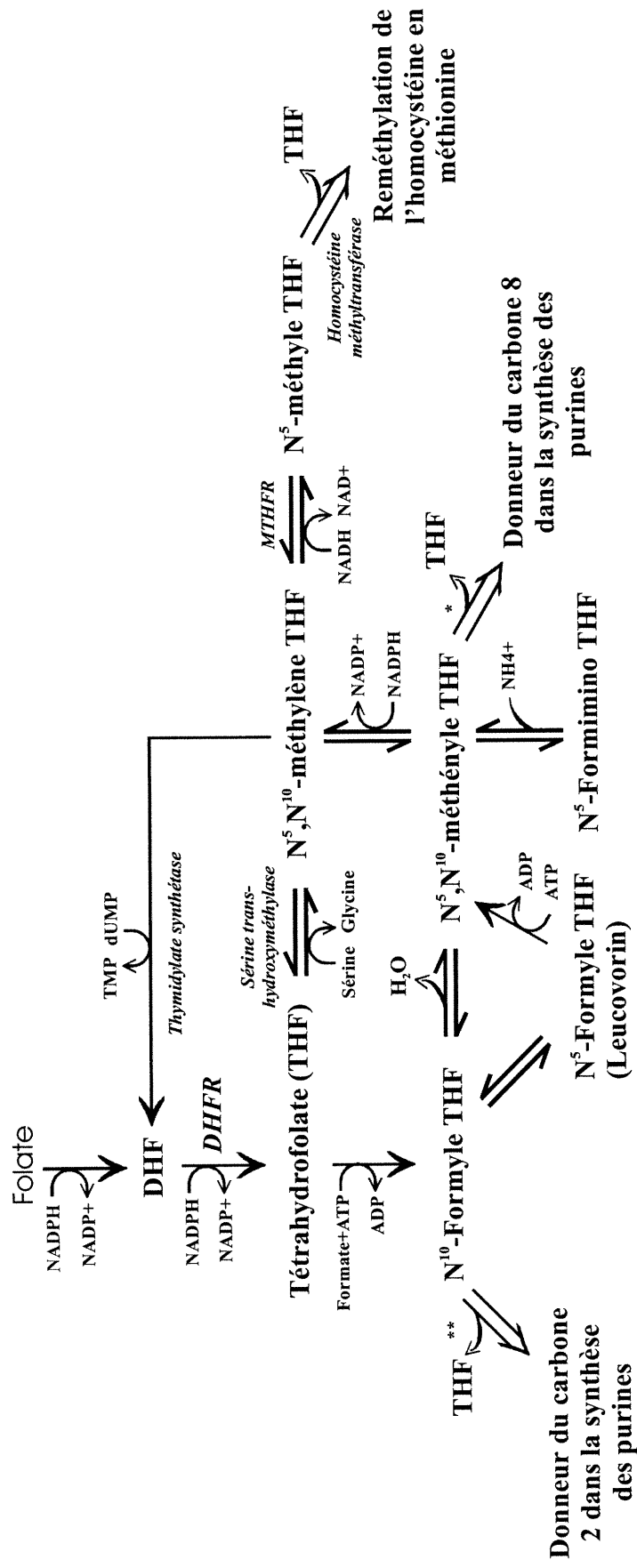
Les variants observés dans le présent mémoire au niveau du gène de la MTHFR sont associés à une baisse de l'activité enzymatique (Weisberg *et al.* 1998). Il est donc probable qu'ils altèrent l'équilibre d'interconversion des dérivés tétrahydrofolates. Si tel qu'attendu, il y a une réduction dans la formation du N⁵-méthyle tétrahydrofolate, ceci pourrait se traduire par une réduction dans la formation du S-adénosyle-L-méthionine et, conséquemment, par une moins bonne disponibilité de méthyles pour des méthyltransférases telles que la TPMT. Le présent mémoire supporte l'hypothèse d'un déplacement du métabolisme des thiopurines en faveur de la formation des nucléotides de la thioguanine chez les patients ayant un polymorphisme dans le gène de la MTHFR. Cette augmentation des 6-TGN pourrait provenir à la fois d'une plus grande biodisponibilité de la 6-MP (plus faible méthylation de premier passage) et d'une méthylation réduite du 6-TIMP au profit de l'IMPDH. Il est possible que l'augmentation des concentrations des 6-TGN puisse se produire sans réduction apparente de celle des métabolites méthylés, car les concentrations intraérythrocytaires de ces derniers sont au moins 20 à 32 fois supérieures à celles des 6-TGN (ratio moyen 6-MMP/6-TGN) et très variables. Il est également peu probable que l'effet inhibiteur des métabolites méthylés des thiopurines sur la glutamine-phosphoribosyle amidotransférase soit modifié par un variant dans le gène de la MTHFR. Comme il n'existe pas de données dans la littérature sur l'impact d'un polymorphisme du gène de la MTHFR sur le niveau du N⁵,N¹⁰-méthylène tétrahydrofolate ni sur ceux des autres dérivés, il est difficile de spéculer sur

l'impact qu'une augmentation du N⁵,N¹⁰-méthényle tétrahydrofolate et du N¹⁰-formyle tétrahydrofolate aurait sur la synthèse *de novo* des purines, sur leur voie de récupération ainsi que sur le métabolisme des thiopurines. L'utilisation du MTX chez les patients avec une LLA et la présence du gène MTHFR muté ajoute à la « pression » exercée sur le cycle des méthyles. Le MTX et ses dérivés polyglutamatés inhibent la DHFR qui est responsable de la réduction du dihydrofolate en tétrahydrofolate. La diminution du pool des coenzymes tétrahydrofolate entraîne une inhibition de la synthèse des bases puriques par interférence avec les réactions enzymatiques nécessaires à l'introduction des carbones 2 et 8 du cycle des purines et de la méthionine (inhibition amplifiée chez les patients avec une activité réduite de la MTHFR). L'inhibition de la xanthine oxidase couplée à une méthylation réduite (telle que décrite plus haut) favorisera la formation des 6-TGN. Cette dernière pourrait également être favorisée par une inhibition de la synthèse des purines ce qui entraînerait une augmentation de la voie de récupération des purines incluant les thiopurines. Même s'il est rare que les patients avec une MII prennent simultanément de la 6-MP et du MTX, d'autres facteurs pourraient prédisposer ces patients à un effet similaire à celui observé chez les patients avec une LLA. Ainsi, l'augmentation de l'homocystéine plasmatique observée chez les patients avec une MII semble être associée à de plus faibles niveaux d'acide folique et de vitamine B12. Une déficience en acide folique favorise une diminution de l'apport en carbones pour la synthèse *de novo* des purines ainsi qu'une diminution de la reméthylation de l'homocystéine en méthionine comme pour un déficit en vitamine B12. Ceci favorisera une diminution de la formation des métabolites méthylés par la TPMT et une augmentation de la formation des 6-TGN. Ces déficiences peuvent être causées par plusieurs facteurs dont un apport nutritif inadéquat, une malabsorption d'origine médicamenteuse ou des besoins excessifs en nutriments dus à l'inflammation.

TPMT	MTHFR	Ratio sexes (garçons/ filles)	Valeurs *	N	Niveaux de 6-TGN dans les GR (pmol/8x10 ⁸ GR)			Niveaux de 6-MMP dans les GR (pmol/8x10 ⁸ GR)			Ratio 6MMP/6-TGN		
					médiane	moyenne	écart des moyennes	médiane	moyenne	écart des moyennes	médiane	moyenne	écart des moyennes
1/1	1/1	3/3	B	33	213	255	36-616	4324	4603	410-12050	14.0	22.6	3.2-91
			M	6	183	228	128-435	4110	3659	534-6607	11.4	18.3	3.8-42
1/1	1/2	1/5	B	16	179	208	76-435	2142	5089	36-32858	10.4	24.6	0.1-127
			M	6	164	171	76-261	3372	4114	283-9451	21.3	23.5	3.7-49.3
1/1	1/3	14/8	B	63	189	214	71-793	1731	3572	121-21653	7.5	20.6	0.9-170
			M	22	203	239	87-793	2543	3768	373-11651	9.0	21.5	1.7-134
1/1	2/3	11/8	B	71	210	229	34-535	2683	5294	103-25879	13.1	22.7	1.2-117
			M	19	228	225	81-349	2707	4384	502-11561	14.6	19.0	4-50
1/1	2/2	1/1	B	9	291	331	221-571	3388	4229	999-8806	5.8	12.6	3.4-22.6
			M	2	336	336	289-384	4437	4437	2568-6305	9.8	13	9.8-16.2
1/1	3/3	0/4	B	8	287	290	78-521	3613	5625	2673-12849	18.2	31.2	7.2-123
			M	4	299	299	78-521	4656	5702	2673-10825	34.1	27.6	7.2-34.9
1/3A, 1/3B, 1/3C	1/1,1/2, 1/3,2/3, 2/2	3/4	B	21	525	569	247-1203	790	1447	118-6315	1.9	2.3	0.2-8.5
			M	7	603	531	247-757	640	1411	503-4714	2	2.4	0.9-6.3

*Des valeurs provenant de plusieurs échantillons étaient disponibles pour un même patient, nous avons donc utilisé les données brutes (B) (tous les échantillons inclus) ou la valeur moyenne pour chaque patient (M) (i.e., médiane, moyenne ou écart des moyennes).
N=nombre d'échantillons

Tableau IX Niveaux des métabolites de la 6-MP chez les patients avec une MII en fonction des variants de MTHFR.



* *phosphoribosylglycinamide formyltransferase*

** *phosphoribosylaminoimidazole carboxamide formyltransferase*

DHF: dihydrofolate

TMP: thymidine monophosphate

dUMP: désoxyuridine monophosphate

NAD: nicotinamide adénine dinucléotide

NADP: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NADH: dihydronicotinamide adénine dinucléotide

NADPH: dihydronicotinamide adénine dinucléotide phosphate

Figure 8 Cycle d'activation des méthyles.

Effet du sexe et de l'âge sur le métabolisme des thiopurines

Le métabolisme des thiopurines a également été analysé en fonction de différences qui pouvaient exister entre les garçons et les filles ainsi qu'en fonction de leur âge. Chez les patients atteints d'une MII, aucune différence n'a été observée entre les concentrations des 6-TGN chez les filles et les garçons. Afin de vérifier s'il n'y avait pas de différences dans les concentrations en fonction de l'âge, les deux groupes ont été stratifiés selon un âge prédit de puberté (12 ans pour les filles et 14 ans pour les garçons). Cette stratification ne montrait aucune différence significative dans les concentrations médianes des 6-TGN entre les filles et les garçons pré-pubères ou post-pubères. Chez les patients avec une LLA, il n'existe aucune différence entre les garçons et les filles en ce qui a trait aux concentrations moyennes des 6-TGN et des comptes absolus en polymorphonucléaires (CAP) et ce, au début (6-TGN: 110 vs 112 pmol/8x10⁸ GR; CAP: 2.73 vs 2.72 x10⁹/l), au milieu (6-TGN: 208 vs 196; CAP: 4.18 vs 4.42) et à la fin (6-TGN: 275 vs 246; CAP: 2.14 vs 2.21) des cycles de traitement. Cette absence de différence significative dans les concentrations des 6-TGN entre les garçons et les filles (275 vs. 325) avait également été notée dans une étude de Lilleyman et Lennard (1994). Toutefois, les filles montraient une tendance à avoir des concentrations des 6-TGN plus élevées que les garçons. Cette tendance se trouve renforcée par le fait que, par opposition aux résultats rapportés dans ce mémoire, Lilleyman et Lennard ont observé que les filles avec LLA manifestaient une cytopénie plus longue que les garçons avec LLA.

Les concentrations de 6-MMP étaient différentes entre les garçons et les filles avec une MII et ce, autant chez les patients homozygotes sauvages que chez les hétérozygotes. Après avoir stratifié les groupes en fonction de l'âge, les garçons post-pubères présentaient des concentrations de 6-MMP inférieures à celles retrouvées chez les filles pré- et post-pubères ainsi que chez les garçons pré-pubères. Chez les patients leucémiques, les concentrations de 6-MMP étaient plus faibles chez les garçons que chez les filles et ce, indépendamment de l'âge. Il faut toutefois souligner que les enfants leucémiques différaient des enfants avec une MII en ayant un âge moyen plus petit, un

mode d'administration cyclique de la 6-MP basé sur la surface corporelle et la possibilité d'interactions médicamenteuses, notamment avec un antifolate comme le MTX.

Certaines données expérimentales rapportées dans la littérature contredisent toutefois nos observations. Ainsi, Woodson *et al.* (1981) ont montré que les rats mâles possèdent une activité rénale basale de la TPMT, plus élevée que les femelles. Ils ont aussi établi qu'une hypophysectomie ou une castration entraîne une diminution de l'activité de la TPMT chez les rats mâles mais pas chez les rats femelles. De plus, la testostérone augmente l'activité rénale de la TPMT chez les rats normaux sans égard au sexe ainsi que chez les rats mâles castrés. Il est donc logique de postuler que l'activité de la TPMT dans divers organes tels que le rein, le foie et l'intestin soit plus élevée chez les patients mâles post-pubères. Sur la base de ce postulat, il est également raisonnable de penser que les quantités de 6-MP qui vont atteindre les globules rouges, et conséquemment, les concentrations des métabolites qui seront formées seront diminuées. Tout comme une augmentation de la quantité de 6-MP dans les globules rouges se traduit par une augmentation préférentielle dans la formation de 6-MMP, il est possible qu'une diminution de la quantité de 6-MP dans les globules rouges se manifeste par une diminution sélective dans la synthèse de 6-MMP. La formation des 6-TGN peut être limitée par une activité enzymatique saturable de l'IMPDH bien qu'il soit improbable que cette voie enzymatique soit saturée par la prise quotidienne d'une dose orale de 6-MP ou d'AZA. La diminution préférentielle des métabolites du 6-MMP est probablement reliée à une baisse du niveau d'induction de la TPMT en présence d'une plus faible quantité de substrat. Ce raisonnement doit cependant être interprété avec circonspection. Ainsi, il y a lieu de se questionner sur l'impact qu'une différence de 10-15% dans l'activité de la TPMT (telle que rapportée dans la littérature) aura sur le métabolisme des thiopurines. De plus, certaines études ont montré qu'il n'y avait pas de différence dans l'activité de la TPMT entre les sexes chez des individus pré-pubères ou post-pubères. Finalement, le rôle de la testostérone est difficilement conciliable avec les résultats observés dans la présent mémoire chez les patients avec une LLA. Les garçons leucémiques ont des concentrations de 6-MMP environ deux fois plus faibles que les filles leucémiques, et ce même si tous les enfants inclus dans l'étude étaient largement d'âge pré-pubère. Cette différence entre les garçons et les filles avec une LLA a déjà été rapportée dans la littérature en regard d'autres paramètres. Le risque de rechute

leucémique était plus important chez les garçons que chez les filles et les garçons avec une LLA semblaient tolérer, sans développer de cytotoxicité, des doses plus élevées de 6-MP que les filles (Klemetsdal *et al.* 1995; Chessells *et al.* 1995). Deux études récentes font ressortir l'absence de différence entre les garçons et les filles avec une LLA quant aux concentrations des 6-TGN, l'activité de la TPMT et le dosage de la 6-MP (Relling *et al.* 1999; Pui *et al.* 1999). En comparant ces paramètres, ces résultats ne divergent pas de ceux rapportés dans le présent mémoire. Il n'y a, à ce jour, aucun mécanisme précis qui permet d'expliquer la différence entre les garçons et les filles chez les patients avec une LLA. Cette méconnaissance tient sans doute aux différences qui existent entre les divers protocoles de traitement (ex., UKALL, FRALLE, DFCI, POG), à la multiplicité des effets qui découlent d'une irradiation crânienne prophylactique ainsi qu'à une administration intrathécale et systémique de plusieurs agents aux spectres d'activité variés.

Effet des métabolites sur la réponse thérapeutique

Dans le premier article de ce mémoire, nous avons montré que la concentration intraérythrocytaire des 6-TGN, et non la dose de 6-MP, était significativement et indépendamment associée à la réponse thérapeutique aux thiopurines chez les patients avec MII. Au cours des dernières années, plusieurs indices (Dombal Index, CDAI: Crohn's Disease Activity Index, PCDAI: Pediatric Crohn's Disease Activity Index, HBI: Harvey-Bradshaw Index, van Hees Index, Oxford Index, Cape Town Index) basés sur des observations cliniques et/ou des données de laboratoire ont été élaborés afin d'évaluer la sévérité de la maladie et l'étendue de l'activité inflammatoire. Même si aucun de ceux-ci n'est idéal, l'indice de Harvey Bradshaw (**Annexe II**) a été retenu afin d'évaluer la réponse thérapeutique des patients avec MII traités à l'Hôpital Sainte-Justine parce que son utilisation sur une base routinière est relativement aisée et parce qu'il repose sur des symptômes subjectifs et des signes cliniques. Il a été établi que la probabilité d'obtenir une réponse thérapeutique chez les patients avec MII est plus élevée si les concentrations des 6-TGN sont supérieures à $235 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ GR}$. Tel qu'attendu, la diminution de l'indice inflammatoire était plus marquée chez les individus hétérozygotes que chez les individus homozygotes sauvages pour la TPMT. Cette

réduction s'explique, selon toute vraisemblance, par une concentration médiane de 6-TGN plus élevée chez les premiers que chez les seconds (588 versus 255 pmol/8x10⁸ GR). Ces résultats concordent avec ceux que nos laboratoires ont rapportés suite à une étude pilote menée chez les patients avec MII (Cuffari *et al.* 1996b). L'établissement d'une valeur seuil en regard des concentrations des 6-TGN chez les patients avec MII est novateur et il origine du concept mis de l'avant par des chercheurs britanniques chez les enfants avec LLA (Lilleyman et Lennard 1994). Ces chercheurs ont montré que le taux de survie sans rechute était plus élevé chez les patients qui avaient des concentrations intraérythrocytaires de 6-TGN supérieures à 284 pmol/8x10⁸ GR que chez ceux dont les concentrations étaient inférieures à ce niveau (84% versus 63%). Cette valeur seuil d'environ 20% supérieure à celle que nous avons établi chez les patients avec MII peut s'expliquer à plusieurs niveaux. Le dosage des thiopurines et son ajustement diffèrent chez ces deux groupes de patients. En effet, les enfants britanniques avec LLA recevaient une dose quotidienne de 6-MP de 75 mg/m² alors que les enfants avec MII de l'Hôpital Sainte-Justine recevaient une dose quotidienne (ou son équivalence en AZA) variant de 0.4 à 2.4 mg/kg (médiane de 1.25). En outre, l'oncologue cherche à maintenir un compte en polymorphonucléaires de 0.5 à 0.75 x 10⁹/l alors que le(la) gastro-entérologue cherche à réduire les signes de MII (ex., douleur et masse abdominale, nombre de selles liquides) sans nécessairement viser le développement d'une leucopénie (< 4.0 x 10⁹/l). Les résultats de ce mémoire supportent ce dernier concept car la majorité (92%) des réponses thérapeutiques chez les patients avec MII sont survenues en l'absence de leucopénie. Par ailleurs, lorsqu'une leucopénie était observée chez ces patients, elle était associée à une concentration médiane des 6-TGN de 286 pmol/8x10⁸ GR soit une concentration comparable au niveau seuil noté chez les enfants britanniques avec LLA. Ces résultats indiquent donc que l'ajustement du dosage des thiopurines, en vue d'obtenir des concentrations cibles, peut être utilisé comme guide thérapeutique chez un individu qui ne répond pas au traitement avec les thiopurines en raison d'une dose insuffisante ou de l'inefficacité de cette classe de médicament. Comme pour d'autres substances à faible indice thérapeutique utilisées chez les enfants et les adolescents(es), plusieurs facteurs tels que le respect de la posologie, la biodisponibilité et le métabolisme intracellulaire du médicament vont déterminer la dose de thiopurine requise afin d'obtenir une réponse clinique optimale.

Chez les enfants avec LLA, la réponse chimiothérapeutique peut être définie de différentes façons, la rémission (habituellement obtenue à la fin de la phase d'induction), le maintien du CAP à l'intérieur d'une certaine limite (usuellement 0.5 à $0.75 \times 10^9/l$) au cours des phases d'intensification et de maintien, un faible taux de rechute ou un taux élevé de survie (ordinairement sur une période de 5 ans). L'étude ayant été effectuée après la phase d'induction, lorsque la plupart des patients étaient encore sous traitement ou lorsqu'ils avaient complété le traitement depuis seulement quelques mois, nos études se sont attardées à comparer les concentrations des métabolites de la 6-MP avec celle du CAP. Tel que mentionné précédemment, il existe en regard des concentrations de 6-TGN mais pas de celles du 6-MMP des différences aux jours 7 et 14 entre d'une part les patients MTHFR homozygotes sauvages et d'autre part les patients MTHFR hétérozygotes et MTHFR homozygotes mutants. Par ailleurs, il a été établi que le CAP des patients MTHFR sauvages était au jour 14 statistiquement inférieur à celui mesuré chez les patients MTHFR hétérozygotes/MTHFR homozygotes mutants. Une tendance dans la même direction a également été observée au jour 0 mais la différence était sous le seuil de la signification.

Toutefois, nous n'avons observé aucune corrélation entre la concentration des deux métabolites de la 6-MP et le CAP aux jours 0, 7 et 14 du cycle de traitement. Cette absence de corrélation était attendue car le CAP ne varie pas immédiatement après l'administration de la 6-MP et sa biotransformation dans les érythrocytes. Ainsi, la baisse du CAP est à la fois tributaire du processus moléculaire qui conduit à la mort cellulaire de même que de la cinétique des neutrophiles et de leurs précurseurs. L'effet cytotoxique des thiopurines nécessite l'incorporation du 6-désoxythioguanosine dans l'ADN lors de la réplication cellulaire. L'induction de la mort cellulaire n'est pas immédiate et elle semble nécessiter une deuxième ronde de réplication au cours de laquelle il y aura formation de paires de bases mésappariées telles que la 6-thioguanine-thymine. L'excision par les enzymes de réparation et l'insertion répétitive de la thymine par l'ADN polymérase occasionnent des bris dans l'ADN et elles peuvent enclencher la cascade apoptotique. Toutefois, cet effet cytotoxique n'affectera le nombre de neutrophiles circulant que lorsque les précurseurs neutrophiliques auront effectué deux rondes de réplication (promyélocyte → myélocyte → métamyélocyte) et que le compartiment de maturation de la moelle osseuse aura été suffisamment épuisé de sa

réserve de précurseurs neutrophiliques et de neutrophiles matures. En conditions normales, le promyélocyte nécessite entre 10 et 13 jours (selon les méthodes utilisées pour étudier la cinétique des neutrophiles) afin de compléter ces stades mitotiques et de maturation et de se retrouver dans la circulation sanguine. Les neutrophiles circulants ayant une demi-vie variant de 6 à 8 heures, leur quantité entrant dans la circulation sanguine étant en moyenne de 160×10^7 neutrophiles/kg/jour et la réserve de neutrophiles matures étant de 230×10^7 cellules/kg, le maintien du nombre de neutrophiles circulants dépendra du degré de cytotoxicité. Étant donné le délai d'apparition de l'effet cytotoxique, les concentrations des 6-TGN et de 6-MMP ont été étudiées en relation avec le CAP mesuré 7 ou 14 jours plus tard. Cette approche a été utilisée par d'autres chercheurs et a permis de mettre en évidence une relation entre les concentrations de 6-TGN et le CAP (Lennard *et al.* 1983; Innocenti *et al.* 2000). Toutefois, dans le présent mémoire, seule une tendance vers une corrélation négative a été observée entre ces deux variables si un délai de 14 jours était utilisé et aucune relation ne semblait exister si le délai était de 7 jours. Un niveau significatif pourrait certainement être atteint si l'analyse tenait compte du génotype du patient pour les enzymes MTHFR et TPMT et si le nombre de patients et d'analyses par patient étaient plus importants. Par ailleurs, il importe de se rappeler que le 6-MTIMP (mesuré sous forme de 6-MMP) peut exercer un effet cytotoxique via l'inhibition de la synthèse *de novo* des purines. Cela pourrait expliquer pourquoi les patients hétérozygotes ou homozygotes mutants pour la TPMT tolèrent, en présence de faibles concentrations de 6-MTIMP, des doses de thiopurines qui ne sont que légèrement inférieures à celles données chez les patients avec un génotype TPMT sauvage. L'ensemble de ces observations suggère que l'effet des thiopurines sur la réponse thérapeutique doit tenir compte non seulement des concentrations des 6-TGN mais également de celles du 6-MMP. Les prochaines études permettront sans doute d'établir les paramètres de cette relation.

Effet des métabolites sur la toxicité

Les réactions adverses associées à l'administration des thiopurines chez les patients avec MII ou LLA affectent principalement le foie et la moelle osseuse.

Toutefois, et tel que mentionné précédemment, l'intensité de la réaction sera évaluée différemment selon que le patient a une MII ou une LLA. Ainsi, et à titre d'exemple, une modification de la concentration sérique de certaines enzymes hépatiques, jusqu'à 2,5 fois la valeur normale, sera considérée comme légère chez les patients avec LLA, mais nécessitera généralement l'arrêt du traitement ou une diminution du dosage des thiopurines chez les patients avec MII.

Depuis plusieurs années, l'utilisation des thiopurines est reconnue comme pouvant induire une hépatotoxicité chez certains patients. Cette atteinte hépatique peut toucher, selon les études, de 6 à 42% des patients leucémiques traités par la 6-MP et se traduit habituellement par une cholestase intra-hépatique, une nécrose du parenchyme et une jaunisse qui disparaît généralement à l'arrêt des thiopurines mais qui peut réapparaître si la 6-MP est réintroduite dans le traitement (Berkovitch *et al.* 1996; Clark *et al.* 1960; Einhorn et Davidsohn 1964; McIlvanie et MacCarthy 1959; Shorey *et al.* 1968; Zimmerman 1978). Même si certaines études *in vitro* et animales ont soulevé la formation d'une liaison entre l'acide 6-sulfénique purine, un métabolite réactif de la 6-MP, et les protéines microsomales du foie comme mécanisme possible de l'effet hépatotoxique, celui-ci demeure inconnu. Le premier article du présent mémoire démontre l'existence d'une relation entre l'apparition d'un événement hépatotoxique et la concentration des métabolites méthylés à l'intérieur des globules rouges. Ainsi, le risque d'hépatotoxicité triple si la concentration de 6-MMP est supérieure à $5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ GR}$. Ces résultats suggèrent que la présence à la fois d'une haute activité de la TPMT et d'une concentration élevée de métabolites méthylés jouent un rôle important dans la pathogenèse de la toxicité hépatique induite par la 6-MP. Cette suggestion s'appuie sur le fait que l'activité de la TPMT dans les globules rouges est comparable à celle qui est présente dans d'autres tissus dont le foie, les reins et les lymphocytes (Szumlanski *et al.* 1992; Lennard 1992; McLoed *et al.* 1995; Woodson *et al.* 1982). La mesure des métabolites de la 6-MP et de l'activité de la TPMT dans les cellules hépatiques des patients avec hépatotoxicité permettrait sans doute de mieux connaître le rôle de ces variables mais le caractère envahissant de cette approche est éthiquement inacceptable. Le suivi des concentrations de 6-MMP dans les globules rouges conjointement avec la mesure des enzymes hépatiques apparaissent donc comme étant utiles afin d'identifier les patients à risque de développer une hépatotoxicité. Par ailleurs,

l'incidence d'hépatotoxicité (telle que définie par le protocole du DFCI: légère, ≤ 2.5 x valeurs enzymatiques normales; modérée, 2.6–5.0 x normale; sévère, 5.1-20 x normale) chez les patients avec LLA recevant la 6-MP par voie orale semblent négligeable. Même si des concentrations élevées de 6-MMP (médiane de 30 000 pmol/8x10⁸ GR) ont été observées chez des patients leucémiques traités à l'Hôpital Sainte-Justine qui recevaient de la 6-MP à haute dose intraveineuse (50 mg/m²/heure pendant 20 heures la première et la deuxième semaines d'un cycle de 3 semaines), ceux-ci ne semblaient pas être associés à une hépatotoxicité. Cela suggère que la durée d'exposition à des niveaux élevés de 6-MMP représente aussi un facteur important dans le développement de l'hépatotoxicité. Ainsi, le protocole du DFCI est basé sur un cycle de traitement de trois semaines au sein duquel l'administration de la 6-MP est suspendue la troisième semaine. Le rôle du 6-MMP dans l'apparition de l'hépatotoxicité chez les patients leucémiques a été mis en doute dans une étude qui a comparé les concentrations de ce métabolite dans les globules rouges de 4 patients avec symptômes gastro-intestinaux à celles de 5 patients sans ces symptômes (Berkovitch *et al.* 1996). Les concentrations moyennes de 6-MMP entre ces deux groupes n'étaient pas différentes mais elles étaient largement supérieures aux concentrations normalement attendues. Cette absence de différence peut s'expliquer par le nombre limité de patient et la très grande variabilité interpatient, spécialement au sein du groupe sans symptômes gastro-intestinaux. Toutefois, le rôle central du 6-MMP dans l'hépatotoxicité est indirectement confirmé par le fait que l'utilisation de la 6-TG était beaucoup moins souvent associée à une hépatotoxicité que la 6-MP chez les patients atteints d'une LLA. De plus, l'administration du riboside de 6-MMP lui-même a été associée à une hépatotoxicité (Bodey *et al.* 1968; Hewlett *et al.* 1979; Luce *et al.* 1967).

L'analyse du génotype de la TPMT permet également d'identifier les patients à risque de développer une myélotoxicité liée à l'administration des thiopurines et devrait idéalement être effectuée chez tous les patients avant le début de la thérapie. Le génotypage est particulièrement important pour les patients recevant des thiopurines par voie parentérale sur une base élective, car l'effet myélosuppresseur est amplifié chez les individus qui ont une déficience en TPMT et il peut en résulter une toxicité hématologique fatale. Les individus hétérozygotes devraient théoriquement débiter leur thérapie avec une dose réduite de thiopurines et cette dernière devrait être modulée en

fonction de la réponse thérapeutique et des concentrations des métabolites. Les patients présentant un génotype normal devraient quant à eux être en mesure de tolérer une dose normale de thiopurines au moment de l'initiation de la thérapie, sans nécessairement recourir à un ajustement de doses dans les semaines qui suivront. Récemment, Colombel *et al.* (2000) ont rapporté que le délai médian entre le début de la thérapie et la survenue d'une cytopénie était plus court chez les patients avec une mutation de la TPMT (< 4 mois) que chez les individus homozygotes sauvages (13,7 mois). Il faut également se rappeler que l'administration continue des thiopurines peut être associée à une augmentation de 20 à 25% de l'activité de la TPMT, d'où la nécessité, de pafois procéder à un réajustement des doses. Tel que mentionné précédemment, la manifestation d'une toxicité hématologique chez les patients avec MII n'est pas, contrairement à ce que l'on a longtemps cru, un pré-requis à l'efficacité thérapeutique. Ainsi, même si près des deux-tiers des événements leucopéniques surviennent durant la rémission des patients avec MII, ceux-ci comptent pour moins de 10% de l'ensemble de la réponse thérapeutique. Par contre, le protocole de traitement des enfants avec LLA vise à maintenir le CAP à l'intérieur d'un certain intervalle (0.5 à 0.75×10^9 neutrophiles et monocytes/l). Pour ce faire, les doses de 6-MP et de MTX doivent être fréquemment ajustées, mais le CAP doit éviter de chuter sous cet intervalle, afin de ne pas retarder l'ensemble de la thérapie anti-leucémique et possiblement compromettre le succès du traitement. Finalement, il ne faut pas oublier que la myélosuppression peut être multifactorielle et, conséquemment, qu'elle peut être occasionnée ou précipitée par d'autres facteurs reliés ou non au métabolisme des thiopurines. Les infections virales peuvent être associées à une neutropénie ou une thrombopénie. L'allopurinol, un inhibiteur de la xanthine oxidase, peut interférer avec le catabolisme de la 6-MP ou de l'AZA et ainsi modifier la concentration des métabolites actifs (El-Gamel *et al.* 1998). La sulfasalazine, les 5-amino-salicylates et les diurétiques peuvent également interférer avec le métabolisme en inhibant ou en induisant la TPMT (Lewis *et al.* 1997; Szumlanski *et al.* 1995; Bergan *et al.* 1997; Klemetsdal *et al.* 1993). Ces observations mettent en lumière le fait que la TPMT n'est qu'une des multiples enzymes impliquées dans le métabolisme des thiopurines, que les facteurs génétiques agissent rarement seuls et qu'une manifestation toxique n'est généralement pas unifactorielle.

Au cours des dernières années, plusieurs études se sont attardées à examiner si l'utilisation d'immunosuppresseurs de la classe des thiopurines était associée à une augmentation du risque néoplasique (Vacher-Coponat *et al.* 1999). Ces études découlent sans doute du fait que la dose totale d'immunosuppresseurs et le type de traitement immunosuppresseur semblent modifier la fréquence et le délai d'apparition des tumeurs. Ainsi, les patients traités par des immunosuppresseurs puissants comme la cyclosporine, développent plus précocement (habituellement dans les premiers mois) des tumeurs. Par contre, les patients qui ont subi une immunosuppression moins puissante (ex., thiopurines, corticoïdes) ne sont habituellement atteints qu'après plusieurs années. Outre l'état d'immunosuppression, la présence d'un oncogène viral semble également être un facteur déclenchant pour chaque type de néoplasie. À titre d'exemple, le virus d'Epstein-Barr semble impliqué dans les syndromes lymphoprolifératifs alors que les cancers cutanés et les cancers du col utérin succèdent souvent à des dysplasies virales secondaires aux papillomavirus. Une étude récente portant sur 550 patients avec MII ayant pris de la 6-MP indiquait que l'incidence de néoplasie se situait à 25/550 ou 2.7/1000 patient-années de suivi (Korelitz *et al.* 1999). Sur les 25 patients qui avaient développés un cancer, le cancer de l'intestin venait en tête (8/25) suivi du cancer du sein (3/25) et du lymphome non-hodgkinien (2/25). Des études antérieures également chez les patients avec MII avaient révélé des incidences néoplasiques de 31/755 patients (Connell *et al.* 1994) et de 12/396 patients (Present *et al.* 1989). Ces études concluent que l'incidence de néoplasie chez les patients traités avec les thiopurines n'est pas plus élevée que dans la population en général. Chez les patients avec LLA, la majorité des cas de myélodysplasie secondaire ou de leucémie myéloïde aiguë ont été associés au traitement avec des agents alkylants, des épipodophyllotoxines avec ou sans asparaginase ou à l'irradiation (Pedersen-Bjergaard *et al.* 1990; Pui *et al.* 1995; Pui *et al.* 1995). Toutefois des études récentes ont fait ressortir le potentiel leucémogénique de la 6-MP lorsqu'elle était administrée avec d'autres agents cytotoxiques chez les patients qui avaient une faible activité de la TPMT (Relling *et al.* 1998; Thomsen *et al.* 1999). Il est intéressant de noter que la présence de hautes concentrations de métabolites méthylés accentuait le risque de ces patients à faible activité enzymatique de développer un cancer secondaire. Cela s'explique sans doute par le fait (tel que mentionné précédemment) que les métabolites méthylés favorisent, en inhibant la synthèse *de novo* des purines, l'incorporation et la réutilisation des 6-TGN. Les cancers associés au traitement se

développant généralement quelques années après le début de celui-ci, le présent mémoire n'a pu évaluer la relation qui pouvait exister entre la concentration des métabolites des thiopurines, les génotypes (TPMT et MTHFR) et la survenue d'un cancer primaire chez les patients avec MII ou secondaire chez les enfants avec LLA.

L'administration des thiopurines provoque plusieurs autres effets secondaires sur lesquels ce mémoire ne s'est pas attardé et pour lesquels il n'existe que peu de données dans la littérature quant à leur association avec la concentration des métabolites des thiopurines. Ainsi les nausées, les vomissements et les diarrhées sont rares. L'hyperuricémie peut être observée chez certains patients à cause de la lyse rapide des lymphoblastes mais n'a pu, dans le cadre du protocole de Boston, être associée à la 6-MP car son administration débute après la rémission. Des ulcérations orales peuvent être observées (surtout chez les patients qui reçoivent des hautes doses intraveineuses de thiopurines) et ressemblent à du muguet plutôt qu'à des ulcérations provoquées par des anti-foliques. Certains cas de pancréatite induite par les thiopurines ont été rapportés mais les symptômes ne semblent pas être reliés à la dose et disparaissent habituellement dans les jours qui suivent l'arrêt de la médication.

Conclusions

Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que la mesure des métabolites des thiopurines et l'analyse moléculaire de la TPMT et de la MTHFR puissent fournir aux cliniciens des outils fiables afin d'optimiser et d'individualiser la thérapie par la 6-MP et l'AZA. Cet énoncé est surtout vrai chez les patients atteints d'une MII car, contrairement aux patients avec LLA où une diminution des comptes leucocytaires est généralement indicateur de la réponse thérapeutique, cette variable clinique n'est pas associée à une rémission de la MII. Le dosage des métabolites des thiopurines permet également d'identifier les enfants (ou les parents) qui ne respectent pas la posologie prescrite et ainsi de détecter une des causes sous-estimée de l'échec thérapeutique. Finalement, la mesure des métabolites des thiopurines peut prévenir ou prédire la survenue d'une forme particulière de toxicité (ex., myélosuppression, hépatotoxicité) propre à chacun des deux principaux métabolites mesurés. Selon la concentration des

métabolites, le clinicien sera plus à même de modifier la posologie médicamenteuse ou de choisir une autre approche thérapeutique. Le concept du dosage des métabolites des thiopurines et du génotypage peut aussi être appliqué à d'autres conditions qui incorporent cette classe médicamenteuse dans le régime thérapeutique (ex., transplantation, rhumatisme et maladies auto-immunes). Des études sont toutefois nécessaires afin de déterminer le rôle prédictif de la concentration des métabolites dans les globules rouges pour ces conditions.

Perspectives futures

Suite aux résultats que nous avons obtenus, il serait intéressant d'effectuer des études sur les enzymes de réparation de l'ADN afin de mieux comprendre le rôle de ces dernières dans la réponse cytotoxique aux thiopurines. Il serait aussi important de vérifier l'effet des différents polymorphismes génétiques sur l'activité de ces enzymes et par la suite, leur implication dans la réponse cytotoxique.

Il serait également intéressant d'évaluer, dans chaque cellule, l'étendue des bris dans les brins d'ADN causés par les thiopurines et de corrélérer ces résultats avec les concentrations des différents métabolites des thiopurines et la réponse thérapeutique au traitement. L'évaluation des bris peut être effectuée grâce à « l'essai comète » qui est une méthode d'analyse de la migration de l'ADN des cellules nucléées par électrophorèse sur gel, révélée par le propidium, observée en fluoromicroscopie et ensuite, numérisée et analysée sur ordinateur.

Il ne fait aucun doute que l'approche pharmacogénétique/pharmacocinétique/pharmacodynamique est appelée à se développer non seulement au niveau des études de développement de nouveaux médicaments (phases I à IV), mais également dans la pratique pharmacologique quotidienne de tous les intervenants du secteur de la santé.

Bibliographie

Aarbakke J, Janka-Schaub G et Elion GB. Thiopurine biology and pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences* 1997;18:3-7.

Allan PW et Bennett LL. 6-Methylguanylic acid, a metabolite of 6-thioguanine. *Biochem. Pharmacol.* 1971;20:847-852.

Balis FM, Holcenberg JS, Poplack DG, Ge J, Sather HN, Murphy RF, Ames MM, Waskerwitz MJ, Tubergen DG, Zimm S, Gilchrist GS et Bleyer WA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral methotrexate and mercaptopurine in children with lower risk acute lymphoblastic leukemia: a joint Children's Cancer Group and Pediatric Oncology branch study. *Blood* 1998;92:3569-3577.

Bergan S, Rugstad HE, Klemetsdal B, Giverhaug T, Bentdal O, Sodal G, Hartmann A, Aarbakke J et Stokke O. Possibilities for therapeutic drug monitoring of azathioprine: 6-thioguanine nucleotide concentrations and thiopurine methyltransferase activity in red blood cells. *Therapeutic Drug Monitoring* 1997;19:318-326.

Bergan S, Rugstad HE, Bentdal O, Sodal G, Hartmann A, Leivestad T et Stokke O. Monitored high-dose azathioprine treatment reduces acute rejection episodes after renal transplantation. *Transplantation* 1998;66:334-339.

Berkovitch M, Matsui D, Zipursky A, Blanchette VS, Verjee Z, Giesbrecht E, Saunders EF, Evans WE et Koren G. Hepatotoxicity of 6-mercaptopurine in childhood acute lymphocytic leukemia: pharmacokinetic characteristics. *Medical and Pediatric Oncology* 1996;26:85-89.

Bodey GP, Brodovsky HS, Isassi AA, Samuels ML et Freireich EJ. Studies of combination 6-mercaptopurine (NSC-755) and 6-methylmercaptopurine riboside (NSC-40774) in patients with acute leukemia and metastatic cancer. *Cancer Chemother Rep* 1968;52:315-320.

Burchenal JH, Murphy ML, Ellison RR, *et al.* Clinical evaluation of a new antimetabolite, 6-mercaptopurine, in the treatment of leukaemia and allied diseases. *Blood* 1953;8:965-999.

Chessells JM, Richards SM, Bailey CC, Lilleyman JS et Eden OB. Gender and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukaemia: report from the MRC UKALL trials. *Br. J. Haematol.* 1995;89:364-372.

Chrzanowska M, Kolecki P, Duczmal-Cichocka B et Fiet J. Metabolites of mercaptopurine in red blood cells: a relationship between 6-thioguanine nucleotides and 6-methylmercaptopurine metabolite concentrations in children with lymphoblastic leukaemia. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 1999;8:329-334.

Clark PA, Hsia YE et Huntsman, RG. Toxic complications of treatment with 6-mercaptopurine. *Brit. Med. J.* 1960;1:393-395.

Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H, Marteau P, Gendre JP, Bonaz B, Soule JC, Modigliani R, Touze Y, Catala P, Libersa C et Broly F. Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology* 2000;118:1025-1030.

Connell WR, Kamm MA, Dickson M, Balkwill AM, Ritchie JK et Lennard-Jones JE. Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1994;343:1249-1252.

Cortes F et Labastie M-C. Contrôle moléculaire du développement du système hématopoïétique chez les vertébrés. *Médecine Science* 2000;16: 198-204.

Cuffari C, Seidman EG, Latour S et Théorêt Y. Quantitation of 6-thioguanine in peripheral blood leukocyte DNA in Crohn's disease patients on maintenance 6-mercaptopurine therapy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1996a;74:580-585.

Cuffari C, Théorêt Y, Latour S et Seidman G. 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease : correalation with efficacy and toxicity. *Gut* 1996b;39:401-406.

Dana Farber Cancer Institute Consortium. Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Dana Farber Cancer Institute* 1995; 44 Binney Street, Boston, MA 02115.

Deininger M, Szumlanski CL, Otterness DM, VanLoon J, Ferber W et Weinshilboum RM. Purine substrates for human TPMT. *Biochemical Pharmacology* 1994;48:2135-2138.

Dubinsky MC, Lamothe S, Ying Yang H, Targan SR, Sinnett D, Théorêt Y et Seidman EG. Pharmacogenomics and Metabolite Measurement for 6-Mercaptopurine Therapy in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2000;118:705-713.

Einhorn M et Davidsohn I. Hepatotoxicity of mercaptopurine. *JAMA* 1964;188:802-806.

El-Gamel A., Evans C, Keevil B, Aziz T, Rahman C, Campbell C, Deiraniya A et Yonan N. Effect of allopurinol on the metabolism of azathioprine in heart transplant patients. *Transplantation Proceedings* 1998;30:1127-1129.

Ellison RR, Silver RT et Engle RL Jr. Comparative study of 6-Chloropurine and 6-Mercaptopurine in acute leukemia in adults. *Ann Intern Med* 1959;51:322.

Fallinborg J, Christensen LA, Jacobsen BA et Rasmussen SN. Very low intraluminal colonic pH in patients with active ulcerative colitis. *Digestive Diseases & Sciences* 1993;38:1989-1993.

Farber S. Summary of experience with 6-mercaptopurine. *Ann NY Acad Sci* 1954;60:412.

Forabosco P, Collins A, Latiano A, Annese V, Clementi M, Andriulli A, Fortina P, Devoto M et Morton NE. Combined segregation and linkage analysis of inflammatory bowel disease in the IBD1 region using severity to characterize Crohn's disease and ulcerative colitis. On behalf of the GISC. *European Journal of Human Genetics* 2000;8:846-852.

Frankel LS, Ochs J, Shuster JJ, Dubowy R, Bowman WP, Hockenberry-Eaton M, Borowitz M, Carroll AJ, Steuber CP et Pullen DJ. Therapeutic trial for infant acute lymphoblastic leukemia: the Pediatric Oncology Group experience (POG 8493). *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 1997;19:35-42.

Frei E, Holland JF, Schneiderman MA, Pinkel D, Selkirk G, Freireich EJ, Silver RT, Gold GL et Regelson W. A comparative study of two regimens of combination chemotherapy in acute leukemia. *Blood* 1958;13:1126-1148.

Gaffney PC et Cooper WM. A clinical study of 6-mercaptopurine. *Ann NY Acad Sci* 1954;60:478-482.

Gaynon PS, Bostrom BC, Reaman GH, Sather HN, Trigg ME, Tubergen DG et Uckun FM. Children's Cancer Group (CCG) initiatives in childhood acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 1998;5(no2-4):99-114.

Griffin S, Branch P, Xu Yz et Karran P. DNA mismatch binding and incision at modified guanine bases by extracts of mammalian cells: implications for tolerance to DNA methylation damage. *Biochemistry* 1994;33:4787-4793.

Harms D, Janka-Schaub GE, Erb N, Schöck V, Graubner U, Knust FH, Völpel S, Müller W, Siegert E, Weigel S et Gutjahr P. Randomized comparison of 6-mercaptopurine (6-MP) vs 6-thioguanine (6-TG) in maintenance treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL): preliminary clinical results. *British Journal of Haematology* 1996;93(suppl.2):58.

Hewlett JS, Bodey GP, Wilson HE et Stuckey WJ. Combination 6-mercaptopurine and 6-methylmercaptopurine riboside in the treatment of adult acute leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Treat Rep* 1979;63:156-158.

Hyams JS. 1999. Crohn's Disease. *Dans Pediatric Gastroenterology Disease: Pathology, Diagnosis and Management* (2^e éd.). Éditeurs: Wyllie R. and Hyams JS. W.B. Saunders company, Montréal, Canada. pp.401-418.

Hyslop RM et Jardine I. Cytochrome P-450 dependent irreversible binding of 6-thiopurine to rat liver microsomal protein in vitro and protection by glutathione. *Research Communications in Chemical Pathology & Pharmacology* 1978;22:163-173.

Hyslop RM et Jardine I. Metabolism of 6-thiopurines. I. Irreversible binding of a metabolite of 6-thiopurine to mammalian hepatic protein in vitro. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 1981a;218:621-628.

Hyslop RM et Jardine I. Metabolism of 6-thiopurines. II. Covalent binding of a 6-thiopurine metabolite to mammalian tissue protein in vivo. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 1981b;218:629-635.

Innocenti F, Danesi R, Favre C, Nardi M, Menconi MC, Di Paolo A, Bocci G, Fogli S, Barbara C, Barachini S, Casazza G, Macchia P et Del Tacca M. Variable correlation between 6-mercaptopurine metabolites in erythrocytes and hematologic toxicity: implications for drug monitoring in children with acute lymphoblastic leukemia. *Therapeutic Drug Monitoring* 2000;22:375-382.

Klemetsdal B, Flaegstad T et Aarbakke J. Is there a gender difference in red blood cell thiopurine methyltransferase activity in healthy children? *Medical and Pediatric Oncology* 1995;25:445-449.

Klemetsdal B, Straume B, Wist E et Aarbakke J. Identification of factors regulating thiopurine methyltransferase activity in a Norwegian population. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1993;44:147-152.

Korelitz BI, Mirsky FJ, Fleisher MR, Warman JI, Wisch N et Gleim GW. Malignant neoplasms subsequent to treatment of inflammatory bowel disease with 6-mercaptopurine. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3248-3253.

Lancaster DL, Lennard L, Rowland K, Vora AJ et Lilleyman JS. Thioguanine versus mercaptopurine for therapy of childhood lymphoblastic leukaemia: a comparison of hematological toxicity and drug metabolite concentrations. *British Journal of Haematology* 1998;102:439-443.

Lennard L. Assay of 6-mercaptopurine in human plasma. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications* 1985;345:441-446.

Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur. J. Clin Pharmacol.* 1992; 43:329-339.

Lennard L. 1989 Cytotoxic agents: 6-mercaptopurine, 6-thioguanine and related compounds. *Dans Sulphur-Containing drugs and related organic compounds: Chemistry, Biochemistry and Toxicology (Volume 3 Part B: Metabolism and pharmacokinetics of sulphur containing drugs) Éditeur Damani L.A. Ellis Horwood Series in Biochemical Pharmacology; Halsted Press, New York, États-Unis. pp.9-46.*

Lennard L, Gibson BES, Nicole T et Lilleyman JS. Congenital thiopurine methyltransferase deficiency and 6-mercaptopurine toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukaemia. *Arch Dis Child* 1993;69:577-579.

Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J et Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1990;336:225-229.

Lennard L et Maddocks JL. Assay of 6-thioguanine nucleotide, a major metabolite of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine, in human red blood cells. *J. Pharm Pharmacol* 1983;35:15-18.

Lennard L, Rees CA, Lilleyman JS et Maddocks JL. Childhood leukaemia: a relationship between intracellular 6-mercaptopurine metabolites and neutropenia. *Br J Clin Pharmacol* 1983;16:359-363.

Lennard L et Singleton HJ. High-performance liquid chromatographic assay of the methyl and nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine: quantitation of red blood cell 6-thioguanine nucleotide, 6-thioinosinic acid and 6-methylmercaptopurine metabolites in a single sample. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications* 1992;583:83-90.

Lewis LD, Benin A, Szumlanski CL, Otterness DM, Lennard L, Weinshilboum RM et Nierenberg DW. Olsalazine and 6-mercaptopurine-related bone marrow suppression: a possible drug-drug interaction [published erratum appears in *Clin Pharmacol Ther* 2000 Apr;67(4):431]. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 1997;62:464-475.

Lilleyman JS et Lennard L. Mercaptopurine metabolism and risk of relapse in childhood lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1994;343:1188-1190.

Luce JK, Frenkel EP, Vietti TJ et Isassi AA. Clinical studies of 6-methylmercaptopurine riboside (NSC-40774) in acute leukemia. *Cancer Chemother. Rep.* 1967;51:535-546.

MacKay IR, Weiden S et Ungar B. Treatment of active chronic hepatitis and lupoid hepatitis with 6-mercaptopurine and azathioprine. *Lancet* 1964;1:899-902.

Markowitz JF. 1999. Ulcerative Colitis. *Dans Pediatric Gastroenterology Disease: Pathology, Diagnosis and Management (2^e éd.)*. Éditeurs: Wyllie R. and Hyams JS. W.B. Saunders company, Montréal, Canada. pp.419-432.

Markowitz J, Grancher K, Kohn N, Lesser M, Daum F et the Pediatric 6MP Collaborative Group. A multicenter trial 6-mercaptopurine and prednisone therapy in newly diagnosed children with Crohn's disease. 2000. (soumis)

McIlvanie SK et McCarthy JD. Hepatitis in association with prolonged 6-mercaptopurine therapy. *Blood* 1959;14:80-90.

McLoed HL, Relling MV, Liu Q, Pui CH et Evans WE. Polymorphic thiopurine methyltransferase in erythrocytes is indicative of activity in leukemic blasts from children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995;85:1897-1902.

Miller RW, Young JL et Novakovic B. Childhood Cancer. *Cancer* 1994;75:395-405.

Munkholm P, Langholz E, Davidsen M et Binder V. Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn's disease. *Gut* 1994;35:360-362.

Pedersen-Bjergaard J, Philip P, Larsen SO, Jensen G et Byrting K. Chromosome aberrations and prognostic factors in therapy-related myelodysplasia and acute nonlymphocytic leukemia. *Blood* 1990;76:1083-1091.

Pokorny RM, Hofmeister A, Galandiuk S, Dietz AB, Coher ND et Neiberghs HL. Crohn's disease and ulcerative colitis are associated with the DNA repair gene *MLH1*. *Annals of Surgery* 1997;225:718-725.

Present DH, Meltzer SJ, Krumholz MP, Wolke A et Korelitz BI. 6-Mercaptopurine in the management of inflammatory bowel disease: short- and long-term toxicity. *Annals of Internal Medicine* 1989;111:641-649.

Press AG, Hauptmann IA, Hauptmann L, Fuchs B, Fuchs M, Ewe K et Ramadori G. Gastrointestinal pH profiles in patients with inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 1998;12:673-678.

Pui CH, Boyett JM, Relling MV, Harrison PL, Rivera GK, Behm FG, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Gajjar A et Evans WE. Sex differences in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 1999;17:818-824.

Pui CH, Relling MV, Rivera GK, Hancock ML, Raimondi SC, Heslop HE, Santana VM, Ribeiro RC, Sandlund JT, Mahmoud HH. *et al.* Epipodophyllotoxin-related acute myeloid leukemia: a study of 35 cases. *Leukemia* 1995a;9:1990-1996.

Pui CH, Relling MV, Behm FG, Hancock ML, Boyett JM, Raimondi SC, Krance RA, Mahmoud HH, Ribeiro RC, Sandlund JT *et al.* L-asparaginase may potentiate the leukemogenic effect of the epipodophyllotoxins. *Leukemia* 1995b;9:1680-1684.

Rappaport HP. Replication of the base pair 6-thioguanine/5-methyl-2-pyrimidinone with the large Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Biochemistry* 1993;32:3047-3057.

Rawn JD. 1990 *Traité de biochimie. Biosynthèse des nucléotides.* De Boeck-Wesmael, Bruxelles. pp.627-660.

Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY, Pui CH et Evans WE. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *Journal of the National Cancer Institute* 1999;91:2001-2008.

Relling MV, Yanishevski Y, Nemej J, Evans WE, Boyett JM, Behm FG et Pui CH. Etoposide and antimetabolite pharmacology in patients who develop secondary acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1998;12:346-352.

Saha V et Eden T. The United Kingdom medical research council trials for the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 1998;5(no2-4):275-285.

Sandborn WJ. Azathioprine : State of art in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1998;suppl. 25:92-99.

Sandborn WJ. A review of immune modifier therapy for inflammatory bowel disease: azathioprine, 6-mercaptopurine, cyclosporine and methotrexate. *American Journal of Gastroenterology* 1996;91:423-433.

Sandborn WJ, Tremaine WJ, Wolf DC, Targan SR, Sninsky CA, Sutherland LR, Hanauer SB, McDonald JWD, Feagan BG, Fedorak RN, Isaacs KL, Pike MG, Mays DC, Lipsky JJ, Gordon S, Kleoudis CS et Murdock RH. Lack of effect of intravenous administration of time to respond to azathioprine for steroid-treated Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999;117:527-535.

Sandborn WJ, Van Os EC, Zins BJ, Tremaine WJ, Mays DC et Lipsky JJ. An intravenous loading dose of azathioprine decreases the time to response in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1995;109:1808-1817.

Schaison GS, Baruchel A, Leblanc T et Auclerc M-F. Therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia. French trials. *International Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 1998;5(no2-4):145-154.

Schmiegelow K et Bruunshuus I. 6-Thioguanine nucleotide accumulation in red blood cells during maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia, and its relation to leukopenia. *Cancer Chemother Pharmacol* 1990;26:288-292.

Schein PS et Winokur SW. Immunosuppressive and cytotoxic chemotherapy: Long-term complications. *Ann Intern Med* 1975;82:84-95.

Shorey J, Schenker S, Suki WN et Combes B. Hepatotoxicity of mercaptopurine. *Arch. Inter. Med.* 1968;122:54-58.

Sibani S, Christensen B, O'Ferrall E, Saadi I, Hiou-Tim F, Rosenblatt DS et Rozen R. Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocysteinuria. *Human Mutation* 2000;15:280-287.

Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA, Arkin S, Declerck L, Cohen HJ et Sallan SE. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* 2001;97:1211-1218.

Société canadienne du cancer, L'Institut national du cancer du Canada, Statistique Canada, Registres du cancer des provinces et des territoires et Santé Canada. 1999. Statistiques canadiennes sur le cancer. Institut national du cancer du Canada, Toronto, Canada.

Spahn JD et Kamada AK. Special considerations in the use of glucocorticoids in children. *Pediatrics in Review* 1995;16:266-272.

Swann PF, Waters TR, Moulton DC, Xu YZ, Zheng Q et Edwards M. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science* 1997;273:1109-1111.

Szumlanski CL et Weinshilboum RM. Sulphasalazine inhibition of thiopurine methyltransferase: possible mechanism for interaction with 6-mercaptopurine and azathioprine. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1995;39:456-459.

Szumlanski CL, Honchel R, Scott MC et Weinshilboum RM. Human liver thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: biochemical properties, liver-erythrocyte correlation and presence of isozymes. *Pharmacogenetics* 1992;2:148-159.

Tay BS, Lilley R, McMurray AW et Atkinson MR. Inhibition of phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase for Erlich ascites tumor cells by thiopurine nucleotides. *Biochem Pharmacol* 1969;18:936.

Thomsen JB, Schroder H, Kristinsson J, Madsen B, Szumlanski C, Weinshilboum R, Anderson JB et Schmiegelow K. Possible carcinogenic effect of 6-mercaptopurine on bone marrow stem cells. Relation to thiopurine metabolism. *Cancer* 1999;86:1080-1086.

Vacher-Coponat H, Dussol B et Berland Y. Affections néoplasiques et transplantation d'organe. (Revue) *Rev. Med. Interne* 1999;20:992-1003.

Van Der Does-Van Der Berg A, Veerman AJP, Van Wering ER, De Vries JA, De Waal FC, Van Zanen GE, Weerden JF et Kamps WA. Childhood acute lymphoblastic leukemia in the Netherlands. Randomized studies and nationwide treatment results from 1972 to 1995. *International Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 1998;5(no2-4):125-139.

Vernant JP, Imbert M, Jouault H, Tulliez M, Merle-Béral H, Boucheix C, Charrin C, Mugneret F, Gabert J, Schaison G, Baruchel A, Leblanc T, Fièrè D, Danaila C, Reiffers J, Lacombe F, Puntous M et Cordonnier C. Leucémies aiguës. *La Revue du Practicien* 1996;46:21-79.

Warren DJ, Andersen A et Sl rdal L. Quantitation of 6-thioguanine residues in peripheral blood leukocyte DNA obtained from patients receiving 6-mercaptopurine-based maintenance therapy. *Cancer Research* 1995;55:1670-1674.

Weinshilboum RM, Otterness, DM et Szumlanski CL. Methylation pharmacogenetics : catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999;39:19-52.

Weinshilboum RM et Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics : monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 1980;32:651-662.

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

Woodson LC, Dunnette JH et Weinshilboun RM. Pharmacogenetics of human thiopurine methyltransferase: kidney-erythrocyte correlation and immunotitration studies. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1982;222:174-181.

Woodson LC, Maus TP, Reiter C et Weinshilboun RM. Rat thiopurine methyltransferase: regulation by testosterone. *J Pharmacol Exp Ther* 1981;218:734-738.

Zimm S, Collins JM, Riccardi R, O'Neil D, Narang PK, Chabner B et Poplack DG. Variable bioavailability of oral mercaptopurine. Is maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia being optimally delivered ? *N Engl J Med* 1983;308:1005-1009.

Zimmerman HJ. Drug-induced liver disease. *Drugs* 1978;16:24-45.

Annexe I : Copie du tiré à part de l'article 1

Pharmacogenomics and Metabolite Measurement for 6-Mercaptopurine Therapy in Inflammatory Bowel Disease

MARLA C. DUBINSKY,* STÉPHANIE LAMOTHE,† HUI YING YANG,§ STEPHAN R. TARGAN,§ DANIEL SINNETT,† YVES THÉORËT,† and ERNEST G. SEIDMAN*

*Division of Gastroenterology and Nutrition, University of Montréal, Montréal, Québec, Canada; †Centre de Cancérologie Charles Bruneau, Sainte-Justine Hospital, and Departments of Pediatrics and Pharmacology, University of Montréal, Montréal, Québec, Canada; and §Divisions of Gastroenterology and Genetics, Departments of Medicine and Pediatrics, Cedars-Sinai Medical Center, UCLA, Los Angeles, California

Background & Aims: The effects of 6-mercaptopurine (6-MP) are mediated via its intracellular conversion to 6-thioguanine (6-TG) and 6-methylmercaptopurine (6-MMP) nucleotide metabolites, the latter genetically controlled by thiopurine methyltransferase (TPMT). We sought to determine optimal therapeutic 6-MP metabolite levels and their correlation with medication-induced toxicity and TPMT genotype. **Methods:** Therapeutic response was determined in 92 pediatric patients with inflammatory bowel disease coincidentally with hematologic, pancreatic, and hepatic laboratory parameters, and compared with erythrocyte metabolite levels and TPMT genotype. **Results:** Clinical response was highly correlated with 6-TG levels ($P < 0.0001$) but not with any other variable, including 6-MMP levels, drug dose, gender, and concurrent medications. The frequency of therapeutic response increased at 6-TG levels $> 235 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ erythrocytes ($P < 0.001$). Hepatotoxicity correlated with elevated 6-MMP levels ($> 5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ erythrocytes; $P < 0.05$). Although leukopenia was associated with higher 6-TG levels ($P < 0.03$), it was observed in only 8% of responders. Patients heterozygous for TPMT (8/92) had higher 6-TG levels ($P < 0.0001$), and all responded to therapy. **Conclusions:** 6-MP metabolite levels and TPMT genotyping may assist clinicians in optimizing therapeutic response to 6-MP and identifying individuals at increased risk for drug-induced toxicity.

Treating inflammatory bowel disease (IBD) while limiting drug-induced toxicity is a continuous challenge. The therapeutic advantages of 6-mercaptopurine (6-MP) and its prodrug, azathioprine (AZA), are well documented in both the pediatric and adult literature.¹⁻⁸ These drugs have been used effectively for induction and maintenance of remission in corticosteroid-dependent or -resistant IBD and in the management of fistulizing Crohn's disease (CD). Retrospective studies have confirmed the generally satisfactory safety profile of these drugs.⁹⁻¹² Nevertheless, concerns regarding both short-

and long-term toxicity are the most common explanation for their restricted use.¹³

6-MP (or AZA converted to 6-MP) has both cytotoxic and immunosuppressive properties via the incorporation of thiopurine nucleotide metabolites into cellular nucleic acids and inhibition of de novo purine synthesis.¹⁴ Plasma pharmacokinetic studies have confirmed the low and variable oral bioavailability of both 6-MP and AZA, as well as the limited therapeutic value of measuring plasma 6-MP levels.¹⁵⁻¹⁷ Only about 16% of 6-MP is available to the systemic circulation, largely because of its extensive catabolism by xanthine oxidase, present in both enterocytes and hepatocytes but not in hematopoietic tissue.¹⁴ As illustrated in Figure 1, 6-MP may be catabolized intracellularly to the inactive metabolite, 6-methylmercaptopurine (6-MMP), or anabolized to the active metabolites, 6-thioguanine nucleotides (6-TGNs) and 6-methylmercaptopurine ribonucleotides (6-MMPRs).^{18,19} The methylation of 6-MP and 6-thioinosine 5'-monophosphate (6-TImP) is catalyzed by thiopurine methyltransferase (TPMT), an enzyme that exhibits interindividual variation as a result of a known genetic polymorphism of its alleles. One in 300 (0.3%) individuals have low to absent enzyme activity (homozygous TPMT^L), 11% have intermediate (heterozygous TPMT^H/TPMT^L), and 89% have normal to high levels of activity (homozygous/wild-type TPMT^H).²⁰

Investigations on the clinical use and interpretation of intracellular 6-MP metabolite and TPMT activity measurements were initiated in childhood acute lymphoblastic leukemia.²¹⁻²³ Studies have suggested an inverse

Abbreviations used in this paper: ASO, allele-specific oligonucleotide; AZA, azathioprine; CBC, complete blood count; HBI, Harvey-Bradshaw index; 6-MMP, 6-methylmercaptopurine; 6-MMPR, 6-methyl-mercaptopurine ribonucleotide; 6-MP, 6-mercaptopurine; RBC, red blood cell; 6-TG, 6-thioguanine; 6-TGN, 6-thioguanine nucleotide; 6-TImP, 6-thioinosine 5'-monophosphate; TPMT, thiopurine methyltransferase.

© 2000 by the American Gastroenterological Association
0016-5085/00/\$10.00
doi:10.1053/gg.2000.5925

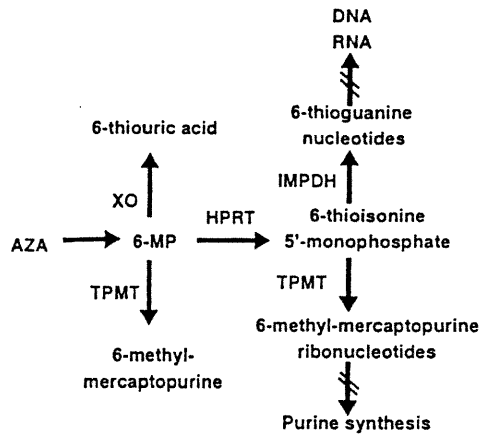


Figure 1. 6-MP metabolism. Oral AZA is rapidly converted to 6-MP by a nonenzymatic process.¹⁹ Initial 6-MP transformations occur along competing catabolic (XO, xanthine oxidase; TPMT) and anabolic (HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase) enzymatic pathways. Once formed, 6-TIMP may be transformed into 6-TGN by the rate-limiting inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) or methylated into 6-MMPR.

relationship between red blood cell (RBC) TPMT activity and 6-TG levels in acute lymphoblastic leukemia, corresponding clinically to a reduced risk of relapse, but a higher probability of neutropenia.^{24,25} Our group was the first to evaluate the use of 6-MP metabolite monitoring in the setting of IBD.²⁶ The pilot results suggested a significant correlation between RBC 6-TG levels and clinical response to 6-MP/AZA. We subsequently showed that erythrocyte 6-TG and 6-MMP levels correlated with those in leukocyte DNA.²⁷

In this study, we prospectively evaluated the clinical use of erythrocyte 6-MP metabolite monitoring and TPMT genotyping in IBD. The data support the application of these beneficial laboratory measurements for optimizing therapeutic response to 6-MP and in identifying individuals at risk for drug-induced toxicity.

Materials and Methods

Patient Population

Patients less than 19 years of age followed up by the clinical investigators (M.C.D. and E.G.S.) at Ste-Justine Hospital IBD Center were eligible for inclusion if they had undergone 6-MP or AZA treatment for at least 4 months. Diagnoses of CD, ulcerative colitis (UC), or indeterminate colitis were established by standard clinical, radiological, histological, and endoscopic criteria.²⁸ Patients with leukopenia or increased serum hepatic or pancreatic enzyme activities before initiation of therapy were excluded from the study. The dose of AZA or 6-MP, determined by the treating physician, was stable for at least 1 month. Clinical information collected included the following: (1) patient-related data including gender, age at diagnosis, and site of disease; (2) disease activity,

assessed at each visit corresponding to a 6-MP metabolite blood drawing, by calculating a validated index based on direct questioning, clinical examination, and laboratory data (modified Harvey-Bradshaw index [HBI]²⁹ for CD, Truelove and Witts' index for UC,³⁰ or a detailed assessment of perianal disease and fistulas, as described previously^{31,32}); (3) 6-MP-related data including age at initiation, indication, and dose ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$); and (4) toxicity-related data including complete blood count (CBC) and differential, alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), bilirubin, amylase, lipase, dose of 6-MP, timing of event relative to initiation of therapy, course of action taken, and concurrent medications. Blood samples from 92 consenting patients analyzing 6-MP, 6-TG, and 6-MMP moieties were obtained prospectively during the study period (1995–1998). When possible, multiple samples were obtained from the same patient separated by an interval exceeding 3 months of the first specimen. The clinical investigators remained blinded to the 6-MP metabolite levels and the results of TPMT genotyping.

Outcome Definitions

A clinical evaluation point was designated as a clinic visit corresponding to each 6-MP metabolite measurement. Primary outcomes were based on each individual patient's initial indication for 6-MP. For patients with chronic active or steroid-dependent disease, response was defined by clinical remission based on a modified HBI score < 4 for CD²⁹ or according to the criteria for remission defined by Truelove and Witts,³⁰ in the absence of oral or parenteral corticosteroids. Complete fistula closure was considered a response for patients in whom fistulizing disease was the primary indication. Treatment failure applied to cases in which the above-stated therapeutic goals were not achieved. In accordance with other reports,^{11,12} toxicity was defined as (1) hematologic: leukocytes $< 4000/\text{mm}^3$; (2) hepatic: AST or ALT > 2 times upper limit of normal; and (3) pancreatic: amylase or lipase > 2 times upper limit of normal.

Erythrocyte 6-MP Metabolite Assay

Heparinized blood (5 mL) was obtained along with other routine blood work at the time of a scheduled clinic visit or hospitalization. RBC-free thiobase, 6-MP, 6-TG, and 6-MMP (picomoles per 8×10^8 RBC) levels were determined by a reversed-phase high-performance liquid chromatography assay, as we described previously.²⁶

TPMT Genotyping

All individuals were genotyped for 2 polymorphisms in TPMT transitions^{33,34} at position 460 (G460A, Ala-to-Thr) and at position 719 (A719G, Tyr-to-Cys) using a polymerase chain reaction allele-specific oligonucleotide (ASO) hybridization assay.³⁵ These mutations were used to define 3 distinct

alleles: TMPT 3*A (both G460A and A719G), TMPT 3*B (only G460A), and TMPT 3*C (only A719G).

Statistical Methods

Statistical analysis was performed using SAS computer software (version 6.10, 1994; SAS Institute, Cary, NC). Quantitative variables are described as medians (range) throughout. Normality was tested for all quantitative variables. Both parametric and nonparametric statistic tests were used, based on the distribution of variables to evaluate correlation between 2 variables and test mean/median differences of quantitative variables between 2 groups. Statistical differences in proportion exact tests when appropriate were evaluated by using the χ^2 method or Fisher's test.

To evaluate the relationship between therapeutic response and metabolite levels, linear logistic regression was performed by the maximum-likelihood method. The dependent variable was therapeutic response or failure for an individual, either at one evaluation point or consistently over time. Independent variables were the patient characteristics detailed in Table 1, 6-MP dose, and metabolite levels, as well as TMPT genotype. In this analysis, for individuals with blood drawn for metabolite levels at more than one evaluation point, mean values were used, and cases with mixed clinical responses ($n = 16$) were excluded. However, they were used to identify therapeutic response-associated factors within each individual with paired tests (response vs. failure). The odds ratio and confidence interval were calculated using the Woolf method.

Table 1. Characteristics of Pediatric IBD Patients Treated With 6-MP/AZA

Gender (M:F)	41:51
Mean age at diagnosis, yr (range)	11.5 (1-18)
Disease classification and location	
CD (n)	79
Small bowel alone (n)	2
Small bowel + perianal +/- or duodenal involvement (n)	1
Ileocolitis (n)	33
Ileocolitis + perianal +/- or duodenal involvement (n)	21
Colitis alone (n)	13
Colitis + perianal +/- or duodenal involvement (n)	8
Perianal disease alone (n)	1
UC (n)	8
Pancolitis (n)	6
Left-sided (n)	2
Indeterminate colitis (n)	5
Mean age at initiation of 6-MP/AZA, yr (range)	13 (4-18.5)
Delay from diagnosis to start of 6-MP/AZA, yr (range)	1.5 (0-7)
Primary indication for 6-MP/AZA use	
Steroid dependent (n)	68
Steroid refractory (n)	17
Fistulizing disease (n)	7
Mean 6-MP dose, $mg \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$ (range)	1.25 (0.4-2.4)

Results

Metabolite Levels and Therapeutic Response

The study population was divided into patients with a satisfactory clinical response and those who failed therapy. In the single-sampled patient group, 27 of 46 (59%) responded and 19 of 46 (41%) failed. In the multisampled patients, 20 of 46 (43%) had a response sustained at each clinical evaluation point, 11 (24%) never achieved a clinical response, and 15 (33%) responded inconsistently over time. Among all 173 metabolite measurements, 103 (60%) corresponded to patients with a clinical response to therapy and 70 (40%) were in patients not responding at the designated clinical evaluation points.

Overall, higher median 6-TG levels (in $pmol/8 \times 10^8$ RBC) were observed at points of clinical response vs. nonresponse (312 vs. 199; $P < 0.0001$), as shown in Table 2. Secondary analysis of all 92 patients tested at their initial clinical evaluation point showed similar results (313 vs. 209 at 53 points of response vs. 39 nonresponse; $P < 0.004$). Quartile analysis on all samples revealed that the best probability of treatment response was not significantly increased until RBC 6-TG levels were greater than 235 (Figure 2A). The patients' 6-TG levels were evenly distributed within the third quartile, suggesting 235 as the true threshold point. Furthermore, as shown in Figure 3, only 20 of 70 (27%) measurements at times of therapeutic failure were greater than 235, compared with 69 of 103 (67%) at times of response ($P < 0.001$). Presenting the data in a clinically meaningful manner, we calculated that the odds ratio of a therapeutic response for a 6-TG level higher than our cutoff of 235 was 5.0 (95% confidence interval, 2.6-9.7; $P < 0.001$).

6-MMP levels (in $pmol/8 \times 10^8$ RBC) did not correlate with disease activity, nor did quartile analysis demonstrate a specific level that corresponded with outcome in the primary (Figure 2B) or secondary analyses (2683 vs. 1420 for response and nonresponse). The theoretically competitive enzymatic pathways determining concentrations of 6-TG and 6-MMP suggest a negative correlation between these 2 metabolites. Nevertheless, a positive correlation between 6-TG and 6-MMP was observed ($r = 0.21$; $P < 0.007$). 6-MP moieties were undetected in most samples, indicating that 6-MP and 6-TImP had been entirely biotransformed.

Logistic regression analysis showed that 6-TG levels were significantly associated with therapeutic response, independent of other confounding factors potentially affecting prognosis ($P = 0.002$). For each of the 15

Table 2. Values of 6-TG and 6-MMP at Designated Clinical Evaluation Points Corresponding to Therapeutic Efficacy

Therapeutic efficacy	6-TG level ^b (pmol/8 × 10 ⁸ RBC)	6-MMP level ^b (pmol/8 × 10 ⁸ RBC)
Response (n = 103)	312 (49–1203)	2683 (0–23,129)
Failure (n = 70)	199 (0–705)	1739 (0–25,982)
<i>P</i> ^a	<0.0001	0.37

^aSee Materials and Methods for description of the statistical analysis.

^bMedian (range).

patients inconsistently responsive over time, the values of 6-TG, 6-MMP, dose, and duration of therapy were compared between points of clinical response and of nonresponse. Again, 6-TG level was the only statistically significant variable determining therapeutic response ($P < 0.02$). Unsuspected noncompliance was confirmed in 3 patients by documenting metabolite levels below the limits of detection.

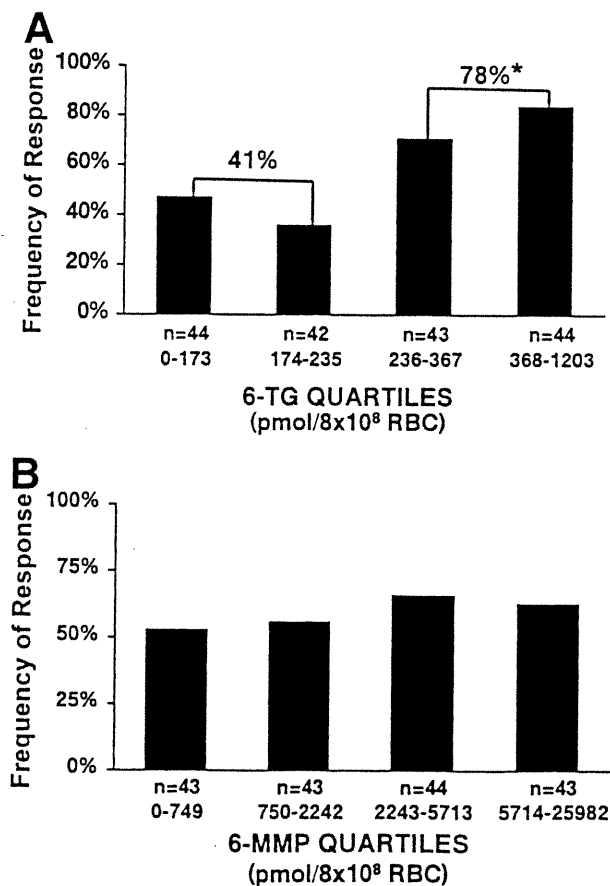


Figure 2. Correlation of quartile 6-MP metabolite levels with clinical response in IBD. (A) The frequency of clinical response was significantly higher within the upper 6-TG level quartiles (>235 pmol/8 × 10⁸ RBC). * $P < 0.001$. (B) Association between 6-MMP quartile levels and clinical response. No significant differences were observed ($P = 0.48$). n, number of clinical evaluation points per quartile.

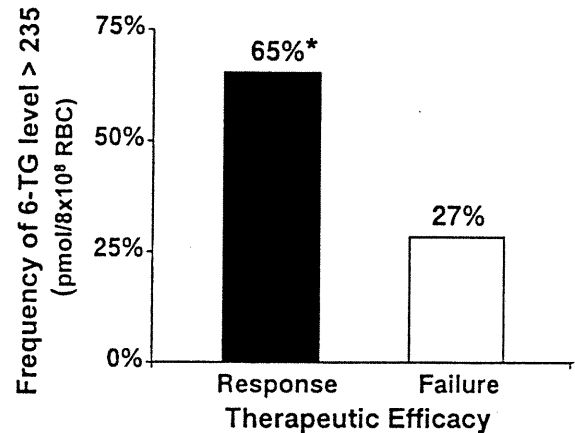


Figure 3. Frequency of 6-TG levels > 235 (pmol/8 × 10⁸ RBC) at clinical evaluation points corresponding to therapeutic response, compared with points of therapeutic failure. * $P < 0.001$.

Effect of Drug Dose

A meta-analysis reported a beneficial effect of increasing 6-MP dose in treating quiescent, although not active, CD.⁴ In our study, the median dose of 6-MP was not statistically different compared with therapeutic response (1.25 and 1.25 mg · kg⁻¹ · day⁻¹ for response and treatment failures, respectively). Similarly, there was no difference in dose when analyzed at the time of first clinical assessment alone (1.2 vs. 1.1 mg · kg⁻¹ · day⁻¹). Quartile analysis showed that the frequency of remission was not significantly different across the dose range (Figure 4). Because 6-TG levels correlated with response, the relationship between 6-MP dose and metabolite level was examined. We observed a nonlinear, very weakly positive correlation between dose and 6-TG ($r = 0.0009$) and 6-MMP ($r = 0.32$) levels.

Toxicity and Metabolite Levels

In addition to the lack of, or delay in, therapeutic response to 6-MP, drug-related toxicity has led to underutilization of this class of immunosuppressive therapy in IBD. In this study, 36 of 92 patients (39%) experienced an adverse reaction attributable to 6-MP/AZA therapy. Sixteen patients (17%) had increased amino transaminase levels. Increased amylase and lipase levels were observed in 7 cases (8%). However, only 1 patient developed clinically overt pancreatitis. Another experienced hepatic and pancreatic toxicity simultaneously. Leukopenia occurred in 13 individuals (14%). On average, hematologic toxicity occurred later in the course of 6-MP therapy compared with hepatic or pancreatic complications (means of 1.5 vs. 0.4 and 0.6 years, respectively). Permanent discontinuation of 6-MP treatment as a result of myelosuppression was deemed necessary in 1 of these patients (6-TG, 793).

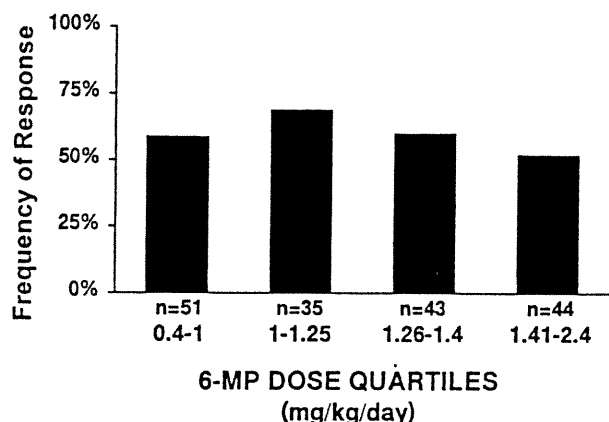


Figure 4. Relationship between 6-MP dose and clinical response in IBD. No significant differences were observed in the frequency of clinical response within 6-MP dose quartiles. AZA dose was converted to 6-MP dose by a factor of 2.07.³⁶ n, number of clinical evaluation points per quartile.

Hepatic. As shown in Figure 5A, median 6-MMP levels were significantly greater at the time of a hepatotoxic event (n = 16). Although hepatotoxicity was observed at low 6-MMP levels, the risk increased 3-fold (18% vs. 6%) at 6-MMP levels above the third quartile (>5700). 6-TG levels did not affect hepatotoxicity, nor did the 6-MP dose (data not shown).

Hematologic. The median 6-TG level during leukopenic events in 12 individuals was 286, compared with 232 without leukopenia (P = 0.06). Two thirds of leukopenic events occurred during remission, representing only 8% of all therapeutic responses. The majority (92%) of clinical responses thus occurred in the absence of leukopenia. 6-TG levels correlated significantly with the presence of leukopenia at points of therapeutic response (Figure 5B). Although 4 of 70 (6%) leukopenic events occurred during points of treatment failure, the 6-TG levels were lower (198 [101–215]). Neither the 6-MP dose nor 6-MMP levels influenced leukopenia (data not shown).

Pancreatic. No correlation between 6-MP dose or metabolite levels and pancreatic toxicity was observed (data not shown).

Effect of Mesalamine Treatment

Kinetic studies have demonstrated that derivatives of benzoic acid such as sulfasalazine and mesalamine, its active metabolite, inhibit TPMT activity in vitro.³⁷ In this study, 48 of 92 (52%) patients were treated with mesalamine concomitantly (mean, 45 mg · kg⁻¹ · day⁻¹). Of 173 metabolite levels measured, 77 coincided with mesalamine use. We did not observe any effect of concurrent mesalamine use on therapeutic

response, 6-TG and 6-MMP determination, and levels, nor drug-related toxicity (data not shown).

TPMT Genotype

Among our patients, 8 (9%) were heterozygous for the TPMT allele (TPMT^H/TPMT^L). All heterozygotes, compared with 39 of 84 (46%) patients homozygous for normal alleles, achieved a clinical response (single and multisampled) on 6-MP treatment. Thirty of the remaining 45 never responded, and 15 were mixed responders. As anticipated, higher 6-TG levels were found among heterozygotes (Figure 6). However, 6-MMP levels were comparable among heterozygotes and normals (1115 vs. 2231). The median dose of 6-MP was not significantly different in relation to genotype (1.2 and 1.1 mg · kg⁻¹ · day⁻¹ for normals and heterozygotes, respectively). Only 1 of 13 patients with leukopenia was heterozygous for the TPMT allele. Overall, 35 of 36 patients with drug-related toxicity had a normal TPMT genotype.

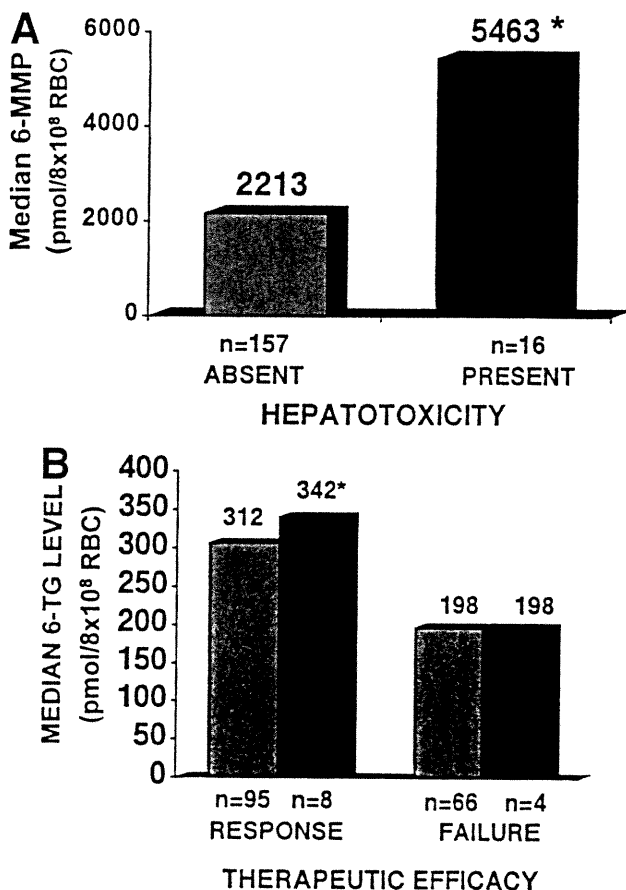


Figure 5. Correlation of erythrocyte 6-MP metabolite levels with drug-related side effects in IBD. n, number of observations. (A) Correlation of 6-MMP levels with hepatotoxicity. Hepatotoxic events were associated with higher median 6-MMP levels. *P < 0.05. (B) Correlation of 6-TG levels with leukopenia at times of therapeutic response and failure. *P = 0.025 leukopenia (■) vs. no leukopenia (□).

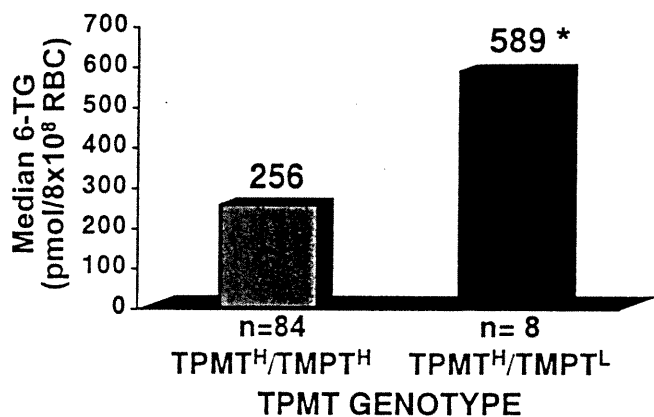


Figure 6. Relationship between TPMT genotype and 6-TG level in IBD. Median 6-TG levels were higher among heterozygotes (TPMT^H/TPMT^L) (n = 8) than homozygous normals (TPMT^H/TPMT^H) (n = 84) with high-activity (H) alleles. *P < 0.0001.

Discussion

This study demonstrates that erythrocyte 6-TG concentration, not drug dose, is significantly and independently associated with therapeutic response to 6-MP in children with IBD. Our data corroborate our previous pilot study in IBD,²⁶ as well as reports in acute lymphoblastic leukemia, suggesting that 6-TG levels above particular cutoff points are related to disease-free survival, independent of other factors known to affect prognosis, including standardized dosing regimens.^{22,24,25} Our results also suggest that response to 6-MP therapy was optimized at 6-TG levels greater than a cutoff of 235 pmol/8 × 10⁸ RBC. Suggested target levels can thus be used as a therapeutic guide for those patients not responding to 6-MP/AZA, a therapeutic concept rarely used in gastrointestinal disorders. Similar to other medications requiring blood level monitoring, factors such as compliance, bioavailability, and the intracellular drug metabolism will ultimately determine the dose of 6-MP required to achieve clinical response. Despite the similarity among the factors determining both an individual's therapeutic 6-MP dose and 6-TG level, we did not observe a correlation between these 2 important variables. However, this study was not designed to allow the use of genotyping or metabolite levels to adjust the dose.

A major influence on 6-MP metabolism is pharmacogenetic. The activity of TPMT is genetically regulated, which influences cytotoxic activity of 6-MP.^{22,24,25} Potentially severe or even fatal toxic effects of 6-MP/AZA may occur in individuals with deficient levels of enzyme activity as a result of the absent or diminished production of methylated nucleotides and subsequent accumulation of 6-TG³⁸⁻⁴⁰ (Figure 1). Conversely, high erythrocyte TPMT activity correlates with low 6-TG levels. Although we did not assay TPMT activity, its genotyping

has been shown to accurately reflect enzyme activity.⁴¹ Higher doses of 6-MP may thus be needed in those IBD patients with high TPMT activity to prevent undertreatment as a cause of therapeutic failure, as reported in children with acute lymphoblastic leukemia.²⁴

TPMT genotype analysis also identifies patients at risk for 6-MP-related bone marrow toxicity and should ideally be performed on all patients before implementing therapy.⁴² Genotyping is particularly important for patients receiving AZA parenterally on an elective basis in view of the potential life-threatening myelosuppression in TPMT-deficient individuals. In contrast to individuals with high TPMT activity, identified heterozygotes would theoretically require significantly lower doses of 6-MP to achieve a therapeutic response. In contrast, patients with a normal genotype should be able to tolerate full-dose 6-MP/AZA at initiation of therapy, without resorting to progression in dose over several months. With the exception of idiosyncratic reactions such as pancreatitis, 6-MP tolerance, appropriate dosing, and patient monitoring are dependent on the molecular analysis of TPMT.

Studies have demonstrated that derivatives of benzoic acid can inhibit the TPMT metabolic pathway of 6-MP.⁴³ Sulfasalazine and its metabolites (mesalamine) are examples that have been shown in vitro to be potent inhibitors of TPMT.^{37,44} In our study, we did not find any clinically significant effects of this potential drug interaction. However, our patients did not use azo-bond-linked aminosalicylic acid compounds, such as sulfasalazine and olsalazine. In vivo studies in IBD are needed to validate the effect of mesalamine described in vitro.

The frequency of 6-MP-induced toxicity observed in this study is consistent with that previously reported in IBD.^{11,12} In all but 1 of 16 events, reduction of 6-MP dose was associated with normalization of transaminase levels within weeks. In the latter case, extensive investigations revealed steatohepatitis. Although the hepatotoxic effects of 6-MP are well documented, the underlying mechanisms remain obscure. In our study, hepatotoxicity correlated with the presence of significantly higher concentrations of 6-MMP. This suggests that high TPMT activity and the accumulation of 6-MMP could play an important role in the pathogenesis of 6-MP-induced hepatic toxicity. Erythrocyte TPMT activity levels parallel the enzyme activity in other tissues, particularly the liver.⁴⁵ Monitoring 6-MMP levels, in conjunction with liver function tests, appears to be useful in identifying patients at risk for hepatotoxicity and to determine the level at which a hepatic event has occurred to individualize appropriate dose adjustments. Our data suggest that 6-MMP levels below 5700 pmol/8 × 10⁸ RBC are less often associated with increased transaminases. The use of

6-TG has been observed to be much less often associated with hepatotoxicity in acute lymphoblastic leukemia,⁴⁶ in keeping with our data. In our leukemic patients receiving intravenous 6-MP, high 6-MMP levels (>30,000) were not uniformly associated with hepatotoxicity, suggesting that duration of exposure to high 6-MMP levels may also be an important determinant. Despite *in vitro*⁴⁷ and *in vivo*⁴⁸ evidence for the immunosuppressive or cytotoxic properties of methylated metabolites, 6-MMP levels did not correlate with therapeutic response in our study.

As in IBD, a long period of maintenance treatment with 6-MP/AZA is necessary for the successful treatment of acute lymphoblastic leukemia.²⁵ Relapse-free survival was shown to be improved when leukemic children experience myelosuppression.²⁴ In IBD, titrating the dose to induce leukopenia has been observed to improve response rate in patients not responding to 6-MP.⁴⁹ This insightful observation now has a biochemical explanation, because leukopenia is associated with higher 6-TG levels.^{21,23,24,50,51} Indeed, in this study, the median 6-TG level was 342 (mean, 490) in leukopenic individuals, well above the threshold level of 235. However, our results clearly demonstrate that leukopenia is not a reliable marker of therapeutic response and is definitely not required to control IBD. Similar conclusions were recently found in a prospective clinical trial of 6-MP in pediatric IBD.⁵² Although it is widely recognized that mutations in TPMT can cause severe myelosuppression with 6-MP therapy, these usually occur early, and do not represent all potential factors, such as other drugs or infections. Recently, Colombel et al.⁵³ reported that most CD patients with cytopenia while receiving AZA had no TPMT mutations, similar to our results. The median delay between onset of therapy and cytopenia was shorter in the 9 with TPMT mutations (<4 months) than those with normal genotypes (13.7 months). Thus, metabolite testing is not a surrogate for monitoring of CBCs, required in all patients. However, coincidental metabolite testing may help identify the potential cause. The risk of clinical bone marrow suppression outweighs its use as a clinical guide of therapeutic response in IBD. Because of the small number of patients experiencing leukopenia, we were unable to clearly identify a level of 6-TG that could predict leukopenia. Identification of the patients at high risk by genotyping and the 6-TG level at which myelosuppression occurs will permit clinicians to individualize 6-MP dosing to maximize therapeutic efficacy while minimizing myelotoxicity.

The results of this study suggest that 6-MP metabolite measurements and TPMT molecular analysis may provide clinicians with useful tools to optimize and individu-

alize AZA/6-MP therapy in IBD. The advantages of metabolite monitoring observed in this study include the identification of the causes of failure to respond to 6-MP therapy. These include nonadherence, a potential problem in all patients, particularly adolescents, as well as inadequate dose. Another potential cause of inadequate response is excessive TPMT activity, resulting in shunting of 6-MP toward the production of 6-MMP, with inadequate levels of 6-TG achieved despite escalations in dose. Alternate strategies in such individuals may include the use of 6-TG. However, the therapeutic range of 6-TG is likely to be different and requires reassessment in terms of efficacy and toxicity, as suggested for acute lymphoblastic leukemia.⁵⁴ Further studies using genotyping before initiating therapy and metabolite measurements to adjust dose are needed to examine the use of these tests in optimizing 6-MP therapy for IBD.

Currently, dose-escalation studies are underway to examine the potential benefits of pharmacogenomics, as used by us, to achieve optimal 6-TG levels in both adults and children with IBD. The concept of 6-MP metabolite determination and genotyping can also be applied to other disease entities that incorporate 6-MP/AZA within the therapeutic regimen (transplantation, rheumatic and autoimmune disorders). Studies are needed to validate the use of these tests in these disorders and to elucidate disease-specific target 6-TG levels.

References

1. Willoughby JMT, Kumar PJ, Beckett J, Dawson AM. Controlled trial of azathioprine in Crohn's disease. *Lancet* 1971;731:944-947.
2. Candy S, Wright J, Gerber M, Adams G, Gerig M, Goodman R. A controlled double blind study of azathioprine in the management of Crohn's disease. *Gut* 1995;37:674-678.
3. Present DH, Korelitz BI, Wisch N, Glass JL, Sachar DB, Pasternack BS. Treatment of Crohn's disease with 6-mercaptopurine: a long-term, randomized, double blind study. *N Engl J Med* 1980;302:981-987.
4. Pearson DC, May GR, Fick GH, Sutherland LR. Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn's disease. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 1995;123:132-142.
5. Rosenberg JL, Wall AJ, Levin B, Binder HJ, Kirsner JB. A controlled trial of azathioprine in the management of ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1975;69:96-99.
6. Hawthorne AB, Logan RF, Hawkey CJ, Foster PN, Axon AT, Swarbrick ET, Scott BB, Lennard-Jones JE. Randomized controlled trial of azathioprine withdrawal in ulcerative colitis. *Br Med J* 1992;305:20-22.
7. Markowitz J, Rosa J, Grancher K, Aiges H, Daum F. Long-term 6-mercaptopurine treatment in adolescents with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1990;99:1347-1351.
8. Markowitz J, Grancher K, Mandel F, Daum F, and the 6-MP Collaborative group. 6-Mercaptopurine (6-MP) and prednisone therapy for newly diagnosed pediatric Crohn's disease (CD): a prospective multicenter, placebo-controlled clinical trial (abstr). *Gastroenterology* 1998;114:A4227.
9. Present DH, Meltzer SJ, Krumholz MP, Wolke A, Korelitz BI. 6-Mercaptopurine in the management of inflammatory bowel

- disease: short- and long-term toxicity. *Ann Intern Med* 1989;111:641-649.
10. Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK, Lennard Jones JE. Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. *Gut* 1993;34:1081-1085.
 11. Goldstein ES, Marion JF, Wheeler S, Present DH. Toxicities and infections associated with chronic 6-mercaptopurine (6-MP) use in Crohn's disease (CD): do we need to discontinue treatment? *Gastroenterology* 1998;114:A4042.
 12. Kirschner BS. Safety of azathioprine and 6-mercaptopurine in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998;115:813-821.
 13. Markowitz J, Grancher K, Mandel F, Daum F. Immunosuppressive therapy in pediatric inflammatory bowel disease: results of a survey of the North American Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition. Subcommittee on immunosuppressive use of the Pediatric IBD Collaborative Research Forum. *Am J Gastroenterol* 1993;88:44-48.
 14. Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol* 1992;43:329-339.
 15. Zimm S, Collins JM, Riccardi R, O'Neill D, Narang PK, Chabner B, Poplack DG. Variable bioavailability of oral mercaptopurine. Is maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia being optimally delivered? *N Engl J Med* 1983;308:1005-1009.
 16. Van Os EC, Zins BJ, Sandborn WJ, Mays DC, Tremaine WJ, Mahoney DW, Zinsmeister AR, Lipsky JJ. Azathioprine pharmacokinetics after intravenous, oral, delayed release oral and rectal foam administration. *Gut* 1996;39:63-68.
 17. Lafolie P, Hayder S, Bjork O, Peterson C. Intraindividual variation in 6-mercaptopurine pharmacokinetics during oral maintenance therapy of children with acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Clin Pharmacol* 1991;40:599-601.
 18. Lennard L. Clinical implications of thiopurine methyltransferase optimization of drug dosage and potential drug interactions. *Ther Drug Monitoring* 1998;20:527-531.
 19. Elion GB. The comparative metabolism of imuran and 6-mercaptopurine in man. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1969;10:21.
 20. Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine Pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 1980;32:651-662.
 21. Lennard L, Rees CA, Lilleyman JS, Maddocks JL. Childhood leukemia: a relationship between intracellular 6-MP metabolites and neutropenia. *Br J Clin Pharmacol* 1983;16:358-363.
 22. Lennard L, Lilleyman JS. Variable 6-mercaptopurine metabolism and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1989;7:1816-1823.
 23. Lennard L, Van Loon JA, Weinshilboum RM. Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 1989;46:149-154.
 24. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1990;336:225-229.
 25. Lennard L, Lilleyman JS. Mercaptopurine metabolism and risk of relapse in childhood lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1994;343:1188-1190.
 26. Cuffari C, Théorêt Y, Latour S, Seidman EG. 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut* 1996;39:401-406.
 27. Cuffari C, Seidman EG, Latour S, Théorêt Y. Quantitation of 6-thioguanine in peripheral leukocyte DNA in Crohn's disease patients on maintenance 6-mercaptopurine therapy. *Can J Physiol Pharmacol* 1996;74:580-585.
 28. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1989;24(suppl 170):2-6, 16-19.
 29. Myren J, Bouchier IAD, Watkinson G, Softley A, Clamp SE, deDombal FT. The O.M.G.E. multinational inflammatory bowel disease survey 1976-1982. A further report on 2,657 cases. *Scand J Gastroenterol* 1984;95(suppl):1-27.
 30. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis. Final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955;2:1041-1044.
 31. Korelitz BI, Present DH. Favorable effect of 6-mercaptopurine on fistulae of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1985;30:58-64.
 32. Hughes LE. Clinical classification of perianal Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 1992;35:928-932.
 33. Szumlanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kelsell D, Spurr N, Lennard L, Wieben E, Weinshilboum R. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol* 1996;15:17-30.
 34. Tai H-L, Krynetski EY, Yates CR, Loennechen T, Fessing MY, Krynetskaia NF, Evans WE. Thiopurine S-methyltransferase deficiency. Two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *Am J Hum Genet* 1996;58:694-702.
 35. Zietkiewicz E, Yotova V, Jarnik M, Korab-Laskowska M, Kidd KK, Modiano D, Scozzari R, Stoneking M, Tishkoff S, Batzer M, Labuda D. Nuclear DNA diversity in worldwide distributed human populations. *Gene* 1997;205:161-171.
 36. Sandborn WJ. A review of immune modifier therapy for inflammatory bowel disease: azathioprine, 6-mercaptopurine, cyclosporine and methotrexate. *Am J Gastroenterol* 1996;91:423-433.
 37. Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Sulphasalazine inhibition of thiopurine methyltransferase: possible mechanism for interaction with 6-mercaptopurine and azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* 1995;39:456-459.
 38. Evans WE, Horner M, Chu YQ, Kalwinsky D, Roberts WM. Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr* 1991;119:985-989.
 39. McLeod HL, Miller DR, Evans WE. Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient heart transplant recipient. *Lancet* 1993;341:1151.
 40. Lennard L, Gibson BES, Nicole T, Lilleyman JS. Congenital thiopurine methyltransferase deficiency and 6-mercaptopurine toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Arch Dis Child* 1993;69:577-579.
 41. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, Relling MV, Evans WE. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med* 1997;126:608-614.
 42. Black AJ, McLeod HL, Capell HA, Powrie RH, Matowe LK, Pritchard SC, Collie-Duguid ES, Reid DM. Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine. *Ann Intern Med* 1998;129:716-718.
 43. Woodson LC, Ames MM, Selassie CD, Hansch C, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase: aromatic thiol substrates and inhibition by benzoic acid derivatives. *Mol Pharmacol* 1994;24:471-478.
 44. Lewis LD, Benin A, Szumlanski CL, Otterness DM, Lennard L, Weinshilboum RM, Nierenberg DW. Olsalazine and 6-mercaptopurine-related bone marrow suppression: a possible drug-drug interaction. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62:464-475.
 45. Szumlanski CL, Scott MC, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human liver enzyme activity. *Clin Pharmacol Ther* 1988;43:134.
 46. Lennard L, Davies HA, Lilleyman JS. Is 6-thioguanine more appropriate than 6-mercaptopurine for children with acute lymphoblastic leukemia? *Br J Cancer* 1993;68:186-190.
 47. Bennet LL, Allan PW. Formation and significance of 6-methylthio-

- purine ribonucleotide as a metabolite of 6-mercaptopurine. *Cancer Res* 1971;31:152.
48. Erb N, Harms DO, Janka-Schaub G. Pharmacokinetics and metabolism of thiopurines in children with acute lymphoblastic leukemia receiving 6-thioguanine versus 6-mercaptopurine. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998;42:266-272.
 49. Collona T, Korelitz BI. The role of leukopenia in the 6-mercaptopurine-induced remission of refractory Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1994;89:362-366.
 50. Bergan S, Rugstad HE, Bentdal O, Sodal G, Hartmann A, Leivestad T, Stokke O. Monitored high dose azathioprine treatment reduces acute rejection episodes after renal transplantation. *Transplantation* 1998;66:334-339.
 51. Schütz E, Gummert J, Mohr FW, Armstrong VW, Oellerich M. Should 6-thioguanine nucleotides be monitored in heart transplant recipients given azathioprine? *Ther Drug Monitoring* 1996;18:228-233.
 52. Markowitz J, Grancher K, Mandel F, Daum F, and the 6-MP Collaborative Group. Relationship of leukopenia to 6-MP induced remission of Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;27:A8.
 53. Colombel JF, Touze I, Catala P, Ferrari N, Libersa C, Marteau P, Gendre JP, Bonaz B, Soule JC, Modigliani R, Broly F. Genotypic analysis of the thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy (abstr). *Gastroenterology* 1999;116:A688.
 54. Lennard L, Davies HA, Lilleyman JS. Is 6-thioguanine more appropriate than 6-mercaptopurine for children with acute lymphoblastic leukaemia? *Br J Cancer* 1993;68:186-190.

Received June 29, 1999. Accepted December 7, 1999.

Address requests for reprints to: Ernest G. Seidman, M.D., Division of Gastroenterology and Nutrition, Sainte-Justine Hospital, 5734, 3175 Cote-St-Catherine Road, Montreal, Quebec, Canada H3T 1C5. e-mail: ernest.seidman@umontreal.ca; fax: (514) 345-4999.

Drs. Sinnett, Théorêt, and Seidman share equal senior authorship.

Supported by the Charles Bruneau Foundation (to D.S. and Y.T.), Fonds de la Recherche en Santé du Québec (Scholarships to D.S. and E.G.S.), and Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (Studentship to S.L.).

Dr. Targan is a Founder of Prometheus Labs; Ste-Justine Hospital and Drs. Sinnett, Théorêt, and Seidman have a royalty agreement for the use of the described tests for the management of IBD with Prometheus Labs.

The authors thank Hughes Sinnett and Sylvain Latour for technical support.

Annexe II : Indice de Harvey Bradshaw

Signes constitutionnels (1 point chacun):

anorexie

fatigue

fièvre

douleur abdominale (bénigne=1, modérée=2, sévère=3)

masse abdominale (douteuse=1, déterminée=2 et sensible=3)

Caratéristiques des selles (1 point chacun):

>3 liquides par jour

urgence

spasme anal douloureux

sang

Complications (1 point chacun):

articulation

cutanés

érythème noueux (inflammation aiguë hypoderme)

ulcères de la muqueuse (bucale, génitale)

maladie cutanée purulente

inflammation de l'uvéïe (iris, corps ciliaire, choroïde)

fistule

abcès

fissure.

(0-5 rémission, 5-10 rechute bénigne, 10-15 rechute modérée, 15 et + rechute sévère)

Remerciements

J'aimerais remercier le Dr Yves Théorêt qui m'a fait confiance, il y a trois ans, lorsque je me suis présenté à la porte de son laboratoire pour un stage d'été. Tout d'abord, merci de m'avoir guidé vers cette voie de la pharmacologie qu'est la pharmacogénétique, j'y ai énormément appris autant du point de vue académique que personnel, merci de m'avoir formé, épaulé et encouragé au cours de ces trois années. J'ajouterais, pour répondre à une question existentielle : « Non, je ne regrette nullement mon passage dans ton laboratoire, ce fut une expérience très enrichissante ». Finalement, merci pour ton amour de la recherche et des enfants, puisque c'est pour eux que tu le fais jours après jours. J'aimerais tout autant remercier le Dr Daniel Sinnett qui a fait confiance au Dr Théorêt quant au choix du candidat qui allait effectuer les travaux de recherche sur ce sujet d'intérêt commun qui flottait dans les airs depuis quelques temps. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir dirigé et soutenu. Merci pour ton sens de l'organisation, pour ton esprit critique et pour ta rigueur scientifique.

Je voudrais aussi remercier les Drs Damian Labuda et Maja Krajinovic pour leurs judicieux conseils et leurs commentaires constructifs. Je tiens à remercier les médecins, les infirmières et les pharmaciens qui m'ont été d'une aide très précieuse pour les questions d'ordres médicales. Plus particulièrement, merci aux Drs Ernest Seidman et Albert Moghrabi pour leur aide concernant les patients avec une maladie inflammatoire de l'intestin et avec une leucémie lymphoblastique aiguë, respectivement.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du centre de recherche du Pavillon Charles Bruneau de l'Hôpital Sainte-Justine, avec lesquels j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler : Géraldine, Hugues, Sylvain, Chantal, Nicolas, Gino, Anne-Julie, Andrej, Zeina, Alexandre, Vania, Ulrike, Ewa, Raffaëla, Émilie, Martin, Dominik, Nathalie, Maryse, Sylvain, Richard et Manon.

Finalement, merci à mes parents, ma sœur et mon chum, pour leur présence et leurs encouragements constants.

Ce projet a été réalisé grâce au soutien financier du Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche, de la Fondation Charles Bruneau et du Fonds de la Recherche en Santé du Québec.