

Université de Montréal

Pharmacogénétique du DHFR chez les enfants leucémiques

par
Fidaa Al-Shakfa

Département de Pharmacologie
Faculté de médecine

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

Avril 2009

© Fidaa Al-Shakfa, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Pharmacogénétique du DHFR chez les enfants leucémiques

présenté par :

Fidaa Al-Shakfa

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Denis DeBlois
président-rapporteur

Dr Maja Krajinovic
directrice de recherche

Dr Jean-François Gauchat
membre du jury

Résumé

Le dihydrofolate réductase (DHFR) est la principale cible du méthotrexate, un important composant du traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA). Une association des polymorphismes du promoteur de DHFR avec l'issue de la LLA a été mise en évidence au laboratoire. Une survie sans événement (EFS) réduite corrélait avec les allèles A₋₃₁₇ et C₋₁₆₁₀, et l'haplotype *1, défini par ces allèles. L'haplotype *1 était aussi associé à une expression élevée du DHFR. Dans cette étude, nous étendons l'analyse à la région régulatrice adjacente, d'environ 400 pb, correspondant au transcrit mineur non-codant du DHFR, qui joue un rôle essentiel dans la régulation de la transcription au niveau du promoteur majeur. Six polymorphismes ont été identifiés, parmi lesquels 5 étaient des SNPs et un polymorphisme de longueur composé d'un nombre variable d'éléments de 9 pb et d'une insertion/délétion de 9 pb. L'analyse d'haplotype, incluant tous les polymorphismes promoteurs, a révélé une diversification de l'haplotype *1 en 5 sous-types (*1a à *1e). Les variations du promoteur majeur et les sous-types de l'haplotype *1 ont été par la suite analysés pour l'association avec l'issue de LLA. Un EFS réduit corrélait avec l'allèle A du polymorphisme G₃₀₈A (p=0,02) et avec l'haplotype *1 (p=0,01). Des niveaux élevés d'ARNm étaient trouvés chez les porteurs de l'haplotype *1b (p=0,005) et pas pour les autres sous-types de l'haplotype *1. Alors, la mauvaise issue de LLA associée avec l'haplotype *1 est en effet déterminée par le sous-type *1b.

Cette étude donne un nouvel aperçu des polymorphismes régulateurs du DHFR définissant plus précisément les variations du DHFR prédisposant un événement.

Mots-clés : pharmacogénétique, leucémie lymphoblastique aiguë (LLA), méthotrexate (MTX), polymorphismes, dihydrofolate réductase (DHFR), survie sans événement (EFS)

Abstract

Dihydrofolate reductase (DHFR) is the major target of methotrexate, a key component in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment. We recently reported an association of DHFR promoter polymorphisms with ALL outcome. Lower event free survival (EFS) correlated with the alleles A₋₃₁₇ and C₋₁₆₁₀, and with haplotype *1, defined by these alleles. Haplotype*1 was also associated higher DHFR expression. Here we extended the analysis to adjacent 400bp regulatory region corresponding to non-coding minor DHFR transcript which plays an essential role in the regulation of transcription from the major promoter. Six polymorphisms were identified, of which 5 were SNPs and one length polymorphism composed of variable number of 9bp elements and 9bp insertion/deletion. Haplotype analysis including all promoter polymorphisms revealed diversification of haplotype *1 into 5 subtypes (*1a to *1e). Major promoter variations and haplotype *1 subtypes were subsequently analyzed for the association with ALL outcome. Lower EFS correlated with an A allele of G₃₀₈A polymorphism (p=0.02) and with *1b haplotype (p=0.01). Higher mRNA levels were found in the carriers of *1b haplotype (p=0.005) and not for remaining haplotype *1 subtypes. So, the worse ALL outcome associated with haplotype *1 is actually determined by the subtype *1b. The study provides a new insight into DHFR regulatory polymorphisms defining more precisely event-predisposing DHFR variations.

Key Words: pharmacogenetics, acute lymphoblastic leukemia (ALL), methotrexate (MTX), polymorphisms, dihydrofolate reductase (DHFR), event free survival (EFS)

Tables des matières

Résumé.....	III
Abstract.....	V
Tables des matières	VII
Liste des tableaux.....	IX
Listes des figures.....	X
Liste des abréviations	XI
Dédicace.....	XIII
Remerciements.....	XIV
Préambule.....	XV
Introduction.....	1
A. Leucémie lymphoblastique aiguë.....	1
1. Définition et présentation.....	1
2. Épidémiologie.....	3
3. Facteurs environnementaux et génétiques.....	3
4. Facteurs pronostiques.....	4
5. Traitements thérapeutiques.....	5
B. La pharmacogénétique et son importance.....	8
1. Description.....	8
2. Variations génétiques.....	11
3. Approches pharmacogénétiques et pharmacogénomiques.....	13
4. Méthodes de génotypage.....	14
C. Le méthotrexate dans le traitement de la LLA.....	17
1. Mode d'action de MTX.....	17
2. Résistance au MTX.....	19

3. Pharmacogénétique du MTX.....	20
D. DHFR : gène d'intérêt.....	23
1. Présentation du gène.....	23
2. DHFR : élément-clé dans la réponse au MTX	24
3. Nouveau mécanisme de régulation.....	24
4. Étude du promoteur.....	25
Hypothèses et objectifs.....	27
Présentation par article.....	29
Discussion.....	58
Conclusion.....	67
Références.....	68
Annexe : accord des coauteurs.....	I

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Protocoles successifs de DFCI pour le traitement de la LLA	7
II	Mécanismes de résistance au MTX dans les tumeurs expérimentalement induites	20

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Fréquence des altérations génétiques dans la LLA chez les enfants	2
2	Classification du risque de la LLA pédiatrique à l'hôpital Ste-Jude	5
3	Amélioration de la probabilité de la survie sans événement (EFS) au cours des 4 dernières décennies	5
4	La pharmacogénétique dans le développement du médicament	11
5	Représentation d'un haplotype	12
6	Association entre un marqueur et une réponse thérapeutique	13
7	Exemple d'un résultat d'ASO	15
8	Le DHPLC	16
9	Représentation de l'action du MTX	18
10	Le gène de DHFR	23
11	Les polymorphismes au promoteur majeur identifiés à partir de dbSNP	59
12	Les polymorphismes identifiés au promoteur majeur	60
13	Diversification de l'haplotype *1 en 5 sous-types	61
14	La répression de la transcription du transcrit majeur par le transcrit mineur	63

Liste des abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique

AICART : aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase

ARNm: acide ribonucléique messenger

ASO : Allele Specific Oligonucleotide

DFS: disease free survival

DHF: dihydrofolate

DHFR: dihydrofolate réductase

DHPLC : Denaturing High Performance Liquid Chromatography

dTMP : deoxythymidylate

dUMP : deoxyuridylate

EFS: event free survival (survie sans événement)

FDA : Food and Drug Administration

FPGS : folypolyglutamate synthase

GART : glycinamide ribonucleotide transformylase

LLA : leucémie lymphoblastique aiguë

MRP : multi-drug resistance associated protein

MTHFD1 : 5,10-méthylentetrahydrofolate dehydrogénase

MTHFR: 5,10-méthylentétrahydrofolate réductase

MTX: méthotrexate

MTX-PG : méthotrexate-polyglutamate

OS : overall survival

pb: paire de bases

RFC1 : reduced folate carrier

RFLP: restriction fragment length polymorphism

SNP: single nucleotide polymorphism

SP: specificity protein

TFIIB: transcription factor II B

THF: tétrahydrofolate

TPMT: thiopurine S-méthyltransférase

TS: thymidylate synthase

UGT1A1: UDP-glucuronosyltransferase 1A1

WBC: white blood cell count

Dédicace

À mes parents, sans vous, je n'aurais pas arrivé jusqu'à ici. Mes infimes remerciements envers vous ne suffiront pas!

À ma famille, mes sœurs et mon frère, vous me rappelez de mes souvenirs d'enfance.

À mon épouse, une amie à vie, je n'oublierai pas ton soutien que tu m'as donné.

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier ma directrice de recherche Maja Krajinovic pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et supervisé tout au long de ma maîtrise. J'ajouterais aussi ses critiques qui m'ont été bien constructifs, sans surtout oublier sa confiance en moi.

Je remercie également les Drs Sinnett et Labuda pour les discussions et commentaires enrichissants lors des lab-meetings et journal clubs.

Enfin, je tiens à remercier tous mes collègues au laboratoire qui m'ont aidé à la réalisation de ce travail par leurs soutien et partage d'expériences.

Préambule

La leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) est la forme la plus courante des cancers pédiatriques, constituant environ 25% de ces cancers. Le traitement intensif de la maladie avait conduit à une amélioration impressionnante au niveau des taux de guérison, qui est, de nos jours, plus de 80%. Cependant, ce fait cache des taux de réussite variés qui sont fortement dépendants des caractéristiques de la maladie et de la personne traitée. Dans certains patients, l'échec du traitement survient en raison de la résistance au médicament, rendant alors la LLA la principale cause de décès reliés au cancer. De plus, le traitement intensif a des conséquences significatives à long terme. On peut noter un risque augmenté des tumeurs malignes secondaires, un retard de la croissance, des anomalies osseuses, une neurotoxicité ou des troubles cognitifs.

Dans ce contexte, le méthotrexate (MTX), un des principaux médicaments pour le traitement de la LLA, a contribué à l'amélioration des taux de guérison, mais aussi a montré des réponses thérapeutiques variables parmi les enfants leucémiques. En effet, on voit développer chez certains individus une résistance au MTX ce qui peut alors mettre en cause l'efficacité du traitement.

Le MTX est un antagoniste de l'acide folique. Le mécanisme majeur de son action implique l'inhibition compétitive de l'enzyme dihydrofolate réductase (DHFR). Le DHFR constitue notre point d'intérêt, car il joue un rôle important dans le développement de la résistance au MTX. Des études ont relevé qu'une altération des niveaux d'expression du DHFR était associée avec la résistance au MTX. Une différence au niveau d'expression du DHFR pourrait être due, en une

partie, aux polymorphismes fonctionnels des régions régulatrices du gène DHFR. L'analyse de ces polymorphismes, combinés à d'autres analyses, pourraient permettre d'établir un traitement individualisé pour les patients leucémiques.

Introduction

A. Leucémie lymphoblastique aiguë

1. Définition et présentation

La leucémie est une maladie complexe touchant les cellules sanguines. Elle est classifiée en différentes formes dépendamment de la lignée cellulaire affectée : myéloïde ou lymphoïde, et du niveau de différenciation cellulaire : aiguë si les cellules sont indifférenciées et la progression de la maladie est rapide, ou chronique dans le cas où les cellules sont plus différenciées et la progression de la maladie est moins rapide [1].

La leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) est la forme de leucémie la plus commune chez les enfants. Elle survient à partir d'une cellule lymphoïde progénitrice ayant accumulées des altérations génétiques donnant ensuite lieu à une prolifération monoclonale non-contrôlée de lymphoblastes dont la différenciation est bloquée [2].

La LLA est une maladie hétérogène. Pour cette raison, la LLA est classifiée selon différents critères, parmi lesquels on peut en nommer deux : critères immunophénotypique et cytogénétique.

L'immunophénotypage est très employée pour classifier la LLA. Elle permet de différencier les lignées myéloïdes ou lymphoïdes de la leucémie. De plus, ce test

définit les lymphocytes de lignée B ou T et leur stade de différenciation. La cytométrie de flux est une technique utilisée pour l'immunophénotypage [3].

L'analyse cytogénétique permet de détecter les anomalies chromosomales de nombre (hyperdiploïdie, hypodiploïdie et trisomie) et les translocations, étant fréquentes dans la LLA. L'hyperdiploïdie et la translocation t(12,21) compte pour plus de 50% des cas [2, 4]. En plus de pouvoir classifier les sous-types de la LLA, l'analyse cytogénétique fournit de l'information pronostique nécessaire pour définir le traitement.

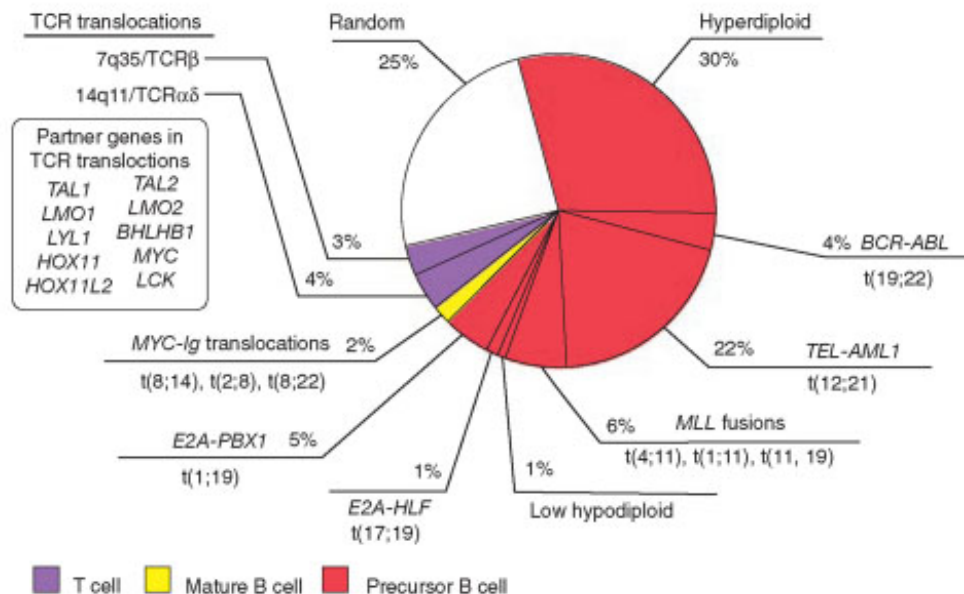


Figure 1 : Fréquence des altérations génétiques dans la LLA chez les enfants [2].

2. Épidémiologie

La LLA est le cancer le plus fréquent chez les enfants, englobant 25% des cancers pédiatriques. Annuellement, 2400 cas sont diagnostiqués aux Etats-Unis [5]. Le pic d'incidence est situé entre 2-5 ans [1]. La LLA pré-B, la forme dominante, représente 85% des cas, alors que la LLA pré-T compte pour 15% des cas. La LLA de cellules B matures ne dépasse pas le 1%.

3. Facteurs environnementaux et génétiques

Étant donné que le pic d'incidence est entre 2-5 ans, il est suggéré que le développement de leucémie a lieu *in utero* ou tôt dans l'enfance [6]. Plusieurs facteurs environnementaux augmentent le risque de développer la LLA. L'exposition aux radiations ionisantes, à certains produits chimiques comme : les solvants organiques, le benzène et la peinture, et aux pesticides, confère un risque de développement de la LLA [1, 7, 8] .

D'un autre côté, des polymorphismes fonctionnels au niveau de certains gènes codant pour des enzymes responsables du métabolisme des carcinogènes (CYP2E1, CYP1A1, GSTM1, GSTP1, NAT2, NQO1) sont associés avec une importante susceptibilité à la LLA [6, 9-11].

4. Facteurs pronostiques

Les facteurs pronostiques sont déterminés dans le but de mieux orienter la thérapie.

Comme facteurs de bon pronostic, il y a l'âge entre 1-9 ans, le sexe féminin, un décompte de leucocytes inférieur (WBC) à $50000/m^3$, la couleur de peau blanche, un index d'ADN* supérieur à 1.16, les LLA pré-B, la translocation t(12,21), les trisomies 4 et 10.

Les facteurs de mauvais pronostic incluent l'âge inférieur à un an et supérieur à 9 ans, le sexe masculin, un WBC supérieur à $50000/m^3$, la couleur de peau noire, un index d'ADN inférieur à 1.16, les LLA pré-T, les translocations t(4,11) et t(9,22) [12].

À l'aide des facteurs pronostiques, les patients sont stratifiés en groupes d'individus en fonction du risque de la maladie. Dans certains protocoles de traitement, il y a 3 niveaux de risque : standard, élevé et très élevé [13], (figure 2).

Cette stratification permet d'adapter une thérapie appropriée aux patients. Plus le risque est élevé, plus le traitement devient intensif.

* index d'ADN : ratio du contenu relatif d'ADN dans les cellules tumorales versus les cellules normales.

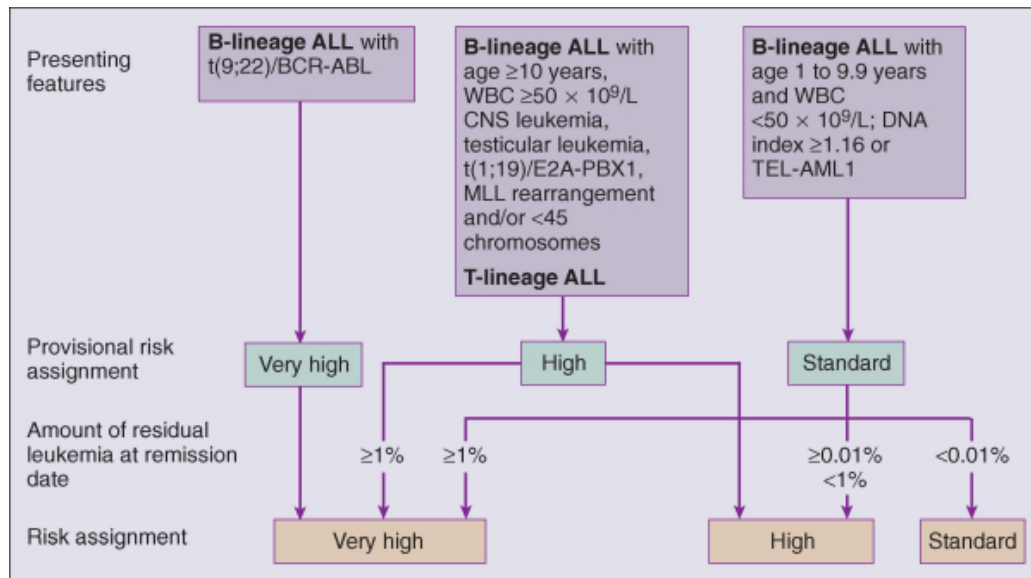


Figure 2 : Classification du risque de la LLA pédiatrique à l'hôpital Ste-Jude [13].

5. Traitements thérapeutiques

Le progrès dans le traitement de la LLA a mené à une amélioration des taux de guérison qui atteignent aujourd'hui 80% contre 10% il y a 40 ans [14, 15].

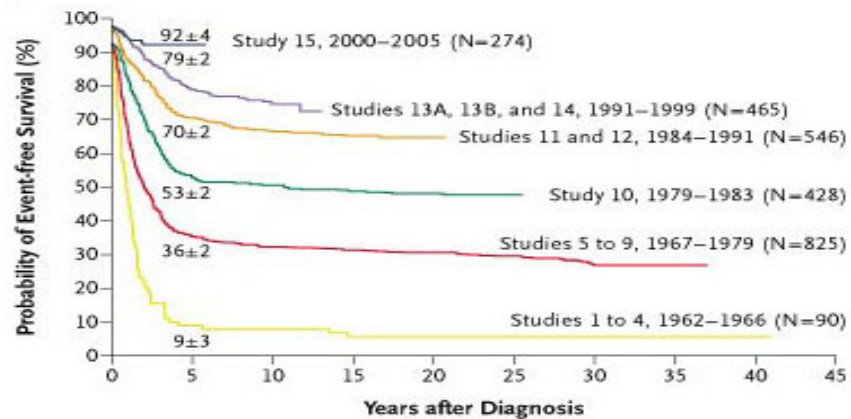


Figure 3 : Amélioration de la probabilité de la survie sans événement (EFS) au cours des 4 dernières décennies [14].

Il existe plusieurs protocoles pour le traitement de la LLA. Parmi ces protocoles, il y a ceux du Dana Farber Cancer Institute, DFCI (tableau I) [16], qui sont par ailleurs utilisés à l'hôpital Ste-Justine. Généralement, le traitement est divisé en 4 phases [1, 2]:

Induction-rémission (4 semaines) :

L'objectif est d'induire une rémission complète en éradiquant plus de 99% des cellules leucémiques et de restaurer une hématopoïèse normale.

Traitement du système nerveux central (3 semaines) :

Essentiellement, elle aide à prévenir les rechutes au niveau du système nerveux central.

Intensification ou consolidation (environ 30 semaines) :

Une série de cycles (3 semaines) de chimiothérapie compose cette phase dans le but de réduire le nombre des cellules leucémiques.

Maintenance (2 ans):

Le but dans cette phase est de maintenir la rémission.

Tableau I : Protocoles successifs de DFCl pour le traitement de la LLA [16].

Protocol	87-01	91-01	95-01	2000-01
Investigational window	Asp x 1 dose (randomized)	Steroids x 3 days (randomized)		
Induction (4 weeks)	Vincristine 1.5 mg/m ² q week Prednisone 40 mg/m ² /day Doxorubicin 30 mg/m ² x 2 doses Mix 40 mg/m ² 4 g/m ² (randomized) I.T. Ara-C (dosed by age)	Vincristine 1.5 mg/m ² q week Prednisone 40 mg/m ² /day Doxorubicin 30 mg/m ² x 2 doses Mix 4 g/m ² I.T. Ara-C (dosed by age)	Vincristine 1.5 mg/m ² q week Prednisone 40 mg/m ² /day Doxorubicin 30 mg/m ² x 2 doses Mix 4 g/m ² Asparaginase 25,000 U x 1 dose I.T. Ara-C (dosed by age) D0 I.T. Ara-C + Mix + He D16	Vincristine 1.5 mg/m ² q week Prednisone 40 mg/m ² /day Doxorubicin 30 mg/m ² x 2 doses, associated with dextrazoxane for all HR patients Mix 4 g/m ² Asparaginase 2,500 IU x 1 dose I.T. Ara-C (dosed by age) D0 I.T. Ara-C + Mix + He D14
CNS treatment (3 weeks)	I.T. Mix + Ara-C x 2/ weeks for 2 weeks then q 18 weeks (SR) + cranial XRT 1,800 cGy (HR)	I.T. Mix + Ara-C x 2/week for 2 weeks then q 18 weeks (SR girls) + cranial XRT 1,800 cGy (SR boys and HR)	I.T. Mix + Ara-C x 2/week for 2 weeks then x 1/9 week for 6 weeks then q18 weeks or as HR patients in 91-01 (randomized) + cranial XRT 1,800 cGy (8 or 10 fractions, randomized)	I.T. Ara-C + Mix + HC x 2/week for 2 weeks then q 9 week x 6 then q18 weeks (SR) or as HR patients in 91-01 (HR) x 2 + cranial XRT 1,200 cGy (HR CNS neg) or 1,800 cGy (HR CNS pos)
Intensification (≈30 weeks), q 3-week cycles	SR: VCR 2 mg/m ² i.v. x 1 dose 6-MP 50 mg/m ² /day p.os x 14 d Pred 40 mg/m ² /day x 5 days Mix 30 mg/m ² i.m. q week Asp 25,000 U/m ² i.m. q week x 20	SR: idem 87-0; except Dexa 6 mg/m ² /day x 5 days (instead of Pred)	SR: idem 87-01	SR: idem 87-01 except randomization between Pred and Dexa Asparaginase 25,000 U fixed dose or individualized dosing x 30
	HR: idem SR patients except Pred 120 mg/m ² /day x 5 days Dox 30 mg/m ² q 3 weeks up to cumulative dose of 360 mg/m ²	HR: idem 87-01 except Dexa 18 mg/m ² /days x 5 days (instead of pred) Dox cumulative dose: 360 mg/m ²	HR: idem 87-01 except randomization for dextrazoxane with Dox Dox cumulative dose: 300 mg/m ²	HR: idem 87-01 except dextrazoxane for all patients Dox cumulative dose: 300 mg/m ²
	VHR: idem HR plus Mix 130 mg/m ² i.v. x 2 doses Ara-C 100 mg/kg q 12h x 6	VHR: idem HR plus Mix 130 mg/m ² i.v. x 2 doses Ara-C 100 mg/kg q 12h x 6		
Maintenance (until 2 years following CR)	Idem intensification without Asp	Idem 87-01	Idem	Idem

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

B. La pharmacogénétique et son importance

1. Description

Un problème qu'on peut rencontrer lors du traitement thérapeutique est que les patients répondent différemment aux médicaments et leur profil de toxicité varie d'un individu à un autre. Des déterminants génétiques expliqueraient, en partie, cette variabilité.

La pharmacogénétique constitue une discipline permettant d'étudier l'interaction entre la variabilité génétique et la réponse au médicament chez un individu. L'analyse pharmacogénétique peut se faire au niveau pharmacocinétique ou pharmacodynamique du médicament. De nos jours, les termes pharmacogénétique et pharmacogénomique sont souvent employés pour signifier la même chose. Or, il y a une petite nuance à faire. En effet, la pharmacogénomique, à l'opposition de la pharmacogénétique, englobe l'étude de l'ensemble des gènes, le génome.

L'objectif ultime de toute étude pharmacogénétique est de pouvoir personnaliser le traitement thérapeutique. Ceci passe en maximisant l'effet du médicament et en diminuant sa toxicité. Il est bien évident que les études pharmacogénétiques visent en particulier les médicaments avec un index thérapeutique étroit, puisque des variations au niveau de la réponse ou de la toxicité risquent de compromettre l'effet de ces médicaments.

De nombreuses applications pratiques de la pharmacogénétique ont vu le jour.

Les polymorphismes génétiques de l'enzyme thiopurine S-méthyltransférase (TPMT) constituent un exemple classique d'application clinique de la pharmacogénétique. Le TPMT catalyse la S-méthylation des thiopurines comme l'azathioprine et la 6-mercaptopurine. 3 allèles sont responsables pour plus de 95% des profils d'activités réduites de TPMT : TPMT*2, TPMT*3A et TPMT*3C [17-20]. Les individus hétérozygotes et homozygotes mutants ont une activité de TPMT respectivement intermédiaire et très diminuée. Comme conséquence, ces individus auront des niveaux plasmatiques élevés de thiopurines, et donc développeront une toxicité hématopoïétique intermédiaire ou sévère pouvant être fatale, dans le cas des homozygotes mutants, lorsque les thiopurines sont administrés à la dose conventionnelle [21, 22]. C'est pourquoi la FDA recommande d'effectuer un test de génotype de TPMT avant l'administration de la 6-mercaptopurine [23]. D'ailleurs, dans le but d'identifier les personnes à risque, différents tests de diagnostic ont été développés par certaines compagnies, comme c'est le cas de Prometheus [24].

Un autre exemple d'application de la pharmacogénétique est la prédiction de la toxicité de l'irinotecan, un médicament utilisé dans le traitement du cancer colorectal. La conjugaison du SN-38, le métabolite actif de l'irinotecan, est assurée par l'UDP-glucuronosyltransférase 1A1 (UGT1A1) [25]. Un polymorphisme, le UGT1A1*28, constitué d'une répétition supplémentaire de TA dans la boîte de TATA existe au niveau du promoteur de ce gène. Ce

polymorphisme est associé avec une diminution de la transcription d'UGT1A1 [26]. Plusieurs études ont montré l'association entre le variant UGT1A1*28 et des niveaux plasmatiques élevés entraînant une toxicité [25, 27, 28]; diarrhée et leucopénie ont été observées. En 2005, la FDA a changé l'étiquetage de l'irinotecan pour ajouter la recommandation de diminuer la dose du médicament chez les porteurs du UGT1A1*28 [29, 30].

D'un autre côté, la pharmacogénétique prend de plus en plus sa place dans le développement de médicaments, et ce suite à la recommandation de la FDA [31]. Conduites surtout en phases II et III, les études pharmacogénétiques constituent un outil intéressant pour les compagnies pharmaceutiques. On sait qu'un certain nombre de médicaments ont un taux réduit d'efficacité. La variabilité de la réponse au médicament l'explique. Or, en stratifiant les individus lors des phases cliniques selon leur profil génétique, on augmente les possibilités du succès du médicament et on aura des individus qui répondent mieux. De plus, comme on cible des sous-groupes de patients, le nombre d'individus à recruter dans les essais cliniques diminue, ce qui en résulte une réduction des coûts et des durées des essais cliniques [32]. L'herceptin est un exemple classique de l'utilisation de la pharmacogénétique dans le développement du médicament. Cette drogue est un anti-corps mono-clonal qui cible le récepteur HER2/neu, surexprimé chez près de 20% des femmes atteintes de cancer du sein. Une identification de la surexpression de ce récepteur, par des techniques comme l'immuno-histochimie, est requise pour la prescription de l'herceptin [33].

Drug R&D Phases	Number of Compounds	Number of Individuals	Goals	Benefits of Genomics/Pharmacogenomics
Phase I	5	15-40	Study of short-term toxicity and pharmacokinetics in humans	None, due to too few individuals for statistical analysis
Phase IIa, IIb	3	100-300	IIa: Initial evaluation of efficacy, pharmacokinetics & side effect liability in a targeted patient population IIb: Pivotal double blind placebo controlled efficacy trial	Use of previously identified coding polymorphisms influencing the activity of the target ⇨ Selection of individuals in order to increase the chances of seeing a therapeutic response
Phase III	2	1000-5000	Second pivotal trial for registration. ⇨ Exposure of patients to compound for more than 1 year	Identification of polymorphisms associated with response and/or side-effects ⇨ Individual tailoring based on predictive tests Identification of the biological mechanisms responsible for side-effects. ⇨ Development of new drugs in other indication

Figure 4: La pharmacogénétique dans le développement du médicament [34].

2. Variations génétiques

Les être humains sont génétiquement identiques à 99,9%. Le 0,1% qui reste constitue des variations: c'est en effet de là que vient la diversité génétique de l'Homme. Généralement, une variation génétique peut être définie comme un polymorphisme si sa fréquence est supérieure à 1%. Il existe différents types de polymorphismes. On peut nommer principalement : le polymorphisme nucléotide simple (SNP) et le polymorphisme de nombre de copie variable, où les allèles sont de différente longueur.

Les SNPs, généralement sous la forme bialléliques, sont les variations génétiques les plus communes. C'est pourquoi alors qu'ils sont des marqueurs de choix dans les études pharmacogénétiques. De plus, ils sont faciles à analyser. Un SNP peut

être localisé n'importe où dans gène. Un rSNP est localisé dans les régions régulatrices comme le promoteur, 5'UTR et 3'UTR. Un SNP peut être aussi dans un intron ou dans un exon sous la forme synonyme ou non-synonyme. Dans une étude pharmacogénétique, on s'intéresse plus aux SNPs ayant un potentiel fonctionnel. Un rSNP entraîne un changement quantitatif, alors qu'un SNP localisé dans une région codante et entraînant une modification non-synonyme cause un changement qualitatif.

Souvent, lorsqu'on mène des études d'association, on procède par l'analyse d'haplotypes, car elle est généralement plus informative que l'analyse d'un polymorphisme à la fois. Un haplotype est une combinaison des allèles des polymorphismes sur un même chromosome. Pour construire les haplotypes, on se base sur le déséquilibre de liaison entre les polymorphismes, qui est une association, non due au hasard, entre deux allèles. Le coefficient de corrélation r^2 est utilisé pour exprimer la corrélation entre deux polymorphismes.

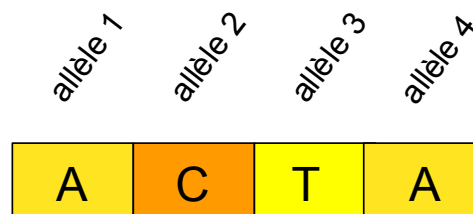


Figure 5 : Représentation d'un haplotype.

3. Approches pharmacogénétiques et pharmacogénomiques

Lorsqu'une étude pharmacogénétique est menée, on s'attend à déterminer s'il existe une association entre la réponse thérapeutique et les polymorphismes génétiques en question. Souvent, les polymorphismes analysés ne sont que des marqueurs pour le variant causatif qui n'est pas "visible" (figure 6). Mais, il est plus probable qu'un polymorphisme associé à une réponse thérapeutique donnée soit un variant causatif lorsqu'il est fonctionnel.

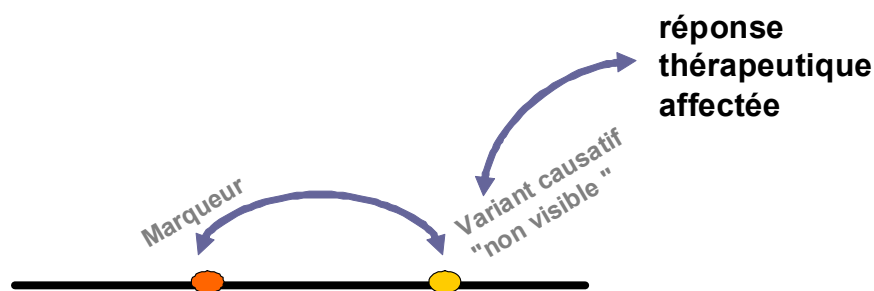


Figure 6: Association entre un marqueur et une réponse thérapeutique.

Il existe deux approches pour mener des études pharmacogénétiques / pharmacogénomiques : une approche par gènes candidats et une autre appelée criblage génomique ou *genome-wide screen*.

a) Approche par gènes candidats

C'est une approche traditionnelle qui requière une connaissance préalable des gènes impliqués dans la pharmacodynamie ou pharmacocinétique des médicaments. De nombreuses études pharmacogénétiques ont été conduites selon

cette approche [35]. Les avantages de cette approche sont des coûts plus faibles et la présence de peu de faux positifs. Comme inconvénient, l'approche par gènes candidats est limitée par la connaissance des gènes.

b) Criblage génomique

Le criblage génomique est une approche plus globale permettant d'analyser l'ensemble de tous les gènes impliqués potentiellement dans la réponse thérapeutiques, et ce sans une connaissance préalable des gènes.

Pour ce faire, on utilise des marqueurs aléatoires espacés, généralement des SNPs, couvrant l'ensemble du génome. Basée sur le principe de déséquilibre de liaison, qui suppose une association non aléatoire entre les marqueurs et le locus à risque, l'approche de criblage génomique permet d'identifier une région du génome présentant une susceptibilité pour une maladie ou une mauvaise réponse thérapeutique. Cette région peut contenir un ou plusieurs gènes de susceptibilité. Une analyse plus raffinée de la région en question est requise afin de déterminer plus précisément les SNPs associés avec la maladie ou la mauvaise réponse thérapeutique [34]. Il existe différentes technologies permettant d'effectuer un criblage génomique : les puces d'ADN d'Affymetrix ou Illumina constituent un bon exemple.

Cette approche génère de très nombreuses informations. Cependant, cet avantage est accompagné par des coûts plus élevés et la présence de plusieurs faux positifs. À l'opposé de l'approche par gènes candidats, le criblage génomique nécessite un échantillon de plus grande taille.

4. Méthodes de génotypage

On peut classer les méthodes de génotypage en deux catégories : génotypage des polymorphismes connus et génotypage des polymorphismes inconnus. Voici quelques exemples de méthodes pour ces deux catégories :

a) Génotypage des polymorphismes connus

ASO-PCR : on amplifie les fragments d'ADN par PCR. Le produit PCR est ensuite transféré sur deux membranes. Sur la première membrane, on fait hybrider une sonde marquée de l'allèle sauvage, et sur la deuxième, une sonde marquée de l'allèle mutant [36, 37].

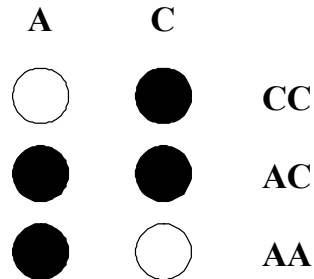


Figure 7 : Exemple d'un résultat d'ASO.

RFLP (restriction fragment length polymorphism) : à l'aide d'enzymes de restriction, on génère des fragments d'ADN dont la taille diffère selon l'allèle en question [37].

b) Génotypage des polymorphismes inconnus

Séquençage : cette technique permet de déterminer la série des nucléotides sur un fragment d'ADN. Elle est très pratique aussi pour génotyper de nombreux polymorphismes sur un même fragment.

DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography): C'est plutôt une technique de détection des polymorphismes. Les fragments d'ADN sont d'abord amplifiés par PCR. Sous des conditions de dénaturation, les fragments d'ADN sont séparés. Ensuite, un rappariement de ces fragments donne 2 homoduplexes et 2 hétéroduplexes. Sur colonne en conditions dénaturantes, ces duplex sont séparés. La mobilité des hétéroduplexs est différente de celle des homoduplexes [37].

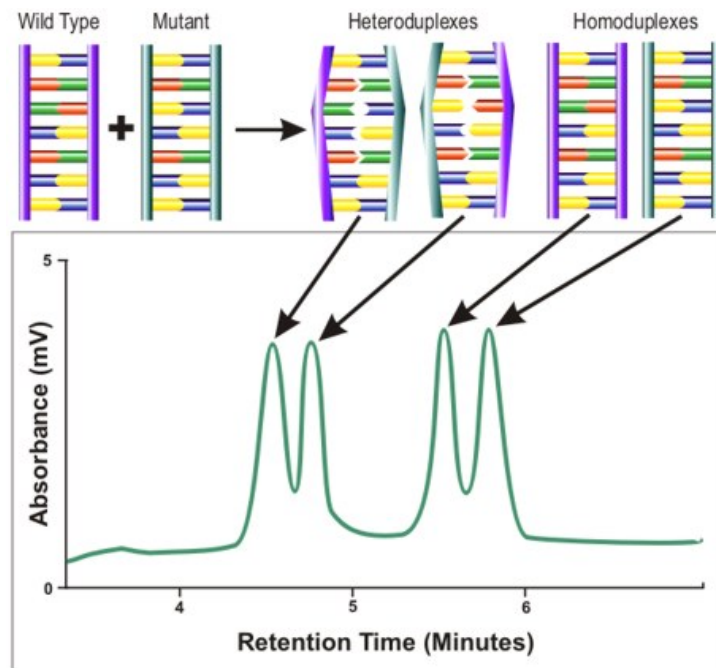


Figure 8 : Le DHPLC [38].

C. Le méthotrexate dans le traitement de la LLA

1. Mode d'action de MTX

Le MTX est parmi les importants composés utilisés pour le traitement de la LLA. Un antagoniste de l'acide folique, le MTX inhibe compétitivement l'enzyme DHFR, qui a comme rôle de réduire le dihydrofolate (DHF) en tetrahydrofolate (THF), une forme active de folate. Cette inhibition a pour effet d'abimer la régénération de THFs, ce qui en résulte un manque en THFs.

Les THFs sont des cofacteurs essentiels pour plusieurs réactions. Le 5-methyl-THF, un dérivé de THF produit par l'enzyme 5,10-méthylènetetrahydrofolate réductase (MTHFR) à partir de 5,10-methylene-THF, est un coenzyme pour la méthylation d'homocystéine pour donner de la méthionine. Des niveaux réduits en 5-methyl-THF altèrent la réaction de méthylation ce qui entraîne une hyperhomocysteinemia et une hypométhylation de l'ADN [39]. Le même substrat du MTHFR, le 5,10-methylene-THF, est nécessaire pour la conversion du deoxyuridylate (dUMP) en deoxythymidylate (dTMP), catalysée par l'enzyme thymidylate synthase (TS). Le 5,10-methylene-THF est aussi un substrat pour le 5,10-méthylènetetrahydrofolate dehydrogénase (MTHFD1) qui convertit ce dérivé en 10-formyl-THF, un cofacteur important pour la synthèse des purines.

Comme les THFs sont alors nécessaires pour la synthèse des purines et pyrimidines, leur manque entraîne l'inhibition de la réplication d'ADN, et il y a alors mort cellulaire au sein des populations de cellules proliférantes [40].

Le MTX agit également sous la forme de polyglutamate (MTX-PG). La polyglutamation a lieu par l'ajout des résidus de glutamate. Cette réaction est catalysée par la folypolyglutamate synthase (FPGS). Les MTX-PGs ont un effet d'inhibition plus important, car ils sont retenus plus longtemps dans la cellule. Ils affectent aussi plus de cibles que le MTX. En plus du DHFR, l'inhibition par les MTX-PGs touche les enzymes impliqués dans la synthèse des dTMP et purines : TS, glycinamide ribonucleotide transformylase (GART) et aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase (AICART). Il est intéressant de noter que l'inhibition d'AICART entraîne une relâche d'adénosine, ce qui en résulte une action anti-inflammatoire [41]. Les MTX-PGs sont dégradés par l'enzyme γ -glutamyl hydrolase (GGH). L'influx du MTX dans la cellule est principalement assuré par le reduced folate carrier (RFC 1), alors que son efflux est assuré par le multi-drug resistance associated protein (MRP).

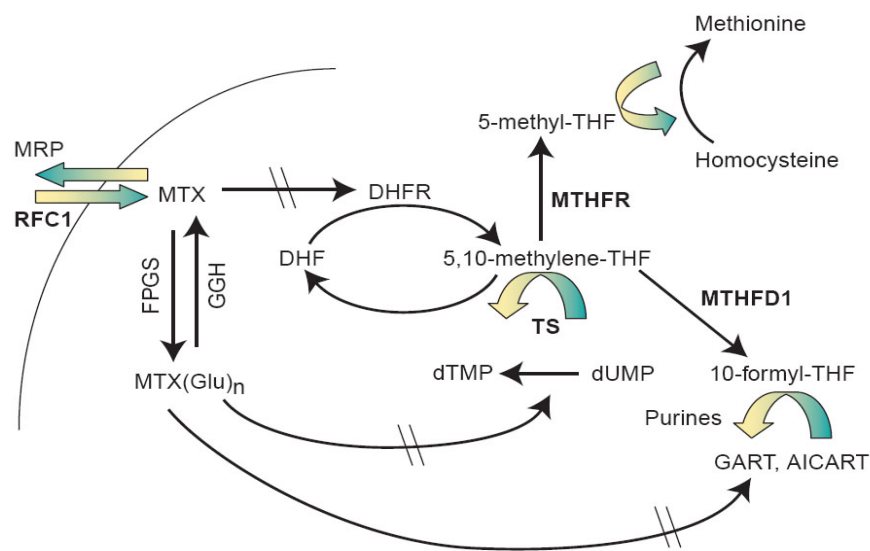


Figure 9 : Représentation de l'action du MTX [40].

2. Résistance au MTX

La réponse thérapeutique aux MTX chez les patients leucémiques est variable. En effet, certains peuvent développer une résistance au MTX, ce qui met en cause la réussite du traitement.

Le RFC1 est un élément important dans le transport du MTX. Différentes études ont mis en évidence que des altérations de l'expression du gène sont associées à la résistance au MTX [42-45].

Au niveau du gène DHFR, des approches expérimentales et cliniques ont montré que des niveaux de DHFR altérés et/ou une diminution de la formation du complexe DHFR-MTX sont retrouvés chez les patients ayant une rechute et dans les cellules démontrant le phénotype MTX-résistantes [45-47]. D'un autre côté, des mutations dans le gène DHFR seraient responsables d'une diminution de l'affinité au MTX [48]. Cependant, il n'y a pas d'étude jusqu'à présent qui montre la pertinence clinique de ces mutations [49].

Enfin, certaines études ont trouvé qu'une diminution de la formation des polyglutamates constituait un mécanisme de résistance au MTX [50, 51]. De plus, il a été démontré que l'activité de FPGS est diminuée dans la LLA-T par rapport à la LLA-B, ce qui entraîne une accumulation réduite des MTX-PG dans la LLA-T comparativement à la LLA-B [52, 53].

Tableau II : Mécanismes de résistance au MTX dans les tumeurs expérimentalement induites (traduit de Gorlick R et al., 1996 [54]).

Mécanismes de résistance	Changement phénotypique	Changement génotypique
Diminution du influx de la drogue	faible niveau de la protéine du transporteur du folate ou sa non-fonctionnalité	Diminution de la transcription, mutation dans le gène du transporteur de folate
Augmentation de l'activité de DHFR	Augmentation de la protéine de DHFR	Amplification du gène DHFR, augmentation de la traduction du DHFR
Diminution de la liaison du MTX au DHFR	Protéine de DHFR mutée	Mutations au niveau du gène DHFR
Diminution de la formation de polyglutamate	Diminution du niveau ou de l'activité de la folylpolyglutamate synthase Augmentation de l'activité de la folylpolyglutamate hydrolase	Diminution de la transcription de la folylpolyglutamate synthase, possibilité des mutations dans la folylpolyglutamate synthase

3. Pharmacogénétique du MTX

Le MTX est associé avec un grand nombre de variations interindividuelles au niveau des gènes impliqués dans sa pharmacocinétique et sa pharmacodynamie.

Voici quelques exemples d'études soulignant l'impact de ces variations.

1. Étude du gène RFC1

Le polymorphisme GA80 du gène RFC1 est associé avec des faibles niveaux plasmatiques du folate et des niveaux élevés d'homocystéine [55]. De plus, sa fréquence est augmentée chez les enfants ayant des défauts du tube neural [56, 57]. Laverdière et al. 2002 [58], ont montré que le variant A80 était associé avec une augmentation du risque de rechute par rapport au génotype

GG et que le génotype AA avait des niveaux plasmatiques de MTX élevés comparativement aux autres génotypes.

2. Étude du gène TS

Un polymorphisme de longueur constitué d'un motif de 28 pb répété en tandem 2 (2R) ou 3 fois (3R) existe au niveau du gène TS. Des études ont relevé que l'allèle 3R conférait *in vitro* une augmentation de la transcription et de la traduction du TS par rapport à l'allèle 2R [59, 60]. D'autres études le confirme cliniquement en montrant que l'homozygotie pour l'allèle 3R avait un taux d'expression et de traduction élevé de TS comparativement avec l'homozygotie 2R [61-63]. Enfin, Krajinovic et al, 2005 [64] ont trouvé, dans une étude de 259 enfants, que les patients leucémiques qui sont homozygotes 3R avaient un risque augmenté de rechute.

3. Étude du gène MTHFR

Deux polymorphismes non-synonymes, C677T et A1298C, diminuent l'activité enzymatique. Le variant C677T affecte la fonction catalytique de l'enzyme, alors que le variant A1298C a un impact sur le domaine régulateur [65, 66]. Dans une étude de 201 enfants avec une LLA à l'hôpital Ste-Justine, il a été démontré que les patients porteurs d'au moins un allèle T677 avaient un risque augmenté de rechute [67]. Ce résultat a été confirmé par la suite par Aplenc et al, 2005 [68] dans une autre étude de 520 patients. D'un autre côté, des taux réduits de leucopénies étaient observés chez patients leucémiques

porteurs de l'allèle T677 [69]. Une interaction entre les polymorphismes du MTHFR et le TS a été mise en évidence. En effet, les individus avec l'allèle MTHFR T677 et le génotype 3R3R avaient un risque de rechute encore plus augmenté, par rapport à ceux qui ne les ont pas [67].

D. DHFR : gène d'intérêt

1. Présentation du gène

Le DHFR, enzyme convertissant le DHF en THF, est impliqué dans le métabolisme et croissance cellulaire. Situé dans le chromosome 5, le gène du DHFR est composé de 6 exons, séparés par 5 introns. Sa taille est d'environ 30 kb [70, 71]. Deux promoteurs sont présents dans le gène : un mineur et un majeur. Près de 99% des ARNs sont initiés à partir du promoteur majeur et 1% du promoteur mineur [72]. Le transcrit mineur, à l'opposé du transcrit majeur, est non-codant.

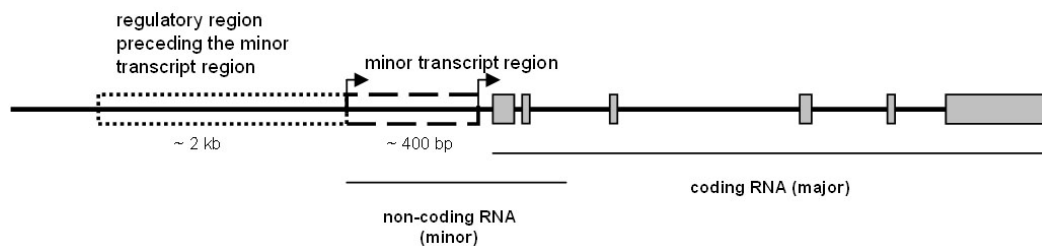


Figure 10: Le gène de DHFR.

2. DHFR : élément-clé dans la réponse au MTX

Le DHFR est la principale cible du MTX, constituant alors le point central de son mode d'action. De plus, le DHFR contribue au développement de la résistance au MTX chez les patients atteints de LLA. Dans des approches expérimentales et cliniques, des niveaux de DHFR altérés et/ou une diminution de la formation du complexe DHFR-MTX sont retrouvés chez les patients ayant une rechute et dans les cellules démontrant le phénotype MTX-résistants.

3. Nouveau mécanisme de régulation

Certaines études ont démontré que le transcrit mineur, émanant du promoteur mineur jusqu'au second intron, réprime la transcription du gène DHFR [73, 74]. En effet, cet ARN mineur empêche la formation du complexe de pré-initiation au promoteur majeur, des évidences ont été montrées *in vitro* et *in vivo* [73, 74]. Ce rôle de régulation est particulièrement dû à la séquence 5' du transcrit mineur, correspondant au promoteur majeur. Une particularité de cette séquence est d'être riche en GC et de contenir des séquences *G-tracks**. Dans son étude,

* G-tracks : Séquences hautement riches en guanine. Elles sont deux au total dans le promoteur majeur du DHFR : GGGGCGGGGGGGCGGGG et GGGACGAGGGGGCGGGG.

Blume et al., 2003 [73] suggèrent que le transcrit mineur adopte des structures en quadruduplexe. Ces structures entraînent une séquestration sélective des facteurs de transcription, comme specificity protein (Sp), empêchant leur liaison au promoteur. Dans une autre étude, la formation d'une structure triplex purine-purine-pyrimidine stable et spécifique entre le transcrit mineur et le promoteur majeur a été montré [74]. De plus, une interaction directe entre le transcrit mineur et le facteur de transcription II B (TFIIB), *in vitro* et *in vivo*, était observée. Ces résultats pourraient expliquer l'action du transcrit mineur sur le complexe de pré-initiation.

4. Étude du promoteur

Une étude a été déjà réalisée par notre laboratoire sur les polymorphismes situés dans la région régulatrice de DHFR [75]. Plus précisément, cette étude a analysé les polymorphismes situés dans une région de 2 kb précédant le site d'initiation du transcrit mineur, correspondant au promoteur mineur. 15 SNPs ont été identifiés et analysés. 3 d'entre eux (C-1610G/T; C-680A; A-317G) ont été définis suffisants pour définir 5 haplotypes communs. Ces polymorphismes ont été étudiés pour une association avec la réponse au traitement chez 277 enfants atteints de LLA. Une réduction de survie sans événement (EFS) était associée avec une homozygotie pour l'allèle A -317 et C -1610 (p-valeur = 0,03 et 0,02), et avec l'haplotype *1, défini par ces deux allèles (p-valeur = 0,03). De plus,

l'haplotype *1 a conféré une activité transcriptionnelle élevée du DHFR (p-valeur < 0,01), montrée par l'essai de luciférase, et des niveaux élevés d'ARNm (p-valeur < 0,01) dans des lignées cellulaires provenant d'individus porteurs de cet haplotype.

Dans ce contexte, il est intéressant d'étendre l'étude à la région régulatrice adjacente de 400 pb, correspondant au promoteur majeur et chevauchant avec la région du transcrit mineur. Le rôle des régions régulatrices du gène DHFR ainsi que leurs polymorphismes serait alors mieux établi.

Hypothèses et objectifs

Le DHFR, principal cible du MTX, est impliqué dans la résistance au MTX. L'altération des niveaux d'expression du gène DHFR est un des mécanismes de résistance chez les patients atteints de LLA.

Notre hypothèse est que des polymorphismes, en contribuant à la variabilité interindividuelle de la réponse thérapeutique au MTX, pourraient prédire les cas de résistance chez patients de LLA. Une étude réalisée par notre laboratoire sur les polymorphismes situés dans le promoteur mineur de DHFR a mis en évidence que l'haplotype *1 est associé avec une augmentation du risque de rechute et une activité transcriptionnelle augmentée [75]. Dans ce projet, il s'agit d'étudier des polymorphismes plus en aval et localisées dans une région de 400 pb, étant à la fois la région du transcrit mineur de DHFR et la région régulatrice du transcrit majeur. Des récentes études ont montré que le transcrit mineur agit en réprimant la transcription du transcrit majeur [73, 74]. Ceci souligne donc le potentiel de régulation que peuvent jouer les polymorphismes dans cette région.

-Pour commencer, une identification des polymorphismes promoteurs dans la région d'intérêt doit être faite. Ces polymorphismes seront recherchés dans la base de données de dbSNP.

-Par la suite, le génotypage d'ADN d'une quarantaine d'individus sains sera réalisé afin de déterminer la fréquence des allèles et identifier un nombre minimal de polymorphismes (tag polymorphismes) suffisants pour définir des

haplotypes communs. La technique de génotypage utilisé sera ASO-PCR. Pour les polymorphismes de longueur, le génotypage se fera par gel d'agarose 3%.

-Les tags polymorphismes seront ultérieurement génotypés au niveau des patients. La cohorte des patients englobe 277 enfants caucasiens diagnostiqués avec la LLA à l'hôpital Ste-Justine et traités selon les protocoles de DFCI 87-01, 91-01,95-01 ou 200-01 [16]. Il est à noter que la dose du MTX ne diffère pas à travers ces protocoles.

-Finalement, des études d'association seront amenés afin d'évaluer l'impact des polymorphismes et/ou haplotypes sur l'évolution de la LLA et la réponse thérapeutique. Les principaux paramètres mesurés sont la survie sans événement (EFS), la survie sans maladie (DFS) et le temps total de survie (OS).

Les résultats de cette étude seront présentés sous la forme d'un article.

Présentation d'article

**DNA variants in region for non-coding interfering transcript of
dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood acute lymphoblastic
leukemia**

Fidaa Al-Shakfa^{1,3}, Stéphanie Dulucq,^{1,4} Ivan Brukner¹, Iva Milacic¹, Patrick Beaulieu¹, Caroline Laverdière^{1,2}, Albert Moghrabi ^{1,2} Daniel Sinnett,^{1,2} and Maja Krajinovic,¹⁻³

¹Research Center, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada; ²Department of Pediatrics, University of Montreal.; ³Department of Pharmacology, University of Montreal ⁴ Laboratoire d'hématologie CHU Pellegrin, INSERM U876, Université Victor Segalen, Bordeaux2, France

Correspondence: Maja Krajinovic, Centre de recherche, CHU Sainte-Justine, 3175 chemin de la Côte-Ste-Catherine, Montréal, QC, H3T 1C5 Canada

Abstract

Dihydrofolate reductase (DHFR) is the major target of methotrexate, a key component in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment. We recently reported an association of DHFR promoter polymorphisms with ALL outcome. Lower event free survival (EFS) correlated with the alleles A₋₃₁₇ and C₋₁₆₁₀, and with haplotype *1, defined by these alleles. Haplotype*1 was also associated higher DHFR expression. Here we extended the analysis to adjacent 400bp regulatory region corresponding to non-coding minor DHFR transcript which plays an essential role in the regulation of transcription from the major promoter. Six polymorphisms were identified, of which 5 were SNPs and one length polymorphism composed of variable number of 9bp elements and 9bp insertion/deletion. Haplotype analysis including all promoter polymorphisms revealed diversification of haplotype *1 into 5 subtypes (*1a to *1e). Major promoter variations and haplotype *1 subtypes were subsequently analyzed for the association with ALL outcome. Lower EFS correlated with an A allele of G₃₀₈A polymorphism (p=0.02) and with *1b haplotype (p=0.01). Higher mRNA levels were found in the carriers of *1b haplotype (p=0.005) and not for remaining haplotype *1 subtypes. The study provides a new insight into DHFR regulatory polymorphisms defining more precisely event-predisposing DHFR variations.

Introduction

Methotrexate (MTX), a folic acid antagonist, is an important component of the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL). A major mechanism of MTX action involves competitive inhibition of the dihydrofolate reductase (DHFR)(1, 2). In both experimental and clinical settings, altered levels of DHFR are found in relapsed patients and in cells manifesting MTX-resistant phenotype (3-5) suggesting that DHFR can play an important role in development of MTX resistance. Changes in the level of DHFR expression and consequently in the sensitivity to MTX can also be due to genetic polymorphisms, particularly those located in the regulatory elements. We recently analyzed polymorphisms in DHFR gene located in the region 2 kb upstream of the first transcription initiation site (6). Association of these polymorphisms with treatment responses in children with ALL showed that a reduction in event free survival (EFS) was associated with A₋₃₁₇ and C₋₁₆₁₀ alleles and with the haplotype *1, harboring these alleles. The haplotype *1 conferred higher transcriptional activity as shown by reporter gene assay and quantitative mRNA analysis (6) .

In addition to this regulatory region which precedes the first or minor transcript initiation site, human DHFR gene has also a downstream major promoter controlling the transcription of productive mRNA (7, 8) (Fig.1A). A small proportion of non-coding DHFR transcript initiates at minor promoter and terminates within the second intron. This minor transcript is enriched in the nucleus and its specific function till recently was not known when it was

documented to act as interfering transcript and play essential role in the regulation of transcription from the major promoter (7, 8).

Here we analyzed the polymorphisms in the ~400 bp long sequence coding for minor transcript which corresponds essentially to major (core) promoter of DHFR. The association of individual polymorphisms and derived haplotypes, with ALL treatment outcome and DHFR expression, was assessed. We also assess the relationship between the polymorphisms in this region and SNPs previously analyzed in an adjacent promoter region. (6)

Methods

Study population and endpoints in the analysis

The children enrolled in the study are 277 Caucasians diagnosed with ALL at Hospital Sainte-Justine (HSJ), Montreal, Canada, between January 1989 and December 2003. The patients underwent treatment with Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium protocols DFCI 87-01, 91-01, 95-01 (9-11) or 2000-01. The MTX dose did not differ across the protocols; patients received a high MTX dose ($4\text{g}/\text{m}^2$) during induction phase and once a week dose of 30-45 mg/m^2 during the consolidation (standard-risk patients) and maintenance (all patients) phases.

Association of genotypes/haplotypes with ALL outcome was assessed in all patients by event free survival (EFS), disease free survival (DFS) and overall survival (OS) analysis. Children who relapsed, had an induction failure or died were defined to have had an event. Toxicity on bone marrow and liver function

was based on the results of weekly laboratory tests collected during consolidation and maintenance treatment, as previously described (12). Toxicity was graded using the common criteria for adverse events of National Cancer Institute. The toxicity data were available for 173 patients who were assessed for the relationship between genotypes and EFS probabilities. The mean number of weeks assessed per patient was 80.

Genotyping

Two DNA fragments of the DHFR gene that contain 6 polymorphisms (Fig. 1B) were first amplified by polymerase chain reaction (PCR) using 15 to 25 ng of genomic DNA from 39 healthy individuals (controls). All individuals were Caucasians composed of 23 females and 16 males with the mean age of 48.5 years. The sequence of forward and reverse primer pairs used for amplification of each fragment along with the size of the PCR products and relationship between polymorphisms and the DNA fragments are outlined in Table 1. PCR reactions were performed in a final volume of 20 μ L using 0.5 μ M of each of the primers and QIAGEN Fast Cycling PCR kit (QIAGEN, Mississauga, ON) following manufacturer instruction. Fragments were amplified for 40 cycles composed of 5 seconds at 96°C, 5 sec at 56°C, and 9 sec or 6 sec at 68°C (fragment 1 and 2, respectively).

For five single nucleotide polymorphisms (SNPs) the genotyping was performed by allele specific oligonucleotide (ASO) hybridization as described previously (13). The sequence of ASO probes specific for tested variants is given in Table 1.

Length polymorphism was identified by sequencing of PCR product of fragment 2 performed in sequencing core facility at the Institute for Immunology and Cancer Research, Montreal, using automatic Applied Biosystem's (ABI) 3730 sequencing system and ABI BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit. Sequences were aligned by Clustel W software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Subsequently, the genotypes of the length polymorphism were resolved by 3% or 4% agarose gel electrophoresis.

Polymorphisms sufficient to define common haplotypes (tagging polymorphisms) were selected based on linkage disequilibrium (LD) information ($R^2=1$, Fig.1C). Genotyping of tagging polymorphisms was subsequently performed in patients with ALL. The efficiency of amplification was not equal in all samples explaining the differences in the total number of individuals for loci analyzed. The subset of samples was genotyped in duplicate to ensure genotype reproducibility. Patient samples were collected after informed consent was obtained. The Ethical Committee of Hospital Sainte-Justine approved the study protocol.

Statistics

Six DHFR polymorphisms (Table 1) were genotyped in the 400 bp segment, located upstream of the major transcript initiation site. The estimates of haplotype phase and haplotype pairs were obtained by PHASE software, version 2.1 (Seattle, WA) (14, 15). Carriers of a given haplotype were calculated from all haplotype pairs containing respective haplotype. Survival differences, estimated

by Kaplan-Meier analysis for patients with different genotypes, were assessed using a log-rank test. Times to event were measured as the time between diagnosis and the event of interest; for censored cases, it corresponded to time between diagnosis and the study endpoint (5 years after the end of treatment [i.e., 84 months following diagnosis]), or to the last observational period. The hazard ratio (HR; with a 95% confidence interval, CI) for genetic variants was estimated by the Cox regression analysis, with and without inclusion of the common prognostic factors categorized according to relapse risk prediction (6). All analyses assessing the impact of genotypes/haplotypes were performed by SPSS statistical package (Chicago, IL), version 16.0.

Quantitative RT-PCR

The DHFR mRNA levels were previously quantified by real-time PCR from lymphoblastoid cell lines of CEPH families (n = 18), or from lymphocytes of anonymous volunteers (n = 31) following phytohemagglutinin stimulation (6). Obtained mRNA levels were used to assess their relation to DHFR variants studied here. DHFR genotype/haplotypes were determined as described above. Depending on data distribution, relative expression between groups with and without given genotype/ haplotype was compared by analysis of variance (ANOVA) or the Mann-Whitney test.

Results

Information on polymorphisms in 400 bp region upstream of major transcript initiation site (Fig. 1A) was originally obtained from dbSNP at National Center for Biotechnology and Information (NCBI). Analysis by ASO

and subsequently by sequencing confirmed presence of five SNPs including C₃₅T, C₃₀₄T, G₃₀₈A, G₃₁₉A and A₄₁₃G substitutions with minor allele frequency ranging from 6 to 36% in Caucasians (Fig. 1B). The amplification product of fragment 2 (Table 1) originating from different individuals showed variable electrophoretic mobility (Fig. 2A). Sequencing of homozygous individuals (having one band of different length at gel electrophoresis) revealed the presence of length polymorphism composed of two sequence motifs. One of them consists of insertion/deletion (indel) at the position 63 (Fig.2B) and the other is defined by variable number of 9bp elements at the position 91 (Fig. 2B). Length polymorphism can be thus summarized as 9bp indel₆₃ (9bp)_{n91}. Five different alleles have been identified in the population studied, defined from shortest to largest as one to five (Fig. 2B). Allele *1 is characterized by 9pb del and one copy of 9bp repeat [9bp del₆₃(9bp)₁₉₁]. Remaining alleles have always 9bp insertion and increasing number of 9bp elements from two repeats in allele *2 to five in allele *5. Allele *3 is referred as major allele whereas remaining alleles ranged in frequency from 5 to 36% in controls (Fig.1B). Summary of 5 SNPs as well as length polymorphisms in the context of the major promoter region with its several sequence hallmarks are given in Figure 2C.

We further explored the organization of these polymorphisms in haplotypes. In order to define relationship with polymorphisms that we previously analyzed in the 2kb region upstream of minor transcript initiation site, three tag SNPs (C₋₁₆₁₀G/T; C₋₆₈₀A; A₋₃₁₇G) (6) were also included in the analysis. Minor and major promoter variants could have been organized in 8

common haplotypes (Fig. 1C). Three of previously identified haplotypes [*3-*5 in Dulucq et al, 2008 (5) and in Fig. 1C)] were not changed with the inclusion of the major promoter polymorphisms. In contrast, previously defined haplotype *1 (C₋₁₆₁₀C₋₆₈₀A₋₃₁₇) diversified further in five sub-haplotypes, defined here as *1a to *1e. Respective frequencies in controls are given in Figure 1C. Based on LD data (Fig. 1C) three tagging polymorphisms were identified in the major promoter region (loci at the position 35 and 308 and length polymorphisms at positions 63/91). ALL patients were subsequently genotyped for these three polymorphisms and analyzed for the association with ALL outcome. The frequency of genotypes at these loci in event and non-event groups is given in Table 2A. A difference in frequency was observed at locus 308 ($p=0.009$). Individuals with A₃₀₈ allele (GA and AA genotypes) had poorer EFS compared to those with GG genotype ($p=0.02$, Figure 3A). Higher frequency of individuals that are homozygous for allele *3 of length polymorphism was noted in the patients with the event as compared to non-event group (45% vs. 33%, Table 2A). These individuals had lower EFS comparing to other genotypes (Fig. 3B), however this difference was of borderline significance ($p=0.1$).

Our previous analysis identified haplotype *1 defined by minor promoter polymorphisms as significantly associated with ALL outcome (6). Since the enclosure of major promoter polymorphisms diversifies haplotype *1 into to the five subtypes, *1a to*1e, we further investigated if the EFS were different in the carriers of any specific subtype. Number and frequencies are given in Table 2B. The effect in the individuals carrying haplotype *1b could be distinguished from

the remaining subtypes through the association with lower EFS ($p=0.01$, Table 2B and Fig. 3C). Similar result was shown for DFS ($p=0.04$) and no significant association was seen with OS ($p=0.2$). Associations with EFS and DFS were retained in the Cox regression when other prognostic factors were added to the model (HR for haplotype *1b =3.0, 95% CI=1.5-6.0 and 2.6, 95% CI=1.3-5.3, respectively).

DHFR polymorphisms or haplotypes were not associated with chemotherapy toxicity (data not shown).

Our previous analysis defining functional significance of DHFR minor promoter variants and derived haplotypes indicated higher mRNA levels in lymphoblasts from individuals that are carriers of haplotype *1 (6). Given that the reduced EFS was seen here in individuals with *1b only, we further investigated if mRNA levels differ among carriers of haplotype *1 subtypes. Higher mRNA levels were found in the carriers of *1b haplotype ($p=0.005$) and not in the carriers of remaining haplotype *1 subtypes (Fig.4A).

Discussion

DHR is the major target of MTX whose variable expression can contribute to the development of the resistance to MTX. We recently described the role of DHFR minor promoter polymorphisms in disease outcome in patients with childhood ALL. We identified particular haplotype (haplotype *1) that correlated with reduced EFS and higher mRNA levels likely underlying

observed association (6). Here we provide a further insight into the role of regulatory DHFR polymorphisms analyzing the adjacent ~400 bp region coding for minor transcript and corresponding to major promoter of DHFR. This region seems to be of particular importance as it was recently shown that minor transcript acts as interfering transcript controlling transcription from major promoter (7, 8). We first defined the polymorphic content of this region and then analyzed tagging variations in children with ALL. Five SNPs along with length polymorphism were identified out of which three were sufficient to define common haplotypes. Length polymorphism is composed of 9b insertion/deletion and 9pb repeat element. Interestingly, the latter was described by Fujii and Shimada, 1989 (16) who observed different number of 9bp motifs in two different cell lines investigated. They suggested that this polymorphism might play a role in DHFR gene regulation as the region of polymorphism was highly resistant to nuclease digestion (16).

The analysis of individual polymorphisms with ALL outcome showed that the allele A of G₃₀₈A substitution was associated with lower EFS. Haplotype analysis allowed us to further define previously observed association of haplotype *1 with lower EFS and thus to define more precisely the risk factors of DHFR gene associated with worse ALL outcome. Analysis of all tagging variations in minor and major promoter showed that the haplotype *1 consists of 5 subtypes. Only subtype *1b was associated with lower EFS. An A₃₀₈ allele is present in both 1a and 1b subtype, its presence in 1b most likely explains the association observed between this polymorphism and lower EFS. Importantly,

*1b was the only haplotype *1 subtype associated with higher mRNA levels. Several studies analyzing the role of DHFR expression in intrinsic MTX resistance in childhood ALL provided the evidence for a key role of elevated DHFR levels (3, 17, 18).

In quiescent cells DHFR gene is repressed and the steady state levels of DHFR mRNA are importantly reduced (7, 8). It has been suggested that non-coding minor transcript may play a role in this repression. Blume et al, 2003 (7) showed that the minor transcript selectively sequesters Sp (specificity protein) transcription factors preventing their binding to DHFR core promoter and thus assembly of the transcription pre-initiation complex. It seems that the selective sequestration of Sp factors involves an altered RNA conformation (7). Subsequently, Martianov et al, 2007 (8) showed through series of different experiments that the repression is ensured by the formation of a stable complex between non-coding RNA and the major promoter (likely through triplex complex formation), direct interaction of the non-coding RNA with the general transcription factor II B and dissociation of the pre-initiation complex from the major promoter (8). Major promoter region has hence apparent regulatory properties and it is quite possible that it can modulate the levels of mRNA beyond repression in quiescent cells. The polymorphisms in this region could possibly affect function of non-coding interfering transcript which may result in *1b associated increase in mRNA levels. Predicted loss and gain of transcription factor binding sites relative to haplotype *1 subtypes obtained by Match program at Biobase biological databases (<http://www.biobase->

international.com/pages/index.php?id=291) are illustrated in Table 2C. Given that control of transcription by non-coding minor transcript involves structural changes we also performed the analysis by RNAfold (19) using the sequence of five haplotype*1 subtypes. While no difference was observed for other subtypes, change in structure is predicted for haplotype *1b (Fig. 4B).

In conclusion, we report the association of DHFR major promoter variants with the poorer ALL outcome, likely due to the increase in DHFR expression. The study provides a new insight into DHFR regulatory polymorphisms narrowing down event-predisposing DHFR haplotype. This information will further increase the knowledge how to use host genetic variations to tailor therapy of antileukemia drugs.

Acknowledgements

We are thankful to all patients and their parents who consented to participate in genetics study related to leukemia. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research, Leukemia Lymphoma Society of Canada, Research Center of CHU Sainte Justine, Charles Bruneau Foundation and Centre d'excellence en Oncologie pédiatrique et en soins palliatifs. MK and DS are scholars of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

References:

1. Gorlick R GE, Trippett T, Waltham M, Banerjee D, Bertino JR. Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia. *N Engl J Med* 1996;335:1041-8.
2. Assaraf Y. Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:153-81.
3. Matherly LH TJ, Ravindranath Y, Proefke SA, Wong SC, Gimotty P, Buck S, Wright JE, Rosowsky A. Elevated dihydrofolate reductase and impaired methotrexate transport as elements in methotrexate resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995;85:500-9.
4. Göker E WM, Kheradpour A, Trippett T, Mazumdar M, Elisseyeff Y, Schnieders B, Steinherz P, Tan C, Berman E, et al. Amplification of the dihydrofolate reductase gene is a mechanism of acquired resistance to methotrexate in patients with acute lymphoblastic leukemia and is correlated with p53 gene mutations. *Blood* 1995;86:677-84.
5. Serra M R-BG, Maurici D, Benini S, Shen JN, Chano T, Hattinger CM, Manara MC, Pasello M, Scotlandi K, Picci P. Analysis of dihydrofolate reductase and reduced folate carrier gene status in relation to methotrexate resistance in osteosarcoma cells. *Ann Oncol* 2004;15:151-60.
6. Dulucq S S-OG, Gagné V, Ansari M, Sinnett D, Labuda D, Moghrabi A, Krajcinovic M. DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood* 2008;111:3692-700.
7. Blume SW MZ, Shrestha K, Snyder RC, Emanuel PD. The 5'-untranslated RNA of the human dhfr minor transcript alters transcription pre-initiation complex assembly at the major (core) promoter. *J Cell Biochem* 2003;88:165-80.
8. Martianov I RA, Serra Barros A, Chow N, Akoulitchev A. Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature* 2007;445:666-70.
9. Moghrabi A LD, Asselin B, Barr R, Clavell L, Hurwitz C, Samson Y, Schorin M, Dalton VK, Lipshultz SE, Neuberg DS, Gelber RD, Cohen HJ, Sallan SE, Silverman LB. Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007;109:896-904.
10. Silverman LB DL, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA, Lipton JM, Cohen HJ, Sallan SE. Results of Dana-Farber Cancer Institute Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1981-1995). *Leukemia* 2000;14:2247-56.
11. Silverman LB GR, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA, Arkin S, Declerck L, Cohen HJ, Sallan SE. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* 2001;97:1211-8.

12. Costea I MA, Laverdiere C, Graziani A, Krajinovic M. Folate cycle gene variants and chemotherapy toxicity in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2006;91:1113-6.
13. Bourgeois S LD. Dynamic allele-specific oligonucleotide hybridization on solid support. *Anal Biochem* 2004;324:309-11.
14. Stephens M SN, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001;68:978-89.
15. Stephens M DP. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 2003;73:1162-9.
16. Fujii H ST. Isolation and characterization of cDNA clones derived from the divergently transcribed gene in the region upstream from the human dihydrofolate reductase gene. *J Bio Chem* 1989;264:10057-64.
17. Rots MG WJ, Jansen G, Van Zantwijk CH, Noordhuis P, DeMuth JP, Kuiper E, Veerman AJ, Pieters R, Peters GJ. mRNA expression levels of methotrexate resistance-related proteins in childhood leukemia as determined by a standardized competitive template-based RT-PCR method. *Leukemia* 2000;14:2166-75.
18. Matherly LH TJ, Wong SC, Simpson PM, Ekizian R, Buck S, Williamson M, Amylon M, Pullen J, Camitta B, Ravindranath Y. Increased frequency of expression of elevated dihydrofolate reductase in T-cell versus B-precursor acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood* 1997;90:578-89.
19. Gruber AR LR, Bernhart SH, Neuböck R, Hofacker IL. The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res* 2008;36:W70-4.
20. Masters JN AG. Discrete human dihydrofolate reductase gene transcripts present in polysomal RNA map with their 5' ends several hundred nucleotides upstream of the main mRNA start site. *Mol Cell Biol* 1985;5:493-500.

Table 1. Identity of polymorphisms and details of PCR and ASO hybridization

Polymorphisms			PCR		ASO
Identity	dbSNP	DNA fragment	size (bp)	primers	probes
35	rs1650697	2	189	F2: cccagtcccagacagaaacct R2: tgagccgattctccagtct	gccgcac g tagtagg gccgcac a tagtagg
length polymorphism (63/91)	rs3045983 (63)	2		— —	NA NA
304	rs1105524	1	275	F1: agactggaagaatcggctca	ctcct t gccgggccc ctcct g ccaggccc
308	rs1105525	1		R1: agttggcgcgaaattgtg	ctcct c gccaggccc ctcct g ccaggccc
319	rs2250063	1		— —	ccgcggg c tcgcgct ccgcggg t tcgcgct
413	rs10168	1		— —	ctcgtcccc a tttgt ctcgtcc c tatttgt

R, reverse, F, forward. The base substitution that distinguishes the two variants of each polymorphism is given in bold in corresponding ASO probes. PCR primers and ASO probes were taken from human chromosome 5 clone sequence (GenBank accession no. AC008434) on which the major transcript initiation site (20) is positioned according to DHFR mRNA sequence information (GenBank accession no. NM_000791). The position of polymorphism is given relative to the first or minor transcript initiation site. When available the respective number

from SNP database (dbSNP) at NCBI is provided. -, as above NA, not applicable;

Table 2A. The frequency of DHFR genotypes in ALL children with and without event.

DHFR polymorphisms	DHFR genotypes	Event N (%)	Non-event N (%)	Total ^a N (%)	p ^b
35	TT	5 (9.3)	13 (5.8)	18 (6.5)	0.2
	CT	20 (37.0)	65 (29.1)	85 (30.7)	
	CC	29 (53.7)	145 (65.0)	174 (62.8)	
	total	54 (100.0)	223 (100.0)	277 (100.0)	
63/91	11	7 (13.2)	18 (8.3)	25 (9.2)	0.7
	12	0 (0)	2 (0.9)	2 (0.7)	
	13	13 (24.5)	86 (39.4)	99 (36.5)	
	23	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.4)	
	24	0 (0)	2 (0.9)	2 (0.7)	
	14	3 (5.7)	6 (2.8)	9 (3.3)	
	15	1 (1.9)	6 (2.8)	7 (2.6)	
	33	24 (45.3)	72 (33.0)	96 (35.4)	
	34	2 (3.8)	12 (5.5)	14 (5.2)	
	35	2 (3.8)	9 (4.1)	11 (4.1)	
	44	1 (1.9)	3 (1.4)	4 (1.5)	
	45	0 (0)	1 (0.5)	1 (0.4)	
total		53 (100.0)	218 (100.0)	271 (100.0)	
308	AA	0 (0)	6 (2.8)	6 (2.3)	0.009
	GA	18 (36.0)	43 (19.9)	61 (22.9)	
	GG	32 (64.0)	167 (77.3)	199 (74.8)	
total		50 (100.0)	216 (100.0)	266 (100.0)	

^aTotal reflects the number of individuals. ^bP value is calculated by log rank test for the event-related difference across all genotypes of a locus. EFS curves for individuals that carry or not A3₀₈ allele and 33 genotype of length polymorphism are given in Fig. 3A and 3B, respectively.

Table 2B. The frequency of the individuals carrying DHFR haplotypes among ALL patients with and without event

carriers of a haplotype	Event N (%)		Non-event N (%)		p ^a
	+	-	+	-	
*1a	3 (6.1)	46 (93.9)	11 (5.3)	196 (94.7)	0.8
*1b	14 (28.6)	35 (71.4)	33 (15.9)	174 (84.1)	0.01
*1c	2 (4.1)	47 (95.9)	4 (1.9)	203 (98.1)	0.5
*1d	6 (12.2)	43 (87.8)	19 (9.2)	188 (90.8)	0.5
*1e	3 (6.1)	46 (93.9)	16 (7.7)	191 (92.3)	0.7

^ap value is estimated by log rank test.

The frequency of carriers and non-carriers of a given haplotype sums up to 100% in each group of patients. All observed haplotype pairs containing haplotype *1a, *1b, *1c, *1d or *1e contributed to the estimation of the number of the respective carriers. EFS curves for the carriers of haplotype *1b are given in Fig. 3C.

Table 2C. Transcription binding sites containing promoter polymorphisms: loss or gain of the transcription factor binding sites relative to the alleles of haplotype *1a

Polymorphisms								
Haplotype	35	63/91	304	308	319	413		
							Loss	
							Gain	
*1a	C	3	C	A	G	A	None	None
*1b	T	-	-	-	-	-	AhRHIF_Q6, ARNT_01	None
*1c	-	-	-	G	-	-	AhRHIF_Q6, ARNT_01,TTF1_Q6	WT1_Q6
*1d	-	4	-	-	-	-	AhRHIF_Q6, ARNT_01,TTF1_Q6	WT1_Q6, 4 more AP4_01, 1 more PAX4_03
*1e	-	5	-	-	-	-	AhRHIF_Q6, ARNT_01,TTF1_Q6	WT1_Q6, 8 more AP4_01, 2 more PAX4_03

All polymorphisms within major promoter region are listed. The binding site changes are given relative to the polymorphisms at position 35, 63/91 and 308 which differ among haplotype *1 subtypes.

AhR , aryl hydrocarbon receptor; HIF, Hypoxia-inducible factor; ARNT , aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator; TTF1, Thyroid transcription factor 1; PAX4, paired box 4; WT1 = Wilms tumor1; AP4, transcription factor AP4 of the basic helix-loop-helix-zipper family, -,same as above

Figure legend

Figure 1. DHFR gene and the promoter polymorphisms

(A) Organization of the human DHFR gene. The DHFR gene has minor (non-coding) and major (coding) RNAs. The region of interest, corresponding to major promoter is located between the minor and major transcript initiation sites. (B) Promoter polymorphisms located in 400 bp region upstream of major transcript initiation site. The frequency of minor alleles in controls is shown. (C) Haplotypes arbitrarily derived from 9 promoter polymorphisms including 3 previously identified tagSNP in minor promoter (positions 1610, -680 and -317) and 6 here analyzed polymorphisms in major promoter. Position of the polymorphisms refers to first (minor) transcript initiation site. Pairwise estimates of linkage disequilibrium are given in the bottom panel (■ indicates $r^2 = 1$; □ indicates $r^2 < 1$). Tagging variations of the major promoter are at the position 35, 63/91 and 308. Haplotype names are as in Dulucq et al., 2008 (6) Haplotype *1 is diversified in 5 subtypes (*1a to *1e).

Figure 2. Length polymorphism in the major promoter of DHFR with genotypes (A) allele composition (B) and sequence (C).

(A) Genotypes of the length polymorphism, as resolved by a 4% agarose gel electrophoresis. The allele names are as in Fig. 2B. M is 100 bp DNA ladder. (B) The length polymorphism is composed of two sequence motifs. The first motif is a 9bp insertion/deletion at the position 63. The second consists of variable number (1 to 5) of 9bp element at the position 91. (C) Sequence of the 400 bp region upstream of major transcript initiation site. Two sequence motifs at the

positions 63 and 91 of the length polymorphism are highlighted. Variable 9bp element has gccgctgcr sequence where r stands for purine. The allele in the presented sequence corresponds to most common allele 3. The other analyzed polymorphisms with their relative positions are also given. Minor and major transcription initiation site are indicated by a dot. The minor transcription initiation site is considered as position 0. Two consensus G/C box recognition sequences for Sp factor binding are underlined (7). The TATA-like sequence is boxed (20).

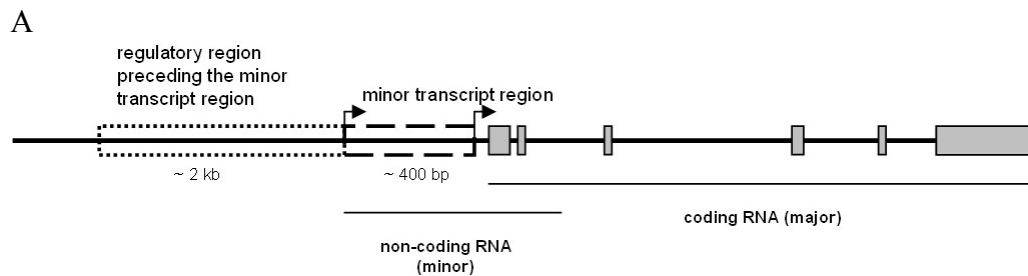
Figure 3. EFS for patients with ALL according to DHFR genotypes

(A) EFS curves according to the genotypes of the polymorphism at the position 308. The lower curve (gray line) represents EFS for AA and AG patients and the upper curve (black line) represents EFS for individuals with GG genotype. (B) EFS curves for patients who are positive (+; gray line) or negative (-; black line) for DHFR 33_{63/91} genotype. (C) EFS for patients that are carriers (+; gray line) or not (+; black line) of DHFR haplotype *1b. The genotype and the number of patients in each curve, numbers of individuals with an event (in the parenthesis), as well as the P value, estimated by log-rank test for the survival differences between the patients groups, are indicated on each plot. Risk of event associated with the given genotype, expressed as a univariable HR with 95% CI, is indicated below the plots

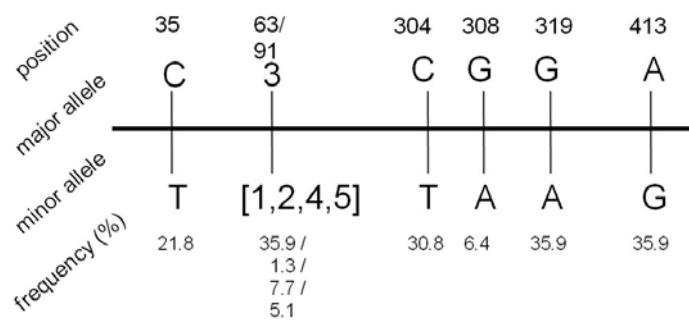
Figure 4. Subtypes of DHFR haplotype *1 in relation to mRNA levels (A) and predicted structure changes (B).

(A) The mean mRNA levels with 95% CI are given for individuals with and without indicated haplotype *1 subtype. The number of individuals represented by each line, and P value obtained by ANOVA (*1a and*1b haplotypes) and Mann-Whitney test (*1d haplotype) for the difference of expression between carriers (+) and non-carriers (-) of indicated haplotypes are given on the plots. The number of *1c and *1e carriers were insufficient to perform the mRNA level comparison. (B) RNA secondary structure estimated by RNAfold (19) using ~400bp sequence upstream of major transcript initiation site. Note that RNA of haplotype *1b has a modification in its secondary structure.

Figure 1 :



B



C

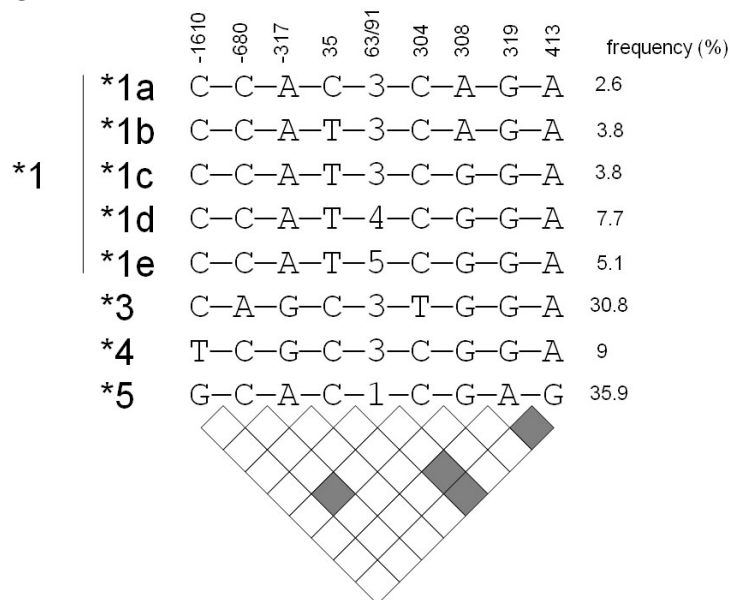
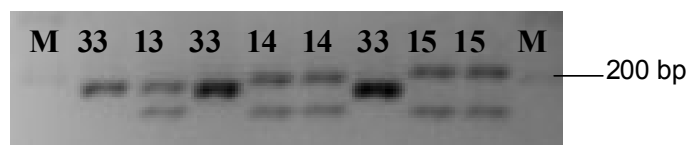


Figure 2 :

A



B

- allele 1: 9bp del₆₃ (9bp)1₉₁
- allele 2: 9bp ins₆₃ (9bp)2₉₁
- allele 3: 9bp ins₆₃ (9bp)3₉₁
- allele 4: 9bp ins₆₃ (9bp)4₉₁
- allele 5: 9bp ins₆₃ (9bp)5₉₁

C

```

ttcttcagcccgcccccttctcctccagccctatcatcgggcggagggtc
ccgcctccgcccgccttaccacaagccccgccccccagccc•cgatgg
cctgcccagtcccagacagaaccta35tgtgcggcggcagctggggcg
ggaaggc63gggagctgg91ggg91cgctgggggcgctgcgg91gcccgtgcggcccgt
gcagcccgtgca91gcgccaggggtccacctggctcggtgcacctgtggagga
ggaggtggatttcaggcttcccgtagactggaagaatcggctcaaaccg
cttgccctcgcaggggctgagctggaggcagcagggccgcccgacgcaggc
ttccggcgagacatggcagggcaaggatggcagcccggcggcagggcc304tg
gc308gaggagcgcga319gcccgcggccgcagttcccaggcgtctgcgggcgcga
gcacgcgcgcgaccctgcgtgcgccggggcgggg413ggggcggggcctcgcctg
c413caaaatg413gggacgagg413ggggcggggcggcca413a413caatttcgcgccaactt
gaccgcgcgcttctgctgtaacgagcgggctcggaggctcctcccgtgctg

```

Figure 3 :

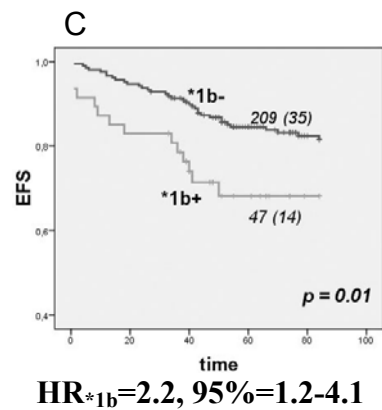
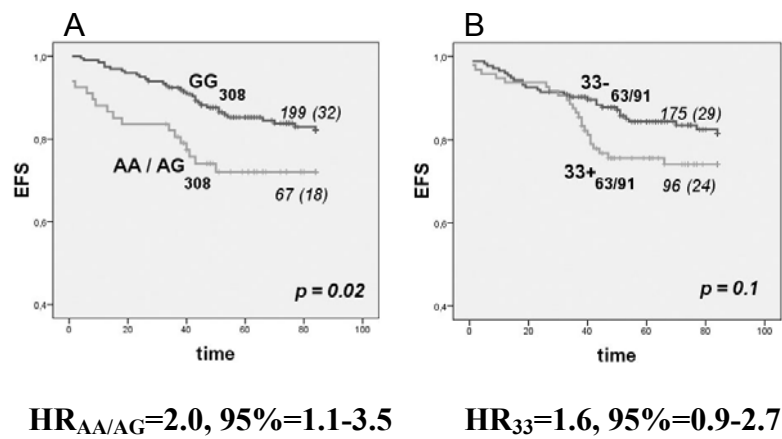
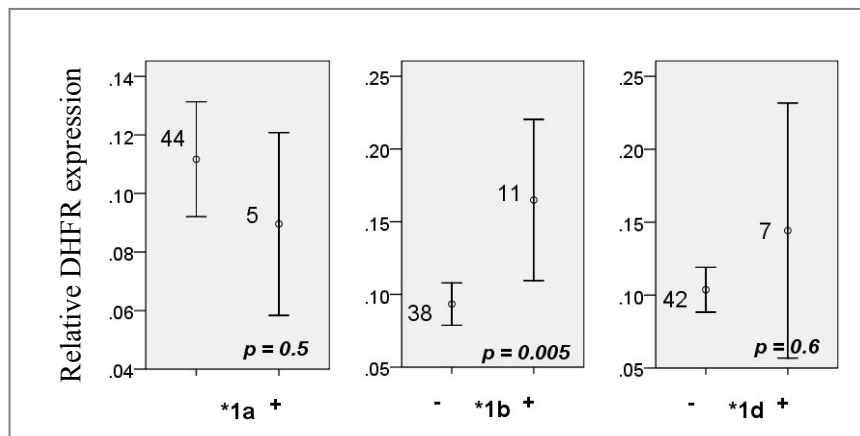
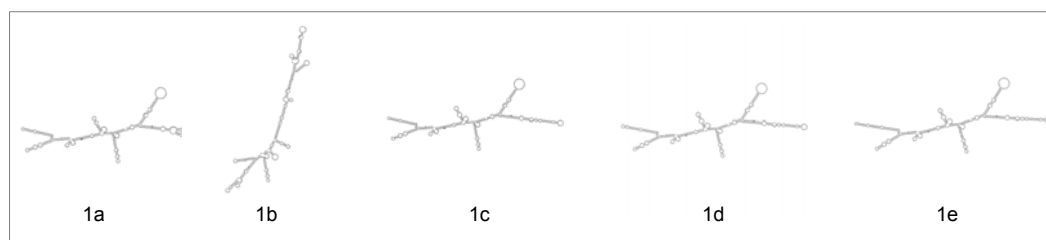


Figure 4 :

A



B



Discussion:

Le DHFR constitue une principale cible du MTX, dont l'expression peut contribuer au développement de la résistance au MTX. Le rôle des polymorphismes du promoteur mineur au niveau de l'issue de la LLA chez les enfants leucémiques a été décrit dans l'étude de Dulucq et al, 2008 [75]. Il a été identifié un haplotype (haplotype *1) qui corrèle avec un EFS réduit, une activité transcriptionnelle élevée et des niveaux élevés d'ARNm [75]. Dans cette étude, nous explorons le rôle des polymorphismes régulateurs du DHFR situés dans une région adjacente de ~ 400 pb, codant pour le transcrit mineur et correspondant au promoteur majeur du DHFR. Cette région semble être d'une importance particulière, puisqu'il a été montré récemment que le transcrit mineur agit comme un transcrit interférent contrôlant la transcription du promoteur majeur [73, 74].

Polymorphismes au niveau du promoteur majeur

Nous avons tout d'abord identifié les polymorphismes existants dans cette région à partir de la base de données dbSNP [76]. 15 SNPs et une délétion ont été trouvés (figure 11).

```

ttcttcagcccgcccttcctcctccagccctatcatcgggcggagggtc
cccgctccgcccgccttaccacaagccccgccccccagccccgatgg
ccctgccagtcaccagacagaacctactattgtgcggcggcagctggggcg
ggaaggcgggagctggggcgctggggcgctgcggccgctgcggccgct
gcagccgctgcagcgccagggtccacctggctcgctgcacctgtggagga
ggaggtggatttcaggcttcccgtagactggaagaatcggctcaaaaccg
cttgctcgcaggggctgagctggagggcagcgaggccgcccgaccgccagggc
ttccggcgagacatggcagggcaaggatggcagcccggcggcagggccctg
gcgaggagcgcgaggcccgcggccgcagttcccaggcgtctgcgggcgcgga
gcacgcccgcgaccctgcgtgcgccggggcgggggggcggggccctcgctg
caciaaatgggggacgagggggcggggcggccacaatttcgcgccaaactt
gaccgcgcgcttctgctgtaacgagcgggctcggaggtcctccccgctgctg

```

Figure 11 : Les polymorphismes au promoteur majeur identifiés à partir de dbSNP. La séquence surlignée en gris foncé correspond à une délétion.

Cependant, 5 SNPs étaient uniquement polymorphiques. En effet, cette région contient des multiples répétitions, avec une grande homologie de séquence. Or, un faux alignement de séquences dans cette région mènerait à trouver des "faux" SNPs, comme c'est le cas dans dbSNP. En plus de ces 5 SNPs, un polymorphisme de longueur a été caractérisé (figure 12). Les fréquences des polymorphismes identifiés dans la région d'étude variaient entre 5% et 36% chez les contrôles.

L'analyse des polymorphismes dans les promoteurs mineur et majeur a permis d'identifier 5 SNPs et un polymorphisme de longueur comme suffisants pour définir les haplotypes communs. 3 tag-polymorphismes sont dans le promoteur majeur : 2 SNPs (C35T et G308A) et le polymorphisme de longueur.

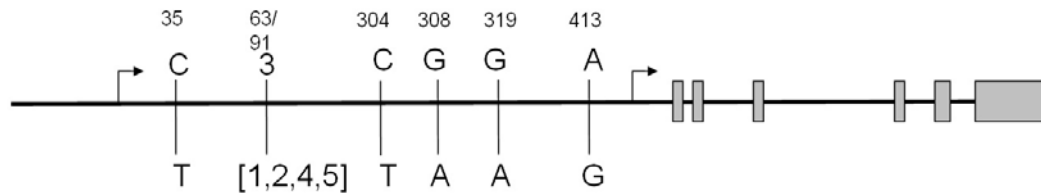


Figure 12 : Les polymorphismes identifiés au promoteur majeur.

Le polymorphisme de longueur, ayant été identifié au laboratoire, est composé d'une insertion/délétion de 9pb et une répétition d'une séquence de 9 pb. Il est intéressant de noter que ce polymorphisme a été décrit par Fujii et Shimada, 1989 [77], qui ont observé différents nombres de copies (3 et 6) du motif-9pb dans deux différentes lignées cellulaires. De plus, ils ont suggéré que ce polymorphisme pourrait jouer un rôle dans la régulation du gène DHFR, sachant que la région du polymorphisme est hautement résistante à la digestion de nucléase [77]. Cette information n'était qu'une simple observation dans cet article publié il y a 20 ans, et il n'y a pas eu jusqu'à date d'autre études analysant le contenu polymorphique de cette région.

2 variants et un haplotype influençant l'issue de LLA

Au niveau de l'analyse des polymorphismes avec l'issue de la LLA, seul l'allèle A du variant G308A a montré une association statistiquement significative avec un EFS réduit (p-valeur = 0,02). Le génotype 33_{63/91} montrait une tendance d'être associé avec un EFS réduit, mais on ne note pas une signifiante statistique (p-valeur = 0,1).

L'analyse d'haplotypes a permis de définir les sous-haplotypes de l'haplotype *1 associé auparavant avec une réduction de EFS, et ainsi de définir plus précisément les facteurs du risque du gène DHFR associés à une mauvaise issue de la LLA. En analysant tous les tag-polymorphismes dans les promoteurs mineur et majeur (6 au total), nous avons montré que l'haplotype *1 est diversifié en 5 sous-types. Une question qui se pose alors : quelle(s) sous-type(s) de l'haplotype *1 est (sont) réellement associé(s) avec une mauvaise évolution de la LLA?

	-1610	-680	-317	35	63/91	308	frequency (%)
*1a	C	C	A	C	3	A	2.6
*1b	C	C	A	T	3	A	3.8
*1c	C	C	A	T	3	G	3.8
*1d	C	C	A	T	4	G	7.7
*1e	C	C	A	T	5	G	5.1
*3	C	A	G	C	3	G	30.8
*4	T	C	G	C	3	G	9
*5	G	C	A	C	1	G	35.9

Figure 13: Diversification de l'haplotype *1, décrit dans Dulucq et al., 2008 [75], en 5 sous-types. Les fréquences d'haplotypes correspondent à la population contrôle.

Uniquement le sous-type *1b se trouve être associé avec un EFS réduit (p-valeur = 0,01). Des résultats similaires ont été obtenus au niveau de *disease free survival* (DFS). Il est à noter que l'allèle A du variant G308A est présent dans

deux sous-types : *1a et *1b. Sa présence dans *1b expliquerait l'association observée entre ce polymorphisme et la réduction de l'EFS. Une observation des deux sous-types, *1a et *1b, nous mène à noter que l'allèle C du variant C35T annule l'effet du A308.

D'un autre côté, *1b était le seul sous-type associé avec des niveaux de ARNm élevés (p-valeur = 0,005). Plusieurs études ayant analysé le rôle de l'expression du DHFR dans la résistance intrinsèque au MTX chez les enfants leucémiques ont fourni une évidence pour le rôle clé des niveaux élevés de DHFR [45-47].

L'augmentation de l'expression du DHFR au niveau de *1b indiquerait alors une résistance au MTX chez les individus porteurs de cet haplotype, et expliquerait l'association avec un EFS réduit.

Aucune association avec les toxicités hématologique et hépatique au niveau des polymorphismes ou haplotypes a été observée. Ceci laisse la possibilité d'augmenter la dose chez les porteurs de *1b, étant résistant au MTX, sans toutefois avoir un risque de toxicité.

Il est intéressant de mentionner que la fréquence de l'haplotype *1b chez patients a plus que doublé par rapport aux contrôle (10.1% versus 3.8%). On peut suggérer que *1b constituerait un facteur de risque pour la LLA. Cependant, il faudra avoir un plus grand nombre de contrôles afin de pouvoir vérifier cette hypothèse.

Propriétés régulatrices de la région du promoteur majeur

Dans les cellules quiescentes, le gène DHFR est réprimé et les niveaux à l'état stable d'ARNm du DHFR sont remarquablement réduits [74]. Il a été suggéré que le transcrit mineur non-codant pourrait jouer un rôle dans cette répression. Blume et al., 2003 [73] ont démontré que le transcrit mineur séquestre sélectivement les facteurs de transcription Sp empêchant leur liaison au promoteur, et donc l'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription. Il semble que la séquestration sélective des facteurs Sp entraîne conformation altérée d'ARN [73]. Par la suite, Martianov et al., 2007 [74] ont montré que la répression était assurée par la formation d'un complexe stable entre l'ARN non-codant et le promoteur majeur, (possiblement par la formation d'un triplex), une interaction directe de l'ARN non-codant avec le facteur TFIIB et la dissociation du complexe de pré-initiation du promoteur majeur.

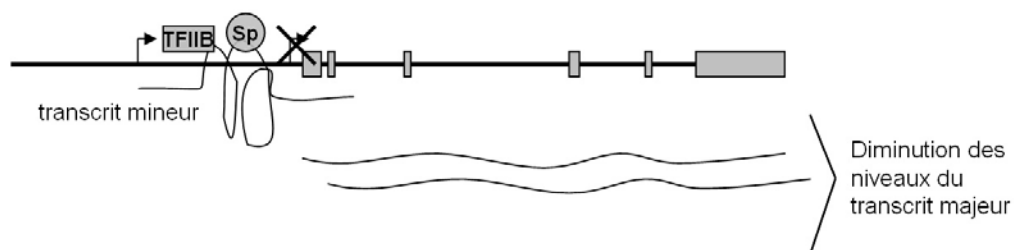


Figure 14: La répression de la transcription du transcrit majeur par le transcrit mineur.

La région du promoteur majeur aurait des propriétés régulatrices et il est possible qu'elle ait un impact important sur les niveaux d'ARNm au-delà de la répression dans les cellules quiescentes. Les polymorphismes de cette région pourraient

affecter la fonction régulatrice du transcrit interférent non-codant, ce qui en résulterait une augmentation des niveaux d'ARNm associée à l'haplotype *1b.

Une prédiction de perte et gain des sites de liaison aux facteurs de transcription a été réalisée par le programme Match [78] (tableau 4 de l'article). Il serait intéressant d'évaluer, par des études fonctionnelles, l'impact des pertes et gains des sites de liaison au niveau de l'haplotype *1b. Ces études pourraient permettre d'expliquer la corrélation entre l'haplotype *1b et les niveaux élevés d'ARNm.

Changements de structure et haplotype *1b

Comme le contrôle de la transcription par le transcrit mineur non-codant entraîne l'adoption de structures permettant l'interaction avec le promoteur majeur et certains facteurs, nous avons également effectué l'analyse par RNAfold [79] en utilisant la séquence des 5 sous-types de l'haplotype *1. Alors qu'aucune différence a été observée chez les autres sous-types, un changement de structure est prédit pour l'haplotype *1b (figure 7 de l'article). Ce changement aurait un impact sur le rôle de down-régulation du transcrit mineur au niveau de *1b, car l'interaction du transcrit mineur avec les différents intervenants est affectée.

Régulation du DHFR, pas un seul mécanisme !

Malgré l'importance du transcrit mineur dans la régulation du DHFR, il existe également d'autres mécanismes pouvant réguler le DHFR. Un de ces mécanismes est la répression traductionnelle de l'ARNm par la protéine DHFR,

qui s'effectue par la liaison de la protéine à son propre ARNm [80, 81]. Un autre mécanisme implique la liaison d'un microARN (miR-24) sur le 3'UTR de l'ARN, induisant alors la dégradation du messager. Le variant T du SNP C829T, situé au site de liaison de miR-24, interfère avec la fonction du microRNA amenant alors une surexpression du DHFR et une résistance au méthotrexate [82]. Malheureusement, la région entourant le SNP C829T est hautement répétitive, rendant alors impossible le design d'analyse de génotypage. Cependant, il est possible d'analyser ce SNP au niveau d'ARNm.

DHFR, élément parmi d'autre dans la résistance au MTX

Nous avons trouvé que dans le DHFR, l'haplotype *1b conférait une augmentation des niveaux d'expression du gène, ce qui contribuerait à la résistance au MTX. Cependant, il faut prendre en considération que la résistance au MTX implique également les autres composants présents dans la voie de MTX.

Perspectives

Des études fonctionnelles seraient intéressantes à réaliser afin de pouvoir établir la fonctionnalité de chaque polymorphisme de l'haplotype *1b. On peut, par exemple, réaliser des essais de luciférase pour déterminer l'effet des polymorphismes en question sur l'expression. Également, il est possible

d'analyser *in vitro* l'impact de ces polymorphismes sur la perte ou gain des sites de liaisons aux facteurs de transcription.

Cette étude a permis de déterminer que la mauvaise issue de LLA associée avec l'haplotype *1 est, en effet, uniquement déterminée par le sous-type *1b. Les résultats de cette analyse, complétés par d'autres études, favoriseront l'ajustement de la dose du MTX selon les prédispositions génétiques du patient, menant alors à une médecine personnalisée, dont l'objectif est d'augmenter l'efficacité et de diminuer la toxicité du traitement.

Conclusion :

La leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) est le plus commun cancer pédiatrique, constituant environ 25% de ces cancers. Malgré l'amélioration impressionnante de thérapies anticancéreuses qui a mené à des taux de guérison élevés, certains patients développent une résistance aux traitements. La résistance au méthotrexate (MTX), un des principaux médicaments pour le traitement de la LLA, est un exemple.

Dans ce projet, il était question d'évaluer l'impact des polymorphismes génétiques sur l'issue de la LLA. Notre gène d'intérêt était le dihydrofolate réductase (DHFR), principal cible du MTX. L'association entre la résistance au MTX et l'altération des niveaux d'expression du DHFR nous a amené à analyser le promoteur majeur, étant donné que le promoteur mineur a fait l'objet d'une étude précédente au laboratoire.

Nous avons identifié des polymorphismes dans le promoteur majeur du DHFR, et avons trouvé une association d'un polymorphisme et d'un haplotype dérivé avec une mauvaise évolution de la LLA. Cette association est probablement due à l'augmentation d'expression du DHFR. L'étude donne un nouvel aperçu des polymorphismes régulateurs du DHFR et leur impact sur le traitement de la LLA.

Cette information augmentera la connaissance de comment utiliser les variations génétiques du patient afin d'adapter la thérapie des drogues anti-leucémiques.

Références

1. Colby-Graham MF, Chordas C, *The childhood leukemias*. J Pediatr Nurs, 2003. 18: p. 87-95.
2. Hoffman R, et al., *Hematology: Basic Principles and Practice*. 5th ed, Churchill Livingstone. 2008: Philadelphia, Pa. Chap: 63-65.
3. Béné, MC, *Immunophenotyping of acute leukaemias*. Immunol Lett, 2005. 98: p. 9-21.
4. Armstrong SA, Look AT, *Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia*. J Clin Oncol, 2005. 23: p. 6306-15.
5. Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR, *Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995*, in *SEER Program*. 1999: Bethesda, MD.
6. Sinnett D, N'Diaye N, St-Onge P, Healy J, *La leucémie de l'enfant: une maladie génétique!* Med Sci (Paris), 2007. 23: p. 968-74.
7. McBride, ML, *Childhood cancer and environmental contaminants*. Can J Public Health, 1998. 89 (Suppl 1): p. S53-62, S58-68.
8. Infante-Rivard C, Labuda D, Krajinovic M, Sinnett D, *Risk of childhood leukemia associated with exposure to pesticides and with gene polymorphisms*. Epidemiology, 1999. 10: p. 481-7.
9. Krajinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S, Sinnett D, *Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms*. Blood, 1999. 93: p. 1496-501.
10. Krajinovic M, Richer C, Sinnett H, Labuda D, Sinnett D, *Genetic polymorphisms of N-acetyltransferases 1 and 2 and gene-gene interaction in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2000. 9: p. 557-62.
11. Krajinovic M, Sinnett H, Richer C, Labuda D, Sinnett D, *Role of NQO1, MPO and CYP2E1 genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia*. Int J Cancer, 2002. 97: p. 230-6.
12. Friedmann AM, Weinstein HJ, *The role of prognostic features in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia*. Oncologist, 2000. 5: p. 321-8.
13. Abeloff M, Armitage J, Niederhuber J, Kastan M, McKenna W, *Abeloff's Clinical Oncology*. 4th ed, Churchill Livingstone. 2008: Philadelphia, PA. Chap: 101.
14. Pui CH, Evans WE, *Treatment of acute lymphoblastic leukemia*. N Engl J Med, 2006. 354: p. 166-78.
15. Silverman LB, Declerck L, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA,

- Lipton JM, Cohen HJ, Sallan SE, *Results of Dana-Farber Cancer Institute Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1981-1995)*. *Leukemia*, 2000. 14: p. 2247-56.
16. Dalle JH, Moghrabi A, Rousseau P, Leclerc JM, Barrette S, Bernstein ML, Champagne J, David M, Demers J, Duval M, Hume H, Meyer P, Champagne MA, *Second induction in pediatric patients with recurrent acute lymphoid leukemia using DFCI-ALL protocols*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2005. 27: p. 73-9.
 17. Krynetski EY, Evans WE, *Pharmacogenetics of cancer therapy: getting personal*. *Am J Hum Genet*, 1998. 63: p. 11-6.
 18. McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV, Evans WE, *Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 2000. 14: p. 567-72.
 19. 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: p. 608-14.
 20. Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, Eichelbaum M, Zanger UM, Schwab M, *Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants*. *Pharmacogenetics*, 2004. 14: p. 407-17.
 21. Cheek MH, Evans WE, *Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6: p. 117-29.
 22. Ansari M, Krajinovic M, *Pharmacogenomics of acute leukemia*. *Pharmacogenomics*, 2007. 8: p. 817-34.
 23. Maitland ML, Vasisht K, Ratain MJ, *TPMT, UGT1A1 and DPYD: genotyping to ensure safer cancer therapy?* *Trends Pharmacol Sci.*, 2006. 27: p. 432-7.
 24. http://www.prometheuspaitients.com/Products_Diagnostics.asp.
 25. Iyer L, King CD, Whittington PF, Green MD, Roy SK, Tephly TR, Coffman BL, Ratain MJ, *Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes*. *J Clin Invest*, 1998. 101: p. 847-54.
 26. Algeciras-Schimmich A, O'Kane DJ, Snozek CL, *Pharmacogenomics of tamoxifen and irinotecan therapies*. *Clin Lab Med*, 2008. 28: p. 553-67.
 27. Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka H, Yokoyama A, Saitoh S, Shimokata K, Hasegawa Y, *Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis*. *Cancer Res*, 2000. 60: p. 6921-6.

28. Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, Chen PX, Das S, Kocherginsky M, Karrison T, Janisch L, Ramírez J, Rudin CM, Vokes EE, Ratain MJ, *Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan.* J Clin Oncol, 2004. 22: p. 1382-8.
29. Haga SB, Thummel KE, Burke W, *Adding pharmacogenetics information to drug labels: lessons learned.* Pharmacogenet Genomics, 2006. 16: p. 847-54.
30. O'Dwyer PJ, Catalano RB, *Uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 and irinotecan: practical pharmacogenomics arrives in cancer therapy.* J Clin Oncol, 2006. 24: p. 4534-8.
31. www.fda.gov/cder/guidance/6400fnl.pdf.
32. Rothstein, Mark A, *Pharmacogenomics : social, ethical, and clinical dimensions*, Wiley-Liss. 2003, Hoboken, N.J. p. 229-50.
33. Kirk RJ, Hung JL, Horner SR, Perez JT, *Implications of pharmacogenomics for drug development.* Exp Biol Med (Maywood), 2008. 233: p. 1484-97.
34. Licinio J, Wong ML, *Pharmacogenomics : the search for individualized therapies*, Wiley-VCH. 2002, Weinheim.
35. Evans WE, Relling MV, *Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics.* Science, 1999. 286: p. 487-91.
36. Bourgeois S, Labuda D, *Dynamic allele-specific oligonucleotide hybridization on solid support.* Anal Biochem 2004. 324: p. 309-11.
37. Kalow W, Meyer Urs A, Tyndale R *Pharmacogenomics.* 2th ed, Taylor & Francis. 2005: New York. Chap: 11-13.
38. www.transgenomic.com.
39. Yi, Kim, *Folate and cancer prevention: a new medical application of folate beyond hyperhomocysteinemia and neural tube defects.* Nutr Rev, 1999. 57: p. 314-21.
40. Krajcinovic M, Moghrabi A, *Pharmacogenetics of methotrexate.* Pharmacogenomics, 2004. 5: p. 819-34.
41. Cronstein BN, Naime D, Ostad E, *The antiinflammatory effects of methotrexate are mediated by adenosine.* Adv Exp Med Biol, 1994. 370: p. 411-6.
42. Zhang L, Taub JW, Williamson M, Wong SC, Hukku B, Pullen J, Ravindranath Y, Matherly LH, *Reduced folate carrier gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: relationship to immunophenotype and ploidy.* Clin Cancer Res, 1998. 4: p. 2169-77.
43. Gorlick R, Goker E, Trippett T, Steinherz P, Elisseyeff Y, Mazumdar M, Flintoff WF, Bertino JR, *Defective transport is a common mechanism of acquired methotrexate resistance in acute lymphocytic leukemia and is associated with decreased reduced folate carrier expression.* Blood, 1997. 89: p. 1013-8.
44. Moscow JA, Connolly T, Myers TG, Cheng CC, Paul K, Cowan KH, *Reduced folate carrier gene (RFC1) expression and anti-folate*

- resistance in transfected and non-selected cell lines. Int J Cancer, 1997. 72: p. 184-90.*
45. Matherly LH, Taub JW, Ravindranath Y, Proefke SA, Wong SC, Gimotty P, Buck S, Wright JE, Rosowsky A, *Elevated dihydrofolate reductase and impaired methotrexate transport as elements in methotrexate resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood, 1995. 85: p. 500-9.*
 46. Göker E, Waltham M, Kheradpour A, Trippett T, Mazumdar M, Elisseyeff Y, Schnieders B, Steinherz P, Tan C, Berman E, et al., *Amplification of the dihydrofolate reductase gene is a mechanism of acquired resistance to methotrexate in patients with acute lymphoblastic leukemia and is correlated with p53 gene mutations. Blood, 1995. 86: p. 677-84.*
 47. Serra M, Reverter-Branchat G, Maurici D, Benini S, Shen JN, Chano T, Hattinger CM, Manara MC, Pasello M, Scotlandi K, Picci P, *Analysis of dihydrofolate reductase and reduced folate carrier gene status in relation to methotrexate resistance in osteosarcoma cells. Ann Oncol, 2004. 15: p. 151-60.*
 48. Jackson RC, Hart LI, Harrap KR, *Intrinsic resistance to methotrexate of cultured mammalian cells in relation to the inhibition kinetics of their dihydrofolate reductases. Cancer Res, 1976. 36: p. 1991-7.*
 49. Fotoohi AK, Albertioni F, *Mechanisms of antifolate resistance and methotrexate efficacy in leukemia cells. Leuk Lymphoma, 2008. 49: p. 410-26.*
 50. Cowan KH, Jolivet J, *A methotrexate-resistant human breast cancer cell line with multiple defects, including diminished formation of methotrexate polyglutamates. J Biol Chem, 1984. 259: p. 10793-800.*
 51. Li WW, Lin JT, Tong WP, Trippett TM, Brennan MF, Bertino JR, *Mechanisms of natural resistance to antifolates in human soft tissue sarcomas. Cancer Res, 1992. 52: p. 1434-8.*
 52. Barredo JC, Synold TW, Laver J, Relling MV, Pui CH, Priest DG, Evans WE, *Differences in constitutive and post-methotrexate folypolyglutamate synthetase activity in B-lineage and T-lineage leukemia. Blood, 1994. 84: p. 564-9.*
 53. Rots MG, Pieters R, Kaspers GJ, van Zantwijk CH, Noordhuis P, Mauritz R, Veerman AJ, Jansen G, Peters GJ, *Differential methotrexate resistance in childhood T- versus common/preB-acute lymphoblastic leukemia can be measured by an in situ thymidylate synthase inhibition assay, but not by the MTT assay. Blood, 1999. 93: p. 1067-74.*
 54. Gorlick R, Goker E, Trippett T, Waltham M, Banerjee D, Bertino JR, *Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia. N Engl J Med, 1996. 335: p. 1041-8.*
 55. Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS, Nicolas JP, *A polymorphism (80G->A) in the reduced*

- folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. Mol Genet Metab, 2000. 70: p. 310-5.*
56. De Marco P, Calevo MG, Moroni A, Arata L, Merello E, Cama A, Finnell RH, Andreussi L, Capra V, *Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as risk factors for NTDs. Eur J Pediatr Surg, 2001. 11: p. Suppl 1:S14-7.*
 57. Shaw GM, Lammer EJ, Zhu H, Baker MW, Neri E, Finnell RH, *Maternal periconceptional vitamin use, genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G), and risk of spina bifida. Am J Med Genet, 2002. 108: p. 1-6.*
 58. Laverdière C, Chiasson S, Costea I, Moghrabi A, Krajinovic M, *Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood, 2002. 100: p. 3832-4.*
 59. Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K, *Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. Cell Struct Funct, 1995. 20: p. 191-7.*
 60. Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, Omura K, Watanabe G, Danenberg PV, *Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. Clin Cancer Res, 2001. 7: p. 4096-101.*
 61. Kawakami K, Omura K, Kanehira E, Watanabe Y, *Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. Anticancer Res, 1999. 19: p. 3249-52.*
 62. Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, Warren R, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ, *Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. Pharmacogenomics J, 2001. 1: p. 65-70.*
 63. Uchida K, Hayashi K, Kawakami K, Schneider S, Yochim JM, Kuramochi H, Takasaki K, Danenberg KD, Danenberg PV, *Loss of heterozygosity at the thymidylate synthase (TS) locus on chromosome 18 affects tumor response and survival in individuals heterozygous for a 28-bp polymorphism in the TS gene. Clin Cancer Res, 2004. 10: p. 433-9.*
 64. Krajinovic M, Costea I, Primeau M, Dulucq S, Moghrabi A, *Combining several polymorphisms of thymidylate synthase gene for pharmacogenetic analysis. Pharmacogenomics J, 2005. 5: p. 374-80.*
 65. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al., *A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet, 1995. 10: p. 111-3.*
 66. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R, *A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase*

- (*MTHFR*) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*, 1998. 64: p. 169-72.
67. Krajcinovic M, Lemieux-Blanchard E, Chiasson S, Primeau M, Costea I, Moghrabi A, *Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Pharmacogenomics J*, 2004. 4: p. 66-72.
 68. Aplenc R, Thompson J, Han P, La M, Zhao H, Lange B, Rebbeck T, *Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and therapy response in pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Cancer Res*, 2005. 65: p. 2482-7.
 69. Costea I, Moghrabi A, Laverdiere C, Graziani A, Krajcinovic M, *Folate cycle gene variants and chemotherapy toxicity in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia*. *Haematologica*, 2006. 91: p. 1113-6.
 70. Chen MJ, Shimada T, Moulton AD, Cline A, Humphries RK, Maizel J, Nienhuis AW, *The functional human dihydrofolate reductase gene*. *J Biol Chem*, 1984. 259: p. 3933-43.
 71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=126060>.
 72. Masters JN, Attardi G, *Discrete human dihydrofolate reductase gene transcripts present in polysomal RNA map with their 5' ends several hundred nucleotides upstream of the main mRNA start site*. *Mol Cell Biol*, 1985. 5: p. 493-500.
 73. Blume SW, Meng Z, Shrestha K, Snyder RC, Emanuel PD, *The 5'-untranslated RNA of the human dhfr minor transcript alters transcription pre-initiation complex assembly at the major (core) promoter*. *J Cell Biochem*, 2003. 88: p. 165-80.
 74. Martianov I, Ramadass A, Serra Barros A, Chow N, Akoulitchev A., *Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript*. *Nature*, 2007. 445: p. 666-70.
 75. Dulucq S, St-Onge G, Gagné V, Ansari M, Sinnott D, Labuda D, Moghrabi A, Krajcinovic M, *DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL*. *Blood*, 2008. 111: p. 3692-700.
 76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.
 77. Fujii H, Shimada T, *Isolation and characterization of cDNA clones derived from the divergently transcribed gene in the region upstream from the human dihydrofolate reductase gene*. *J Bio Chem*, 1989. 264: p. 10057-64.
 78. <http://www.biobase-international.com/pages/index.php?id=291>.
 79. Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neuböck R, Hofacker IL, *The Vienna RNA websuite*. *Nucleic Acids Res*, 2008. 36: p. W70-4.
 80. Tai N, Ding Y, Schmitz JC, Chu E, *Identification of critical amino acid residues on human dihydrofolate reductase protein that mediate RNA recognition*. *Nucleic Acids Res*, 2002. 30: p. 4481-8.

81. **Tai N, Schmitz JC, Chen TM, Chu E, *Characterization of a cis-acting regulatory element in the protein-coding region of human dihydrofolate reductase mRNA*. Biochem J, 2004. 378: p. 999-1006.**
82. **Mishra PJ, Humeniuk R, Mishra PJ, Longo-Sorbello GS, Banerjee D, Bertino JR, *A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104: p. 13513-8.**