

Université de Montréal

**Les Déterminants Génétiques de la Pharmacocinétique du
Busulfan et les Résultats de la Transplantation**

par
Mohamed Aziz Rezgui

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise és Sciences (M.Sc.)
en Pharmacologie
option Pharmacogénomique

Décembre 2012

© Mohamed Aziz Rezgui, 2012.

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Les Déterminants Génétiques de la Pharmacocinétique du
Busulfan et les Résultats de la Transplantation**

présenté par :
Mohamed Aziz Rezgui

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Guy Rousseau, président-rapporteur

Dr. Maja Krajinovic, directeur de recherche

Dr. Michel Duval, codirecteur

Dr. Henrique Bittencourt, membre du jury

RÉSUMÉ

Le busulfan (Bu) est un composé clé de la phase de conditionnement chez les enfants subissant une transplantation des cellules souches hématopoïétiques (TCSH). Les différences inter-individuelles de la pharmacocinétique (PK) du Bu pourraient affecter son efficacité et sa toxicité. Le Bu est principalement métabolisé par la glutathion-S-transférase (GST). Nous avons étudié la relation des génotypes GSTA1, GSTM1 et GSTP1 avec la PK de la première dose de Bu et la relation avec les résultats de la TCSH chez 69 enfants recevant un régime de conditionnement myéloablatif. Le génotype GSTM1 nul a corrélé avec une exposition élevée du Bu et une faible clairance (CL) chez les patients âgés de 4 ans ($p \leq 0,04$). Dans le respect du rôle fonctionnel suggéré d'haplotype GSTA1 *A2, il a été associé à des niveaux plus faibles de médicaments et des niveaux élevés de CL ($p \leq 0,03$). L'effet Gène-dose a également été observé ($p = \leq 0,007$). L'haplotype de GSTA1 était associé avec les résultats de la TCSH. Les porteurs de deux copies d'haplotype *A2 avaient une meilleure survie sans événement ($p = 0,03$). En revanche, les individus homozygotes pour haplotypes * B et *B1 ont un risque plus élevé d'atteindre la maladie veino-occlusive (MVO) ($p = 0,009$). Les individus porteurs de GSTM1 nul âgés de 4 ans possèdent un risque plus fréquent d'avoir la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) ($p = 0,03$). En conclusion, nous avons montré que les variantes génétiques de GST influencent la PK du BU et les résultats de la TCSH chez les enfants. Pour l'ajustement de la posologie, un modèle avec l'inclusion des facteurs génétiques et non génétiques devrait être évalué et validé dans une étude prospective.

Mots-clés: busulfan; transplantation des cellules souches hématopoïétiques; pharmacocinétique; enfants; GST et pharmacogénétique.

ABSTRACT

Busulfan (Bu) is a key compound of conditioning regimen in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Inter-individual differences in Bu pharmacokinetics might affect Bu efficacy and toxicity. Since Bu is mainly metabolized by glutathione S-transferase (GST), we investigated the relationship between *GSTA1*, *GSTM1* and *GSTP1* genotypes with first-dose Bu pharmacokinetics (PK), and relationship with HSCT outcomes in 69 children receiving myeloablative conditioning regimen. *GSTM1* null genotype correlated with higher Bu exposure and lower clearance in patients older than 4 years ($p \leq 0.04$). In accordance with the suggested functional role *GSTA1**A2 haplotype was associated with lower drug levels and higher drug clearance ($p \leq 0.03$). Gene-dosage effect was also observed ($p = \leq 0.007$). *GSTA1* haplotypes were associated with HSCT outcomes. Patients with two copies of haplotype *A2 had better event free survival ($p = 0.03$). In contrast, homozygous individuals for haplotypes *B and *B1 had higher occurrence of veno-occlusive disease ($p = 0.009$). *GSTM1* null individuals older than 4 years had more frequently graft versus host disease ($p = 0.03$). In conclusion, we showed that *GST* gene variants influence Bu PK and outcomes of HSCT in children. A model for the dosage adjustment with the inclusion of genetic and non-genetic factors should be evaluated in a future prospective validation cohort.

Keywords: busulfan; hematopoietic stem cell transplantation; pharmacokinetics; children; GST; pharmacogenetics

TABLE DE MATIÈRES

RÉSUMÉ	1
ABSTRACT.....	2
LISTE DES TABLEAUX.....	4
LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS.....	6
REMERCIEMENTS.....	9
DÉDICACE.....	10
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	11
1.1 Contexte de recherche	11
1.1.1 Pharmacogénétique / Pharmacogénomique.....	12
1.1.1.1 Définition.....	12
1.1.1.2 Études antérieures	13
1.1.1.3 La diversité génétique interindividuelle.....	18
1.1.1.4 Les études d'associations	19
1.1.1.5 La méthode ASO-PCR	20
1.1.1.6 Métabolisme des Médicaments.....	21
1.1.2. Le Busulfan (BU)	22
1.1.2.1. Forme galénique	23
1.1.2.2. Mécanisme d'action.....	23
1.1.2.3. Indication du BU	23
1.1.2.4. Facteurs de Variabilité, Effets Indésirables & Toxicité du BU.....	25
1.1.2.5. Pharmacocinétique du BU	29
1.1.2.6. Conditionnement du BU pré-greffe dans la TCSH	31
1.1.3. La TCSH.....	32
1.1.3.1. Cellules souches (CS)	32
1.1.3.3. Indications de la TCSH	33
1.1.3.4. Les complications de la TCSH	34
CHAPITRE 2: HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	39
CHAPITRE 3: MÉTHODOLOGIE.....	40
CHAPITRE 4: ARTICLE PUBLIÉ DURANT CE MÉMOIRE.....	41
CHAPITRE 5: LA COHORTE D'ITALIE.....	76
4.1. Introduction	76
4.2. Matériels et Méthodes	78
4.3. Objectifs	79
4.4. Les résultats.....	79
4.4.1. Les résultats d'analyses d'associations	80
4.5. Les Tableaux	84
CHAPITRE 5: DISCUSSION.....	88
CHAPITRE 6: CONCLUSION.....	92
BIBLIOGRAPHIE.....	93

LISTE DES TABLEAUX

Table 1. Les tests pharmacogénétique disponibles [14].....	15
Table 2. Les caractéristiques cliniques des patients atteints de la maladie veino occlusive du foie selon la sévérité de la maladie [26].....	27
Table 3. Les stades de la maladie contre l'hôte aigue [51].....	35
Table 4. Les grades de la maladie contre l'hôte aigue [51].....	35
Table 5. Les caractéristiques démographiques chez les enfants de l'étude (n=46).....	84
Table 6. Les paramètres de Pharmacocinétique du Busulfan observés chez les enfants de l'étude (n=46).....	85
Table 7. Les haplotypes de GSTA1 et les fréquences des allèles mineurs dans la population étudiée (n=46).....	86
Table 8. Les résultats cliniques observés chez les enfants de l'étude (n=46).....	87

LISTE DES FIGURES

Fig. 1. Exemple d'une mutation définissant un polymorphisme d'ADN.....	18
Fig. 2. Exemple des résultats de génotypage utilisant la méthode d'Allèle Spécifique Oligonucléotide (ASO).....	20
Fig. 3. Le métabolisme des médicaments.....	22
Fig. 4. Formule chimique du busulfan.....	22
Fig. 5. Métabolisme du Busulfan [44].....	30
Fig. 6. Le coefficient de déséquilibre de liaison R2 entre les polymorphismes du GSTA1.....	78
Fig. 7. Influence du GSTA1 C69T sur la PK du BU pour le groupe entier.....	81
Fig. 8. Influence du GSTA1 C1142G sur la PK du BU pour le groupe entier.....	81
Fig. 9. Influence du GSTA1 C69T sur la PK du BU pour le sexe féminin.....	82
Fig. 10. Influence du GSTA1 C1142G sur la PK du BU pour le sexe féminin.....	82
Fig. 11. Le risque d'atteindre aGvHD chez les porteurs de GSTM1 null versus non porteurs.....	83

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique;

aGvHD : La maladie du greffon contre l'hôte aigue;

ASO : Allèle Spécifique Oligonucléotide;

ASO-PCR : Allèle Spécifique Oligonucléotide-Réaction en Chaîne par Polymérisation;

ATG: Globulineantithymocyte ;

AUC : Aire sous la courbe;

Bu: Busulfan;

CCR: Cancer colorectal;

cGvHD : La maladie du greffon contre l'hôte chronique;

CH : Cystite hémorragique;

Cmax : Concentration plasmatique maximale;

CMV : Cytomégalovirus;

CP : les complications pulmonaires;

CR1: première rémission;

CS : Cellules souches;

CSA: Cyclosporine;

CSH : Cellules souches hématopoïétiques;

CSS : Concentration plasmatique en état d'équilibre;

CSSP : Les cellules souches du sang périphérique

Cy: Cyclophosphamide;

CYP : Cytochrome;

EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique;

GST : Glutathion S-transférase;

GSTA1 : Glutathion s-transférase Alpha 1;

GSTM1 : Glutathion s-transférase Mu 1;

GSTP1 : Glutathion s-transférase Pi 1;

GSTT1 : Glutathion s-transférase Theta 1;

GvHD : La maladie du greffon contre l'hôte;

IMC : Indice de masse corporelle;

IV : Intraveineuse;

Kb: Kilo de base;

LLA : Leucémie lymphoblastique aigue;

LMA : Leucémie myéloïde aigue;

Mel: Melphalan;

MMF: Mycophenolate_mofetil;

MO : Moelle osseuse;

MRD: correspond donneur apparenté (matched related donor);

MTX: Methotrexate;

MVO: La maladie veino-occlusive;

PCR : Réaction en chaine par polymérisation;

PD : Pharmacodynamique;

PK : Pharmacocinétique;

PO : Voie orale;

SC : Surface corporelle;

SNP : Polymorphisme nucléotidique simple;

TMO : Transplantation de moelle osseuse;

TCSH : Transplantation des cellules souches hématopoïétiques.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier particulièrement ma directrice de recherche Dr Maja Krajinovic pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour son encadrement exemplaire, pour son aide précieuse et son soutien.

Mes remerciements vont également au Dr Marc Ansari, Dr Yves Théorêt, Dr Michel Duval, Dr Henrique Bittencourt pour leurs précieux conseils, leurs recommandations, ainsi que leur excellent encadrement grâce à qui j'ai réussi à accomplir ce modeste mémoire.

J'exprime aussi ma grande reconnaissance à mes chers collègues du laboratoire: Margaret Labuda, Julie Rousseau, Barham Sherif Askari, Vincent Gagné et Mohsen Ben Tanfous, pour leur accueil, leur accompagnement et leur partage d'expérience.

Je remercie tous les stagiaires venus faire un court séjour pour leurs conversations amicales et avoir mis de la vie dans le laboratoire.

Je félicite tout le personnel du CHU Sainte-Justine pour le merveilleux environnement de travail, le professionnalisme et le service remarquable de tous les employés en particulier les infirmières de recherche Mme Samira Mezziani et Mme catherine Desjean et le bioinformaticien Pascal st-Onge.

Je tiens à remercier tous les membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à évaluer mon travail, en espérant que ce projet aura répondu à leurs attentes.

DÉDICACE

A la mémoire de la personne qui m'est très chère, à mon père Abdel Aziz, votre sourire m'a accompagné dans les plus heureux moments de ma vie et aujourd'hui c'est votre âme que je vois présente lors de ce moment exceptionnel.

A ma très chère mère Rebeh, recevez l'expression de ma grande gratitude et mes plus sincères amours pour votre grand support et encouragements durant mes études. Que dieu vous protège.

A mes sœurs Jihene, Khitem, Lamia, Semia, Dalinda, Sana, Najla, Bouthaina et Nawel, pour leurs amours et leurs farces qui rendent ma vie plus belle.

A mon épouse Sabrine, une amie à vie, je n'oublierai jamais ton soutien et ton amour que tu m'as donnés.

Et

Mille mercis à mon bébé Abdel-Aziz d'être ainsi associé à mon bonheur.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Contexte de recherche

La pharmacogénétique est une discipline qui a permis de détecter les variations génétiques des individus avant de prescrire un traitement dans le but d'améliorer leur réponse thérapeutique. Elle peut ainsi nous amener à une médecine personnalisée.

Le busulfan (BU) est un composé clé dans les régimes de conditionnement myéloablatif pour les enfants qui subissent une transplantation des cellules souches hématopoïétiques (TCSH). Sa pharmacocinétique (PK) a été mise en œuvre par plusieurs études quant à son utilisation dans le conditionnement pré-greffe des cellules souches hématopoïétiques (CSH). En effet, la greffe des cellules souches est une technique d'injection intraveineuse (IV) de CSH périphériques qui est utilisée pour reconstruire des nouvelles cellules saines. Elle est indiquée dans des pathologies graves malignes ou non malignes et en maladies congénitales.

Le BU est indiqué dans le conditionnement pré-greffe de ces CSH sous un protocole précis de chimiothérapie. Cependant, lors de son administration il peut développer plusieurs toxicités. Puisqu'il a un index thérapeutique étroit, la variabilité de l'exposition au BU peut conduire à des effets secondaires ou à une diminution de l'efficacité du traitement. Cette variabilité peut être expliquée par plusieurs facteurs, notamment des polymorphismes génétiques.

Puisque la glutathion-S-transférase (GST) est la principale voie de biotransformation du BU, elle est impliquée dans son métabolisme ainsi que dans la détoxification de diverses variétés des médicaments utilisés dans le traitement du cancer. La pharmacogénétique contribue à la compréhension de la variabilité dans les réponses au traitement par l'identification des polymorphismes génétiques, qui peuvent prédire les résultats des traitements, le but étant d'améliorer l'efficacité tout en réduisant leurs effets secondaires.

1.1.1 Pharmacogénétique / Pharmacogénomique

1.1.1.1 Définition

La pharmacogénomique étudie les effets des médicaments sur le génome humain, qui est défini par l'ensemble des gènes, pour déterminer de nouvelles cibles pour les traitements. Elle englobe la pharmacogénétique qui combine la génétique et la pharmacologie, depuis 60 ans. Elle a été créée par Arno Motulsky en 1957 comme une discipline permettant d'étudier et de comprendre l'influence de la variabilité génétique sur la réponse aux médicaments. Cette variabilité interindividuelle affecte la PK du médicament par une variation codant des enzymes et la pharmacodynamique (PD) du traitement par une variation codant des récepteurs. Depuis longtemps, les chercheurs essaient de trouver une explication pour la grande variabilité des réponses des individus aux médicaments, dans la discipline de pharmacogénétique.

En effet, la pharmacogénétique contribue à minimiser les effets secondaires des médicaments et prévenir les risques de toxicités. Elle peut aider à maximiser l'efficacité du traitement utilisé chez un individu. Son principal objectif consiste à

personnaliser la thérapeutique en fonction des variables génétiques de chaque individu [1, 2].

Par ailleurs, la pharmacogénétique/pharmacogénomique est une discipline qui émerge vers une médecine personnalisée utilisant des données génétiques ou moléculaires pour optimiser les traitements médicamenteux [3, 4].

1.1.1.2 Études antérieures

Plusieurs études récentes ont été menées pour prouver l'importance de la pharmacogénétique.

Selon "American Cancer Society" [5], il y avait plus de 141000 nouveaux patients atteints du cancer colorectal (CCR) dont 49380 personnes sont décédées, en 2011 et l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) [6] a montré, en 2004, que le cétuximab traite le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) dans un stade avancé du CCR pour tous les patients qui ne répondent plus à la chimiothérapie. En effet, le cétuximab est un anticorps monoclonal chimérique IgG1 qui se lie spécifiquement avec l'EGFR. Cette liaison induit son internalisation. De plus, il bloque la liaison des ligands endogènes de l'EGFR ce qui inhibe sa signalisation.

Par la suite, en 2009, la FDA a mis en évidence ce résultat en se basant sur des études qui prouvent l'inefficacité de cétuximab chez les patients dont les tumeurs possédant un gène muté KRAS. Cette étude a aussi montré que la survie médiane était de 8,6 mois pour les patients dont les tumeurs n'ont pas subi des mutations de gène KRAS et qui ont reçu cétuximab, et de 5 mois pour ceux qui ne l'ont pas reçu. Tandis que, pour les porteurs de la mutation KRAS, la survie médiane était de 4,8 mois pour les patients qui ont reçu cétuximab et de 4,6 mois pour ceux qui ne l'ont pas reçu.

La FDA [6] a approuvé le premier test génétique pour détecter la mutation de gène KRAS avant de prescrire le médicament cétuximab. Elle a aussi démontré que cétuximab est un traitement efficace pour le cancer colorectal (CCR) en absence d'une mutation du gène KRAS, en 2012.

Plusieurs études ont mis l'accent sur l'importance d'une médecine personnalisée qui permet d'améliorer la sécurité de la pharmacothérapie en combinant trois facteurs dose-génétique-résultats cliniques. Prenons l'exemple de l'irinotécan qui est un médicament utilisé dans la chimiothérapie du traitement du CCR. Il est converti en son métabolite actif le SN-38, un inhibiteur de topoisomérase I, dont son inactivation est assurée par glucuronidation sous l'effet de l'uridine diphosphate glucuronosyltransférase (UGT1A1) [7].

Les patients porteurs du polymorphisme du UGT1A1*28 ont un risque élevé de développer une neutropénie sévère, une diarrhée et même le décès [8]. Des études [8, 9, 10] ont suggéré que les homozygotes du génotype UGT1A1*28*28 sont associés à une sévérité accrue de la diarrhée et de la neutropénie et une diminution de la conversion de SN à SN-38-38G induite par l'administration de l'irinotécan. En se basant sur ces résultats, et après avoir examiné plusieurs essais pharmacogénétiques pour évaluer l'association entre le génotype UGT1A1*28 et la toxicité de l'irinotécan, en 2005, la FDA a recommandé d'une part de changer l'étiquette du médicament pour diminuer sa dose chez les patients porteurs du génotype UGT1A1*28/*28, et d'autre part, elle a approuvé un test de diagnostic pour le génotype UGT1A1*28 [11, 12].

Hu ZY *et al.* [10] a montré que le risque de diarrhée sévère à des doses moyennes et élevées de l'irinotécan était plus élevé chez les patients ayant un génotype UGT1A1 *28/*28 par rapport à ceux qui ont les génotypes UGT1A1 *1/*1 ou UGT1A1 *1/*28. Ils ont confirmé ainsi que l'importance relative de la

glucuronidation du SN-38 peut expliquer que la dose du médicament dépend de l'association entre le génotype UGT1A1*28 et le risque de neutropénie induit par l'irinotecan [13].

Prenons l'exemple d'autres tests pharmacogénétiques faits pour différents médicaments et présentés dans le tableau suivant (voir Table 1) [14].

Table 1. Les tests pharmacogénétiques disponibles [14].

Nom du Médicament	Les Tests de Pharmacogénétique	Nom du Test	Informations pharmacogénétiques sur l'étiquette des médicaments.
Abacavir	HLA-B*5701	HLA-B5701	Le dépistage de l'allèle HLA-B*5701 est recommandé avant l'administration du traitement de l'abacavir; cette approche a été trouvée pour réduire le risque de réaction d'hypersensibilité. (Ziagen(abacavir)label: http://www.fda.gov/cder/foi/label/2008/020977s019,020978s022lbl.pdf)
5-fluorouracile	DPYD	“TheraGuide 5-fluorouracile”	L'Efudex ne doit pas être utilisé chez les patients atteints d'un déficit en dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD). (Efudex (fluorouracil) label: http://www.fda.gov/cder/foi/label/2005/016831s049lbl.pdf)
Irinotecan	UGT1A1*28	“Invader UGT1A1 Molecular Assay”	Une réduction de la dose initiale d'au moins un niveau de CAMPOSTAR doit être envisagée chez les patients homozygote d'allèle UGT1A1 * 28 lorsque l'irinotecan est administré tout seul ou en association avec d'autres agents. (Camptosar (irinotecan) label: http://www.fda.gov/cder/foi/label/2006/020571s030lbl.pdf)

Azathioprine 6- Mercaptopurine	Thiopurine methyltransferase (TPMT)	“Prometheus TPMT Genetics”	Il est recommandé de prendre en considération soit le génotype ou le phénotype des patients pour TPMT. (Imuran (azathioprine) label: http://www.fda.gov/cder/foi/label/2008/016324s031,017391s014lbl.pdf)
Warfarine	CYP2C9 VKORC1	“Cytochrome P450 2C9 and VKORC1 warfarin genotyping”	Les plus faibles premières doses doivent être envisagées chez les patients avec certaines variations génétiques dans les enzymes CYP2C9 et VKORC1. (Coumadin (warfarin) label: http://www.fda.gov/cder/foi/label/2007/009218s105lblv2.pdf)
Tamoxifène	CYP2D6	“Tamoxifen response”	Aucune information sur le génotype CYP2D6 et sa réponse au tamoxifène sur l'étiquette du médicament. (Tamoxifen, label: http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=4262)
Carbamazepine Phénytoïne	HLA-B*1502	“HLA-B*1502 carbamazepines sensitivity”	Les patients appartenant à des populations à des risques génétiques doivent être testés pour la présence de l'allèle HLA-B * 1502 avant de commencer le traitement avec Tegretol. Les patients porteurs de cet allèle ne doivent pas être traités par le Tegretol à moins que ses avantages dépassent ses risques. (Tegretol (carbamazepine) label: http://www.fda.gov/cder/foi/label/2007/016608s098lbl.pdf)
Clozapine	HLA-DQB1	Clozapine	Aucune information sur le génotype HLA-DQB1 et sa réponse à la clozapine sur l'étiquette du médicament. (Clozaril (clozapine) label: http://dailymed.nlm.nih.gov/daily)

			med/drugInfo.cfm?id=8631)
Trastuzumab	Récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains (HER2)	“PathVysion HER2 DNA Probe Kit”	Détection de la surexpression de la protéine HER2 est nécessaire pour la sélection des patients appropriés pour le traitement par Herceptin parce qu'ils sont les seuls patients étudiés pour lesquels le résultat a été démontré. L'évaluation de la surexpression de HER2 et d'amplification du gène HER2 doivent être effectuées par des laboratoires ayant une compétence démontrée dans l'utilisation de la technologie spécifique. (Herceptin (trastuzumab)label:http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=8221)
Dasatinib Imatinib	BCR-ABL (La translocation BCR et ABL1)	“BCR-ABL quantitation in CML and in LAL ph+; BCR-ABL mutations in CML”	SPRYCEL est indiqué pour le traitement des adultes atteints d'une leucémie lymphoblastique aiguë d'un chromosome Philadelphie positif (LLA Ph+) avec résistance ou intolérance à un traitement antérieur. (Sprycel (dasatinib)label:http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=8592)
Tetrabenazine	CYP2D6	“AmpliChip CYP450 Test”	Les patients doivent être génotypés pour le CYP2D6 avant le traitement avec des doses journalières de tétrabénazine supérieures à 50 mg. Les patients qui ont des métaboliseurs lents ne doivent pas administrer des doses journalières supérieures à 50 mg. (Xenazine(tetrabenazine),label:http://www.fda.gov/cder/foi/label/2008/021894lbl.pdf)

1. 1.1.3 La diversité génétique interindividuelle

La pharmacogénétique est une discipline qui aide à détecter les variations génétiques des individus avant de prescrire un traitement, dans le but d'améliorer la réponse thérapeutique en identifiant tout individu sensible ou résistant à un médicament. L'évaluation des variations génétiques dans le traitement demeure indispensable. Ces variations peuvent être liées à plusieurs facteurs.

Le génome humain contient environ 30 000 gènes, environ 3×10^6 kilo de base (kb) qui sont présentés par un ensemble génétique haploïde et 6×10^6 kb d'un ensemble génétique diploïde. Les différences et les variations interindividuelle génétique peut être expliquée par le polymorphisme nucléotidique simple (SNP), l'indel (insertion / délétion) et le nombre de copies variables.

Parmi ces types de variations génétiques, le SNP est considéré comme le type le plus fréquent et le plus étudié en pharmacogénétique. Le SNP est bi-allélique et la forme la plus simple du polymorphisme génétique, il représente 90% de l'ensemble des polymorphismes de l'acide désoxyribonucléique (ADN) de l'être humain. Le SNP est le polymorphisme d'ADN causé par une mutation d'une seule paire de base et défini par une différence de deux chromosomes sur un segment accordé (voir Fig 1). Il peut être localisé soit dans les régions codantes de gènes, appelées Exon, soit dans les régions non codantes de gènes, nommées Intron.

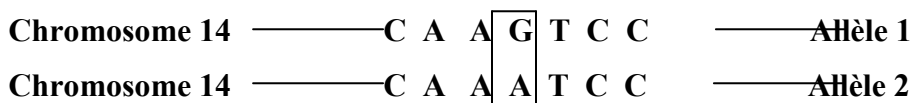


Fig. 1. Exemple d'une mutation définissant un polymorphisme d'ADN.

1.1.1.4 Les études d'association

On distingue deux principales méthodes adaptées pour mener les études pharmacogénétiques:

- a) **Les études d'association pangénomique (GWAS)** : consistent à analyser de nombreuses variations génétiques recouvrant la totalité du génome chez de nombreux individus, tout en s'appuyant sur l'analyse de la liaison génétique. Ces études sont sans hypothèses exigeant des génotypages dont les coûts demeurent très élevés. Plusieurs études ont adopté cette méthode pour approuver l'importance de GWAS pour identifier les loci associés à une variable réponse aux traitements [15].

- b) **L'étude du gène candidat** : basée sur une hypothèse exigeant un petit nombre de génotypage dont les coûts sont faibles. Cependant, il y a environ 30000 gènes. Elle comporte deux types d'analyse :
 - ✓ Une analyse directe entre une maladie et des SNPs d'une séquence fonctionnel ou potentiellement fonctionnel du gène candidat.
 - ✓ Une analyse indirecte entre une maladie et des tags SNP aléatoires au sein ou à proximité du gène candidat.

Plusieurs études sont basées sur cette approche [16].

1.1.1.5 La méthode ASO-PCR

Le génotypage des individus est défini par la méthode d'ASO-PCR (Allèle Spécifique Oligonucléotide-Réaction en Chaîne par Polymérisation). Son principe de base consiste à amplifier le fragment d'ADN par la réaction en chaîne par polymérisation (PCR) pour le transférer sur deux membranes. Qui sera par la suite hybrider des sondes marquées pour détecter sur la première membrane l'allèle sauvage et sur la deuxième l'allèle mutant.

L'utilisation de cette technique nous permet de distinguer sans ambiguïté les homozygotes et les hétérozygotes [17]. En effet, la présence d'un signal sur les deux membranes signifie que l'individu est hétérozygote portant les deux allèles, tandis que la présence d'un signal sur une seule membrane signifie que l'individu est homozygote (voir Fig. 2).

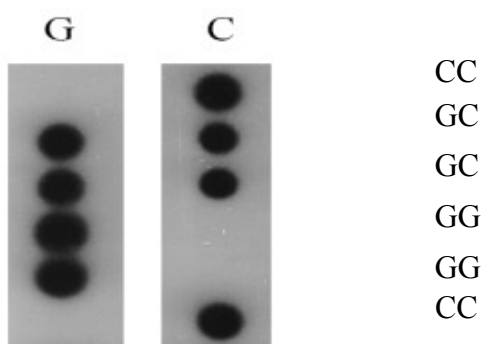


Fig. 2. Exemple des résultats de génotypage utilisant la méthode d'Allèle Spécifique Oligonucléotide (ASO).

1.1.1.6 Métabolisme des Médicaments

La PK du métabolisme des médicaments comporte deux phases [18] (voir Fig 3):

a) Métabolisme de phase I : c'est la phase d'oxydation, elle est présentée par le cytochrome 450 (CYP450) qui définit une famille d'enzyme au niveau hépatique et extra hépatique, intestin, rein et cerveau. Cette famille d'enzyme métabolise à peu près 60% des médicaments par CYP1A1/1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 et CYP3A4.

b) Métabolisme de phase II : c'est la phase de conjugaison qui consiste en plusieurs réactions suivantes :

- ✓ La Glucuronidation
- ✓ La Sulfonation (sulfation)
- ✓ L'Acétylation
- ✓ La Méthylation
- ✓ La conjugaison avec la Gluthation
- ✓ La conjugaison des Acides aminés

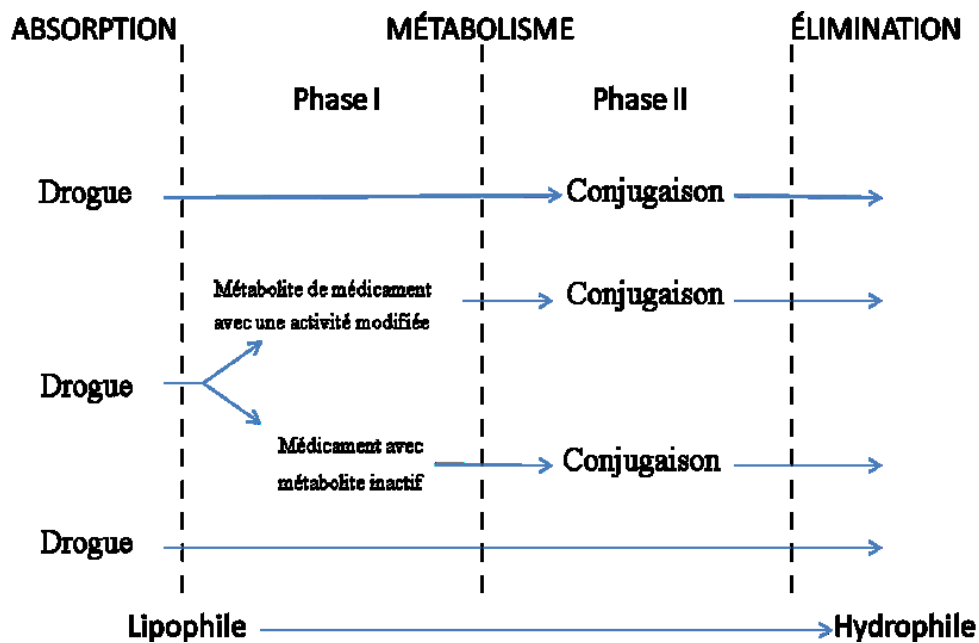


Fig. 3. Le métabolisme des médicaments.

1.1.2. Le Busulfan (BU)

Le BU est un agent alkylant utilisé comme un anticancéreux. Il est un composé clé de la phase de conditionnement chez les enfants subissant une TCSH. Sa masse moléculaire est 246.3 g/mol. Il est présenté sous le nom commercial MYLERAN® et BUSULFEXE®. Il est défini par la formule chimique suivante (voir Fig 4):

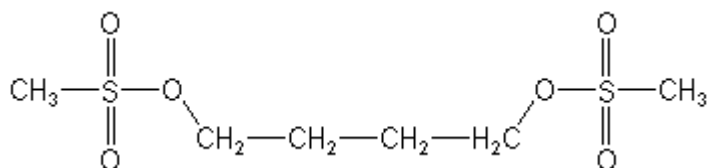


Fig. 4. Formule chimique du busulfan.

1.1.2.1. Forme galénique

Le BU existe sous forme de comprimé ou de solution diluée pour perfusion.

1.1.2.2. Mécanisme d'action

Le BU a un mécanisme d'action qui agit sur une interaction avec l'ADN cellulaire pour attaquer le développement des cellules cancéreuses. Cette interaction consiste à former des ponts inter brins et des pontages ADN-protéines. Le BU passe au niveau du liquide céphalo-rachidien. Il intervient dans l'ensemble des lignées hématopoïétiques à forte doses, tandis qu'à faibles doses, il porte son action sur les cellules de la lignée granulocytaire.

1.1.2.3. Indication du BU

Le BU est indiqué dans le conditionnement pré-greffe des CSH sous un protocole précis de chimiothérapie en association avec d'autres agents alkylants, anticancéreux, tels que :

Chez l'adulte, Le BU est suivie par le CY (BUCY2) pour 60 mg/kg/dose par jour pendant 2 jours pour un total de 2 doses, ce qui correspond à 120 mg/kg.

Chez l'enfant, le BU est suivi par le CY (BUCY4) pour 50 mg/Kg/dose par jour pendant 4 jours pour un total de 4 doses, ce qui correspond à 200 mg/Kg ou de 140 mg/m² de Mel (BuMel).

Le BU est indiqué pour certaines pathologies :

- **Leucémie lymphoblastique aigue (LLA) :** ce type de leucémie touche les cellules sanguines, caractérisée par la multiplication des blastes. Il est considéré comme le cancer le plus fréquent chez les enfants. Aux États –Unis, il y a 2400 patients qui ont atteint la LLA, par année [19]. Ses principaux syndromes se distinguent en syndrome d'insuffisance médullaire (syndrome anémique, hémorragique d'origine plaquettaire et infectieux d'origine granulocytaire), syndrome tumoral (douleurs osseuses, adénopathie, splénomégalie et atteinte tissulaire non lymphoïde (SNC, testicules...)) et complications révélatrices (syndrome de lyse cellulaire tumorale et de leucostase).

L'indication de greffe avec BU pour les patients atteints de LLA est indiqué seulement pour les enfants âgés de moins de 2 ans et en cas d'une deuxième greffe.

- **Leucémie myéloïde aigue (LMA) :** c'est un type de cancer qui porte sur la lignée myéloïde des leucocytes. Elle est manifestée par différents symptômes, tels que l'anémie, la fièvre, les problèmes respiratoires, les douleurs articulaires,...etc. Elle est causée par différents facteurs de risques comme les pathologies hématologiques (le syndrome myélodysplasique ou myéloprolifératif), les chimiothérapies (par exemple utilisant des agents alkylants), les radiations, les facteurs génétiques et les maladies auto-immunes.
- **Les syndromes myélodysplasiques (SMD):** c'est une maladie clonale de l'hématopoïèse qui représente des états pré-leucémiques. Les SMD se constituent par un trouble de la maturation médullaire et une prolifération de cellules immatures se traduisant par une ou plusieurs cytopénies, une dysplasie des trois lignées hématopoïétiques avec une richesse médullaire normale et une

tendance à évoluer vers une LMA. Les SMD ont été classés pathologiquement en cinq groupes définis par le groupe Franco-Américano-Britannique (l'anémie réfractaire, l'anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne, l'anémie réfractaire avec excès de blastes, l'anémie réfractaire avec excès de blastes en transformation et la leucémie myélomonocytaire chronique) [20, 21].

- **Hémoglobinopathies** : ce sont des anomalies de l'hémoglobine de deux sortes qualitative qui conduisent à la production d'une hémoglobine de structure anormale (drépanocytose) et quantitative qui résultent de la synthèse diminuée des chaînes de globine (thalassémies) [22].
- **Déficit immunitaire** : c'est un déficit immunitaire congénital suite à une défaillance ou une absence de l'une des fonctions immunologiques.
- **Les maladies métaboliques** : ce sont des maladies génétiques qui créent des troubles au niveau du métabolisme cellulaire.

1.1.2.4. Facteurs de Variabilité, Effets Indésirables & Toxicité du BU

Le BU a un index thérapeutique étroit, donc la variabilité de l'exposition au BU peut conduire à des effets secondaires ou à une diminution de l'efficacité du traitement.

a) Les facteurs de variabilité :

- ✓ Le sexe,
- ✓ Le poids,

- ✓ Les polymorphismes génétiques,
- ✓ L'âge,
- ✓ La voie d'administration.

b) **Effets Indésirables & Toxicité :** lors d'un conditionnement d'une chimiothérapie administrée pré-greffe des CSH on constate les effets suivants :

- ✓ **La maladie veino-occlusive (MVO):** la toxicité hépatique la plus grave est la MVO, qui se définit ci-bas par le tableau 2. Plusieurs études ont analysé l'impact de MVO chez des patients pédiatriques qui ont subi une TCSH. L'étude de Morgan [23] a constaté que 19% des patients ont atteint la MVO, tandis que l'étude de Barker [24] a montré que 18.3% des patients ont l'incidence de MVO. Cette maladie peut apparaître entre Jour-3 avant et Jour+30 après la greffe en association avec les symptômes suivants [25] :
 - Des douleurs de l'hypochondre droit ;
 - Une ascite ou prise du poids supérieure 5% du poids de base;
 - Une hyperbilirubinémie supérieure 2 mg/dl ou 34.2 $\mu\text{mol/l}$.

Cette pathologie est caractérisée par trois stades :

- **Une MVO de gravité légère :** caractérisée par une bilirubine inférieure à 104 $\mu\text{mol/l}$, un gain de poids inférieur à 5% et une dysfonction hépatique qui soit réversible.
- **Une MVO de gravité modérée :** définie par une bilirubine supérieure à 104 $\mu\text{mol/l}$ et inférieure à 350 $\mu\text{mol/l}$, un gain de poids supérieur à 5%, une ascite et une dysfonction hépatique réversible.

- **Une MVO de gravité sévère :** déterminée par une bilirubine supérieure à 350 μ mol/l, une ascite causant une insuffisance respiratoire, une détérioration rénale et une encéphalopathie hépatique.

Cette classification a été approuvée par l'étude faite par Martha Wadleigh [26] tout en s'appuyant sur une approche antérieure de McDonald [25] (voir Table 2).

Table 2. Les caractéristiques cliniques des patients atteints de la maladie veino-occlusive du foie selon la sévérité de la maladie [26].

	Faible	Modéré	Sévère
Gain de poids (kg), % d'augmentation	7.0 (\pm 3.5 %)	10.1 (\pm 5.3%)	15.5 (\pm 9.2%)
Maximum de bilirubine sérique totale avant 20 jours, mg/dl	4.73 (\pm 2.9)	7.95 (\pm 6.6)	26.15 (\pm 15.3)
Pourcentage des patients avec œdème périphérique	23 %	70 %	85 %
Pourcentage des patients avec ascite	5 %	16 %	48 %
Les besoins de transfusion de plaquettes à jour 20	53.8 (\pm 27.6)	83.6 (\pm 5.0)	118.3 (\pm 51.8)
Pourcentage de mortalité à jour 100 (toutes causes)	3 %	20 %	98 %

- ✓ **Les Cystites hémorragiques (CH) :** c'est une toxicité vésicale présentée sous forme des inflammations de la vessie. Elle peut être, soit d'une origine virale, soit causée par des agents toxiques anticancéreux. Le Cyclophosphamide (CY) est un facteur important pour développer la CH plus particulièrement lorsqu'il est associé au BU lors d'une TCSH. En effet, l'incidence de la CH est de 36% [27], 30% [23] et 18% [28] chez les patients qui ont subi une TCSH.
- ✓ **Les troubles digestifs :** ce sont des troubles liés à des toxicités digestives causées par l'administration des traitements de chimiothérapie lors d'une TCSH. Ils sont signalés par des nausées, des vomissements et des diarrhées,...etc.
- ✓ **Les complications pulmonaires (CP) :** elles peuvent être manifestées après une greffe autologue ou allogénique des CSH. Ses causes se sont des complications infectieuses (bactériennes, fongiques et virales) et non infectieuses (œdème pulmonaire aigu, syndrome de détresse respiratoire, pneumopathie interstitielle...etc.). Une étude menée par Bekele Afessa et *al.* [29] dont le but est de décrire les CP, leurs facteurs de risque, ainsi que l'impact sur la mortalité chez les receveurs autologues. Cette étude a montré, que parmi 1243 patients, seul 343 patients (27.6%) ont développé 487 des CP dont 173 d'origines infectieuses (13,9%), 127 non infectieuses (10,2%) et 43 les deux à la fois infectieuses et non infectieuses (3,5%).

Autre étude menée par A Bergeron et *al.* [30] a évoqué le sujet sur les CP tardives non infectieuses après allogreffe de CSH. Cette étude a constaté que l'incidence de la bronchiolite oblitérante était significativement moindre 1 et 2 ans post l'allogreffe de CSH chez

les patients qui ont bénéficié d'un conditionnement non myéloablatif par rapport au conditionnement myéloablatif.

- ✓ **Les complications neurologiques :** des complications neurologiques, telles que des épisodes épileptiques, accidents vasculaires cérébraux, maux de tête très sévères, paralysie des nerfs crâniens,...etc. peuvent contribuer à la morbidité ou à la mortalité. Elles peuvent survenir avec une fréquence de 11% à 59% pour les patients subissant une TMO et une fréquence de 10% à 15% pour les cas de décès [31, 32, 33, 34]. Une étude d'Uckan et al. [35] qui a été faite pour 113 patients observés durant les trois premiers mois après la TMO, a montré que sur 102 patients, 33 qui ne souffrent pas de symptômes neurologiques aigus sont morts, alors que sur les 11 patients ayant des complications neurologiques 10 sont décédés.
- ✓ **Autres effets indésirables :** d'autres effets indésirables du BU apparaissent lors d'une transplantation, tels que l'apparition des altérations histologiques et cytologiques, mucosite, douleurs fessières, douleurs auriculaires,...etc.

1.1.2.5. Pharmacocinétique du BU

La PK du BU par voie orale est caractérisée par 4 principaux critères : son absorption, sa distribution, son métabolisme et son élimination. Lors de l'administration du BU en perfusion IV de 2 heures, la biodisponibilité du BU est immédiate et complète. Le BU est métabolisé principalement par la conjugaison de glutathion et se catalyse par la GST. Ce conjugué subit encore un métabolisme oxydatif dans le foie. La GSTA1 est la principale isoforme de GST catalysante du métabolisme du BU, tandis que GSTM1 et GSTP1 jouent un rôle important. Son élimination se fait par voie rénale [36, 37, 38, 39, 40]. Après sa conjugaison par la

glutathion, il se convertit en cystéine conjugué par la première voie impliquant la mercapturate-glutamyl transférase et la dipeptidase/la cysteinylglycinase [41]. Le conjugué de la cystéine peut ensuite subir une élimination enzymatique médiée par la cystathionine gamma-lyase pour conclure le tétrahydrothiophène [42]. Par la suite, le tétrahydrothiophène peut être oxydé par le CYP450 et la formation d'autres métabolites (le sulfolane et le 3-hydroxysulfolane) [43] (voir Fig 5).

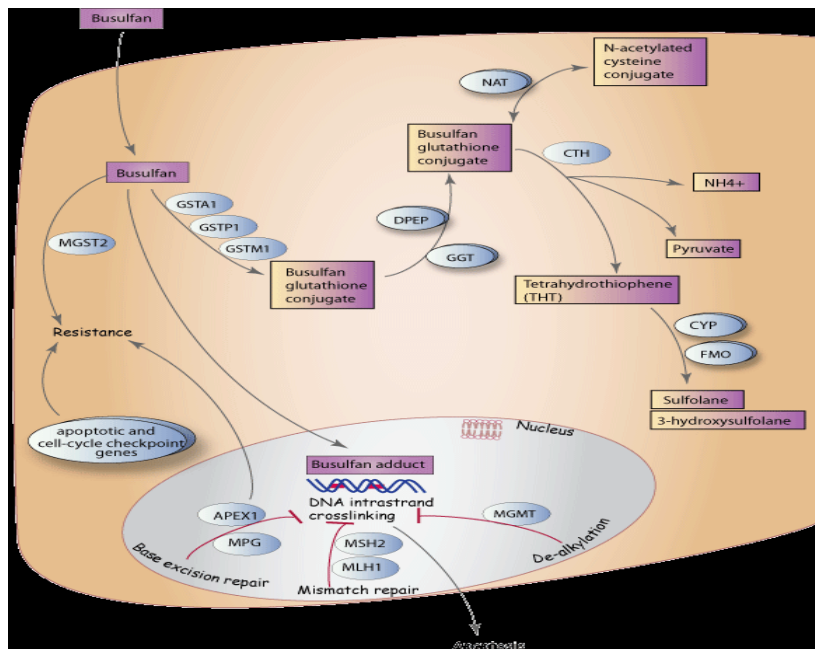


Fig. 5. Métabolisme du Busulfan [44].

1.1.2.6. Conditionnement du BU pré-greffe dans la TCSH

Le BU peut être administré soit par voie orale (PO) ou par voie IV :

Par voie PO le régime de conditionnement de greffe peut se composer par 40 mg/m² de fludarabine par voie IV pour une perfusion de 30 minutes du jour- 6 à- 2 (dose totale de fludarabine 200 mg/m²) et de 4 mg/kg/jour de BU par voie PO (4 fois par jour) du jour -5 à -2 (dose totale de BU 16 mg/kg) [45].

Par voie IV, le BU est administré 4 fois par jour pendant 4 jours pour une perfusion IV de 2 heures chaque 6 heures soit un total de 16 doses, du jour -9 à -6 avant la transplantation. Après 24 heures de la dernière dose (16^{ème}) du BU :

Chez l'adulte, Le BU est suivie par le CY (BUCY2) pour 60 mg/kg/dose par jour pendant 2 jours pour un total de 2 doses, ce qui correspond à 120 mg/kg.

Chez l'enfant, le BU est suivi par le CY (BUCY4) pour 50 mg/Kg/dose par jour pendant 4 jours pour un total de 4 doses, ce qui correspond à 200 mg/Kg ou par 140 mg/m² de Mel (BuMel). Il existe différentes façons pour adapter la dose de BU chez les enfants lors d'un régime du conditionnement pré-greffe de la TCSH :

✓ **Selon l'âge** [46] :

- < 3 mois : la dose prescrite est de 16 mg/m²
- ≥ 3 mois et < 1 an : la dose prescrite est de 0.8 mg/Kg
- ≥ 1 an et < 4 ans : la dose prescrite est de 1 mg/Kg
- ≥ 4 ans: la dose prescrite est de 0.8 mg/Kg

✓ **Selon le poids corporel (kg) [47]:**

- < 9 kg la dose prescrite est de 1mg/kg
- 9 à < 16 kg la dose prescrite est de 1.2mg/kg
- 16 à 23 kg la dose prescrite est de 1.1mg/kg
- 23 à 34 kg la dose prescrite est de 0.95mg/kg
- 34 kg la dose prescrite est de 0.8mg/kg

1.1.3. La TCSH

La greffe des CS est une technique d'injection IV de CSH périphériques. Elle est utilisée pour reconstruire des nouvelles cellules saines. Il existe deux types :

- ✓ **Une greffe autologue** provenant du même individu.
- ✓ **Une greffe allogénique** entre les individus de même espèce apparentée ou non apparentée.

1.1.3.1. Cellules souches (CS)

Ce sont des cellules indifférenciées caractérisées par une capacité de s'auto-renouveler elles même. Elles permettent deux divisions cellulaires : une symétrique générant des cellules filles identiques et l'autre asymétrique (indispensable pour assurer ses 2 fonctions l'auto-renouvellement et la différenciation). Elles possèdent deux différentes sources une embryonnaire et une autre adulte.

On peut classer les CS selon leur potentiel de différenciation en quatre types :

- ✓ **Les CS totipotentes** qui peuvent produire toute sorte de tissus, ils peuvent engendrer un être humain complet.
- ✓ **Les CS pluripotentes** qui sont capables de produire plus de deux cents sortes de cellules.
- ✓ **Les CS multipotentes** sont des cellules différenciées capables de donner naissance à d'autres cellules.
- ✓ **Les CS unipotentes** sont des cellules spécialisées, produisant une seule sorte de cellules capables de s'auto-renouveler.

Les CSH peuvent être recueillies dans la MO, le sang ainsi que dans le sang du cordon ombilical et interviennent lors de l'hématopoïèse. Comme toute CS, la CSH possède la capacité de s'auto-renouveler et donner une nouvelle CSH. Elle se caractérise par une différenciation donnant naissance à une cellule mature (globules rouges, globules blancs et des plaquettes).

1.1.3.3. Indications de la TCSH

Les indications de la TCSH se résument en pathologies graves malignes ou non malignes et en maladies congénitales, prenons l'exemple de [48] :

- ✓ Myélome lors d'inefficacité du traitement de radiothérapie,
- ✓ Leucémie myéloïde aiguë (LMA) lors d'une translocation $t(8;21)(p11;q22)$ et $t(16;16)(p13;q22)$,
- ✓ Leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) lors d'une translocation de Philadelphie (Ph+) $t(9;22)(q34;q11)$ menant à la formation du gène de fusion *Bcr-Abl* et lors d'autre structure d'anomalie chromosomique tel que la translocation $t(4;11)$ et $t(8;14)$,

- ✓ Leucémie myéloïde chronique (LMC) lors de chromosome de Philadelphie (Ph+) t(9;22)(q34;q11) menant à la formation du gène de fusion *Bcr-Abl*,
- ✓ Anémie aplasique,
- ✓ Déficits immunitaires graves,
- ✓ Hémoglobinopathies sévères.

1.1.3.4. Les complications de la TCSH

- ✓ **La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD):** La GVHD est une complication majeure après une greffe allogénique des CSH. Elle est développée s'il y a une différence d'histocompatibilité entre le donneur et le receveur. La GvHD peut être classée en deux types : une GVHD aigue (aGvHD) et une GVHD chronique (cGvHD) selon des manifestations cliniques et la durée du temps après la transplantation [49] :
- a) L'aGvVHD :** Peut survenir dans les 90 jours suivant la greffe pour atteindre principalement trois niveaux : cutané, hépatique et digestif. Les principaux signes figurant au niveau du foie sont souvent sous forme cholestatique. Au niveau de la peau, on constate l'apparition de l'érythème, l'altération de la peau, le rash cutané et la desquamation. Des nausées, des vomissements et les diarrhées sont les premiers signes dans l'appareil digestif [50]. Ces trois niveaux sont évalués en fonction de 4 stades déterminés de 1 à 4 selon le degré de gravité (voir Table 3) et le grade de l'aGvHD est présenté sous forme de 4 grades de I à IV selon les stades déjà définis (voir Table 4) [51].

Table 3. Les stades de la maladie du greffon contre l'hôte aigüe [51].

Stade	Voie intestinale	Foie	Cutanée
0	Diarrhée ≤ 500 ml/d	Bilirubine < 2.0 mg/dl	Pas d'éruption
1	Diarrhée 501-1000 ml/d ou nausée (± vomissement)	Bilirubine 2.0-3.0 mg/dl	Éruption maculopapulaire < 25% de surface corporelle
2	Diarrhée 1001-1500 ml/d	Bilirubine 3.1-6.0 mg/dl	Éruption maculopapulaire 25%-50% de surface corporelle
3	Diarrhée > 1501 ml/d	Bilirubine 6.1-15 mg/dl	Érythrodermie général
4	Douleur abdominal sévère +/- iléus	Bilirubine > 15 mg/dl	Érythrodermie général

Table 4. Les grades de la maladie du greffon contre l'hôte aigüe [51].

Grade	Intestin	Foie	Cutanée
0 (aucun)	0	0	0
I (faible)	0	0	1-2
II (modéré)	1	1	3
III (sévère)	2-4	2-3	0-3
IV (mortelle)		4	4

- **cGvHD** : elle apparaît souvent trois mois après la greffe mais pas nécessairement suite à une aGVHD. La cGvHD peut être limitée, liée à une atteinte cutanée de façon locale, ou extensive qui nécessite un traitement. La cGvHD est une importante complication de la TCS allogénique. Elle se produit dans 27-50% dans les TMO frère et sœur HLA-identique, 47-72% dans les TMO non apparenté et 38-77% dans les transplantations allogénique de CSSP. Elle peut conduire à handicap majeur, des infections et même la mort chez certains patients. La cGvHD est beaucoup plus diversifiée dans sa symptomatologie, elle peut toucher presque n'importe quel organe [52]:

- La sclérodermie,
- Le lupus érythémateux systémique,
- Le tractus gastro-intestinal,
- La polyarthrite rhumatoïde,
- Les maladies auto-immunes (syndrome de Sjögren),
- Les yeux, la peau...etc.

- ✓ **Rejet de la greffe** : c'est une complication grave après une TCSH qui expose les patients à un risque élevé des infections fatales. L'échec d'une greffe indique une fonction inadéquate hématopoïétique en un moment dans le temps où la récupération de l'hématopoïèse doit être prévue après une TCSH. L'échec primaire d'une greffe est l'incapacité d'obtenir un nombre de neutrophiles supérieur à $0.2 \times 10^9/l$ entre 21 à 28 jours après la transplantation de la moelle osseuse ou des cellules souches du sang périphérique (CSSP). L'échec secondaire d'une greffe est définie par la perte de la numération formule sanguine après la greffe initiale.

Le rejet de la greffe est apparu dans le cadre d'une greffe allogénique seulement et représente un échec immunologique de l'hématopoïèse du donneur [53].

✓ **D'autres complications :** se produisent lors d'une TCSH, telle que l'apparition des infections bactériennes et non bactériennes qui demeurent un obstacle prévisible et grave pour la survie après une greffe de CSH. [54, 55].

- **Pendant la phase de pré-greffe** (0 à 30 jours après la transplantation), les trois types les plus fréquents d'une infection bactérienne sont la fièvre d'origine inconnue (présumée bactérienne), la septicémie de Gram-positif et de Gram-négatif. Les infections non bactériennes qui peuvent se produire au cours de cette période comprennent celles dues à l'herpès simplex, Candida et Aspergillus.
- **Le début de la phase après-greffe** (30 à 90 jours) les trois types les plus fréquents d'une infection sont de nouveau la fièvre d'origine inconnue (la majorité présumée bactérienne), la septicémie de Gram-positif et de Gram-négatif, suivie par une infection broncho-pulmonaire. Les infections non bactériennes qui peuvent se produire au cours de cette période comprennent celles dues au cytomégalovirus (CMV), virus BK, adénovirus, le virus varicelle-zona, Candida, Aspergillus, la pneumonie à Pneumocystose et Toxoplasma gondii.
- **Au cours de la phase post-transplantation tardive** (> 180 jours), La plupart des patients ont des neutrophiles polynucléaires normaux, mais une partie d'entre eux à une cGvHD. Les trois types les plus fréquents d'infections bactériennes sont l'infection de l'oreille, du nez et de la gorge, l'infection bronchopulmonaire et la septicémie. Les

infections non bactériennes qui peuvent se produire au cours de cette dernière période comprennent celles dues au virus varicelle-zona, pneumonie à Pneumocystose et Aspergillus.

CHAPITRE 2

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

La GST est la principale voie de biotransformation du BU, elle est impliquée dans son métabolisme. Notre hypothèse est que les polymorphismes fonctionnels dans les gènes GST expliquent en partie la variabilité de la PK du BU et/ou les résultats de TCSH. Une étude réalisée dans notre laboratoire a fixé deux objectifs :

- ✓ Déterminer l'impact des polymorphismes des gènes GSTA1, GSTM1 et GSTP1 sur la PK de la première dose du BU après une perfusion IV chez les enfants.

- ✓ Déterminer le rôle des polymorphismes de ces gènes sur les risques de développer une MVO, GvHD, CH, les rejets des greffes, les rechutes, les toxicités pulmonaires, les décès et d'affecter la survie sans événement.

CHAPITRE 3

MÉTHODOLOGIE

Pour commencer, à l'hôpital Sainte-Justine, nous avons collecté les données cliniques et pharmacocinétiques et nous avons extrait les échantillons de sang pour 69 enfants, qui ont subi une TSCH avec l'administration du BU du 16 doses dans un conditionnement myéloablatif pré-greffe.

Par la suite, on a effectué le génotypage pour tous les patients en utilisant la méthode d'ASO-PCR pour les polymorphismes GSTA1 (C-69T, A-513G, G-631T, C-1142G) et GSTP1 (A-1578G, C-2293T) et la méthode d'électrophorèse sur le gel d'agarose 2% pour le polymorphisme du GSTM1. Les haplotypes GSTA1 ont été obtenu par le logiciel phase.

Finalement, des études d'association ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS version 20 afin d'évaluer l'impact des polymorphismes fonctionnels dans les gènes GST sur la variabilité de la PK du BU et/ou les résultats de TCSH. Les résultats de cette étude seront présentés sous la forme d'un article.

CHAPITRE 4

ARTICLE PUBLIÉ DURANT CE MÉMOIRE

Glutathione S transferase gene variations influence busulfan pharmacokinetics and outcome of hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients

Marc Ansari MD^{1,2,3}, Mohamed Aziz Rezgui MSc^{1,6}, Yves Théoret MD^{4,5-6}, Chakradhara Rao S Uppugunduri PhD^{2,3}, Samira Mezziani MD¹, Marie-France Vachon¹, Catherine Desjean¹, Julie Rousseau¹, Malgorzata Labuda PhD¹, Christophe Przybyla¹, Michel Duval MD^{1,5}, Martin Champagne MD⁷, Christina Peters MD⁸, Henrique Bittencourt MD^{1,5}, Maja Krajinovic MD PhD^{1,4-6}

on behalf of the Pediatric Disease Working Parties of the European Blood and Marrow Transplant group.

⁽¹⁾ Charles-Bruneau Cancer Center, CHU Sainte-Justine Research Center, Montreal, QC, Canada

⁽²⁾ CANSEARCH research laboratory, Faculty of medicine, Geneva, Switzerland

⁽³⁾ Department of Pediatrics, Onco-Hematology unit, Geneva University Hospital, Geneva University, Switzerland

⁽⁴⁾ Clinical Pharmacology Unit, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada

⁽⁵⁾ Department of Pediatrics, Faculty of medicine, University of Montreal

⁽⁶⁾ Department of Pharmacology, Faculty of medicine, University of Montreal

⁽⁷⁾ Department of Hematology, Hospital Verdun, Montreal, Canada

⁽⁸⁾ Department of Pediatrics, Stem Cell Transplantation Unit, St Anna Children's Hospital, Vienna, Austria

- **Running Title:** *GST* variants and Busulfan in Pediatric Patients

Corresponding authors:

Marc Ansari

Department of Pediatrics, Onco-Hematology unit

Geneva University Hospital, Rue Willy Donzé 6, 1211 Geneva 14, Switzerland

T: +41795533626

F: +41223823100

And

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

This investigation was supported by grants from the CANSEARCH Foundation, Hans Wilsdorf and Télémaque Foundations, Geneva Cancer League, and Fondation Charles-Bruneau.

This study has been fully registered in a public trials registry as part of an ongoing prospective EBMT multicentric study (register at Clinical Trials.gov, NCT01257854). It is submitted on behalf of the Pediatric Disease Working Parties of the European Blood and Marrow Transplant group and is an EBMT label study (EudraCT number: 2009-018105-41).

Abstract

Busulfan (Bu) is a key compound of conditioning regimen in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Inter-individual differences in Bu pharmacokinetics might affect Bu efficacy and toxicity. Since Bu is mainly metabolized by glutathione S-transferase (GST), we investigated the relationship between *GSTA1*, *GSTM1* and *GSTP1* genotypes with first-dose Bu pharmacokinetics (PK), and relationship with HSCT outcomes in 69 children receiving myeloablative conditioning regimen. *GSTM1* null genotype correlated with higher Bu exposure and lower clearance in patients older than 4 years ($p \leq 0.04$). In accordance with the suggested functional role *GSTA1**A2 haplotype was associated with lower drug levels and higher drug clearance ($p \leq 0.03$). Gene-dosage effect was also observed ($p \leq 0.007$). *GSTA1* haplotypes were associated with HSCT outcomes Patients with two copies of haplotype *A2 had better event free survival ($p = 0.03$). In contrast, homozygous individuals for haplotypes *B and *B1 had higher occurrence of veno-occlusive disease ($p = 0.009$). *GSTM1* null individuals older than 4 years had more frequently graft versus host disease ($p = 0.03$). In conclusion, we showed that *GST* gene variants influence Bu PK and outcomes of HSCT in children. A model for the dosage adjustment with the inclusion of genetic and non-genetic factors should be evaluated in a future prospective validation cohort.

Keywords: busulfan; hematopoietic stem cell transplantation; pharmacokinetics; children; GST; pharmacogenetics

Introduction

Busulfan (Bu) is a key component of myeloablative regimens prior to hematopoietic stem cell transplantation (HSCT).¹ Inter-individual variation in Bu plasma levels is observed even when administered by intravenous (IV) route.^{2, 3} There is no consensus on the optimal therapeutic window of IV Bu in pediatric patients; although studies have shown improved outcomes at steady state concentrations of (C_{ss}) 600-900 ng/mL, when a conventional dosing schedule is followed.³⁻⁶ There is an increased incidence of adverse events such as veno-occlusive disease (VOD), pulmonary toxicity and graft versus host disease (GVHD) at higher concentrations and graft failure or disease relapse at lower concentrations in pediatric and adult patients.^{4, 7, 8} To decrease the occurrence of toxicity and to improve efficacy, therapeutic drug monitoring (TDM) is performed to adjust Bu dose based on the first dose pharmacokinetics (PK).^{6, 8} In addition to the PK guided dosing of Bu, prediction of inter-individual variability in Bu levels before its administration would be helpful in individualizing Bu treatment.

Bu is primarily metabolized by liver glutathione-S-transferase enzymes (GST), predominantly by GSTA1.^{9, 10} GSTM1 and GSTP1 are also involved in Bu metabolism but to a lesser extent.^{9, 11} Bu metabolism is affected by GST enzyme activity which is influenced by age, disease condition and co-medication.^{2, 12-14} Bodyweight and body surface area have been also shown to contribute to the PK variability.¹⁵⁻¹⁹ Nevertheless a large proportion of Bu variability remains unexplained²⁰ and could be due to *GST* polymorphisms influencing GST activity²¹⁻²⁵ (Table 1). While some studies have shown that *GSTA1* genotypes influence the PK of oral and IV Bu in both adults and children,^{17, 26-30} others did not find this association.^{15, 31, 32} In a small pilot study, we have shown that polymorphisms in *GSTM1* might influence the PK of Bu.¹⁵ The present work was undertaken to confirm this finding and to allow more detailed insight into *GST* variants in a larger cohort.

Methods

Patients

This study comprises 69 consecutive patients (including 28 from earlier study¹⁵ 32 males, 37 females, median age 6.5) who underwent allogeneic HSCT with IV Bu at CHU Sainte-Justine, between May 2000 and August 2010. The Review Board approved the study and all patients/parents provided informed consent. The demographic characteristics of the patients, details of disease and transplantation are given in Table 2.

Treatment regimen

IV Bu (Busulfex[®], Otsuka Pharmaceuticals) was administered as a 2h infusion every 6h from day -9 to -6. Bu first dose was based on age of patient (infants ≥ 3 months and < 1 year of age and children ≥ 4 years old received 0.8 mg/kg dose, children ≥ 1 year and < 4 years old received 1mg/kg dose) and PK guided dose adjustment was performed from 5th dose onwards.¹⁵ All the patients received 16 doses of Bu followed by, IV cyclophosphamide (200 mg/kg total dose; n=62, Table 2). Cyclosporine was given as GVHD prophylaxis, and methotrexate or steroids were added for bone marrow/peripheral blood and cord blood transplantation (CBT), respectively (Table 2). G-CSF was used after CBT only. Prophylaxis for seizure included midazolam lorazepam or phenytoin. Fluconazole, Acyclovir and trimethoprim/sulfamethoxazole were given as anti-infectious prophylaxis and acid ursodeoxycholic as VOD prophylaxis.

Definition of Clinical outcomes

Diagnostic criteria for adverse events are detailed elsewhere.¹⁵ In brief, VOD was diagnosed according to the Seattle criteria³³ and acute (a)GVHD was based on the 1994 Consensus Conference.³⁴ Neutrophil and platelet recoveries were defined as absolute count $\geq 0.5 \times 10^9/L$ for the first 3 consecutive days and $\geq 50 \times 10^9/L$ without

transfusion for the first 10 consecutive days from the day of transplant, respectively. Overall survival (OS) was the time between day of transplant and death due to any cause, whereas event free survival (EFS) was the time from day of transplant to the day of occurrence of any event i.e. death, relapse or graft failure whichever is seen first. OS was 83% at 1 year and EFS was 69% at 1 year. Details are also provided in the Table 3A.

Pharmacokinetic analysis and genotyping

Five blood samples were collected after the first dose infusion and were used for estimation of Bu levels using an established analytical method.³⁵ The PK parameters were estimated from the first dose using non-compartmental analysis (WinNonlin, version 3.1) and further doses from 5th dose onwards were adjusted to achieve Bu C_{ss} of 600-900 ng/mL. PK data is represented in terms of maximum concentration (C_{max}), Area under the curve (AUC), C_{ss}, and clearance (CL) (Table 3B).

Patients were genotyped for the common polymorphisms (Table 1) in *GSTAI* and *GSTPI* by allele-specific oligonucleotide hybridization.¹⁵ *GSTMI* null allele was detected by gel electrophoresis.³⁶

Statistical Analysis

Bu PK parameters (C_{max}, AUC, C_{ss} and CL) and dose adjustment were compared across genotypes of *GSTAI*, *GSTPI* and *GSTMI* or between carriers and non-carriers of particular *GSTAI* haplotype subtypes using non-parametric tests. Depending on the results obtained, appropriate genetic models (dominant, recessive or additive) for particular genotypes/haplotypes were subsequently derived. Non-parametric or *chi*-square tests were used to test differences in sex and age between different genotype groups. Linear regression was used to test gene-dosage effect and to assess the effect of genotypes on C_{max}, AUC, C_{ss} and CL in a multivariate model with the inclusion of other covariates (age, sex, weight, Bu dose). Survival (OS and EFS)

was estimated using Kaplan-Meier (KM) curves and log-rank test was used to compare the differences between genotype groups in univariate analysis. EFS analysis for particular genotype was also performed when the event and follow-up were truncated to 1 year post HSCT. The cumulative incidence of engraftment or HSCT related toxicity (VOD, aGVHD grades 1-4, lung toxicity, hemorrhagic cystitis (HC), or any of these toxicities whichever was seen first) in relation to the *GST* genotypes was estimated by 1-survival curves using KM analysis and log-rank test. Frequency of all toxic events between particular genotype groups was compared by *chi*-square test. Univariate Cox regression analysis was used to estimate hazard ratio (HR) with 95% confidence interval (CI); multivariate Cox regression was used to estimate the impact of genotypes on clinical outcomes in the presence of other covariates (same as above). Logistic regression was used to estimate % of variability in clinical outcomes due to genetic/non-genetic factors. KM functions were used to access relationship between PK data (categorical variable with 4 different categories corresponding to quartile distribution) and clinical outcomes. All PK parameters showed similar results; C_{ss} is used to present the data. Haplotypes were resolved using PHASE (version 2.1).³⁷ Statistical analyses were performed using IBM[®] SPSS[®] statistics (version 19, SPSS Inc, NY).

Results

Genetic variants of GSTA1, M1, P1 and busulfan Pharmacokinetics

Overall PK distribution is given in Table 3B. The minor allele frequencies and *GSTA1* haplotypes of patients analyzed are given in Table 4 and that of *GSTM1* and *GSTP1* in Supplementary Table 1.

The *GSTA1***A* and **B* haplotypes, defined by the -69C>T substitution, are further subdivided based on the presence or absence of minor alleles at positions -631, -1142 and -531 (Table 4). No significant association of *GSTA1* genotypes with Bu PK was observed when each *GSTA1* polymorphism was analyzed individually. However,

when haplotype based analysis was performed, significant differences ($p \leq 0.03$) for each PK parameter analyzed (C_{max} , C_{ss} , AUC, CL) was noted between the carriers and non-carriers of *GSTAI*A2* haplotype (Figure 1A). Carriers had significantly lower AUC, C_{max} and C_{ss} and higher CL compared to non-carriers. Similar differences were seen between two groups when the PK parameters (C_{max} , C_{ss} , AUC) were normalized with Bu first dose (mg/kg, $p \leq 0.03$, not shown). The gene-dose effect of *GSTAI*A2* haplotype was also observed (Figure 1B). Decrease in Bu levels represented by C_{ss} ($p=0.007$) and increase in CL ($p=0.005$) correlated with the number of *GSTAI*A2* haplotypes, being highest in individuals homozygous for that haplotype. No other *GSTAI* haplotype correlated with Bu PK.

Bu levels adjusted by dose (mg/kg) differed significantly ($p \leq 0.001$, data not shown) between individuals below ($n=26$) and above 4 years of age ($n=43$), suggesting the influence of age along with the genetic parameters studied. Likewise, C_{max} distribution differed between males and females ($p=0.04$, data not shown). This prompted us to further investigate the association between *GST* genotype and Bu PK upon stratification by gender or age. In accordance with our previous report¹⁵ *GSTMI* association with PK was apparent in individuals above 4 years of age receiving uniform Bu dose (0.8mg/kg). The patients with *GSTMI* null genotype had higher C_{max} ($p=0.02$), and lower CL ($p=0.04$) compared to those with non-null genotype. A trend was observed for C_{ss} ($p=0.07$) and AUC ($p=0.06$), with null individuals having higher values compared to non-null individuals (Figure 2). The association of *GSTAI* haplotype *A2 was particularly apparent in females (supplemental Figure 1). No age-dependent correlation between PK and *GSTAI* genotypes or sex-dependent *GSTMI*-PK correlation was noted. Finally, no correlation between *GSTMI* and *GSTAI*A2* genotypes and age or sex of patients was seen.

In a multivariate regression model that included age, gender, Bu dose and weight as covariates, genotypes remained associated with Bu PK (CL, $p=0.03$ for *GSTAI*A2* and 0.04 for *GSTMI* null, C_{ss} , $p=0.04$ for both genotypes, AUC, $p=0.02$ for

both genotypes, C_{max}, p=0.01 for *GSTAI**A2 and 0.007 for *GSTMI* null). The model with both genotypes and non-genetic covariates explained 47-54% of variability in PK with genetic factors contributing to 14-17% of this variability.

The ratio of adjusted dose to initial dose was used to compare the increment or decrement of dose according to genotype. *GSTMI* null individuals received lower Bu dose compared to *GSTMI* non null individuals (p=0.03; Figure 3A). Patients who are homozygous for *GSTA**A2 haplotype had a higher increase in dose compared to remaining individuals (p=0.02, Figure 3A). In spite of dose adjustment, C_{ss} after 8th dose (available for 50 patients), although within the target range, was still significantly lower in *A2 carriers, compared to non-carriers (p=0.007, Figure 3B). No such relationship was seen for *GSTMI* genotype. No correlation between *GSTPI* genotypes and PK was observed.

Genetic variants of GSTA1, M1, P1 and clinical outcomes of HSCT

Details of clinical outcomes are given in Table 3A. Patients with two copies of haplotype *GSTAI**A2 had better EFS (100 % vs. 54%, p=0.03, Figure 4A). No event occurred in *A2 homozygotes (n=8) whereas events occurred in 26 out of the remaining 61 individuals. Gene-dosage effect was seen for EFS only at 1 year after HSCT (p=0.03, not shown). Reduction of toxicity was observed in *A2 homozygotes; only one patient had VOD and none had HC, lung toxicity or aGVHD (p=0.01 for number of all toxic events combined and p=0.06 for cumulative incidence of any toxicity). To verify whether these associations are due to *A2-PK relationship, we analyzed an association between C_{ss} and EFS and between C_{ss} and toxic events. Similar to our previous study³⁸, lower C_{ss} was associated with better EFS (p<0.0005, not shown); higher C_{ss} correlated with higher cumulative incidence of any toxicity (p=0.005, not shown) and with each individual toxicity (aGVHD, lung toxicity and HC, p≤0.03) except VOD.

Association analyses between GST genotypes and HSCT-related toxicities indicated that homozygous *GSTAI* -69 *TT* and -1142 *GG* patients had higher occurrence of VOD. As shown in Table 4, the *T* allele of -69C>*T* defines haplotype **B* (all haplotypes **B* combined) and *G* allele of -1142C>*G* defines haplotype **B1*, therefore the same results are obtained with these haplotypes. VOD was seen in 43% homozygous **B* or **B1* individuals compared to 9.6% in remaining patients (HR=5.3, 95% CI= 1.3-21.5, p=0.009; Figure 4B). The effect seems to be modulated by gender being more apparent in girls (75% vs.12.5%, HR=9.6; 95% CI=2.0-45.1, p=0.001, Figure 4C). *GSTMI* null individual above age of 4 had more frequently aGVHD (grades 1-4, 44% vs. 17%, HR=3.8, 95%CI=1.1-13.7, p=0.03, Figure 4D). Genotypes remained significantly associated with clinical outcomes in multivariate models that included age, gender, Bu dose and weight as covariates. Genetic and non-genetic factors explained 26% of EFS variability (with 11% of *GSTAI* **A2* contribution, p=0.05), 26% of VOD variability (with 19% of *GSTAI***B* contribution, p=0.04) and 32% of aGVHD variability (with 10% of *GSTMI* null contribution). No other significant association between *GST* genotypes/haplotypes and HSCT clinical outcomes was seen.

Discussion

GST genetic variants and Bu PK variability

Analysis of *GSTAI* genotypes/haplotypes revealed significant association with Bu exposure. An increase in Bu CL and reduction in drug levels following the first dose was seen in individuals with *GSTAI***A2* haplotype. Gene-dosage effect was also noted. Our observation is in accordance with the functional studies suggesting higher GSTA activity in *GSTAI***A* carriers^{10, 22, 24} and is also supported by several previous reports.^{17, 26-30} Decreased CL following oral Bu was seen in adults and children with *GSTA***B* haplotype; ^{17, 29, 31} a significant decrease in CL following IV Bu was observed in pediatric *GSTAI***B* patients; ^{21, 22} and accordingly increased Bu CL correlated with *GSTAI* **A* haplotype. ^{17, 39} However, a few studies conducted in adults and children^{15,}

^{31, 32} failed to show such an association, which might be due to low sample size ¹⁵, different Bu dosing schedules, ^{31, 32} dose adjustment, or varying proportions of non-malignant diseases. ^{15, 31, 32} Use of phenytoin³¹ or different methods of estimating BU PK might have as well contributed to the conflicting observations. Our study included patients receiving only myeloablative conditioning regimen with IV Bu in a conventional dosing schedule with a small proportion of hemoglobinopathy (<15 %) and only 3 patients that received phenytoin for seizure prevention. Patients were also categorized into specific subtypes of *GSTAI* *A/*B haplotypes allowing more detailed insight into the *GSTAI* gene effect. We also noted a sex-dependent effect of *GSTAI* genotype. *GSTAI**A haplotype influence on Bu metabolism might be more prominent in females as they were shown to have lower cytosolic GST activity compared to males.

40

We confirmed our previous findings on association of *GSTM1* genotypes with Bu exposure.¹⁵ *GSTM1* null genotypes were significantly associated with higher Bu levels and lower Bu CL in individuals older than 4 years which can be explained, to a certain extent, by increased *GSTM1* involvement of Bu metabolism in older children with moderate or reduced *GSTA* activity.⁶ Observations from our study are not in agreement with a report by Srivastava *et al.*, who showed enhanced CL and low C_{ss} of oral Bu in thalassemia children carrying *GSTM1* null genotype.⁴¹ Another study conducted in adult patients found reduced IV Bu CL in individuals with combined *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes, but not in individuals with *GSTM1* null genotype alone³⁹, whereas others reported absence of such association.^{17, 26, 27, 30-32} The compensatory action of other GST isoforms to defective enzyme activity has been also demonstrated.³⁹ We did not find clear combined effect or interaction between *GSTM1* and *GSTAI* genotypes. However it is worth noting that the distribution of the genotypes was not completely random. All individuals that were *GSTA**A2 carriers also had *GSTM1* non-null genotype, i.e. there was no individuals that had *GSTA**A2 and *GSTM1* null genotype combination; hence the combined *GSTA1*/*GSTM1* effect cannot be ruled out.

Multiple linear regression analysis showed that genetic factors contribute to 14-17 % of the variability in Bu PK compared to non-genetic factors alone (~30 %). This is similar to studies conducted in adults that have reported that *GSTAI* polymorphisms could account for 15- 18 % of the variability in first dose Bu CL, and in line with the unexplained variability of Bu CL among pediatric patients reported in a recent meta-analysis.^{16, 30, 39}

Homozygous *GSTAI**A2 individuals had an augmentation of Bu dose, owing to increased CL of Bu. Although reaching the target level, *A2 carriers had still lower C_{ss} after the 8th dose as compared to non-carriers, which may suggest the need to reduce the Bu dose in patient without *A2 haplotype. Wide ranges in the requirement of Bu dose was nevertheless seen in individuals with no *GSTAI**A2 homozygosity which might be due to age, presence of single *GSTAI**A2 copy, *GSTMI* or other genotypes. *GSTMI* null individuals had subsequently received lower Bu doses than non-null individuals explained by lower CL in *GSTMI* null patients.

No significant association of *GSTP1* genotypes with Bu exposure was found confirming our previous observation¹⁵ and is in agreement with earlier studies.^{15, 17, 26, 30, 32}

GST genetic variants and clinical outcomes of HSCT

Better EFS was seen in homozygous *GSTAI**A2 patients, which is likely due to a significantly lower Bu levels seen in these individuals. Indeed, lower C_{ss} correlated with better EFS which is in accordance with our observation³⁸ and with previous reports.¹⁹ It is worth noting that C_{ss} in *GSTAI**A2 carriers following dose adjustment, was on average in the target range but did not exceed the target concentrations and was significantly lower than in individuals without this haplotype, which might resulted in lower toxicity. Indeed, overall reduction in toxicity was noted for homozygous *GSTAI**A2 patients, further supported by correlation between lower C_{ss} and less frequent

toxicity. This finding might support previous observation of decreased incidence of GVHD in *GSTA1**A/*A patients.²⁸

We have also shown that individuals that are homozygous for either haplotype *B or *BI respectively, had higher incidence of VOD. Haplotype *B was reported to confer decreased GSTA1 activity,²² suggesting higher Bu level in such individuals. Higher AUC levels were indeed reported to correlate with VOD.⁴² We have not however found either significant association between C_{ss} and VOD or between *B (*BI) haplotype and PK, which can be due to low VOD and/or genotype numbers, but also involvement of Bu-independent mechanism. For example, liver toxicity could be influenced by cyclophosphamide, including time of its administration relative to Bu.^{43, 44} Higher levels of toxic metabolites of cyclophosphamide in *GSTA**B homozygotes can also contribute to VOD development, in which case administration of cyclophosphamide after Bu would be detrimental. This finding is nevertheless contrary to the hypothesis that increased activity of GSTA in *GSTMI* null individuals might deplete GSH causing damage to liver and occurrence of VOD.⁴¹ None of few studies that looked into an association between *GST* genotypes and clinical outcomes^{17, 28, 32} reported correlation between *GSTA1* genotypes and EFS or VOD, which may be due to the low incidence of VOD, inclusion of patients on non-myeloablative regimen, other events, non-investigated factors that may potentiate GSTA1 effect (e.g. gender), dose adjustment or low sample size. We did not observe any association of VOD with *GSTMI* genotypes, in agreement with previous studies^{15,17, 28} and contrary to a report on higher VOD incidence in *GSTMI* null carriers which could be attributed to the different patient population.⁴¹ And finally, our finding of higher GVHD frequency in *GSTMI* null individuals in agreement with previous report.¹⁷ This could be explained by observed *GSTMI* null-PK relationship, further supported by an association between higher C_{ss} and higher incidence of aGVHD.

In conclusion, we showed that *GST* gene variants influence Bu PK and outcomes of HSCT in children. A model for the dosage adjustment with the inclusion

of genetic and non-genetic factors should be evaluated in a future prospective validation cohort. Predicting Bu dose before initiation of therapy will be helpful to achieve better clinical outcomes in pediatric patients paving a path for individualized Bu treatment according to patient's genetic profile.

Acknowledgements:

We are thankful to all patients and their parents for consenting to participate in this study. This investigation was supported by a grant provided by the Geneva Cancer League, CANSEARCH, Hans Wilsdorf, Telemaque and Charles Bruneau foundations. We thank the Swiss Oncology Group as our sponsor and the European Blood and Marrow Transplantation Pediatric (EBMT) working disease group for their support and for labeling this study as an EBMT trial.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Electronic supplementary information is available online at BMT's website.

References:

1. Slattery JT, Clift RA, Buckner CD, Radich J, Storer B, Bensinger WI et al. Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: the influence of plasma busulfan levels on the outcome of transplantation. *Blood* 1997; 89: 3055-60.
2. Dalle JH, Wall D, Theoret Y, Duval M, Shaw L, Larocque D et al. Intravenous busulfan for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in infants: clinical and pharmacokinetic results. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 647-51.
3. Tran H, Petropoulos D, Worth L, Mullen CA, Madden T, Andersson B et al. Pharmacokinetics and individualized dose adjustment of intravenous busulfan in children with advanced hematologic malignancies undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; 10: 805-12.
4. Vassal G, Michel G, Esperou H, Gentet JC, Valteau-Couanet D, Doz F et al. Prospective validation of a novel IV busulfan fixed dosing for paediatric patients to improve therapeutic AUC targeting without drug monitoring. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 61: 113-23.
5. Bolinger AM, Zangwill AB, Slattery JT, Risler LJ, Sultan DH, Glidden DV et al. Target dose adjustment of busulfan in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 1013-8.
6. McCune JS, Gibbs JP, Slattery JT. Plasma concentration monitoring of busulfan: does it improve clinical outcome? *Clin Pharmacokinet* 2000; 39: 155-65.
7. Andersson BS, Thall PF, Madden T, Couriel D, Wang X, Tran HT et al. Busulfan systemic exposure relative to regimen-related toxicity and acute graft-versus-host disease: defining a therapeutic window for i.v. BuCy2 in chronic myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8: 477-85.
8. Malar R, Sjöo F, Rentsch K, Hassan M, Gungor T. Therapeutic drug monitoring is essential for intravenous busulfan therapy in pediatric hematopoietic stem cell recipients. *Pediatr Transplant* 2011; 15: 580-8.

9. Rowe JD, Nieves E, Listowsky I. Subunit diversity and tissue distribution of human glutathione S-transferases: interpretations based on electrospray ionization-MS and peptide sequence-specific antisera. *Biochem J* 1997; 325 (Pt 2): 481-6.
10. Cooper AJ, Younis IR, Niatsetskaya ZV, Krasnikov BF, Pinto JT, Petros WP et al. Metabolism of the cysteine S-conjugate of busulfan involves a beta-lyase reaction. *Drug Metab Dispos* 2008; 36: 1546-52.
11. Czerwinski M, Gibbs JP, Slattery JT. Busulfan conjugation by glutathione S-transferases alpha, mu, and pi. *Drug Metab Dispos* 1996; 24: 1015-9.
12. Gulbis AM, Culotta KS, Jones RB, Andersson BS. Busulfan and metronidazole: an often forgotten but significant drug interaction. *Ann Pharmacother* 2011; 45: e39.
13. Nath CE, Earl JW, Pati N, Stephen K, Shaw PJ. Variability in the pharmacokinetics of intravenous busulphan given as a single daily dose to paediatric blood or marrow transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol* 2008; 66: 50-9.
14. Schechter T, Finkelstein Y, Doyle J, Verjee Z, Moretti M, Koren G et al. Pharmacokinetic disposition and clinical outcomes in infants and children receiving intravenous busulfan for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 307-14.
15. Ansari M, Lauzon-Joset JF, Vachon MF, Duval M, Theoret Y, Champagne MA et al. Influence of GST gene polymorphisms on busulfan pharmacokinetics in children. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45: 261-7.
16. Bartelink IH, Boelens JJ, Bredius RG, Egberts AC, Wang C, Bierings MB et al. Body weight-dependent pharmacokinetics of busulfan in paediatric haematopoietic stem cell transplantation patients: towards individualized dosing. *Clin Pharmacokinet* 2012; 51: 331-45.
17. Elhasid R, Krivoy N, Rowe JM, Sprecher E, Adler L, Elkin H et al. Influence of glutathione S-transferase A1, P1, M1, T1 polymorphisms on oral busulfan pharmacokinetics in children with congenital hemoglobinopathies undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 55: 1172-9.

18. Paci A, Vassal G, Moshous D, Dalle JH, Bleyzac N, Neven B et al. Pharmacokinetic behavior and appraisal of intravenous busulfan dosing in infants and older children: the results of a population pharmacokinetic study from a large pediatric cohort undergoing hematopoietic stem-cell transplantation. *Ther Drug Monit* 2012; 34: 198-208.
19. Bartelink IH, Bredius RG, Belitser SV, Suttorp MM, Bierings M, Knibbe CA et al. Association between busulfan exposure and outcome in children receiving intravenous busulfan before hematologic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15: 231-41.
20. Ansari M, Krajinovic M. Can the pharmacogenetics of GST gene polymorphisms predict the dose of busulfan in pediatric hematopoietic stem cell transplantation? *Pharmacogenomics* 2009; 10: 1729-32.
21. Bredschneider M, Klein K, Murdter TE, Marx C, Eichelbaum M, Nussler AK et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase A1, the major glutathione S-transferase in human liver: consequences for enzyme expression and busulfan conjugation. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 71: 479-87.
22. Coles BF, Morel F, Rauch C, Huber WW, Yang M, Teitel CH et al. Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2 expression. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 663-9.
23. Di Pietro G, Magno LA, Rios-Santos F. Glutathione S-transferases: an overview in cancer research. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010; 6: 153-70.
24. Ning B, Wang C, Morel F, Nowell S, Ratnasinghe DL, Carter W et al. Human glutathione S-transferase A2 polymorphisms: variant expression, distribution in prostate cancer cases/controls and a novel form. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 35-44.
25. Reszka E, Jablonowski Z, Wiczorek E, Gromadzinska J, Sosnowski M, Wasowicz W. GSTP1 mRNA expression in human circulating blood leukocytes is associated with GSTP1 genetic polymorphism. *Clin Biochem* 2011; 44: 1153-5.

26. Gaziev J, Nguyen L, Puozzo C, Mozzi AF, Casella M, Perrone Donnorso M et al. Novel pharmacokinetic behavior of intravenous busulfan in children with thalassemia undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a prospective evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic profile with therapeutic drug monitoring. *Blood* 2010; 115: 4597-604.
27. Johnson L, Orchard PJ, Baker KS, Brundage R, Cao Q, Wang X et al. Glutathione S-transferase A1 genetic variants reduce busulfan clearance in children undergoing hematopoietic cell transplantation. *J Clin Pharmacol* 2008; 48: 1052-62.
28. Kim I, Keam B, Lee KH, Kim JH, Oh SY, Ra EK et al. Glutathione S-transferase A1 polymorphisms and acute graft-vs.-host disease in HLA-matched sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Transplant* 2007; 21: 207-13.
29. Kusama M, Kubota T, Matsukura Y, Matsuno K, Ogawa S, Kanda Y et al. Influence of glutathione S-transferase A1 polymorphism on the pharmacokinetics of busulfan. *Clin Chim Acta* 2006; 368: 93-8.
30. ten Brink MH, Wessels JA, den Hartigh J, van der Straaten T, von dem Borne PA, Guchelaar HJ et al. Effect of genetic polymorphisms in genes encoding GST isoenzymes on BU pharmacokinetics in adult patients undergoing hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2012; 47: 190-5.
31. Abbasi N, Vadnais B, Knutson JA, Blough DK, Kelly EJ, O'Donnell PV et al. Pharmacogenetics of intravenous and oral busulfan in hematopoietic cell transplant recipients. *J Clin Pharmacol* 2011; 51: 1429-38.
32. Zwaveling J, Press RR, Bredius RG, van Derstraaten TR, den Hartigh J, Bartelink IH et al. Glutathione S-transferase polymorphisms are not associated with population pharmacokinetic parameters of busulfan in pediatric patients. *Ther Drug Monit* 2008; 30: 504-10.
33. Przepiorcka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 825-8.

34. McDonald GB, Hinds MS, Fisher LD, Schoch HG, Wolford JL, Banaji M et al. Venooclusive disease of the liver and multiorgan failure after bone marrow transplantation: a cohort study of 355 patients. *Ann Intern Med* 1993; 118: 255-67.
35. Rifai N, Sakamoto M, Lafi M, Guinan E. Measurement of plasma busulfan concentration by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Ther Drug Monit* 1997; 19: 169-74.
36. Zhong S, Wyllie AH, Barnes D, Wolf CR, Spurr NK. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1821-4.
37. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 978-89.
38. M. Ansari YT, M. Rezgui, S. Mezziani, C. Desjean, M. Vachon, M. Labuda, M. Champagne, M. Duval, C. Peters, M. Krajinovic, H. Bittencourt on behalf of the Pediatric Disease Working Parties of the European Blood and Marrow Transplant group. Association between busulfan exposure and outcome in children receiving intravenous busulfan before haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2012; 47 (Suppl): S 40 (abstract 245).
39. Kim SD, Lee JH, Hur EH, Kim DY, Lim SN, Choi Y et al. Influence of GST gene polymorphisms on the clearance of intravenous busulfan in adult patients undergoing hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 1222-30.
40. Miyagi SJ, Brown IW, Chock JM, Collier AC. Developmental changes in hepatic antioxidant capacity are age-and sex-dependent. *J Pharmacol Sci* 2009; 111: 440-5.
41. Srivastava A, Poonkuzhali B, Shaji RV, George B, Mathews V, Chandy M et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism: a risk factor for hepatic venoocclusive disease in bone marrow transplantation. *Blood* 2004; 104: 1574-7.
42. Dix SP, Wingard JR, Mullins RE, Jerkunica I, Davidson TG, Gilmore CE et al. Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 225-30.

43. Cantoni N, Gerull S, Heim D, Halter J, Bucher C, Buser A et al. Order of application and liver toxicity in patients given BU and CY containing conditioning regimens for allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2011; 46: 344-9.

44. Kerbauy FR, Tirapelli B, Akabane H, Oliveira JS. The effect of administration order of BU and CY on toxicity in hematopoietic SCT in humans. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43: 883-5.

Table 1. Common genetic variants of *GSTA1*, *GSTM1* and *GSTP1* selected for the study

Gene	Genetic variant / haplotype	Nucleotide change	Enzyme function	Frequency of minor allele/haplotype	Reference
GSTA1	GSTA1*A	-567T, -69C1, -52G	Normal	43.22	15, 17
	GSTA1*B	-567G, -69T1, -52A	Decreased activity due to low expression of enzyme		
GSTM1	GSTM1*0 (null)	Deletion	No enzyme activity	34-58.32	16
GSTP1	GSTP1*A		Normal	-	-
	GSTP1*B	c.313A>G (p.Ile105Val)	Decreased enzyme activity and expression	40.72	16, 18
	GSTP1*C	c.313A>G (p.Ile105Val) and c.341C>T (p.Ala114Val)	Decreased enzyme activity	9.72	

1SNP in bold is a tag SNP for a given haplotype. GSTA1*A and *B haplotypes are further diversified into additional subtypes by the presence or absence of variants at -513 T>C, -631T>G and -1142C>G positions in GSTA1 promoter as detailed in table 4 in the main text. 2Minor allele frequencies were taken from HapMap reported frequencies in Caucasian population (CEU) if available at www.hapmap.org or from the reference cited for a particular variation.

Supplementary Table 1. *GSTM1* and *GSTP1* genotypes and minor allele frequencies in the study population (n=69)

Genetic variant	Homozygous for major allele n (%)	Heterozygous n (%)	Homozygous for minor allele n (%)	Minor allele n (%) **
GSTM1null *	32 (46.4)			
GSTP1 313A>G	28 (40.6)	35 (50.7)	6 (8.7)	47(33.8)
GSTP1 341C>T	55 (79.7)	12 (17.4)	2 (2.9)	16 (11.6)

GSTM1: glutathione S transferase Mu1; GSTM1 null- homozygous individuals for deletion; GSTP1: glutathione S transferase Pi1;

*Distinction cannot be made between GSTM1 non-null heterozygous and homozygous individuals by the method used in the study, therefore observed frequencies could not be provided. GSTM1 null individuals are considered as homozygous for major allele

** Minor allele frequency is calculated relative to the total number of chromosomes.

Table 2. Demographic characteristics, details of diseases and transplantation in study subjects (n=69)

Characteristics		Patients	
		N	%
Gender	Male	32	46.4
	Female	37	53.6
Ethnicity	Caucasian	54	78.3
	Native American	3	4.3
	African-American	11	15.9
	Asian	1	1.4
Diagnosis	ALL	6	8.7
	AML	21	30.4
	MDS	16	23.2
	BMFS	1	1.4
	Hemoglobinopathies	8	11.6
	Immunodeficiencies	9	13
	Metabolic Disease	4	5.8
	Hemophagocytic Syndrome	4	5.8
Disease Status (Leukemia)	CR1	15	55.6
	CR2 / CR3 / Relapse	6/4/2	22.2/14.8/7.4
HLA compatibility	MUD	12	17.4
	MM related donor	3	4.3
	MM unrelated donor	31	44.9
	HLA identical sibling	23	33.3
Stem Cell Source	BM	27	39.1
	PBSC	1	1.4
	Cord Blood	41	59.4
Myeloablative conditioning	Bu/Cy	62	89.9
	Bu/Cy/VP16	6	8.7
	Bu/Mel	1	1.4

Serotherapy	No	16	23.2
	ATG	53	76.8
GvHD prophylaxis	CSA+Steroids	40	58
	CSA+MTX	28	40.6
	CSA	1	1.4
Seizure prophylaxis (n=63)	Lorazepam	50	72.4
	Midazolam	10	14.5
	Phenytoin	3	4.4
		Median	Range
Age (years)		6.5	0.1-19.9
Weight		24.1	4.3-84.8
Height		122.6	54.0-183.00
Cell Number (x108/kg)		2.8	0.5-46.9
CD34(x108/kg) (n=50)		0.06	0.0007-1.3

Abbreviations: ALL: acute lymphoblastic leukemia; AML: acute myeloid leukemia; ATG: anti-thymocyte globulin; BM: bone marrow; BMFS: bone marrow failure syndrome; BMI: Body mass index; BSA : body surface area; Bu: busulfan; CR1: first remission; CR2: second remission; CR3: third remission; CSA: cyclosporine; Cy: cyclophosphamide; Flu: fludarabine; HLA: human leukocyte antigen; MDS: myelodysplastic syndrome; Mel: melphalan; MM: mismatch; MRD: matched related donor; MTX: methotrexate; MUD: matched unrelated donor; PBSC: peripheral blood stem cells; VP16:etoposide.

Table 3A. Clinical outcomes observed in the study subjects

Clinical outcomes	Cumulative incidence	Day of onset
	N (%)	Median (Range)
Neutrophil recovery (Day 100)	61 (88.4)	18 (9-48)
Platelet recovery (Day 180)	59 (85.5)	42 (16-173)
Veno-occlusive disease (VOD)	9 (13)	15 (4-47)
Acute GVHD (grade 1-4)	14 (20.3)	74 (15-162)
Lung toxicity	6 (8.7)	34.5 (4-166)
Hemorrhagic cystitis	17 (24.6)	23 (3-113)

Table 3B. Busulfan pharmacokinetic parameters observed in the study subjects (n=69)

Parameter	Median (Range)
C _{max} (ng/mL)	837.0 (545.0-1298.0)
C _{SS} (ng/mL)	578.0 (325.0-1227.0)
AUC (min.ng/mL)	196491.5 (108767.2-431260.7)
Clearance (mL/min/kg)	4.2 (1.8-7.2)

C_{max}: maximum plasma concentration; C_{SS}: Steady state plasma concentration; AUC: area under the curve; The Pharmacokinetic parameters were estimated for the first dose.

Table 4: *GSTA1* haplotypes and minor allele frequencies in the study population (n=69)

<i>GSTA1</i> Haplotype	-69	-513	-631	-1142	Haplotypes n (%)	Haplotype carriers n (%)
*A1	C	T	T	C	47 (34.1)	39 (56.52)
*A2	C	T	G	C	35 (25.3)	27 (39.13)
*A3	C	T	T	G	1 (0.7)	1 (1.44)
*B1	T	T	G	G	44 (31.9)	39 (56.52)
*B1a	T	C	G	G	6 (4.3)	6 (8.69)
*B2	T	T	G	C	5 (3.6)	5 (7.24)
Minor allele n (%)	55 (39.8)	6 (4.3)	48 (34.8)	51 (36.9)		

GSTA1: Glutathione- S- transferase Alpha1. The haplotype and allele frequencies are calculated relative to the total number of chromosomes. Carriers of a given haplotype (all haplotype pairs containing the respective haplotype) are calculated relative to the total number of individuals (n=69).

Figure legends:

Figure 1. Influence of *GSTA1**A2 haplotypes on busulfan pharmacokinetics

- A. C_{max}: maximum plasma concentration; C_{ss}: steady state concentration; AUC: area under the curve in *GSTA1* *A2 haplotype carriers (+, n=28) and non-carriers (-, n=41). Median (interquartile, IQR, range) for C_{max}, C_{ss} and AUC are 810 (684.25-863.25), 544.5 (494.75-631.75) and 184973 (164193-215396) for *A2 carriers, respectively. Respective values for *A2 non-carriers are 855 (786-1045.5), 616 (538-723) and 210607 (180729-249128). The units of measurements are given on the respective plot.
- B. Gene-dose effect of *GSTA1**A2 on busulfan first dose pharmacokinetics 0, 1 and 2 refer to number of *GSTA1**A2 haplotypes. The mean ± SD for C_{ss} is 652.9±187.3 in group «0», 578.8±129.5 in group «1» and 490±100.7 in group «2». The mean ± SD for clearance is 3.9±1.0 in group «0», 4.49±1.1 in group «1» and 5.0±1.2 in group «2». The number of individuals represented for each haplotype group as well as p values for the change across groups is given on each plot.

Supplementary figure 1. Influence of *GSTA1**A2 haplotypes on busulfan pharmacokinetics in females.

Median (IQR, range) for C_{max}, C_{ss} and AUC for *A2 haplotype carriers (+, n=17) are 795 (693.5-1000.5), 540 (495.5-639.5) and 183845 (165178-221058), respectively. Respective values for *A2 non-carriers (-, n=20) are 925 (844.9-1075.25); 655 (582.25-759.75) and 224578 (198431-261218).

Figure 2. Influence of *GSTM1* genotypes on busulfan first dose pharmacokinetics in children older than 4 years

The pharmacokinetic parameters of busulfan measured in patients ≥ 4 years and grouped based on *GSTM1* genotypes: +: patients with *GSTM1* null genotype (n=16); - : patients with non-null genotype (n=27). The median values with (IQR) for C_{max} , C_{ss} , AUC and clearance for *GSTM1* null individuals are 894.7 (820.75-1075.75), 632 (555.5-772.5), 219442 (187341-267710) and 3.6 (2.9-4.16). The respective values for non-null individuals are 798 (705-930), 575 (497-671), 196086 (167148-233873) and 4.09 (3.37-4.46).

Figure 3. Busulfan dose adjustment and C_{ss} values following PK-guided dose adjustment and relation to *GST* genotype

- A. Dose adjustment in individuals with *GSTA1**A2*A2 and *GSTM1* null genotype calculated as ratio between adjusted and non-adjusted dose. Median ratio with (IQR range) for *A2*A2 carriers is 1.5 (1.2-1.9) and for non-carriers is 1.2 (1.0-1.4). Median ratio with (IQR range) for *GSTM1* null individuals is 1.1 (1.0-1.3) and for non-null individuals is 1.3 (1.1-1.6).
- B. C_{ss} following 8th busulfan dose in carriers and non-carriers of *GSTA1**A2 haplotype. Median ratio with (IQR range) for *A2 carriers is 721.9 (634.6-842.8) and for non-carriers is 849 (771.2-906.5).
- `+` and `-`, presence and absence of indicated haplotype/genotype, respectively; number of individuals represented by each genotype group and p value for the difference between groups is given on each plot.

Figure 4. Association of *GST1A1* haplotypes with event free survival (EFS), the risk of veno-occlusive disease (VOD) and acute graft versus host disease (aGVHD)

A. Association of *GST1A1* haplotypes with EFS

The number of patients in each curve representing the patients with or without indicated genotype, number 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 the plot.

B, C, Association of *GST1A1* genotypes with the risk of VOD

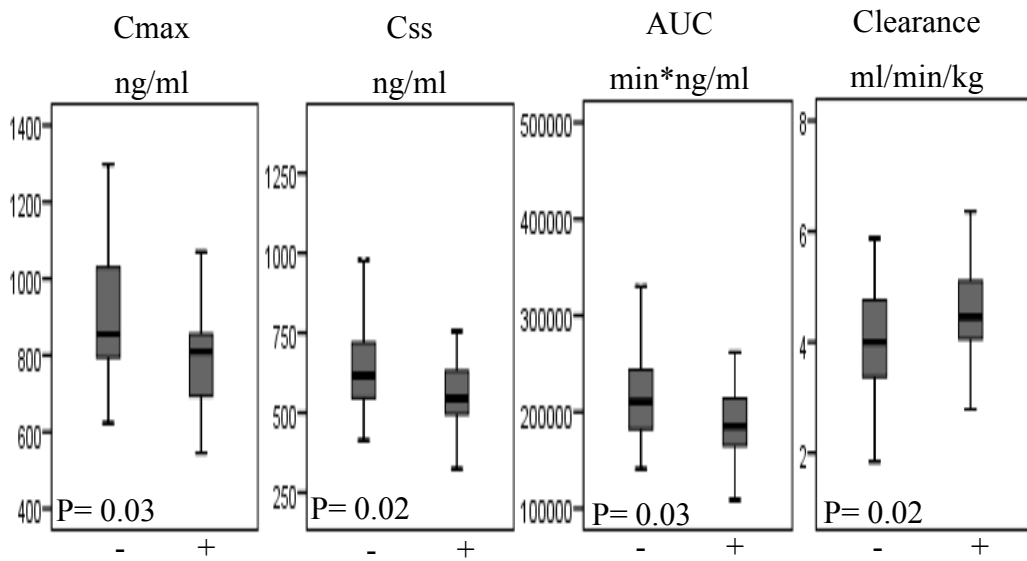
The number of patients in each curve with and without *B*B (B, left panel and C) and with and without *B1*B1 haplotype pair (right panel in B), number of individuals with VOD (given in the parenthesis), as well as the p value, estimated by log-rank test for the cumulative VOD incidence between the haplotype groups, are indicated on each plot. Results in B include all patients, and in C are limited to females only. Risk of VOD associated with the *B*B (represented by -69TT) and *B1*B1 (-represented by -1142GG genotype) expressed as HR with 95% CI, is indicated below respective plots.

D. Association of *GSTM1* null genotype with the risk of aGVHD

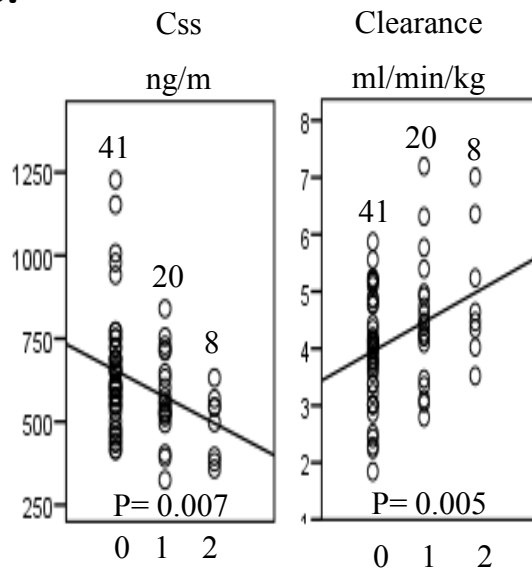
The number of patients in each curve with and without *GSTM1* null genotype, number of individuals with aGVHD (given in the parenthesis), as well as the p value, estimated by log-rank test for the cumulative aGVHD (grades 1-4) incidence between the genotype groups, are indicated on each plot. The analyses are limited to the patients above 4 years of age.

Figure 1:

A.



B.



Supplementary Figure1:

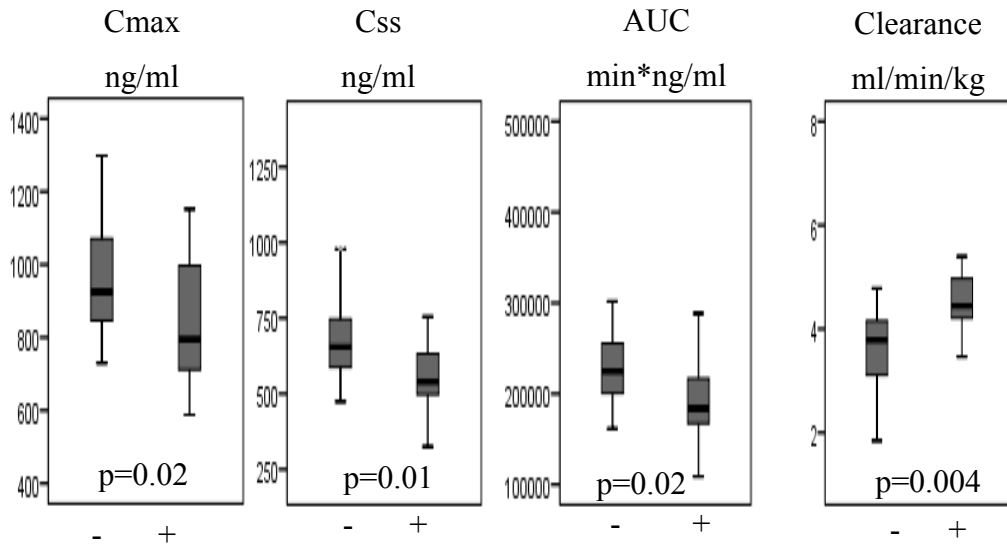


Figure 2:

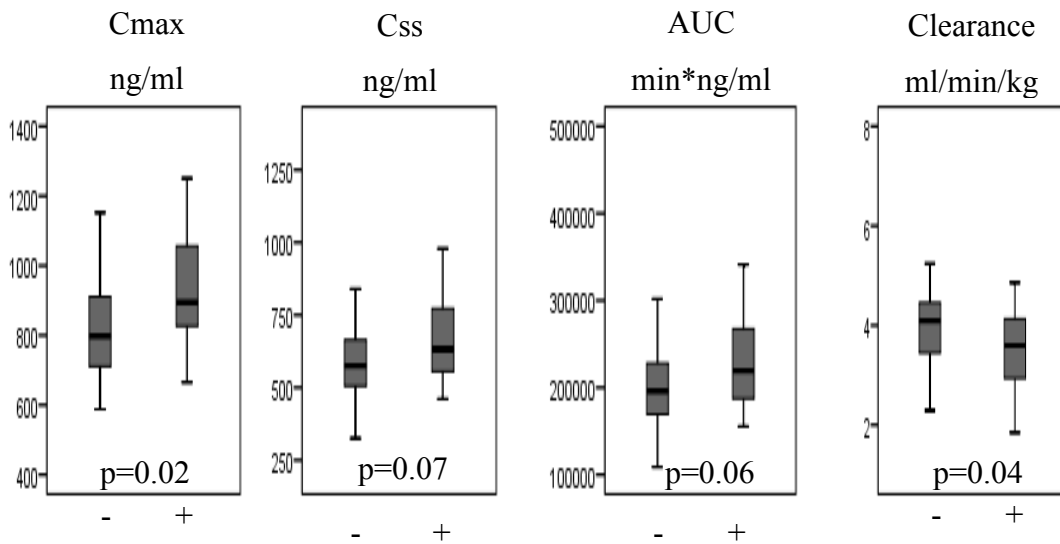
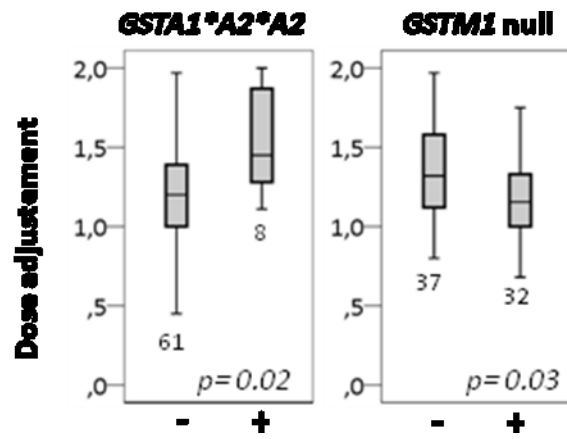


Figure 3:

A.



B.

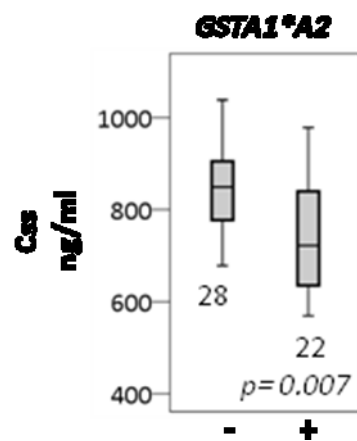
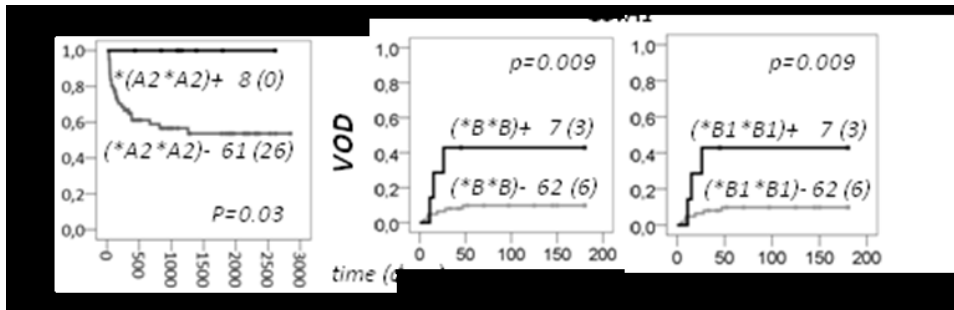


Figure 4:

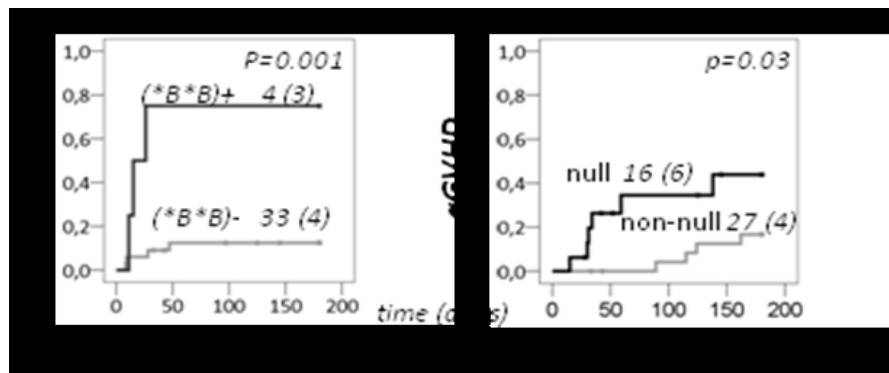
A.

B.



C.

D.



CHAPITRE 5

LA COHORTE D'ITALIE

Notre étude au sein du laboratoire du Dr Krajinovic Maja définit principalement l'influence de GST sur la PK du BU et les résultats de la transplantation.

C'est une étude multicentrique qui contient plusieurs centres, tels que l'Hôpital Sainte-Justine, Toronto, Calgary, France, Prague, Hollande, Suisse et Italie.

Le BU demeure un composé clé dans les régimes de conditionnement myéloablatif pour les enfants subissant une TCSH. Il y aura ainsi de grandes variabilités interindividuelles dans la PK de la première dose du BU expliquées par les polymorphismes et les haplotypes de GST, ce qui pourrait augmenter le risque d'avoir la maladie MVO, l'aGvHD et d'affecter la survie sans événement. Parmi les centres cités ci-dessus on a étudié la cohorte d'Italie qui traite des patients pédiatriques d'origine de Moyen Orient.

4.1. Introduction

Cette étude a été menée sur 46 enfants d'origine de Moyen Orient ayant une médiane d'âge de 8 ans (1.5-17) diagnostiqués par une Thalassémie majeure (76.1%), thalassémie intermédiaire (19.6%) et une drépanocytose (4.4%) et traités par une TMO (100%) après une administration du BU associé au CY dans un régime de conditionnement myeloablatif pré greffe (voir Table 5).

La thalassémie est en effet un problème de santé majeur, mais le syndrome monogénique le plus fréquent est classiquement la drépanocytose. L'estimation annuelle de cette maladie lors de la naissance est de 40000 personnes avec une fréquence élevée chez les Méditerranéens, Moyen Orient et l'Asie de sud [56].

La bêta- thalassémie (anémie de Cooley) est une maladie héréditaire caractérisée par l'absence de la chaîne β de l'hémoglobine. Elle se définit par quatre syndromes thalassémiques majeure ($Hb < 7g/dl$ et une splénomégalie marquée), intermédiaire ($Hb 7-10g/dl$ et une splénomégalie modérée), mineure ($Hb > 10g/dl$ et une splénomégalie légère) et minimale (pas de caractéristiques cliniques anormales). Le défaut de synthèse de la chaîne β provoque un déséquilibre dans la chaîne de production et de l'accumulation des chaînes gratuites dans les globules rouges ou des précurseurs des globules rouges, conduisant à la destruction intramédullaire, l'apoptose, l'érythropoïèse inefficace et l'anémie hémolytique. L'allogreffe de la moelle osseuse s'est révélée être un radical de la guérison chez les patients ayant un donneur HLA-identique [57].

Les 16 doses de BU ont été administrées par une perfusion IV de 2 heures, 4 doses par jour pendant 4 jours avec un intervalle de 6h entre les doses. La dose prescrite est déterminée selon le poids corporel :

- ✓ < 9 kg la dose prescrite est de 1mg/kg
- ✓ 9 à < 16 kg une dose de 1.2mg/kg
- ✓ 16 à 23 kg une dose de 1.1mg/kg
- ✓ 23 à 34 kg une dose de 0.95mg/kg
- ✓ 34 kg une dose de 0.8mg/kg

Après la fin du traitement du BU, les 46 patients pédiatriques devaient recevoir du CY (21 patients ont reçu une dose cumulée de 160mg/kg et 25 patients ont reçu une dose cumulée de 200 mg/kg) une dose par jour pendant 4 jours.

4.2. Matériels et Méthodes

La première étape consistait à recevoir les échantillons d'ADN pour les 46 patients déjà extraits à partir du prélèvement sanguin. Puis, les fragments des SNPs du gène GSTA1 (C-69T, A-513G, G-631T, C-1142G) et du gène GSTP1 (A1578G, C2293T) ont été amplifiés par PCR. Par la suite, ils étaient génotypés par la méthode d'hybridation d'ASO et les génotypes du GSTM1 & GSTT1 (délétion) ont été réalisés par la méthode d'électrophorèse sur gel. Ce qui a permis à la fin d'obtenir les haplotypes du GSTA1 à l'aide du logiciel PHASE version 2.1.1 (voir Table 7). Et de même à l'aide de programme Haploview on a obtenu le coefficient de déséquilibre de liaison R^2 entre les polymorphismes du gène GSTA1 (voir Fig 7).

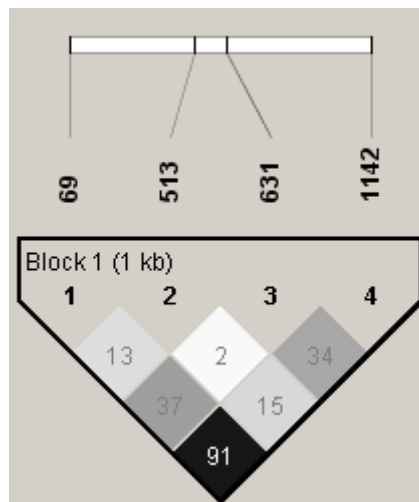


Fig. 6. Le coefficient de déséquilibre de liaison R^2 entre les polymorphismes du GSTA1.

Ensuite toutes les données PK, génotypes et cliniques ont été enregistrées dans une base de donnée appelée Pandora, qui a été créée dans le but de sauvegarder toutes les données et les informations cliniques, PK et génotypes de chaque centre et plus précisément pour chaque patient. Enfin, la dernière étape détermine la distribution des paramètres PK (Cmax, Css, AUC et CL) obtenus après la première dose administrée et la dose ajustée du BU. Ces paramètres seront comparés avec les génotypes des polymorphismes donnés et les résultats cliniques en utilisant le logiciel SPSS version 20, par les tests statistiques de type ANOVA, t-Test ou par les tests non paramétriques (en fonction de l'homogénéité des distributions des données).

4.3. Objectifs

Le but de cette étude est d'analyser principalement l'association entre les génotypes GSTA1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 et les paramètres PK de la première dose du Bu et leur relation avec les résultats de la TCSH.

4.4. Les résultats :

Parmi les résultats cliniques conclus dans notre étude; 15 patients sont atteints de l'aGvHD (32.6%), et 5 patients sont atteints d'une toxicité pulmonaire (10.86%). La récupération de neutrophile a été observée chez 43 enfants (93.5%) et 41 enfants ont eu une prise de greffe (89.1%), (voir Table 8).

Les paramètres PK (Cmax, Css, AUC et CL) de la première dose de BU sont caractérisés par des valeurs médianes respectivement comme suit 1208 ng/ml, 831.5 ng/ml, 277332.73 min*ng/ml et 3.65 ml/min/kg (voir Table 6).

4.4.1. Les résultats d'analyses d'associations

✓ Polymorphisme – Haplotype - Pharmacocinétique

Pour notre étude, nous avons effectué nos analyses selon deux groupes, soit avec le groupe entier d'enfants (46) soit seulement avec le sous groupe de sexe féminin (23) sachant que le choix du sous groupe du sexe féminin est expliqué par le fait que nous avons déjà trouvé dans l'article une association significative entre les paramètres pharmacocinétiques de la première dose du BU et l'haplotype *A2 dans le groupe du sexe féminin. Notre deuxième motif était de savoir si nous aurons la même association pour le sous groupe pédiatrique thalassémique.

Nous avons trouvé que les paramètres de la PK de la première dose du BU sont associés significativement d'une part avec les génotypes / haplotypes du GSTA1.

Mais au niveau des polymorphismes du GSTP1 (A1578G, C2293T), GSTM1 (délétion) et GSTT1 (délétion) on n'a pas trouvé une corrélation.

Nous avons constaté des corrélations entre les paramètres pk de la première dose administrée et la dose ajustée (mg/kg) du BU et les polymorphismes du gène GSTA1 au niveau de ses SNPs C-69T et C-1142G, sachant que les individus homozygotes pour GSTA1 d'allèle T-69 et d'allèle G-1142 définissent respectivement les haplotypes *B et *B1 (voir Fig 7, 8, 9 et 10). Ces individus possèdent une C_{max}, une C_{ss} plus élevée et une CL moins élevée par rapport aux homozygotes CC et par rapport aux hétérozygotes CT et CG respectivement pour les SNPs C69T et C1142G du polymorphisme du gène GSTA1 pour le groupe complet et le sous groupe de sexe féminin.

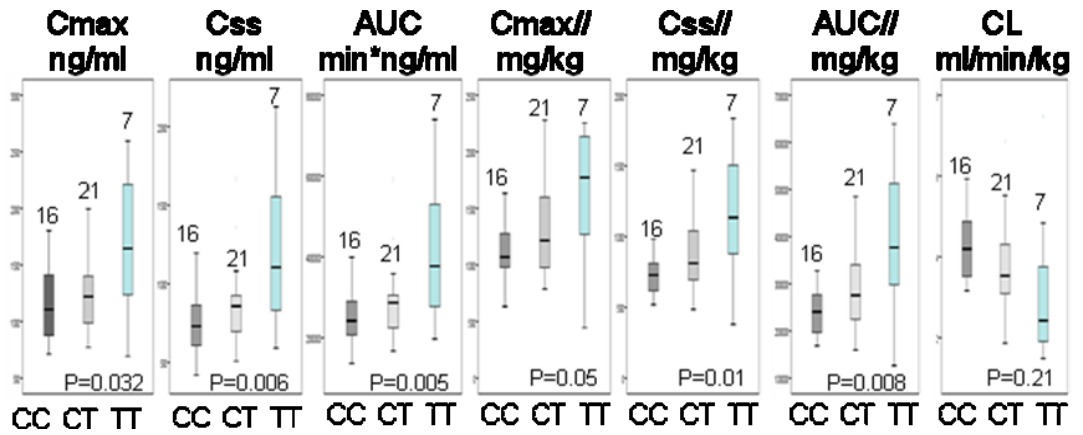


Fig 7. Influence du *GSTA1*, *C69T* sur la PK du BU pour le groupe entier.

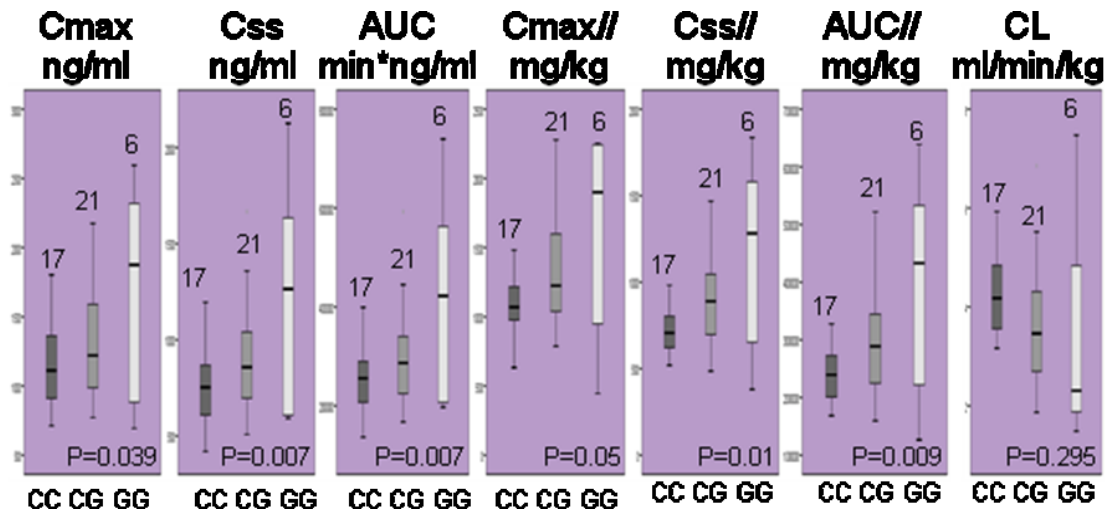


Fig 8. Influence du *GSTA1*, *C1142G* sur la PK du BU pour le groupe entier.

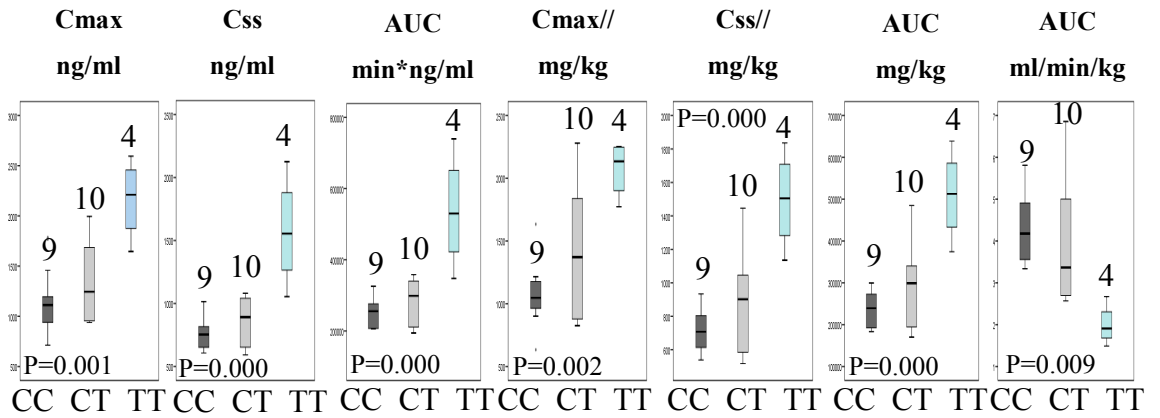


Fig. 9. Influence du *GSTA1*, *C69T* sur la PK du BU pour le sexe féminin.

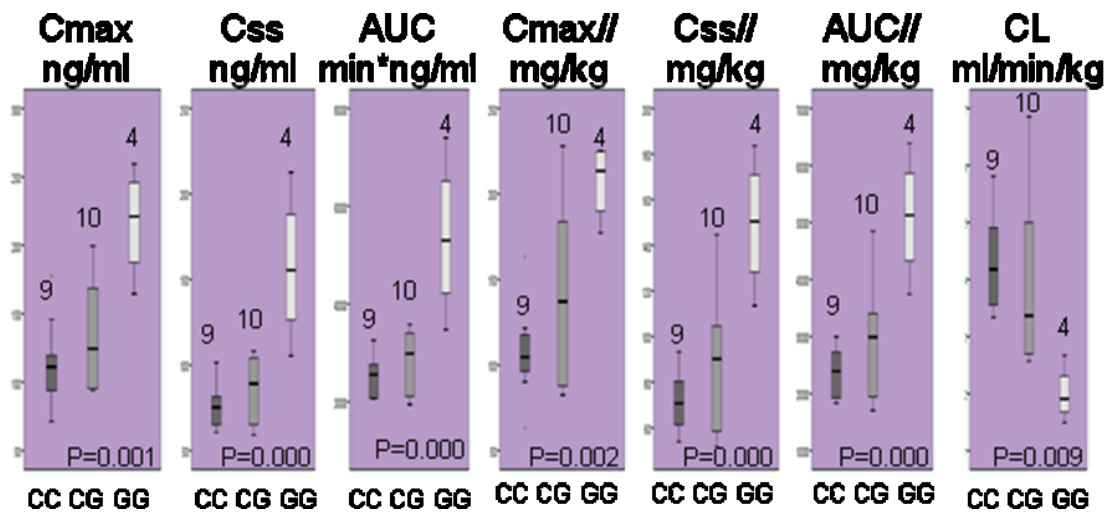


Fig 10. Influence du *GSTA1*, *C1142G* sur la PK du BU pour le sexe féminin.

✓ Analyse d'association Génomique-Résultats Cliniques

Nous n'avons pas trouvé une corrélation entre les polymorphismes de GSTP1 et GSTT1 (délétion) versus les résultats cliniques de la TCSH. Pour le polymorphisme GSTA1, nous avons trouvé que les individus homozygotes de GSTA1 d'allèles C-69 et G-1142 présentant respectivement les haplotypes GSTA1 *B et *B1 possèdent un risque élevé d'atteindre la MVO pour le groupe entier (nous avons seulement un seul patient atteint de la MVO).

Ainsi pour le génotype GSTM1 nous avons constaté une corrélation présentée comme suit :

Il existe un impact significatif de développer l'aGvHD chez les enfants porteurs du génotype GSTM1 nul versus les non porteurs (62.2% vs 37.8%; $p=0.013$). Ces résultats ont permis de conclure que les porteurs du génotype GSTM1 nul ont un risque élevé de développer l'aGvHD (voir Fig 11).

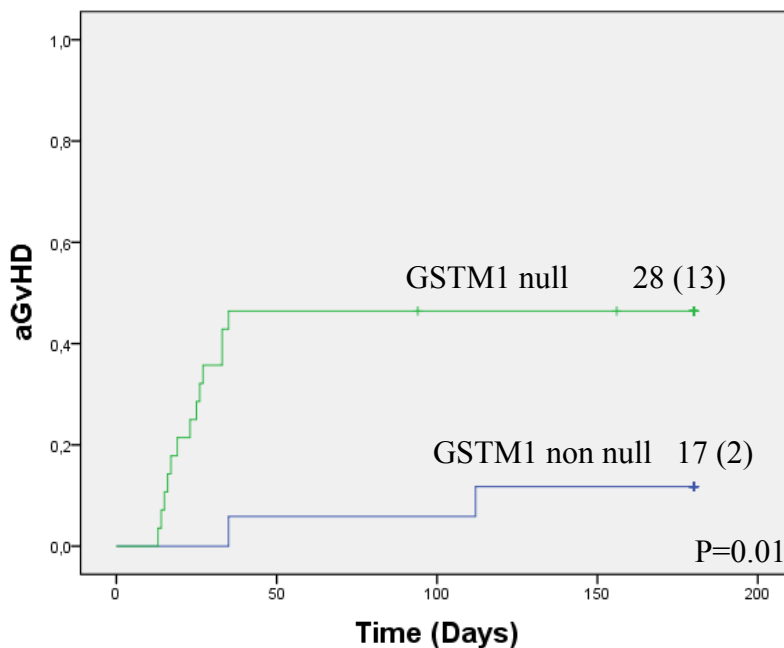


Fig 11. Le risque d'atteindre l'aGvHD chez les porteurs de GSTM1 null

4.5. Les Tableaux

Table 5. Les caractéristiques démographiques chez les enfants de l'étude (n=46)

Les caractéristiques démographiques		Patients	
		N	%
Le sexe	Masculin	23	50
	Féminin	23	50
L'origine	Moyen Orient	46	100
Le diagnostique	Drépanocytose	2	4.4
	Thalassémie Intermédiaire	9	19.6
	Thalassémie Majeur	35	76.1
La compatibilité de HLA	HLA identique	46	100
La source des cellules souches	BM	46	100
Le conditionnement Myéloablative	Bu/Cy	46	100
La sérothérapie	No	30	65.2
	ATG	16	34.8
La prophylaxie de GvHD	CSA+MTX	16	34.8
	CSA+MTX+ Stéroïdes	30	65.2
		Médiane	Extrême
Le nombre de cellules (x10 ⁸ /kg)		4.9	1.4-11.5
CD34 (x10 ⁸ /kg)		0.0831	0.036-0.216
L'âge		8	1.5-17
Le poids (kg)		22.5	11.5-47
La taille (cm)		124.5	94-162
IMC		16.022	11.31-19.71
SC (m ²)		0.88	0.54-1.45

Abréviations: ATG: Anti-thymocyte globulin; BM: Moelle osseuse; IMC: Indice de masse corporelle; SC : Surface corporelle;

Bu: Busulfan; CSA: Cyclosporine; Cy: Cyclophosphamide; HLA: Les antigènes des leucocytes humains; MTX: Methotrexate;

MMF : Mycophénolate mofétil.

Table 6. Les paramètres de Pharmacocinétique du Busulfan observés chez les enfants de l'étude (n = 46).

Paramètres	Médiane (Extrême)
Cmax (ng/mL)	1208 (694-2596)
Css (ng/mL)	831 (420-2126)
AUC (min.ng/mL)	277333 (136404-739704)
Clearance (mL/min/kg)	3.65 (1.48-7.47)

Cmax : concentration plasmatique maximale ; Css : concentration d'équilibre ; AUC : l'aire sous la courbe ; Les paramètres pharmacocinétique de la première dose de busulfan.

Table 7. Les haplotypes de GSTA1 et les fréquences des allèles mineurs dans la population étudiée (n = 46).

GATA1 Haplotype	-69	-513	-631	-1142	Haplotypes n (%)	Haplotype carriers n (%)
*A1	C	T	T	C	33 (35.4)	28 (60.86)
*A2	C	T	G	C	22 (23.9)	20 (43.47)
*A3	C	T	T	G	1 (1.5)	1 (2.17)
*B1	T	T	G	G	24 (26.5)	22 (47.82)
*B1a	T	C	G	G	10 (10.4)	10 (21.73)
*B2	T	T	G	C	2 (2.2)	2 (4.34)
Allèle mineur n (%)	36 (39.1)	10 (10.4)	34 (36.9)	35 (38.4)		

La glutathion-S-transférase Alpha1 (GSTA1), les haplotypes et les fréquences d'allèles sont calculés par rapport au nombre total de chromosomes. Les porteurs d'un haplotype donné (toutes les paires d'haplotypes contenant l'haplotype respectif) sont calculés par rapport au nombre total d'individus (n = 46).

Table 8. Les résultats cliniques observés chez les enfants de l'étude (n=46)

Les résultats cliniques	L'incidence cumulée		Le jour de l'apparition	
	N	%	Médiane	Extrême
Récupération des Neutrophiles	43	93	19	12-33
(Jour 100)				
Récupération des Plaquettes	41	89	27	13-75
(Jour 180)				
MVO	1	2	NA	NA
aGvHD (grade 1-4)	15	33	25	13-112
Toxicité pulmonaire	5	11	36	15-52
Cystite hémorragique	1	2	NA	NA

MVO : La maladie veino-occlusive ; aGvHD : La maladie du greffon contre l'hôte aigue.

CHAPITRE 5

DISCUSSION

La GST est la principale voie de biotransformation du BU. Elle joue un rôle très important dans son métabolisme. Dans les deux études (l'article et la cohorte d'Italie), nous explorons le rôle des variantes génétiques de la GST sur la variabilité PK du BU. D'une part, les polymorphismes du GST contribuent à l'explication de la variabilité interindividuelle de la PK après la première dose IV chez les enfants. D'autre part, ils aident à comprendre les résultats cliniques de la TSCH présentés sous forme de complications, tels que la MVO, GVHD, CH, rejet de la greffe, rechute de la maladie et même le décès.

L'article :

Dans notre première étude, nous avons évalué le rôle des polymorphismes du GST dans la variabilité de la PK du BU. Les conclusions précédentes ont été confirmées sur l'association significative du génotype GSTM1 nul qui a été associé à des niveaux plus élevés à l'exposition au médicament et à une CL plus basse du BU chez les personnes âgées de 4 ans et plus [46]. Ces résultats sont expliqués, dans une certaine mesure, par l'augmentation de la participation des GSTM1 dans le métabolisme du BU chez les enfants plus âgés. Il est aussi important de noter que cette association n'est pas confirmée par d'autres études [58].

L'analyse des génotypes GSTA1 / haplotypes a révélé une association significative avec l'exposition au Bu. En effet, on a observé une augmentation de la CL et une réduction des niveaux à l'exposition au médicament après la première dose chez les porteurs d'haplotype GSTA1*A2. On a aussi noté l'existence d'un effet Gène-dose.

Cette observation est en accord avec les études fonctionnelles suggérant une plus grande activité du GSTA pour les porteurs GSTA1 *A [25, 59].

Nous avons également noté un effet dépendant du sexe sur le génotype de GSTA1. L'haplotype de GSTA1 influence le métabolisme du Bu qui pourrait être plus important chez les femmes par rapport aux hommes selon l'activité de GST.

Aucune association significative entre les génotypes de GSTP1, GSTT1 (délétion) et l'exposition au Bu n'a été retrouvée. Ce résultat a également été rapporté par plusieurs études [58, 60, 61].

Il était aussi important de déterminer le rôle des variantes génétiques de GST dans les résultats cliniques de la TCSH. Dans cette étude, nous avons pu montrer que les individus porteurs de deux copies d'haplotypes de GSTA1 *A2*A2 ont une meilleure survie sans événement (ni décès, ni rejet, ni rechute) versus les non porteurs. De même, on a conclu que les individus homozygotes de GSTA1 d'allèles C-69 et G-1142 présentant respectivement les haplotypes GSTA1 *B et *B1 se caractérisent par un risque élevé d'atteindre la MVO pour le groupe entier et pour le sous groupe du sexe féminin on a trouvé aussi que les porteuses d'haplotype de GSTA1 *B ont le même risque élevé d'avoir la MVO. Ce risque est dû à une exposition élevée au médicament et à une CL plus faible probablement expliquée par une faible activité de GSTA1 chez les porteurs de ces haplotypes. Nous avons montré que les porteurs de GSTM1 nul ont un risque élevé d'atteindre l'aGvHD versus les non porteurs.

Cohorte d'Italie :

Dans cette deuxième étude, nous nous sommes basés sur les mêmes hypothèses et objectifs de la première étude dans le but de savoir si nous pouvons atteindre les mêmes résultats sachant que cette étude contient des patients pédiatriques thalassémiques.

En effet, nous avons évalué le rôle des polymorphismes du GST dans la variabilité de la PK du BU. Nous avons conclu, pour les patients pédiatriques thalassémiques d'origine de Moyen Orient, l'absence de l'association entre le génotype GSTM1 nul et les paramètres pharmacocinétiques de la première dose du BU administré par voie IV.

L'analyse des génotypes GSTA1 / haplotypes a trouvé une association significative avec l'exposition au Bu dans le groupe des patients pédiatriques thalassémiques. Cette association a été identifiée entre les porteurs d'haplotypes du GSTA1*B et *B1 qui présentent respectivement les individus homozygotes pour GSTA1 d'allèle T-69 et d'allèle G-1142 et les paramètres PK de la première dose du BU par voie IV. Une exposition plus élevée au médicament et une CL plus basse expliquent en partie cette corrélation.

Une autre recherche menée par Gaziev *et al.* [62] a mis l'accent sur cette corrélation génotype- PK. Une association significative entre les polymorphismes de la GST et la CL pour les porteurs d'haplotypes du GSTA1*B par rapport aux porteurs d'allèles sauvages a été révélée. Alors que d'autres polymorphismes du GST n'ont subi aucune influence sur les paramètres PK du BU administré par voie IV chez les patients thalassémiques.

Ces mêmes résultats des porteurs de GSTA1 d'haplotype *B sont confirmés par plusieurs autres études [61, 63]. En revanche, d'autres réflexions menées chez l'adulte et l'enfant n'ont pas pu montrer une telle corrélation. Ceci est causé par soit le nombre minimal des patients participants soit par les différents schémas posologiques du BU [60, 61].

Comme nous avons déjà montré dans la première étude, le sexe est un critère déterminant sur le génotype de GSTA1. En effet, le métabolisme du Bu est influencé par l'haplotype de GSTA1 puisqu'il pourrait être plus important chez les femmes par rapport aux hommes selon l'activité de GST.

Dans cette étude, nous avons aussi analysé le rôle des variantes génétiques de GST dans les résultats cliniques de la TCSH. Lors de l'analyse de la cohorte d'Italie chez les patients pédiatriques thalassémiques, nous avons prouvé que les porteurs du génotype GSTM1 nul ont un risque plus élevé de développer l'aGvHD versus les non porteurs. Cette conclusion est confirmée aussi par notre première étude et par d'autres études [58].

Il est important de mentionner que nous avons trouvé que les individus homozygotes de GSTA1 d'allèles C-69 et G-1142 présentant respectivement les haplotypes GSTA1 *B et *B1 possèdent un risque élevé d'atteindre la MVO pour le groupe entier (nous avons seulement un seul patient atteint de la MVO).

En résumé, nous avons montré que les variantes génétiques de GST influencent la PK du Bu et les résultats de la TCSH chez les enfants. Pour l'ajustement de la dose, un modèle avec l'inclusion de facteurs génétiques et non génétiques devrait être évalué dans une étude prospective. En effet, prédire la dose du Bu avant le début du traitement sera utile pour obtenir des meilleurs résultats cliniques chez les patients pédiatriques pour prescrire un traitement individualisé du BU en fonction du profil génétique de chaque patient.

CHAPITRE 6

CONCLUSION

La TCSH demeure un traitement important pour plusieurs maladies malignes, non malignes et congénitales. Pour la réussir, il est recommandé d'administrer un protocole bien précis de chimiothérapie basée sur une association des agents alkylants.

Parmi ces agents, le BU est un des principaux médicaments utilisés dans les régimes de conditionnement myéloablatif pour les enfants qui subissent une TCSH. Il est caractérisé par un index thérapeutique étroit, et une variabilité de son exposition qui conduit à des effets secondaires ou à une diminution de l'efficacité du traitement. Donc, il faut prédire la dose du Bu avant le début du traitement pour obtenir de meilleurs résultats cliniques chez les enfants. A ce niveau, l'unité de pharmacologie clinique de CHU Sainte-Justine ajuste la dose du BU après la première dose par voie IV avant l'administration de la 5^{ème} des 16 doses requises pour réussir la transplantation et diminuer les effets secondaires du BU.

Dans ce projet, il était important d'évaluer l'impact des polymorphismes de GST sur la PK du BU et/ou les résultats cliniques de la transplantation. Nous avons pu conclure que la variabilité de l'exposition au BU peut être expliquée par des polymorphismes génétiques tout en montrant dans notre étude que les variantes génétiques de GST influencent la PK du Bu et les résultats cliniques de la TCSH chez les enfants. Nous avons ainsi constaté qu'on peut adapter la première dose du BU selon la génétique des enfants. En effet, il n'est pas recommandé de donner des dosages standards et uniformes pour tous les enfants car la personnalisation des posologies est indispensable. En pédiatrie, ce résultat permet de bien connaître l'importance des variations génétiques avant la prescription des doses du médicament lors d'un conditionnement myéloablatif précédant la TCSH. Cette étude donne un nouvel aperçu sur la pharmacogénétique qui appuie la médecine personnalisée.

BIBLIOGRAPHIE

1. Arno G Motulsky, Ming Qi. Pharmacogenetics, pharmacogenomics and ecogenetics. *J Zhejiang Univ SCIENCE B* 2006 7(2):169-170.
2. Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med.* 2003 Feb 6 ; 348 (6) : 529-37.
3. Allorge D, M-A Lorient. La pharmacogénétique ou la promesse d'une médecine personnalisée : variations du métabolisme et du transport des médicaments. *Ann Biol Clin*, vol. 62, n° 5, septembre-octobre 2004.
4. Nebert DW, Jorge-Nebert L, Vesell ES. Pharmacogenomics and "individualized drug therapy": high expectations and disappointing achievements. *Am J Pharmacogenomics.* 2003 ; 3 (6) : 361-70.
5. American Cancer Society, Atlanta, Georgia. Colorectal Cancer Facts & Figures 2011-2013.
6. U.S. Food and Drug Administration.
<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm310899.htm>
7. Nagar S, et al. Pharmacogenetics of uridine diphosphoglucosyltransferase (UGT) 1A family members and its role in patient response to irinotecan. *Drug Metab Rev.* 2006 ; 38 (3) : 393-409.
8. Ando Y, et al. Polymorphisms of UDPglucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res.* 2000 ; 60 (24) : 6921-6926.
9. Federico Innocenti, Samir D. Undevia, Lalitha Iyer, et al. Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol* 22 : 1382-1388. © 2004 by American Society of Clinical Oncology.
10. Zhe-Yi Hu, Qi Yu, Qi Pei, et al. Dose-dependent association between UGT1A1*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: low doses also increase risk. *Clin Cancer Res* ; 16 (15) August 1, 2010.
11. Haga SB, et al. Adding pharmacogenetics information to drug labels: lessons learned. *Pharmacogenetics & Genomics: December 2006 - Volume 16 - Issue 12 - pp 847-854.*
12. Peter J. O'Dwyer, Robert B. Catalano. Uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 and irinotecan: practical pharmacogenomics arrives in cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 24, No 28 (October 1), 2006: pp 4534-4538.
13. Zhe-Yi Hu, Qi Yu, Yuan-Sheng Zhao. Dose-dependent association between UGT1A1*28 polymorphism and irinotecan-induced diarrhoea: a meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2010 ; 46 (10) : 1856-1865.

14. DA Flockhart, T Skaar, DS Berlin, et al. Clinically Available Pharmacogenomics Tests. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 86 : 109-113 (July 2009).
15. Fumihiko Takeuchi, Ralph McGinnis, Stephane Bourgeois, et al. A Genome-Wide Association Study Confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as Principal Genetic Determinants of Warfarin Dose. *PLoS Genet*, March 2009, 5 (3) : e1000433.
16. Mengjin Zhu, Shuhong Zhao. Candidate Gene Identification Approach: Progress and Challenges. *Int. J. Biol. Sci.* 2007, 3 (7) : 420-427.
17. Stéphan B, et al. Dynamic allele-specific oligonucleotide hybridization on solid support. *Analytical Biochemistry*. Volume 324, Issue 2, 15 January 2004, Pages 309–311.
18. Richard Weinshilboum. Inheritance and Drug Response. *n engl j med* 348 ; 6, 2003.
19. Ries L.A.G, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1973–1996 National Cancer Institute Bethesda, MD 1999.
20. C Lamour, A Bergeron. Non-infectious pulmonary complications of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders. *Rev Mal Respir* 2009 ; 26 : 655–665.
21. Theo de Witte. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelodysplastic syndrome. In: Kerry Atkinson (ed). *Clinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation*, 3rd edn. Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2004, pp 844–859.
22. V Siguret, J-P Andreux. Biological diagnosis of haemoglobinopathies by phenotype analysis.
23. Morgan M, Dodds A, Atkinson K, et al. The toxicity of busulphan and cyclophosphamide as the preparative regimen for bone marrow transplantation. *British Journal of Haematology*. April 1991, 77 (4) : 529–534.
24. CC Barker, JD Butzner, RA Anderson, et al. Incidence, survival and risk factors for the development of veno-occlusive disease in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation* (2003) 32, 79–87.
25. George B. McDonald, Mary S. Hinds, Lloyd D. Fisher, et al. Veno-occlusive disease of the liver and multiorgan failure after bone marrow transplantation: a cohort study of 355 patients. *Annals of Internal Medicine*. 1993 ; 118 : 255-267.
26. Wadleigh M, Ho V, Momtaz P, et al. Hepatic veno-occlusive disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Curr Opin Hematol*. 2003 Nov ; 10 (6) :451-62.
27. Thomas AE, Patterson J, Prentice HG, et al. Haemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation patients: possible increased risk associated with prior busulphan therapy. *Bone Marrow Transplant*. 1987 Apr ; 1 (4) : 347-355.

28. K Tsuboi, K Kishi, K Ohmachi, et al. Multivariate analysis of risk factors for hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* (2003) 32, 903–907.
29. Bekele Afessa, Raolat M. Abdula, Walter K. Kremers, et al. Risk Factors and Outcome of Pulmonary Complications After Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplant. *CHEST/141/2/FEBRUARY*, 2012.
30. A Bergeron, S Feuillet, V Meignin et al. Les complications pulmonaires tardives non infectieuses après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. *Rev Mal Respir* 2008 ; 25 : 173-83.
31. A Iguchi, R Kobayashi, M Yoshida, et al. Neurological complications after stem cell transplantation in childhood. *Bone Marrow Transplantation*, (1999) 24, 647–652.
32. Wiznitzer M, Packer RJ, August CS, et al. Neurological complications of bone marrow transplantation in childhood. *Ann Neurol*. 1984 Nov; 16 (5) : 569-76.
33. Garrick R. Neurological complications. In: Kerry Atkinson (ed). *Clinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation*, 2nd edn. Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2000, pp 958–979.
34. Oppenshaw H, et al. Neurological complications. In: Forman SJ, Blume KG, Thomas (eds). *Bone Marrow Transplantation*. Blackwell Scientific Publications: Oxford, UK, 1999, pp 659–673.
35. D Uckan, M Cetin, I Yigitkanli, et al. Life-threatening neurological complications after bone marrow transplantation in children. *Journal of Bone Marrow Transplant* (2005) 35, 71-76.
36. Czerwinski M, Gibbs JP, Slattery JT. et al. Busulfan conjugation by glutathione S-transferases alpha, mu, and pi. *Drug Metab Dispos*. 1996 Sep ; 24 (9) : 1015-9.
37. Dourado DF, Fernandes PA, Ramos MJ. Mammalian cytosolic glutathione transferases. *Curr Protein Pept Sci*. 2008 Aug ; 9 (4) : 325-37.
38. Hassan M, Oberg G, Ehrsson H, et al. Pharmacokinetic and metabolic studies of high-dose busulphan in adults. *Eur J Clin Pharmacol*. 1989 ; 36 (5) : 525-30.
39. Marchand DH, Remmel RP, Abdel-Monem MM. Biliary excretion of a glutathione conjugate of busulfan and 1, 4-diiodobutane in the rat. *Drug Metab Dispos*. 1988 Jan-Feb ; 16 (1) : 85-92.
40. Ritter CA, Bohnenstengel F, Hofmann U, et al. Determination of tetrahydrothiophene formation as a probe of in vitro busulfan metabolism by human glutathione S-transferase A1-1: use of a highly sensitive gas chromatographic-mass spectrometric method. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999 Jun 25 ; 730 (1) : 25-31.
41. Hassan M, Ehrsson H. Urinary metabolites of busulfan in the rat. *Drug Metab Dispos*. 1987 May-Jun ; 15 (3):399-402.

42. Arthur J. L. Cooper, Islam R. Younis, Zoya V. Niatsetsckaya, et al. Metabolism of the cysteine S-conjugate of busulfan involves a beta-lyase reaction. *Drug Metab Dispos.* 2008 Aug;36(8):1546-52.
43. Damani LA, Houdi AA. Cytochrome P-450 and FAD-monoxygenase mediated S- and N-oxygenations. *Drug Metabol Drug Interact.* 1988 ; 6 (3-4) : 235-44.
44. Kuo Yang, Sook Wah Yee, Li Gong, et al. Busulfan Pathway, Pharmacodynamics. <http://www.pharmgkb.org/views/pathway/PA165374494.pdf>
45. M Iravani, MR Evazi, SA Mousavi, et al. Fludarabine and busulfan as a myeloablative conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in high-and standard-risk leukemic patients. *Bone Marrow Transplantation* (2007) 40, 105–110.
46. M Ansari, J-F Lauzon-Joset, M-F Vachon, et al. Influence of GST gene polymorphisms on busulfan pharmacokinetics in children. *Bone Marrow Transplantation* (2010) 45, 261–267.
47. Robert Chiesa, Barbara Cappelli, Roberto Crocchiolo, et al. Unpredictability of intravenous busulfan pharmacokinetics in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation for advanced beta thalassemia: limited toxicity with a dose-adjustment policy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010 May ; 16 (5) : 622-628.
48. Alois Gratwohl. Transplantation de cellules souches humaines: nouveaux paradigmes. *Forum Med Suisse* 2008;8:92–97
49. Afonso C. Vigorito, Paulo V. Campregher, Barry E. Storer, et al. Evaluation of NIH consensus criteria for classification of late acute and chronic GVHD. *Blood.* 2009 Jul 16 ; 114 (3) : 702-708.
50. Jacques-Olivier Bay, Aurélie Cabrespine, Régis Peffault de Latour. Place des anticorps monoclonaux dans le traitement de la maladie aiguë du greffon contre l'hôte en 2006. *Bull Cancer* 2007 ; 94 (1) : 33-41.
51. Hande H Tuncer, Naveed Rana, Cannon Milani, et al. Gastrointestinal and hepatic complications of hematopoietic stem cell transplantation. *World J Gastroenterol* 2012 April 28; 18(16): 1851-1860.
52. D A Jacobsohn, S Montross, V Anders, et al. Clinical importance of confirming or excluding the diagnosis of chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplantation* (2001) 28, 1047-1051.
53. G Georges and R Storb. Failure of sustained engraftment : clinical manifestations and treatment. In: Kerry Atkinson (ed). *Clinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation*, 3rd edn. Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2004, pp 1088–1108.
54. Bekele Afessa, Steve G. Peters. Major complications following hematopoietic stem cell transplantation. *Semin Respir Crit Care Med.* 2006 Jun;27(3):297-309.

55. A Dekker and D Engelhard. Bacterial infections. In: Kerry Atkinson (ed). *Clinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation*, 3rd edn. Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2004, pp 1158–1179.
56. Robert Chiesa, Barbara Cappelli, Roberto Crocchiolo, et al. Unpredictability of Intravenous Busulfan Pharmacokinetics in Children Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Advanced Beta Thalassemia: Limited Toxicity with a Dose-Adjustment Policy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 May ; 16 (5) : 622-8.
57. G Lucarelli and E Angelucci. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia. In: Kerry Atkinson (ed). *Clinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation*, 3rd edn. Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2004, pp 929–937.
58. Ronit Elhasid, Norberto Krivoy, Jacob M. Rowe, et al. Influence of glutathione S transferase A1, P1, M1, T1 polymorphisms on oral busulfan pharmacokinetics in children with congenital hemoglobinopathies undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2010 ; 55 : 1172–1179.
59. Monika Bredschneider, Kathrin Klein, Thomas E Mürdter, et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase A1, the major glutathione S-transferase in human liver: consequences for enzyme expression and busulfan conjugation. *Clin Pharmacol Ther*. 2002 Jun ; 71 (6) : 479-87.
60. Tal Schechter, Yaron Finkelstein, John Doyle, et al. Pharmacokinetic disposition and clinical outcomes in infants and children receiving intravenous busulfan for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 March ; 13 (3) : 307-14.
61. Makiko Kusama, Takahiro Kubota, Yuji Matsukura, et al. Influence of glutathione S-transferase A1 polymorphism on the pharmacokinetics of busulfan. *Clin Chim Acta* Volume 368, Issues 1–2, June 2006, Pages 93–98.
62. Javid Gaziev, Laurent Nguyen, Christian Puozzo, et al. Novel pharmacokinetic behavior of intravenous busulfan in children with thalassemia undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a prospective evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic profile with therapeutic drug monitoring. *Blood*, 2010 ; 115: 4597-4604.
63. Kim I, Keam B, Lee KH, et al. Glutathione S-transferase A1 polymorphisms and acute graft-vs.-host disease in HLA-matched sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Transplant*. 2007 Mar-Apr ; 21 (2) : 207-13.