HAL
open science

PHARMACOGENETIQUE DES MEDICAMENTS THIOPURINIQUES Implication des enzymes TPMT et IMPDH2 et de la RhoGTPase RAC1

Anne Garat

To cite this version:

Anne Garat. PHARMACOGENETIQUE DES MEDICAMENTS THIOPURINIQUES Implication des enzymes TPMT et IMPDH2 et de la RhoGTPase RAC1. Biochimie [q-bio.BM]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2009. Français. NNT : . tel-00439266

HAL Id: tel-00439266

https://theses.hal.science/tel-00439266

Submitted on 7 Dec 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE de LILLE 2 - DROIT ET SANTE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE ET SANTE

Thèse pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Discipline : Toxicologie

présentée et soutenue publiquement le 9 septembre 2009 par

Anne GARAT

Sujet de thèse

PHARMACOGENETIQUE DES MEDICAMENTS THIOPURINIQUES

Implication des enzymes TPMT et IMPDH2 et de la RhoGTPase RAC1

Directeur de thèse

Mme le Docteur Nicole Houdret

Membres du Jury

Rapporteurs	Mme le Professeur Corinne Charlier
	Mr le Professeur François Sichel
Examinateurs	Mr le Professeur Franck Broly
	Mr le Professeur Michel Lhermitte
	Mme le Docteur Marie-Anne Loriot

J'exprime tous mes remerciements à :

Madame le Professeur Corinne Charlier et Monsieur le Professeur François Sichel qui ont accepté la charge d'être rapporteurs de ce travail,

Messieurs les Professeurs Michel Lhermitte, Franck Broly, et Madame le Docteur Marie-Anne Loriot qui ont accepté d'examiner ce travail et de faire partie du jury de cette thèse,

Madame le Docteur Nicole Houdret qui a accepté d'être mon directeur de thèse et qui m'a soutenue, encouragée et orientée durant ces trois années.

Je souhaiterais exprimer ici ma gratitude à Messieurs les Professeurs Michel Lhermitte et Franck Broly pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire.

Je tiens également à remercier toute l'Equipe d'accueil de la « Salle 31 », en particulier Delphine, Jean-Marc, Christelle, Anne et Aurore, pour leur aide précieuse, leurs conseils et leur soutien jour après jour.

Je remercie Ingrid, qui m'a initiée à l'art de la recherche au cours de mon DEA, et Dany, pour ses précieux conseils pédagogiques.

Je remercie Madame le Docteur Mathieu-Nolf et tous les membres de l'équipe du Centre Antipoison de Lille pour leur accueil et la confiance qu'ils m'accordent.

Je remercie également mes co-thésards et amis, Marion, Julie, Christian, Nicolas, et tous les petits nouveaux.

Une pensée pour Luc, sa famille, ses proches.

Je remercie mes amies, elles se reconnaitront, pour leur patience et leurs encouragements, années après années.

Enfin, bien sûr, je remercie mes parents, mes premiers supporters, et Etienne, pour tout ce qu'ils m'apportent au quotidien.

PUBLICATIONS ET TRAVAUX

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

Identification of single nucleotide polymorphisms in the human *IMPDH2* gene and characterization of a promoter polymorphism.
Garat A, Cauffiez C, Hamdan-Khalil R, Glowacki F, Devos A, Leclerc J, Lionet A, Allorge D, Lo-guidice JM, Broly F. Article accepté dans *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*.
2009

Identification of the genetic polymorphism of RAC1 and its role in thiopurine drug response.
Garat A, Allorge D, Bourgine J, Crunelle-Thibaut A, Lo-Guidice JM, Moreau JJ, Colombel JF, Broly F, Billaut-Laden I. *Article en préparation.*
2009

Characterisation of novel defective thiopurine S-methyltransferase allelic variants.
Garat A, Cauffiez C, Renault N, Lo-Guidice JM, Allorge D, Chevalier D, Houdret N, Chavatte P, Loriot MA, Gala JL, Broly F. Biochem Pharmacol. 2008;76:404-15.
2008

Communication orale

Congrès National de la Société Française de Pharmacie Clinique
Avez N, Garat A, Moet A, Pollet C, Robert H. « Observation de taux sériques inattendus de rispéridone en situation posologique adéquate : essais d'explication ».
2006

Communications affichées

Journée André Verbert, Lille
Garat A, Houdret N, Broly F. Caractérisation de nouveaux variants alléliques de la Thiopurine S-Méthyltransférase.
2008

Congrès national de la Société Française de Pédiatrie - Journée d'études de l'ANPDE
Nisse P, Garat A, Cezard C, Peucelle D, Mathieu-Nolf M. « Intérêt de la fibroscopie oesogastroduodénale après ingestion accidentelle d'un caustique fort chez l'enfant ».
2004

Congrès Hopipharm
Barrier F, Garat A, Nisse P, Mathieu-Nolf M. « Intoxication par des solutions conditionnées en unidose de 1999 à 2003 au Centre Antipoison de Lille ».
2003

COLLABORATIONS SCIENTIFIQUES

Pr. Ph. CHAVATTE, EA1043, Laboratoire de Chimie Thérapeutique, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Lille 2, France.

Pr. J-F. COLOMBEL, Service d'Hépato-Gastroentérologie, CHRU Lille, France.

Pr. J-L. GALA, Technologies Moléculaires Appliquées, Université Catholique de Louvain et Département des laboratoires de la Défense, Brussels, Belgique.

Dr. M-A. LORIOT, INSERM UMR S775, Bases moléculaires de la réponse aux xénobiotiques, Université de Paris 5, France.

Dr. D. POMPON, CNRS UPR 9061, Centre de Génétique Moléculaire, Gif-sur-Yvette, France.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE……. **1**

LES MEDICAMENTS THIOPURINIQUES……. **13**

PHARMACOGENETIQUE DES THIOPURINES……... **39**

I. ANOMALIES DE REPONSE AUX THIOPURINES……. **43**

1. EFFETS INDESIRABLES……...……... **43**

2. RESISTANCE AU TRAITEMENT……...…….. **49**

II. POLYMORPHISME GENETIQUE DE PROTEINES IMPLIQUEES DANS LES ANOMALIES DE REPONSE AUX THIOPURINES……... **53**

A. ENZYMES ……...……. **53**

1) LA THIOPURINE *S*-METHYLTRANSFERASE (TPMT)…….. **53**

2) L'INOSINE TRIPHOSPHATE PYROPHOSPHATASE (ITPA)…….. **61**

3) LA GLUTHATION-*S*-TRANSFERASE (GST)……. **67**

4) LA 5,10-METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE (MTHFR)…….. **71**

5) L'HYPOXANTHINE GUANINE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE (HGPRT)…… **75**

6) LA XANTHINE OXYDASE (XO)……...…….. **77**

7) L'INOSINE MONOPHOSPHATE DESHYDROGENASE (IMPDH)…….. **81**

B. TRANSPORTEURS IMPLIQUES DANS L'ENTREE OU LA SORTIE DES NUCLEOTIDES THIOPURINIQUES……... **85**

1) TRANSPORTEURS D'AFFLUX……..……...…….. **85**

2) TRANSPORTEURS D'EFFLUX…….. **89**

TRAVAUX PERSONNELS……. **93**

I. METHODOLOGIES……... **97**

II. TRAVAUX PERSONNELS SUR LE GENE *TPMT*……... **107**

III. TRAVAUX PERSONNELS SUR LE GENE *IMPDH2*……. **137**

IV. TRAVAUX PERSONNELS SUR LE GENE *RAC1*……... **171**

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES……... **221**

CONCLUSION…….. **243**

BIBLIOGRAPHIE…… **249**

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques……. **4**

Figure 2. Bases moléculaires des polymorphismes d'activité enzymatique…… **6**

Figure 3. Métabolisme des médicaments thiopuriniques…… **20**

Figure 4. Effets indésirables des thiopurines, place du métabolisme…….. **42**

Figure 5. Place de la TPMT dans le métabolisme des thiopurines…….. **52**

Figure 6. Histogramme de distribution de l'activité TPMT dans la population caucasienne…….. **54**

Figure 7. Structure des allèles non-fonctionnels du gène *TPMT* les plus fréquents…… **54**

Figure 8. Place de l'ITPA dans le métabolisme des thiopurines……..... **60**

Figure 9. Schéma de la synthèse et du recyclage de l'ITP……... **60**

Figure 10. Place de la GST dans le métabolisme des thiopurines……... **66**

Figure 11. Réaction enzymatique catalysée par la GST…….. **66**

Figure 12. Place de la MTHFR dans la production de la méthionine à partir de l'homocystéine... **70**

Figure 13. Représentation schématique de 41 mutations graves du gène *MTHFR* et de 2 polymorphismes particulièrement étudiés…… **70**

Figure 14. Place de l'HGPRT dans le métabolisme des thiopurines……... **74**

Figure 15. Place de l'HGPRT dans la synthèse *de novo* des purines……... **74**

Figure 16. Place de la XO dans le métabolisme des thiopurines…….. **76**

Figure 17. Réactions catalysées par la XO……... **76**

Figure 18. Place de l'IMPDH dans le métabolisme des thiopurines……. **80**

Figure 19. Conversion de l'inosine monophosphate (IMP) en xanthosine monophosphate (XMP) par l'IMPDH…… **80**

Figure 20. Représentation simplifiée des transporteurs ENT et CNT……. **84**

Figure 21. Rôle de MRP4 et MRP5 dans la régulation des concentrations intracellulaires des nucléotides cycliques…… **88**

Figure 22. Rôle de MRP4 et MRP5 dans la régulation des concentrations intracellulaires des thionucléotides.…… **88**

Figure 23. Cycle d'activation et d'inactivation de RAC, petite protéine G, par ses régulateurs…. **170**

Figure 24. Variants alléliques de la TPMT humaine……... **228**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Exemples d'enzymes affectées par un polymorphisme génétique ayant des applications pharmacogénétiques…… **8**

Tableau 2. Indications principales et propriétés de l'azathioprine, de la 6-mercaptopurine et de la 6-thioguanine…**……** **14**

Tableau 3. Indications des médicaments thiopuriniques…… **16**

Tableau 4. Interprétation des dosages des métabolites 6-TGN, 6-MMP(R) et du *ratio* 6-MMP(R)/6-TGN chez les patients atteints de MICI et traités par AZA ou 6-MP……... **34**

Tableau 5. Exemple de guide thérapeutique pour la prescription d'AZA et de 6-MP…... **58**

Tableau 6. Principaux polymorphismes des GSTM1, GSTP1 et GSTT1……... **66**

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les médicaments représentent une part importante des substances chimiques étrangères à l'organisme, encore appelées xénobiotiques, auxquelles l'homme est exposé en permanence. Il existe une grande variabilité inter-individuelle dans la réponse aux médicaments, tant en terme d'efficacité que de toxicité. Cette variabilité est en partie expliquée par différents facteurs physiopathologiques comme l'âge, le sexe, la grossesse, les pathologies associées, les fonctions hépatique et rénale des patients, ainsi que par des facteurs environnementaux tels que l'alimentation, la co-administration de médicaments, le tabagisme, etc. Cependant, il est désormais reconnu que des anomalies affectant les gènes codant pour des protéines impliquées dans la distribution des médicaments, leur métabolisme ou codant pour leur(s) cible(s) thérapeutique(s), comme des récepteurs par exemple, représentent la cause essentielle des variations d'efficacité et de toxicité des molécules médicamenteuses.

La pharmacogénétique est la discipline qui étudie l'effet des gènes et de leurs variants sur la réponse aux médicaments. Il s'agit d'une thématique pluridisciplinaire, qui combine des éléments de pharmacologie, pharmacocinétique, biochimie, génétique et biologie moléculaire. Elle a pour but ultime le développement de tests simples permettant d'identifier les individus à risque d'anomalies de réponse aux médicaments, et ceci, avant leur administration si possible. Cette discipline est très ancienne, des différences inter-individuelles de réponse à une substance exogène ayant probablement été rapportées dès le IVe siècle avant JC par Pythagore, qui avait constaté que certains individus souffraient d'anémie hémolytique aiguë suite à l'ingestion de fèves (favisme). C'est seulement en 1902 que Garrod et Oxon ont émis l'hypothèse selon laquelle une composante génétique pourrait être à l'origine d'un déficit enzymatique. Le terme de « pharmacogénétique » a été proposé dès la fin des années 1950, à la suite de la démonstration du caractère héréditaire de réponses anormales à certains traitements médicamenteux (Vogel, 1959). La survenue de crises d'anémies hémolytiques aiguës après la prise de médicaments « oxydants » comme la primaquine (antipaludéen) chez des individus déficitaires en glucose 6-phosphate déshydrogénase représente l'un des premiers exemples célèbres illustrant l'existence d'une prédisposition génétique aux effets indésirables des médicaments (Beutler, 1993). Depuis lors, de très nombreux exemples d'anomalies génétiques, responsables de variations d'expression et/ou d'activité des protéines

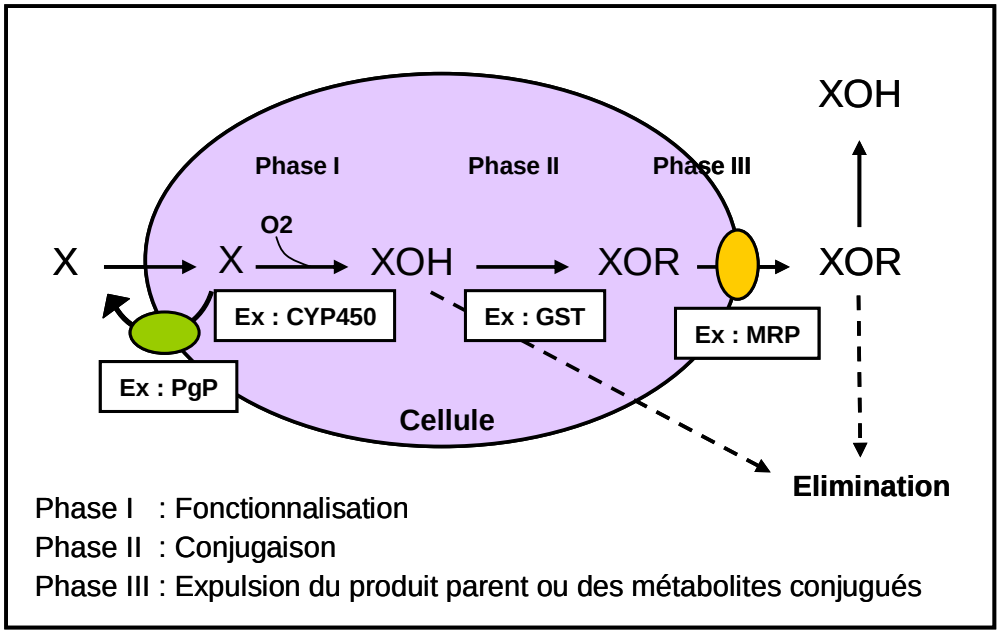

Figure 1. Représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques. PgP, P-glycoprotéine ; CYP450, cytochromes P450 ; GST, Glutathion S-transférases ; MRP, Multi Drug Resistance Proteins ; X, Xénobiotique hydrophobe ; XOH et XOR, métabolites plus polaires du xénobiotique (d'après Allorge et Loriot, 2004).

impliquées dans la prise en charge des médicaments, ont été rapportés (Ingelman-Sundberg *et al.*, 1999; Daly, 2003; Oscarson, 2003; Katz et Bhathena, 2009). Parmi ces anomalies génétiques, les mieux connues sont celles qui affectent les enzymes du métabolisme et les protéines de transport des médicaments. Ces composés sont en effet généralement de nature hydrophobe et doivent être métabolisés en composés hydrophiles afin d'être plus facilement éliminés dans la bile ou les urines **(Figure 1)** (Allorge et Loriot, 2004).

Après administration orale, les médicaments doivent pénétrer dans le compartiment vasculaire pour atteindre leur cible, en franchissant la barrière intestinale, au niveau de laquelle il existe des transporteurs destinés à les expulser (Phase «0» du métabolisme, représentée par exemple par la P-glycoprotéine). Le métabolisme cellulaire, essentiellement hépatique, est ensuite assuré par différents systèmes enzymatiques qui sont schématiquement divisés en deux groupes : (1) les enzymes de phase I sont des enzymes de fonctionnalisation qui rendent les molécules plus polaires, principalement représentées par les enzymes de la superfamille des cytochromes P450; (2) les enzymes de phase II sont des transférases qui catalysent des réactions de conjugaison, et rendent les métabolites encore plus hydrophiles, par greffage d'un radical endogène acétyle, sulfate, glucuronate, méthyle, glutathion, etc. Enfin, pour être éliminés hors de la cellule, ces métabolites conjugués doivent être transportés à travers la membrane par des protéines de phase III, représentées surtout par deux superfamilles, d'une part, les protéines ABC (*ATP-Binding Cassette*) qui comprennent entre autres les MRP (*Multi Drug Resistance Proteins)*, et d'autre part, les protéines SLC (*Solute Carrier*).

La majorité des enzymes intervenant dans le métabolisme des médicaments est exprimée de façon ubiquitaire. Ainsi, on a longtemps considéré que les P450 étaient principalement exprimés dans le foie, mais ils sont en fait présents dans tous les tissus, où ils influencent la biodisponibilité des agents thérapeutiques et contribuent à la formation de métabolites dont la production *in situ* peut expliquer la toxicité tissu-spécifique (Ding et Kaminsky, 2003).
En effet, les réactions métaboliques aboutissent la plupart du temps à une désactivation du xénobiotique, mais peuvent parfois conduire à la formation d'un métabolite plus actif, voire plus toxique, que le composé initial. L'équilibre entre la production des métabolites toxiques ou atoxiques dans un tissu dépend, au moins partiellement, du profil des enzymes exprimées dans ce tissu.

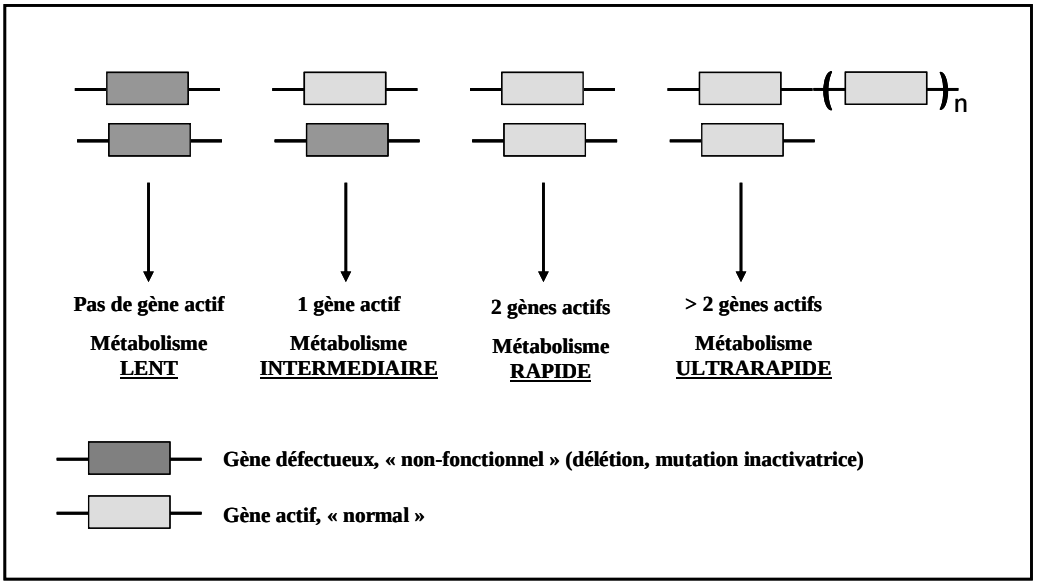

Figure 2. Bases moléculaires des polymorphismes d'activité enzymatique. Dans le cas d'un médicament métabolisé par une enzyme, la capacité métabolique de l'individu dépend du nombre d'allèles fonctionnels du gène codant pour l'enzyme. Si les deux allèles sont inactivés (homozygote muté), on parle de métaboliseur lent (activité enzymatique absente ou diminuée). Si un seul des deux allèles est muté (hétérozygote), on parle parfois de métaboliseur intermédiaire. Si les deux allèles sont sauvages, on parle de métaboliseur rapide ou extensif. Dans certains cas assez rares, il peut exister une amplification du gène, conduisant à une augmentation de l'activité et à un phénotype de métaboliseur ultra-rapide (d'après de Chaisemartin et Loriot, 2004).

Les polymorphismes génétiques affectant l'expression ou l'activité des enzymes du métabolisme des médicaments s'expriment dans la population générale sous forme de différents phénotypes métaboliques, définissant au moins deux groupes d'individus : les métaboliseurs lents (ML), qui présentent un déficit d'activité enzymatique, et les métaboliseurs rapides (MR), à activité normale. Pour certaines enzymes, sont décrits également des métaboliseurs ultra-rapides (MUR), chez qui l'activité enzymatique est augmentée et des métaboliseurs intermédiaires (MI), à activité réduite **(Figure 2)**. La fréquence des différents phénotypes est variable en fonction de l'enzyme et, pour une même enzyme, variable en fonction de l'origine ethnique ou géographique des populations étudiées (Gaedigk, 2000 ; Loriot et Beaune, 2004).

Le phénotype métabolique d'un individu peut être déterminé par deux types de méthodes, à savoir le phénotypage ou le génotypage. Les méthodes de phénotypage reposent sur la mesure directe de l'activité enzymatique ou, le plus souvent, sur l'administration d'un substrat-test, suivie d'une mesure des quantités de substrat résiduelles et/ou de leurs métabolites. Dans le cas le plus général, on détermine alors le rapport métabolique entre la quantité de substance retrouvée sous forme inchangée et celle d'un (ou plusieurs) métabolite(s), ce rapport étant le reflet de l'activité enzymatique étudiée. La valeur du rapport métabolique permet de classer les individus en métaboliseurs extensifs ou limités par comparaison à celle de l'antimode de distribution, déterminé au préalable de façon statistique, sur une grande population d'individus. Lorsque l'administration directe du médicament-test à l'individu n'est pas envisageable (par exemple pour les médicaments immunosuppresseurs potentiellement toxiques), ces tests de phénotypage *in vivo* peuvent être remplacés par des tests *ex vivo*. C'est par exemple le cas pour la Thiopurine *S*-Méthyltransférase, dont la mesure d'activité est réalisée à partir d'un lysat érythrocytaire. En fait, cette approche par mesure directe de l'activité enzymatique sur un tissu facilement accessible comme les érythrocytes ou les leucocytes serait préférable à la méthode par administration d'un médicament-test, plus contraignante. Malheureusement, la grande majorité des enzymes présentant un intérêt en pharmacogénétique est peu ou pas exprimée dans des tissus d'accès facile et non invasif (Allorge et Loriot, 2004). De plus, l'interprétation du phénotype par ces méthodes est parfois difficile, voire impossible, par exemple en cas de co-administrations de médicaments eux-mêmes substrats, inducteurs ou encore inhibiteurs, de l'enzyme testée (risque de phénocopie).

Tableau 1. Exemples d'enzymes affectées par un polymorphisme génétique ayant des applications pharmacogénétiques (d'après Tomalik-Scharte *et al*., 2008).

Pathologie	***Médicaments***	***Enzymes impliquées / Allèles incriminés***
Dépression	Antidépresseurs tricycliques (amitriptyline, imipramine)	CYP2D6 *CYP2D6*3,*4,*5* et **6*
	Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (paroxétine)	CYP2C19 *CYP2C19*2* et **3*
Pathologies cardio-vasculaires	ß-bloquants (metoprolol, carvedilol)	CYP2D6 *CYP2D6*3,*4,*5* et **6*
	Antagonistes du récepteur AT_1 (losartan, candesartan)	CYP2C9 *CYP2C9*2* et **3*
Troubles thromboemboliques	Anticoagulants coumariniques (warfarine, acenocoumarol)	CYP2C9 *CYP2C9*2* et **3*
Ulcère gastrique	Inhibiteurs de la pompe à protons (omeprazole, lansoprazole)	CYP2C19 *CYP2C19*2* et **3*
Pathologies cancéreuses	Thiopurines	TPMT *TPMT*2,*2A* et **3C*
	Irinotecan	UGT *UGT1A1*28, *6* et **27*
Tuberculose	Isoniazide	NAT2 *NAT2*5,*6* et **7*

Pour pallier ces inconvénients, il est possible, grâce à l'utilisation de techniques dites de génotypage, simples et rapides, basées sur l'analyse d'un échantillon d'ADN, d'offrir aux cliniciens la possibilité de prévoir et de prévenir, chez leurs patients, la survenue d'effets indésirables, considérés jusque-là comme une fatalité inhérente à la thérapeutique médicamenteuse, et ainsi d'améliorer l'efficacité et la sécurité d'emploi de nombreux traitements. Cette possibilité représente une révolution dans l'utilisation des médicaments à l'échelle individuelle et un réel espoir d'aboutir à une pharmacothérapie « sur mesure ». Ainsi, les gènes codant pour différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments peuvent être analysés en routine, avant l'instauration d'un traitement. Après génotypage, les patients classés « métaboliseurs ultra-rapides », susceptibles d'éliminer trop rapidement le médicament, verront éventuellement leur posologie augmentée afin d'éviter une inefficacité thérapeutique par sous-dosage. Les « métaboliseurs lents », qui, quant à eux, sont susceptibles d'accumuler le médicament et de présenter des effets secondaires en lien avec un sur-dosage, verront leurs doses réduites. Chez les patients « métaboliseurs intermédiaires », il pourra être recommandé de suivre les concentrations circulantes pour adapter plus finement la posologie (Ikeda *et al.*, 2004). Le **Tableau 1** présente quelques exemples d'enzymes impliquées dans le métabolisme de médicaments pour lesquels des anomalies de réponse d'origine génétique ont été démontrées.

Au total, les travaux menés dans le domaine de la pharmacogénétique ont pour objectifs (1) d'identifier les variations, d'origine génétique, de réponse aux médicaments, (2) d'étudier les mécanismes moléculaires à l'origine de ces variations, (3) d'évaluer leur importance médicale, voire médico-économique, et (4) de développer des méthodes simples d'identification des individus à risque de réponse anormale à ces médicaments. La pharmacogénétique a donc pour but ultime l'optimisation des traitements médicamenteux, tant en termes d'efficacité que de sécurité d'emploi, et représente, à ce titre, un réel espoir d'individualisation des traitements médicamenteux.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse s'inscrivent dans ce cadre et ont porté sur la pharmacogénétique des médicaments thiopuriniques. Ce manuscrit est organisé en trois grandes parties. La première présente les propriétés des médicaments thiopuriniques, que sont l'azathioprine, la 6-mercaptopurine et la 6-thioguanine. La seconde partie fait état des connaissances actuelles sur les enzymes et les transporteurs qui ont, ou sont suspectés d'avoir, un rôle dans les variations inter-individuelles de réponse à ces molécules. La troisième partie

présente, sous forme d'articles scientifiques acceptés ou soumis pour publication, les résultats de mes travaux concernant l'étude de deux enzyme-clés du métabolisme des thiopurines, la Thiopurine *S*-Méthyltransférase d'une part **(Article 1)**, et l'Inosine Monophosphate Déshydrogénase de type 2 **(Article 2)** d'autre part, ainsi que celle de l'une des cibles de ces médicaments, la protéine RAC1 **(Article 3)**.

LES MEDICAMENTS THIOPURINIQUES

Tableau 2. Indications principales et propriétés de l'azathioprine, de la 6-mercaptopurine et de la 6-thioguanine.

DCI Nom commercial	Pharmacodymamie, Indications, Posologies	Effets indésirables, Précautions d'emploi	Interactions médicamenteuses
6-Mercaptopurine **Purinethol®**	- Analogue des purines, antimétabolites (antinéoplasique et immunomodulateur) ☞ Leucémies Aiguës Lymphoblastiques (LAL) ☞ Leucémies Aiguës Myéloblastiques (LAM) ☞ Leucémies Myéloïdes Chroniques (LMC) Dose d'entretien des LA : de 1 à 2,5 mg/kg/j, max. 5 mg/kg/j Dose d'entretien des LMC : de 1,5 à 2,5 mg/kg/j	- Hypoplasie médullaire (leucopénie, thrombopénie, anémie, pancytopénie) ⇒ Surveillance régulière de l'hémogramme - Hépatotoxicité (cholestase, nécrose hépatocytaire) ⇒ Bilan hépatique régulier - Troubles gastrointestinaux (anorexie, nausées, vomissements, ulcérations buccales ou intestinales, diarrhée, pancréatite, hypofertilité, alopécie) - Rares cas de manifestation d'hypersensibilité (fièvre, vertiges, arthralgies, myalgies, éruption cutanée, hypotension)	- Allopurinol, dérivés du 5-ASA ⇒ Risque d'insuffisance médullaire réversible par surdosage (diminution du métabolisme hépatique) - Busulfan (spécifique de la thioguanine) ⇒ Risque d'hépatotoxicité sévère et d'effets indésirables pulmonaires - Phénytoïne à visée prophylactique ⇒ Risque de convulsions suite à une diminution de l'absorption digestive - Ciclosporine et tacrolimus ⇒ Risque d'immunodépression excessive avec lymphoprolifération - Vaccins contre la fièvre jaune et vaccins vivants atténués ⇒ Risque de maladie vaccinale généralisée
6-Thioguanine **Lanvis®**	- Analogue des purines, antimétabolites (antinéoplasique et immunomodulateur) ☞ Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM) Dose d'entretien : de 60 à 200 mg/m^2/j, modulable		
Azathioprine **Imurel®**	- Immunosuppresseur (antinéoplasique et immunomodulateur). Prodrogue de la 6-Mercaptopurine. ☞ Prévention du rejet des organes transplantés (en association avec des corticoïdes et d'autres agents immunodépresseurs). Dose d'attaque : jusqu'à 5 mg/kg/j Dose d'entretien : de 1 à 4 mg/kg/j ☞ Maladies dysimmunitaires : lupus érythémateux disséminé, polyarthrite rhumatoïde sévère, hépatite chronique active, purpura thrombopénique idiopathique, anémie hémolytique acquise auto-immune, dermatomyosite, polymyosite, périartérite noueuse, pemphigus vulgaire, maladie de Crohn et rectocolite hémorragique. Dose d'attaque : jusqu'à 3 mg/kg/j Dose d'entretien : de 1 à 3 mg/kg/j		

LES MEDICAMENTS THIOPURINIQUES

L'azathioprine (AZA, Imurel®) et la 6-mercaptopurine (6-MP, Purinethol®), sont les plus anciens dérivés thiopuriniques utilisés en thérapeutique. Ces molécules ont été synthétisées dans les années 1950 par Elion et Hitchings (Elion *et al.*, 1951 ; Hitchings *et al.*, 1952). En 1999, la 6-thioguanine (6-TG, Lanvis®), troisième membre de cette famille, a obtenu l'Autorisation de Mise sur le Marché en France.

Les informations données dans cette section comportent des extraits du Vidal 2008 et de la base de données Thériaque (www.theriaque.org). Les Avis de la Commission de Transparence de la Haute Autorité de Santé (01/02/06) pour l'Imurel® 50 mg et le Purinethol® 50 mg, ainsi que les monographies de l'Imuran® 50 mg (27/02/07), spécialité canadienne de l'AZA, et du Lanvis® 40 mg (27/06/06) ont également été consultés, tout comme les fiches d'information thérapeutique du Getaid (Groupe d'Etude Thérapeutique des Affections Inflammatoires du Tube Digestif). Ces informations sont résumées dans le **Tableau 2**.

1. Indications thérapeutiques

Les indications thérapeutiques des médicaments thiopuriniques sont nombreuses. Ces molécules aux propriétés antinéoplasiques et immunosuppressives sont préconisées non seulement dans la prise en charge de nombreuses formes de leucémies, mais également dans le traitement de maladies auto-immunes et inflammatoires, ainsi que dans la prévention du rejet de greffe d'organe.

Ainsi, l'AZA est utilisée dans la prévention du rejet de greffe, en association avec des corticostéroïdes ou d'autres agents immunosuppresseurs. Elle est également prescrite dans les formes sévères de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques et auto-immunes, comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) chez les patients intolérants aux corticoïdes ou corticodépendants, ou dont la réponse thérapeutique est insuffisante malgré l'utilisation de doses élevées de corticoïdes.

Tableau 3. Indications des médicaments thiopuriniques (d'après Sahasranaman *et al.*, 2008).

Indications	Références
Leucémie Aiguë Lymphoblastique de l'enfant	Gottlieb *et al.*, 1984 ; Veerman *et al.*, 1996.
Leucémie Aiguë Non Lymphocytaire de l'adulte	Lennon, 1989.
Leucémie Aiguë Lymphocytaire de l'adulte	Anonymous, 1993.
Leucémie Aiguë Myéloïde de l'enfant	Paton *et al.*, 1982 ; Holleb *et al.*, 1991.
Lymphome Non Hodgkinien de l'enfant	Wollner *et al.*, 1976 ; Wollner *et al.*, 1979.
Maladie de Crohn	Pearson *et al.*, 1995.
Transplantation d'organes	Bean, 1962 ; Kirk et Lennard-Jones, 1982 ; Mahadevan *et al.*, 2000.
Colite ulcéreuse	Ponticelli *et al.*, 1999.
Hépatite Auto-Immune	Pratt *et al.*, 1996.
Polyarthrite Rhumatoïde	Heurkens *et al.*, 1991.
Lupus Erythémateux Disséminé	Abu-Shakra et Shoenfeld, 2001.
Psoriasis	Silvis et Levine, 1999.
Eczéma atopique sévère de l'enfant	Murphy et Atherton, 2003.
Maladies Inflammatoires Chroniques de l'intestin	Teml *et al.*, 2007a.

La 6-MP, quant à elle, est indiquée en première intention dans la prise en charge des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), notamment en phase de consolidation, en association avec le cyclophosphamide et la cytarabine, et en phase d'entretien, associée au méthotrexate. La 6-MP est également indiquée comme traitement de deuxième intention dans la prise en charge des leucémies aiguës myéloblastiques (LAM), en phase d'entretien, associée au méthotrexate. Elle constitue également l'un des traitements à visée palliative des leucémies myéloïdes chroniques (LMC).

Enfin, la 6-TG est indiquée dans la prise en charge des LAM, en phase d'induction et de consolidation de la rémission.

L'ensemble des indications thérapeutiques des thiopurines est résumé dans le **Tableau 3**.

2. Mécanismes d'action.

Les médicaments thiopuriniques sont des antimétabolites, analogues des bases puriques, qui interviennent au niveau de la biosynthèse des purines en inhibant le processus métabolique. Leurs propriétés cytotoxiques et immunosuppressives découlent de l'incorporation de la 6-thioguanosine triphosphate (6-TGTP) et de sa forme désoxy (6-dTGTP) à la place des bases puriques dans les chaînes d'ADN ou d'ARN (Tidd et Paterson, 1974 ; Coulthard *et al.*, 2002; Neurath *et al*., 2005; Roblin *et al*., 2005), et de l'inhibition de la synthèse des purines (Karran et Attard, 2008). Toutes les sous-populations de cellules lymphocytaires sont des cibles des thiopurines et ceci plus particulièrement au moment de la différenciation induite par les antigènes, ce qui leur confère un rôle inhibiteur potentiel de l'immunité à médiation cellulaire. Ces médicaments agiraient de façon préférentielle sur les réponses immunitaires thymo-dépendantes. Conformément à cette idée, il a été démontré que l'AZA peut également induire l'apoptose des lymphocytes T CD4+ stimulés via le CD28 par un mécanisme d'action impliquant une inhibition spécifique de la voie de signalisation RAC1 (Tiede *et al.*, 2003). En effet, en se liant de façon spécifique avec une très forte affinité à la protéine RAC1 en lieu et place de son co-activateur endogène, le GTP, la 6-TGTP inhibe l'effet anti-apoptotique initial de RAC1-GTP, et est donc à l'origine d'un processus d'apoptose (Tiede *et al*., 2003).
Enfin, selon Thomas *et al.* (2005), l'AZA et la 6-MP exerceraient également leurs propriétés antiprolifératives sur les lymphocytes T par inhibition de l'expression de certains gènes

codant pour des protéines à fonction immunitaire et anti-inflammatoire, comme l'alpha-intégrine, le TNFRSF7 (*tumor necrosis factor receptor super family member 7*) et le TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*).

Au total, les thiopurines ont donc des sites d'action multiples au sein de la cellule : elles peuvent inhiber la synthèse de l'ADN et de l'ARN à une étape précoce de la synthèse des purines et peuvent également être incorporées dans les acides nucléiques. Elles sont de ce fait responsables de cassures chromosomiques, ainsi que de l'apparition de formes particulières fonctionnellement imparfaites d'acides nucléiques. Les thiopurines entraînent également l'apoptose des lymphocytes T. Il découle de tous ces mécanismes une lymphopénie touchant les lignées B et T.

3. Pharmacocinétique

Absorption

L'AZA administrée par voie orale est rapidement absorbée et atteint un taux plasmatique maximal 2 heures après la prise. Sa biodisponibilité absolue est inférieure à 50 %. La biodisponibilité de la 6-MP est quant à elle de 16 % en moyenne et présente d'importantes variations inter-individuelles, qui pourraient être expliquées par un effet de premier passage hépatique. Sa concentration plasmatique maximale est atteinte, en moyenne, en 2,2 heures. Les études concernant la 6-TG montrent que son pic plasmatique est atteint environ 8 à 10 heures après son administration orale.

Distribution

La distribution tissulaire des médicaments thiopuriniques n'a pas été évaluée avec précision chez l'homme, mais des études menées chez la souris avec de l'AZA radiomarquée ont permis de montrer une répartition relativement uniforme du produit dans tous les tissus. Le taux de liaison aux protéines plasmatiques est d'environ 30 %. Le passage dans le liquide céphalo-rachidien est faible. Par contre, les médicaments thiopuriniques et leurs métabolites traversent la barrière placentaire. La 6-MP, métabolite de l'AZA, a été détectée dans le lait de patientes

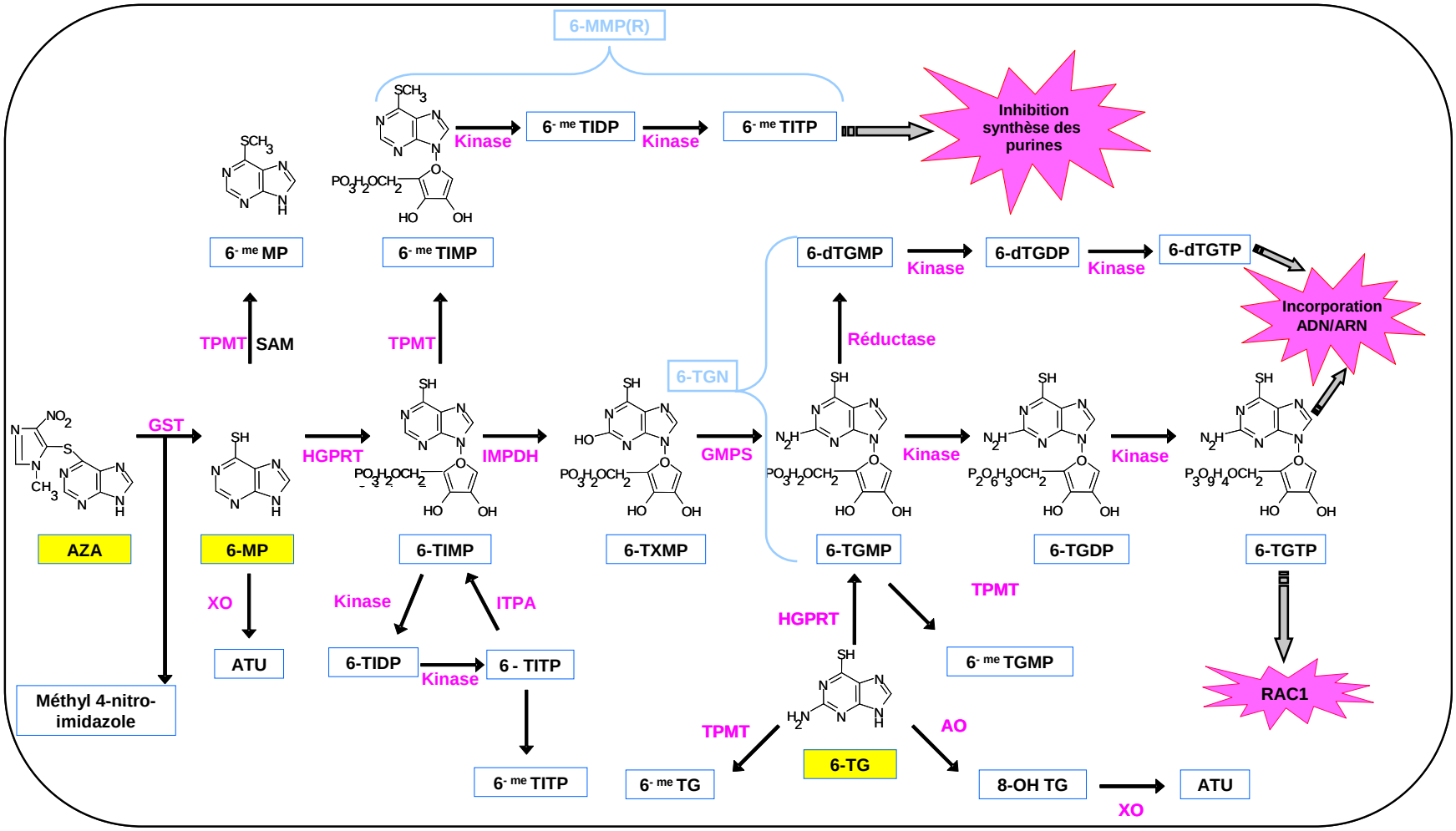

Figure 3. Métabolisme des médicaments thiopuriniques. AZA = azathioprine ; 6-MP = 6-mercaptopurine ; 6-TIMP = 6-thioinosine monophosphate ; 6-TXMP = 6-thioxanthosine 5'monophosphate ; 6-TGMP = 6-thioguanosine monophosphate ; 6-TGDP = 6-thioguanosine diphosphate ; 6-TGTP = thioguanosine triphosphate ; 6-^{me}MP = 6-méthylmercaptopurine ; 6-^{me}TIMP = 6-méthylthioinosine monophosphate ; 6-^{me}TIDP = 6-méthylthioinosine diphosphate ; 6-^{me}TITP = 6-méthylthioinosine triphosphate ; ATU = acide thiourique ; 6-TIDP = 6-thioinosine diphosphate ; 6-TITP = 6-thioinosine triphosphate ; 6-dTGMP = désoxythioguanosine monophosphate ; 6-dTGDP = désoxythioguanosine diphosphate ; 6-dTGTP = désoxythioguanosine triphosphate ; 6-^{me}TGMP = 6-méthylthioguanosine monophosphate ; 6-TG = 6-thioguanine ; 6-^{me}TG = 6-méthylthioguanine ; 8-OH TG = 8-hydroxythioguanine ; TPMT = thiopurine *S*-méthyltransférase ; HGPRT = Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase ; XO = xanthine oxydase ; ITPA = inosine triphosphate pyrophosphatase ; IMPDH = inosine monophosphate déshydrogénase ; GMPS = Guanosine monophosphate synthétase ; AO = aldéhyde oxydase ; SAM = *S*-adénosyl *L*-méthionine ; 6-TGN : 6-thioguanine nucléotides ; 6-MMP(R): 6-méthylmercaptopurine ribonucléotides.

traitées par l'AZA. A ce jour, aucune étude n'a démontré le passage de la 6-TG ou de ses métabolites dans le lait maternel.

Métabolisme et élimination

L'AZA, la 6-MP et la 6-TG sont administrées sous forme de prodrogues.
L'AZA est rapidement transformée en 6-MP dans l'organisme par un processus longtemps considéré comme non enzymatique impliquant le glutathion (Elion, 1967). Il est actuellement admis que cette première étape est enzymatique et assurée par une ou plusieurs Gluthation-*S*-Transférase(s) (GST) (Eklund *et al*., 2006; Kurtovic *et al.*, 2008).

La 6-MP est elle-même métabolisée selon trois voies enzymatiques compétitives **(Figure 3)**.
La première voie fait intervenir la xanthine oxydase (XO) et conduit à l'acide thiourique (ATU), métabolite inactif qui sera excrété dans les urines.

La seconde voie, sous la dépendance de la TPMT, permet la conversion de la 6-MP en 6-méthylmercaptopurine (6-^{me}MP), un métabolite inactif, en utilisant la *S*-adénosyl *L*-méthionine (SAM) comme donneur de méthyle.

La troisième voie, sous la dépendance initiale de l'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT), conduit, après plusieurs transformations enzymatiques, à la formation des 6-thioguanosine nucléotides (6-TGN), métabolites actifs de l'AZA. La 6-MP, sous l'action de l'HGPRT, est d'abord convertie en 6-thioinosine monophosphate (6-TIMP), puis en 6-thioxanthine monophosphate (6-TXMP), elle-même métabolisée en 6-thioguanosine monophosphate (6-TGMP). La transformation du 6-TIMP en 6-TGMP fait intervenir l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), puis la guanosine monophosphate synthétase (GMPS). La 6-TGMP est à l'origine de la formation, *via* l'intervention de kinases et de réductases, des nucléotides pharmacologiquement actifs (ou 6-TGN) que sont la 6-thioguanosine triphosphate (6-TGTP) et sa forme désoxy (6-dTGTP). La 6-TIMP est également substrat de la TPMT, qui la transforme en 6-méthyl-thioinosine monophosphate ou 6-^{me}TIMP, elle-même convertie *via* des kinases en 6-méthyl-thioinosine diphosphate (6-^{me}TIDP), puis triphosphate (6-^{me}TITP), puissant inhibiteur de la synthèse des purines, contribuant ainsi à l'effet cytotoxique de la 6-MP par un mécanisme différent de

celui des 6-TGN (Tay *et al.*, 1969; Dervieux *et al.*, 2001a ; Coulthard *et al.*, 2002). Les métabolites 6-^{me}TIMP, 6-^{me}TIDP et 6-^{me}TITP sont désignés collectivement sous le terme 6-MMP(R) (6-Méthyl Mercaptopurine Ribonucléotides).
La 6-TIMP peut également être prise en charge par une kinase pour aboutir à la formation de 6-TIDP, puis 6-TITP, qui peut lui-même être ensuite déphosphorylé en 6-TIMP par l'inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA) (Marinaki *et al.*, 2004).

La suite du manuscrit explicitera dans quelle mesure un déficit enzymatique en TPMT est capable d'entraîner une déviation du métabolisme de l'AZA vers la voie de l'HGPRT, augmentant ainsi la concentration des 6-TGN, dont l'accumulation est responsable d'accidents hématologiques. Inversement, plus l'activité TPMT est élevée, plus la concentration en 6-TGN diminue, expliquant certains cas de résistance au traitement (Neurath *et al.*, 2005 ; Roblin *et al.*, 2005).

La 6-TG est également métabolisée par trois voies métaboliques distinctes.
La voie de l'HGPRT la transforme directement en 6-TGMP et donc en 6-TGN. Ainsi, du fait de l'absence de formation de 6^{-me}TIMP, la 6-TG n'exerce son effet cytotoxique que *via* l'incorporation des thionucléotides dans les acides nucléiques et *via* son action sur la protéine RAC1. La conversion de 6-TG en 6-TGN s'affranchit donc de nombreuses étapes limitantes dans le métabolisme de l'AZA et de la 6-MP (Lennard *et al.*, 1993 ; Vora *et al.*, 2006). Les 6-TGN subissent par la suite une désamination par la guanase ou guanine désaminase, qui les métabolise en 6-thioxanthine. Ce métabolite inactif subit par la suite l'action de la xanthine oxydase pour donner l'ATU.
La voie de la TPMT conduit à la formation de 6-méthylthioguanosine (6-^{me}TG) dont l'effet pharmacologique est à ce jour encore inconnu.
Enfin, la voie de l'aldéhyde oxydase la convertit en 8-hydroxythioguanine, elle-même transformée en acide thiourique par la xanthine oxydase.

4. Effets secondaires

Les thiopurines sont associées à deux types d'effets indésirables plus ou moins sévères (Sahasranaman *et al.*, 2008), d'une part, des réactions indépendantes de la dose, qui surviennent dans les premières semaines suivant l'instauration du traitement, et d'autre part, des réactions dose-dépendantes, liées à la concentration intracellulaire des métabolites actifs et qui peuvent se développer des mois, voire des années, après le début du traitement.

Parmi ces effets indésirables, les plus graves et les plus fréquents sont la myélosupression, aboutissant parfois à une aplasie médullaire, et la pancréatite aiguë. La myélosuppression survient, selon les auteurs, chez 1,4 à 10 % des patients traités par des doses conventionnelles de thiopurines (Connell *et al.*, 1993; Lennard, 2002). Une méta-analyse, publiée très récemment et incluant 66 études portant sur plus de 8000 patients traités par l'AZA ou la 6-MP pour une MICI, rapporte une incidence de la myélotoxicité d'environ 3 % par patient et par année de traitement (Gisbert et Gomollón, 2008). La pancréatite aiguë concerne entre 2 et 3,3 % des patients (Sandborn *et al.*, 2000; Timmer *et al.*, 2007). De plus, Present *et al.*, (1989) rapportent environ 2 % de réactions allergiques et 0,3 % d'hépatites, dans une large population de patients atteints de MICI, traités par l'AZA et suivis sur une période de cinq ans.
L'origine et les mécanismes, suspectés ou démontrés, de ces effets indésirables seront détaillés dans le chapitre concernant la pharmacogénétique des thiopurines.

5. Interactions médicamenteuses

Liées à l'effet immunosuppresseur

Pour tous les médicaments thiopuriniques, l'association au vaccin contre la fièvre jaune est formellement contre-indiquée, en raison du risque de survenue de maladie vaccinale généralisée potentiellement mortelle. Pour la même raison, toute association avec des vaccins vivants atténués est déconseillée.

Pour les trois molécules, l'association à d'autres médicaments immunosuppresseurs est à prendre en compte, en raison du risque d'immunodépression excessive, avec risque de syndrome lympho-prolifératif.

Interaction d'ordre pharmacodynamique

Pour la 6-TG, l'association au busulfan est contre-indiquée, car elle entraîne une aggravation des effets indésirables pulmonaires de ce médicament anticancéreux, ainsi qu'une toxicité hépatique sévère (hypertension portale, varices oesophagiennes).

Interactions d'ordre pharmacocinétique

L'allopurinol, un inhibiteur de la xanthine oxydase, risque d'entraîner une majoration des effets immunosuppresseurs de l'AZA et de la 6-MP, à l'origine d'une insuffisance médullaire potentiellement grave. La 6-TG, quant à elle, peut être administrée à posologie habituelle, lorsqu'on l'utilise conjointement à l'allopurinol.

Dans la mesure où les thiopurines entraînent une diminution de l'absorption digestive de la phénytoïne, leur association avec ce médicament anti-convulsivant augmente le risque comitial. En cas d'association de ces deux thérapeutiques, il est fortement conseillé d'associer momentanément une benzodiazépine anti-convulsivante.

Les anticoagulants antivitamine K oraux (AVK) voient leur métabolisme hépatique augmenté en cas d'association avec l'AZA ou la 6-MP, ce qui a pour conséquence une diminution de leur effet. Il est donc recommandé de contrôler dans ce cas, plus fréquemment, le bilan de coagulation du patient et d'adapter la posologie de l'AVK lors de la mise en route du traitement par l'immunosuppresseur et après son arrêt.

Les dérivés de l'acide aminosalicylique (ASA), qui inhibent la TPMT, risquent de majorer l'effet myélosuppresseur des thiopurines. Ce type d'interaction médicamenteuse a été observé chez des patients atteints de maladie de Crohn, traités avec de l'AZA ou de la 6-MP en

association avec de la 5-ASA ou de la sulfasalazine, avec augmentation de l'incidence des leucopénies dans les 8 semaines après le début du traitement (Lowry *et al*., 2001).

6. Effets sur la reproduction

Fertilité

Une diminution temporaire de la spermatogenèse, ainsi qu'une réduction de la viabilité et du nombre des spermatozoïdes, ont été rapportées chez des souris qui recevaient de l'AZA (à des doses correspondant à 10 fois la dose thérapeutique chez l'homme). Chez l'homme, une oligospermie rare a été rapportée.

Grossesse

L'AZA est tératogène chez l'animal, des malformations du squelette et des organes ayant été décrites chez des nouveaux-nés de lapines et de souris traitées par des doses équivalentes à celles administrées chez l'homme.

Concernant l'administration chez la femme enceinte, des centaines d'observations de grossesses exposées semblent écarter, à ce jour, l'hypothèse d'un risque malformatif de l'AZA sur le foetus. Cependant, une leucopénie et/ou thrombocytopénie ont été rapportées chez des nouveaux-nés dont les mères avaient été traitées par l'AZA en cours de grossesse. Par ailleurs, des cas de naissances prématurées et de faibles poids à la naissance ont été signalés suite à une exposition de la mère à l'AZA. Des observations semblables ont été effectuées lors de l'utilisation de la 6-MP et de la 6-TG au cours de la grossesse. Des cas d'avortements spontanés en lien avec une exposition de la mère ou du père aux médicaments thiopuriniques ont également été décrits.

En conséquence, aucun essai adéquat et bien contrôlé n'ayant été effectué pendant la grossesse, les thiopurines ne doivent pas être administrées aux femmes enceintes ou susceptibles de le devenir sans que les risques et les avantages du traitement n'aient été soigneusement évalués. Cependant, en cas de découverte d'une grossesse fortuite, cet élément ne constitue pas un argument suffisant pour conseiller une interruption de grossesse, mais conduit à une attitude de prudence, avec notamment, si cela est possible, une diminution de la

posologie maternelle et une surveillance prénatale rigoureuse, en particulier sur le plan hématologique.

Allaitement

L'administration d'AZA et de 6-MP chez les femmes qui allaitent n'est pas recommandée puisque ces molécules passent, à de faibles concentrations, dans le placenta et dans le lait maternel. En ce qui concerne la 6-TG, on ignore encore si elle est excrétée dans le lait maternel. Etant donné le risque cancérigène associé aux thiopurines, il faudra faire un choix entre l'interruption de l'allaitement ou le retrait du médicament.

7. Suivi thérapeutique pharmacologique (STP)

Le STP ou dosage des médicaments consiste à suivre la concentration plasmatique d'un médicament ou de ses métabolites afin de la maintenir dans un intervalle thérapeutique pré-établi, encore appelé fenêtre thérapeutique. Le principal objectif de cette approche est d'individualiser et d'optimiser les posologies prescrites dans le but d'améliorer l'efficacité thérapeutique et de prévenir la toxicité. Le STP est particulièrement adapté aux médicaments présentant une fenêtre thérapeutique étroite, pour lesquels il existe une relation concentration/effet bien démontrée et une variabilité individuelle importante des concentrations plasmatiques pour une même dose administrée. Le STP a été proposé dès les années 1970 pour un certain nombre de médicaments répondant aux critères ci-dessus, comme par exemple la digoxine, le lithium, les aminosides, certains antiépileptiques, et plus récemment certains immunosuppresseurs dont la ciclosporine et le tacrolimus (Molina, 2003).

Dans le cadre d'un traitement par thiopurines, le suivi thérapeutique consiste en la mesure dans les globules rouges (GR) des concentrations de leurs métabolites actifs, les 6-TGN. Lorsqu'il s'agit d'un traitement par AZA ou 6-MP, un suivi de la concentration intra-érythrocytaire des 6-MMP(R) peut également être réalisé.

Dosage des 6-TGN

Il a été démontré que les concentrations en 6-TGN dans les érythrocytes sont corrélées à celles des 6-TGN incorporés à l'ADN leucocytaire (Cuffari *et al.*, 1996a; Bergan et *al.*, 1997a). Ainsi, leur dosage en routine a été proposé comme marqueur préférentiel pour estimer l'efficacité du traitement par AZA ou 6-MP. Tandis que de trop fortes concentrations sont associées à une augmentation du risque de myélosuppression et de ses conséquences, parfois fatales, de faibles concentrations sont associées à une diminution de l'efficacité thérapeutique.
Les méthodes de dosage sont des méthodes chromatographiques, et de nombreux protocoles ont été proposés, les plus couramment utilisés étant ceux de Lennard (1987) et de Dervieux et Boulieu (1998). Il existe une bonne corrélation entre ces deux méthodes, mais, en raison de protocoles différents pour la préparation des échantillons, la concentration en 6-TGN obtenue est 2,6 fois supérieure avec la méthode de Dervieux et Boulieu (Shipkova *et al.*, 2003).

A ce jour, l'existence d'un taux efficace de 6-TGN reste encore débattu (Roblin *et al.*, 2005). Trois études ont pourtant déterminé des seuils d'efficacité des 6-TGN, à 235 pmol/8.10^8 globules rouges (GR) (Dubinsky *et al.*, 2000), 250 pmol/8.10^8 GR (Cuffari *et al.*, 1996b) et 292 pmol/8.10^8 GR (Cuffari *et al.*, 2004). À l'inverse, les études de Lowry *et al.* (2001) et Bellaiche *et al.*, (2001) n'ont pas permis de retenir de seuil d'efficacité des 6-TGN. Malgré ces discordances, toutes les études montrent que ce dosage est utile, soit en cas d'inefficacité de l'AZA (recherche d'une non-observance ou suspicion d'une activité TPMT élevée) (Bonaz, 2002), soit en cas d'effets secondaires hématologiques (recherche de taux élevé de 6-TGN) (Roblin *et al.*, 2004).

Dosage des 6-MMP(R)

Le dosage des 6-MMP(R), quant à lui, est surtout utilisé dans le but de prévenir la survenue d'une toxicité hépatique, qui peut-être parfois observée au cours du traitement par AZA ou 6-MP. En 2000, Dubinsky *et al.*, ont ainsi estimé que le risque de survenue d'une hépatotoxicité lors d'un traitement par AZA ou 6-MP chez des patients atteints de MICI est multiplié par trois lorsque le taux de 6-MMP(R) est supérieur à 5700 pmol/8.10^8 GR, taux mesuré par HPLC (méthode décrite par Cuffari *et al.*, 1996b). Ainsi, lorsque ce seuil est atteint, il semble

Tableau 4. **Interprétation des dosages des métabolites 6-TGN, 6-MMP(R) et du *ratio* 6-MMP(R)/6-TGN chez les patients atteints de MICI et traités par AZA ou 6-MP** (d'après Al Hadithy *et al*., 2005 ; Derijks *et al*., 2006).

	6-TGN (pmol/8.10^{8} GR)	6-MMP(R) (pmol/8.10.^{8} GR)	6-MMP(R) /6-TGN
Zone thérapeutique atteinte	230 - 450	< 5700	5 - 25
Non-observance	<< 230	<< 5700	5 - 25
Sous-dosage	< 230	< 5700	5 - 25
Myélotoxicité probable (absence d'activité de la TMPT)	>> 450	<< 5700	0
Myélotoxicité potentielle (activité faible de la TMPT)	> 450	< 5700	0
Hépatotoxicité potentielle (activité élevée de la TPMT)	< 230 - 450	> 5700	30 - 100
Hépatotoxicité probable (activité très élevée de la TMPT)	<< 230	>> 5700	>> 100

6-TGN, 6-thioguanosine nucléotides; 6-MMP(R), 6-méthylmercaptopurine ribonucléotides; pmol, picomoles; GR, globules rouges.

nécessaire de réduire les doses de thiopurines pour éviter une souffrance hépatique. Cependant, ces résultats restent controversés et d'autres équipes recommandent, même si le taux de 6-MMP(R) est supérieur à 5700 pmol/8.10^8 GR, de ne pas réduire les posologies tant que le bilan hépatique reste normal (Siegel et Sands, 2005).

Recommandations

La fréquence du suivi thérapeutique recommandé par *Cigna Healthcare Coverage Position* 2008 (http://www.cigna.com/customer_care/healthcare_professional/coverage_positions/medical/mm_0016_coveragepositioncriteria_monitoring_thiopurine_levels_in_ibd.pdf) pour tous les patients traités par AZA ou 6-MP est le suivant :

- à 2, 4 et 8 semaines après l'initiation du traitement, **ET**

- tous les 3 mois par la suite, **OU**
- 15 jours après un ajustement de posologie, sauf si survenue de symptômes liés à une toxicité.

Les dosages suivants ont été associés à un échec thérapeutique :
- 6-TGN < 230 pmol/8.10^8 GR, **OU**
- 6-MMP(R) < 5700 pmol/8.10^8 GR.

Le **Tableau 4** est un résumé des seuils de concentrations en 6-TGN, 6-MMP(R) et de leur *ratio* (6-MMP(R)/6-TGN), à partir desquels un risque d'inefficacité thérapeutique, éventuellement liée à une non-observance, est à envisager. De même, il propose des seuils de surdosage en 6-TGN, en 6-MMP(R), ainsi que les *ratio* (6-MMP(R)/6-TGN), à partir desquels une hémato- ou une hépatotoxicité sont à craindre.

Suivi thérapeutique lors d'un traitement par 6-thioguanine

Le taux de 6-TGN intra-érythrocytaire augmente très vite sous Lanvis®, à la posologie de 20 mg/j, à des taux en moyenne quatre à six foix supérieurs aux taux dits thérapeutiques déterminés sous AZA/6-MP (Dubinsky *et al.*, 2003a ; Herrlinger *et al.*, 2004), et sans que ces taux élevés n'entraînent plus d'effets indésirables, notamment hématologiques (Bonaz, 2002). Actuellement, le taux thérapeutique optimal des 6-TGN lors d'un traitement par 6-TG n'est pas déterminé, et, à ce jour, son intérêt réside dans la vérification de l'observance du traitement (de Boer *et al*., 2006).

PHARMACOGENETIQUE DES THIOPURINES

PHARMACOGENETIQUE DES THIOPURINES

Les médicaments thiopuriniques ont une marge thérapeutique relativement étroite, et peuvent être à l'origine d'une toxicité sévère susceptible de mettre en jeu le pronostic vital. Le plus souvent, le risque est lié à une myélosuppression excessive, due à l'accumulation dans les tissus hématopoïétiques des métabolites actifs cytotoxiques de ces molécules, les 6-TGN. D'autres effets indésirables, parmi lesquels une atteinte hépatique parfois sévère ou une pancréatite aiguë, peuvent nécessiter l'interruption du traitement.

Dans ce chapitre, après avoir rappelé les différentes anomalies de réponse pouvant survenir au décours d'un traitement par thiopurines, nous décrirons les différents phénomènes pharmacogénétiques, suspectés ou démontrés être à l'origine d'une variation de la prise en charge cellulaire des thiopurines, et, par conséquent, de la variabilité de réponse à ces médicaments. Nous présenterons tout d'abord les données disponibles sur la TPMT, dont la variabilité d'activité inter-individuelle est désormais établie comme étant une cause majeure de variation de la réponse au traitement par thiopurines. En effet, il est démontré qu'un déficit enzymatique en TPMT entraîne une déviation du métabolisme de l'AZA vers la voie HGPRT, augmentant ainsi la concentration des métabolites actifs, les 6-TGN, dont l'accumulation est responsable d'accidents hématologiques. Inversement, plus l'activité TPMT est élevée, plus la concentration en 6-TGN diminue, expliquant la résistance au traitement (Roblin, 2005; Neurath *et al*., 2005). Toutefois, un peu moins de 30 % des patients atteints de MICI ayant présenté une leucopénie sous AZA sont déficitaires en TPMT, et moins de 10 % de ceux présentant une résistance au traitement ont une activité TPMT élevée (Colombel *et al*., 2000). Ces observations suggèrent fortement l'implication d'autres facteurs, c'est pourquoi, dans un second temps, nous présenterons d'autres gènes candidats, codant pour des enzymes et des transporteurs, pour lesquels sont émis des arguments en faveur d'un rôle dans la variabilité de réponse aux thiopurines, mais qui actuellement ne font encore l'objet d'aucun consensus.

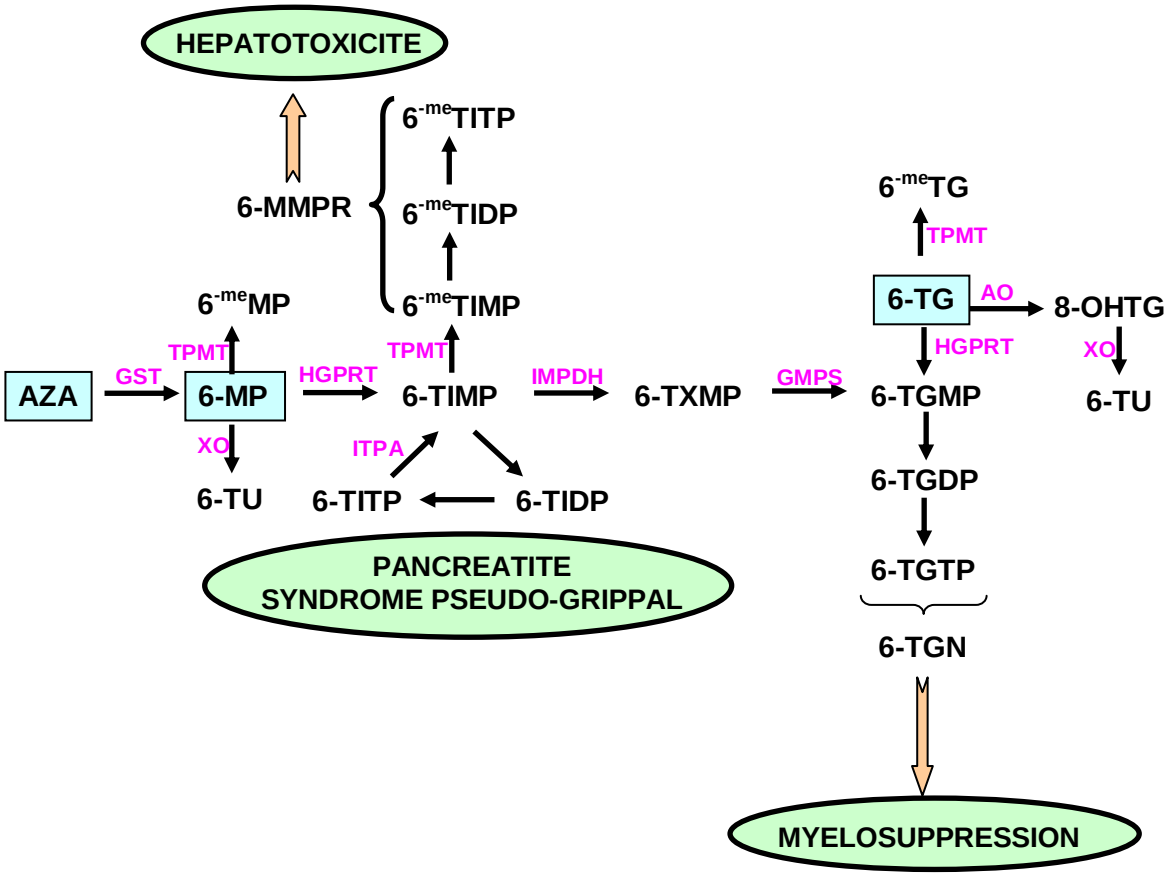

Figure 4. **Effets indésirables des thiopurines, place du métabolisme.** L'ensemble des abréviations retrouvées sur cette figure est détaillées dans la figure 3 (d'après Al Hadithy *et al.*, 2005).

I. ANOMALIES DE REPONSE AUX THIOPURINES

Selon les études, des effets indésirables, plus ou moins sévères, sont observés chez 15 à 28 % des patients traités par AZA ou 6-MP (Ansari *et al*., 2002; Schwab *et al*., 2002; Marinaki *et al*., 2004). De plus, on constate qu'environ 9 % des patients atteints de MICI sont résistants aux thiopurines (Dubinsky *et al.*, 2002). Ces variations inter-individuelles dans la réponse au traitement sont, à ce jour, le plus souvent associées à des différences dans la métabolisation de ces composés **(Figure 4)**.

A. EFFETS INDESIRABLES

L'**intolérance gastro-intestinale** aux médicaments thiopuriniques est variable et se manifeste le plus souvent par des nausées et de l'anorexie, parfois accompagnées de vomissements. Dans certains cas, ce phénomène semble être lié à la dose et, après une courte interruption, l'administration peut souvent reprendre avec succès à une dose plus faible.

Une **hyperuricémie** et/ou une **hyperuricosurie** peut survenir, en raison de la lyse cellulaire rapide qui accompagne l'effet antinéoplasique. Pour éviter la survenue de néphropathie liée à l'hyperuricémie, il faut assurer une augmentation de l'hydratation, une alcalinisation des urines et éventuellement administrer en prophylaxie un inhibiteur de la xanthine oxydase, tel que l'allopurinol, en tenant compte du fait qu'il entraînera une augmentation de l'effet immunosuppresseur de l'AZA et de la 6-MP.

Les **réactions d'hypersensibilité** se manifestent au cours du premier mois de traitement dans la majorité des cas et se traduisent habituellement par de la fièvre, associée le plus souvent et de manière variable à des vertiges, arthralgies, frissons, myalgies, éruption cutanée, pancréatite, hépatite, troubles du rythme, pneumopathie, hypotension et altération de la fonction rénale. Les réactions d'hypersensibilité peuvent être croisées entre la 6-MP, l'AZA et la 6-TG. Récemment, Marinaki *et al.*, (2004) ont montré une corrélation positive significative entre le déficit en ITPA déterminé par génotypage et ce type d'effets indésirables de l'AZA chez des patients atteints de maladie de Crohn.

La réticence de certains cliniciens à prescrire l'AZA ou la 6-MP est liée au risque d'apparition d'**affections malignes**, en particulier de cancers cutanés, de lymphomes ou de cancers du col de l'utérus. Cependant, en raison de leur utilisation en association à d'autres thérapeutiques, leur rôle oncogène propre reste discuté. Toutefois, même s'il est difficile d'affirmer que les cas décrits sont imputables au traitement, cette possibilité existe et doit être prise en compte pour décider du traitement. De plus, un déficit d'activité TPMT pourrait jouer un rôle dans l'apparition de cancers secondaires chimio-induits chez les enfants traités pour une LAL. C'est ce que suggère la survenue tardive de leucémies myéloïdes aiguës ou de syndromes myélodysplasiques, chez des enfants à activité TPMT nulle ou intermédiaire, traités par une chimiothérapie incluant de la 6-MP et de l'etoposide (Relling *et al.*, 1998 ; Bo *et al.*, 1999). Avec la 6-TG, le risque de survenue de lymphomes semble également possible, mais est cependant moins connu, ou en tout cas moins fréquemment rapporté, qu'avec l'AZA ou la 6-MP.

Le développement de tumeurs malignes cérébrales a également été observé chez des enfants leucémiques traités simultanément par de la 6-MP et par radiothérapie (Neglia *et al.*, 1991; Relling *et al.*, 1999b). L'augmentation de l'incidence des tumeurs chez ces sujets serait liée à la diminution de la formation, par la TPMT, des métabolites méthylés inhibiteurs de la voie de synthèse des purines, au profit de l'incorporation des dérivés 6-TGN dans l'ADN et des conséquences chromosomiques qui en découlent (Bo *et al.*, 1999 ; Dervieux *et al.*, 2001b).

La **toxicité hépatique** de l'AZA ou de la 6-MP est rare (elle survient dans environ 1 % des cas) et peut s'exprimer sous forme d'une hépatite cytolytique, d'une péliose ou d'une hyperplasie nodulaire régénérative (HNR), justifiant une surveillance du bilan hépatique. L'évaluation périodique (avant le traitement, tous les mois pendant le premier trimestre, puis tous les trois mois) des transaminases sériques, de la phosphatase alcaline et de la bilirubine est indiquée pour un dépistage précoce de l'hépatotoxicité. Si une perturbation modérée du bilan hépatique se manifeste, le traitement peut être poursuivi, mais une réduction de la posologie est nécessaire. Toutefois, si l'état clinique du patient laisse entrevoir la possibilité d'une maladie veino-occlusive du foie, le traitement devra être interrompu. Cette toxicité hépatique de l'AZA et de la 6-MP semble liée à une accumulation des 6-MMP(R). Ainsi, il a par exemple été montré que des enfants et adolescents atteints de MICI traités par AZA ou 6-MP ont un risque trois fois plus élevé de développer une hépatotoxicité si leur taux de 6-MMP est supérieur à 5700 pmol/8.10^8 GR (Dubinsky *et al.*, 2000 et 2002). Une étude plus récente a même mis en évidence une corrélation étroite entre les concentrations de 6-MMP et

celles des transaminases chez des enfants atteints de LAL et traités par 6-MP (Nygaard *et al.*, 2004). Cette hépatotoxicité pourrait également être liée à l'attaque mitochondriale par des radicaux libres superoxydes générés par la xanthine oxydase (Tapner *et al.*, 2004 ; Menor *et al.*, 2004). Ainsi, certains auteurs proposent l'association d'allopurinol au traitement par AZA ou 6-MP, dont les doses seront réduites, afin d'inhiber la production de ces espèces réactives de l'oxygène (Ansari *et al.*, 2008). En 2001, Lee et Farrel ont émis une autre hypothèse, selon laquelle, lors d'un surdosage en AZA, la déplétion en glutathion, liée à sa consommation lors de la transformation de l'AZA en 6-MP, pourrait entraîner une hépatotoxicité.

La 6-TG présente, quant à elle, un risque très élevé de toxicité hépatique, qui se présente sous la forme d'un syndrome clinique de maladie veino-occlusive (hyperbilirubinémie, hépatomégalie sensible, ascite) ou s'accompagne de signes d'hypertension portale (splénomégalie, thrombocytopénie et varices oesophagiennes). Les caractéristiques histopathologiques associées à cette toxicité comprennent la sclérose hépatoportale, l'hyperplasie nodulaire régénérative, la péliose hépatique et la fibrose périportale. En cas d'apparition de ces symptômes, le traitement doit être interrompu immédiatement. Le mécanisme par lequel survient cet effet indésirable sévère est à ce jour encore peu connu. Récemment, l'hypothèse selon laquelle le 6^{-me}TGMP, métabolite majeur de la 6-TG, serait à l'origine de la maladie veino-occlusive a été évoquée (Duley et Florin, 2005).

Chez les patients atteints de MICI, l'administration de 6-TG est à l'origine d'une hyperplasie nodulaire régénérative beaucoup plus fréquente que lors de traitements par AZA ou 6-MP. En effet, cet effet indésirable, rencontré chez environ 1 à 2 % des patients traités par AZA ou 6-MP, présente une fréquence qui varie, selon les études, de 27 à 62 % chez les patients traités par 6-TG (Teml *et al.*, 2007b). La survenue d'une HNR semble dose-dépendante et l'administration de 6-TG à de faibles posologies, même sur une longue période, semble prévenir ce type d'hépatotoxicité (Gilissen *et al.*, 2007 ; de Boer *et al.*, 2008).

L'**atteinte hématologique**, dose dépendante et réversible à l'arrêt du traitement, peut entraîner leucopénie, thrombopénie, anémie, macrocytose, mégaloblastose et hypoplasie médullaire. Des infections, notamment en cas d'association avec des corticostéroïdes, ont été observées, conséquences de la granulocytopénie et de la thrombocytopénie. Une surveillance hebdomadaire de l'hémogramme durant le premier mois est nécessaire pour détecter une cytopénie précoce et sévère. Des accidents tardifs sévères restent possibles et justifient une surveillance régulière (tous les mois, puis tous les 3 mois) tout au long du traitement. Celui-ci doit être interrompu, ou les posologies réduites, dès les premiers signes de dépression

médullaire. L'accumulation des 6-TGN est en grande partie responsable de l'exacerbation des effets hématotoxiques. Les facteurs intervenant dans cette surproduction de métabolites actifs sont multiples. On peut citer le cas des patients ayant une activité TPMT déficitaire, qui, théoriquement dans 100 % des cas, présenteront une myélosuppression sévère quelques semaines après l'instauration d'un traitement à des doses usuelles d'AZA ou de 6-MP. Chez ces patients, les concentrations de 6-TGN dans les érythrocytes sont 8 à 15 fois supérieures à celles mesurées chez les individus à activité TPMT élevée (Lennard *et al.*, 1987). Par ailleurs, cette myélosuppression peut être provoquée par l'administration concomitante d'autres médicaments, comme des inhibiteurs de la xanthine oxydase (allopurinol), ou par la survenue d'infections virales (par exemple cytomégalovirus, parvovirus B19) (Colombel *et al.*, 2000). Enfin, d'autres gènes candidats, que nous détaillerons par la suite, pourraient également être impliqués dans la myélosuppression induite par les thiopurines chez les patients présentant un phénotype TPMT normal. Par exemple, certains cas de leucopénie pourraient être liés à une accumulation excessive de 6-TITP chez les patients déficitaires en ITPA (Zelinkova *et al.*, 2006).

La 6-TG présente moins un risque moindre de myélotoxicité que l'AZA ou la 6-MP car, ne conduisant pas à la formation de 6-MMP(R), elle n'inhibe pas la synthèse des purines.

B. RESISTANCE AU TRAITEMENT

Les critères permettant de considérer un patient résistant au traitement varient en fonction des études. Par exemple, Seidman (2003) conclut à une résistance au traitement si aucune amélioration de la clinique n'a été constatée après plus de 4 mois de traitement à des posologies comprises entre 1,5 et 2,5 mg/kg/jour et si le ratio intra-érythrocytaire 6-MMP(R)/6-TGN est supérieur à 30/1. Schwab *et al.* (2002), au cours d'une étude sur 93 patients atteints de maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse et traités par des doses conventionnelles d'AZA, considèrent résistants les patients pour lesquels aucune rémission n'a été observée 8 mois après l'instauration du traitement.

Les causes de la résistance au traitement sont en partie expliquées. Dans la majorité des cas, la résistance à l'AZA est liée à une activité TPMT très élevée. Ces patients sont incapables de produire des quantités suffisantes de 6-TGN et, par conséquence, accumulent des 6-MMP(R), à l'origine d'une hépatotoxicité parfois sévère. Cependant, dans la mesure où seulement 1 à 2 % des Caucasiens présentent une activité TPMT très élevée, il faudrait rechercher d'autres

causes potentielles de cette résistance (Roberts *et al.*, 2007), comme, par exemple, le sous-dosage en AZA. Ainsi, il a été démontré que l'augmentation des posologies peut entraîner une réponse au traitement chez des patients initialement classés résistants (Rayner *et al.*, 2004).

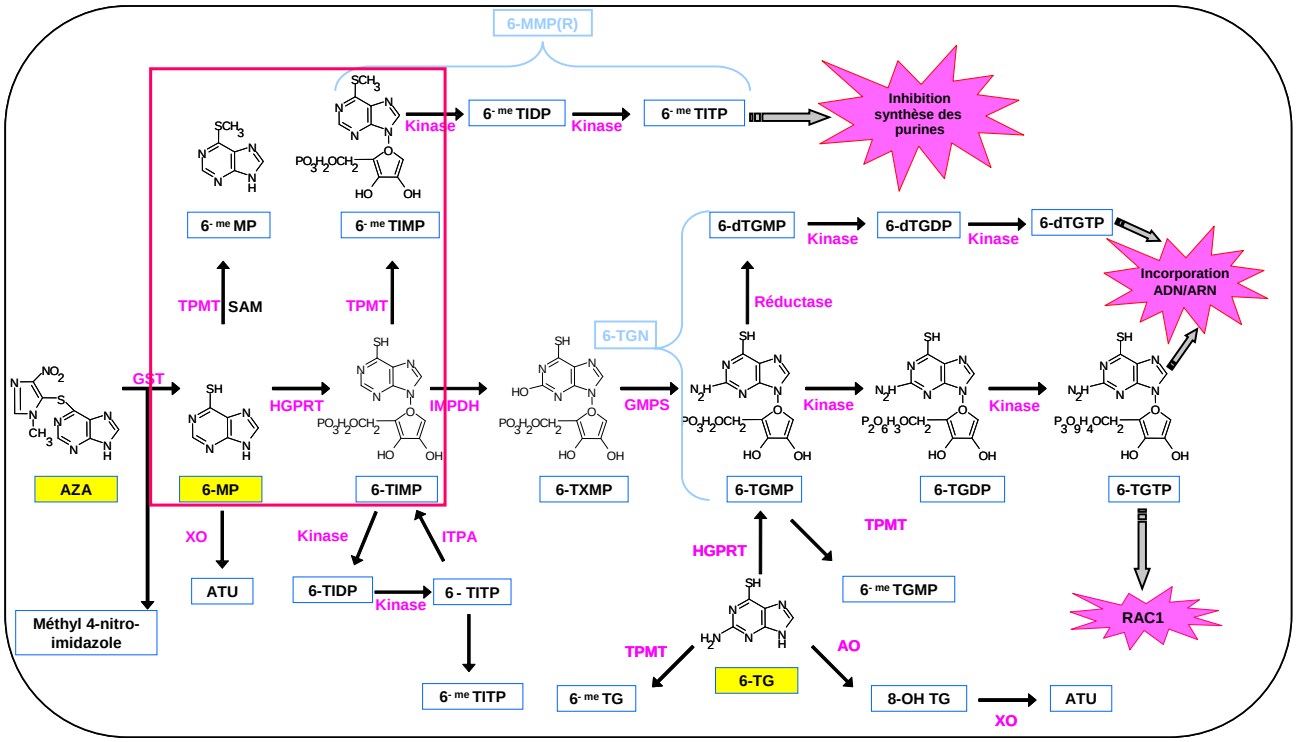

Figure 5. Place de la TPMT dans le métabolisme des thiopurines.

II. POLYMORPHISME GENETIQUE DE PROTEINES IMPLIQUEES DANS LES ANOMALIES DE REPONSE AUX THIOPURINES

A. ENZYMES

Le métabolisme des molécules thiopuriniques est complexe et fait intervenir de nombreux systèmes enzymatiques **(Figure 5)**. Nous avons choisi, pour présenter les données de la littérature concernant le polymorphisme génétique de ces enzymes et leur rôle dans la pharmacogénétique des thiopurines, de commencer par celles qui concernent la TPMT et l'ITPA, qui ont fait l'objet du plus grand nombre d'études et sont désormais reconnues comme impliquées dans la variation de réponse à ces médicaments, puis de décrire successivement les autres enzymes étudiées en respectant le chemin métabolique de l'AZA et de la 6-MP.

1) LA THIOPURINE *S*-METHYLTRANSFERASE

La thiopurine *S*-méthyltransférase (TPMT, EC 2.1.1.67) est une enzyme cytosolique qui catalyse la *S*-méthylation de composés sulfhydryles aromatiques ou hétérocycliques, notamment de substances exogènes comme la 6-MP, en utilisant la *S*-adénosyl *L*-méthionine (SAM) comme donneur de groupement méthyle **(Figure 5)**.

L'activité de la TPMT chez l'homme est extrêmement variable d'un individu à l'autre et partage la population en trois catégories : un groupe majoritaire de sujets pour lesquels l'activité TPMT est élevée (méthyleurs rapides ou MR), un groupe d'individus pour lesquels l'activité est dite intermédiaire (méthyleurs intermédiaires ou MI) et un petit groupe de sujets pour lesquels l'activité TPMT est indétectable (méthyleurs limités ou lents ou ML) (McLeod *et al.*, 1994). Le caractère héréditaire du déficit d'activité TPMT a été démontré par des études de familles (Weinshilboum et Sladek, 1980). Le phénotype d'activité TPMT est transmis sous le mode autosomal co-dominant, les individus déficitaires étant homozygotes ou hétérozygotes composites pour un ou deux allèles non fonctionnels du gène *TPMT*, alors que les individus intermédiaires sont hétérozygotes, c'est à dire porteurs d'un allèle

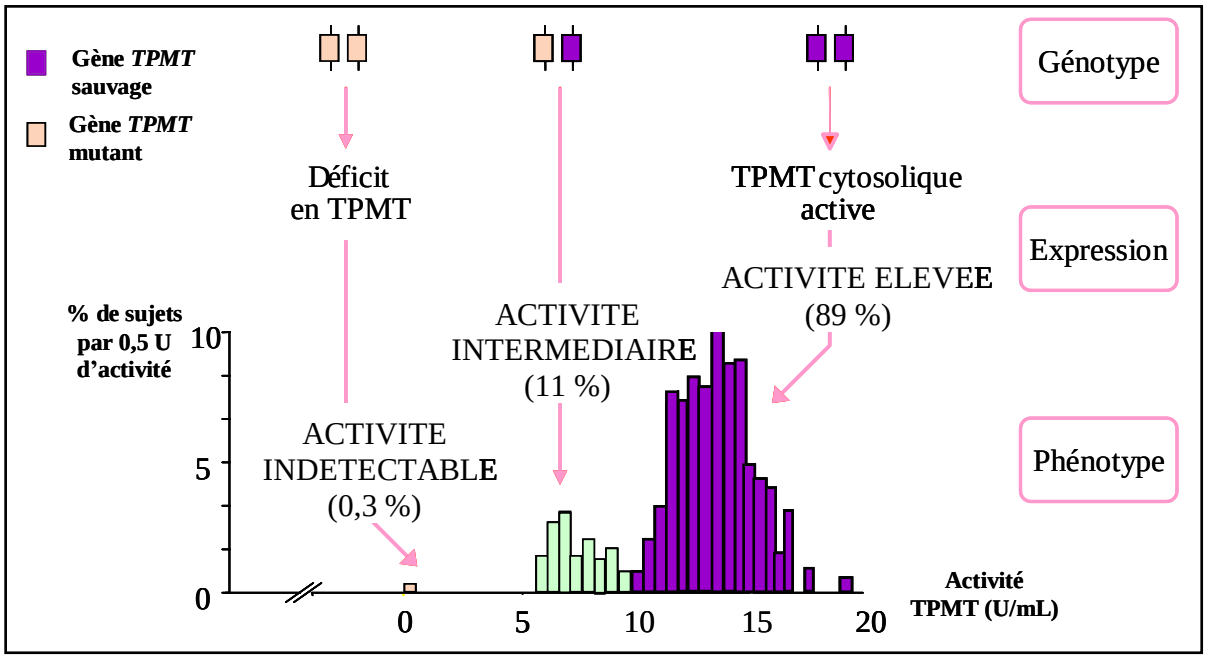

Figure 6. Histogramme de distribution de l'activité TPMT dans la population caucasienne. Il fait apparaître une répartition trimodale des individus : un groupe d'individus méthyleurs rapides, pour lesquels l'activité TPMT est élevée; un groupe d'individus méthyleurs intermédiaires, et un petit groupe de sujets dont l'activité TPMT est indétectable, qui sont dits méthyleurs limités ou lents. Les génotypes respectifs de chacun des trois groupes d'individus sont précisés en haut de la figure (d'après Weinshilboum et Sladek, 1980).

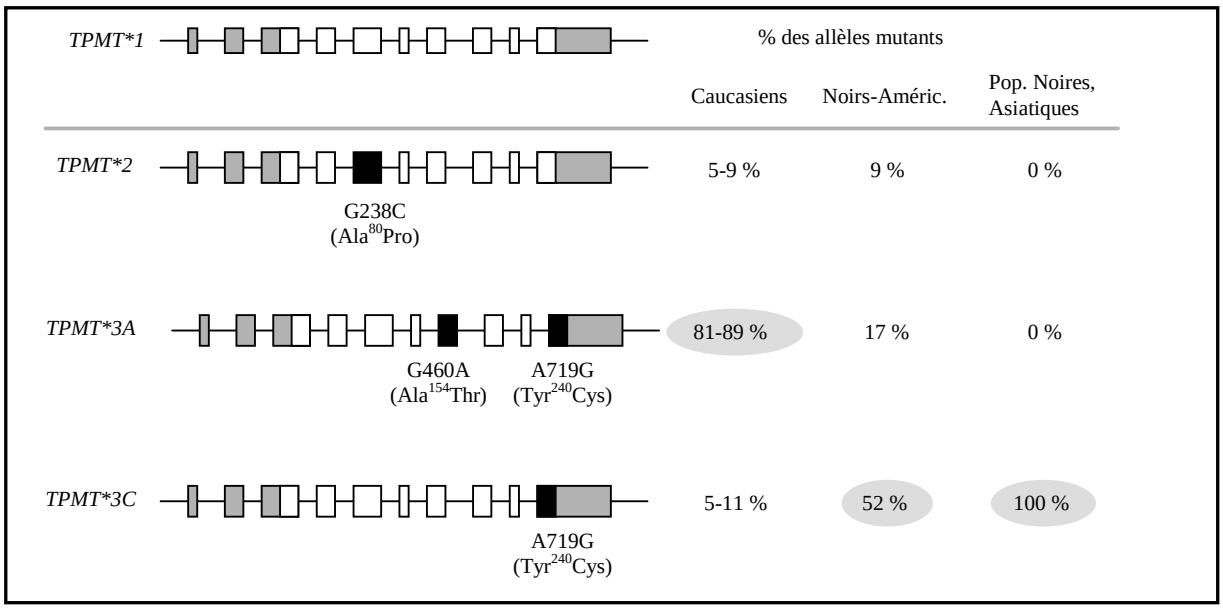

Figure 7. Structure des allèles non-fonctionnels du gène *TPMT* les plus fréquents.

fonctionnel et d'un allèle non-fonctionnel du gène. Ainsi, en Europe et en Amérique du Nord, environ 89 % des sujets ont une activité enzymatique élevée (MR), 11 % d'entre eux ont une activité intermédiaire (MI), tandis que moins de 1 % présentent un déficit total d'activité (ML) (Weinshilboum et Sladek, 1980) (**Figure 6**). L'analyse de la séquence du gène de la TPMT, réalisée dans des populations de diverses origines ethniques, a permis de confirmer l'origine génétique du polymorphisme d'activité de la TPMT et d'en élucider les mécanismes moléculaires (Krynetski et Evans, 2000).

Le gène *TPMT* comprend 10 exons, dont 8 sont codants, et 9 introns. Il est localisé sur le bras court du chromosome 6 (6p22.3) et s'étend sur 34 kb (Szumlanski *et al.*, 1996). Un pseudogène, *TPMTP1*, correspondant aux séquences exoniques du gène *TPMT*, sans promoteur et non-fonctionnel, a également été caractérisé (Lee *et al*., 1995).

Au total, à ce jour, une trentaine de variants alléliques du gène de la TPMT a été identifiée. Parmi les plus fréquents, on retrouve l'allèle *TPMT*2*, qui, comparé à la séquence sauvage du gène (*TPMT*1*), porte une mutation faux-sens dans l'exon 5 (c.238G>C, $Ala^{80}Pro$). Cette variation de séquence modifie la structure tertiaire de la protéine, ce qui altère la stabilité de l'enzyme, et entraîne sa dégradation rapide par protéolyse (Tai *et al.*, 1997). L'allèle *TPMT*3A*, quant à lui, est porteur de deux mutations faux-sens, c.460G>A ($Ala^{154}Thr$) et c.719A>G ($Tyr^{240}Cys$), localisées au niveau des exons 7 et 10, respectivement. Ces deux mutations ponctuelles ou SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), présentes chez la plupart des Caucasiens au phénotype ML, entraînent une diminution de la quantité de protéine (Szumlanski *et al.*, 1996). Cette diminution serait le résultat d'un mécanisme post-traductionnel lié à une activation des voies protéolytiques, dont la conséquence est l'augmentation de la vitesse de dégradation de l'enzyme par le protéasome (Tai *et al.*, 1997 et 1999 ; Wang *et al.*, 2003). Enfin, le troisième variant allélique non fonctionnel, l'allèle *TPMT*3B*, ne contient que la mutation c.460G>A (Szumlanski *et al.*, 1996).
Ces trois mutations, c.238G>C ($Ala^{80}Pro$), c.460G>A ($Ala^{154}Thr$) et c.719A>G ($Tyr^{240}Cys$), sont à l'origine des allèles non-fonctionnels de la TPMT les plus fréquemment rencontrés quelle que soit l'origine ethnique des individus, avec une fréquence croissante c.238G>C < c.460G>A < c.719A>G (Loennechen *et al*., 2001) (**Figure 7**).
Tous les autres variants alléliques identifiés sont rares et portent chacun une unique mutation faux-sens affectant, le plus souvent, une séquence conservée de la protéine.

Les mutations affectant les séquences codantes du gène *TPMT*, décrites ci-dessus, n'expliquent pas à elles seules la large variabilité d'activité enzymatique observée dans la population générale. En effet, des discordances phénotype/génotype ont été rapportées dans de nombreuses populations (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.,* 1998a ; Lindqvist *et al.*, 2007). L'existence d'autres anomalies géniques, situées dans des régions autres que les séquences codantes, et susceptibles de modifier l'expression et/ou l'activité de la TPMT, a donc été envisagée (Vuchetich *et al.,* 1995). La région 5'-flanquante du gène de la TPMT, qui possède plusieurs sites potentiels de fixation pour le facteur de transcription Sp1 (Szumlanski *et al*., 1996), a ainsi été étudiée, originellement par notre équipe puis par d'autres, et un polymorphisme de répétitions de type VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), caractérisé par la présence de motifs de 17 à 18 pb, répétés de 4 à 8 fois, a été identifié. Chaque motif introduit un site de fixation supplémentaire pour Sp1. Au total, onze allèles, désignés *VNTR*V3, *V4a, *V4b *V5a, *V5b, *V6a, *V6b, *V7a, *V7b, *V8* et *V9,* selon le nombre et le type de répétitions qu'ils contiennent, ont été caractérisés (Spire-Vayron de la Moureyre *et al*., 1998a et 1999, Alves *et al.,* 1999 et 2001 ; Yan *et al*., 2000). Les allèles **V4a* et **V5a* sont les plus fréquents dans la population caucasienne (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.,* 1998a et 1999 ; Yan *et al.,* 2000 ; Alves *et al.,* 2001). Des études de corrélation phénotype/génotype, réalisées sur de grandes populations d'individus, ont mis en évidence une relation inverse significative entre le nombre total de répétitions présentes sur les deux allèles du gène et l'activité TPMT (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.,* 1998a; Yan *et al.,* 2000). Cependant, l'influence de ce polymorphisme de répétitions sur l'activité globale de la TPMT semble mineure comparée à celle due aux polymorphismes affectant la séquence codante du gène.

Le déficit d'activité TPMT, chez l'homme comme chez l'animal, apparaît sans conséquence, tant qu'ils ne sont pas exposés à un substrat exogène de l'enzyme, ce qui laisse supposer l'absence de fonction endogène pour cette enzyme. En revanche, l'influence majeure du polymorphisme génétique de la TPMT au cours d'un traitement par AZA ou 6-MP, n'est plus à démontrer. En effet, le risque d'hématotoxicité dose-dépendante est particulièrement élevé chez les patients présentant un phénotype déficitaire pour la TPMT (Schütz *et al.,* 1993 ; Krynetski et Evans, 2000), phénomène lié à la relation inverse qui a été démontrée entre la concentration intra-érythrocytaire en 6-TGN et l'activité TPMT (Lennard *et al.,* 1987). Chez ces patients, il est recommandé d'ajuster la posologie du traitement en diminuant les doses de thiopurines à 5-10 % des doses usuelles (Lennard *et al.,* 1990 ; Evans *et al.,* 2001; Ansari *et*

Tableau 5. Exemple de guide thérapeutique pour la prescription d'AZA et de 6-MP. La posologie en AZA ou 6-MP est adaptée en fonction de l'activité TPMT du patient. En cas d'association à l'allopurinol, la posologie sera également ajustée (d'après Ansari *et al.*, 2008).

	Activité TPMT			**Association à l'allopurinol**
	Elevée	**Intermédiaire**	**Très faible**	
Doses d'AZA (réduite de moitié pour la 6-MP)	**100 % (2-2,5 mg/kg)**	**50 % (1-1,25 mg/kg)**	**5 - 10 % (0,1-0,25 mg/kg)**	**25-33 % de la dose (fonction de l'activité TPMT)**

al., 2008) **(Tableau 5),** voire d'utiliser un autre immunosuppresseur. Une adaptation des posologies et une surveillance étroite des signes de toxicité sont également préconisées chez les patients au phénotype intermédiaire, qui présentent également un risque potentiel d'hématotoxicité (Relling *et al.,* 1999a ; Evans *et al.,* 2001). Cependant, il est nécessaire de prendre en compte le fait que l'interprétation des résultats obtenus par phénotypage est parfois difficile chez les patients polymédicamentés, voire impossible chez les patients ayant été transfusés avec des culots érythrocytaires provenant de donneurs, ce qui est fréquent chez les enfants leucémiques. En effet, un phénomène de « phénocopie », qui classe les individus de manière erronée dans un phénotype MR ou ML, peut être induit par des interactions médicamenteuses avec les médicaments thiopuriniques, ainsi que dans le trimestre suivant une transfusion sanguine (Krynetski et Evans, 2000 ; Schmiegelow *et al.,* 2003). De plus, l'activité TPMT peut être induite par l'administration chronique de médicaments thiopuriniques (Chocair *et al.,* 1992 ; Mircheva *et al.,* 1995). Ce phénomène d'induction enzymatique varie, après quelques semaines de traitement thiopurinique, de 0 à 55 % selon les sujets (Lennard *et al.,* 1990 ; McLeod *et al.,*1994 ; Bergan *et al.,*1997b). Les conséquences cliniques de ce phénomène d'induction, dont le mécanisme est encore inconnu à ce jour, ne doivent pas être négligées. En l'absence de déterminations régulières de l'activité TPMT par phénotypage et d'une adaptation de la posologie, cette augmentation de l'activité TPMT peut être responsable d'un échappement thérapeutique chez certains patients. Pour pallier les inconvénients des méthodes de phénotypage, des méthodes de génotypage permettant la prédiction du phénotype des individus ont été développées. La stratégie de génotypage la plus couramment utilisée actuellement repose sur l'identification des trois mutations faux-sens les plus fréquentes, décrites précédemment. L'application de ces tests de génotypage à des échantillons d'ADN, provenant de grandes populations de volontaires sains ou de patients préalablement phénotypés, a permis de montrer une bonne concordance, de 75 à 100 %, entre le phénotype des sujets prédits par génotypage et celui déterminé par phénotypage (Yates *et al.*, 1997 ; Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1998b ; Schaeffeler *et al.*, 2004). Ce taux d'efficacité de prédiction relativement élevé, associé à la simplicité, la rapidité et le coût modéré des tests de génotypage, en font des méthodes de choix, utilisables en routine, pour identifier les patients à risque de myélotoxicité et utilisables avant l'administration des médicaments thiopuriniques.

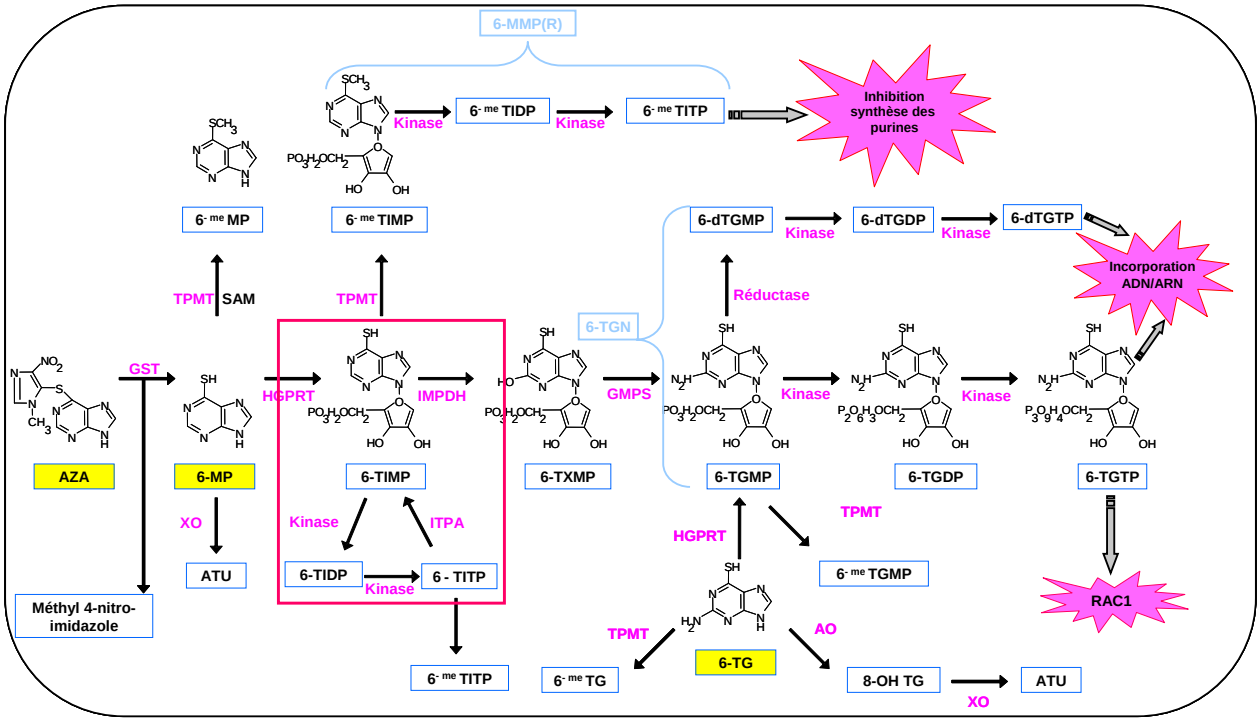

Figure 8. Place de l'ITPA dans le métabolisme des thiopurines

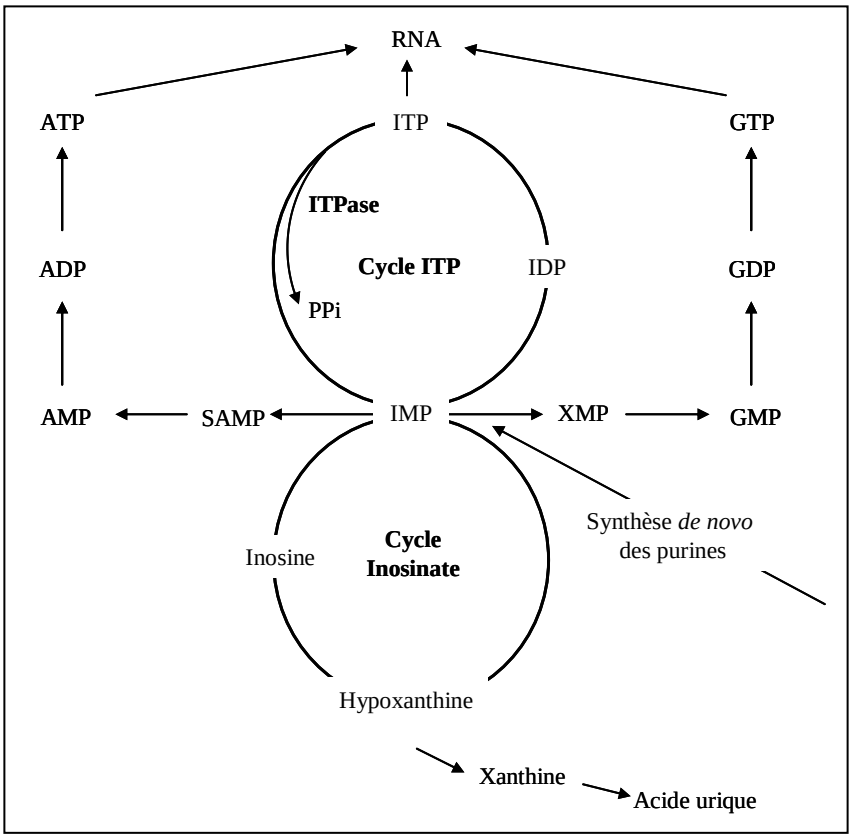

Figure 9. Schéma de la synthèse et du recyclage de l'ITP (d'après Sumi *et al.*, 2002). L'IMP, formée par la voie de synthèse *de novo* des purines ou par la voie de récupération des nucléotides, est transformée en AMP et GMP par différentes voies anaboliques. L'IMP est également phosphorylée en ITP, elle-même susceptible d'être recyclée en IMP par l'ITPA. Un déficit complet en ITPA entraîne une accumulation d'ITP dans la cellule.

2) L'INOSINE TRIPHOSPHATE PYROPHOSPHATASE (ITPA)

Au cours du métabolisme de l'AZA et de la 6-MP, l'Inosine Triphosphate Pyrophosphatase (ITPA) prend en charge la 6-TITP, pour la déphosphoryler en 6-TIMP **(Figure 8)**.

L'ITPA (EC 3.6.1.19) est une enzyme cytosolique catalysant la pyrophosphohydrolyse de l'inosine triphosphate (ITP) en inosine monophosphate (IMP) (**Figure 9**). L'IMP, qui est synthétisée soit par la voie de synthèse *de novo* des purines, soit par la voie de récupération des purines, occupe un rôle central dans le métabolisme des purines, permettant la synthèse de l'AMP et de la GMP. Cependant, l'IMP peut également être phosphorylée en ITP. Le rôle supposé de l'ITPA est ainsi de contribuer au recyclage des purines, stockées sous forme d'ITP, en IMP et, par conséquent, de protéger les cellules contre l'accumulation de ce nucléotide potentiellement toxique, capable de s'incorporer dans l'ADN et l'ARN. La désoxyITP et la xanthosine triphosphate seraient également substrats de l'ITPA (Lin *et al.*, 2001).

Des études de populations ont montré qu'il existe une distribution bimodale de l'activité ITPA chez les Caucasiens, avec environ 5 à 10 % des individus présentant une activité résiduelle allant de 0 à 50 % de celle du reste de la population (Fraser *et al.*, 1975 ; Soder *et al.*, 1976 ; Holmes *et al.*, 1979 ; Van Waeg *et al.*, 1988 ; Duley *et al.*, 1990). La mesure de l'activité ITPA est réalisée par incubation de lysats érythrocytaires avec de l'ITP, suivie de la mesure de la quantité d'IMP formée par HPLC-UV (Shipkova *et al.*, 2006).

L'origine génétique de la variabilité inter-individuelle d'activité ITPA a été démontrée récemment et les mécanismes moléculaires à l'origine du déficit en ITPA ont été élucidés (Cao et Hegele, 2002 ; Sumi *et al.*, 2002). Le gène *ITPA* est localisé sur le bras court du chromosome 20 (Mohandas *et al.*, 1980). Il s'étend sur 13 kb et comprend 8 exons (Sumi *et al.*, 2002). L'analyse de la séquence nucléotidique de l'*ITPA* dans des familles présentant des individus déficitaires en ITPA a permis de mettre en évidence cinq polymorphismes, dont deux mutations silencieuses (c.138G>A et c.561G>A), une mutation dans la région 3'-flanquante probablement sans conséquence fonctionnelle (c.708G>A), une mutation faux-sens (c.94C>A, $Pro^{32}Thr$) et une mutation intronique localisée au niveau d'un site potentiel de

branchement à proximité du site donneur d'épissage de l'intron 2 (IVS2+21A>C) (Sumi *et al.*, 2002). La présence de la mutation faux-sens c.94C>A à l'état homozygote est responsable d'un déficit complet en ITPA, les hétérozygotes ayant eux une activité résiduelle d'environ 20 % de l'activité ITPA moyenne (Sumi *et al.*, 2002). Cet effet délétère de la mutation $Pro^{32}Thr$ serait dû à sa localisation dans une région très conservée de la protéine (Lin *et al.*, 2001), altérant sa structure secondaire et probablement sa dimérisation sous forme active. L'effet de la mutation IVS2+21A>C est moindre sur l'activité ITPA, les hétérozygotes retenant environ 60 % de l'activité moyenne (Sumi *et al.*, 2002). Cette mutation altèrerait un site de branchement relativement conservé de l'intron 2 du gène *ITPA*, résultant en un épissage anormal de l'ARNm. Enfin, l'activité ITPA chez les hétérozygotes composites c.94C>A/IVS2+21A>C est de l'ordre de 10 % de l'activité moyenne de la population générale (Sumi *et al.*, 2002). La fréquence de la mutation inactivatrice c.94C>A est relativement élevée, de l'ordre de 5 à 7 %, avec une fréquence similaire chez les Caucasiens, les Afro-Américains et les Africains (Cao et Hegele, 2002 ; Marsh *et al.*, 2004). Elle est encore plus élevée dans diverses populations asiatiques, allant de 11 à 19 % (Cao et Hegele 2002 ; Marsh *et al.*, 2004). En dehors du constat, controversé dans la littérature, d'une plus grande proportion de patients à activité ITPA basse chez les individus souffrant de schizophrénie (Fraser *et al.*, 1975), le déficit en ITPA ne semble pas être responsable de pathologie particulière. L'analyse récente du promoteur du gène n'a pas permis de mettre en évidence de mutations ayant un impact sur l'activité promotrice (Von Ahsen *et al.*, 2008).

De nombreuses équipes ont étudié le rôle éventuel des polymorphismes génétiques IVS2+21A>C et c.94C>A dans les anomalies de réponse à l'AZA ou la 6-MP. Aucun impact de la mutation IVS2+21A>C n'a été mise en évidence chez des patients traités par des doses conventionnelles de ces molécules (Marinaki *et al.*, 2004 ; Allorge *et al.*, 2005 ; Zelinkova *et al.*, 2006).

Les résultats concernant la relation éventuelle entre la présence de la mutation c.94C>A et la survenue d'effets indésirables chez des patients traités par AZA/6-MP, sont, quant à eux, très controversés. De nombreuses études n'ont pas mis en évidence de corrélation entre la mutation c.94C>A et la survenue d'effets indésirables chez des patients atteints de MICI et traités par des doses standards d'AZA ou de 6-MP (Gearry *et al.*, 2004 ; Allorge *et al.*, 2005 ; Van Dieren *et al.*, 2005 ; Hindorf *et al.*, 2006). Le même constat a été fait au cours d'une étude portant sur une population pédiatrique (De Ridder *et al.*, 2006). Enfin, lors d'une étude portant sur plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des thiopurines, la présence de

cette mutation à l'état hétérozygote chez 7 patients traités par 6-MP n'était pas corrélée aux concentrations sériques des métabolites 6-^{me}TIMP et 6-TGN, ce qui n'est donc pas en faveur de son implication dans la survenue de certains effets secondaires des thiopurines, en particulier leur myélotoxicité (Haglund *et al.*, 2008). D'autres études, en revanche, ont qualifié la mutation c.94C>A de bon marqueur prédictif d'intolérance chez des patients traités par l'AZA (Marinaki *et al.*, 2004 ; von Ahsen *et al.*, 2005 ; Zelinkova *et al.*, 2006). Selon Marinaki *et al.*, (2004), ce risque exacerbé de développer certains effets indésirables au cours d'un traitement par AZA/6-MP chez les individus présentant un déficit partiel ou complet en ITPA est lié à une accumulation des métabolites 6-TITP et 6-^{me}TITP, potentiellement cytotoxiques.

Récemment une méta-analyse, menée par Van Dieren *et al.*, (2007), a ré-analysé les travaux de six études portant sur le lien entre les polymorphismes de l'ITPA et la toxicité des thiopurines (Gearry *et al.*, 2004 ; Marinaki *et al.*, 2004 ; Van Dieren *et al.*, 2005; Von Ahsen *et al.*, 2005 ; Zelinkova *et al.*, 2006 ; Hindorf *et al.*, 2006). Cette méta-analyse, qui a permis d'inclure 751 patients adultes, tous atteints de MICI et traités par des doses standard d'AZA ou de 6-MP, a conclu à l'absence d'une corrélation significative entre la mutation c.94C>A de l'*ITPA* et la survenue d'effets indésirables sous thiopurines.

Les résultats d'études encore plus récentes ne permettent pas à ce jour d'aboutir à un consensus concernant l'ITPA. Kurzawski *et al.*, (2009) ont ainsi affirmé qu'il n'existe pas de lien entre les polymorphismes affectant le gène *ITPA* et l'intolérance à l'AZA chez des patients greffés rénaux. En revanche, selon Okada *et al.* (2009), la mutation c.94C>A représente un facteur d'efficacité thérapeutique, mais uniquement pour des doses faibles d'AZA, chez les patients souffrant de lupus érythémateux disséminé.

Selon Stocco *et al.* (2009), les résultats contradictoires de ces différentes études s'expliqueraient par le fait que la plupart d'entre elles incluaient des patients pour lesquels les posologies de thiopurines n'ont pas été systématiquement ajustées en fonction de leur phénotype TPMT. En effet, il apparaît dans cette étude, réalisée sur des patients atteints de leucémies lymphoblastiques aiguës et traités par la 6-MP, qu'un défaut d'activité de l'ITPA est corrélé à une fréquence plus élevée de neutropénies fébriles sévères, mais uniquement chez les patients pour lesquels la posologie en 6-MP a été adaptée en fonction de leur phénotype TPMT.

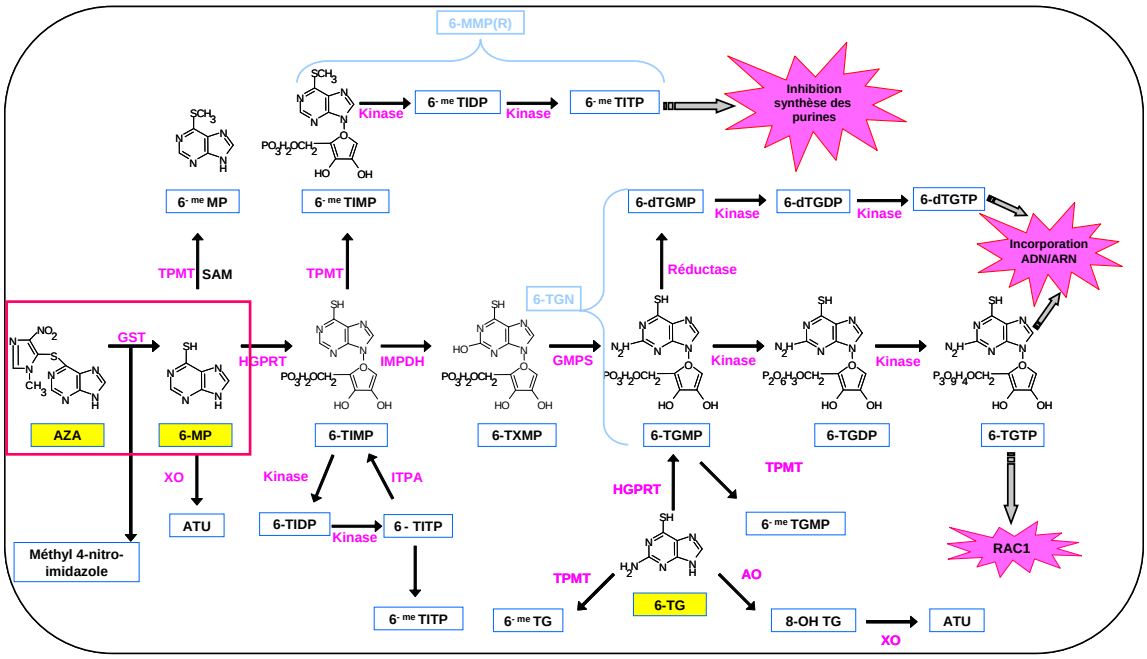

Figure 10. Place de la GST dans le métabolisme des thiopurines

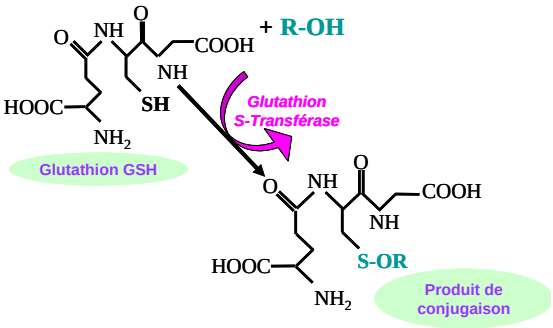

Figure 11. Réaction enzymatique catalysée par la GST. Le GSH, sous l'action de la GST, convertit les substances électrophiles par formation d'un pont thioéther S-OR en conjugués hydrosolubles inactifs qui peuvent facilement être excrétés.

Tableau 6. Principaux polymorphismes des GSTM1, GSTP1 et GSTT1 (d'après Habdous *et al*., 2004 ; Mannervik *et al*., 1992).

Classe GST	Gène	Protéine	Variants alléliques	Conséquence
Mu	*GSTM1*	GSTM1-1	*GSTM1*A* *GSTM1*B* *GSTM1*0*	Forme sauvage active c.573C>G (Lys^{173}Asn) Délétion complète
Pi	*GSTP1*	GSTP1-1	*GSTP1*A* *GSTP1*B* *GSTP1*C* *GSTP1*D*	Forme sauvage active c.313A>G (Ile^{105}Val) c.313A>G, c.341C>T (Ile^{105}Val/Ala^{114}Val) c.341C>T (Ala^{114}Val)
Thêta	*GSTT1*	GSTT1-1	*GSTT1*A* *GSTT1*B*	Forme sauvage active c.310A>C (Thr^{104}Pro)

	*GSTT1*0*	Délétion complète

3) LA GLUTHATION-*S*-TRANSFERASE (GST)

La première étape de métabolisation de l'AZA consiste en sa transformation en 6-MP, avec libération du noyau nitroimidazolé **(Figure 10)**. Cette réaction, catalysée par une glutathion *S*-transférase (GST), consomme les réserves hépatiques de glutathion sous forme réduite ou GSH (Stocco *et al.*, 2007) **(Figure 11)**. On note que dans le cas de l'AZA, comme dans la majorité des réactions catalysées par des GST, la réaction enzymatique est accompagnée par une réaction parallèle minoritaire, non enzymatique, faisant également intervenir le GSH (Eklund *et al*., 2006 ; Kurtovic *et al*., 2008).

Le glutathion sous sa forme réduite est un élément essentiel dans la protection contre de nombreux composés toxiques ou dans la lutte contre le stress oxydatif et protège les cellules des dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène. Une déplétion en GSH hépatique prédispose donc à la peroxydation et la dénaturation de nombreux composés tels que les lipides (lipoprotéines circulantes, phospholipides), les mucopolysaccharides, les protéines et les acides nucléiques (Cadet *et al*., 2002 ; Favier, 2003).

Il existe trois grandes classes de GST, mitochondriales, cytosoliques et microsomales. De grandes différences inter-individuelles d'activité GST dans la population générale ont été démontrées, certaines à l'origine d'une susceptibilité accrue à certains types de cancers (Bendjemana *et al*., 2006). Les GST cytosoliques (E.C 2.5.1.18) représentent une importante famille d'isoenzymes polymorphes réparties en huit classes (Hayes et Pulford, 1995). Parmi elles, cinq classes présentent un polymorphisme génétique: GSTA (alpha), GSTM (mu), GSTP (pi), GSTT (thêta) et GSTZ (zêta). Les polymorphismes les plus étudiés, dont la fréquence varie en fonction de l'origine ethnique des individus, sont ceux relatifs aux sous-classes GSTM1, T1 et P1 et sont présentés dans le **Tableau 6**. La fréquence de l'allèle nul *GSTM1*0* est de 50 % chez les Caucasiens et de 27 % chez les Asiatiques. Les deux mutations connues du gène *GSTP1* ont un impact sur la structure tridimensionnelle de l'enzyme et sur la stéréospécificité de son site catalytique (Ali-Osman *et al*., 1997). La fréquence de la mutation c.313A>G ($Ile^{105}Val$) est de 30 % chez les Caucasiens et de 10 % chez les Asiatiques, tandis que la mutation c.341C>T ($Ala^{114}Val$), rencontrée chez 10 % des Caucasiens, n'a pas été mise en évidence dans la population asiatique. La fréquence de l'allèle

nul *GSTT1*0* est de 20 % dans la population caucasienne et de 61 % dans la population asiatique (Habdous *et al*., 2004).

Il semblerait que certains effets indésirables observés lors de l'administration d'AZA à des doses conventionnelles puissent être liés non seulement au phénotype TPMT, mais également à une production excessive de 6-MP couplée à une forte déplétion en GSH, résultant d'une activité GST très élevée (Eklund *et al*., 2006). Ainsi, la surconsommation du GSH hépatique lors de la première étape de biotransformation de l'AZA est susceptible d'entraîner des complications hépatiques. En 2001, Lee et Farrell ont confirmé cette hypothèse en utilisant des cultures primaires d'hépatocytes de rats. Ils ont ainsi démontré l'implication dose-dépendante de l'AZA dans la déplétion en GSH, avec pour conséquence l'apparition de lésions mitochondriales conduisant à la lyse des membranes cellulaires et à la mort de l'hépatocyte (cytolyse).

De plus, il a récemment été démontré *in vitro* que sur les douze GST les plus abondantes et les plus susceptibles d'intervenir dans le métabolismes des xénobiotiques, les GSTA1, A2 et M1 sont les principales impliquées dans la production de 6-MP à partir de l'AZA (Eklund *et al*., 2006). Une autre étude a permis d'évaluer de façon rétrospective l'association entre les polymorphismes génétiques affectant les gènes *TPMT*, *GSTM1*, *GSTP1* et *GSTT1* et la fréquence de survenue d'effets indésirables chez des patients atteints de MICI et traités par AZA. Les résultats n'ont montré une association significative avec l'apparition d'effets indésirables qu'avec le polymorphisme de *GSTM1*. Ainsi, le génotype *GSTM1* nul a un rôle protecteur sur l'incidence des effets indésirables de l'AZA et diminue la fréquence de survenue de leucopénies. Au contraire, les patients au génotype sauvage ont un risque plus élevé de développer une lymphopénie au cours du traitement. Aucune association significative n'a par contre été mise en évidence avec les polymorphismes affectant les gènes *GSTT1* et *GSTP1* (Stocco *et al*., 2007).

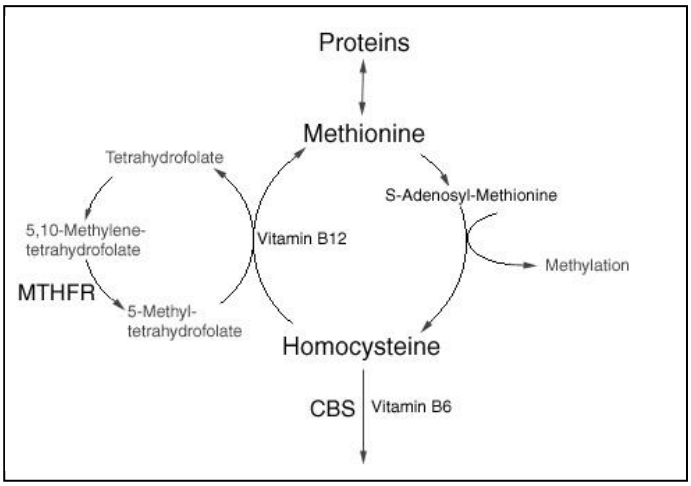

Figure 12. Place de la MTHFR dans la production de la méthionine à partir de l'homocystéine.

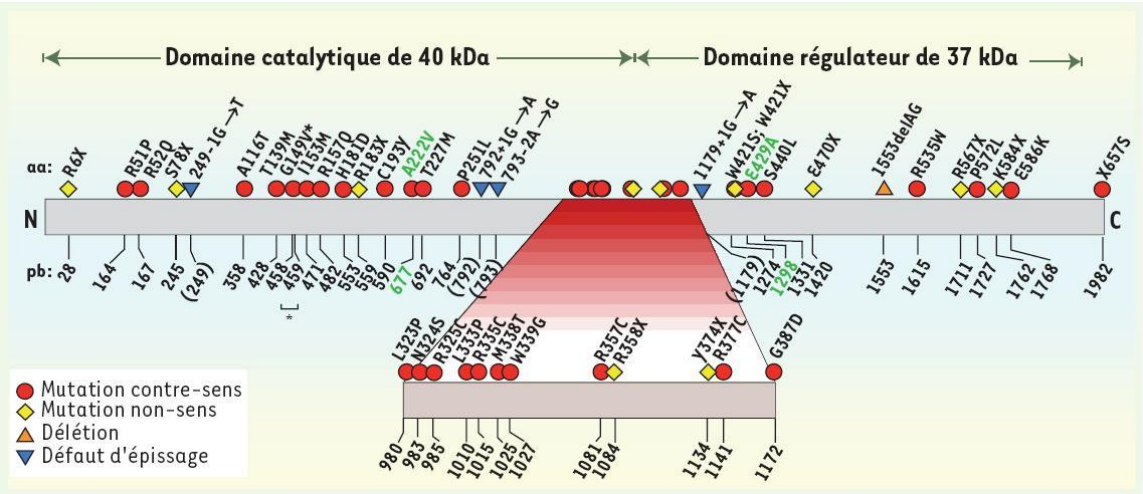

Figure 13. Représentation schématique de 41 mutations graves du gène *MTHFR* et de 2 polymorphismes particulièrement étudiés (Leclerc et Rozen, 2007)**.** Les 41 mutations spécifiées n'ont été identifiées que dans des familles de patients présentant un déficit important de MTHFR. La protéine MTHFR est représentée par un rectangle et les acides aminés mutés sont indiqués au-dessus, ainsi que les mutations affectant l'épissage du gène. Les nombres sous le rectangle désignent la position des mutations dans la séquence de l'ADNc; les nombres entre parenthèses désignent la présence d'une mutation intronique à proximité du résidu mentionné. Les 2 polymorphismes de *MTHFR* les plus étudiés sont indiqués en vert.

4) LA 5,10-METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE (MTHFR)

La *S*-adénosyl *L*-méthionine (SAM) est le donneur de groupement méthyle lors de la réaction de méthylation catalysée par la TPMT, qui à partir de la 6-MP, aboutit à la formation de 6^{-me}MP, métabolite inactif, avec libération de *S*-adénosyl-*L*-homocystéine (SAH). Ainsi, des polymorphismes génétiques affectant les gènes codant pour les acteurs impliqués dans le recyclage de la SAM, comme la 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR, EC 1.5.1.20), pourraient avoir un impact indirect sur l'activité de la TPMT (Breen *et al*., 2005) et donc sur la réponse aux thiopurines

La MTHFR catalyse la conversion du 5,10-méthylènetétrahydrofolate (5,10-CH_2-FH_4) en 5-méthyltétrahydrofolate (5-CH_3-FH_4), co-substrat de l'homocystéine pour sa méthylation aboutissant à la production de méthionine. Cette réaction fait intervenir le NADPH comme cofacteur **(Figure 12)**. Le déficit d'activité MTHFR est l'une des principales causes d'homocystéinurie, dont les symptômes se manifestent notamment par des retards de développement, ainsi que par diverses affections neurologiques et vasculaires (Cohen Aubart *et al*., 2007).

Le gène codant pour la MTHFR, très polymorphe, est localisé sur le chromosome 1 en position 1p36.3. A ce jour, plus de soixante mutations de *MTHFR* ont été identifiées (Martin *et al*., 2006), parmi lesquelles 41 ont été décrites comme ayant des conséquences cliniques sévères **(Figure 13)**. La plupart de ces mutations n'ayant été observées que dans une ou deux familles, elles n'ont fait l'objet que de peu d'études, et leurs conséquences fonctionnelles ont été peu étudiées ou demeurent inconnues (Leclerc et Rozen, 2007). En revanche, deux mutations fréquentes ont fait l'objet de nombreuses analyses. La première, la substitution c.1298A>C (Glu^{429}Ala), dont la fréquence à l'état homozygote est de 10 % dans la population générale (Ogino et Wilson, 2003 ; Breen *et al.*, 2005), est associée à une activité enzymatique d'environ 60 % de celle de l'enzyme sauvage (Van der Put *et al.*, 1998 ; Ogino et Wilson, 2003 ; Breen *et al.*, 2005). La seconde, la mutation c.677C>T (Ala^{222}Val), dont la fréquence à l'état homozygote est d'environ 10 % dans la population générale, est à l'origine de la synthèse d'une protéine thermolabile (Ogino et Wilson, 2003 ; Breen *et al.*, 2005). Le génotype homozygote TT est associée à une activité MTHFR qui est de 30 à 50 % de celle de l'enzyme sauvage (Kang *et al.*, 1991 ; Chango *et al.*, 2000 ; Breen *et al.*, 2005).

Les études de l'impact éventuel du polymorphisme du gène *MTHFR* au cours d'un traitement par thiopurines sont à ce jour encore peu nombreuses, et leurs résultats restent discordants. Ainsi, dans une étude rétrospective réalisée sur 65 patients traités par AZA après une greffe hépatique, aucun lien entre le statut génotypique *MTHFR* pour les mutations c.1298A>C et c.677C>T et la réponse au traitement n'a pu être mis en évidence (Breen *et al.*, 2005). En revanche, Arenas *et al*., (2005) ont constaté chez des individus prédits MR par génotypage (pour les trois mutations les plus fréquentes de la TPMT), mais présentant toutefois une activité TPMT basse, une fréquence significativement plus élevée (23%) de porteurs homozygotes pour la mutation c.677C>T par rapport aux individus également prédits MR, mais ayant eux une activité TPMT normale (8 % d'homozygotes TT). Ce constat semble en accord avec l'hypothèse selon laquelle des anomalies du recyclage de la SAM, à la fois co-facteur de la TPMT et reconnu comme son protecteur vis-à-vis de la dégradation *in vitro* (Tai *et al.*, 1999), pourraient avoir comme conséquence une diminution de l'activité de la TPMT.

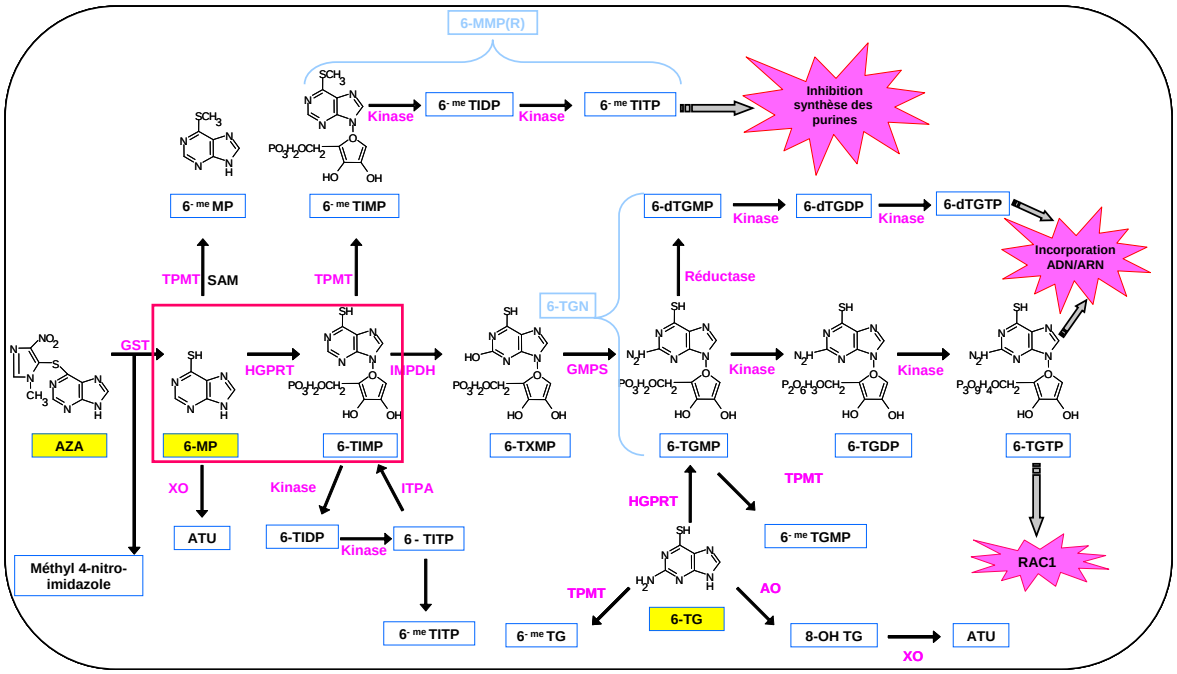

Figure 14. Place de l'HGPRT dans le métabolisme des thiopurines.

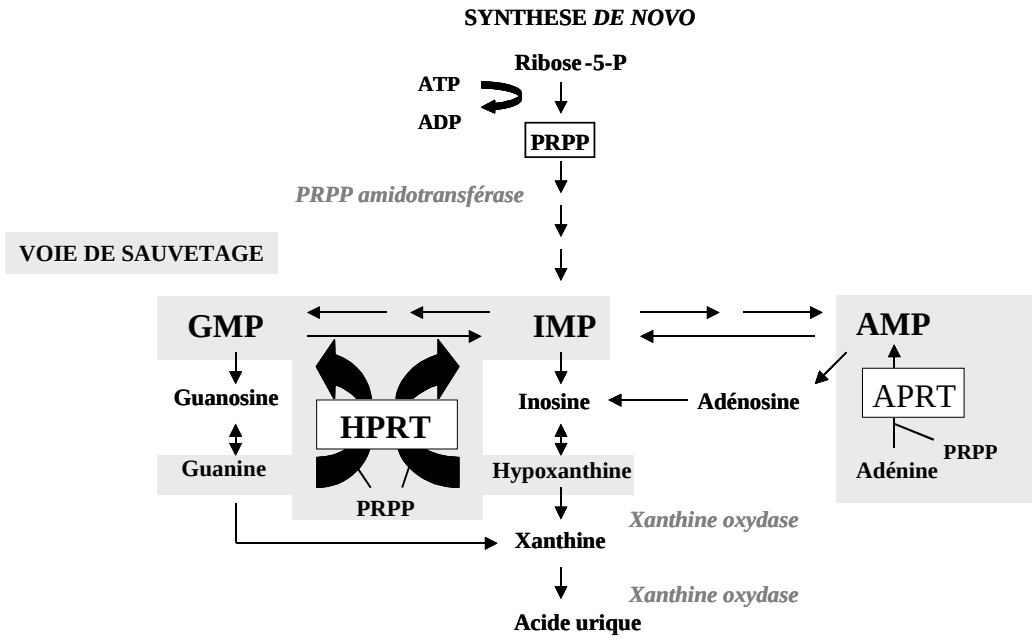

Figure 15. Place de l'HGPRT dans la synthèse *de novo* des purines (Torres et Puig, 2007).

5) L'HYPOXANTHINE GUANINE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE (HGPRT)

L'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT ou HPRT, EC 2.4.2) est la première enzyme impliquée dans l'activation de la 6-MP en dérivés nucléotidiques actifs (6-TGN). Elle entre en compétition avec la XO et la TPMT, qui produisent des métabolites inactifs **(Figure 14)**.

L'HGPRT est responsable de la transformation de l'hypoxanthine en inosine monophosphate (IMP) et de la guanine en guanine monophosphate (GMP), en présence de phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) **(Figure 15)**. Le déficit d'activité HGPRT est une maladie héréditaire qui se manifeste par une hyperuricémie associée à une lithiase et à la goutte, ainsi qu'à de nombreuses manifestations neurologiques dont l'intensité dépend du degré du déficit enzymatique, les formes les plus sévères étant connues sous le nom de syndrome de Lesch-Nyhan (Torres et Puig, 2007).

Le gène codant pour l'HGPRT, *HGPRT1*, situé sur le chromosome X en position q26-27.2, est un gène très polymorphe. Ainsi, ont été recensées plus de 300 mutations, qui ont un impact très variable sur l'activité de la protéine (Torres et Puig, 2007).

Il est légitime de penser qu'une diminution de l'activité HGPRT puisse entraîner une diminution de la production des métabolites actifs des thiopurines et donc une résistance au traitement. Or, en pratique, ce mécanisme de résistance n'a jamais été mis en évidence chez des patients ayant pourtant une faible activité HGPRT. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'un très faible niveau d'activité HGPRT suffise pour générer une quantité efficace de métabolites actifs (Pieters *et al*., 1992).

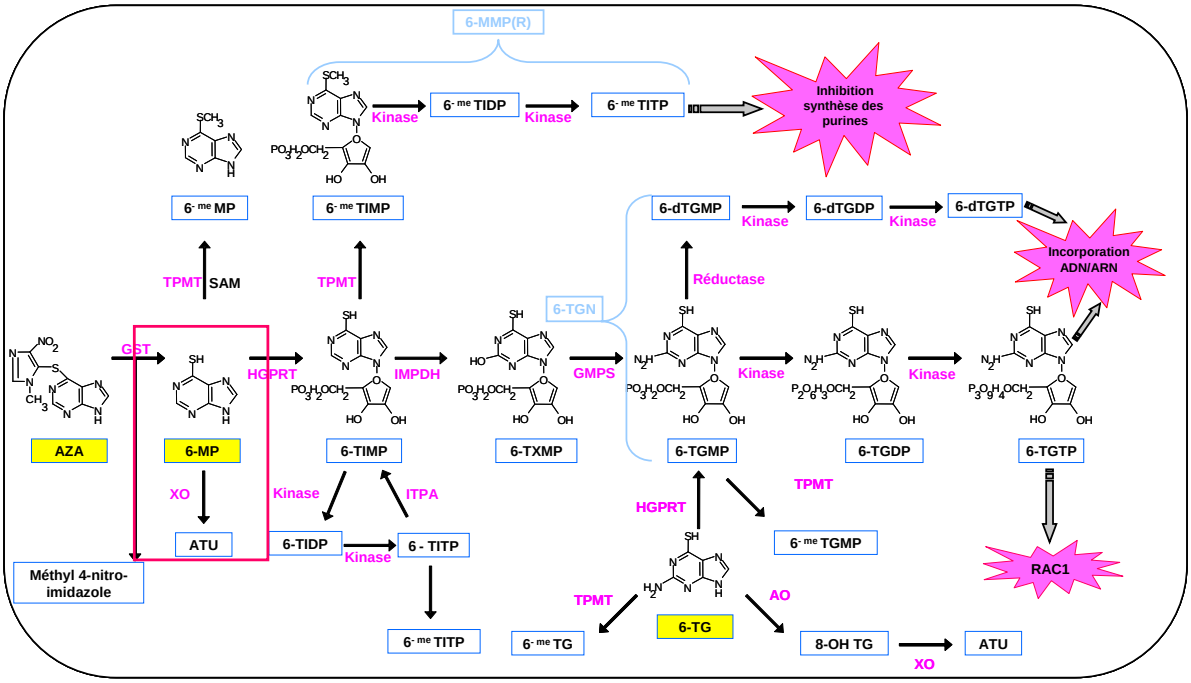

Figure 16. Place de la XO dans le métabolisme des thiopurines.

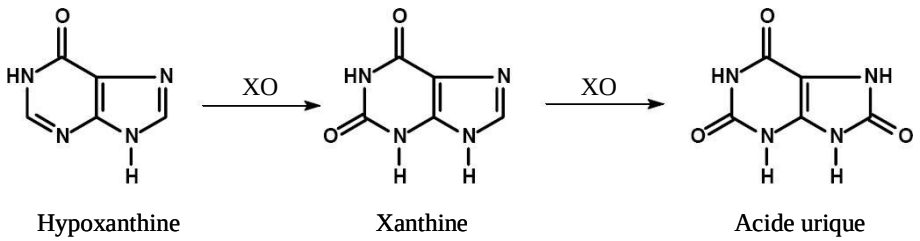

Figure 17. Réactions catalysées par la XO.

6) LA XANTHINE OXYDASE

La xanthine oxydase, encore appelée xanthine déshydrogénase, (XO ou XDH, EC 1.1.3.32) intervient de facon précoce dans le métabolisme de l'AZA et de la 6-MP, puisqu'elle prend en charge la 6-MP pour l'oxyder en 6-thioxanthine qui sera à son tour convertie en acide thiourique (ATU), métabolite inactif éliminé dans les urines **(Figure 16)**.

La XO est une enzyme cytoplasmique qui catalyse les deux dernières étapes du catabolisme des purines, à savoir l'oxydation successive de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique **(Figure 17)**. Au cours des réactions catalysées par la XO, l'oxygène peut être réduit par un ou deux électrons, ce qui conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène.

Il existe de grandes variations inter-individuelles de l'activité XO hépatique. Ainsi, il a été démontré que les hommes ont une activité XO hépatique en moyenne 21 % plus élevée que celle des femmes. Une variabilité d'activité inter-ethnique a également été mise en évidence, avec 11 % de métaboliseurs lents dans la population japonaise (Saruwatari *et al.*, 2002) contre 20 % dans la population caucasienne (Guerciolini *et al.*, 1991). Le déficit isolé en XO, à l'origine d'une xanthinurie, est une pathologie rare à transmission autosomique récessive, dont la conséquence est une accumulation de xanthine dans le plasma et dans les urines, à l'origine de lithiase xanthinique et parfois d'insuffisance rénale aiguë (Simmonds, 2003). Un second type de déficit en XO est connu, associé d'ailleurs à un déficit en sulfite oxydase, du fait d'un déficit en leur co-facteur commun, le molybdène. Dans ce cas, le tableau clinique est celui d'une encéphalopathie myoclonique précoce, associée à des lésions de nécrose cérébrale et d'encéphalopathie multikystique (Bahi-Buisson, 2005).

Le gène codant pour la XO, très polymorphe, est situé sur le chromosome 2 en position 2p22 ou 2p23 selon les auteurs (Minoshima *et al.*, 1995 ; Rytkonen *et al.*, 1995). A ce jour, une vingtaine de SNP ont été décrits au niveau de sa séquence codante. Leurs conséquences sur l'activité de la protéine sont variables. Ainsi, les mutations c.445C>T ($Arg^{149}Cys$) et c.2729C>A ($Thr^{910}Lys$) ont pour conséquence la synthèse d'une enzyme inactive. Les mutations c.1663C>T ($Pro^{555}Ser$), c.1820G>A ($Arg^{607}Gln$), c.1868C>T ($Thr^{623}Ile$), c.2727C>A ($Asn^{909}Lys$), c.3449C>G ($Pro^{1150}Arg$) et c.3953G>A ($Cys^{1318}Tyr$), quant à elles, ont pour conséquence une diminution de l'activité enzymatique de la XO. Enfin, deux autres

mutations, c.2107A>G (Ile^{703}Val) et c.3662A>G (His^{1221}Arg), entraînent une augmentation de l'activité enzymatique (Kudo *et al*., 2008).

Implication dans la réponse au traitement par thiopurines

La XO métabolise rapidement 84 % de la 6-MP en ATU, réduisant ainsi considérablement la biodisponibilité de la 6-MP, ce qui pourrait jouer un rôle, suivant un processus similaire à celui de la TPMT, dans l'efficacité thérapeutique ou la survenue d'effets indésirables. Un cas de leucopénie sévère et précoce sous AZA, ayant conduit à l'arrêt du traitement, a d'ailleurs été décrit chez une patiente transplantée rénale présentant un phénotype TPMT intermédiaire et un déficit d'activité XO (Serre-Debeauvais *et al.*, 1995). De plus, en 2007, Wong et *al.* ont décrit le cas d'une patiente traitée par 6-MP, de génotype *TPMT* sauvage, présentant une activité XO très augmentée, et incapable de produire des quantités détectables de métabolites actifs 6-TGN. Hawwa *et al.*, (2008) ont récemment évalué l'association entre des polymorphismes affectant les gènes *TPMT*, *XO* et *ITPA* et la concentration des métabolites actifs, et la survenue d'une hématotoxicité. Les patients porteurs de mutations affectant le gène codant pour la XO, conformément à l'hypothèse de départ, présentaient des concentrations supérieures de 6-TGN. Cependant, il n'a pas été possible de conclure de façon formelle quant à l'impact des mutations de XO sur la réponse au traitement pour deux raisons: d'une part, certains porteurs de mutations de XO étaient également porteurs de mutations du gène *TPMT* ; d'autre part, certains étaient traités de façon concomitante avec du méthotrexate, lui-même connu pour inhiber la XO.

Implication dans le mécanisme d'hépatotoxicité des thiopurines

Les espèces réactives de l'oxygène produites par la xanthine oxydase lors de l'oxydation de la 6-MP en 6-thioxanthine génèrent un stress oxydant, susceptible d'entraîner des lésions hépatiques (Tapner *et al.*, 2004 ; Menor *et al.*, 2004). Pour limiter leur production, certains auteurs proposent l'association d'allopurinol au traitement par AZA ou 6-MP, dont les doses seront alors réduites de 30 %, ce qui présente également l'avantage de diminuer la production des 6-MMP(R) connus pour être également hépatotoxiques (Ansari *et al.*, 2008).

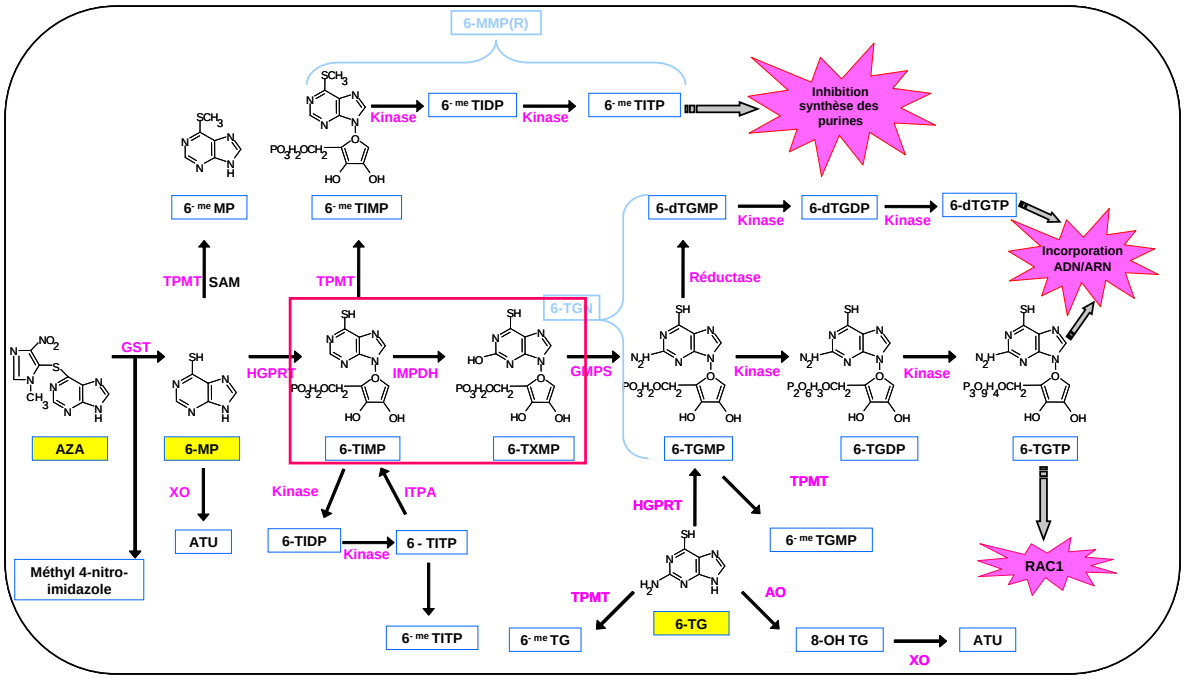

Figure 18. Place de l'IMPDH dans le métabolisme des thiopurines.

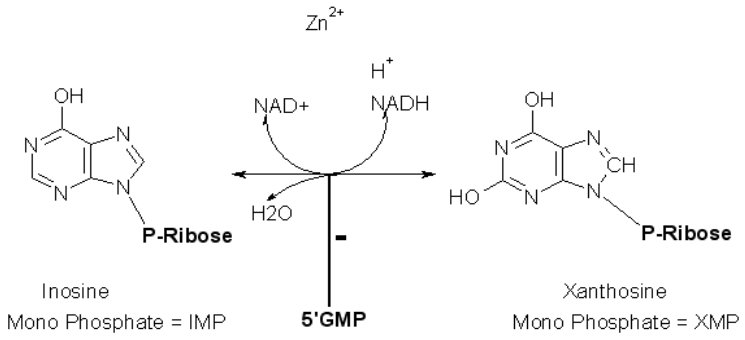

Figure 19. Conversion de l'inosine monophosphate (IMP) en xanthosine monophosphate (XMP) par l'IMPDH.

7) L'INOSINE MONOPHOSPHATE DESHYDROGENASE (IMPDH)

L'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH, EC1.11.205) est l'enzyme qui prend en charge la 6-TIMP, produite par l'HGPRT à partir de la 6-MP, pour aboutir à la formation des métabolites actifs 6-TGN **(Figure 18)**.

L'IMPDH est une enzyme-clé de la voie de synthèse *de novo* des purines. Elle catalyse la conversion de l'inosine monophosphate (IMP) en xanthosine monophosphate (XMP) **(Figure 19)**, en présence du co-substrat NAD^+ et produit les nucléotides à guanine nécessaires à la synthèse de l'ADN et donc à la prolifération cellulaire (Glesne *et al.,* 1993 ; Glesne et Huberman, 1994). Une autre voie alternative pour la synthèse des nucléotides à guanine est la voie de sauvetage ou de récupération des nucléotides, catalysée par l'HGPRT. La contribution relative de ces deux voies dans la biosynthèse des guanines nucléotides dans différents types cellulaires est à ce jour encore mal connue (Gu *et al.,* 2000).
Chez l'homme, l'activité IMPDH est portée par deux enzymes, l'IMPDH1 et l'IMPDH2, qui présentent une homologie de séquence en acides aminés de 84 %. L'IMPDH1 est exprimée dans tous les tissus à l'état basal et est donc considérée comme une forme constitutive. L'IMPDH2, surtout exprimée dans les cellules proliférantes, serait une forme inductible. Ainsi, l'augmentation de l'activité IMPDH observée dans des cellules en prolifération, comme les lymphocytes activés par des mitogènes, les tumeurs ovariennes, les tumeurs cérébrales solides, les sarcomes ou encore les cellules leucémiques (Natsumeda *et al.,* 1990 ; Konno *et al.,* 1991 ; Nagai *et al.,* 1991 et 1992 ; Collart *et al.,* 1992), est attribuée à une augmentation de l'expression et de l'activité de l'IMPDH2 (Futer *et al.,* 2002). Il existe de grandes différences dans la régulation et l'expression des deux isoformes de l'IMPDH. L'expression de l'*IMPDH1* semble plus variable que celle de l'*IMPDH2*, ce qui peut être dû à la présence de trois promoteurs alternatifs dans le gène *IMPDH1* à l'origine de trois transcrits différents (Gu *et al.,* 1997). De plus, ces deux isoformes exercent des fonctions différentes (Glesne *et al.,* 1993 ; Gu *et al.,* 1994) et non redondantes (Jain *et al.,* 2004). En effet, l'invalidation isolée du gène de l'IMPDH2 entraîne la mort embryonnaire chez la souris, ce qui démontre que l'activité de l'IMPDH1 est incapable de suppléer l'activité de l'IMPDH2 (Gu *et al.,* 2000). L'invalidation du gène *IMPDH1* a elle des conséquences beaucoup moins sévères (Gu *et al.,* 2003).

Les deux isoformes de l'IMPDH sont codées par deux gènes distincts, *IMPDH1* et *IMPDH2*, situés respectivement en position 7q31.3-32 et 3p21.2-24.2 (Glesne et Huberman 1994). De nombreuses mutations affectant le gène *IMPDH1* sont connues et constituent l'un des facteurs de développement d'une rétinite pigmentaire (RP10) et de l'amaurose congénitale de Leber, deux affections héréditaires de la rétine, tissu dans lequel l'IMPDH1 est dix fois plus exprimée que l'IMPDH2 (Bowne *et al.*, 2006a). En revanche, les mutations de l'*IMPDH1* n'affectent pas les autres tissus, dans la mesure où la diminution d'activité IMPDH1 y est compensée par l'IMPDH2 (Bowne *et al.*, 2006b). Très peu de mutations affectant la séquence du gène de l'IMPDH2 ont été décrites jusqu'à présent. Seules deux mutations sont susceptibles d'avoir un impact fonctionnel. Il s'agit, d'une part, de la substitution faux-sens c.787C>T ($Leu^{263}Phe$), qui entraîne la synthèse d'une protéine dont l'activité catalytique est fortement diminuée (Wang *et al.*, 2007), et d'autre part, d'une mutation intronique IVS7+10T>C, potentiellement associée à la survenue d'un rejet aigü du greffon chez certains patients transplantés rénaux (Grinyó *et al.*, 2008). Dans l'état des connaissances actuelles, aucune pathologie spécifique n'a été associée à un déficit enzymatique de l'IMPDH2.

L'IMPDH occupe une place centrale au sein du métabolisme des thiopurines, et, à ce titre, pourrait être un facteur de variation supplémentaire dans la réponse au traitement et la survenue d'effets indésirables, dans la mesure où une activité IMPDH élevée pourrait être corrélée à une concentration en 6-TGN importante, et inversement, à un faible taux de 6^{me}TIMP (Haglund *et al.*, 2008). Dans la mesure où l'IMPDH2 est plus exprimée que l'IMPDH1 dans les cellules néoplasiques et les cellules à réplication rapide, elle pourrait jouer un rôle plus important dans la réponse aux traitements antinéoplasiques, comme les thiopurines (Mizushina *et al.*, 2007).

Une seule étude, à notre connaissance, a étudié la séquence des gènes *IMPDH1* et *IMPDH2* dans le cadre de la réponse aux thiopurines, en l'occurrence chez 20 patients atteints de MICI et présentant une résistance au traitement par AZA (Roberts *et al.*, 2007). Alors qu'aucune mutation n'a été identifiée dans le gène *IMPDH2* chez ces patients, une insertion de 9 pb dans le promoteur de l'*IMPDH1*, réduisant significativement l'activité promotrice *in vitro*, a été identifiée chez un patient présentant une résistance sévère à l'AZA.

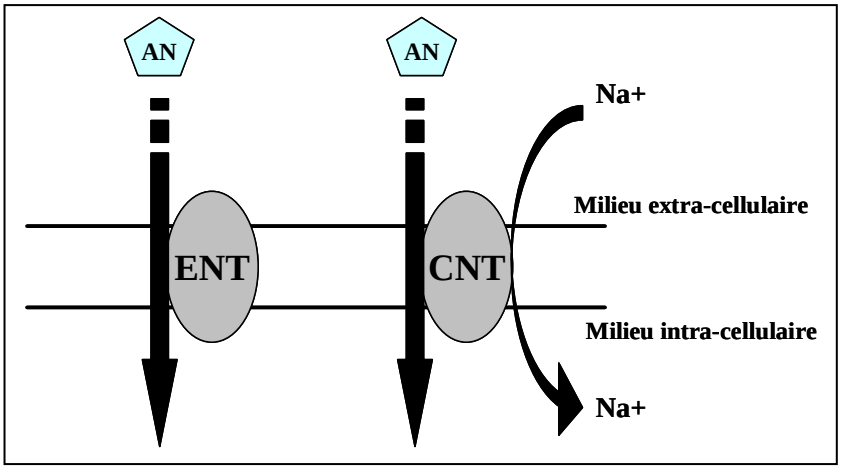

Figure 20. Représentation simplifiée des transporteurs ENT et CNT (d'après Jordheim *et al*., 2005). AN : analogue de nucléoside ; ENT : *equilibrative nucleoside transporter* ; CNT : *concentrative nucleoside transporter*.

B. LES TRANSPORTEURS

La résistance tumorale à la chimiothérapie peut être liée à l'hôte ou aux altérations génétiques ou épigénétiques des cellules malignes. Cette résistance peut s'exprimer d'emblée ou peut être acquise lors du traitement, même après une phase initiale d'efficacité. Parmi les nombreux mécanismes de résistance, la résistance dite « multidrogue » (MDR) est liée à une diminution de l'accumulation intracellulaire des agents cytotoxiques par accroissement de leur efflux hors de la cellule (Cals *et al.*, 2005). Plusieurs travaux ont ainsi montré l'implication probable de la surexpression de protéines de transport du type *MRP*, ou *Multi Drug Resistance Protein*, dans la résistance aux traitements thiopuriniques (Wielinga *et al.*, 2002 ; Reid *et al.*, 2003).
Les gènes codant pour ces transporteurs représentent donc de bons gènes candidats dans les variations inter-individuelles de réponse aux thiopurines.

1.Transporteurs d'afflux

Les *Equilibrative Nucleoside Transporters* (ENT) permettent le transport bidirectionnel de nucléosides à travers la membrane cytoplasmique jusqu'à l'équilibre des concentrations intra et extracellulaires. Plusieurs membres de cette famille ont été identifiés et sont classés en fonction de leur sensibilité à différents inhibiteurs (Jordheim *et al.*, 2005). Le transport de nucléosides par les *Concentrative Nucleoside Transporters* (CNT), quant à lui, est couplé au transport d'un ion sodium et peut se faire contre un gradient de concentration (Jordheim *et al.*, 2005) **(Figure 20)**. Les CNT et les ENT appartiennent à la superfamille des protéines SLC (*SoLute Carrier*) et certains ont été décrits comme impliqués dans l'entrée des nucléotides thiopuriniques dans les cellules.

Quatre transporteurs du type SLC ont été décrits à ce jour comme susceptibles d'assurer le transport de la 6-MP dans les cellules (PharmGKB, 2009) : SLC28A2 (CNT2), SLC28A3 (CNT3), SLC29A1 (ENT1) et SLC29A2 (ENT2) (Zaza *et al.*, 2009).
Les gènes codant pour ces quatre transporteurs sont tous polymorphes. Des mutations faux-sens ont été identifiées sur le gène *SLC28A2*, mais ne semblent pas avoir de conséquences physiologiques, ce qui pourrait s'expliquer en partie par la redondance d'activité entre

SLC28A1 et SLC28A2. Cependant, il a été démontré que, pour certains variants de SLC28A2, bien que leur fonction de transport ne soit pas altérée, leur spécificité de substrat peut être modifiée (Owen *et al*., 2005). Une mutation affectant le promoteur de *SLC28A2* a également été caractérisée et est à l'origine d'une augmentation de l'expression de la protéine (Yee *et al*., 2009).

Une dizaine de mutations faux-sens a été identifiée sur le gène *SLC28A3* (Damaraju *et al*., 2005 ; Badagnani *et al*., 2005). Parmi elles, une seule a un impact fonctionnel sur la protéine. Cette mutation, la c.1099G>A ($Gly^{367}Arg$), affecte un domaine très conservé de la protéine impliqué dans la reconnaissance des substrats et diminue de 80 à 85 % la capacité de transport des purines et des pyrimidines.

Parmi les 39 mutations mises en évidence à ce jour sur le gène *SLC29A1*, seules quatre modifient la séquence codante. Deux de ces mutations, c.647T>C ($Ile^{216}Thr$) et c.1171G>A ($Glu^{391}Lys$), n'ont aucun impact fonctionnel (Osato *et al*., 2003) et les deux autres, c.177C>G ($Asp^{59}Glu$) et c.1288G>A ($Ala^{430}Thr$) (Kim *et al*., 2006), n'ont pas encore été fonctionnellement analysées. Des polymorphismes situés en amont du site d'initiation de la transcription ont également été décrits (-1345C>G, -1050G>A et -706G>C). Parmi eux, les mutations -1345C>G et -1050G>A augmentent de façon significative l'expression de la protéine (Myers *et al.*, 2006).

Cinq mutations affectant la séquence codante ont été identifiées sur le gène *SLC29A2* (Owen *et al.*, 2006). L'une de ces mutations correspond à une délétion de 2 pb (c.845-846 del, $Ser^{282}Stop$) à l'origine de la synthèse d'une protéine tronquée non fonctionnelle et deux autres, c.551-556del (Délétion Gly185 et Val186) et c.13G>T ($Asp^{5}Tyr$), codent pour une protéine dont la fonction de transport est significativement diminuée (Owen *et al.*, 2006).

Il est légitime de penser que, dans la mesure où ces transporteurs semblent impliqués dans le passage intracellulaire de la 6-MP et de la 6-TG, leur surexpression pourrait en augmenter la concentration intracellulaire, et aboutir, au final, à une accumulation de leurs métabolites actifs, et éventuellement aboutir à une toxicité. Inversement, une diminution de l'expression de ces transporteurs pourrait en limiter le passage intracellulaire, et, finalement, aboutir à une résistance ou une moindre efficacité au traitement. Cette hypothèse a été testée *in vitro* dans des cellules lymphoblastiques (lignée MOLT4), et il a été démontré qu'une exposition de 72 h à la 6-MP ou la 6-TG entraîne une diminution de l'expression des gènes *SLC29A2* et *SLC28A3* et confère, *in vitro*, une résistance à ces molécules (Fotoohi *et al*., 2006).

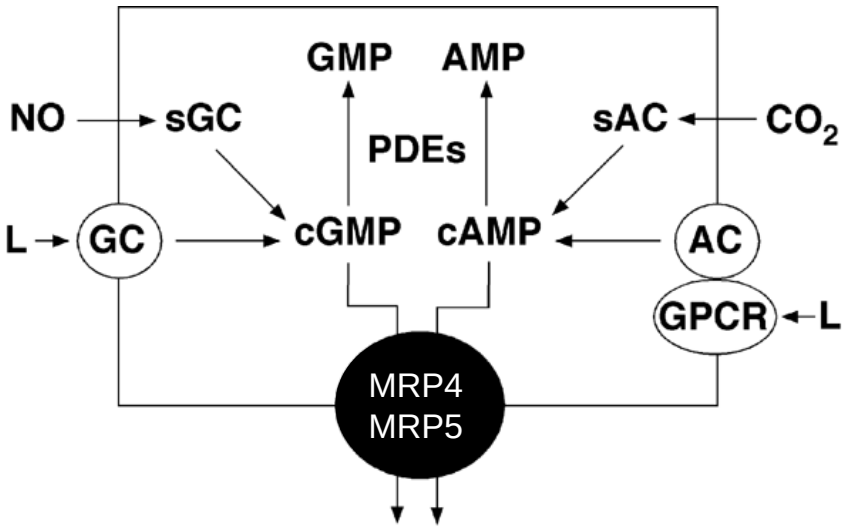

Figure 21. Rôle de MRP4 et MRP5 dans la régulation des concentrations intracellulaires des nucléotides cycliques (Chen *et al.*, 2001)**.** La synthèse de l'AMPc et le GMPc démarre lorsque l'adénylate (AC) et la guanylate cyclases (GC) sont stimulées par des peptides ligands (L) et l'oxyde nitrique (NO). Leur dégradation se produit sous l'action des phosphodiestérases (PDE). Ils sont également soumis à l'extrusion cellulaire par les transporteurs membranaires MRP4 et MRP5.

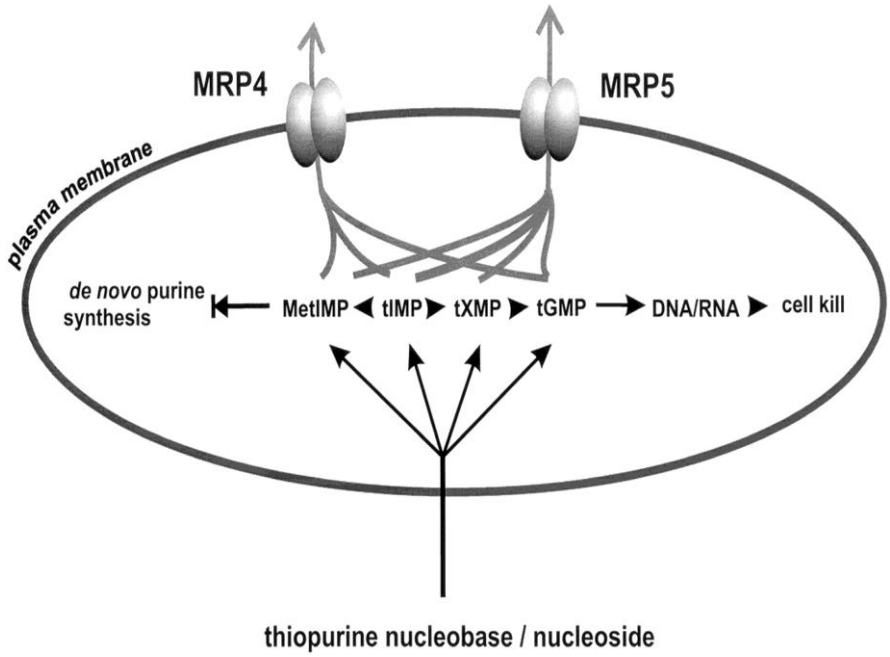

Figure 22. Rôle de MRP4 et MRP5 dans la régulation des concentrations intracellulaires des thionucléotides (Wielinga *et al*., 2002).

De plus, une étude chez des patients atteints de LAL traités seulement par 6-MP a permis de mettre en évidence une corrélation entre l'accumulation des 6-TGN dans les cellules cancéreuses et l'expression de SLC29A1 (Zaza *et al.*, 2005).

2. Transporteurs d'efflux

Les transporteurs de la superfamille des protéines ABC (*ATP-Binding Cassette)* constituent une famille de protéines membranaires, dont 49 gènes ont été identifiés chez l'homme, et sont impliqués dans des fonctions physiologiques très diverses. Ces protéines ABC assurent le transport, au travers des membranes cellulaires, d'une très grande variété de substrats (acides aminés, lipides, ions, sucres, médicaments...) **(Figure 21)** et sont ainsi responsables de certaines résistances des microorganismes aux antibiotiques et induisent des phénotypes de résistance des cellules tumorales à diverses drogues anticancéreuses (Sharom, 2008).

Parmi les membres de la superfamille des protéines ABC, ABCC4 (MRP4) et ABCC5 (MRP5) sont les plus susceptibles de jouer un rôle dans la résistance aux analogues puriniques (Schuetz *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2000 ; Wijnholds *et al.*, 2000) **(Figure 22)**. Au niveau physiologique, ces deux protéines ont en effet un rôle dans la régulation des concentrations intracellulaires des nucléotides cycliques (Adachi *et al.*, 2002 ; Kruh et Belinsky, 2003).

Les gènes codant pour MRP4 et MRP5 sont localisés sur le chromosome 13, en position 13q32 et au niveau du chromosome 3 en position 3q27, respectivement**.** De nombreuses mutations affectant la séquence codante des gènes *ABCC4* et *ABCC5* ont été décrites (Saito *et al.*, 2002 ; Adachi *et al.*, 2002), mais, à ce jour, leurs conséquences fonctionnelles *in vivo* ne sont pas connues pour toutes.

Plusieurs études ont montré que les cellules surexprimant ABCC4 sont résistantes à la cytotoxicité des thiopurines (Chen *et al.*, 2001 ; Lai *et al.*, 2002). Une étude récente sur des souris *MRP4*$^{+/+}$, $^{+/-}$ et $^{-/-}$ a montré que les cellules de la moelle osseuse des souris $^{-/-}$ sont beaucoup plus sensibles à la cytotoxicité de la 6-MP (Krishnamurthy *et al.*, 2008). Cette observation est d'autant plus intéressante qu'il a été démontré, dans une population d'enfants atteints de LAL, qu'il existe une large variation inter-individuelle d'expression de MRP4

(Sampath *et al.*, 2002). Récemment, il a été montré que ABCC4 et ABCG2 contribueraient, en collaboration, au phénomène de résistance aux analogues des nucléosides puriniques et à la régulation de leur distribution tissulaire (Takenaka *et al.*, 2007). Deux mutations du gène *ABCC4*, g.123548A>G ($Tyr^{556}Cys$) et g.139997G>A ($Val^{776}Ile$), ont été démontrées comme altérant la capacité de transport des thiopurines (Janke *et al.*, 2008). Les études concernant MRP5, moins nombreuses, ont permis de montrer que des cellules surexprimant ce transporteur deviennent *in vitro*, elles aussi, résistantes à la 6-MP et à la 6-TG (Wijnholds *et al.*, 2000).

TRAVAUX PERSONNELS

TRAVAUX PERSONNELS

Les thiopurines sont reconnues par la communauté scientifique et médicale comme des molécules essentielles de par leur efficacité dans la prise en charge thérapeutique de nombreuses pathologies et dans la prévention du rejet de greffe d'organe. Cependant, ces molécules sont également responsables de nombreux effets indésirables, parfois sévères, nécessitant souvent l'interruption du traitement. Parmi ces effets indésirables, la myélotoxicité est incontestablement le plus redouté, dans la mesure où elle peut rapidement mettre en jeu le pronostic vital du patient en cas d'aplasie médullaire. Comme nous l'avons vu, cet effet indésirable grave est souvent expliqué par une ou plusieurs mutations affectant la région codante du gène *TPMT*, diminuant l'activité de cette enzyme, et, de ce fait, entraînant une accumulation des métabolites actifs de l'AZA et de la 6-MP, les 6-TGN. Dans ce contexte, la première partie de mon travail a consisté en l'étude fonctionnelle *in vitro*, ainsi qu'en l'analyse structurale par modélisation moléculaire, de nouveaux variants rares du gène *TPMT*, dans le but d'améliorer encore le taux d'efficacité de prédiction du phénotype par génotypage.

Cependant, environ 70 % des cas de leucopénies sous thiopurines restent non expliqués par le polymorphisme génétique de la TPMT et sont donc probablement le fait d'anomalies génétiques affectant d'autres protéines impliquées dans la prise en charge cellulaire des thiopurines. Plusieurs de ces gènes candidats ont été étudiés au sein de notre équipe.

Tout d'abord, le gène codant pour l'inosine monophosphate déshydrogénase de type 2 ou IMPDH2, très peu étudié jusqu'ici dans le cadre de la réponse aux médicaments thiopuriniques, nous est apparu comme un bon candidat, étant donné sa position centrale dans le métabolisme de ces molécules.

De plus, nous nous sommes intéressés au gène codant pour la protéine RAC1, qui est désormais reconnue comme étant l'une des cibles pharmacologiques des métabolites de l'AZA et de la 6-MP. En effet, dans la mesure où le 6-TGTP, en se fixant à cette protéine, en inhibe l'effet anti-apoptotique qu'elle exerce normalement sur les lymphocytes T CD4+, ce qui participe à l'effet immunosuppresseur des thiopurines, il n'était pas déraisonnable de penser que des polymorphismes affectant le gène *RAC1* pourraient, eux aussi, contribuer à modifier la réponse au traitement par thiopurines.

I. METHODOLOGIES

Dans le cadre de mes travaux sur la pharmacogénétique des thiopurines, la stratégie méthodologique utilisée consiste en une analyse structurale et fonctionnelle de gènes candidats, basée sur le criblage de leurs séquences codantes et régulatrices, complété par l'étude *in vitro* des conséquences fonctionnelles des nouveaux variants identifiés. Ces analyses sont éventuellement complétées par des études de corrélation phénotype/génotype.

Remarque : Toutes les méthodes utilisées sont décrites en détails dans les articles composant cette thèse.

1. Analyse des variations de séquence des gènes d'intérêt

1. Echantillons d'ADN

L'ADN génomique de volontaires sains et de patients atteints de MICI, provenant de banques d'ADN constituées au laboratoire depuis plusieurs années, on été utilisées. Pour chaque individu, un consentement éclairé et signé a été obtenu et 10 mL de sang ont été prélevés. L'ADN génomique a été isolé et purifié à partir des leucocytes selon des procédures classiques, à l'aide de kits commerciaux.

2. Analyse des variations de séquence

La méthode utilisée est basée sur l'analyse du polymorphisme de conformation de fragments d'ADN simple brin générés par réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction - Single Strand Conformation Polymorphism* ou PCR-SSCP). Cette méthode est appliquée au promoteur, aux exons (incluant les sites donneurs et accepteurs d'épissage, ainsi que les codons d'initiation et de terminaison de la traduction) et à la région 3'-flanquante, des gènes analysés. Le principe de cette technique repose sur le fait que la mobilité des simples brins d'ADN soumis à une électrophorèse en milieu non dénaturant dépend de leur conformation ou structure tridimensionnelle et, par conséquent, de leur séquence

nucléotidique (Orita *et al.*, 1989). Toute variation de migration électrophorétique, identifiée entre les échantillons testés et un échantillon de référence de séquence connue traduit la présence d'une modification de séquence. Le séquençage des fragments d'ADN qui présentent un profil SSCP « anormal » permet ensuite de déterminer la nature et la position de la mutation. Les profils de référence sont obtenus par séquençage d'un échantillon d'ADN provenant d'un volontaire sain et par comparaison avec les séquences « sauvages » publiées.
Cette technique SSCP apparaît particulièrement bien adaptée à la détection et à l'identification d'anomalies de séquence dans nos gènes d'intérêt, qui ont tous des exons relativement courts, généralement inférieurs à 300 pb, l'efficacité de cette technique étant en effet corrélée à la taille des séquences analysées et optimale pour des fragments PCR de 100 à 300 pb (Hayashi et Yandell, 1991 ; Sheffield *et al.*, 1993).

2. Analyse fonctionnelle des variations de séquence affectant nos gènes-candidats

1. Mutations affectant la séquence codante

Analyse fonctionnelle *in vitro*

L'analyse de l'impact fonctionnel des mutations de type faux-sens nécessite généralement l'expression de la protéine mutante dans un système cellulaire hétérologue. Le système que nous avons choisi repose sur l'utilisation de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, et plus particulièrement sur la souche W(R) (gracieusement offerte par le Dr. Denis Pompon, CNRS, Gif-sur-Yvette). Le choix de ce système d'expression a été conditionné par sa relative simplicité de mise en œuvre et par les résultats satisfaisants obtenus dans notre laboratoire avec ce système pour l'analyse de nombreux polymorphismes, dont ceux de la TPMT (Hamdan-Khalil *et al.*, 2003 et 2005).
Brièvement, après extraction des ARN totaux à partir de tissus divers (leucocytes, tissus hépatique ou pulmonaire provenant d'exérèses chirurgicales) et après rétro-transcription, l'ADN complémentaire (ADNc) sauvage des gènes d'intérêt, ainsi que les ADNc mutés obtenus par mutagenèse dirigée, sont clonés dans un vecteur d'expression (pYeDP60 ou V60) et transfectés dans *S. cerevisiae*. Après culture des levures et préparation de la fraction sub-cellulaire où s'exprime la protéine recombinante (fraction cytosolique dans le cas de la TPMT), des cinétiques enzymatiques sont réalisées à l'aide de substrats-tests de l'enzyme

étudiée et *via* l'utilisation de techniques analytiques du type HPLC-UV. Les paramètres cinétiques, Km et Vmax, sont calculés grâce à l'équation de Eadie-Hoffstee (Vi = f (Vi/[S]) = -Km X Vi/[S] + Vmax) à l'aide du logiciel Grafit Version 3.0 (Erithacus Software, Surrey, Royaume-Uni). Les paramètres cinétiques obtenus pour chacun des variants, ainsi que la clairance intrinsèque qui reflète l'activité catalytique globale de l'enzyme (Vmax/Km), sont alors comparés à ceux obtenus pour la forme sauvage de la protéine. Une estimation de la quantité des protéines recombinantes est également effectuée à l'aide d'un *Western Blot*.

Analyse structurale par modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire d'une protéine, voire de ses variants, repose sur des analyses informatiques plus ou moins complexes, dont l'interprétation, et donc la pertinence des résultats, dépendent des informations dont on dispose sur la protéine. L'une des approches les plus simples est la modélisation par homologie comparative, qui est utilisable dès lors que la protéine à modéliser présente une forte homologie avec une protéine de référence dont on connaît la structure tridimensionnelle (3D). Cette structure 3D de référence est obtenue préalablement par une approche expérimentale grâce à des méthodes physiques qui fournissent les éléments indispensables à la connaissance de la géométrie moléculaire, et est ensuite utilisée comme modèle pour la structure 3D de la protéine « requête ». La modélisation par homologie comparative repose sur le concept suivant : la structure 3D des protéines qui présentent des fonctions similaires est plus conservée au cours de l'évolution que leur séquence primaire en elle-même. La fiabilité des résultats dépend toutefois du degré d'identité entre les séquences, un seuil minimum de 30 % d'homologie étant couramment admis pour considérer les résultats comme fiables.

Recherche des structures de référence

Il est dans un premier temps nécessaire d'identifier des protéines de structure connue apparentées à la séquence à modéliser. Ces structures sont rassemblées dans une base de données, la Protein Databank (PDB) (http://www.rcsb.org/pdb/), qui contient les coordonnées tridimensionnelles d'un nombre important, et régulièrement incrémenté, de protéines, d'acides nucléiques ou de complexes ligands-protéines. Pour identifier, dans cette base de données, les structures de référence les plus pertinentes, nous avons utilisé le logiciel BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tool). Ce logiciel recherche des alignements locaux entre

la séquence primaire du modèle à construire et une série de références contenues dans la PDB et leur attribue un score d'identité permettant d'accéder rapidement aux protéines les plus proches de la séquence primaire d'entrée.

Alignement des séquences

La seconde étape de la modélisation par homologie comparative consiste à aligner la séquence primaire à modéliser avec les séquences de référence, en prenant soin de superposer les zones structurellement conservées. Parmi les logiciels effectuant cette opération, qui est cruciale pour la qualité du modèle final, ClustalW 1.81 est l'un des plus utilisés en raison de sa flexibilité dans la gestion des zones les moins conservées. Il fonctionne en optimisant le score global de la superposition de deux séquences, défini comme la somme des scores individuels de chaque paire d'acides aminés, diminué des pénalités pour les gaps, c'est à dire les acides aminés pour lesquels l'une des séquences n'a pas de correspondance dans l'autre séquence.

Construction, minimisation et évaluation du modèle

La troisième étape de la modélisation moléculaire fait appel aux logiciels Sybyl 6.9.1 et Jackal, implémentés sur une station de travail Silicon Graphics Octane 2 fonctionnant sous environnement UNIX. Pour chaque alignement, les coordonnées des carbones α de la structure de référence sont transférées aux carbones α du modèle. Les chaînes latérales du modèle sont alors ajoutées et leur position spatiale est ajustée pour minimiser les contacts entre atomes en faisant appel à une bibliothèque de rotamères. Enfin, la dernière étape consiste à évaluer le modèle obtenu tant au niveau de la structure secondaire que de la géométrie des acides aminés.

2. Mutations affectant la région promotrice

Il est généralement moins aisé d'évaluer l'effet des mutations qui sont situées en dehors de la séquence codante du gène analysé. Des mutations situées dans les régions introniques peuvent modifier les mécanismes d'épissage (De Morais et *al.*, 1994 ; Bracco et Kearsey, 2003), celles situées dans la région 3'-flanquante peuvent altérer la stabilité des ARNm et donc modifier la quantité de protéines synthétisées (Faletto et *al.*, 1992). Classiquement, l'influence des polymorphismes affectant les séquences régulatrices de l'expression des gènes

(localisées le plus souvent dans le promoteur) est étudié *in vitro* par mesure de l'activité transcriptionnelle d'un gène rapporteur à l'aide de divers systèmes cellulaires d'expression. Nous avons choisi d'utiliser, comme gène rapporteur, le gène de la luciférase.

II. TRAVAUX PERSONNELS SUR LE GENE *TPMT*

Il est désormais reconnu que des anomalies de la séquence codante du gène *TPMT* peuvent entraîner une altération de son activité enzymatique et ainsi être à l'origine de variations inter-individuelles dans la réponse aux médicaments thiopuriniques (Relling *et al.*, 1999a ; Evans *et al.*, 2001). Ainsi, pour des doses standard de ces médicaments, les individus porteurs d'un ou de deux allèles non fonctionnels du gène *TPMT* présentent un risque accru de développer une toxicité hématologique sévère, en raison de l'accumulation excessive de métabolites cytotoxiques, les 6-TGN, dans les cellules hématopoïétiques.

Le génotypage des trois mutations inactivatrices les plus fréquentes, c.238G>C, c.460G>A et c.719A>G, caractéristiques des allèles *TPMT*2, *3A, *3B, *3C et *3D*, permet d'identifier 80-95 % des individus méthyleurs lents ou intermédiaires (Yates *et al.*, 1997 ; Krynetski et Evans, 2000 ; Schaeffeler *et al.*, 2004). L'identification de nouvelles mutations inactivatrices permet donc d'améliorer l'efficacité de prédiction du phénotype des individus par génotypage.

Dans notre étude, les séquences codantes, ainsi que la région promotrice du gène *TPMT*, ont été analysées chez des patients présentant un phénotype méthyleur intermédiaire, mais non porteurs des mutations inactivatrices fréquentes, mentionnées ci-dessus. Quatre polymorphismes ont été identifiés, correspondant à deux mutations précédemment décrites, c.356A>C (p.Lys^{119}Thr, *TPMT*9*) et c.205C>G (p.Leu^{69}Val, *TPMT*21*), et à deux nouvelles mutations faux-sens, c.537G>T (p.Gln^{179}His, *TPMT*24*) et c.634T>C (p.Cys^{212}Arg, *TPMT*25*). Pour déterminer les paramètres cinétiques (Km et Vmax) de ces variants pour la *S*-méthylation de la 6-thioguanine, substrat de la TPMT, ils ont été exprimés dans la levure *Saccharomyces cerevisae*, selon le protocole décrit précédemment. De plus, des études structurales, menées par modélisation moléculaire, ont été effectuées dans le but d'expliquer l'impact potentiel des substitutions d'acides aminés sur la structure des protéines mutantes.

Au total, ces travaux nous ont permis de montrer que les mutations c.356A>C et c.537G>T n'affectent pas de manière significative l'activité catalytique des enzymes recombinantes correspondantes, ce qui ne permet donc pas de définir les allèles *TPMT*9* et *TPMT*24* comme non fonctionnels. Les mutations c.205C>G et c.634T>C, quant à elles, entraînent la

synthèse de protéines mutantes présentant une clairance intrinsèque significativement diminuée par rapport à celle de la protéine sauvage et, par conséquent, caractérisent des allèles non fonctionnels de la TPMT (*TPMT*21* et *TPMT*25*).

Characterisation of novel defective thiopurine S-methyltransferase allelic variants.

Garat A, Cauffiez C, Renault N, Lo-Guidice JM, Allorge D, Chevalier D, Houdret N, Chavatte P, Loriot MA, Gala JL, Broly F.

Biochem Pharmacol. 2008 ; 76:404-15.

III. TRAVAUX PERSONNELS SUR LE GENE *IMPDH2*

Etant donné la position centrale de l'IMPDH2 dans la production des métabolites actifs des médicaments thiopuriniques et la large variabilité inter-individuelle d'activité IMPDH (Glander *et al.*, 2004), son gène représente un bon candidat dans le cadre de la pharmacogénétique de ces molécules. Afin de caractériser le polymorphisme génétique de ce gène, nous avons développé une méthode d'analyse par *PCR-SSCP* de ses séquences codantes et de ses régions 5'- et 3'-flanquantes et l'avons appliquée à une population de volontaires sains d'origine caucasienne.

La première étape de l'analyse PCR-SSCP du gène *IMPDH2* consiste en une série de 16 PCR indépendantes, permettant l'amplification spécifique de chacun des 14 exons et de deux fragments couvrant sa région 5'-flanquante. Ces deux fragments de la séquence promotrice contiennent respectivement un site de reconnaissance potentiel pour le facteur de transcription POS (*Palindromic Octamer Sequence*) et cinq sites potentiels de fixation pour les facteurs de transcription, AML1, CRE(A), Egr/Sp1, CRE(B) et Sp1. La région 3'-flanquante étudiée, et contenue par le fragment PCR couvrant également l'exon 14, comprend le site de polyadénylation du gène (Zimmermann *et al.*, 1997).
La seconde étape consiste en l'analyse SSCP, à proprement parlée, de chacun des 16 produits PCR.

Cette stratégie PCR-SSCP a été appliquée à l'analyse de 96 échantillons d'ADN génomique provenant de volontaires sains d'origine caucasienne et a permis de mettre en évidence quatre mutations du gène de l'IMPDH2, dont trois rares (fréquence de l'ordre de 1 %) et une relativement fréquente (fréquence de l'ordre de 15 %)**:** (1) une substitution c.-95T>G située dans la région 5'-flanquante ; (2) une mutation située à proximité du site donneur d'épissage de l'intron 7 (IVS7+10T>C); (3) une mutation silencieuse dans l'exon 9 (c.915C>G ou $Val^{305}Val$) ; et (4) une insertion d'un nucléotide (g.6971_6972insT) localisée une paire de base en amont du site de polyadénylation (AATAAA). A l'origine de ces travaux, aucune de ces mutations n'avaient été préalablement identifiée. Très récemment, cependant, la mutation IVS7+10T>C a été décrite dans la littérature et est suggérée comme impliquée dans le risque de rejet aigu de greffe rénale chez les patients traités par le mycophénolate mofétil (Cellcept®) (Grinyó *et al.*, 2008).

Si la mutation silencieuse peut être considérée comme a priori sans conséquence sur l'activité de l'enzyme, il reste difficile d'estimer, au vu de leur nature et de leur localisation, l'impact des autres mutations sur l'expression et/ou l'activité de l'IMPDH2. Néanmoins, il apparaît que la mutation c.-95T>G (**T**GACGAAA > **G**GACGAAA) abolit un site de reconnaissance pour le facteur CRE(A) (*cAMP Response Element*), ce qui justifiait d'étudier ce variant d'un point de vue fonctionnel.

Afin d'étudier l'influence de la mutation c.-95T>G sur l'expression de l'*IMPDH2*, les séquences promotrices, sauvage et mutée, ont été amplifiées à partir d'un individu hétérozygote pour cette mutation et les fragments PCR correspondants ont été clonés dans le vecteur pGL3, en amont d'un gène rapporteur, celui de la luciférase. Après transfection de cellules humaines de la lignée rénale HEK293 et de la lignée lymphocytaire Jurkat, l'activité luciférase a été mesurée sur les lysats cellulaires afin d'estimer le taux d'activité transcriptionnelle de chacune des séquences, sauvage et mutée. Cette analyse a permis de montrer, d'une part, que la séquence promotrice sauvage présente bien une activité transcriptionnelle et, d'autre part, que la séquence promotrice mutée présente une activité transcriptionnelle significativement diminuée par rapport à celle de la séquence sauvage, de 55 % dans la lignée HEK 293 et de 65 % dans la lignée Jurkat. Il reste à confirmer l'impact *in vivo* de ce polymorphisme sur l'activité IMPDH2, en particulier en réalisant une étude de corrélation phénotype/génotype dans une large population d'individus sains.
Il reste également à analyser la séquence du gène *IMPDH2* dans une population de patients traités par AZA/6-MP et ayant développé une leucopénie, dans le but d'examiner l'hypothèse d'un lien entre cet effet indésirable des thiopurines et le polymorphisme génétique de l'*IMPDH2*.

Au total, cette analyse du polymorphisme génétique de l'*IMPDH2* a permis de démontrer le caractère relativement peu polymorphe de ce gène, mais d'identifier toutefois un polymorphisme qui diminue *in vitro* l'expression de cette enzyme. Cette variabilité d'expression de l'IMPDH2, si elle se confirme *in vivo*, pourrait être à l'origine de variations de réponse aux médicaments thiopuriniques, voire à d'autres médicaments tels que le mycophénolate mofétil, dont l'IMPDH constitue la cible pharmacologique.

IMPDH2 genetic polymorphism: a promoter SNP disrupts a cAMP Responsive Element.

Garat A, Cauffiez C, Hamdan-Khalil R, Glowacki F, Devos A, Leclerc J, Lionet A, Allorge D, Lo-Guidice J-M, Broly F.

Article accepté dans *Genetic Testing and Molecular Biomarkers.*

IMPDH2 genetic polymorphism: a promoter SNP disrupts a cAMP Responsive Element

Anne Garat[1*], Christelle Cauffiez[1*], Rima Hamdan-Khalil[1,2], François Glowacki[1,3], Aurore Devos[1], Julie Leclerc[1], Arnaud Lionet[3], Delphine Allorge[1], Jean-Marc Lo-Guidice[1], Franck Broly[1].

[1] EA2679, Faculté de Médecine, Pôle Recherche, 1 place de Verdun, Lille, France

[2] Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, American University of Beirut, Beirut, Lebanon

[3] Pôle de Néphrologie, Hôpital Calmette, CHRU Lille, France

* Both authors contributed equally to this work

Running title : IMPDH2 genetic polymorphism

ABSTRACT

The inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) activity which catalyzes a key step in the *de novo* biosynthesis of guanine nucleotide is mediated by two highly conserved isoforms, IMPDH1 and IMPDH2. In this study, *IMPDH2* genetic polymorphism was investigated in 96 individuals of Caucasian origin. Four mutations were identified, comprising one previously described in the close vicinity of the consensus donor splice site of intron 7 (IVS7+10T>C), and three novel mutations: one silent mutation in exon 9 (c.915C>G), one nucleotide insertion (g.6971_6972insT) within the 3'-untranslated region of the gene and one substitution located in the promoter region (c.-95T>G) that disrupts the transcription factor binding site CRE(A). Considering the nature and location of this latter polymorphism, its functional relevance was examinated by transfecting HEK293 and Jurkat cell lines with constructs of the related region of *IMPDH2/*luciferase reporter gene. The c.-95T>G mutation leads to a significant decrease of luciferase activity (HEK293: -55%, Jurkat: -65%; $p<0.05$) compared to the wild-type promoter sequence and, therefore, is likely to determine interindividual differences in *IMPDH2* transcriptional regulation. These results might contribute to a better understanding of the variability in clinical outcome and dose adjustments of immunosuppressors that are metabolized through the IMPDH pathway or are IMPDH inhibitors.

KEYWORDS: *IMPDH2*, genetic polymorphism, Promoter polymorphism, immunosuppressors.

INTRODUCTION

Guanine nucleotides are crucial prerequisites for many cellular functions including transmembrane and intracellular signaling, DNA replication and RNA and protein synthesis. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH, EC1.1.1.205) is a rate-limiting enzyme in the *de novo* pathway for synthesis of these nucleotides [1]. Although the majority of cell types are able to generate purine nucleotides via either the *de novo* pathway or a salvage pathway, lymphocytes are completely dependent upon the *de novo* route [2]. IMPDH activity has been shown to increase during cell proliferation and malignant transformation [3-5], making IMPDH an attractive target for anticancer, antimicrobial, antiviral and immunosuppressive drugs [1, 6-9].

The enzymatic activity of IMPDH is composed of two distinct but nearly identical isoforms encoded by two genes, namely *IMPDH1* and *IMPDH2*. Even if they exhibit disparities in term of length (more than 18 kb for type I gene versus 5.8 kb for type II) and chromosomic localization (7q31.3-q32 versus 3p21.2-p24.2, respectively), both genes contain 14 highly conserved exons [10-11]. The two isoforms are 84% identical at the amino acid level [4. 12] and display substrate affinities, catalytic activities, and K_i values that are virtually indistinguishable [13, 14]. Despite the high level of identity, the two isoforms are not mutually redundant. Homozygous deletion of *IMPDH2* gene results in embryonic lethality at day 9 of gestation in mice [15], indicating that the activity of IMPDH1 enzyme is unable to substitute for the activity of IMPDH2 enzyme during early embryonic development. Deletion of the type I gene has a milder effect on phenotype [16]. In addition, while both isoforms are expressed in most tissues, the regulation of the expression of both *IMPDH* genes differs significantly [17-19]. The increased IMPDH activity observed in replicating or neoplasic cells is largely due to an increased expression of the IMPDH type II mRNA, whereas type I gene remains constitutively expressed during cell proliferation or transformation [20-21]. Disparities in 5'-regulatory sequences of type I and II *IMPDH* genes probably explain these divergences. While expression of the *IMPDH1* gene is controlled by three distinct promoter sequences in a tissue-specific manner [18], the *IMPDH2* gene is regulated by a single promoter [17], which contains various transcription factor binding sites, such as tandem CRE motifs, a Sp1 site, an overlapping Egr-Sp1 site and a palindromic octamer sequence (POS). These motifs bind with nuclear factors identified as candidate mediators of growth regulated *IMPDH2* gene expression [22].

Table 1. PCR primers and SSCP conditions used for analysis of the *IMPDH2* gene

1.1 ***PCR*** fragments	**Primer sequence (5'**
Pro 1	F-AGGCTCCTGTG R-CGCATGCGTAT
Pro 2	F-CTTCAGCGCCA R-TGCCCCCACTA
Exon 1	F-CTGACGTCAGC R-CTTCGCCCAGG
Exon 2	F-GAGAGCTTTAC R-TGATGTTCAGG
Exon 3	F-CCACACTGGTT R-CTCCTTCCCCC
Exon 4	F-CCTGCTTCTTGT R-CAAGGAGCGCT
Exon 5	F-GATGCCCTTTCT R-GCTTGGATCTA
Exon 6	F-ACTGGCCCTTCT R-CAGGCCCTTTC
Exon 7	F-GCCTAGGGTCC R-TATTGCCCCAA
Exon 8	F-CACATCACAGT R-CCACCACACAT
Exon 9	F- CTTCACATGAGCA R-CTCTGTGGGCC
Exon 10	F-CTATCCACCCAT R-ACTGGCCTTCA
Exon 11	F-CTAACCCAAGC R-GGTGGGGTAAC
Exon 12	F-TGACCTTGCCC R-CTCTACCCATG
Exon 13	F-GGCCAGCTACC R-TATGGCAGAGC
Exon 14	F-TTTCTCCTGCCC R-TGTTGAAGATC

F: forward, R: reverse.

At the molecular level, *IMPDH1* genetic polymorphism has been analyzed in a large extent and numerous missense mutations had been identified as responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa [23-24]. Until recently, IMPDH2 has retained less interest and only a few *IMPDH2* polymorphisms have been described so far, especially a missense mutation, $Leu^{263}Phe$, likely associated with an altered enzyme activity [25], and an intronic mutation (IVS7+10T>C) potentially associated with Biopsy Proven Acute Rejection in kidney transplantation [26]. The objective of this study was to analyze the full extent of *IMPDH2* polymorphism and to explore the *in vitro* consequences of potentially relevant mutations. We screened all the 14 *IMPDH2* exons, their 5'- and 3'-splice site consensus sequences, as well as the described 5'-regulatory region, in genomic DNAs from 96 individuals of Caucasian origin. Four Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) were identified and the functional impact of one of them, located in the promoter region, was assessed.

MATERIAL AND METHODS

DNA samples

DNA samples from 96 healthy French volunteers of Caucasian origin were collected after ethical committee approval and informed consent of each individual had been obtained. Total genomic DNA was isolated from peripheral leukocytes using the Nucleon BACC3 kit (Amersham Pharmacia Biotech, Saclay, France), according to the manufacturer's instructions.

Single strand conformational polymorphism analysis and sequencing

Sixteen different PCRs were performed on each DNA sample from the 96 French Caucasians to individually amplify the 14 exons of the *IMPDH2* gene, including their 5'- and 3'-splice site consensus sequences, and two sequences spanning the promoter region. Specific primers were designed based on the published nucleotide sequence of the gene (Genbank L39210.1). The name, sequence and location of primers are listed in **Table 1**. Each amplification reaction was carried out in a total volume of 25 µL 10 mM Tris-HCl buffer pH 8.4 containing 50 mM KCl, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 µM of each primer, 200 ng DNA and 0.6 U Taq DNA polymerase (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). $MgCl_2$ concentration, annealing temperature and number of cycles were optimized for each primer set (**Table 1**). After an initial denaturation step at 94°C for 120 sec, 30-34 cycles of 60 sec at 94°C, 90 sec at an optimized annealing temperature and 90 sec at 72°C were carried out. A final extension

period of 7 min was performed at 72°C. Size and specificity of PCR fragments were controlled on 1% agarose ethidium bromide-stained gels.

Nonisotopic SSCP analysis of PCR fragments was performed on a Genephor Electrophoresis Unit (Amersham Pharmacia), according to the manufacturer's instructions. PCR products were diluted (1:1) with formamide containing 0.05% bromophenol blue and 0.05% xylene cyanol and submitted to a denaturation step at 95° for 4 min, followed by rapid cooling on ice. Samples were then loaded into the wells of a precasted 12.5 % polyacrylamide gel (Gene Gel Excel 12.5/24) for non-denaturing electrophoresis. Conditions to obtain the clearest and sharpest signals for the different fragments are reported in **Table 1**. Gels were stained using the DNA Silver Staining Kit (Amersham Pharmacia). In order to avoid erroneous shift of electrophoretic mobility due to mutations resulting from possible replication errors of the DNA polymerase, the PCR-SSCP procedure was repeated twice when a sample displayed a SSCP pattern different from that of a reference sample with a wild-type sequence. Nucleotide sequences were determined using an automated DNA sequencer (ABI Prism® 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems Inc.). Fragments were amplified by PCR with primers used for the PCR-SSCP strategy and labeled with the BigDye® Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems Inc).

Genotyping of the g.3375C>T mutation

To allow a rapid genotyping of the g.3375C>T ($Leu^{263}Phe$) mutation described by Wang et al. [25], a PCR-RFLP-based assay was performed. After amplification with IMPDH2-7F and IMPDH2-7R primers **(Table 1**), PCR products were digested with the endonuclease *Cac8*I (New England Biolabs, Ipswich, MA), which cleaves the wild-type allele in two fragments (206 and 63 bp), but leaves uncut the g.3375T allele (269 bp). The digested PCR fragments were then analyzed on a 2 % agarose ethidium bromide-stained gel.

Construction of luciferase reporter gene plasmid

Genomic DNA sample from an individual heterozygous for the c.-95T>G substitution was used as a template to amplify the promoter region (- 493 to + 28) of the *IMPDH2* gene. PCR was performed using the sense primer LucF 5'-CTT AAA GCT TGA GGC TCC TGT GC-3', the antisense primer ProR 5'-TGC CCC CAC TAA TCA GGT AG-3', and the Pfx DNA polymerase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) following the manufacturer's instructions.

The underlined nucleotides were mismatched (guanine and thymine instead of adenine and cytosine respectively) to create a *Hind*III restriction site at the 5'-end of the PCR products. After purification with the Quiaquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany), the amplified fragments were cloned between the *Hind*III and *Nco*I restriction sites of the promoterless eukaryotic expression pGL3-Basic Vector (Promega, Madison, USA), a 4818-bp plasmid that contains the luciferase reporter gene. After purification with the Qiagen plasmid Midi Kit (Qiagen), plasmid constructs containing either the mutated or the wild-type fragment were controlled by sequencing to check that no artefactual mutation had been introduced during the amplification step.

Transient transfection assays

Analysis of the effect of the c.-95T>G variant on the promoter activity of a reporter gene was performed by transient transfection assay in the human kidney cell line HEK 293 using the lipofectamine reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's recommendations, and in Jurkat lymphocytes by electroporation (Easyject+, Eurogentec, Seraing, Belgium; 250V; capacitance 1500 µm). A pSV-β- galactosidase control vector (Promega) was co-transfected with each pGL3 construct to normalize the transfection efficiency.

Cell extract preparation and luciferase activity measurement

Thirty six hours after transfection, cells were disrupted with the reporter lysis buffer (Promega) and thermic shocks. Luciferase activity was measured using a Berthold Lumat LB 9501 luminometer in 100 µL reagent buffer that contains 25 mM Tris-phosphate pH 7.8, 8 mM $MgCl_2$, 1 µM dithiotreitol, 0.5 % triton X100, 18 % glycerol, 16 mM ATP, and 2 mM luciferine (Promega). Transfection and reporter assays were repeated in two independent experiments, each experiment comprising three replicates. Statistic analyses were performed using Anova and the Tuckey Post Hoc test. A value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

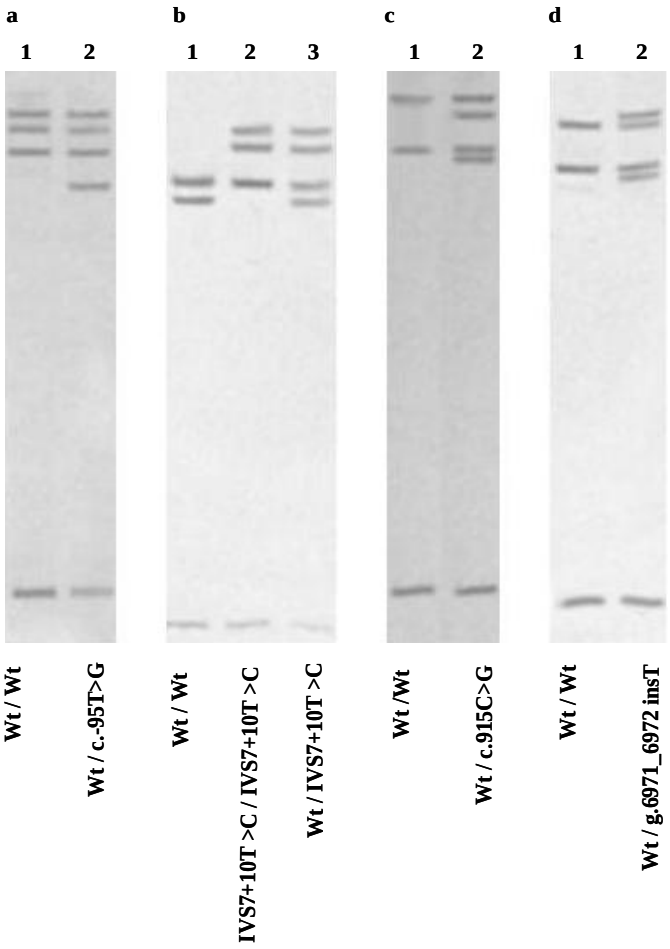

Figure 1. PCR-SSCP analysis of the human *IMPDH2* gene. The 14 exons with their splice site junctions and the promoter region of *IMPDH2* were separately amplified from genomic DNAs from 96 individuals of Caucasian origin. The PCR products were then submitted to electrophoresis in non-denaturing gels. One DNA sample with a wild-type genotype (lanes 1, wt) was used as a reference sample for SSCP analysis. Abnormal SSCP patterns were observed for the promoter region (a), PCR fragments encompassing exon 7 (b) and exon 9 (c) and the 3'-UTR (d). Results from sequencing analysis of the corresponding fragments are reported at the bottom of the gels.

Table 2: Genetic polymorphism of the *IMPDH2* gene in 96 individuals of Caucasian origin

Mutation	Location	Allele frequency (%) (n = 192*)
c.-95T>G	promoter	0.5
IVS7+10T>C (rs11706052)	intron 7	14.6
c.915C>G	exon 9	0.5
g.6971_6972 insT	3'-UTR	1.0

*Number of alleles

RESULTS

1.1.1

1.1.1 Identification of SNPs in the human *IMPDH2* gene

To detect sequence variations in the *IMPDH*2 gene, a PCR-SSCP strategy was developed and applied to genomic DNAs from 96 unrelated individuals of Caucasian origin. One DNA sample, obtained from a homozygote for a wild-type allele of *IMPDH2,* as confirmed previously by sequencing, was used as a reference sample for SSCP analysis. Out of a total of 96 DNA samples, 65 were identified as homozygous for an apparent wild-type *IMPDH2* allele (**Fig 1**). In contrast, 31 samples showed distinctive mobility shifts in at least one of the 16 PCR products, indicating the presence of mutation(s) in the corresponding region (**Fig 1**). Sequencing of these fragments allowed the characterization of four different polymorphisms. Their frequency is reported in **Table 2**.

The first mutation (**Fig 1a**) corresponds to a nucleotide substitution within the 5'-flanking region of the gene at position c.–95 (transition T^{-95} to G). The second polymorphism (**Fig 1b**) corresponds to a previously described point mutation located in the close vicinity of the consensus donor splice site of intron 7 (IVS7+10T>C, rs11706052). This mutation was found in a homozygous state in one individual (**Fig 1b, lane 2**). The third polymorphism was detected in exon 9 (**Fig 1c**) and corresponds to a silent mutation (c.915C>G, p.Val305Val). The last polymorphism was identified downstream of exon 14, in the 3'-UTR of the gene (**Fig 1d**). It consists of a T insertion located 1bp upstream of the polyadenylation site AATAAA (g.6971_6972insT).

The analysis of the distribution of the mutations described above allowed the characterization of 5 different *IMPDH2** alleles in our population. They comprise the wild-type allele, *IMPDH2*1*, which is the most frequent (83.4 %), and four alleles that we termed *IMPDH2*1B, IMPDH2*2, IMPDH2*3* and *IMPDH2*4*. These novel alleles have been submitted to GenBank with accession numbers AY491523, AY491521, AY491522 and AF491524, respectively. The *IMPDH2*1B*, *IMPDH2*2*, *IMPDH2*3* and *IMPDH2**4* alleles carry the mutations c.915C>G, c.–95 T>G, IVS7+10T>C and g.6971_6972insT, respectively.

As the g.3375C>T substitution, corresponding to the Leu^{263}Phe mutation described by Wang et al. [25], was not detected in our Caucasian population by PCR-SSCP analysis, a PCR-

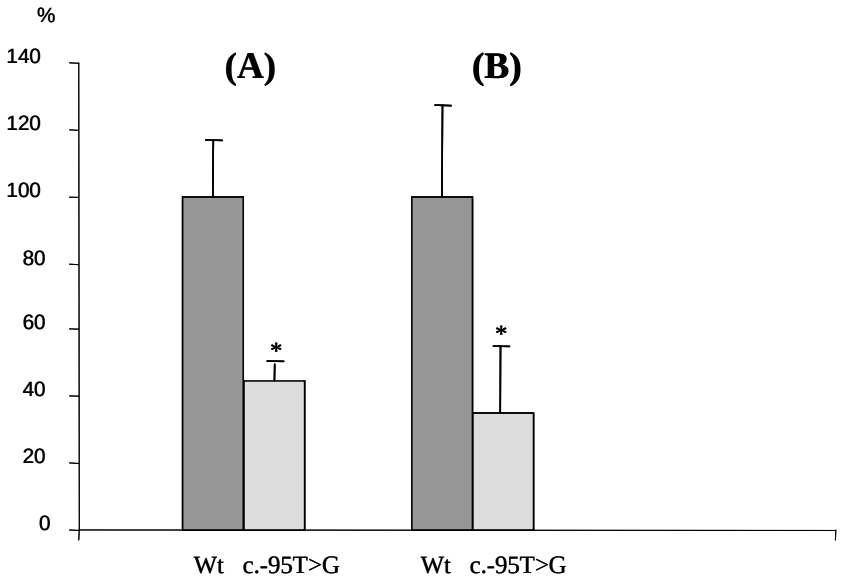

Figure 2. Promoter activity of the wild-type and c.-95T>C variant in HEK293 (A) and Jurkat (B) cell lines. The promoterless pGL3 was used as the baseline control (data not shown). A pSV β-galactosidase was co-transfected with each construct to normalize the transcription efficiency. pGL3-wt luciferase was used as a 100% reference. Values represent the mean ± standard errors of two independent experiments performed in triplicate. Value that differs significantly from that of the wt construct is indicated * ($p<0.05$).

RFLP assay, using the Cac*8I* restriction enzyme, was performed and applied to all the PCR products first analyzed by PCR-SSCP (data not shown). None of the tested samples harbored this mutation, which confirmed that our PCR-SSCP strategy did not fail to identify this substitution and that the frequency of this mutation is quite low.

1.1.1 Functional significance of the c.-95T>G promoter polymorphism

1.1.1.4.1 The promoter activities of IMPDH2 promoter / luciferase reporter gene constructs, harbouring either the wild-type or the c.-95T>G containing sequence, were assessed by transient transfection assays in both HEK293 and Jurkat cell lines. The promoter less pGL3-Basic vector was used as the baseline control (data not shown) and the pGL3-Wt luciferase activity was used as a 100 % reference. In both cell lines and in all experiments, the plasmid containing the wild-type fragment yielded luciferase activity which was about 100-fold higher than that of the empty vector. As seen in **Figure 2A**, in HEK293 cells, a significantly lower luciferase activity (55 % decrease; $p<0.05$) was observed for the construct containing the c.-95T>G mutation, as compared with the wild-type construct. In Jurkat lymphocytes (**Fig 2B**), the same trend was observed for the c.-95T>G variant with a significant decrease in the promoter activity of 65% ($p<0.05$), compared to that of the wild-type construct.

1.1.1.4.2

1.1.1.4.3 DISCUSSION

In the present study, we developed a simple and efficient strategy based on a PCR-SSCP procedure to screen for mutations in the *IMPDH2* gene in a Caucasian population. This method had been successfully used for the detection of mutations in several genes [27-29]. Since the sensitivity of SSCP is closely related to the electrophoresis conditions, the analysis was performed after optimization of multiple parameters affecting the single strand separation, such as time, temperature of electrophoretic migration and gel matrix [30]. Under optimal experimental conditions, we observed clear differences in band patterns when a PCR product contains a mutation. However, despite many precautions, some mutations might have not been detected under the chosen conditions.

Our study has allowed the characterization of three novel polymorphisms that correspond to one silent mutation in exon 9 (c.915C>G), one nucleotide substitution in the promoter region

(c.-95T>G) and one insertion (g.6971_6972insT) in the 3'-UTR of the *IMPDH2* gene. In addition, the previously described intronic substitution, IVS7+10T>C, was also identified [25]. These mutations define at least four allelic variants of *IMPDH2*, namely *IMPDH2*1B*, *IMPDH2*2*, *IMPDH2*3* and *IMPDH2*4*. However, additional alleles resulting from combination of these polymorphisms might exist, as one individual was identified as heterozygous for both IVS7+10T>C and c.915C>G mutations. The three alleles *IMPDH2*1B*, *IMPDH2*2* and *IMPDH2*4*, which carry the c.915C>G, c.-95T>G and g.6971_6972 insT, respectively, are rare variants with a frequency ≤ 1.0 % in our population, whereas the fourth allelic variant, *IMPDH2*3* (IVS7+10T>C) is more frequent, with an allelic frequency of 14.6 % in the same population.

Considering their nature and location, the c.915C>G and g.6971_6972 insT polymorphisms are unlikely to have any functional consequences. The clinical significance of the IVS7+10T>C polymorphism remains unclear, since no functional analysis had been previously performed to our knowledge. Nevertheless, this polymorphism has been recently associated with approximately 3-times odds of Biopsy Proven Acute Rejection in a cohort of 237 renal transplant recipients [26].

More interestingly, the c.-95T>G substitution disrupts a CRE(A) motif (TGACGAAA→GGACGAAA) in the promoter region of the IMPDH2 gene. Among the 5'-regulatory sequences that are involved in the transcriptional regulation of the *IMPDH2* gene, the tandem CRE (CRE(A), CRE(B)) and POS (palindromic octamer sequence) sites appear of major functional importance, as demonstrated by mutational analyses [22]. Mutation of the proximal CRE(A) motif was associated with a profound impairment (65 % decrease) of the promoter activity, whereas loss of the CRE(B) site had little effect. However, simultaneous mutation of the CRE(A) and CRE(B) sites resulted in an 83% decrease in promoter activity, demonstrating an important role of the tandem elements for the overall promoter function. This functional importance is further supported by the observation that the CRE(A) and CRE(B) sites are conserved at the same location relative to the transcription start site in the mouse *IMPDH2* promoter sequence [10, 22]. In the present study, transient transfection assays in HEK293 and Jurkat cell lines demonstrated a significantly lower luciferase activity for the construct containing the c.-95T>G mutation, as compared to that of the wild-type construct (HEK293 : 55% decrease, $p<0.05$; Jurkat : 65% decrease, $p<0.05$). These findings suggest that the naturally-occurring mutation that we detected within the CRE(A) transcription factor binding site, influences *IMPDH2* transcription in a similar way to that

previously observed with site-directed mutational analysis [22]. Nevertheless, the mechanism by which the sequence alteration in CRE(A) decreases the transcription rate of the reporter gene remains to be clarified. *In vitro* studies identified the transcription factor ATF-2 as the predominant protein that binds to CRE motifs of the *IMPDH2* promoter and the most plausible candidate for mediating both the basal and inducible transactivation of the *IMPDH2* gene [22].

It is interesting to speculate on the possible functional consequence of the c.-95T>G polymorphism *in vivo*. If interindividual variations in the capacity to express *IMPDH2* exist, they could then be reflected by differences in therapeutic response to immunosuppressive agents which interrupt *IMPDH2* pathway. As an example, mycophenolate mofetil (MMF, CellCept®) is the prodrug of mycophenolic acid (MPA), an inhibitor of IMPDH approved for the prevention of acute rejection in kidney, heart and liver transplantation [31]. MPA is a fivefold more potent inhibitor of the type II isoform of IMPDH than of the type I isoform [13, 32]. Furthermore, a substantial heterogeneity in drug response has been observed among patients treated with MMF [33-34]. Because *IMPDH2* gene expression is in part transcriptionally regulated, individuals that harbour the c.-95T>G polymorphism might have diminished *IMPDH2* gene transcription, and therefore abnormal clinical response to treatment targeting IMPDH2 pathway, such as MMF. Genotyping of patients under MMF treatment could be of interest to investigate the possible implication of this promoter polymorphism in MMF therapy efficiency.

As it is recognized that IMPDH2 is a critical enzyme in the metabolic pathway of the thiopurine drugs, i.e. azathioprine and its metabolite 6-mercaptopurine, due to its role in the synthesis of the active metabolites or 6-thioguanines, the analysis of *IMPDH2* as a candidate gene for abnormal response to thiopurines remains to be further evaluated. Indeed, even if genetically determined level of the thiopurine *S*-methyltransferase (TPMT) enzyme is known to modulate the therapeutic efficacy and toxicity of the thiopurine drugs [35], TPMT deficiency only explained around 30 % of cases of myelosuppression following 6-mercaptopurine or azathioprine therapy [36-40]. The possibility arises that thiopurine drug toxicity consequent to altered IMPDH2 gene expression could be important and warrants further investigation.

In conclusion, our data provide evidence that the *IMPDH2* gene is polymorphic. Despite its low frequency, the c.-95T>G promoter polymorphism, that disrupts the transcription factor binding site CRE(A), may result in interindividual differences in *IMPDH2* transcriptional

regulation and, consequently, in interindividual differences in IMPDH2 expression. Furthermore, these data could be helpful to study the relationship between a given patient's clinical response toward a treatment that modifies the *IMPDH2* pathway and its genotype at the *IMPDH2* locus.

Acknowledgements

This study was supported by the Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, the Université Lille Nord de France and the Conseil Regional Nord-Pas de Calais. We express thanks to Anne Engels for her excellent technical assistance.

REFERENCES

[1] Shu Q, Nair V. Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) as a target in drug discovery. Med Res Rev. 2008;28:219-32.

[2] Zwerner J, Fiorentino D. Mycophenolate mofetil. Dermatol Ther. 2007;20:229-38.

[3] Jackson RC, Weber G, Morris HP. IMP dehydrogenase, an enzyme linked with proliferation and malignancy. Nature 1975;256:331-3.

[4] Collart FR, Huberman E. Cloning and sequence analysis of the human and Chinese hamster inosine-5′-monophosphate dehydrogenase cDNAs. J Biol Chem 1988;263:15769-72.

[5] Natsumeda Y, Ikegami T, Murayama K, Weber G. De novo guanylate synthesis in the commitment to replication in hepatoma 3924A cells. Cancer Res 1988;48:507-11.

[6] Mita K, Akiyama N, Nagao T, Sugimoto H, Inoue S, Osakabe T et al. Advantages of mizoribine over azathioprine in combination therapy with cyclosporine for renal transplantation. Transplant Proc 1990;22:1679-81.

[7] Eugui EM, Almquist SJ, Muller CD, Allison AC. Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. Scand J Immunol 1991;33:161-73.

[8] Dayton JS, Turka LA, Thompson CB, Mitchell BS. Comparison of the effects of mizoribine with those of azathioprine, 6-mercaptopurine, and mycophenolic acid on T lymphocyte proliferation and purine ribonucleotide metabolism. Mol Pharmacol 1992;41:671-6.

[9] Hauser IA, Sterzel RB. Mycophenolate mofetil: therapeutic applications in kidney transplantation and immune-mediated renal disease. Curr Opin Nephrol Hypertens 1999;8:1-6.

[10] Glesne D, Collart F, Varkony T, Drabkin H, Hubermann E. Chromosomal localization and structure of the human type II IMP dehydrogenase gene (IMPDH2). Genomics 1993;16:274-7.

[11] Glesne DA, Huberman E. Cloning and sequence of the human type II IMP dehydrogenase gene. Biochem Biophys Res Commun 1994;205:537-44.

[12] Natsumeda Y, Ohno S, Kawasaki H, Konno Y, Weber G, Suzuki K. Two distinct cDNAs for human IMP dehydrogenase. J Biol Chem 1990;265:5292–5.

[13] Carr SF, Papp E, Wu JC, Natsumeda Y. Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. J Biol Chem 1993;268:27286-90.

[14] Hager PW, Collart FR, Huberman E, Mitchell BS. Recombinant human inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II proteins. Purification and characterization of inhibitor binding. Biochem Pharmacol 1995;49:1323-9.

[15] Gu JJ, Stegmann S, Gathy K, Murray R, Laliberte J, Ayscue L et al. Inhibition of T lymphocyte activation in mice heterozygous for loss of the IMPDH II gene. J Clin Investig 2000;106:599-606.

[16] Gu JJ, Tolin AK, Jain J, Huang H, Santiago L, Mitchell BS. Targeted disruption of the inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type I gene in mice. Mol Cell Biol 2003;23:6702-12.

[17] Zimmermann AG, Spychala J, Mitchell BS. Characterization of the human inosine-5′-monophosphate dehydrogenase type II gene. J Biol Chem 1995; 270:6808-14.

[18] Gu JJ, Spychala J, Mitchell BS. Regulation of the human inosine monophosphate dehydrogenase type I gene. J Biol Chem 1997;272:4458–66.

[19] Jain J, Almquist SJ, Ford PJ, Shlyakhter D, Wang Y, Nimmesgern E et al. Regulation of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II isoforms in human lymphocytes. Biochem Pharmaco 2004;67:767-76.

[20] Nagai M, Natsumeda Y, Konno Y, Hoffman R, Irino S, Weber G. Selective up-regulation of type II inosine 5′-monophosphate dehydrogenase messenger RNA expression in human leukemias. Cancer Res1991;51:3886–90.

[21] Nagai M, Natsumeda Y, Weber G. Proliferation-linked regulation of type II IMP dehydrogenase gene in human normal lymphocytes and HL-60 leukemic cells. Cancer Res 1992;52:258-61.

[22] Zimmerman AG, Wright KL, Ting JPY, Mitchell BS. Regulation of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type II gene expression in human T Cells. J Biol Chem 1997;272:22913-23.

[23] Kennan A, Aherne A, Palfi A, Humphries M, McKee A, Stitt A et al. Identification of an IMPDH1 mutation in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP10) revealed following comparative microarray analysis of transcripts derived from retinas of wild-type and Rho(-/-) mice. Hum Mol Genet 2002;11:547-57.

[24] Bowne SJ, Liu Q, Sullivan LS, Zhu J, Spellicy CJ, Rickman CB et al. Why do mutations in the ubiquitously expressed housekeeping gene IMPDH1 cause retina-specific photoreceptor degeneration? Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47:3754-65.

[25] Wang J, Zeevi A, Webber S, Girnita DM, Addonizio L, Selby R et al. A novel variant L263F in human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 2 is associated with diminished enzyme activity. Pharmacogenet Genomics 2007;17:283-90.

[26] Grinyó J, Vanrenterghem Y, Nashan B, Vincenti F, Ekberg H, Lindpaintner K et al. Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. Transpl Int 2008;21:879-91.

[27] Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Lo-Guidice JM, Spire C, Lafitte JJ et al. Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. Pharmacogenetics 1997;7:193-202.

[28] Lo-Guidice JM, Allorge D, Cauffiez C, Chevalier D, Laffitte JJ, Lhermitte M et al. Genetic polymorphism of the human cytochrome P450 CYP4B1 : evidence for a non-functional allelic variant. Pharmacogenetics 2002;12:367-374.

[29] Cauffiez C, Klinzig F, Rat E, Tournel G, Allorge D, Chevalier D et al. Human CYP4F12 genetic polymorphism: identification and functional characterization of seven variant allozymes. Biochem Pharmacol 2004;68:2417-25.

[30] Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone AM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. Genomics 1993;16:325-32.

[31] Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. Immunopharmacology 2000;47:85-118.

[32] Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. Immunol Rev 1993;136:5–28.

[33] Budde K, Glander P, Bauer S, Braun K, Waiser J, Fritsche L et al. Pharmacodynamic monitoring of mycophenolate mofetil. Clin Chem Lab Med 2000;38:1213-6.

[34] Glander P, Braun KP, Hambach P, Bauer S, Mai I, Roots I et al. Non-radioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydro-genase (IMPDH) in peripheral mononuclear cells. Clin Biochem 2001;34:543-9.

[35] McLeod HL, Siva C. The thiopurine S-methyltransferase gene locus - implications for clinical pharmacogenomics. Pharmacogenomics 2002;3:89-98.

[36] Black AJ, McLeod HL, Capell HA, Powrie RH, Matowe LK, Pritchard SC et al. Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine. Ann Intern Med 1998;129:716-8.

[37] Ishioka S, Hiyama K, Sato H, Yamanishi Y, McLeod HL, Kumagai K et al. Thiopurine methyltransferase genotype and the toxicity of azathioprine in Japanese. Intern Med 1999;38:944-7.

[38] Naughton MA, Battaglia E, O'Brien S, Walport MJ, Botto M. Identification of thiopurine methyltransferase (TPMT) polymorphisms cannot predict myelosuppression in systemic lupus erythematosus patients taking azathioprine. Rheumatology 1999;38:640-4.

[39] Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H, Marteau P, Gendre JP, Bonaz B et al. Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. Gastroenterology 2000;118:1025-30.

[40] Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Theoret Y et al. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2000;118:705-13.

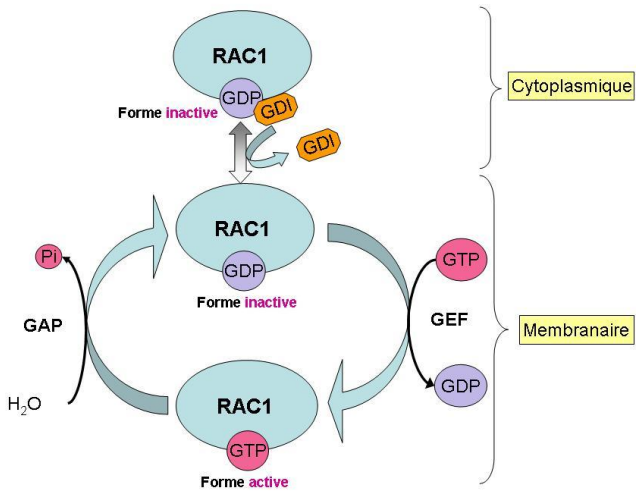

Figure 23. Cycle d'activation et d'inactivation de RAC, petite protéine G, par ses régulateurs. L'activité régulatrice de RAC1 est fondée sur sa capacité à passer d'une forme inactive liée au GDP à une forme active liée au GTP. Trois classes de protéines régulent l'alternance entre la forme inactive et la forme active: les GDI régulent la répartition des protéines G entre le cytoplasme et la membrane, les GEF activent les protéines G en stimulant le remplacement du GDP par du GTP, les GAP stimulent l'hydrolyse du GTP et provoquent le retour à l'état GDP inactif. GDI = *Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors* ; GEF = les *Guanine Nucleotide Exchange Factors* ; GAP = *GTPase Activating Proteins* ; GDP = guanosine diphosphate; GTP = guanosine triphosphate.

IV. TRAVAUX PERSONNELS SUR LE GENE *RAC1*

Les RhoGTPases (*Ras-homologous Guanosine Triphosphatases*) sont des petites protéines G de la superfamille Ras contrôlant de multiples voies de signalisation intracellulaire. Chez les mammifères, elles sont classées, selon des critères d'homologie de séquence, en huit sous-groupes, comprenant 22 membres dont les plus connus sont RAC, Rho et Cdc42 (Sorokina et Chernoff, 2005). Leur activité régulatrice est fondée sur leur capacité à passer d'une forme inactive liée au GDP (guanosine diphosphate) à une forme active liée au GTP (guanosine triphosphate). Cette activité est contrôlée dans l'espace et dans le temps par trois grandes classes de protéines qui régulent l'alternance entre la forme inactive et la forme active (Chardin, 2002): (1) les *Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors* ou GDI régulent la répartition des protéines G entre le cytoplasme où elles sont inactivables et la membrane où elles peuvent être activées ; (2) les *Guanine Nucleotide Exchange Factors* ou GEF activent les protéines G en stimulant le départ du GDP et, de ce fait, son remplacement par du GTP, qui est plus abondant et sous forme libre dans la cellule ; (3) les *GTPase Activating Proteins* ou GAP stimulent l'hydrolyse du GTP et provoquent le retour à l'état GDP inactif **(Figure 23)**. La forme active des protéines G interagit avec des partenaires cellulaires, appelés effecteurs, auxquels elles transmettent un signal d'action.

En 2003, Tiede *et al.*, ont montré que la protéine G monomérique RAC1 est la cible de l'un des métabolites actifs des thiopurines, le 6-TGTP et que cette interaction RAC1/6-TGTP est à l'origine de l'effet immunosuppresseur de l'AZA et de la 6-MP. En effet, lors du traitement, l'induction de l'apoptose des lymphocytes T CD4+ se fait en modulant la voie de signalisation intracellulaire médiée par RAC1. Le 6-TGTP, en se liant de façon spécifique et avec une très forte affinité à la protéine RAC1, en lieu et place de son co-susbstrat endogène, le GTP, inhibe l'effet anti-apoptotique de RAC1-GTP et est donc à l'origine du processus d'apoptose. L'existence de variations inter-individuelles dans l'expression ou l'activité de la protéine RAC1 pourrait notamment expliquer, d'une part, la survenue de leucopénies sévères et, d'autre part, la résistance au traitement, non expliquées respectivement par une diminution ou une augmentation de l'activité TPMT.

Chez l'homme, le gène *RAC1* a été localisé sur le chromosome 7 en position 7p22 (Matos *et al.*, 2000) et s'étend sur une longueur de 29,5 kb. Trois variants d'épissage alternatif ont été

décrits. Le plus long, *RAC1b*, comprend les sept exons du gène, *RAC1* comprend six exons (exons 1, 2, 3, 4, 5 et 6) et le plus court, *RAC1c*, comprend les exons 3, 4, 5 et 6.
Le promoteur de *RAC1*, tel que décrit par Matos *et al.*, (2000), s'étend sur environ 500 pb en amont du codon d'initiation de la traduction et possède les propriétés structurales caractéristiques des gènes domestiques : absence de TATA box et de CCAAT box, îlots riches en GC et quatre sites d'initiation de la transcription. Des séquences consensus de fixation pour les facteur de transcription Sp1 et Ikaros 2 (Ik2), régulateur majeur de la différenciation lymphocytaire (Klug *et al.*, 1998), ont été mis en évidence par Matos *et al.*, (2000). D'autres séquences consensus de fixation de facteurs de transcription spécifiques des lignées hématopoïétiques en différenciation ont également été décrites (Matos *et al*., 2000).

Notre travail a consisté à caractériser la nature et l'étendue de la variabilité génétique de *RAC1*. Dans une première étape, une stratégie *PCR-SSCP*, couplée au séquençage, a été développée afin d'analyser la séquence du promoteur et des 7 exons de *RAC1*. Cette technique a été appliquée à l'analyse de l'ADN génomique provenant de 49 volontaires sains d'origine caucasienne et les profils SSCP obtenus ont été comparés à ceux observés pour un échantillon de référence, préalablement séquencé et identifié comme étant homozygote sauvage. Seize profils SSCP « anormaux » ont été observés. Le séquençage des fragments correspondants a permis l'identification de treize anomalies de séquence, à l'état homozygote ou hétérozygote, dont dix mutations ponctuelles introniques, une mutation synonyme dans l'exon 6 et deux polymorphismes dans la région promotrice du gène. Ces deux polymorphismes localisés dans la région promotrice correspondent à une substitution nucléotidique, c.-289G>C, et à un polymorphisme de répétition de type *VNTR*, qui consiste en une ou deux répétitions d'un motif de 15 pb (CGGGAGCGGCGCGGG) localisé 293 pb en amont de l'ATG. L'allèle porteur d'un seul motif a été désigné VNTR-1 (c.-293_-307[1]), tandis que l'allèle le plus fréquent, qui porte deux motifs, est nommé VNTR-2 (c.-293_-307[2]) et correspond à la séquence sauvage.

L'existence de polymorphismes dans le promoteur d'un gène, notamment du type *VNTR*, étant fortement susceptible d'en modifier l'activité transcriptionnelle, la suite de nos travaux a porté uniquement sur l'analyse du promoteur de *RAC1*. Ainsi, nous avons appliqué notre stratégie *PCR-SSCP* à 43 volontaires sains supplémentaires, ainsi qu'à 128 patients traités par AZA dans le cadre d'une MICI. Trois mutations supplémentaires ont alors été mises en évidence au niveau de la région promotrice. Elles consistent en deux substitutions simples ou

SNP, c.-216C>G et c.-214A>T, et en un nouveau variant de répétition, porteur cette fois de 3 motifs répétés (VNTR-3, c.-293_-307[3]). Le gène *RAC1* des individus porteurs d'une mutation dans le promoteur a été entièrement séquencé au niveau des régons codantes et aucune mutation associée n'a été mise en évidence.

L'étude *in silico* de la séquence sauvage et des variants naturels de la région promotrice de *RAC1* (490 pb en amont de l'ATG) a été effectuée à l'aide du logiciel MatInspector (Matrix Family Library version 8.0). Cette analyse montre, entre autres, que le *VNTR* et la mutation c.-289G>C modifient le nombre de sites consensus Sp1, tandis que la mutation c.-216C>G crée une nouvelle séquence consensus pour le facteur de transcription NF-KB.

L'impact fonctionnel des mutations affectant la région promotrice a été analysé *in vitro* dans les lignées cellulaires HEK293 et A549. Une diminution de l'expression du gène *RAC1* a été mise en évidence pour tous les variants dans les deux lignées cellulaires, allant de 14 à 39 % suivant le polymorphisme étudié.

Au total, ce travail a permis de montrer, pour la première fois, l'existence de polymorphismes génétiques fonctionnels affectant le gène *RAC1*. De plus, au vu des résultats de l'analyse réalisée chez des patients atteints de MICI et traités par des doses standard d'AZA, il semble que la mutation c.-289G>C diminue significativement le risque de survenue de leucopénies. Ce résultat nécessite cependant d'être répété et confirmé sur une population indépendante.

Identification of the genetic polymorphism of RAC1 and its role in thiopurine drug response

Garat A, Allorge D, Bourgine J, Crunelle-Thibaut A, Lo-Guidice JM, Moreau J, Colombel JF, Broly F, Billaut-Laden I.

Article en préparation.

Identification of the genetic polymorphism of RAC1 and its role in thiopurine drug response

Anne Garat[a], Delphine Allorge[a], Joanna Bourgine[a], Aurélie Crunelle-Thibaut[a], Jean-Marc Lo-Guidice[a], Jacques Moreau[b], Jean-Frédéric Colombel[c], Franck Broly[a], Ingrid Billaut-Laden[a].

[a]Equipe d'accueil EA2679, Faculté de Médecine, Pôle Recherche, Université Lille Nord de France.

[b]Département de Gastro-entérologie et Nutrition, Hôpital de Rangueil, CHU, Toulouse, France.

[c]Département de Gastro-entérologie, Hôpital Huriez, CHRU, Lille, France.

Short title: *RAC1* genetic polymorphism

ABSTRACT

Background: Adverse effects of thiopurine drugs occur in 15% to 28% of patients and the majority is not explained by thiopurine-*S*-methyltransferase (TPMT) deficiency. Furthermore, around 9% of inflammatory bowel disease (IBD) patients are resistant to AZA therapy. Recently, the small guanosine triphosphatase, RAC1 appeared as a potentially important molecular target in AZA/ 6-MP treatment failure. To date, no polymorphism of the human RAC1 gene had been reported.

Objectives: Evidence for a functional genetic polymorphism of the human RAC1 gene and to investigate their association with thiopurine drugs response.

Methods: We developed a screening strategy based on a PCR-SSCP method to search for mutations in the *RAC1* gene and applied it to genomic DNA samples from 49 unrelated Caucasian individuals. Their functional consequences were assessed *in vitro* using transient transfection assays in Jurkat and A549 (HEK) cell lines. The relationship between polymorphisms of *RAC1* and thiopurine resistance or hematotoxicity was studied in 128 IBD patients following thiopurine treatment.

Results: Three SNP and one VNTR were identified in the promoter region. These mutations are responsible for a significant decrease (ranging from 14% to 39%) in promoter activity of a reporter gene compared to the corresponding wild type sequence. In addition, the variant, c.-289G>C (rs34932801), is more frequently associated with patients following thiopurine treatment and have no adverse drug reaction (p=0.043).

Conclusion: This work constitutes the first report of the existence of a functional genetic polymorphism affecting RAC1 activity and suggests that the c.-289G>C mutation could modulate the risk of adverse drug reaction of patients following thiopurine treatment.

Key words: RAC1 genetic polymorphism, RAC1 promoter, thiopurine drugs, azathioprine resistance, adverse effects, inflammatory bowel disease.

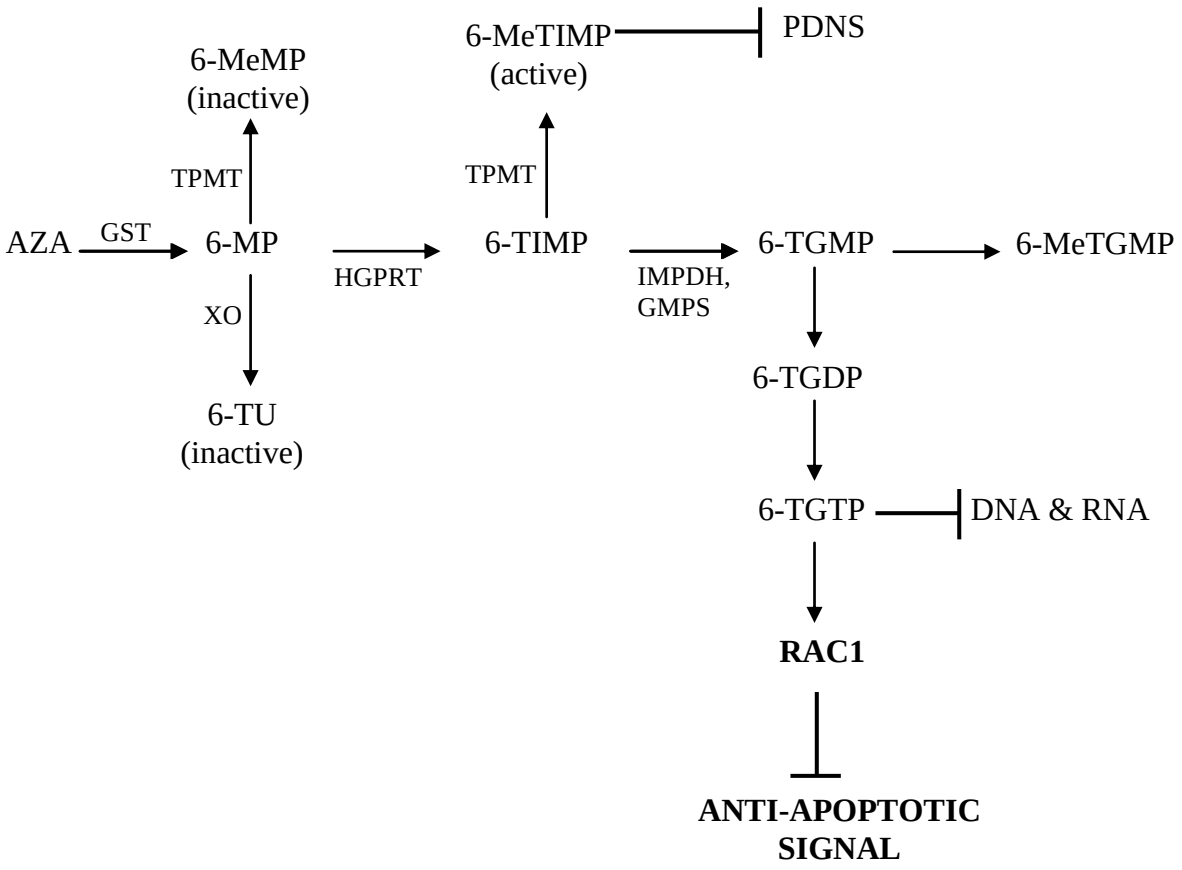

Figure 1. Metabolic scheme of thiopurine metabolism. The pro-drug azathioprine (AZA) is converted to 6-mercaptopurine (6-MP) by glutathione S-transferase (GST). 6-MP is converted by metabolised by hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) into their respective nucleoside monophosphates (6-TIMP). In competing catabolic reactions, thiopurine-S-methyltransferase (TPMT) inactivates 6-MP by S-methylation (6-MeMP) and xanthine oxidase (XO) converts 6-MP to 6-thiouric acid (6-TU). 6-TIMP and 6-TGMP are also TPMT substrates. Methylated TIMP (6-MeTIMP) is an effective inhibitor of de novo purine biosynthesis. 6-TIMP that escapes catabolism is further metabolized by inosine monophosphate deshydrogenase (IMPDH) and guanine monophosphate synthetase (GMPS) to 6-thioguanine-monophosphate (6-TGMP). Sequential action of deoxynucleoside kinases and reductases generates the 6-thioguanine-diphosphate (6-TGDP) and 6-thioguanine-triphosphate (6-TGTP) that are the substrates for incorporation into RNA and DNA. AZA can act as an immunosuppressant through the random incorporation of 2'-deoxy-6-TGTP into DNA and RNA (Krynetskaia et al., 1999, Sommerville et al., 2003). In addition, recent research has demonstrated that AZA exerts its immunosuppressive activity by inhibiting RAC1 in $CD4^+$ T lymphocytes (Tiede et al., 2003). PDNS, purine de novo synthesis.

INTRODUCTION

Thiopurine drugs, azathioprine (AZA), its metabolite 6-mercaptopurine (6-MP) and 6-thioguanine (6-TG), are widely used as cytotoxic or immunosuppressive agents in a variety of clinical conditions, such as acute lymphoblastic leukaemia in childwood, rheumatic diseases, inflammatory bowel disease (IBD) and organ transplantation (Elion, 1989; Weinshilboum, 2001; Krynetski and Evans, 2003). Adverse drug reactions with AZA or 6-MP occur in 15% to 28% of patients (Ansari et al., 2002; Schwab et al., 2002; Marinaki et al., 2004). In clinical practice, during these therapies, the reported frequency of myelodepression (e.g. leukopenia and thrombocytopenia) is in the range of 1.4-10% (Connell et al., 1993; Lennard, 2002). In addition, approximately 9% of IBD patients are resistant to thiopurine therapy (Dubinsky et al., 2002). To be therapeutically active, these pro-drugs need to be metabolized into their final cytotoxic metabolites referred to as the 6-thioguanine nucleotides (6-TGNs) (**Fig. 1**). The first step of this activating pathway is catalyzed by the hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase enzyme (HGPRT). The thiopurine drugs are also inactively metabolized, in part by the thiopurine-*S*-methyltransferase (TPMT) whose level of activity in human tissue is controlled by a common genetic polymorphism. Approximately 1 in 300 individuals has very low or absent TPMT activity, 11% have intermediate activity and 89% show normal/high activity (Weinshilboum and Sladek, 1980). In Caucasian populations, intermediate or low TPMT activity is most frequently associated with *TPMT*2*, *TPMT*3A* or *TPMT*3C* alleles, with *TPMT*3A* being the most frequent allelic variant (85%) (Weinshilboum, 2001). Deficient methylators, as well as intermediate methylators, are at an increased risk of hematotoxicity when they are treated with standard doses of thiopurines, as a consequence of an excessive accumulation of 6-TGNs in hematopoietic cells (Weinshilboum, 2001). In contrast, subjects with very high TPMT activity can be undertreated with standard doses and, consequently, can exhibit a resistance to thiopurine-based treatments (Weinshilboum, 2001). However, only around 30% of patients who develop myelodepression during AZA or 6-MP therapy have mutations in one or both of their *TPMT* alleles (Colombel et al., 2000) and, whereas AZA resistance has been attributed to ultra-high TPMT activity (Ansari et al., 2002), only 1-2% of Caucasians exhibit such a phenotype (Schaeffeler et al., 2004). These data implies that other mechanisms unrelated to TPMT exist to explain adverse effects and/ or non-response to thiopurine drugs.

Inhibition of purine nucleotide biosynthesis, with a consecutive suppression of DNA and RNA synthesis, as well as downregulation of B and T cell functions, have been suggested as the major therapeutic mechanisms of thiopurine drugs (Krynetskaia et al., 1999; Somerville et al., 2003) (Fig. 1). Recently, the 6-TGTP, one of the active metabolite of AZA, was found to contribute significantly to the overall molecular immunosuppressive effect of thiopurine therapy in patients with IBD. This specific end metabolite binds to and inhibits the function of the small GTPase RAC1 upon CD28 co-stimulation in $CD4^+$ T cells, thereby inducing apoptosis of these T cells (Tiede et al., 2003). RAC1 is important for the inhibition of T-cell apoptosis. When 6-TGTP binds to RAC1 instead of its endogenous co-factor, GTP, the activation of target genes, such as those encoding NF-kappaB, STAT3 and bcl-xL, is suppressed, leading to a mitochondria-mediated T-cell apoptosis (Tiede et al., 2003, Maltzman and Koretzky, 2003, Neurath et al., 2005). According to the central role of RAC1 in the therapeutic effect of thiopurines, as well as its potential implication in thiopurine-induced myelodepression, RAC1 can be regarded as a good candidate to explain hematotoxicity or resistance that are not due to TPMT genetic polymorphism (Katsanos and Tsianos, 2006).

RAC1 is a member of the Rho-GTPases subfamily, which act as intracellular molecular switches through exchange of GTP/GDP cycling between an active GTP-bound and an inactive GDP-bound state (Wittinghofer and Nasser, 1996; Zohn et al., 1998). Matos et al., (2000) described the complete structure of the human *RAC1* gene which is localized on chromosome 7p22 (Chr. 7p22). The *RAC1* gene contains seven exons that carry the coding sequence. Its promoter displays several characteristics typical of housekeeping genes, such as the lack of TATA- and CCAAT-boxes, a very GC-rich content and the presence of a CpG island. An alternatively spliced variant of RAC1, RAC1b, that contains the additional exon 3b, encodes a protein with 19 additional amino acid residues. RAC1b is a functional GTPase that displays an increased intrinsic guanine nucleotide exchange rate (Schnelzer et al., 2000) and a decreased intrinsic GTPase activity (Fiegen et al., 2004; Matos et al., 2003) compared to those of RAC1. In addition, Kugler et al. (2004) identified 4 intronless pseudogenes, Ψ1- to Ψ4- RAC1, in the human genome. These pseudogenes, that miss the exon 3b present in the RAC1b variant, seem to be not transcribed (Jordan et al., 1999; Schnelzer et al., 2000).

To date, no systematic analysis of the sequence variation of the human *RAC1* gene has been carried out. The aim of the present study was to develop a polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) strategy in order to analyse the promoter

and the seven exons, including their 5'- and 3'- proximal flanking sequences, of *RAC1* in genomic DNAs from 49 unrelated healthy subjects of Caucasian origin. One silent mutation, nine nucleotide substitutions and one insertion were identified in coding and non-coding regions of *RAC1*. *One Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR) and one *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) were identified in the promoter region. We further studied the polymorphism of the promoter region in genomic DNAs from 171 French Caucasians (43 additional healthy volunteers and 128 patients following AZA treatment comprising 61 good responders, 27 resistant patients, 76 patients without adverse drug reaction and 47 leukopenic patients, corresponding to for whom the clinical information was obtained). An additional VNTR motif and two novel SNPs were identified in the *RAC1* promoter sequence. The functional consequences of the polymorphisms that we identified in the promoter region of the *RAC1* gene were investigated *in vitro*.

Table 1A Demographic comparison between responders and non-responders patient groups

	Responders (n=61)	Non-responders (n=27)
Sex (m/f)	35/26	11/16
Age (year)	35.8 (23-71)	38.2 (26-70)
Duration of disease (year) (mean and range)	14.7 (5-28)	15.3 (6-30)
Diagnosis (%)		
Crohn's disease	81.9	66.7
Ulcerative colitis	18.1	33.3
Disease site (%)		
Ileum	30.4	9
Ileocolon	58.7	63.6
Colon	10.9	27.4
Indication for AZA (%)		
Following intestinal resection	32.7	-
Active disease	51	66.5
Steroid sparing	16.3	33.5
AZA dose in mg/kg (median and range)	1.92 (0.83-3.2)	2.14 (1-3.2)
Median duration of treatment (mth) and range (mth)	93 (9-169)*	21 (8-43)*

*p=1.38^{e-8}, two-sided Mann-Whitney U-test

Table 1B Demographic comparison between control and adverse drug reaction patient groups

	Non Leucopenia (n=76)	Leucopenia (n=47)
Sex (m/f)	30/37	25/22
Age (year)	37.5 (26-71)	39.6 (24-73)
Duration of disease (year) (mean and range)	14 (5-33)	15 (5-30)
Diagnosis (%)		
Crohn's disease	70.3	87.5
Ulcerative colitis	29.7	12.5
Disease site (%)		
Ileum	21.7	40
Ileocolon	56.6	46.6
Colon	21.7	13.4
Indication for AZA (%)		
Following intestinal resection	21.2	26.6
Active disease	61.5	60
Steroid sparing	17.3	13.4
AZA dose in mg/kg (median and range)	2 (1.22-3.22)*	1.57 (0.5-2.5)*
Median duration of treatment (mth) and range (mth)	52.5 (7-162)	**85.5 (1-169)[a]**

*p=0.00015, two-sided Mann-Whitney U-test

[a] calcul only on 16 patients

MATERIALS AND METHODS

Samples

A total of 220 unrelated Caucasian subjects (92 healthy volunteers and 128 IBD patients treated with AZA: 61 good responders versus 27 resistant patients and 76 patients without adverse drug reaction versus 47 with leukocytopenia, corresponding to for whom the clinical information was obtained) were involved in the study after ethical committee approval and after informed consent had been obtained. Characteristics of the IBD patients are given in **Table 1**. Additionally, clinical data regarding the dose and duration of AZA administration, as well as laboratory data from patients with hematotoxicity, were retrospectively collected from the patients' medical records. We used this procedure to minimize the risk of inaccuracy in description of AZA-related side effects which cannot be totally ruled out in a retrospective analysis of drug-induced toxicity. Cytopenia was defined using the criteria as described by Connell et al., (1993). For the definition of the clinical response, complete remission was defined as complete withdrawal of steroid therapy (where steroid sparing was the indication for the use of AZA), for the induction and maintenance of remission in IBD and/or its maintenance after ileocolonic resection (Al Hadithy et al., 2005, Ansari et al., 2002). Non-response to AZA was defined as the absence of remission after 8 months of continuous AZA treatment (Schwab et al., 2002). The distribution of various features between responders versus non-responders or adverse effect and control groups are shown in **Table 1**. The factors that differed significantly between the different groups of patients were the dose of AZA and the median duration of treatment, which were both adapted according to the patients' response. Genomic DNA extraction from peripheral blood leukocytes was performed using the Nucleon BACC3 kit (Amersham-Biosciences, Saclay, France) according to the manufacturer's instructions.

***TPMT* genotype determination**

Genotyping of each IBD patient for the presence of the 3 most frequent *TPMT* gene variants (c.238G>C (rs1800462) for *TPMT*2* and c.460G>A (rs1800460) and c.719A>G (rs1142345) for *TPMT*3A*, **3B* and **3C*) was performed using mutation specific real-time-PCR assays

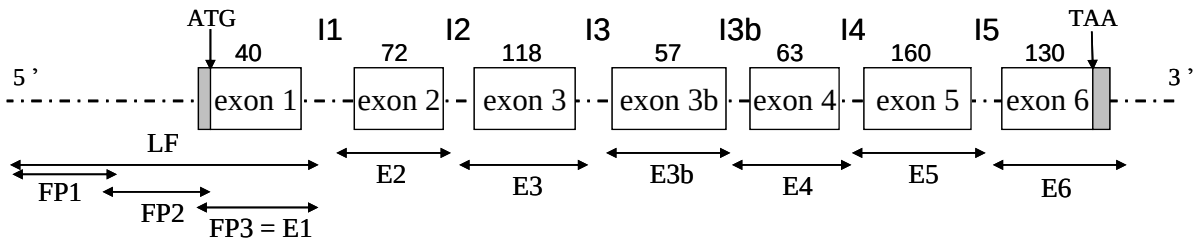

Figure 2. Outline of the strategy for PCR-SSCP analysis of the human *RAC1* gene. A PCR allows the amplification of 9 fragments encompassing the seven exons of *RAC1* and their proximal flanking regions. The number above each exon represents the number of base pairs. White boxes, coding sequences; Gray boxes, non-coding exonic sequences; I, intron.

Table 2 Details of the primers used for PCR-SSCP analysis of the *RAC1* gene

amplified regions	Primers	Sequence (5'-3')	Size (bp)[a]	PCR		SSCP	
				[Mg^{2+}] (mM)[b]	Tm (°C)[c]	Temperature of migration (°C)[d]	Time of migration (h)[e]
LF	FP1LF FP1LR	CTCTTAAAGCCCTGAGTCCC GAGAGCCGGAACCAGGCAC	708	1.5*	62	_	_
FP1	FP1LF FP1R	CTCTTAAAGCCCTGAGTCCC CTCCCGGAGTTTCTCTGGAC	154	1.5**	62	25	1h30
FP2	FP2F FP2R	GAGCCGAGTGGGCCCGAG CGCTGTCCACGCCGCCTC	254	1.5*	62	10	1h45
FP3 (exon 1)	FP3F FP3R	CTTCCAGTCCGCGGAGGGC CCCCAGTCCGGGCCCAAC	261	1.5**	64	25	1h30
Exon 2	F2F F2R	GCTAAGTATGTGATGTATATGC CAGCAAAACAAATGGTCAAAG	262	2	58	10	2h
Exon 3	F3F F3R	CAGCCTTTTTCTTGGCACAC GCGCTCGAGAATTATATACTC	265	2	56	10	2h
Exon 3b	F3bF F3bR	GAAGATATGTTAGAATCTATTG CTAGGAAAACGAAGTGAAATG	271	2	58	10	2h
Exon 4	F4F F4R	CTGACAAACTGAAAGGGTGG CTGAGAGGATCATTCTATAAC	270	2	58	10	2h
Exon 5	F5F F5R	GACATCTGTAAAGGAGCGTG GACTCCAGTCTCTGTCACTAC	274	2	62	10	2h
Exon 6	F6F F6R	GCTGGTGGTGTGATCAGAAG GAGCAAAGCGTACAAAGGTTC	252	2	60	10	2h

[a]Size of amplified fragments.
[b]Optimized Mg^{2+} concentration for each set of primers.
[c]Optimized annealing temperature for each set of primers.
[d]Temperature and [e]Time of migration optimized for the sharpest separation of single stranded DNAs.
Enhancer solution 1X*or 2X**.

(Taqman SNP Genotyping Assays ready to use, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to manufacturer's instructions.

PCR-SSCP analysis of RAC1

The primer design was based on the nucleotide sequences of the *RAC1* gene and mRNA published in GenBank (accession n° NT_007819 and NM_018890.3, respectively) and took into account the necessity of advoiding the amplification of its pseudogenes. The PCR strategy used to screen the *RAC1* gene is described in **Fig. 2.** First, a long fragment (LF), encompassing the promoter and the exon 1, was generated with a pair of specific primers (**Table 2**). For this GC-rich LF, the PCR was carried out with 0.6 U Platinum Taq PCRx DNA polymerase (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), as recommended in the manufacturer's protocol. The LF fragment was subsequently used as a template (0.6 µL) to individually and specifically amplify three fragments encompassing the promoter (FP1 and FP2) and the exon 1 (FP3) of the *RAC1* gene. These nested PCRs were performed (12 cycles) in a final volume of 25 µL with 0.6 U of Platinum Taq PCRx DNA polymerase (Invitrogen) (**Table 2**). Six specific pairs of primers were used to amplify each of the six remaining exons (exons 2, 3, 3b, 4, 5 and 6), including their 5'- and 3'- splice site consensus sequences and the termination codon. The corresponding PCRs were performed in a final volume of 25 µL of 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8), containing 50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 400 ng of genomic DNA, 4 µM of each primer (**Table 2**), 0.2 µM of each dNTP and 0.3 U Taq DNA polymerase (Invitrogen). The Mg^{2+} concentration and the annealing temperature were optimized for each primer set (**Table 2**). After an initial denaturation step at 94°C for 2 min, 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at an optimized annealing temperature, and 1 min 30 at 72°C, were carried out and a final extension period of 10 min was performed at 72°C. All PCR fragments were analysed on a 1.5 % agarose gel in the presence of ethidium bromide to check both the size and the specificity of the amplicons.

For non-isotopic SSCP electrophoreses, 3 µL of each PCR product were mixed with 3 µL of denaturing dye containing 0.05% bromophenol blue formamide and 0.05% xylene cyanol, heat-denatured for 4 min at 95°C and rapidly chilled on ice. Mixtures were then loaded on a denaturing acrylamide gel (GeneGel 12.5/24 kit, GE Healthcare, Saclay, France). The electrophoresis was carried out at 600 V, 15 W and 25 mA on a GenePhor electrophoresis unit (GE Healthcare) with optimized conditions of time and temperature, as listed in **Table 2**. After migration, gels were stained using the DNA silver staining kit (GE Healthcare).

For samples showing a change in electrophoretic mobility when compared to that of a reference sample, the PCR-SSCP procedure was repeated to eliminate any detection of mutation due to errors of amplification generated by the DNA polymerases.

Nucleotide sequence analysis

When a PCR product was found to display an abnormal SSCP pattern, it was cleaned up with the ExoSAP-IT kit (GE Healthcare) and then sequenced on both strands using the CEQ^{TM}DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter, Roissy, France). Electrophoresis and analysis of DNA sequence reactions were performed with the CEQ^{TM}8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter).

Cell culture conditions

Human renal and lung cell lines, HEK293 and A549 (American Type Culture Collection), respectively, were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin G and 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen). A human leukemia T-lymphocyte cell line, Jurkat E6.1 (ATCC) was maintained in similarly supplemented RPMI-1640 medium. All cells were cultured under 5% CO_2 at 37°C. The day before transfection, cells were freshly plated on 24-well plates in antibiotic free media.

Cloning of the promoter region of RAC1

Genomic DNA samples from two subjects that present a heterozygous VNTR genotype, *i.e.* VNTR-1/VNTR-2 and VNTR-2/VNTR-3, respectively, were used to amplify a 984 bp-fragment (+/- 15 bp) (-978 to +6), using a pair of specific primers (PromRAC1F, 5'-GAG**a**agct**t**GAACTACAGGCGCGCGCCTCCACGC -3' and PromRAC1R, 5'-CT**c**cat**gg**GGGCCGCTTCGCTGGGCCGCGGC -3') and the *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. The primers allow the amplification of a PCR product with *Hind*III and *Nco*I sites at the 5'- and 3'-ends, respectively (small bold letters in the forward and reverse primers correspond to mismatched nucleotides that create a *Hind*III and *Nco*I site, respectively). After an initial denaturation step at 94°C for 2 min, the PCR thermal profile included three steps, 15 sec at 94°C, 30 sec at 66°C and 1 min at 68°C, for a total number of 30 cycles, then a final extension period of 10 min at 68°C. PCR products

were purified with the QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and subsequently cloned between the *Hind*III and *Nco*I sites of the promoterless eukaryotic expression vector pGL3-Basic (Promega, Charbonnières, France). Plasmid constructs were purified with the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) and then sequenced, as described above, in order to check the sequence of each *RAC1* allele.

Site-directed mutagenesis

Site-directed mutagenesis assays were performed by PCR using the wild-type RAC1 promoter region-containing vector (pGL3-wtV2) as a template, three pairs of mutagenic primers (RAC1A3BF: 5'- GGCGCGGGCGGCAGCGGCCCCGCCCGGAAC -3'; RAC1A3BR: 5'- GTTCCGGGCGGGGCCGCTGCCGCCCGCGCC -3' for the c.-289G>C mutation; RAC1A3CF: 5'- CCGGATGTGAGTGGAGCGGGCATTTCCTGTTTCTCTGCAG - 3'; RAC1A3CR: 5'- CTGCAGAGAAACAGGAAATGCCCGCTCCACTCACATCCGG -3' for the c.-216C>G mutation; and RAC1A3DF: 5'- CCGGATGTGAGTGGAGCGGCCTTTTCCTGTTTCTCTGCAG - 3'; RAC1A3DR: 5'- CTGCAGAGAAACAGGAAAAGGCCGCTCCACTCACATCCGG -3' for the c.-214A>T mutation; the underlined nucleotides correspond to the mutated codon) and the QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, Massy, France). Sequencing of the mutated constructs was carried out on both strands to assess their strict identity with the expected sequence and to confirm the absence of artefactual mutations.

In silico analysis of the RAC1 promoter sequence

The analysis of the wild-type and mutant DNA sequences that cover the promoter region of RAC1 from nt -484 to +1 was performed using the commercial software MatInspector with a restrictive threshold of 0.85 and the matrix library v8.0 (http://www.genomatix.de/cgibin/matinspector/matinspector.pl) (Quandt et al., 1995, Heinemeyer et al., 1998), in order to determine if the polymorphisms we identified in the RAC1 promoter sequence alter putative binding sites for transcription factors or create new ones.

Table 3. Distribution of RAC1 polymorphisms in 220 Caucasian individuals.

Localisation	Nucleotides changes	n° rs SNP	Mutation frequency (%)	
			Healthy volunteers (n=92)	IBD patients following AZA treatment (n=128)
Prom	c.-289G>C	rs34932801	1.08	2.34
Prom	c.-216C>G	-	-	0.4
Prom	c.-214A>T	-	-	0.8
Prom	c.-293_-307[1]	-	0.54	0.4
Prom	c.-293_-307[3]	-	-	1.95
			(n=49)	
I2	c.108+27C>T	-	33.7	n.d.
I2	c.108+37T>A	-	2	n.d.
I2	c.108+39C>G	-	2	n.d.
I2	c.108+40G>A	rs3729790	7.1	n.d.
I2	c.109-30_-31insT	-	1	n.d.
I3	c.226+18C>T	-	2	n.d.
I3	c.227-76A>G	rs35761891	7.1	n.d.
I3b	c.284-95T>A	-	6.1	n.d.
I3b	c.284-95T>C	-	1	n.d.
I5	c.506+12T>C	rs3729796	1	n.d.
E6	c.553C>G, p.Leu^{184}Leu	rs61753123	1	n.d.

n.d., not determined

Luciferase reporter gene assay

The plasmid constructs, pGL3-wtV2, pGL3-mV1, pGL3-mV3, pGL3-m289, pGL3-m216 and pGL3-m214, correspond to the RAC1 promoter region with a wild-type sequence or with a mutated sequence carrying the VNTR-1, the VNTR3, the c.-289G>C, the c.-216C>G or the c.-214A>T mutation, respectively. In order to analyse the effect of these mutations on the transcriptional activity of the RAC1 promoter region, HEK293 and A549 cell lines (90-95% confluent) were transfected with the different pGL3 constructs (750 ng), using the lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen). Jurkat cell line (10^5 cells/ well the day before transfection) was transfected using the JetPEI^{TM} transfection reagent, following the manufacturer's protocol. Transfections with the promoterless pGL3-Basic vector were also performed as base line controls. A phRL-TK, a renilla luciferase reporter vector (50 ng) (Promega), was co-transfected with each pGL3 construct to normalize the transfection efficiency. Twenty-seven hours after transfection, cells were lysed with the Passive Lysis buffer (Promega). Firefly luciferase activity (LAF) that corresponds to the pGL3 vector, and renilla luciferase activity (LAR) were measured sequentially using a Dual-Luciferase reporter assay system (Promega) and a Mithras LB940 Luminometer (Berthold technologies Design, Sunnyvale, CA). To correct for transfectional efficiency, as well as DNA uptake and expression efficiency, the relative luciferase activity (RLA) was calculated as follow RLA = LAF/LAR. Transfection and reporter assays were repeated in three independent experiments, each experiment comprising three replicates.

Statistical analysis

Clinical data from IBD patients were compared using the Mann-Whitney U-test (StatXact, Cytel Studio 8). Association between a hematotoxicity or lack of clinical response and RAC1 mutations was tested using a two-sided Fisher's exact test (StatXact) or by χ^2-test (Excel), when appropriate. Relative luciferase activity values were statistically compared with ANOVA and the Tukey *post hoc* test for multiple parameters in SPSS 9.0. All statistical tests were performed two-tailed and $p<0.05$ was considered as statistically significant.

2

3

Figure 3. Nucleotide sequence and features of the human *RAC1* gene promoter.

A.

GAGCTGACAGGTTCCTCTTAAAGCCCTGAGTCCCAGGGAAGGGACCTGCAGGCC

CGGCCACGCCCAGGCCGCTTTAGCGCGCCAAGATGGCGGCTGCCACGCCCCGCG
E2F-4

GCCGGAGCCGAGTGGGCCCGAGCGCTTCCGAGCATTCCCGAAGTCCAGAGAAAC
SP1/ SP1
WT1/ WT1/ WT1/ WT1
TCCGGGAGCGGCGCGGGCGGGAGCGGCGCGGGCGGGAGCGGCCCCGCCCGGAAC
c.-289G>C
WT1
MAZ/ MZF1/ SP1
CTGGGAGCGGCGGCGCCGGCGCGGGGGAGGGGAGGCCGGATGTGAGTGGAGCGG
PLAG1
KLF15/ KLF15
c.-216C>G
CCATTTCCTGTTTCTCTGCAGTTTTCCTCAGCTTTGGGTGGTGGCCGCTGCCGG
c.-214A>T
YY1
GCATCGGCTTCCAGTCCGCGGAGGGCGAGGCGGCGTGGACAGCGGCCCCGGCAC

CCAGCGCCCCGCCGCCCGCAAGCCGCGCGCCCGTCCGCCGCGCCCCGAGCCCGC

CGCTTCCTATCTCAGCGCCCTGCCGCCGCCGCCGCGGCCCAGCGAGCGGCCCTG

ATGCAG
▲

B.

SP1
WT1/ WT1/ WT1
V1: TCcgggagcggcgcgggCGGGGAGCGGCCCCGC

SP1/ SP1
WT1/ WT1/ WT1/ WT1
V2: TCcgggagcggcgcgggcgggagcggcgcgggCGGGGAGCGGCCCCGC

SP1/ SP1/ SP1
WT1/ WT1/ WT1/ WT1/ WT1
V3: TCcgggagcggcgcgggcgggagcggcgcgggcgggagcggcgcgggCGGGGAGCGGCCCCGC

RESULTS

4

5

5.1 *Identification of RAC1 polymorphisms in healthy individuals*

To investigate the potential sequence variations of *RAC1*, a PCR-SSCP strategy was developed and applied to genomic DNAs from 49 unrelated and healthy individuals of Caucasian origin. One DNA sample obtained from a homozygote for a wild-type *RAC1* allele, as confirmed by sequencing, was used as a reference sample for SSCP analysis. The wild-type sequence that we used corresponds to the nucleotide sequence reported in GenBank with the accession number NT_007819. Compared to the reference sample, 16 DNA samples displayed distinctive mobility shifts in fragments amplified from each exon or from the promoter region FP2, indicating the presence of mutation(s) in these regions of *RAC1*. Sequencing of the corresponding fragments allowed to identify a total of 13 mutations which were detected in a heterozygous state and/ or in a homozygous state. Mutations are described according to the recommendations of Den Dunnen and Antonarakis (2001) with nucleotide +1 corresponding to the A of the ATG initiation codon on the mRNA sequence (NM_018890.3). Ten out of the 13 polymorphisms were identified in non-coding sequences and consist in nine single nucleotide substitutions located in introns 2, 3, 3b or 5 and one single insertion in intron 2 (**Table 3**). One mutation was identified in exon 6 and corresponds to a synonymous mutation (c.553C>G, p.Leu^{184}Leu). The two remaining mutations were identified in the *RAC1* promoter sequence and correspond to one SNP (c.-289G>C) and a VNTR polymorphism consisting in one or two tandem repeats of a 15 bp-motif (CGGGAGCGGCGCGGG) located 293 nucleotides upstream of the A of the ATG codon (**Fig. 3**). According to the conventional mutation nomenclature, the two VNTR alleles are designated as c.-293_-307[1] (VNTR-1) and c.-293_-307[2] (VNTR-2).

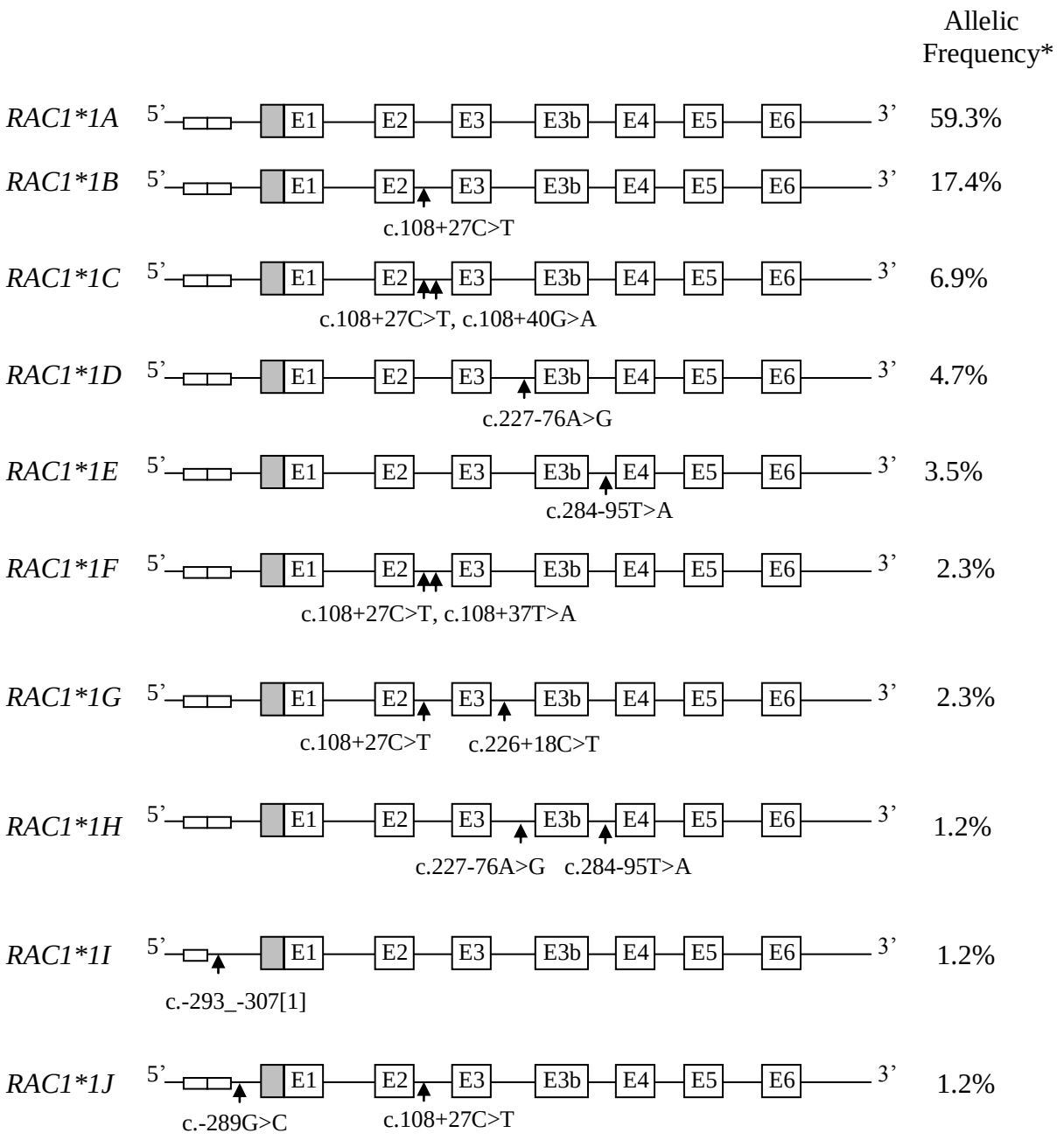

Figure 4. Distribution of RAC1 allelic variants in 43 healthy French Caucasians. *The allelic frequency was calculated on 86 chromosomes (43 subjects).

Table 4. *In silico* analysis of the RAC1 promoter sequence. The binding sites for various transcription factors were identified with the MatInspector program.

	V1	V2(WT)	V3	c.-289G>C	c.-216C>G	c.-214A>T
WT1	**4**	5	**6**	5	5	5
SP1	**2**	3	**4**	**2**	3	3
NF-κB	0	0	0	0	**1**	0
YY1	1	1	1	1	**0**	**0**

Characterization of RAC1 alleles

Some of the polymorphisms we identified in the *RAC1* gene were detected in a combined state and, as some were identified in a homozygous state, appear to be in linkage disequilibrium. The analysis of their distribution allowed the characterization of ten different *RAC1* alleles in our population of healthy French Caucasians. They comprised the wild-type allele, *RAC1*1A*, and nine novel allelic variants that we named *RAC1*1B* to **1J* (**Fig. 4**).

RAC1 allele and mutation frequencies

The frequencies of the RAC1 mutations and alleles we identified in our population of 49 unrelated French Caucasians are presented in **Table 3** and **Fig. 4**. The frequencies of the various genotypes observed in our population followed those predicted by the Hardy-Weinberg law.

5.2 *Identification of RAC1 polymorphisms in patients treated by thiopurine drug*

Because of the potential impact of polymorphisms localized in the promoter region of genes on their expression, we applied our PCR-SSCP strategy on DNA samples of 43 additional healthy volunteers and 128 IBD patients treated with a thiopurine drug to screen the promoter region of *RAC1*. Three additional mutations were identified in the *RAC1* promoter sequence in patients following AZA treatment, consisting in two SNP (c.-216C>G and c.-214A>T) and an additional VNTR allele corresponding to three repeats of the 15 bp-motif, previously described (**Fig. 3**). This new version of the VNTR polymorphism was named c.-293_-307[3] (VNTR-3).

In silico analysis of the RAC1 promoter sequence

The *in silico* analysis of the *RAC1* promoter sequence revealed the presence of several potential binding sites for transcription factors including MZF1, E2F-4, KLF15, MAZ, PLAG1, WT1, YY1 and SP1 (**Fig. 3**), with some of them being found from 1 to 5 times in the

analyzed sequence (**Fig. 3**). The c.-289G>C mutation is responsible for the abolition of a SP1 motif (**Table 4**). The c.-216C>G polymorphism creates one novel binding site for the

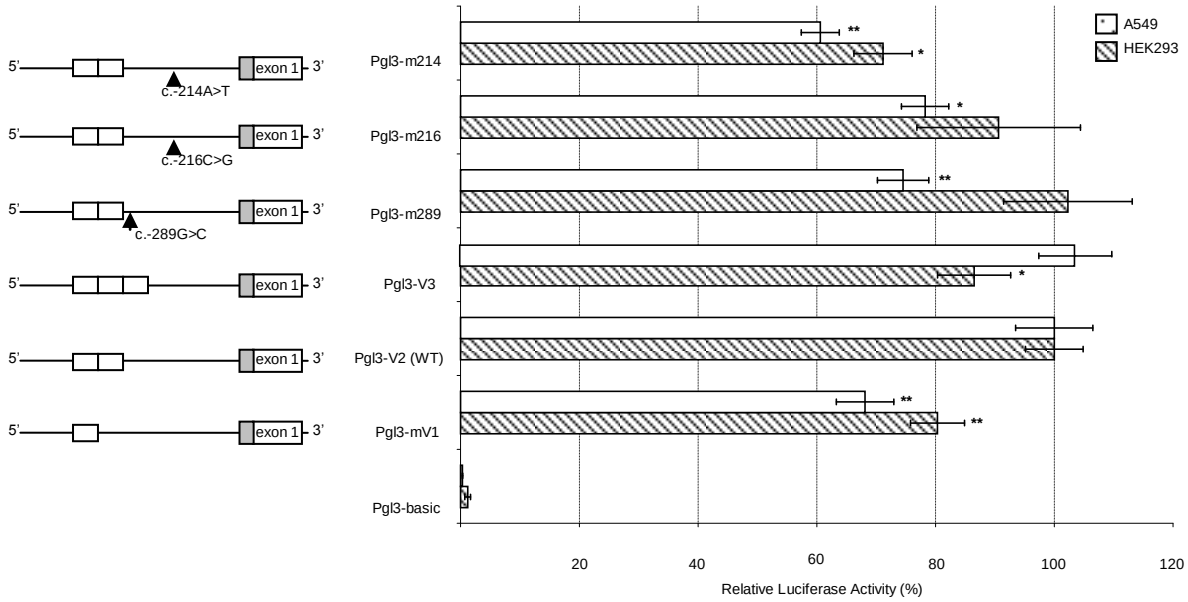

Figure 5. Promoter activities of the wild-type (WT) and polymorphic RAC1 sequences, in HEK293 and A549 cell lines. The promoterless pGL3-Basic was used as the baseline control. A phRL-TK control vector was co-transfected with each construct to normalize the transfection efficiency. pGL3-Wt (wild-type sequence) luciferase activity was used as a reference (100%). Values represent the mean of three independent experiments performed in triplicate. Relative luciferase activity and standard errors are shown for each construct. Values that differ significantly from those of the wild-type construct are indicated: *($p<0.05$) **($p<0.01$). The localization and nature of the polymorphisms are depicted on the sequence of the promoter region. Gray boxes, 5'-untranslated region; white boxes, the 15 bp-motif of the VNTR.

Table 5. Distribution of mutations of RAC1 promoter in IBD patients following AZA treatment.

	Mutation frequency (%)			
Mutations	Non Leucopenia (n=76)	Leucopenia (n=47)	Responders (n=61)	Resistant (n=27)
c.-293_-307[1]	0.6	-	-	1.9
c.-293_-307[3]	1.9	2.1	1.6	1.9
c.-289G>C	4.0*	-	2.4	5.6
c.-216C>G	-	-	0.8	-

c.-214A>T	-	2.1	-	-

n= number of patients, *p< 0.05

transcriptional factor NF-κB. In addition, both mutation, c.-216C>G and c.-214A>T, are responsible for the abolition of a YY1 motif (**Table 4**). Consequently, the VNTR-1 and the VNTR-3 are responsible for the abolition and the creation of both WT1 and SP1 sites, respectively (**Table 4**).

Functional consequences of the RAC1 promoter polymorphisms

We analysed the promoter activity of a 984 bp sequence (+/- 15 bp) (-978 to +6), located upstream the ATG initiation codon, in order to assess the functional impact of the VNTR polymorphism and of the three SNPs (c.-289G>C, c.-216C>G and c.-214A>T) identified in the *RAC1* promoter sequence. Results of the transient transfection assays that we performed using HEK293 and A549 cell lines are shown in **Fig. 5**. The promoterless pGL3-basic vector was used as the baseline control and the pGL3-wtV2 (wild-type) construct, which yielded luciferase activity 100-fold higher than that of the promoterless vector, was used as a reference of 100% activity. In the A549 cell line, pGL3-mV1, pGL3-m289, pGL3-m216 and pGL3-m214 displayed a significantly decreased promoter activity ($p<0.05$ or 0.01) of 32%, 25%, 22% and 39% respectively, compared to that of the wild-type sequence (pGL3-wtV2) (**Fig. 5**). In the HEK293 cell line, pGL3-mV1, pGL3-mV3 and pGL3-m214 displayed a significantly decreased promoter activity ($p<0.05$ or 0.01) of 20%, 14% and 29%, respectively, compared to that of the wild-type sequence (**Fig. 5**).

RAC1 polymorphisms and response to thiopurines

The analysis of the mutation distribution in different groups of IBD patients with thiopurine therapy revealed that the frequency of the c.-289G>C polymorphism (4%) in the patient group without ADR is statistically higher than that in the patient group with ADR (0%, $p= 0.048$) (**Table 5**). This polymorphism is 2.3 fold more frequent in the resistant group than in the responder group (**Table 5**). Excluding *TPMT* heterozygous genotypes from with or without adverse drug reaction cohort strengthened the association between no ADR and the c.-289G>C polymorphism (4.1%, $p=0.043$) (data not shown).

DISCUSSION

Azathioprine is a synthetic analogue of the naturally-occurring purine, adenosine. This pro-drug is mainly converted by a enzymatic pathway to 6-mercaptopurine (Eklund et al., 2006). Since their subsequent metabolism is identical, AZA and 6-MP share similar clinical and adverse effects (Gisbert and Gomollon, 2008). These drugs are inactively metabolized, in part, by TPMT whose level of activity is controlled by a common genetic polymorphism (Weinshilboum, 2001). Several studies have reported a correlation between TPMT activity and the risk of AZA/6-MP-induced myelotoxicity (Gisbert and Gomollon, 2008). Also, approximately 9% of IBD patients on AZA/6-MP exhibit resistance to these drugs (Dubinsky et al., 2002), which can be defined as a lack of remission after 8 months of treatment (Schwab et al., 2002). It has been suggested that ultra-high TPMT activity is the primary cause of thiopurine resistance (Schaeffeler et al., 2004), but less than 2% of individuals in the general population have such an ultra-methylator phenotype. The occurrence of adverse effects like myelodepression, as well as resistance, are major drawbacks in the use of thiopurine drugs and, consequently, concerns regarding both short- and long-term toxicity have restricted their use (Gisbert and Gomollon, 2008). These data, supported by the recent report that the immunosuppressive effect of thiopurine drugs is mediated by specific inhibition of RAC1 activation by 6-thio-GTP binding instead of GTP (Tiede et al., 2003), suggest the existence of additional mechanisms that would participate to the hematotoxicity of or resistance to thiopurine therapies.

In the present study, we report the first systematic investigation of the genetic polymorphism of the human *RAC1* gene. In order to screen for sequence variations in the coding sequence and the promoter region of the *RAC1* gene, we developed a PCR-SSCP strategy and applied it to genomic DNAs from 49 unrelated French individuals of Caucasian origin. The existence of several pseudogenes of *RAC1* has been taken into consideration for the primer design. After optimization of various parameters affecting the single-strand separation, *e.g.*, temperature for electrophoretic migration and matrix, we observed clear differences in band patterns when a PCR product contained a mutation. However, despite many precautions, some mutations might have not been detected under the chosen conditions, even if the sensitivity of PCR-SSCP has been shown to exceed 80% for fragments shorter than 300 bp (Hayashi and Yandell, 1993).

Our study has allowed the identification of a total of 16 different polymorphisms in the *RAC1* gene, five of them being previously described mutations with available dbSNP accession numbers (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/). Ten polymorphisms were detected in introns (nine substitutions and one insertion) and one polymorphism is a synonymous mutation located in exon 6. These 10 mutations are likely silent mutations as none modifies the amino acid sequence of RAC1 and/or none is located in regions potentially involved in mRNA splicing process. Two additional polymorphisms were identified in the promoter region of *RAC1*. Because of the potential impact of promoter polymorphisms on gene expression, we applied our PCR-SSCP strategy on DNA samples of 43 additional healthy volunteers and 128 IBD patients treated with a thiopurine drug to screen the promoter region of *RAC1*.

The median AZA dose received by the hematotoxicity reaction group (1.57 mg/kg) was significantly lower than controls (2 mg/kg, P=0.00015 two-sided Mann-Whitney U-test) consisting with a strategy of dose escalation in AZA prescription. The median duration of treatment in the resistant group (21 mth) was significantly lower than in the responder group (93 mth, P= 1.38^{e-8} two-sided Mann-Whitney U-test). Amongst this, AZA therapy was withdrawn due to lack of response. *TPMT*3A* and *TPMT*3C* alleles were found in the heterozygous state and no *TPMT*2* alleles were found. A heterozygous TPMT genotype was significantly associated with thiopurine hematotoxicity (OR 5.42, CI 1.54- 19.08, P<0.01).

In total, four polymorphisms were identified in the promoter region of *RAC1*, three of which are SNPs (c.-289G>C, c.-216C>G and c.-214A>T). The fourth one corresponds to a variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism consisting in one (c.-293_-307[1]) to three (c.-293_-307[3]) repeats of the 15 bp-motif CGGGAGCGGCGCGGG. As the VNTR allele carrying two repeats is the most frequent in our population and corresponds to the genomic sequence published in GenBank [NT_007819], it can be considered as the wild-type sequence of the *RAC1* promoter in Caucasians.

The analysis of the distribution of all the mutations we identified in *RAC1* has allowed the characterization of nine different allelic variants in addition to the wild-type allele (**Fig. 4**). The wild-type allele *RAC1*1A*, which is the most frequent allele (59.3%), corresponds to the nucleotide sequence reported in GenBank with the accession number NT_007819. The nine allelic variants, named *RAC1*1B* to *RAC1*1J*, contain single or combined mutations (**Fig. 4**). However, it cannot be excluded that other combinations of these mutations exist and define other *RAC1** alleles in the Caucasian population, as well as in other ethnic groups.

Our *in silico* analysis of the RAC1 promoter region also revealed the presence of other consensus binding sites for numerous transcription factors including E2F-4 and several zinc finger transcription factors, such as EGR1, KLF15, MAZ, MZF1, PLAG1, WT1 and YY1 (**Fig. 3**). These transcription factors are transcriptional regulators involved in growth, differentiation and apoptosis, which appear to be linked with major cellular functions of RAC1. RAC1 acts as a key regulator of the actin cytoskeleton by rearranging filamentous actin during coordinated cell migration leading to membrane ruffle formation (lamellipodia) (Hall, 1998) and adhesion. RAC1 is also involved in the progression of the cell cycle from the G1-phase to the S-phase, thereby participating in the cell proliferation (Karnoub et al., 2004). Matos *et al.* (2000) identified recognition motifs for transcription factors that are different to those we identified using Matinspector. This discrepancy could be explained by differences in the RAC1 reference sequence that was used by Matos *et al.* (2000).

In order to analyse the functional impact of the mutations that we identified in the promoter region of *RAC1*, the transcriptional activity of this polymorphic region spanning nucleotides -978 to +6 has been first evaluated using transient transfection assays in A549 and HEK293 cell lines. The wild-type 984-bp fragment exhibited high promoter activity when coupled to the luciferase reporter gene in both cell lines. These results thus suggest that the corresponding sequence likely contains regulatory elements for RAC1 expression whatever the cell type. A promoter region consisting in a 485-bp sequence upstream the ATG initiation codon was previously determined in the human *RAC1* gene by Matos et al., (2000). This promoter sequence displays several features typical of housekeeping genes and contains consensus motifs for binding of various transcription factors (Matos et al., 2000). All the mutant sequences that we analysed exhibited around 14% ($p<0.05$) to 39% ($p<0.01$) reduction of transcriptional activity compared to that of the wild-type construct (**Fig. 5**). Furthermore, we observed some differences in luciferase activity values between the two cell lines we used, suggesting a cell-specific regulation of *RAC1* expression. In order to determine if the reduction of the promoter activity, that we observed *in vitro*, was due to nucleotide differences in putative transcription factor binding sites, we additionally used the MatInspector software, which is a well-recognized tool for transcription factor analysis (Quandt et al., 1995, Heinemeyer et al., 1998). According to this *in silico* analysis, three SP1-binding sites exist in the wild-type promoter sequence of *RAC1* (**Fig. 3**). The SP1 factor is a common regulatory element of housekeeping genes and, in particular, SP1 binding sites have been identified as important elements in establishing and/or maintaining the methylation-free state of a genome, since methylation inhibits transcription (Siegfried et al., 1999). The c.-

289G>C mutation and the c.-293_-307[1] VNTR polymorphism, that we identified in the *RAC1* promoter, are both responsible for the abolition of a SP1 motif, which could consequently decrease the level of *RAC1* expression. Our *in vitro* data are in agreement with this hypothesis, as the c.-289G>C and the c.-293_-307[1] polymorphisms exhibited about 25% and 32% reduction in luciferase activity in A549, respectively. Moreover, we observed that these mutations were more frequent in IBD patients treated with AZA who did not experienced hematotoxicity compared to those who did, as well as in IBD patients who were classified as resistant to AZA compared those who are good responders. These data are consistent with the model for AZA-mediated immunosuppression proposed by Tiede et al. (2003).

An additional transcription factor, NF-κB, created by the mutation c.-216C>G, was revealed by the MatInspector analysis. NF-κB is a zinc finger DNA-binding protein that is involved in the regulation of apoptosis (Bernard et al., 2002). Interestingly, this mutation was found in the group of patients that were classified as good responders to AZA. That is in agreement with the AZA metabolism. 6-TGTP, one of the active metabolite of AZA, binds to RAC1 and activates the target genes, leading to a mitochondria-mediated T-cell apoptosis (Tiede et al., 2003). But, our *in vitro* results show that this mutation exhibits about 22% ($p<0.05$) reduction in luciferase activity in A549. This discrepancy is probably due to cellular context or cell type.

In conclusion, the present study represents, to our knowledge, the first report on the genetic polymorphism of the human *RAC1* gene in the Caucasian population. We did not identified any functional mutations in the coding sequence of *Rac1*, which could have been expected regarding the key cellular functions of this GTPase. Interestingly, we identified one SNP and a VNTR polymorphism in the promoter region of *RAC1*, that both appear to have an *in vitro* functional impact in various cell lines. The analysis of the *RAC1* promoter region in 128 IBD patients following AZA treatment allowed to identify two additional SNPs and a new VNTR variant. *In silico* and *in vitro* analyses performed for all the mutations identified in the RAC1 promoter region identified the mutation c.-289G>C as a mutation that protects against the hematotoxicity to AZA.

ACKNOWLEDGEMENTS

We express thanks to Isabelle Szuster and Anne Engels (EA2679) for their excellent technical assistance.

This study was supported by the Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, the Fond Européen de Développement Régional, the Institut de Recherche en Environnement Industriel and the Région Nord-Pas de Calais, France.

6 REFERENCES

Al Hadithy AF, de Boer NK, Derijks LJ, Escher JC, Mulder CJ, Brouwers JR. Thiopurines in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring and clinical recommendations. Dig Liver Dis. 2005;37:282-97.

Ansari A, Hassan C, Duley J, Marinaki A, Shobowale-Bakre EM, Seed P, et al. Thiopurine methyltransferase activity and the use of azathioprine in inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther 2002;16:1743-50.

Bernard D, Monte D, Vandenbunder B, Abbadie C. The c-Rel transcription factor can both induce and inhibit apoptosis in the same cells via the up-regulation of MnSOD. Oncogene. 2002;21:4392-402.

Carpenter B, Hill KJ, Charalambous M, Wagner KJ, Lahiri D, James DI, Andersen JS, Schumacher V, Royer-Pokora B, Mann M, Ward A, Roberts SG. BASP1 is a transcriptional cosuppressor for the Wilms' tumor suppressor protein WT1. Mol Cell Biol. 2004;24:537-49.

Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H, Marteau P, Gendre JP, Bonaz B, Soulé JC, Modigliani R, Touze Y, Catala P, Libersa C, Broly F. Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. Gastroenterology. 2000;118:1025-30.

Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK, Lennard-Jones JE. Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. Gut. 1993; 34:1081-5.

Den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. Hum Genet. 2001;109:121-4.

Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT, Targan SR, Vasiliauskas EA. 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 2002;122:904-15.

Eklund BI, Moberg M, Bergquist J, Mannervik B. Divergent activities of human glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine. Mol Pharmacol. 2006 ;70:747-54.

Elion GB. The purine path to chemotherapy. Science. 1989;244:41-7.

Fiegen D, Haeusler LC, Blumenstein L, Herbrand U, Dvorsky R, Vetter IR, Ahmadian MR. Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase. J Biol Chem. 2004; 279:4743-9.

Gisbert JP, Gomollón F. Thiopurine-induced myelotoxicity in patients with inflammatory bowel disease: a review. Am J Gastroenterol. 2008;103:1783-800.

Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science. 1998;279:509-14.

Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? Hum Mutat. 1993;2:338-46.

Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL, Kolchanov NA. Databases on Transcriptional Regulation: TRANSFAC, TRRD, and COMPEL. Nucleic Acids Res. 1998;26:364-70.

Jordan P, Brazao R, Boavida MG, Gespach C, Chastre E. Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. Oncogene. 1999;18:6835-9.

Karnoub AE, Symons M, Campbell SL, Der CJ. Molecular basis for Rho GTPase signaling specificity. Breast Cancer Res Treat. 2004; 84 :61-71.

Katsanos KH, Tsianos EV. Explaining the unexplaining leucopenia in azathioprine treatment. Annals of gastroenterology. 2006;19:141-42.

Kugler MC, Gerhard M, Schnelzer A, Borzym K, Reinhardt R, Schmitt M, Lengyel E. Isolation and characterization of Rac1 pseudogenes (psi1Rac1-psi4Rac1) in the human genome. Gene. 2004;341:189-97.

Krynetskaia NF, Krynetski EY, Evans WE. Human RNase H-mediated RNA cleavage from DNA-RNA duplexes is inhibited by 6-deoxythioguanosine incorporation into DNA. Mol Pharmacol. 1999;56: 841-8.

Krynetski E, Evans WE. Drug methylation in cancer therapy: lessons from the TPMT polymorphism. Oncogene. 2003;22:7403-13.

Komatsu N, Takeuchi S, Ikezoe T, Tasaka T, Hatta Y, Machida H, Williamson IK, Bartram CR, Koeffler HP, Taguchi H. Mutations of the *E2F4* gene in hematological malignancies having microsatellite instability. Blood. 2000;95:1509-10.

Lennard L. TPMT in the treatment of Crohn's disease with azathioprine. Gut. 2002; 51:143-6.

Malliri A, van der Kammen RA, Clark K, van der Valk M, Michiels F, Collard JG. Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. Nature. 2002;417:867-71.

Maltzman JS, Koretzky GA. Azathioprine: old drug, new actions. J Clin Invest. 2003;111:1122-4.

Marinaki AM, Ansari A, Duley JA, Arenas M, Sumi S, Lewis CM, Shobowale-Bakre el-M, Escuredo E, Fairbanks LD, Sanderson JD. Adverse drug reactions to azathioprine therapy are associated with polymorphism in the gene encoding inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase). Pharmacogenetics. 2004;14:181-7.

Matos P, Collard JG, Jordan P. Tumor-related alternatively spliced Rac1b is not regulated by Rho-GDP dissociation inhibitors and exhibits selective downstream signaling. J Biol Chem. 2003;278:50442-8.

Matos P, Skaug J, Marques B, Beck S, Veríssimo F, Gespach C, Boavida MG, Scherer SW, Jordan P. Small GTPase Rac1: structure, localization, and expression of the human gene. Biochem Biophys Res Commun. 2000;277:741-51.

Neurath MF, Kiesslich R, Teichgräber U, Fischer C, Hofmann U, Eichelbaum M, Galle PR, Schwab M. 6-thioguanosine diphosphate and triphosphate levels in red blood cells and response to azathioprine therapy in Crohn's disease. Clin Gastroenterol Hepatol. 2005;3:1007-14.

Nielsen JA, Berndt JA, Hudson LD, Armstrong RC. Myelin transcription factor 1 (Myt1) modulates the proliferation and differentiation of oligodendrocyte lineage cells. Mol Cell Neurosci. 2004;25:111-23.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86:2766-70.

Otteson DC, Lai H, Liu Y, Zack DJ. Zinc-finger domains of the transcriptional repressor KLF15 bind multiple sites in rhodopsin and IRBP promoters including the CRS-1 and G-rich repressor elements. BMC Mol Biol. 2005;6:15.

Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, and Werner T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. Nucleic Acids Res. 1995;23:4878-84.

Rihet S, Vielh P, Camonis J, Goud B, Chevillard S, de Gunzburg J. Mutation status of genes encoding RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases in a panel of invasive human colorectal and breast tumors. J Cancer Res Clin Oncol. 2001;127:733-8.

Sandborn W, Sutherland L, Pearson D, May G, Modigliani R, Prantera C. Azathioprine or 6-mercaptopurine for inducing remission of Crohn's disease. Cochrane Database Syst Rev. 2000: CD000545.

Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, Eichelbaum M, Zanger UM, Schwab M. Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. Pharmacogenetics. 2004;14:407-17.

Schnelzer A, Prechtel D, Knaus U, Dehne K, Gerhard M, Graeff H, Harbeck N, Schmitt M, Lengyel E. Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. Oncogene. 2000;19:3013-20.

Schwab M, Schaffeler E, Marx C, Fischer C, Lang T, Behrens C, et al. Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. Pharmacogenetics 2002;12:429-36.

Seidman EG. Clinical use and practical application of TPMT enzyme and 6-mercaptopurine metabolite monitoring in IBD. Rev Gastroenterol Disord. 2003;3:S30-8.

Siegfried Z, Eden S, Mendelsohn M, Feng X, Tsuberi BZ, Cedar H. DNA methylation represses transcription in vivo. Nat Genet. 1999;22:203-6.

Somerville L, Krynetski EY, Krynetskaia NF, Beger RD, Zhang W, Marhefka CA, Evans WE, Kriwacki RW. Structure and dynamics of thioguanine-modified duplex DNA. J Biol Chem. 2003;278:1005-11.

Song J, Murakami H, Tsutsui H, Tang X, Matsumura M, Itakura K, Kanazawa I, Sun K, Yokoyama KK. Genomic organization and expression of a human gene for Myc-associated zinc finger protein (MAZ). J Biol Chem. 1998;273:20603-14.

Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, Lehr HA, Wirtz S, Becker C, Atreya R, Mudter J, Hildner K, Bartsch B, Holtmann M, Blumberg R, Walczak H, Iven H, Galle PR, Ahmadian MR, Neurath MF. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymChernoff Jphocytes. J Clin Invest. 2003 111:1133-45.

Timmer A, McDonald JW, Macdonald JK. Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis. Cochrane Database Syst Rev. 2007: D000478.

Voz ML, Mathys J, Hensen K, Pendeville H, Van Valckenborgh I, Van Huffel C, Chavez M, Van Damme B, De Moor B, Moreau Y, Van de Ven WJ. Microarray screening for target genes of the proto-oncogene PLAG1. Oncogene. 2004;23:179-91.

Weinshilboum R. Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. Drug Metab Dispos 2001;29:601-605.

Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. Am J Hum Genet. 1980;32:651-62.

Wittinghofer A, Nassar N. How Ras-related proteins talk to their effectors. Trends Biochem Sci. 1996;21:488-91.

Wu F and Lee AS. YY1 as a Regulator of Replication-dependent Hamster Histone H3.2 Promoter and an Interactive Partner of AP-2*. J. Biol. Chem. 2001;276:28-34.

Yan QW, Reed E, Zhong XS, Thornton K, Guo Y, Yu JJ. MZF1 possesses a repressively regulatory function in ERCC1 expression. Biochem Pharmacol. 2006;71:761-71.

Zohn IM, Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Der CJ. Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. Oncogene. 1998;17:1415-38.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de cette thèse avaient pour but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine des variations inter-individuelles de réponse aux médicaments thiopuriniques que sont l'azathioprine, la 6-mercaptopurine et la 6-thioguanine, et ainsi d'améliorer l'utilisation de ces molécules tant en termes d'efficacité que de sécurité d'emploi. Parmi les effets indésirables de ces médicaments, les plus sévères sont ceux liés à leur myélotoxicité, pour laquelle l'implication du polymorphisme génétique de la TPMT est désormais reconnue comme un déterminant majeur. En effet, les patients présentant un déficit d'activité en TPMT (méthyleurs lents) et, à un moindre degré, les patients au phénotype intermédiaire, ont un risque accru de développer une leucopénie, voire une aplasie médullaire potentiellement fatale, pour des doses conventionnelles de thiopurines. De plus, il est également reconnu que les patients à activité TPMT très élevée peuvent présenter une résistance au traitement ou un échappement thérapeutique. L'évaluation du coût d'un test de génotypage de la TPMT (de 100 à 663 $ canadiens selon les auteurs), par rapport au coût d'une thérapie par azathioprine (677 $) (Marra *et al.,* 2002) ou des soins nécessaires pour traiter une leucopénie sévère (environ 7757 $ canadiens) (Tavadia *et al.,* 2000), montre le bénéfice que procure la connaissance précoce du statut métabolique des patients en terme d'économie de santé. Plusieurs études pharmacoéconomiques ont depuis confirmé l'intérêt de la détermination du phénotype TPMT dans le cadre de l'utilisation des médicaments thiopuriniques (Vegter *et al.,* 2008). La recommandation de déterminer le phénotype TPMT a ainsi été ajoutée dès 2003 dans la notice des médicaments thiopuriniques aux USA sur décision de la *Food and Drug Administration* (FDA).

L'activité TPMT d'un individu peut être déterminée par des méthodes de phénotypage ou prédites par des méthodes de génotypage. La connaissance du phénotype et/ou du génotype TPMT d'un patient représente une véritable aide à la thérapeutique, qui permet aux cliniciens d'adapter la posologie des médicaments thiopuriniques, et ceci dès l'instauration du traitement, ou de personnaliser le suivi du patient (fréquences de l'hémogramme par exemple), voire de choisir un traitement alternatif. Ces tests de phénotypage et de génotypage sont d'ores et déjà disponibles dans plusieurs laboratoires hospitaliers français, mais leur utilisation en routine n'est probablement pas encore assez largement répandue. De plus, il semble persister une discordance entre le phénotype mesuré par phénotypage et celui prédit

par génotypage, pour 5 à 10 % des individus (Yates *et al.,* 1997 ; Spire-Vayron de la Moureyre *et al.,* 1998a ; Haglund *et al.,* 2004). Cette discordance reflète, d'une part, les limites respectives des méthodes utilisées, et d'autre part, la connaissance encore incomplète de l'enzyme TPMT et, en particulier, des mécanismes moléculaires à l'origine de sa variabilité d'activité inter- et intra-individuelle.

Le phénotypage est indiscutablement la méthode de choix pour connaître à un instant donné la capacité métabolique d'un sujet vis-à-vis d'un substrat de la TPMT et permet ainsi de définir la première dose d'attaque, efficace et normalement non toxique, du traitement thiopurinique (Lennard *et al.,* 1997 ; Evans, 2002 ; Regueiro et Mardini, 2002 ; Dubinsky, 2003b ; Kaskas *et al.,* 2003). Cependant, comme nous l'avons mentionné dans un chapitre précédent, le phénotypage est inadapté ou difficile à interpréter lorsqu'il est réalisé chez des patients ayant été transfusés depuis moins de deux mois ou chez les patients polymédicamentés (interactions médicamenteuses avec des molécules inhibant ou induisant l'activité TPMT), du fait d'un risque de phénocopie (Pazmino *et al.,* 1980 ; Krynetski et Evans, 2000 ;). De plus, des inconvénients liés à la technique elle-même (mise en oeuvre délicate, difficulté de reproductibilité d'un laboratoire à l'autre) limitent l'utilisation du phénotypage en routine.

Le génotypage, qui permet de prédire le phénotype des individus sur la base de leur génotype, apparaît de mise en œuvre a priori plus aisée que le phénotypage, mais son taux d'efficacité de prédiction est directement lié au nombre de mutations du gène *TPMT* qui sont recherchées. Les méthodes de génotypage classiquement utilisées en routine sont basées sur l'identification des trois mutations inactivatrices les plus fréquentes, caractéristiques de l'allèle *TPMT*2* et des allèles du type *TPMT*3*. Le taux d'efficacité de prédiction du phénotype de ces méthodes est élevé, mais n'atteint jamais 100 % du fait de l'existence d'un grand nombre d'autres mutations inactivatrices rares. La plus grande étude réalisée à ce jour, sur plus de 1200 individus sains, montre un taux de concordance entre le phénotype, déterminé par une méthode classique de phénotypage, et le génotype des individus, déterminé par une méthode de criblage de gène (en l'occurrence ici par DHPLC), couplée ou non à du séquençage, de 98,4 % (Schaeffeler *et al.,* 2004). Or, l'utilisation d'une telle méthode de criblage de gène, voire le séquençage complet du gène de la TPMT, est peu adaptée en routine du fait entre autre du délai assez long qu'elle impose entre la prescription de l'analyse et le rendu du résultat. Certains laboratoires utilisent comme alternative le séquençage direct

de l'ADNc du gène *TPMT*, mais cette méthode impose un prélèvement sanguin de haute qualité de manière à préserver l'intégrité de l'ARNm et ne permet d'analyser que la séquence codante du gène. A ce jour, la stratégie de génotypage du gène *TPMT* sans doute la mieux adaptée en routine, et telle qu'utilisée classiquement dans notre laboratoire hospitalier du CHRU de Lille (UF Génopathies et Pharmacogénétique du Pr. F. Broly), consiste en l'identification des trois mutations inactivatrices les plus fréquentes dans le cadre d'une détermination du phénotype TPMT avant administration d'un traitement thiopurinique et au séquençage complet du gène chez les patients déjà traités et ayant développé une myélotoxicité sévère sous traitement.

L'application de cette stratégie à des patients ayant présenté une leucopénie sous AZA ou 6-MP et des individus phénotypés méthyleurs intermédiaires, mais non porteurs des mutations inactivatrices les plus fréquentes, a permis d'identifier dans plusieurs cas de nouvelles mutations du gène *TPMT*, notamment de nouvelles mutations faux-sens. De par leur nature, il est cependant difficile de conclure quant au lien entre ces mutations et un défaut d'activité de la TPMT. Il est donc nécessaire d'étudier l'impact fonctionnel de ces nouvelles mutations faux-sens afin de confirmer leur caractère non-fonctionnel.

La première partie de mes travaux s'est inscrite dans ce cadre et j'ai ainsi étudié, à l'aide d'un système cellulaire d'expression hétérologue, la levure *S. cerevisiae*, quatre mutations faux-sens du gène *TPMT*, dont deux nouvelles et deux qui avaient déjà été décrites dans la littérature, mais non analysées fonctionnellement. Ce travail, complété par une analyse structurale par modélisation moléculaire comparative, a permis de confirmer le caractère non-fonctionnel des mutations c.205C>G ($Leu^{69}Val$, *TPMT*21*) et c.634T>C ($Cys^{212}Arg$, *TPMT*25*) et de montrer que les mutations c.356A>C ($Lys^{119}Thr$, *TPMT*9*) et c.537G>T ($Gln^{179}His$, *TPMT*24*) n'affectent pas de manière significative l'activité catalytique de la TPMT dans le système cellulaire utilisé. Il est possible toutefois que ces deux dernières mutations affectent *in vivo* l'activité de la TPMT et que nos résultats négatifs ne soient que le reflet de l'utilisation d'un système cellulaire rapporté par d'autres comme inadapté à l'analyse des variants de la TPMT. Il semble en effet que la levure *S. cerevisiae* ne permette pas d'analyser les conséquences des mutations faux-sens sur la stabilité de la protéine TPMT, or plusieurs mutations ont été démontrées à l'origine d'un déficit en TPMT par un mécanisme de dégradation accélérée de l'enzyme mettant en jeu le protéasome (Tai *et al.*, 1997 et 1999). Pour ces raisons, d'autres équipes préconisent l'utilisation d'autres systèmes cellulaires

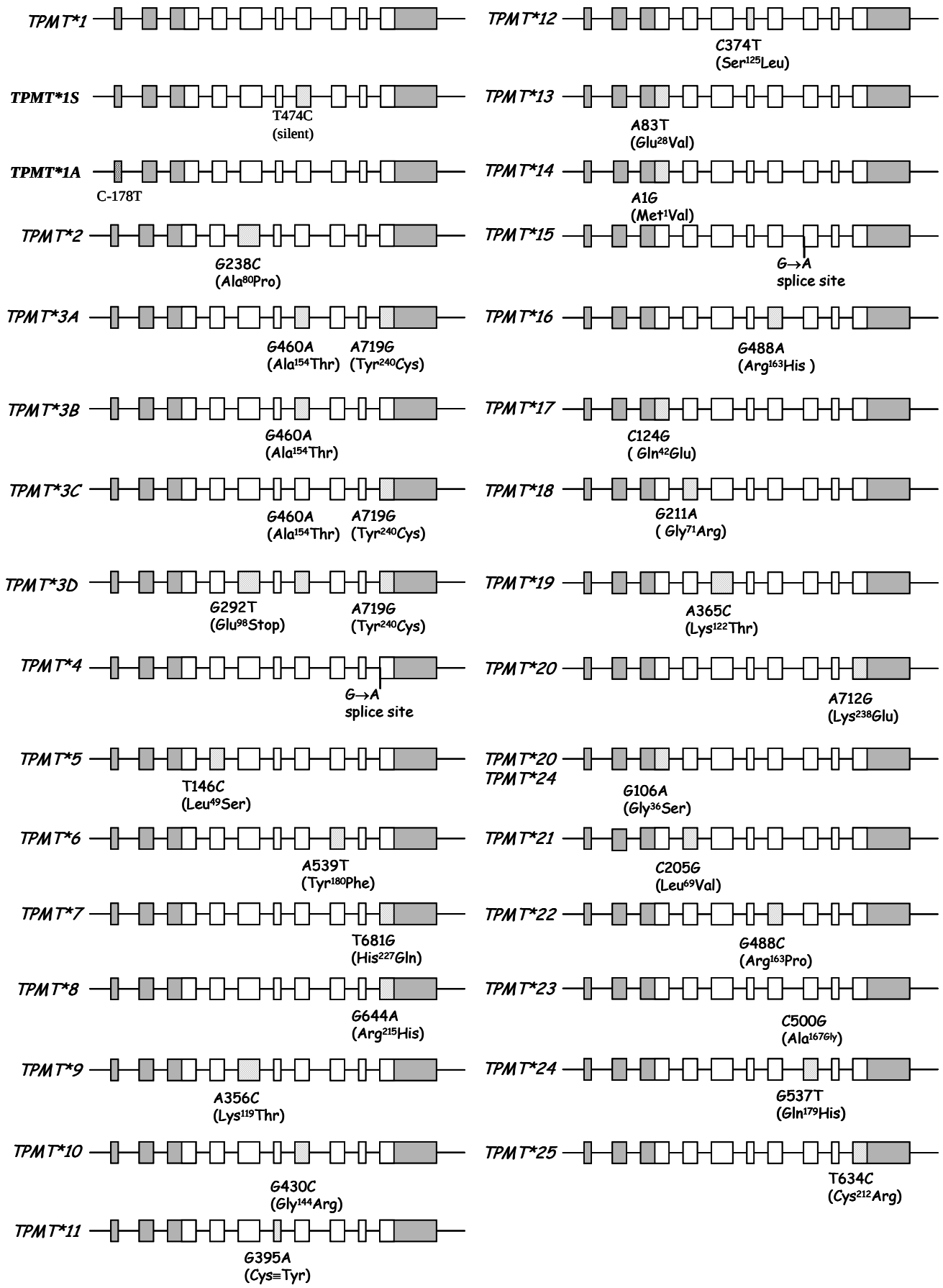

Figure 24. Variants alléliques de la TPMT humaine. Rectangles gris : exons non codants ; rectangles blancs : exons codants ; rectangles hachurés : exons contenant au moins une mutation.

d'expression, comme par exemple les cellules de mammifères du type *COS*. Cependant, deux équipes, qui ont analysé respectivement 13 variants alléliques dans des cellules *COS-1* (Salavaggione *et al.*, 2005) et 23 variants alléliques dans des cellules *COS-7* (Ujiie *et al.*, 2008), aboutissent à des résultats différents, voire discordants, pour certains allèles. Notamment, concernant l'un des variants que nous avons également étudié, le *TPMT*9*, alors que Salavaggione *et al.*, (2005) décrit une activité résiduelle de 92 % par rapport à la forme sauvage de l'enzyme et classe cet allèle comme fonctionnel, Ujiie *et al.*, (2008) rapporte une activité résiduelle de 73 %, significativement ($p<0,05$) différente de celle de l'enzyme sauvage et classe cet allèle comme non-fonctionnel. Toutes ces données rendent compte des limites des analyses fonctionnelles *in vitro* et de la difficulté à conclure sur le caractère fonctionnel ou non-fonctionnel d'un variant, quand l'activité résiduelle *in vitro* n'est pas franchement et indiscutablement déficitaire. Le type de cellule utilisé, les conditions d'incubation du subtrat-test, le choix du substrat, ainsi que la puissance du test statistique utilisé pour comparer les valeurs d'activité enzymatique observées, sont autant de facteurs probablement à l'origine de ces discordances.

Au total, grâce à nos travaux et à ceux d'autres équipes, la connaissance des mécanismes moléculaires à l'origine d'un déficit d'activité TPMT a été considérablement améliorée et, à ce jour, 30 variants alléliques différents du gène *TPMT* ont été identifiés **(Figure 24)**. Le caractère non-fonctionnel de la plupart d'entre eux a été confirmé grâce à la combinaison d'analyses *in vitro* et *in vivo*. Pour les autres, il reste difficile de conclure et des travaux supplémentaires restent sans doute à réaliser de manière à confirmer définitivement ou non leur caractère non-fonctionnel. De plus, il serait nécessaire d'établir une nomenclature internationale consensuelle, de manière à éviter que deux allèles différents soient désignés par le même numéro d'allèle.

Cependant, de nombreuses études montrent qu'il persiste malgré tout une discordance entre le phénotype et le génotype pour certains individus et, de plus, les mutations identifiées dans la séquence codante du gène *TPMT* ne permettent pas d'expliquer la large variabilité d'activité enzymatique observée au sein des méthyleurs rapides, voire des méthyleurs intermédiaires. La découverte par notre équipe, il y a quelques années, d'un polymorphisme de répétitions du type *VNTR* dans la région promotrice proximale du gène, était apparue alors comme un mécanisme possible de variabilité de l'expression de la TPMT et donc comme potentiellement impliquée dans cette large variabilité d'activité (Spire-Vayron de la Moureyre

et al., 1999). Cependant, au vu des nombreux travaux menés par la suite par d'autres équipes, il semble que ce VNTR ne joue qu'un rôle mineur dans les variations inter-individuelles d'activité de la TPMT (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1998a et 1999, Alves *et al.*, 1999 et 2001). Très récemment, un autre polymorphisme de répétitions, affectant également la région promotrice du gène *TPMT*, a été identifié et semble impliqué dans le phénotype TPMT (Roberts *et al.*, 2008). Ce polymorphisme est caractérisé par la répétition en tandem d'un motif trinucléotidique (GCC) et les individus porteurs des variants $(GCC)_5$ et $(GCC)_7$ présentent, par rapport à ceux qui portent le variant $(GCC)_6$, des activités TPMT très élevées, les classant dans un phénotype dit ultra-rapide. L'analyse fonctionnelle *in vitro* de ce polymorphisme, à l'aide d'un gène rapporteur, montre une augmentation significative de l'activité transcriptionnelle pour les variants à 5 et 7 répétitions, par rapport à celui à 6 répétitions, confirmant a priori leur rôle dans le phénotype ultra-méthyleur (Roberts *et al.*, 2008). Ces données très récentes, bien qu'à confirmer dans des populations indépendantes, permettent d'envisager le génotypage de ce polymorphisme en routine pour identifier les individus à risque d'inefficacité thérapeutique ou de résistance aux traitements thiopuriniques.

Bien que la détermination du phénotype TPMT chez les patients candidats à un traitement par thiopurines présente un intérêt considérable dans le cadre de l'individualisation de ces traitements et du suivi des patients, elle ne permet toutefois pas de prévoir et de prévenir tous les cas de myélotoxicité. De nombreux exemples de patients ayant présenté une leucopénie après l'initiation d'un traitement par AZA, alors qu'ils n'étaient porteurs d'aucune anomalie de séquence du gène *TPMT*, ont été en effet décrits (Naughton *et al.*, 1999 ; Colombel *et al.*, 2000 ; Dubinsky *et al.*, 2000 ; Lowry *et al.*, 2001). Il est ainsi classique de rapporter dans la littérature que seul un tiers des cas de leucopénies sous thiopurines est expliqué par la TPMT. Par ailleurs, les médicaments thiopuriniques sont suceptibles d'entraîner d'autres types d'effets indésirables, potentiellement sévères et nécessitant parfois l'arrêt du traitement, comme des pancrétites aiguës, une hépatotoxicité, ou encore des cancers secondairement induits. Il est donc fortement probable que d'autres facteurs, génétiques ou non, soient impliqués dans les variations de réponse aux thiopurines (Gearry *et al.*, 2003 ; Van Aken *et al.*, 2003).

La prise en charge cellulaire des thiopurines est en effet très complexe et fait intervenir un très grand nombre de partenaires protéiques. Les enzymes et leurs co-facteurs, les transporteurs, ou encore les cibles pharmacologiques, impliqués, représentent tous

potentiellement de bons candidats pour expliquer les variations inter-individuelles d'efficacité et de toxicité des thiopurines. Nous avons, dans ce contexte, étudié le polymorphisme génétique de deux de ces protéines, l'inosine monophosphate déshydrogénase de type 2 et la RhoGTPase RAC1.

Le gène de l'inosine monophosphate déshydrogénase de type 2 (*IMDPH2*) nous semblait un bon candidat pour expliquer la survenue de leucopénies sous AZA, car cette enzyme participe à la formation des métabolites actifs des thiopurines, les 6-TGN, dont l'accumulation dans les tissus hématopoïétiques est à l'origine de cette hématotoxicité. De plus, il existe une large variabilité inter-individuelle d'activité IMPDH dans la population générale (Glander *et al.*, 2001 et 2004). Dans un premier temps, nous avons étudié le polymorphisme de ce gène dans une population de volontaires sains d'origine caucasienne, à l'aide d'une stratégie *PCR-SSCP*. Ces travaux nous ont permis de montrer que le gène *IMPDH2* est peu polymorphe, mais d'identifier toutefois un polymorphisme affectant la région promotrice et responsable, *in vitro*, d'une diminution significative de l'activité transcriptionnelle vis-à-vis d'un gène rapporteur. Cette mutation ponctuelle rare, c-95T>G, affecte une séquence consensus correspondant à un élément de réponse AMPc dépendante. Il reste cependant à déterminer l'influence *in vivo* de ce polymorphisme sur l'activité IMPDH2. L'un des autres polymorphismes que nous avons identifiés dans le gène *IMPDH2*, et qui présente une fréquence allélique de l'ordre de 15 % dans la population caucasienne que nous avons testée, est situé à proximité du site donneur d'épissage de l'intron 7. Cette mutation IVS7+10T>C pourrait affecter le processus d'épissage de l'ARNm et, par voie de conséquence, affecter l'expression de l'IMPDH2. Pour examiner cette hypothèse, nous envisageons d'étudier l'impact de ce polymorphisme sur l'épissage de l'ARNm de l'*IMPDH2* par une approche du type « mini-gène », complétée par une quantification de son expression à l'aide d'une méthode de RT-PCR en temps réel chez des individus présentant différents génotypes pour cette mutation. Si l'implication de ces deux polymorphismes, c-95T>G et IVS7+10C>T, sur la variabilité inter-individuelle d'activité IMPDH est confirmée, il restera alors à vérifier l'hypothèse d'un lien entre ces polymorphismes et la réponse aux médicaments thiopuriniques. D'autres polymorphismes rares du gène *IMPDH2* ont été décrits dans la littérature, notamment la mutation faux-sens $Leu^{263}Phe$, qui est responsable *in vitro* d'une diminution significative de l'activité catalytique de l'enzyme (Wang *et al.*, 2007). Cette mutation n'ayant pas été identifiée dans notre échantillon de volontaires sains par la stratégie *PCR-SSCP* que nous avons utilisée, nous avons secondairement ré-analysé ces individus à

l'aide d'un test rapide de génotypage spécifique de cette mutation. Cette analyse a confirmé l'absence d'individus porteurs de la Leu^{263}Phe dans notre cohorte. Ce résultat reflète probablement la rareté de ce polymorphisme ou sa variabilité de fréquence inter-ethnique, l'origine des sujets analysés dans l'étude de Wang *et al.,* (2007) n'étant pas clairement définie.

Ces travaux sur le polymorphisme génétique de l'IMPDH2 présentent en outre un intérêt dans le cadre de la pharmacogénétique d'un autre médicament immunosuppresseur, le mycophénolate mophétil (Cellcept®). L'IMPDH2 est en effet la cible pharmacologique de ce médicament, et plus particulièrement de son métabolite actif, l'acide mycophénolique, inhibiteur puissant de la voie de synthèse *de novo* des purines. Des travaux récents ont d'ailleurs mis en évidence une association significative entre la survenue de rejets aigus chez des transplantés rénaux et le polymorphisme intronique, IVS7+10T>C, décrit précédemment (Grinyó *et al.*, 2008). Ces résultats justifient donc d'autant plus les analyses complémentaires que nous envisageons pour étudier les conséquences de ce polymorphisme sur l'expression et l'activité de l'IMPDH2.

Le second gène candidat que nous avons étudié est celui de la protéine RAC1 (ou *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), qui appartient à la sous-famille des GTPases Rho et qui est l'une des cibles pharmacologiques des thiopurines. En effet, parmi les mécanismes d'action menant à la cytotoxicité des thiopurines (Sahasranaman *et al.,* 2008), celui mettant en jeu la protéine RAC1 semble particulièrement important dans le cadre du traitement des maladies inflammatoires chroniques comme les MICI, puisqu'il serait prépondérant aux effets immunosuppresseurs de l'AZA et de la 6-MP. Il a été montré que la 6-thioguanosine triphosphate (6-TGTP), métabolite actif des thiopurines, est capable de se lier à RAC1 à la place de son co-activateur endogène, le GTP, entraînant ainsi un blocage de l'activation de RAC1 et, par voie de conséquence, la suppression de l'activation de différents gènes-cibles de RAC1 menant à l'induction de l'apoptose des lymphocytes T co-stimulés par le CD28, molécule importante dans la réponse immunitaire (Tiede *et al.,* 2003). Pour examiner l'hypothèse de l'existence d'un polymorphisme génétique à l'origine de variations d'expression et/ou d'activité de RAC1 et, par conséquent, potentiellement responsable d'anomalies de réponse aux thiopurines, nous avons développé une stratégie d'analyse *PCR-SSCP* pour étudier les 7 exons du gène et sa région promotrice. Cette stratégie, appliquée à l'analyse de 49 volontaires sains d'origine caucasienne, a permis de démontrer le caractère

peu polymorphe du gène *RAC1*, en particulier au niveau de ses régions codantes. Plusieurs polymorphismes, dont des mutations ponctuelles et un polymorphisme de répétitions du type *VNTR*, ont cependant été identifiés dans la région promotrice et leur analyse fonctionnelle *in vitro* suggère que certains puissent affecter l'expression du gène *RAC1*. L'effet de ces polymorphismes sur l'activité transcriptionnelle du promoteur de *RAC1* pourrait être dû à l'altération d'un certain nombre de séquences de reconnaissance pour des facteurs de transcription variés, tels que les facteurs Sp1 et NF-KB. Ce travail a alors été complété par l'analyse de la séquence promotrice de *RAC1* chez des patients atteints d'une MICI ayant répondu efficacement ou non à un traitement par AZA ou 6-MP et chez des patients ayant développé une leucopénie sous thiopurine, le gène *RAC1* étant un bon candidat pour expliquer les cas de leucopénie non attribuables à un défaut d'activité TPMT (Katsanos et Tsianos, 2006). Les résultats de cette étude préliminaire montrent que l'un des polymorphismes affectant la séquence promotrice, la mutation c-289G>C, est plus fréquemment retrouvée chez les patients n'ayant pas développé de leucopénies sous AZA/6-MP, ainsi que chez les patients résistants au traitement (Garat *et al.*, manuscrit en préparation). Le mécanisme « protecteur » de cette mutation reste cependant à expliquer et son rôle dans la réponse aux médicaments thiopuriniques à confirmer.

Par ailleurs, il est possible que le polymorphisme génétique de RAC1 soit non seulement impliqué dans les variations de réponse aux traitements thiopuriniques, mais également dans la pathogenèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou dans leur sévérité. En effet, la protéine RAC1, qui intervient dans la progression du cycle cellulaire (Matos et Jordan, 2005) et participe ainsi à la prolifération cellulaire (Hall, 1998; Karnoub *et al.*, 2004), a été montrée comme indispensable aux processus de réparation des ulcérations de la muqueuse intestinale (Ray *et al.*, 2003). La résistance à l'apoptose des LcT CD4+, dans lesquels RAC1 est fortement exprimée, est d'ailleurs l'un des mécanismes pathogéniques reconnu des maladies inflammatoires chroniques comme les MICI, dans lesquelles elle initie et perpétue le processus inflammatoire (Sartor, 1994 ; Neurath, 2002). Pour ces raisons, nous émettons l'hypothèse qu'une variabilité d'expression ou d'activité de RAC1, d'origine génétique, puisse être impliquée dans la pathogenèse des MICI et nous envisageons, par conséquent, de poursuivre nos travaux par l'analyse du polymorphisme du gène *RAC1* dans des cohortes de patients atteints de maladie de Crohn ou de rectocolites hémorragiques.

Enfin, dans le cadre de la poursuite de ces travaux sur la pharmacogénétique des thiopurines,

nous envisageons d'étudier un mécanisme supplémentaire qui pourrait être responsable d'une production anormale des métabolites actifs, à savoir les thionucléotides triphosphate (6-TGN). En effet, une variation inter-individuelle du rapport thionucléotides diphosphate/thionucléotides triphosphate, potentiellement à l'origine d'un défaut de réponse aux médicaments thiopuriniques, a été suggérée, notamment à travers une étude portant sur 79 patients atteints de MICI traités au long cours par l'AZA (Neurath *et al.*, 2005). Dans cette étude, une corrélation significative a été démontrée entre la réponse au traitement et la concentration intra-érythrocytaire en 6-TGTP, avec, en particulier, plus de rechutes et une affection plus réfractaire aux traitements chez les patients présentant des concentrations basses de 6-TGTP et élevées de 6-TGDP. Nous avons en perspective d'examiner cette hypothèse par la mise au point, tout d'abord, de la séparation et du dosage par HPLC de ces thionucléotides di- et tri-phosphatés, puis du dosage de cette activité enzymatique de phosphorylation sur des lysats érythrocytaires. Ce travail vient d'être initié au sein de notre laboratoire. A terme, si cette hypothèse était vérifiée, l'identification de l'enzyme responsable de cette étape de phosphorylation et son analyse moléculaire pourraient constituer les prochaines étapes de nos travaux sur la pharmacogénétique des médicaments thiopuriniques.

Comme nous avons tenté de le faire à travers l'étude des gènes *IMPDH2* et *RAC1*, de nombreuses autres équipes ont analysé divers gènes candidats susceptibles d'être impliqués dans les anomalies de réponse aux médicaments thiopuriniques. Parmi les résultats qui pourraient contribuer à améliorer l'identification des sujets à risque de présenter des effets indésirables ou une inefficacité thérapeutique aux thiopurines, et qui ont été détaillés dans l'un des chapitres précédents de cette thèse, ceux qui concernent les polymorphismes génétiques de l'enzyme ITPA et du transporteur ABCC4 (MRP4) semblent actuellement les plus probants. L'ensemble de ces travaux démontre que les mécanismes impliqués dans la pharmacogénétique des thiopurines sont complexes et que les anomalies de réponse observées avec ces médicaments sont d'origine polygénique. Les travaux récents de Stocco *et al.*, (2009) qui ont montré qu'un défaut d'activité de l'ITPA était corrélé à une fréquence plus élevée de neutropénies fébriles sévères sous 6-MP, mais uniquement chez les patients pour lesquels la posologie a été adaptée en fonction de leur phénotype TPMT, illustrent ce concept et démontrent la nécessité d'établir un protocole pertinent et consensuel définissant non seulement les tests pharmacogénétiques à réaliser, mais aussi les schémas thérapeutiques et la démarche de surveillance à utiliser, chez les patients traités par des médicaments thiopuriniques.

Au total, face à la complexité probable des mécanismes moléculaires à l'origine des variations inter-individuelles de réponse aux médicaments thiopuriniques et, par conséquent, face à la difficulté d'identifier tous les sujets à risque de développer une hématotoxicité, voire d'autres effets indésirables, certains auteurs préconisent le dosage des métabolites 6-TGN comme méthode de surveillance des traitements thiopuriniques (Lennard, 1987). En effet, il est admis que l'efficacité et la toxicité des médicaments thiopuriniques sont étroitement liées aux concentrations intra-érythrocytaires en 6-TGN (Lennard *et al.,* 1993 ; Schütz *et al.,* 1996 ; Bergan *et al.,* 1997a ; Decaux *et al.,* 2001). Ce dosage ne peut cependant pas être réalisé et interprété à l'initiation du traitement, l'équilibre thérapeutique ou « *steady state* » n'étant atteint qu'après plusieurs semaines de traitement, et le protocole analytique à mettre en œuvre est difficile (instabilité des métabolites dans le sang, variabilité des rendements d'extraction, etc...) (Dervieux *et al*., 1999). De ce fait, la détermination du phénotype TPMT avant l'introduction d'un traitement thiopurinique, couplée à un suivi thérapeutique par dosage des 6-TGN et à un contrôle régulier de la formule sanguine, reste actuellement la démarche la plus pertinente et la plus prudente dans le cadre de l'utilisation des médicaments thiopuriniques (Relling *et al.,* 1999a ; Rumbo *et al.,* 2002).

CONCLUSION

CONCLUSION

Les recherches menées dans le domaine de la pharmacogénétique des traitements thiopuriniques, et plus largement, des autres médicaments potentiellement toxiques ou pouvant s'avérer inefficaces chez certains individus, présentent non seulement un intérêt purement médical, mais aussi économique. La connaissance prospective des patients à risque de développer des effets indésirables à un traitement médicamenteux devrait permettre de mieux maîtriser les coûts en terme de Santé Publique, en évitant la prescription de traitements longs, coûteux, voire inutiles ou dangereux pour un certain nombre de sujets. La généralisation des tests de génotypage, en vue d'améliorer l'efficacité et la sécurité d'emploi des médicaments, n'est certes pas encore une réalité, mais les différents acteurs du monde de la Santé et les représentants des autorités de tutelle semblent avoir récemment pris conscience de l'importance des phénomènes pharmacogénétiques. Les variations de réponse aux médicaments, d'origine génétique, sont désormais reconnues comme un problème médical et de Santé Publique majeur et des recommandations d'utilisation de tests pharmacogénétiques ont été ajoutées dans les notices de plusieurs médicaments sur décision de certaines agences de régulation comme la FDA.

L'homme étant exposé à un nombre toujours croissant de composés chimiques ou xénobiotiques, de nouveaux cas d'anomalies de réponse à l'environnement chimique sont régulièrement identifiés. L'accélération récente des découvertes en génétique humaine, due en grande partie aux travaux réalisés sur le génome humain et à la pharmacogénomique, permet d'envisager à terme l'identification de l'ensemble des variations, d'origine génétique, de réponse aux médicaments et, plus largement, aux xénobiotiques. Parallèlement, l'évolution des techniques de biologie moléculaire et la vulgarisation des outils analytiques ne cessent de s'étendre et l'émergence des technologies dites à « haut débit et à grande échelle», telles que les puces à ADN ou biopuces, devrait, dans un futur proche, offrir aux cliniciens la possibilité d'obtenir en un seul test, le profil pharmacogénétique de chaque patient, pour des centaines, voire des milliers de gènes d'intérêt. Ainsi, une « carte d'identité génotypique» permettant de préciser la pathogénie de la maladie, les capacités métaboliques et de transport, et la fonctionnalité des récepteurs ou des cibles thérapeutiques, pourrait être établie pour chaque individu. Une biopuce pour l'aide au diagnostic et au traitement des leucémies chez l'enfant,

développée au St. Judes Children's Research Hospital de Memphis (USA), illustre ces nouveaux concepts (Yeoh *et al.,* 2002 ; Holleman *et al.,* 2004).

L'ensemble de ces évolutions devrait permettre le développement d'une médecine dite « sur mesure », offrant la possibilité d'individualiser les traitements médicamenteux en fonction du phénotype des individus. Ainsi, la survenue de réactions dites "idiosyncrasiques", considérées jusque-là comme une fatalité inévitable et inhérente à la thérapeutique médicamenteuse, pourra être au moins en partie évitée.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Abu-Shakra M, Shoenfeld Y. Azathioprine therapy for patients with systemic lupus erythematosus. Lupus. 2001;10:152-3.

Adachi M, Reid G, Schuetz JD. Therapeutic and biological importance of getting nucleotides out of cells: a case for the ABC transporters, MRP4 and 5. Adv Drug Deliv Rev. 2002;54:1333-42.

Al Hadithy AF, de Boer NK, Derijks LJ, Escher JC, Mulder CJ, Brouwers JR. Thiopurines in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring and clinical recommendations. Dig Liver Dis. 2005;37:282-97.

Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in Escherichia coli of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. J Biol Chem. 1997;272:1004-12.

Allorge D, Hamdan R, Broly F, Libersa C, Colombel JF. ITPA genotyping test does not improve detection of Crohn's disease patients at risk of azathioprine/6-mercaptopurine induced myelosuppression. Gut. 2005;54:565.

Allorge D, Loriot MA. La pharmacogénétique ou la promesse d'une médecine personnalisée : variations du métabolisme et du transport des médicaments. Annales de Biologie Clinique. 2004;62:499-511.

Alves S, Prata MJ, Ferreira F, Amorim A. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: alternative molecular diagnosis and preliminary data from Northern Portugal. Pharmacogenetics. 1999;9:257-61.

Alves S, Amorim A, Ferreira F, Prata MJ. Influence of the variable number of tandem repeats located in the promoter region of the thiopurine methyltransferase gene on enzymatic activity. Clin Pharmacol Ther. 2001;70(2):165-74.

Anonymous. Drugs of choice for cancer chemotherapy. Med Lett Drugs Ther. 1993;35:43-50.

Ansari A, Hassan C, Duley J, Marinaki A, Shobowale-Bakre EM, Seed P, Meenan J, Yim A, Sanderson J. Thiopurine methyltransferase activity and the use of azathioprine in inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther. 2002;16:1743-50.

Ansari A, Elliott T, Baburajan B, Mayhead P, O'Donohue J, Chocair P, Sanderson J, Duley J. Long-term outcome of using allopurinol co-therapy as a strategy for overcoming thiopurine hepatotoxicity in treating inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther. 2008;28:734.

Arenas M, Simpson G, Lewis CM, Shobowale-Bakre el-M, Escuredo E, Fairbanks LD, Duley JA, Ansari A, Sanderson JD, Marinaki AM. Genetic variation in the MTHFR gene influences thiopurine methyltransferase activity. Clin Chem. 2005;51:2371-4.

Badagnani I, Chan W, Castro RA, Brett CM, Huang CC, Stryke D, Kawamoto M, Johns SJ, Ferrin TE, Carlson EJ, Burchard EG, Giacomini KM. Functional analysis of genetic variants in the human concentrative nucleoside transporter 3 (CNT3; SLC28A3). Pharmacogenomics J. 2005;5:157-65.

Bahi-Buisson N. Convulsions néonatales liées à une erreur innée du métabolisme. Orientation diagnostique et thérapeutique. Neurologies. 2005;8:486-93.

Bean RH. The treatment of chronic ulcerative colitis with 6-mercaptopurine. Med J Aust. 1962;49:592-3.

Belaiche J, Desager JP, Horsmans Y, Louis E. Therapeutic drug monitoring of azathioprine and 6-mercaptopurine metabolites in Crohn disease. Scand J Gastroenterol. 2001;36:71-6.

Bendjemana K, Abdennebi M, Gara S, Jmal A, Ghanem A, Touati S, Boussen H, Ladgham A, Guemira F. Polymorphisme génétique des enzymes gluthation-S transférases et N-acétyl-transférases 2 dans le cancer du nasopharynx en Tunisie. Bull Cancer. 2006;93 :297-302.

Bergan S, Rugstad HE, Klemetsdal B, Giverhaug T, Bentdal O, Sodal G, Hartmann A, Aarbakke J, Stokke O. Possibilities for therapeutic drug monitoring of azathioprine: 6-thioguanine nucleotide concentrations and thiopurine methyltransferase activity in red blood cells.Ther Drug Monit. 1997a;19:318-26.

Bergan S, Bentdal O, Sødal G, Brun A, Rugstad HE, Stokke O. Patterns of azathioprine metabolites in neutrophils, lymphocytes, reticulocytes, and erythrocytes: relevance to toxicity and monitoring in recipients of renal allografts. Ther Drug Monit. 1997b;19:502-9.

Beutler E. Study of glucose-6-phosphate deshydrogenase : history and molecular biology. Am J Hematol. 1993;42:53-8.

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

Bonaz B. Résistance à l'azathioprine au cours des maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin. Post'U 2002;97-102.

Bowne SJ, Liu Q, Sullivan LS, Zhu J, Spellicy CJ, Rickman CB, Pierce EA, Daiger SP. Why do mutations in the ubiquitously expressed housekeeping gene IMPDH1 cause retina-specific photoreceptor degeneration? Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006a;47:3754-65.

Bowne SJ, Sullivan LS, Mortimer SE, Hedstrom L, Zhu J, Spellicy CJ, Gire AI, Hughbanks-Wheaton D, Birch DG, Lewis RA, Heckenlively JR, Daiger SP. Spectrum and frequency of mutations in IMPDH1 associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa and leber congenital amaurosis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006b;47:34-42.

Bracco L, Kearsey J. The relevance of alternative RNA splicing in pharmacogenomics. Trends Biotechnol, 2003;21:346-53.

Breen DP, Marinaki AM, Arenas M, Hayes PC. Pharmacogenetic association with adverse drug reactions to azathioprine immunosuppressive therapy following liver transplantation. Liver Transpl. 2005;11:826-33.

Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat AG, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat JL, Sauvaigo S. Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. Biol Chem. 2002;383-93.

Cals L, Bertrand F, Maille N et Tchiknavorian X. Mécanismes de résistance—Données générales. Oncologie. 2005;7:403-5.

Cao H, Hegele RA. DNA polymorphisms in ITPA including basis of inosine triphosphatase deficiency. J Hum Genet. 2002;47:620-2.

Chango A, Boisson F, Barbé F, Quilliot D, Droesch S, Pfister M, Fillon-Emery N, Lambert D, Frémont S, Rosenblatt DS, Nicolas JP. The effect of 677C-->T and 1298A-->C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. Br J Nutr. 2000;83:593-6.

Chardin P. RhoGTPases et processus physiologiques, diversité des processus physiologiques régulés par les petites protéines G de la famille Rho. In Chelly J. Rho GTPases et pathologies humaines. Chelly J (Ed), pp 9-29. Paris : Elsevier, 2002

Chen ZS, Lee K, Kruh GD. Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. J Biol Chem. 2001;276:33747-54.

Chocair PR, Duley JA, Simmonds HA, Cameron JS. The importance of thiopurine methyltransferase activity for the use of azathioprine in transplant recipients. Transplantation. 1992;53:1051-6.

Cohen Aubart F, Sedel F, Papo T. Déficit en cystathionine bêta-synthase et déficit en MTHFR chez l’adulte. Revue Neurologique. 2007;163 :904-10.

Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H, Marteau P, Gendre JP, Bonaz B, Soulé JC, Modigliani R, Touze Y, Catala P, Libersa C, Broly F. Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. Gastroenterology. 2000;118:1025-30.

Collart FR, Chubb CB, Mirkin BL, Huberman E. Increased inosine-5'-phosphate dehydrogenase gene expression in solid tumor tissues and tumor cell lines. Cancer Res. 1992;52:5826-8.

Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK, Lennard-Jones JE. Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. Gut. 1993; 34(8):1081-5.

Coulthard SA, Hogarth LA, Little M, Matheson EC, Redfern CP, Minto L, Hall AG. The effect of thiopurine methyltransferase expression on sensitivity to thiopurine drugs. Mol Pharmacol. 2002;62:102-9.

Cuffari C, Seidman EG, Latour S, Théorêt Y. Quantitation of 6-thioguanine in peripheral blood leukocyte DNA in Crohn's disease patients on maintenance 6-mercaptopurine therapy. Can J Physiol Pharmacol. 1996a;74:580-5.

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

Cuffari C, Dassopoulos T, Turnbough L, Thompson RE, Bayless TM. Thiopurine methyltransferase activity influences clinical response to azathioprine in inflammatory bowel disease. Clin Gastroenterol Hepatol. 2004;2:410-7.

Daly AK. Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolising enzymes. Fundam Clin Pharmacol. 2003;17:27-41.

Damaraju S, Zhang J, Visser F, Tackaberry T, Dufour J, Smith KM, Slugoski M, Ritzel MW, Baldwin SA, Young JD, Cass CE. Identification and functional characterization of variants in human concentrative nucleoside transporter 3, hCNT3 (SLC28A3), arising from single nucleotide polymorphisms in coding regions of the hCNT3 gene. Pharmacogenet Genomics. 2005;15:173-82.

De Boer NK, Reinisch W, Teml A, van Bodegraven AA, Schwab M, Lukas M, Ochsenkühn T, Petritsch W, Knoflach P, Almer S, van der Merwe SW, Herrlinger KR, Seiderer J, Vogelsang H, Mulder CJ. 6-Thioguanine treatment in inflammatory bowel disease: a critical appraisal by a European 6-TG working party. Digestion. 2006;73:25-31.

De Boer NK, Zondervan PE, Gilissen LP, den Hartog G, Westerveld BD, Derijks LJ, Bloemena E, Engels LG, van Bodegraven AA, Mulder CJ.. Absence of nodular regenerative hyperplasia after low-dose 6-thioguanine maintenance therapy in inflammatory bowel disease patients. Dig Liver Dis. 2008;40:108-13.

Decaux G, Horsmans Y, Houssiau F, Desager JP.High 6-thioguanine nucleotide levels and low thiopurine methyltransferase activity in patients with lupus erythematosus treated with azathioprine. Am J Ther. 2001;8:147-50.

De Chaisemartin L, Loriot MA. Pharmacogenetics of anticancer drugs. Pathol Biol. 2005;53:116-24.

De Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer UA, Goldstein JA. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. J Biol Chem. 1994;269:15419-22.

De Ridder L, Van Dieren JM, Van Deventer HJ, Stokkers PC, Van der Woude JC, Van Vuuren AJ, Benninga MA, Escher JC, Hommes DW. Pharmacogenetics of thiopurine therapy in paediatric IBD patients. Aliment Pharmacol Ther. 2006;23:1137-41.

Derijks LJ, Gilissen LP, Hooymans PM, Hommes DW. Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther. 2006;24:715-29.

Dervieux T, Boulieu R. Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC. Clin Chem. 1998;44:551-5.

Dervieux T, Médard Y, Baudouin V, Maisin A, Zhang D, Broly F, Loirat C, Jacqz-Aigrain E. Thiopurine methyltransferase activity and its relationship to the occurrence of rejection episodes in paediatric renal transplant recipients treated with azathioprine.
Br J Clin Pharmacol. 1999;48:793-800.

Dervieux T, Blanco JG, Krynetski EY, Vanin EF, Roussel MF, Relling MV. Differing contribution of thiopurine methyltransferase to mercaptopurine versus thioguanine effects in human leukemic cells. Cancer Res. 2001a;61:5810-6.

Dervieux T, Medard Y, Verpillat P, Guigonis V, Duval M, Lescoeur B, Suciu S, Vilmer E, Jacqz-Aigrain E. Possible implication of thiopurine S-methyltransferase in occurrence of infectious episodes during maintenance therapy for childhood lymphoblastic leukemia with mercaptopurine. Leukemia. 2001b;15:1706-12.

Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2003;43:149-73.

Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Theoret Y, et al. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 2000;118:705-13.

Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT, Targan SR, Vasiliauskas EA. 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 2002;122:904-15.

Dubinsky MC, Feldman EJ, Abreu MT, Targan SR, Vasiliauskas EA. Thioguanine: a potential alternate thiopurine for IBD patients allergic to 6-mercaptopurine or azathioprine. Am J Gastroenterol. 2003a;98:1058-63.

Dubinsky MC. Optimizing immunomodulator therapy for inflammatory bowel disease. Curr Gastroenterol Rep. 2003b;5:506-11.

Duley JA, Simmonds HA, Hopkinson DA, Levinsky RJ. Inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in a kindred with adenosine deaminase deficiency. Clin Chim Acta. 1990;188:243-52.

Duley JA, Florin TH. Thiopurine therapies: problems, complexities, and progress with monitoring thioguanine nucleotides. Ther Drug Monit. 2005;27:647-54.

Eklund BI, Moberg M, Bergquist J, Mannervik B.Mol Pharmacol. Divergent activities of human glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine. 2006;70:747-54.

Elion GB, Hitchings GH, Vanderwerff H. Antagonists of nucleic acid derivatives. J Biol Chem. 1951;192:505-18.

Elion GB. Symposium on immunosuppressive drugs. Biochemistry and pharmacology of purine analogues. Fed Proc. 1967;26:898-904.

Evans WE, Hon YY, Bomgaars L, Coutre S, Holdsworth M, Janco R, Kalwinsky D, Keller F, Khatib Z, Margolin J, Murray J, Quinn J, Ravindranath Y, Ritchey K, Roberts W, Rogers ZR, Schiff D, Steuber C, Tucci F, Kornegay N, Krynetski EY, Relling MV. Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. J Clin Oncol. 2001;19:2293-301.

Evans WE. Thiopurine S-methyltransferase: a genetic polymorphism that affects a small number of drugs in a big way. Pharmacogenetics. 2002;12:421-3.

Faletto MB, Linko P, Goldstein JA. A single amino acid mutation (Ser180----Cys) determines the polymorphism in cytochrome P450g (P4502C13) by altering protein stability. J Biol Chem. 1992;267:2032-7.

Favier A. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'Actualité chimique. 2003;11:108-15.

Fotoohi AK, Lindqvist M, Peterson C, Albertioni F. Involvement of the concentrative nucleoside transporter 3 and equilibrative nucleoside transporter 2 in the resistance of T-lymphoblastic cell lines to thiopurines. Biochem Biophys Res Commun. 2006;343:208-15.

Fraser JH, Meyers H, Henderson JF, Brox LW, McCoy EE. Individual variation in inosine triphosphate accumulation in human erythrocytes. Clin Biochem. 1975;8:353-64.

Futer O, Sintchak MD, Caron PR, Nimmesgern E, DeCenzo MT, Livingston DJ, Raybuck SA. A mutational analysis of the active site of human type II inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. Biochim Biophys Acta. 2002;1594:27-39.

Gaedigk A. Interethnic differences of drug-metabolizing enzymes. Int J Clin Pharmacol Ther. 2000; 38:61-68.

Garrod AE and Oxon MD. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. Lancet. 1902;1:1616-20.

Gearry RB, Barclay ML, Burt MJ, Collett JA, Chapman BA, Roberts RL, Kennedy MA. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) genotype does not predict adverse drug reactions to thiopurine drugs in patients with inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther. 2003;18:395-400.

Gearry RB, Roberts RL, Barclay ML, Kennedy MA. Lack of association between the ITPA 94C>A polymorphism and adverse effects from azathioprine. Pharmacogenetics. 2004;14:779-81.

Gilissen LP, Derijks LJ, Driessen A, Bos LP, Hooymans PM, Stockbrügger RW, Engels LG. Toxicity of 6-thioguanine: no hepatotoxicity in a series of IBD patients treated with long-term, low dose 6-thioguanine. Some evidence for dose or metabolite level dependent effects? Dig Liver Dis. 2007;39:156-9.

Gisbert JP, Gomollón F. Thiopurine-induced myelotoxicity in patients with inflammatory bowel disease: a review. Am J Gastroenterol. 2008 ;103: 1783-800.

Glander P, Braun KP, Hambach P, Bauer S, Mai I, Roots I, Waiser J, Fritsche L, Neumayer HH, Budde K. Non-radioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydro-genase (IMPDH) in peripheral mononuclear cells. Clin Biochem. 2001;34:543-9.

Glander P, Hambach P, Braun KP, Fritsche L, Giessing M, Mai I, Einecke G, Waiser J, Neumayer HH, Budde K. Pre-transplant inosine monophosphate dehydrogenase activity is associated with clinical outcome after renal transplantation. Am J Transplant. 2004;4:2045-51.

Glesne D, Collart F, Varkony T, Drabkin H, Huberman E. Chromosomal localization and structure of the human type II IMP dehydrogenase gene (IMPDH2). Genomics. 1993;16:274-7.

Glesne DA, Huberman E. Cloning and sequence of the human type II IMP dehydrogenase gene. Biochem Biophys Res Commun. 1994;205:537-44.

Gottlieb AJ, Weinberg V, Ellison RR, Henderson ES, Terebelo H, Rafla S, Cuttner J, Silver RT, Carey RW, Levy RN. Efficacy of daunorubicin in the therapy of adult acute lymphocytic leukemia: a prospective randomized trial by cancer and leukemia group B. Blood. 1984;64:267-74.

Grinyó J, Vanrenterghem Y, Nashan B, Vincenti F, Ekberg H, Lindpaintner K, Rashford M, Nasmyth-Miller C, Voulgari A, Spleiss O, Truman M, Essioux L. Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. Transpl Int. 2008;21:879-91.

Gu JJ, Kaiser-Rogers K, Rao K, Mitchell BS. Assignment of the human type I IMP dehydrogenase gene (IMPDH1) to chromosome 7q31.3-q32. Genomics. 1994.1;24:179-81.

Gu JJ, Spychala J, Mitchell BS. Regulation of the human inosine monophosphate dehydrogenase type I gene. Utilization of alternative promoters. J Biol Chem. 1997. 14;272:4458-66.

Gu JJ, Stegmann S, Gathy K, Murray R, Laliberte J, Ayscue L, Mitchell BS. Inhibition of T lymphocyte activation in mice heterozygous for loss of the IMPDH II gene. J Clin Invest. 2000;106:599-606.

Gu JJ, Tolin AK, Jain J, Huang H, Santiago L, Mitchell BS. Targeted disruption of the inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type I gene in mice, Mol Cell Biol. 2003;23:6702-12.

Guerciolini R, Szumlanski C, Weinshilboum RM. Human liver xanthine oxidase: nature and extent of individual variation. Clin Pharmacol Ther. 1991;50:663-72.

Habdous G, Siest B, Herbeth M, Vincent-Viry S, Visvikis S. Polymorphismes des glutathion S-transférases et pathologies humaines : bilan des études épidémiologiques. Annales de Biologie Clinique. 2004;62:15-24.

Haglund S, Lindqvist M, Almer S, Peterson C, Taipalensuu J. Pyrosequencing of TPMT alleles in a general Swedish population and in patients with inflammatory bowel disease. Clin Chem. 2004;50:288-95.

Haglund S, Taipalensuu J, Peterson C, Almer S. IMPDH activity in thiopurine-treated patients with inflammatory bowel disease - relation to TPMT activity and metabolite concentrations. Br J Clin Pharmacol. 2008;65:69-77.

Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science. 1998;279:509-514.

Hamdan-Khalil R, Allorge D, Lo-Guidice JM, Cauffiez C, Chevalier D, Spire C, Houdret N, Libersa C, Lhermitte M, Colombel JF, Gala JL, Broly F. In vitro characterization of four novel non-functional variants of the thiopurine S-methyltransferase. Biochem Biophys Res Commun. 2003;309:1005-10.

Hamdan-Khalil R, Gala JL, Allorge D, Lo-Guidice JM, Horsmans Y, Houdret N, Broly F. Identification and functional analysis of two rare allelic variants of the thiopurine S-methyltransferase gene, TPMT*16 and TPMT*19. Biochem Pharmacol. 2005;69:525-9.

Hawwa AF, Millership JS, Collier PS, Vandenbroeck K, McCarthy A, Dempsey S, Cairns C, Collins J, Rodgers C, McElnay JC. Pharmacogenomic studies of the anticancer and immunosuppressive thiopurines mercaptopurine and azathioprine. Br J Clin Pharmacol. 2008;66:517-28.

Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? Hum Mutat. 1993;2:338-46.

Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit Rev Biochem Mol Biol. 1995;30:445-600.

Herrlinger KR, Fellermann K, Fischer C, Kreisel W, Deibert P, Schoelmerich J, Fleig WE, Ruhl A, Reinshagen M, Greinwald R, Stange EF, Schwab M. Thioguanine-nucleotides do not predict efficacy of tioguanine in Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther. 2004;19:1269-76.

Heurkens AH, Westedt ML, Breedveld FC. Prednisone plus azathioprine treatment in patients with rheumatoid arthritis complicated by vasculitis. Arch Intern Med. 1991;151:2249-54.

Hindorf U, Lindqvist M, Peterson C, Söderkvist P, Ström M, Hjortswang H, Pousette A, Almer S. Pharmacogenetics during standardised initiation of thiopurine treatment in inflammatory bowel disease. Gut. 2006;55:1423-31.

Hitchings GH, Falco EA, Vanderweref H, Russell PB, Elion GB. Antagonists of nucleic acid derivatives. VII. 2, 4-Diaminopyrimidines. J Biol Chem. 1952;199:43-56.

Holleb A, Fink D, Murphy G. Clinical oncology. The American Cancer Society, Atlanta, GA. 1991.

Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Veerman AJ, Kazemier KM, Pei D, Cheng C, Pui CH, Relling MV, Janka-Schaub GE, Pieters R, Evans WE. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. N Engl J Med. 2004;351:533-42.

Holmes SL, Turner BM, Hirschhorn K. Human inosine triphosphatase: catalytic properties and population studies. Clin Chim Acta. 1979;97:143-53.

Ikeda Y, Umemura K, Kondo K, Sekiguchi K, Miyoshi S, Nakashima M. Pharmacokinetics of voriconazole and cytochrome P450 2C19 genetic status. Clin Pharmacol Ther. 2004;75:587-8.

Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. TiPS. 1999;20:342-49.

Jain J, Almquist SJ, Ford PJ, Shlyakhter D, Wang Y, Nimmesgern E, Germann UA. Regulation of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II isoforms in human lymphocytes. Biochem Pharmacol. 2004;67:767-76.

Janke D, Mehralivand S, Strand D, Gödtel-Armbrust U, Habermeier A, Gradhand U, Fischer C, Toliat MR, Fritz P, Zanger UM, Schwab M, Fromm MF, Nürnberg P, Wojnowski L, Closs EI, Lang T. 6-mercaptopurine and 9-(2-phosphonyl-methoxyethyl) adenine (PMEA) transport altered by two missense mutations in the drug transporter gene ABCC4. Hum Mutat. 2008;29:659-69.

Jordheim LP, Galmarini CM, Dumontet C. Métabolisme, mécanisme d'action et résistance aux analogues de nucléosides cytotoxiques. Bull Cancer. 2005;92:239-48.

Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. Am J Hum Genet. 1991;48:536-45.

Karnoub AE, Symons M, Campbell SL, Der CJ. Molecular basis for Rho GTPase signaling specificity. Breast Cancer Res Treat. 2004;84:61-71.

Karran P, Attard N. Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer. Nat Rev Cancer. 2008;8:24-36.

Kaskas BA, Louis E, Hindorf U, Schaeffeler E, Deflandre J, Graepler F, Schmiegelow K, Gregor M, Zanger UM, Eichelbaum M, Schwab M. Safe treatment of thiopurine S-methyltransferase deficient Crohn's disease patients with azathioprine. Gut. 2003;52:140-2.

Katsanos KH, Tsianos EV. Explaining the unexplaining leucopenia in azathioprine treatment. Annals of gastroenterology. 2006;19:141-2.

Katz DA, Bhathena. A Overview of pharmacogenetics. Curr Protoc Hum Genet. 2009;Chapter 9:Unit 9.19.

Kim SR, Saito Y, Maekawa K, Sugiyama E, Kaniwa N, Ueno H, Okusaka T, Morizane C, Yamamoto N, Ikeda M, Yoshida T, Minami H, Furuse J, Ishii H, Saijo N, Kamatani N, Ozawa S, Sawada J. Thirty novel genetic variations in the SLC29A1 gene encoding human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). Drug Metab Pharmacokinet. 2006;21:248-56.

Kirk AP, Lennard-Jones JE. Controlled trial of azathioprine in chronic ulcerative colitis. Br Med J. 1982;284:1291-2.

Klug CA, Morrison SJ, Masek M, Hahm K, Smale ST, Weissman IL. Hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors express different Ikaros isoforms, and Ikaros is localized to heterochromatin in immature lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:657-662.

Konno Y, Natsumeda Y, Nagai M, Yamaji Y, Ohno S, Suzuki K, Weber G. Expression of human IMP dehydrogenase types I and II in Escherichia coli and distribution in human normal lymphocytes and leukemic cell lines. J Biol Chem. 1991;266:506-9.

Krishnamurthy P, Schwab M, Takenaka K, Nachagari D, Morgan J, Leslie M, Du W, Boyd K, Cheok M, Nakauchi H, Marzolini C, Kim RB, Poonkuzhali B, Schuetz E, Evans W, Relling M, Schuetz JD. Transporter-mediated protection against thiopurine-induced hematopoietic toxicity. Cancer Res. 2008;68:4983-9.

Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. Oncogene. 2003;22:7537-52.

Krynetski EY, Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: molecular mechanisms and clinical importance. Pharmacology. 2000;61:136-46.

Kudo M, Moteki T, Sasaki T, Konno Y, Ujiie S, Onose A, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M. Functional characterization of human xanthine oxidase allelic variants. Pharmacogenet Genomics. 2008;18:243-51.

Kurtovic S, Grehn L, Karlsson A, Hellman U, Mannervik B. Glutathione transferase activity with a novel substrate mimics the activation of the prodrug azathioprine. Anal Biochem. 2008;375:339-44.

Kurzawski M, Dziewanowski K, Lener A, Drozdzik M. TPMT but not ITPA gene polymorphism influences the risk of azathioprine intolerance in renal transplant recipients. Eur J Clin Pharmacol. 2009;65:533-40.

Lai L, Tan TM. Role of glutathione in the multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4)-mediated efflux of cAMP and resistance to purine analogues. Biochem J. 2002;361:497-503.

Leclerc D, Rozen R. Génétique moléculaire de MTHFR. Les polymorphismes ne sont pas tous bénins. Medecine/Science. 2007;23:297-302.

Lee AU, Farrell GC. Mechanism of azathioprine-induced injury to hepatocytes: roles of glutathione depletion and mitochondrial injury. J Hepatol. 2001;35:756-64.

Lee D, Szumlanski C, Houtman J, Honchel R, Rojas K, Overhauser J et al. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Cloning of human liver cDNA and a processed pseudogene on human chromosome 18q21.1. Drug Metab Dispos. 1995;23: 398-405.

Lee K, Klein-Szanto AJ, Kruh GD. Analysis of the MRP4 drug resistance profile in transfected NIH3T3 cells. J Natl Cancer Inst. 2000;92:1934-40.

Lennard L, Van Loon JA, Lilleyman JS, Weinshilboum RM. Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. Clin Pharmacol Ther. 1987;41:18-25.

Lennard L. Assay of 6-thioinosinic acid and 6-thioguanine nucleotides, active metabolites of 6-mercaptopurine, in human red blood cells. J Chromatogr. 1987;423:169-78.

Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. Lancet. 1990;336:225-9.

Lennard L, Davies HA, Lilleyman JS. Is 6-thioguanine more appropriate than 6-mercaptopurine for children with acute lymphoblastic leukaemia? Br J Cancer. 1993;68:186-90.

Lennard L, Welch JC, Lilleyman JS. Thiopurine drugs in the treatment of childhood leukaemia: the influence of inherited thiopurine methyltransferase activity on drug metabolism and cytotoxicity. Br J Clin Pharmacol. 1997;44:455-61.

Lennard L. TPMT in the treatment of Crohn's disease with azathioprine. Gut. 2002;51:143-6.

Lennon Y. Adult acute leukemia. In: DiPiro JT, Talber RL, Hayes PE : Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach. Elsevier, New York,1989.

Lin S, McLennan AG, Ying K, Wang Z, Gu S, Jin H, Wu C, Liu W, Yuan Y, Tang R, Xie Y, Mao Y. Cloning, expression, and characterization of a human inosine triphosphate pyrophosphatase encoded by the itpa gene. J Biol Chem. 2001;276:18695-701.

Lindqvist M, Skoglund K, Karlgren A, Söderkvist P, Peterson C, Kidhall I, Almer S. Explaining TPMT genotype/phenotype discrepancy by haplotyping of TPMT*3A and identification of a novel sequence variant, TPMT*23. Pharmacogenet Genomics. 2007;17:891-5.

Loennechen T, Utsi E, Hartz I, Lysaa R, Kildalsen H, Aarbakke J. Detection of one single mutation predicts thiopurine S-methyltransferase activity in a population of Saami in northern Norway. Clin Pharmacol Ther. 2001;70:183-8.

Loriot MA, Beaune P. La pharmacogénétique : le lien entre gènes et réponse aux médicaments. médecine/sciences. 2004;20:634-6.

Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL, Pike MG, Mays DC, Tremaine WJ, et al. Measurement of thiopurine methyltransferase activity and azathioprine metabolites in patients with inflammatory bowel disease. Gut. 2001;49:665-70.

Mahadevan U, Tremaine WJ, Johnson T, Pike MG, Mays DC, Lipsky JJ, Sandborn WJ. Intravenous azathioprine in severe ulcerative colitis: a pilot study. Am J Gastroenterol. 2000;95:3463-68.

Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, Hayes JD, Di Ilio C, Ketterer B, Listowsky I, Morgenstern R, Muramatsu M, Pearson WR, Pickett CB, Sato K, Widersten M, Wolf CR. Nomenclature for human glutathione transferases. Biochem J. 1992;282:305-6.

Marinaki AM, Ansari A, Duley JA, Arenas M, Sumi S, Lewis CM, Shobowale-Bakre el-M, Escuredo E, Fairbanks LD, Sanderson JD. Adverse drug reactions to azathioprine therapy are associated with polymorphism in the gene encoding inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase). Pharmacogenetics. 2004;14:181-7.

Marra CA, Esdaile JM, Anis AH. Practical pharmacogenetics: the cost effectiveness of screening for thiopurine s-methyltransferase polymorphisms in patients with rheumatological conditions treated with azathioprine. J Rheumatol. 2002;29:2507-12.

Marsh M, King CR, Ahluwalia R, McLeod L. Distribution of ITPA P32T alleles in multiple world populations. J Hum Genet. 2004;49:579-81.

Martin YN, Salavaggione OE, Eckloff BW, Wieben ED, Schaid DJ, Weinshilboum RM. Human methylenetetrahydrofolate reductase pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics. Pharmacogenet Genomics. 2006;16:265-77.

Matos P, Skaug J, Marques B, Beck S, Verissimo F, Gespach C, Boavida MG, Scherer SW, Jordan P. Small GTPase Rac1: structure, localization, and expression of the human gene. Biochem Biophys Res Commun. 2000;277:741-51.

Matos P, Jordan P. Expression of Rac1b stimulates NF-kappaB-mediated cell survival and G1/S progression. Exp Cell Res. 2005;305:292-9.

McLeod HL, Lin JS, Scott EP, Pui CH, Evans WE. Thiopurine methyltransferase activity in American white subjects and black subjects. Clin Pharmacol Ther. 1994;55:15-20.

Menor C, Fernández-Moreno MD, Fueyo JA, Escribano O, Olleros T, Arriaza E, Cara C, Lorusso M, Di Paola M, Román ID, Guijarro LG. Azathioprine acts upon rat hepatocyte mitochondria and stress-activated protein kinases leading to necrosis: protective role of N-acetyl-L-cysteine. J Pharmacol Exp Ther. 2004;311:668-76.

Minoshima S, Wang Y, Ichida K, Nishino T, Shimizu N. Mapping of the gene for human xanthine dehydrogenase (oxidase) (XDH) to band p23 of chromosome 2. Cytogenet. Cell Genet. 1995;68:52-3.

Mircheva J, Legendre C, Soria-Royer C, Thervet E, Beaune P, Kreis H. Monitoring of azathioprine-induced immunosuppression with thiopurine methyltransferase activity in kidney transplant recipients. Transplantation. 1995;60:639-42.

Mizushina Y, Dairaku I, Yanaka N, Takeuchi T, Ishimaru C, Sugawara F, Yoshida H, Kato N. Inhibitory action of polyunsaturated fatty acids on IMP dehydrogenase. Biochimie. 2007;89:581-90.

Mohandas T, Sparkes RS, Passage MB, Sparkes MC, Miles JH, Kaback MM. Regional mapping of ADA and ITP on human chromosome 20: cytogenetic and somatic cell studies in an X/20 translocation. Cytogenet Cell Genet. 1980;26:28-35.

Molina JM. Intérêt du suivi thérapeutique dans l'optimisation de l'efficacité des anti-infectieux. In Mouly S, Sellier P. Monitoring thérapeutique des anti-infectieux: des exigences règlementaires au bon usage du médicament. Comptes-rendus de la 7ème journée de thérapeutique de l'UFR Lariboisière Saint-Louis, Paris, 25 septembre 2003. Springer, 2003;9-16.

Murphy LA, Atherton DJ. Azathioprine as a treatment for severe atopic eczema in children with a partial thiopurine methyl transferase (TPMT) deficiency. Pediatr Dermatol. 2003;20:531-4.

Myers SN, Goyal RK, Roy JD, Fairfull LD, Wilson JW, Ferrell RE. Functional single nucleotide polymorphism haplotypes in the human equilibrative nucleoside transporter 1. Pharmacogenet Genomics. 2006;16:315-20.

Nagai M, Natsumeda Y, Konno Y, Hoffman R, Irino S, Weber G. Selective up-regulation of type II inosine 5'-monophosphate dehydrogenase messenger RNA expression in human leukemias. Cancer Res. 1991;51:3886-90.

Nagai M, Natsumeda Y, Weber G. Proliferation-linked regulation of type II IMP dehydrogenase gene in human normal lymphocytes and HL-60 leukemic cells. Cancer Res. 1992;52:258-61.

Natsumeda Y, Ohno S, Kawasaki H, Konno Y, Weber G, Suzuki K. Two distinct cDNAs for human IMP dehydrogenase. J Biol Chem. 1990;265:5292-5.

Naughton MA, Battaglia E, O'Brien S, Walport MJ, Botto M.Identification of thiopurine methyltransferase (TPMT) polymorphisms cannot predict myelosuppression in systemic lupus erythematosus patients taking azathioprine. Rheumatology. 1999;38:640-4.

Neglia JP, Meadows AT, Robison LL, Kim TH, Newton WA, Ruymann FB, Sather HN, Hammond GD. Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. N Engl J Med. 1991;325:1330-6.

Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. Nat Med. 2002;8:567-73.

Neurath MF, Kiesslich R, Teichgraber U, Fischer C, Hofmann U, Eichelbaum M, Galle PR, Schwab M. 6-thioguanosine diphosphate and triphosphate levels in red blood cells and response to azathioprine therapy in Crohn's disease. Clin Gastroenterol Hepatol. 2005;3:1007-14.

Nygaard U, Toft N, Schmiegelow K. Methylated metabolites of 6-mercaptopurine are associated with hepatotoxicity. Clin Pharmacol Ther. 2004;75:274-81.

Ogino S, Wilson RB. Genotype and haplotype distributions of MTHFR677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. J Hum Genet. 2003;48:1-7.

Okada Y, Nakamura K, Hiromura K, Nojima Y, Horiuchi R, Yamamoto K. Pro32Thr Polymorphism of Inosine Triphosphate Pyrophosphatase Gene Predicts Efficacy of Low-Dose Azathioprine for Patients With Systemic Lupus Erythematosus. Clin Pharmacol Ther. 2009;85:527-30.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci.1989;86:2766-70.

Oscarson M. Pharmacogenetics of drug metabolising enzymes: importance for personalised medecine. Clin Chem Lab Med. 2003;41:573-80.

Osato DH, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Wang J, Ferrin TE, Herskowitz I, Giacomini KM. Functional characterization in yeast of genetic variants in the human equilibrative nucleoside transporter, ENT1. Pharmacogenetics. 2003;13:297-301.

Owen RP, Gray JH, Taylor TR, Carlson EJ, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, Giacomini KM. Genetic analysis and functional characterization of polymorphisms in the human concentrative nucleoside transporter, CNT2. Pharmacogenet Genomics. 2005;15:83-90.

Owen RP, Lagpacan LL, Taylor TR, De La Cruz M, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, Giacomini KM. Functional characterization and haplotype analysis of polymorphisms in the human equilibrative nucleoside transporter, ENT2. Drug Metab Dispos. 2006;34:12-5.

Paton CM, Ekert H, Waters KD, Matthews RN, Toogood IR. Treatment of acute myeloid leukaemia in children. Aust N Z J Med. 1982;12:143-6.

Pazmiño PA, Sladek SL, Weinshilboum RM. Thiol S-methylation in uremia: erythrocyte enzyme activities and plasma inhibitors. Clin Pharmacol Ther. 1980;28:356-67.

Pearson DC, May GR, Fick GH, Sutherland LR. Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease.A meta-analysis. Ann Intern Med. 1995;123:132-42.

Pieters R, Huismans DR, Loonen AH, Peters GJ, Hählen K, van der Does-van den Berg A, van Wering ER, Veerman AJ. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase in childhood leukemia: relation with immunophenotype, in vitro drug resistance and clinical prognosis. Int J Cancer. 1992;51:213-7.

Ponticelli C, Tarantino A, Vegeto A. Renal transplantation, past, present and future. J Nephrol. 1999;12:S105-10.

Pratt DS, Flavin DP, Kaplan MM. The successful treatment of autoimmune hepatitis with 6-mercaptopurine after failure with azathioprine. Gastroenterology. 1996;110:271-4.

Present DH, Meltzer SJ, Krumholz MP, Wolke A, Korelitz BI. 6-Mercaptopurine in the management of inflammatory bowel disease: short- and long-term toxicity. Ann Intern Med. 1989;111:641-9.

Ray RM, McCormack SA, Covington C, Viar MJ, Zheng Y, Johnson LR. The requirement for polyamines for intestinal epithelial cell migration is mediated through Rac1. J Biol Chem. 2003;278:13039-46.

Rayner CK, Hart AL, Hayward CM, Emmanuel AV, Kamm MA. Azathioprine dose escalation in inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther. 2004;20:65-71.

Regueiro M, Mardini H. Determination of thiopurine methyltransferase genotype or phenotype optimizes initial dosing of azathioprine for the treatment of Crohn's disease.
J Clin Gastroenterol. 2002;35:240-4.

Reid G, Wielinga P, Zelcer N, De Haas M, Van Deemter L, Wijnholds J, Balzarini J, Borst P. Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. Mol Pharmacol. 2003;63:1094-103.

Relling MV, Yanishevski Y, Nemec J, Evans WE, Boyett JM, Behm FG, Pui CH. Etoposide and antimetabolite pharmacology in patients who develop secondary acute myeloid leukemia. Leukemia. 1998;12:346-52.

Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY Pui CH, Evans WE. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. J Natl Cancer Inst. 1999a;91:1983-5.

Relling MV, Rubnitz JE, Rivera GK, Boyett JM, Hancock ML, Felix CA, Kun LE, Walter AW, Evans WE, Pui CH. High incidence of secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites. Lancet. 1999b;354:34-9.

Roberts RL, Gearry RB, Barclay ML, Kennedy MA. IMPDH1 promoter mutations in a patient exhibiting azathioprine resistance. Pharmacogenomics J. 2007;7:312-7.

Roberts RL, Gearry RB, Bland MV, Sies CW, George PM, Burt M, Marinaki AM, Arenas M, Barclay ML, Kennedy MA. Trinucleotide repeat variants in the promoter of the thiopurine S-methyltransferase gene of patients exhibiting ultra-high enzyme activity. Pharmacogenet Genomics. 2008;18:434-8.

Roblin X, Serres Debeauvais F, Phelip JM, Bessard G, Bonaz B. Intérêt d'un monitorage précoce des 6-TGN au cours des MICI sous azathioprine : étude prospective chez 120 patients. Gastroenterol Clin Biol. 2004;28.

Roblin X, Heluwaert F, Bonaz B. Surveillance des traitements immunosuppresseurs au cours des maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin. Hépato-Gastro. 2005;12:113-21.

Rumbo C, Emerick KM, Emre S, Shneider BL. Azathioprine metabolite measurements in the treatment of autoimmune hepatitis in pediatric patients: a preliminary report.
J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2002;35:391-8.

Rytkonen E. M. K, Halila R, Laan M, Saksela M, Kallioniemi O.-P, Palotie A, Raivio KO. The human gene for xanthine dehydrogenase (XDH) is localized on chromosome band 2p22. Cytogenet. Cell Genet. 1995;68:61-3.

Sahasranaman S, Howard D, Roy S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. Eur J Clin Pharmacol. 2008;64:753-67.

Saito S, Iida A, Sekine A, Miura Y, Ogawa C, Kawauchi S, Higuchi S, Nakamura Y. Identification of 779 genetic variations in eight genes encoding members of the ATP-binding cassette, subfamily C (ABCC/MRP/CFTR). J Hum Genet. 2002;47:147-71.

Salavaggione OE, Wang L, Wiepert M, Yee VC, Weinshilboum RM. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allele functional and comparative genomics. Pharmacogenet Genomics. 2005;15:801-15.

Sampath J, Adachi M, Hatse S, Naesens L, Balzarini J, Flatley RM, Matherly LH, Schuetz JD. Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. AAPS PharmSci. 2002;4:E14.

Sandborn W, Sutherland L, Pearson D, May G, Modigliani R, Prantera C. Azathioprine or 6-mercaptopurine for inducing remission of Crohn's disease. Cochrane Database Syst Rev. 2000: CD000545.

Sartor RB. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. Gastroenterology. 1994;106:533-9.

Saruwatari J, Nakagawa K, Shindo J, Tajiri T, Fujieda M, Yamazaki H, Kamataki T, Ishizaki T. A population phenotyping study of three drug-metabolizing enzymes in Kyushu, Japan, with use of the caffeine test. Clin Pharmacol Ther. 2002;72:200-8.

Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, Eichelbaum M et al. Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. Pharmacogenetics. 2004;14:407-17.

Schmiegelow K, Bjork O, Glomstein A, Gustafsson G, Keiding N, Kristinsson J, Makipernaa A, Rosthoj S, Szumlanski C, Sorensen TM, Weinshilboum R. Intensification of mercaptopurine/methotrexate maintenance chemotherapy may increase the risk of relapse for some children with acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol. 2003;21:1332-9.

Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, Paibir SG, Flynn PM, Srinivas RV, Kumar A, Fridland A. MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. Nat Med. 1999;5:1048-51.

Schwab M, Schäffeler E, Marx C, Fischer C, Lang T, Behrens C, Gregor M, Eichelbaum M, Zanger UM, Kaskas BA. Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. Pharmacogenetics. 2002;12:429-36.

Seidman EG. Clinical use and practical application of TPMT enzyme and 6-mercaptopurine metabolite monitoring in IBD. Rev Gastroenterol Disord. 2003;3:S30-S38.

Serre-Debeauvais F, Bayle F, Amirou M, Bechtel Y, Boujet C, Vialtel P, Bessard G. Hematotoxicity caused by azathioprine genetically determined and aggravated by xanthine oxidase deficiency in a patient following renal transplantation. Presse Med. 1995;24:987-8.

Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. Pharmacogenomics. 2008;9:105-27.

Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone AM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. Genomics. 1993;16:325-32.

Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Oellerich M. Differences in nucleotide hydrolysis contribute to the differences between erythrocyte 6-thioguanine nucleotide concentrations determined by two widely used methods. Clin Chem. 2003;49:260-8.

Shipkova M, Lorenz K, Oellerich M, Wieland E, von Ahsen N. Measurement of erythrocyte inosine triphosphate pyrophosphohydrolase (ITPA) activity by HPLC and correlation of ITPA genotype-phenotype in a Caucasian population. Clin Chem. 2006;52:240-7.

Schütz E, Gummert J, Mohr F, Oellerich M. Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient heart transplant recipient. Lancet. 1993;341:436.

Schütz E, Gummert J, Mohr FW, Armstrong VW, Oellerich M. Should 6-thioguanine nucleotides be monitored in heart transplant recipients given azathioprine? Ther Drug Monit. 1996;18:228-33.

Siegel CA, Sands BE. Review article: practical management of inflammatory bowel disease patients taking immunomodulators. Aliment Pharmacol Ther. 2005;22:1-16.

Silvis NG, Levine N. Pulse dosing of thioguanine in recalcitrant psoriasis. Arch Dermatol. 1999;135:433-7.

Simmonds HA. Hereditary xanthinuria. Orphanet Encyclopedia. 2003. http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-XDH.pdf.

Soder C, Henderson JF, Zombor G, McCoy EE, Verhoef V, Morris AJ. Relationships between nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase activity and inosine triphosphate accumulation in human erythrocytes. Can J Biochem. 1976;54:843-7.

Sorokina EM, Chernoff J. Rho-GTPases : New Members, New Pathways. Journal of Cellular Biochemistry. 2005; 94:225-31.

Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Mastain B, Vinner E, Marez D, Lo Guidice JM, Chevalier D, Brique S, Motte K, Colombel JF, Turck D, Noel C, Flipo RM, Pol A, Lhermitte M, Lafitte JJ, Libersa C, Broly F. Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. Br J Pharmacol. 1998a;125:879-87.

Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Sabbagh N, Marez D, Vinner E, Chevalier ED, Lo Guidice JM, Broly F. Detection of known and new mutations in the thiopurine S-methyltransferase gene by single-strand conformation polymorphism analysis. Hum Mutat. 1998b;12:177-85.

Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Fazio F, Sergent E, Bernard C, Sabbagh N, Marez D, Lo Guidice JM, D'halluin JC, Broly F. Characterization of a variable number tandem repeat region in the thiopurine S-methyltransferase gene promoter. Pharmacogenetics. 1999;9:189-98.

Stocco G, Martelossi S, Barabino A, Decorti G, Bartoli F, Montico M, Gotti A, Ventura A. Glutathione-S-transferase genotypes and the adverse effects of azathioprine in young patients with inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2007;13:57-64.

Stocco G, Cheok MH, Crews KR, Dervieux T, French D, Pei D, Yang W, Cheng C, Pui CH, Relling MV, Evans WE. Genetic polymorphism of inosine triphosphate pyrophosphatase is a determinant of mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukemia. Clin Pharmacol Ther. 2009;85:164-72.

Sumi S, Marinaki AM, Arenas M, Fairbanks L, Shobowale-Bakre M, Rees DC, Thein SL, Ansari A, Sanderson J, De Abreu RA, Simmonds HA, Duley JA. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency. Hum Genet. 2002;111:360-7.

Szumlanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kelsell D, Spurr N, Lennard L, Wieben E, Weinshilboum R. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. DNA Cell Biol. 1996;15:17-30.

Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG, Yanishevski Y, Evans WE. Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT*3A, TPMT*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:6444-9.

Tai HL, Fessing MY, Bonten EJ, Yanishevsky Y, d'Azzo A, Krynetski EY, Evans WE. Enhanced proteasomal degradation of mutant human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) in mammalian cells: mechanism for TPMT protein deficiency inherited by TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B or TPMT*3C. Pharmacogenetics. 1999;9:641-50.

Takenaka K, Morgan JA, Scheffer GL, Adachi M, Stewart CF, Sun D, Leggas M, Ejendal KF, Hrycyna CA, Schuetz JD. Substrate overlap between Mrp4 and Abcg2/Bcrp affects purine analogue drug cytotoxicity and tissue distribution. Cancer Res. 2007;67:6965-72.

Tapner MJ, Jones BE, Wu WM, Farrell GC. Toxicity of low dose azathioprine and 6-mercaptopurine in rat hepatocytes. Roles of xanthine oxidase and mitochondrial injury. J Hepatol. 2004;40:454-63.

Tavadia SM, Mydlarski PR, Reis MD, Mittmann N, Pinkerton PH, Shear N, Sauder DN. Screening for azathioprine toxicity: a pharmacoeconomic analysis based on a target case. J Am Acad Dermatol. 2000;42:628-32.

Tay BS, Lilley RM, Murray AW, Atkinson MR. Inhibition of phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase from Ehrlich ascites-tumour cells by thiopurine nucleotides. Biochem Pharmacol. 1969;18:936-8.

Teml A, Schaeffeler E, Herrlinger KR, Klotz U, Schwab M. Thiopurine treatment in inflammatory bowel disease: clinical pharmacology and implication of pharmacogenetically guided dosing. Clin Pharmacokinet. 2007a;46:187-208.

Teml A, Schwab M, Hommes DW, Almer S, Lukas M, Feichtenschlager T, Florin T, Seiderer J, Petritsch W, Bokemeyer B, Kreisel W, Herrlinger KR, Knoflach P, Bonaz B, Klugmann T, Herfarth H, Pedarnig N, Reinisch W. A systematic survey evaluating 6-thioguanine-related hepatotoxicity in patients with inflammatory bowel disease. Wien Klin Wochenschr. 2007b;119:519-26.

Thomas CW, Myhre GM, Tschumper R, Sreekumar R, Jelinek D, McKean DJ, Lipsky JJ, Sandborn WJ, Egan LJ. Selective inhibition of inflammatory gene expression in activated T lymphocytes: a mechanism of immune suppression by thiopurines. J Pharmacol Exp Ther. 2005;312:537-45.

Tidd DM, Paterson AR. A biochemical mechanism for the delayed cytotoxic reaction of 6-mercaptopurine. Cancer Res. 1974;34:738-46.

Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, Lehr HA, Wirtz S, Becker C, Atreya R, Mudter J, Hildner K, Bartsch B, Holtmann M, Blumberg R, Walczak H, Iven H, Galle PR, Ahmadian MR, Neurath MF. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. J Clin Invest. 2003;111:1133-45.

Timmer A, McDonald JW, Macdonald JK. Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis. Cochrane Database Syst Rev. 2007: CD000478.

Tomalik-Scharte D, Lazar A, Fuhr U, Kirchheiner J. The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. Pharmacogenomics J. 2008;8:4-15.

Torres RJ, Puig JG. Hypoxanthine-guanine phosophoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. Orphanet J Rare Dis. 2007;2:48.

Ujiie S, Sasaki T, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M. Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT*2 - *24). Pharmacogenet Genomics. 2008;18:887-93.

Van Aken J, Schmedders M, Feuerstein G, Kollek R. Prospects and limits of pharmacogenetics: the thiopurine methyl transferase (TPMT) experience. Am J Pharmacogenomics. 2003;3:149-55.

Van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? Am J Hum Genet. 1998;62:1044-51.

Van Dieren JM, Hansen BE, Kuipers EJ, Nieuwenhuis EE, Van der Woude CJ. Meta-analysis: Inosine triphosphate pyrophosphatase polymorphisms and thiopurine toxicity in the treatment of inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther. 2007;26:643-52.

Van Dieren JM, van Vuuren AJ, Kusters JG, Nieuwenhuis EE, Kuipers EJ, van der Woude CJ. ITPA genotyping is not predictive for the development of side effects in AZA treated inflammatory bowel disease patients. Gut. 2005;54:1664.

Van Waeg G, Niklasson F, Ericson A, de Verdier CH. Purine metabolism in normal and ITP-pyrophosphohydrolase-deficient human erythrocytes. Clin Chim Acta. 1988;171:279-92.

Veerman AJ, Hählen K, Kamps WA, Van Leeuwen EF, De Vaan GA, Solbu G, Suciu S, Van Wering ER, Van der Does-Van der Berg A. High cure rate with a moderately intensive treatment regimen in non-high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. Results of protocol ALL VI from the Dutch Childhood Leukemia Study Group. J Clin Oncol. 1996;14:911-8.

Vegter S, Boersma C, Rozenbaum M, Wilffert B, Navis G, Postma MJ. Pharmacoeconomic evaluations of pharmacogenetic and genomic screening programmes: a systematic review on content and adherence to guidelines. Pharmacoeconomics. 2008;26:569-87.

Vogel F. Moderne probleme der human genetik. Ergebnisse der Inneren Medizin. 1959;12: 52-125.

Von Ahsen N, Armstrong VW, Behrens C, von Tirpitz C, Stallmach A, Herfarth H, Stein J, Bias P, Adler G, Shipkova M, Oellerich M, Kruis W, Reinshagen M, Schütz E. Association of inosine triphosphatase 94C>A and thiopurine S-methyltransferase deficiency with adverse events and study drop-outs under azathioprine therapy in a prospective Crohn disease study. Clin Chem. 2005;51:2282-8.

Von Ahsen N, Oellerich M, Armstrong VW. Characterization of the inosine triphosphatase (ITPA) gene: haplotype structure, haplotype-phenotype correlation and promoter function. Ther Drug Monit. 2008;30:16-22.

Vora A, Mitchell CD, Lennard L, Eden TO, Kinsey SE, Lilleyman J, Richards SM; Toxicity and efficacy of 6-thioguanine versus 6-mercaptopurine in childhood lymphoblastic leukaemia: a randomised trial. Medical Research Council; National Cancer Research Network Childhood Leukaemia Working Party. Lancet. 2006;368:1339-48.

Vuchetich JP, Weinshilboum RM, Price RA. Segregation analysis of human red blood cell thiopurine methyltransferase activity. Genet Epidemiol. 1995;12:1-11.

Wang L, Sullivan W, Toft D, Weinshilboum R. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: chaperone protein association and allozyme degradation. Pharmacogenetics 2003;13:555-64.

Wang J, Zeevi A, Webber S, Girnita DM, Addonizio L, Selby R, Hutchinson IV, Burckart GJ. A novel variant L263F in human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 2 is associated with diminished enzyme activity. Pharmacogenet Genomics 2007;17:283-90.

Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. Am J Hum Genet. 1980;32:651-62.

Wielinga PR, Reid G, Challa EE, van der Heijden I, van Deemter L, de Haas M, Mol C, Kuil AJ, Groeneveld E, Schuetz JD, Brouwer C, De Abreu RA, Wijnholds J, Beijnen JH, Borst P. Thiopurine metabolism and identification of the thiopurine metabolites transported by MRP4 and MRP5 overexpressed in human embryonic kidney cells. Mol Pharmacol. 2002;62:1321-31.

Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, de Haas M, Scheffer GL, Baas F, Beijnen JH, Scheper RJ, Hatse S, De Clercq E, Balzarini J, Borst P. Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97:7476-81.

Wollner N, Burchenal JH, Lieberman PH, Exelby P, D'Angio G, Murphy ML. Non-Hodgkin's lymphoma in children. A comparative study of two modalities of therapy. Cancer. 1976;37:123-34.

Wollner N, Exelby PR, Lieberman PH. Non-Hodgkin's lymphoma in children: a progress report on the original patients treated with the LSA2-L2 protocol. Cancer. 1979;44:1990-9.

Wong DR, Derijks LJ, den Dulk MO, Gemmeke EH, Hooymans PM. The role of xanthine oxidase in thiopurine metabolism: a case report. Ther Drug Monit. 2007;29:845-8.

Yan L, Zhang S, Eiff B, Szumlanski CL, Powers M, O'Brien JF, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase polymorphic tandem repeat: genotype-phenotype correlation analysis. Clin Pharmacol Ther. 2000;68:210-9.

Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH et al. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. Ann Intern Med. 1997;126:608-14.

Yee SW, Shima JE, Hesselson S, Nguyen L, De Val S, Lafond RJ, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Kwok PY, Ferrin TE, Black BL, Gurwitz D, Ahituv N, Giacomini KM. Identification and characterization of proximal promoter polymorphisms in the human concentrative nucleoside transporter 2 (SLC28A2). J Pharmacol Exp Ther. 2009;328:699-707.

Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, Behm FG, Raimondi SC, Relling MV, Patel A, Cheng C, Campana D, Wilkins D, Zhou X, Li J, Liu H, Pui CH, Evans WE, Naeve C, Wong L, Downing JR. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. Cancer Cell. 2002;1:133-43.

Zaza G, Cheok M, Yang W, Panetta JC, Pui CH, Relling MV, Evans WE. Gene expression and thioguanine nucleotide disposition in acute lymphoblastic leukemia after in vivo mercaptopurine treatment. Blood. 2005;106:1778-85.

Zaza G, Cheok M, Krynetskaia N, Thorn C, Stocco G, Hebert JM, McLeod H, Weinshilboum RM, Relling MV, Evans WE, Klein TE, Altman RB. PharmGKB. 2009. http://www.pharmgkb.org/do/serve?objId=PA2040&objCls=Pathway

Zelinkova Z, Derijks LJ, Stokkers PC, Vogels EW, van Kampen AH, Curvers WL, Cohn D, van Deventer SJ, Hommes DW. Inosine triphosphate pyrophosphatase and thiopurine S-methyltransferase genotypes relationship to azathioprine-induced myelosuppression. Clin Gastroenterol Hepatol. 2006;4:44-9.

Zimmermann AG, Wright KL, Ting JP, Mitchell BS. Regulation of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase type II gene expression in human T cells. Role for a novel 5' palindromic octamer sequence. J Biol Chem. 1997;272:22913-23.