

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE PHARMACIE

**MERCAPTOPURINE ET
POLYMORPHISME GENETIQUE**

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale : Chimie et Biologie

Discipline : Pharmacie

Spécialité : Pharmaco-toxico-génétique

Présentée et soutenue publiquement par

MONTEIL-GANIERE Catherine

Le 25 Juin 2003, devant le jury composé de

Président	M. Jean-Paul MOISAN, Professeur de Génétique, UFR de Médecine, NANTES
Rapporteurs	M. Marc PALLARDY, Professeur de Toxicologie, UFR de Pharmacie, PARIS XI M. Jean-Michel WARNET, Professeur de Toxicologie, UFR de Pharmacie, PARIS V
Directeurs de thèse	M. Michel BOURIN, Professeur de Pharmacologie, UFR de Médecine, NANTES M. Alain PINEAU, Professeur de Toxicologie, UFR de Pharmacie, NANTES

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS.....	5
-------------------	---

PARTIE I

POLYMORPHISME DE LA THIOPURINE METHYLTRANSFERASE. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.

I – Médicaments de la famille des Thiopurines	8
II – PHARMACOCINETIQUE	10
III – Metabolisme des Thiopurines	10
III.1 – METABOLISME DE LA 6-MERCAPTORURINE	10
III.2 – METABOLISME DE LA 6-THIOGUANINE	13
III.3 – MECANISME D’ACTION DE LA 6- MERCAPTORURINE ET DE LA 6-THIOGUANINE	13
IV – La Thiopurine Methyltransférase	14
IV.1 – Propriétés biochimiques	14
.....	14
IV.2 – POLYMORPHISME DE L’ACTIVITE TPMT CHEZ L’HOMME	15
IV.3 – BASES GENETIQUES DE LA DEFICIENCE EN TPMT	16
IV.4 – MECANISME DE DEGRADATION DES PROTEINES TPMT MUTANTES	20
IV.5 – AUTRES FACTEURS INFLUENCANT L’ACTIVITE TPMT	21
IV.5.1 – Interactions médicamenteuses	21
IV.5.2 – FACTEURS GENETIQUES	21
IV.5.3 – Age des glogules rouges	22
IV.5.4 – Facteur biochimique	22
V – Implications cliniques du polymorphisme de la TPMT	23
V.1 – TOXICITE	23
V.2 – EFFICACITE	24

PARTIE II

TECHNIQUES ANALYTIQUES.

I – Mesure de l’activite TPMT	
I.1 – Evolution chronologique.....	
I.1.1 –TECHNIQUE UTILISANT DES MOLECULES MARQUEES	26
I.1.1.1 - Prélèvement et prétraitement de l’échantillon	
I.1.1.2 - Réaction enzymatique	
I.1.1.3 - Mesure de la 6-Méthylmercaptopurine formée	

III.2 – METHODE DE PCR-REVERSE DOT BLOT	46
III.2.1 – EXTRACTION DE L'ADN	46
III.2.2 – AMPLIFICATION DE L'ADN OU PCR	47
III.2.2.1 – Principe général	
III.2.2.2 – Description des amorces	
III.2.2.3 – PCR	
III.2.3 – Electrophorese	
III.2.4 – REVERSE DE DOT BLOT	50
III.2.4.1 – Principe général	
III.2.4.2 – Description des sondes	
III.2.4.3 – Préparation des membranes et des réactifs	
III.2.4.4 – Reverse Dot Blot	
III.3 – METHODE PAR SEQUENÇAGE	53

PARTIE III

ETUDE DE LA THIOPURINE METHYLTRANSFERASE DANS UNE POPULATION FRANÇAISE CAUCASIENNE.

I – INTRODUCTION	55
I.1 – OBJECTIFS DE L'ETUDE	55
I.2 – REALISATION PRATIQUE – OBTENTION DES PRELEVEMENTS SANGUINS	55
I.2.1 – ADULTES	55
I.2.2 – ENFANTS	55
I.2.3 – SANGS DE CORDON	56
I.2.4 – INCLUSIONS	56
I.2.5 – NATURE DU PRELEVEMENT	56
I.2.6 – PRETRAITEMENT DES ECHANTILLONS	56
II – ONTOGENESE DES AUTRES ENZYMES DU METABOLISME DES MEDICAMENTS	57
II.1 – DEFINITION DE L'ONTOGENESE	57
II.2 – METABOLISME DES MEDICAMENTS	57
II.3 – ONTOGENESE DES ENZYMES DU METABOLISME DES MEDICAMENTS	58
II.3.1 – ENZYMES DE PHASE I	58
II.3.1.1 – CYP2D6	
II.3.1.2 – CYP2C19	
II.3.1.3 – CYP2C9	
II.3.1.4 – CYP1A2	

II.3.1.5 – <i>CYP3A4</i>	
II.3.2 – <i>ENZYMES DE PHASE II...</i>	62
II.3.2.1 – <i>Glucuronosyltransférases</i>	
II.3.2.2 – <i>N-Acétyltransférase</i>	
II.3.2.3 – <i>Thiopurine S-Méthyltransférase</i>	
III – PUBLICATION N°2	64

PARTIE IV

ETUDE DU METABOLISME DE LA 6-MERCAPTOPURINE DANS LA LEUCEMIE AIGUE LYMPHOBLASTIQUE DE L'ENFANT.

I – LA LEUCEMIE AIGUE LYMPHOBLASTIQUE (LAL) DE L'ENFANT	92
II – TRAITEMENT DE LA LAL DE L'ENFANT	93
II.1 – GENERALITES	93
II.2 – PROTOCOLES DE TRAITEMENT UTILISES	95
III – ETUDE REALISEE	97
III.1 – OBJECTIFS	97
III.2 – DESCRIPTION DE LA POPULATION	97
III.3 – TESTS STATISTIQUES	98
IV – RESULTATS	98
IV.1 – GENOTYPES TPMT	98
IV.2 – ACTIVITE TPMT	99
IV.3 – METABOLITES DE LA 6-MP	101
IV.4 – COMPORTEMENT DES ENFANTS HETEROZYGOTES	104
v – DISCUSSION	105

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	109
-----------------------------------	-----

REFERENCES

ANNEXES

ABREVIATIONS

6-MMP	6-méthylmercaptapurine
6-MP	6-mercaptapurine
6-TG	6-thioguanine
6-TGNs	6-thioguanine nucléotide
A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
C	Cytosine
DNPS	Synthèse <i>de novo</i> des purines
DTT	Dithiotréitol
G	Guanine
HPRT	Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransférase
LAL	Leucémie Aiguë Lymphoblastique
MTX	Méthotrexate
SAM	S-Adénosyl-Méthionine
T	Thymine
TGNs	Thioguanine Nucléotides
TPMT	Thiopurine-méthyltransférase

Au cours de notre travail de recherche, nous nous sommes intéressée à la relation entre le médicament et son effet dans l'organisme : efficacité, inefficacité ou toxicité. Pourquoi, pour certains médicaments donnés à posologie identique à différents patients, avons-nous, chez la plupart des patients, une efficacité, mais aussi chez certains, une inefficacité ou une toxicité du traitement ?

C'est le cas pour la 6-mercaptopurine : la variabilité de l'effet de cette molécule est essentiellement due au polymorphisme génétique de la thiopurine-méthyltransférase (TPMT), enzyme qui catabolise la 6-mercaptopurine dans l'organisme. Ce produit est employé en thérapeutique comme anticancéreux ou immunosuppresseur. Chez les patients traités par 6-mercaptopurine, les conséquences de ce polymorphisme peuvent être à l'origine d'effets toxiques graves, mettant parfois en jeu le pronostic vital.

La partie initiale de ce travail est consacrée à une revue des données bibliographiques récentes sur la 6-mercaptopurine et le polymorphisme génétique de la thiopurine-méthyltransférase, ses bases et conséquences en cliniques. Puis, nous avons décrit les méthodes analytiques employées pour mesurer l'activité de la thiopurine-méthyltransférase, les métabolites intraérythrocytaires de la 6-mercaptopurine et pour déterminer le génotype de cette enzyme. Nous avons ensuite procédé à deux études.

La première, au sein d'une population de référence d'adultes et d'enfants, pour évaluer l'impact de l'ontogenèse sur l'activité TPMT et déterminer la corrélation phénotype-génotype au sein d'une population caucasienne française.

Une seconde étude a été réalisée chez des enfants leucémiques prenant de la 6-mercaptopurine au cours de leur traitement de maintenance, pour évaluer si la mesure de l'activité TPMT et des métabolites de la 6-mercaptopurine peuvent apporter un bénéfice au niveau du suivi médical de cette pathologie. Ce travail s'inscrit dans le développement de la recherche du bon usage du médicament à l'hôpital, sujet toujours d'actualité, puisqu'il a récemment fait l'objet d'une question au Sénat (Journal Officiel du 1^{er} mai 2003).

PARTIE I

**POLYMORPHISME
DE LA THIOPURINE-METHYLTRANSFERASE.
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**

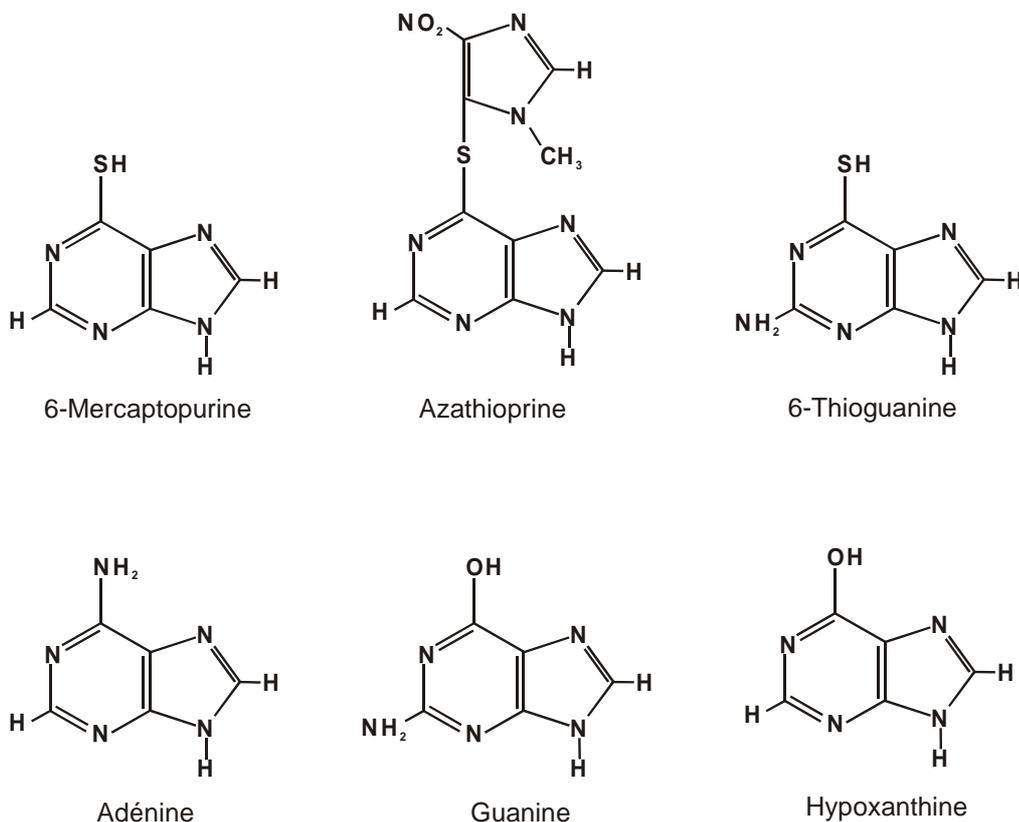
I – MEDICAMENTS DE LA FAMILLE DES THIOPURINES

La famille des thiopurines comprend trois molécules actuellement commercialisées :

- 6-Mercaptopurine = PURINETHOL[®] (comprimés sécables à 50 mg), autorisation de mise sur le marché en 1965.
- Azathioprine = IMUREL[®] (comprimés sécables à 50 mg), autorisation de mise sur le marché en 1967.
- Thioguanine = LANVIS[®] (comprimés sécables à 40 mg), autorisation de mise sur le marché en 1999. Avant 1999, le produit était disponible sur autorisation temporaire d'utilisation (ATU).

DU FAIT DE L'ANALOGIE STRUCTURALE (FIGURE 1), CES MEDICAMENTS SE COMPORTENT COMME DES ANTAGONISTES DES PURINES : ILS INTERFERENT AVEC LE METABOLISME DES PURINES ENDOGENES, L'ADENINE, LA GUANINE ET L'HYPOXANTHINE, QUI SONT DES COMPOSANTS ESSENTIELS DE L'ADN, L'ARN ET DE QUELQUES COENZYMES (LENNARD, 1992).

LA 6-MERCAPTOPURINE (6-MP) ET LA 6-THIOGUANINE (6-TG) SONT DES AGENTS ANTILEUCEMIQUES, TANDIS QUE L'AZATHIOPRINE EST PLUTOT UTILISEE COMME IMMUNOSUPPRESSEUR. LA 6-MP ET L'AZATHIOPRINE POSSEDENT TOUTES DEUX DES PROPRIETES CYTOTOXIQUES ET IMMUNOSUPPRESSIVES.



biochimiques, *in vivo* ou *in vitro*) ont permis des avancées considérables dans la compréhension du mécanisme d'action de ces molécules et de la réponse des patients à leur traitement.

II – PHARMACOCINETIQUE

A la dose de 75 mg/m² par voie orale, la biodisponibilité de la **6-MP** est en moyenne de 16% avec d'importantes variations interindividuelles de 5 à 37% (Zimm *et al.*, 1983a). Un effet de premier passage dû au métabolisme hépatique pourrait expliquer cette variabilité. Chez l'enfant leucémique, les concentrations plasmatiques de la 6-MP montrent aussi une large variation interindividuelle après administration IV ou orale de 75 mg/m² (Zimm *et al.*, 1983a). Cette importante variabilité se retrouve non seulement au niveau des valeurs des concentrations maximales, mais aussi au niveau du délai d'apparition du pic plasmatique (en moyenne 2,2 heures). De ce fait, seule l'aire sous la courbe est le reflet de l'absorption de la 6-MP. Les profils des concentrations plasmatiques en fonction du temps varient aussi chez le même enfant, lors d'administrations répétées de mêmes posologies (Hayder *et al.*, 1989 ; Endresen *et al.*, 1990) : un étude réalisée chez 18 enfants montre un coefficient de variation de l'aire sous la courbe de 58% (Lafolie *et al.*, 1991). La demi-vie moyenne d'élimination de la 6-MP, chez des enfants atteints de LAL et traités à la posologie de 75 mg/m², est de 1,5 h (de 1,2 à 2,4 h) (Zimm *et al.*, 1983a).

L'**azathioprine** est rapidement métabolisée après absorption orale. Chez les patients transplantés rénaux, les cinétiques plasmatiques d'azathioprine et de 6-MP formée montrent aussi des variations interindividuelles importantes après administration IV ou orale (Lin *et al.*, 1980 ; Odland *et al.*, 1986). Bien que la fonction rénale de ces patients soit parfois altérée, la cinétique plasmatique de l'azathioprine ou de la 6-MP n'apparaît pas modifiée (Odland *et al.*, 1986). Chan *et al.* (1990) ont montré que, chez des patients transplantés rénaux prenant de l'azathioprine par voie orale (1,7 à 2,8 mg/kg/jour), la demi-vie est courte (1,9 ± 0,6h), le pic plasmatique de concentration de 6-MP (t max = 2,5h) est faible (74 ± 24 ng/mL) comparé à celui du métabolite majeur l'acide 6-thiourique (1210 ± 786 ng/mL) observé 3,5 ± 0,6h après une dose d'azathioprine.

III – METABOLISME DES THIOPURINES

La mercaptopurine et la thioguanine elles-mêmes n'ont pas d'activité anticancéreuse. Ce sont des prodrogues inactives qui, après absorption par voie orale, subissent un métabolisme important au niveau intestinal et hépatique. Ce métabolisme est intracellulaire.

La figure 3 présente le métabolisme de la mercaptopurine (voie B) et de la thioguanine (voie A).

III.1 – Métabolisme de la Mercaptopurine

Les transformations de la Mercaptopurine se produisent selon trois voies compétitives : deux voies cataboliques et une voie anabolique qui produit les métabolites actifs.

L'oxydation du noyau purine catalysée par la **xanthine-oxydase** (XO, EC 1.1.3.22) est une voie catabolique majeure. Elle conduit à la formation de l'acide 6-thiourique, métabolite inactif (Brunschede et Krooth, 1973). La xanthine-oxidase est une enzyme cytoplasmique dont l'activité spécifique varie d'un tissu à un autre. Chez l'homme elle est élevée dans le foie et les cellules intestinales, présente dans le rein, la rate, les muscles squelettiques et le muscle cardiaque, mais absente de tissus plus accessibles tels que les cellules sanguines circulantes (Holmes et Wyngaarden, 1989 ; Parks et Granger, 1986). Le métabolisme de la 6-MP et de la 6-TG dans les blastes leucémiques schématisé dans la figure 3 (McLeod *et al.*, 2000) montre la production d'acide thiourique à partir de la 6-MP et de la 6-TG, grâce à la XO présente dans d'autres cellules que les blastes

leucémiques. La XO est absente des cellules sanguines circulantes. Des études de population ont rapporté des variations interindividuelles de l'activité XO dans une proportion de 4 à 10 (Lennard et Lilleyman, 1996). Relling *et al.* (1992) ont trouvé des activités significativement plus faibles chez les hommes que chez les femmes ; les résultats de Guerciolini *et al.* (1991) montrent l'inverse. L'influence des variations interindividuelles dans l'activité de la XO sur la thérapie par 6-mercaptopurine n'est pas clairement définie mais nous savons qu'une activité de la XO fortement diminuée potentialise les effets cytotoxiques de 6-MP : l'administration en prétraitement d'allopurinol, inhibiteur de la XO, augmente la concentration du pic plasmatique et l'aire sous la courbe de 6-MP administrée par voie orale (Zimm *et al.*, 1983b). L'administration concomitante augmente les concentrations plasmatiques de 6-MP et les 6-thioguanine nucléotides (6-TGNs) (métabolites produits par une autre voie), alors que l'on observe une chute importante du nombre de leucocytes pendant le même temps (Lennard *et al.*, 1984).

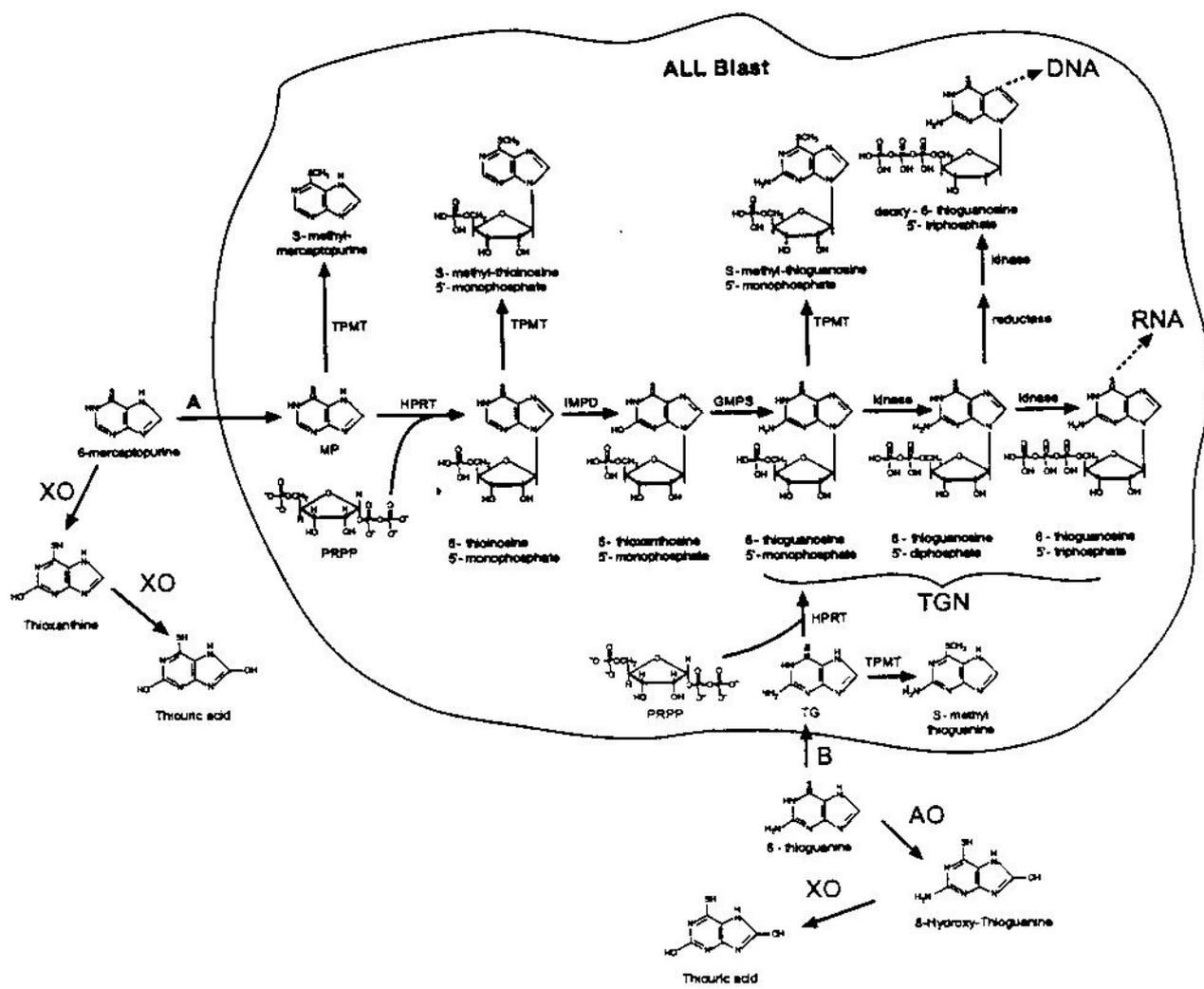


Figure 3 : Métabolisme de la 6-mercaptopurine (voie A) et de la 6-thioguanine (voie B) dans les cellules humaines leucémiques (McLeod et al, 2000).

La seconde voie catabolique majeure est la S-méthylation de la 6-MP catalysée par la **thiopurine méthyltransférase** (TPMT, EC 2.1.1.67) une enzyme cytoplasmique qui catalyse la S-méthylation des composés soufrés aromatiques ou hétérocycliques. En dehors de la métabolisation des xénobiotiques, la fonction endogène de la TPMT est inconnue. Un polymorphisme génétique est responsable de variations interindividuelles importantes dans l'activité TPMT mesurée dans les érythrocytes (Weinshilboum, 1992). La 6-méthylmercaptopurine formée est un métabolite inactif.

La production de métabolites actifs (voie anabolique) est intracellulaire. L'**hypoxanthine phosphoribosyltransférase** (HPRT, EC 2.4.2.8) catalyse la première étape qui consiste en une fixation d'un groupement phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) sur la mercaptopurine pour former la 6-thioinosine 5'-monophosphate (TIMP). Puis l'oxydation du noyau purine, réalisée grâce à l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPD), aboutit à la synthèse de la 6-thioxanthosine 5'-monophosphate. Le groupement alcool formé est ensuite transformé en groupement aminé par la guanosine monophosphate synthétase (GMPS) pour donner la 6-thioguanosine 5'-monophosphate (TGMP) qui va être phosphorylée par des kinases. L'ensemble des thioguanosines 5'-mono -di et -triphosphate forme les 6-thioguanines nucléotides (6-TGNs), métabolites actifs, à l'origine du principal mécanisme d'action de la 6-MP et de la 6-TG grâce à leur incorporation dans l'ADN et l'ARN (Tidd et Patterson, 1974 ; Elion, 1989).

La TPMT intervient aussi dans cette voie du métabolisme : elle va participer à la méthylation de l'atome de soufre de la TIMP et de la TGMP. La S-méthyl-thioinosine 5'-monophosphate (MeTIMP) formée est un inhibiteur puissant de la phosphoribosylpyrophosphate amidotransférase, enzyme catalysant la première étape de la synthèse *de novo* des purines (Tay *et al.*, 1969). La S-méthyl-thioguanosine 5'-monophosphate est un inhibiteur 12 fois moins puissant vis-à-vis de cette enzyme (Allan et Bennett, 1971). Les métabolites méthylés seraient donc cytotoxiques par un mécanisme autre que l'incorporation dans l'ARN et l'ADN : ils inhibent la synthèse *de novo* des purines.

L'HPRT est largement distribuée dans l'organisme. Son activité spécifique varie d'un tissu à un autre. Elles est très élevée au niveau du système nerveux central, moindre au niveau des érythrocytes et des lymphocytes et plus faible au niveau du foie, de la rate et du rein (Cory, 1986). L'activité HPRT dans les globules rouges chez les enfants sains varie peu (14 à 24 U.mL⁻¹). Elle est significativement plus élevée chez les enfants leucémiques traités par 6-MP (20 à 27 U.mL⁻¹) (Lennard *et al.*, 1991).

Les individus atteints du syndrome de Lesch-Nyhan sont complètement déficients en HPRT. Cette enzyme est codée par un gène qui se trouve au niveau du chromosome X. La déficience est due à la mutation d'une base sur ce chromosome (Wilson *et al.*, 1983). Chez ces individus, l'azathioprine et la mercaptopurine ne sont pas toxiques (Nyhan *et al.*, 1968). Cette maladie, observée seulement chez les garçons, est caractérisée par l'association de choréoathétose, d'hypertonie musculaire et d'arriération mentale avec agressivité. Il existe aussi une hyperproduction d'acide urique avec des concentrations sanguines et urinaires élevées.

III.2 – Métabolisme de la 6-Thioguanine

La 6-thioguanine est métabolisée par les 3 mêmes voies enzymatiques. La voie de la xanthine-oxydase produit de l'acide thiourique inactif. La 6-TG est méthylée par la TPMT pour donner la S-méthylthioguanine inactive. Mais la différence essentielle est la formation beaucoup plus rapide de la TGMP et de l'ensemble des 6-TGNs, suite à l'action anabolique de l'HPRT. Second fait important, l'ensemble de ces voies enzymatiques ne conduisent pas à la formation du dérivé méthylé MeTIMP, puissant inhibiteur de la synthèse *de novo* des purines.

III.3 – Mécanisme d'action des métabolites de la 6-MP et de la 6-TG

La déoxy-6-thioguanosine 5'-triphosphate est incorporé dans l'ADN cellulaire, sans conséquence immédiate sur la synthèse de l'ADN ou la viabilité de la cellule. En effet, la cytotoxicité se manifeste au cours du cycle cellulaire suivant, par une inhibition au cours des phases S et G2 (Krynetskaia *et al.*, 1999 ; Maybaum *et al.*, 1983). La cytotoxicité est donc retardée.

Alors que l'incorporation de la déoxy-6-thioguanosine 5'-triphosphate dans l'ADN conduit à la formation des deux paires de bases thioguanine-thymine et thioguanine-cytosine, les études *in vitro* ont montré que la cytosine-triphosphate est incorporée 300 fois plus que la thymidine-triphosphate dans de l'ADN contenant de la thioguanine (Krynetski *et al.*, 2001). Donc la paire de bases TG-Cytosine est probablement la plus impliquée biologiquement dans l'effet thérapeutique des thiopurines.

En présence des paires de bases TG-Cytosine, plusieurs interactions ADN-protéines et ADN-activités enzymatiques sont altérées, pour des enzymes impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN ou dans l'apoptose. Parmi ces enzymes, on peut citer la Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), récemment impliquée dans la réparation de l'ADN et l'apoptose, l'ARNase H, l'ADN ligase et la topoisomérase II, enzymes clés dans la réparation et la réplication de l'ADN (Krynetski *et al.*, 2001).

Somerville *et al.* (2003) ont étudié les modifications structurales et dynamiques induites par la TG dans des duplexes d'ADN contenant la paire de bases TG-Cytosine, par comparaison à la paire de bases Guanine-Cytosine. En dépit d'une diminution de la stabilité thermique du duplexe contenant TG-Cytosine, les perturbations structurales sont modestes. Cependant, les perturbations dynamiques sont beaucoup plus importantes. Un duplexe d'ADN est continuellement en mouvement et une ouverture transitoire des paires de bases se produit naturellement sur une durée voisine d'une milliseconde. Les résultats montrent que la durée d'ouverture de la paire de bases TG-Cytosine est environ 80 fois plus longue que pour la paire de bases Guanine-Cytosine. Les auteurs concluent que ces modifications dynamiques, associées à une diminution de la stabilité de la paire de bases TG-Cytosine constituent le mécanisme par lequel les interactions ADN-activités enzymatiques et ADN-protéines sont modifiées en présence de substrats contenant une paire de bases TG-Cytosine.

En résumé, la 6-MP et la 6-TG sont métabolisées en déoxy-6-thioguanosine 5'-triphosphate qui est incorporé dans l'ADN pendant la réplication, grâce à l'ADN polymérase, en raison de la compatibilité biomoléculaire de ce composé. Mais, d'autres enzymes de synthèse de l'ADN (GAPDH, l'ARNase H, l'ADN ligase et la topoisomérase II) sont, au contraire, très sensibles aux modifications physico-chimiques induites par la présence de la TG et interrompent la réplication de l'ADN lors du cycle cellulaire suivant. Ce mécanisme d'action est particulièrement insidieux du fait de l'absence de détection de la TG lors de son incorporation.

La S-méthyl-thioinosine 5'monophosphate (MeTIMP) est un inhibiteur puissant de la phosphoribosylpyrophosphate amidotransférase, enzyme catalysant la première étape de la synthèse *de novo* des purines (DNPS) (Tay *et al.*, 1969). La conséquence de l'inhibition de la DNPS est une déplétion en purine, conduisant à une inhibition de synthèse de l'ADN, une diminution de la prolifération cellulaire et une cytotoxicité.

IV – THIOPURINE-METHYLTRANSFERASE (TPMT, EC 2.1.1.67)

IV.1 – Propriétés biochimiques :

La thiopurine méthyltransférase est une transméthylase cytoplasmique trouvée chez les mammifères et les oiseaux. Utilisant le S-adenosyl-L-méthionine comme donneur de groupement méthyle, cette enzyme catalyse la méthylation des atomes de soufre des composés aromatiques et hétérocycliques (Figure 4). Aucun substrat endogène n'est connu et son rôle biologique reste indéterminé. Identifiée à l'origine dans le foie et le rein de rats et de souris (Remy, 1963), elle s'est révélée être présente dans de nombreux tissus : cœur, cellules sanguines, placenta, pancréas, intestin (Woodson et al, 1982 ; Woodson et Weinshilbom, 1983).

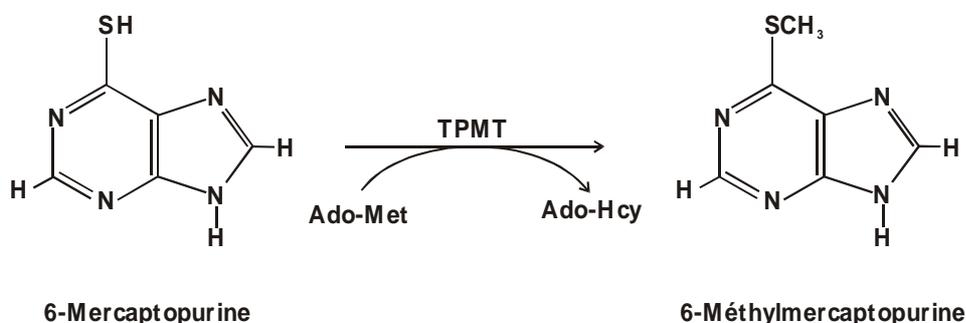


Figure 4 : S-méthylation de la 6-MP catalysée par la thiopurine-méthyltransférase (Ado-Met : S-adenosyl-L-méthionine – Ado-Hcy : S-adenosyl-L-homocystéine).

(Jones *et al.*, 1993)

Sa masse moléculaire est de 28 kDa. Elle contient 245 acides aminés et n'est pas métallo-dépendante (Woodson et Weinshilbom, 1983). La TPMT catalyse la S-méthylation de la 6-MP, 6-TG, des thiophénols, thiopurine nucléotides et nucléosides (Woodson *et al.*, 1983 ; Ames *et al.*, 1986 ; Deininger *et al.*, 1994 ; Krynetski *et al.*, 1995a). Les dérivés de l'acide benzoïque et la thioxanthosine monophosphate sont inhibiteurs de son activité catalytique (Deininger *et al.*, 1994).

La TPMT érythrocytaire humaine a un pH optimum d'activité de 7,5 (Weinshilbom *et al.*, 1978) alors que, dans le rein, le pH optimal est d'environ 6,7 (Woodson et Weinshilbom, 1983). Une chromatographie par échange d'ions a révélé la présence de 2 isoformes de la TPMT dans le foie et le rein humain, avec des poids moléculaires et des propriétés catalytiques similaires (Van Loon et Weinshilbom, 1990 ; Szumlanski *et al.*, 1992). Il existerait un ratio similaire de ces 2 isoformes chez les patients avec une activité TPMT intermédiaire et élevée, indiquant que les 2 isoformes ne sont pas codés par des variants alléliques responsables du polymorphisme génétique (Van Loon et Weinshilbom, 1990).

IV.2 – Polymorphisme de l'activité TPMT chez l'homme

L'activité TPMT des érythrocytes est corrélée à l'activité TPMT présente au niveau hépatique, rénal, leucocytaire et au niveau des blastes leucémiques (Woodson *et al.*, 1982 ; Szumlanski *et al.*, 1992 ; Van Loon et Weinshilbom, 1982 ; McLeod *et al.*, 1995b). Les érythrocytes sont alors devenus un tissu de choix, facilement accessible, pour établir l'activité TPMT chez l'homme.

Ainsi, de nombreuses études de population se sont développées et ont révélé un polymorphisme dans l'activité TPMT érythrocytaire. L'étude de référence reste celle de Weinshilbom et Sladek (1980) : cette étude réalisée chez 298 donneurs de sang adultes caucasiens américains montre une distribution trimodale de l'activité TPMT (Figure 5) : 88,6% de la population ont une activité élevée, 11,1% a une activité intermédiaire et 0,3% (1 individu sur 300) a une activité très faible. Ces résultats, associés à des études familiales réalisées dans ce travail, indiquent une transmission autosomale codominante.

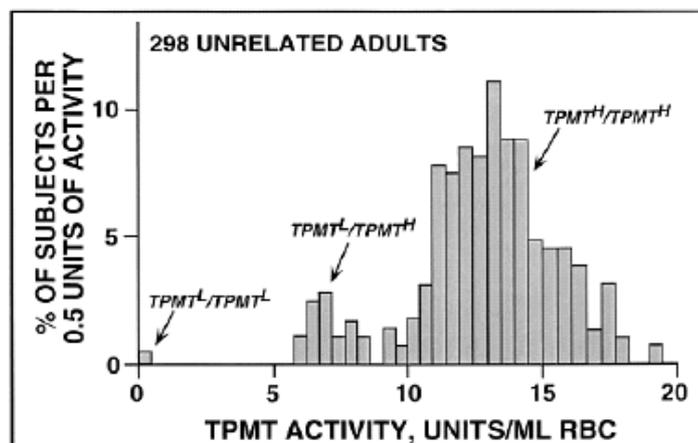


Figure 5 : Distribution de fréquence de l'activité TPMT érythrocytaire dans une population de 298 donneurs de sang (Weinshilboum et Sladek, 1980)

D'autres études de population se sont ensuite succédées au sein de différentes ethnies. Chez les Caucasiens, la distribution trimodale est généralement retrouvée (Tinel *et al.*, 1991 ; Klemetsdal *et al.*, 1993 ; Mc Leod *et al.*, 1994 ; Loennechen *et al.*, 2001 ; Rossi *et al.*, 2001) alors que d'autres travaux trouvent une distribution où il est difficile d'individualiser les métaboliseurs rapides et intermédiaires (Jacqz-Aigrain *et al.*, 1994 ; Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1998a ; Coulthard *et al.*, 2000 ; Alves *et al.*, 2001). Dans la population noire-américaine, Jones *et al.* (1993) et Mc Leod *et al.* (1994) retrouvent aussi une distribution trimodale. C'est également le cas pour la population chinoise (Lee et Kalow, 1993), alors que 2 études réalisées chez les Coréens ont montré une distribution unimodale (Park-Hah *et al.*, 1996 ; Jang *et al.*, 1996).

Loennechen *et al.* (2001) n'ont pas mis en évidence de différence d'activité TPMT entre les Saami et les Caucasiens norvégiens vivant dans la même région. La proportion de phénotypes élevés et intermédiaires est similaire dans les deux populations. Mc Leod *et al.* (1994) ont comparé l'activité TPMT des populations noires et blanches américaines : ils ont aussi retrouvé une proportion similaire de phénotypes élevés et intermédiaires mais l'activité TPMT est 17% plus faible au sein de la population noire américaine. Jones *et al.* (1993) avaient précédemment retrouvé une différence en ce sens (de 33%) entre la population afro-américaine de Floride et une population blanche américaine.

IV.3 – Bases génétiques de la déficience en TPMT

Le polymorphisme de l'activité TPMT, mis en évidence par Weinshilboum et Sladek (1980), repose sur une base génétique : le phénotype « méthylyateur rapide » ou activité élevée serait homozygote pour l'allèle fonctionnel ou « wild-type » (wt). Il aurait donc un génotype wt/wt. Le phénotype « méthylyateur intermédiaire » serait hétérozygote wt/allèle muté non fonctionnel et le phénotype « méthylyateur lent » ou activité très faible, homozygote allèle muté/allèle muté. Les allèles mutés, identifiés par la suite dans des études génétiques, associés à des phénotypes intermédiaires ou lents, ont confirmé cette thèse. La fréquence estimée de l'allèle muté (6%) nous conduit à penser que ce polymorphisme est bien un polymorphisme génétique tel que l'a défini Meyer en 1991 : « *A pharmacogenetic polymorphism is a monogenic trait that is caused by the presence in the same*

population of more than one allele at the same locus and more than one phenotype in regard to drug interaction with the organism. The frequency of the least common allele is more than 1% ».

Le gène fonctionnel de la TPMT (34 Kb) a été localisé chez l'homme sur le bras court du chromosome 6 (6p22.3) et contient 10 exons et 9 introns (Szumlanski et al, 1996 ; Krynetski et al, 1997). Un pseudogène a été identifié et localisé sur le bras long du chromosome 18 (18q 21.1) (Lee et al, 1995).

L'allèle fonctionnel « wild-type » est nommé TPMT*1. Deux allèles avec des mutations silencieuses ont été décrits (Figure 6). TPMT*1S avec la mutation T474C (exon 7) qui ne conduit pas à un changement d'acide aminé (Szumlanski *et al.*, 1996), TPMT*1A avec la mutation C178T au niveau de l'exon 1, mutation non transcrite retrouvée chez un individu ayant une activité TPMT élevée (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1998b).

Actuellement, 10 variants alléliques sont associés à de faibles activités TPMT (Figure 6). Mais, seuls 3 (TPMT*2, *3A, *3C) représentent 80 à 95% des cas d'activité intermédiaire ou très faible. La plupart des allèles mutés contiennent des mutations ponctuelles conduisant à une substitution d'acides aminés (TPMT*2, *3A, *3B, *3C, *3D, *5, *6, *7, *8). Les autres correspondent soit à la formation d'un codon stop prématuré (TPMT*3D) ou à la destruction d'un site d'épissage (TPMT*4).

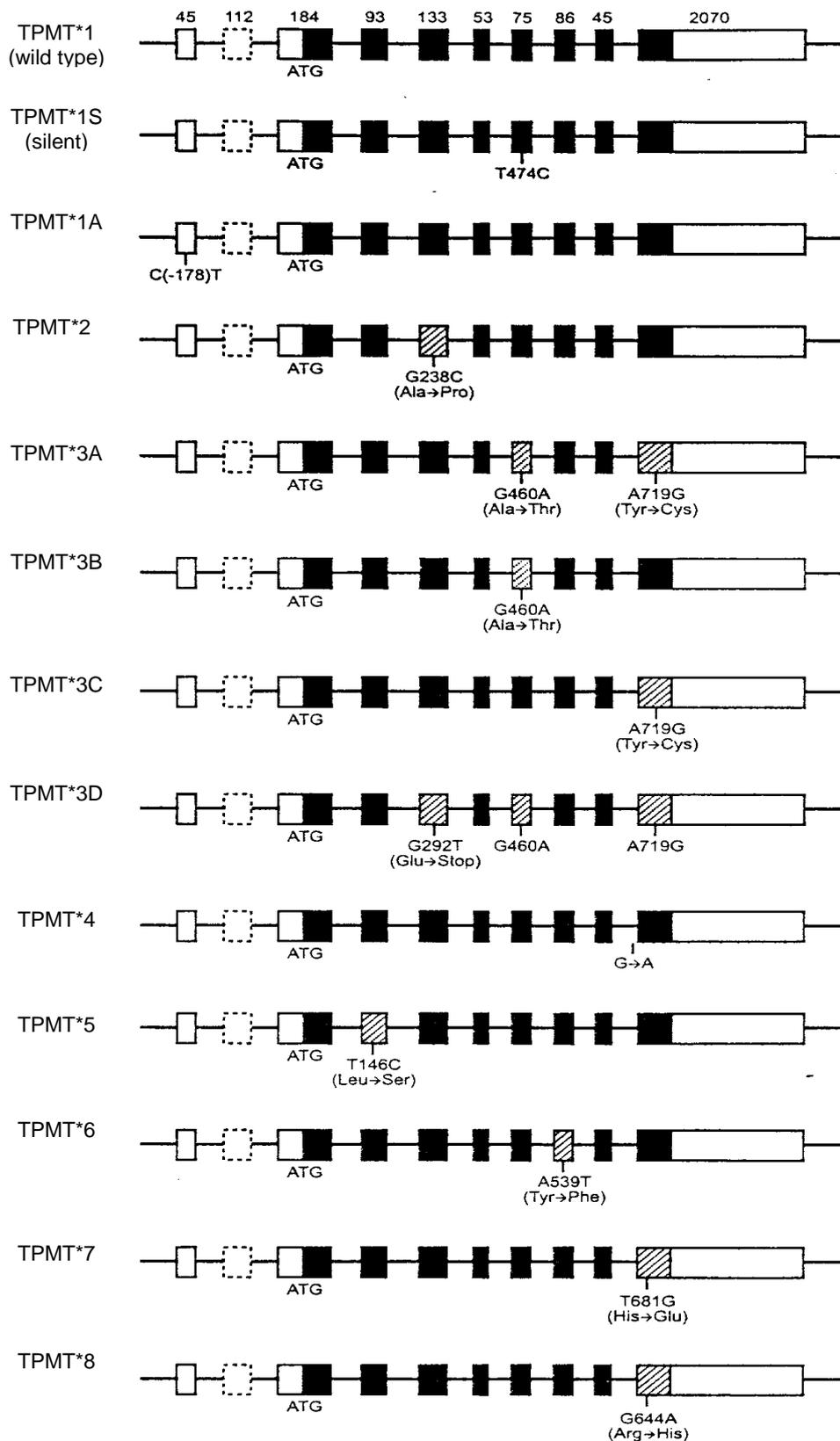


Figure 6 : Les variants alléliques du gène TPMT.

Les rectangles représentent les exons : blancs = régions non traduites, noirs = régions codantes, hachurés = exons contenant des mutations qui entraînent des changements d'acides aminés. L'exon représenté en pointillé (exon 2) n'a été détecté que dans un seul foie humain sur 16 (Krynetski et al, 2000).

- TPMT*2 est caractérisé par une transversion G238C au niveau de l'exon 5 entraînant une substitution de l'alanine par la proline au codon 80 (Krynetski *et al.*, 1995).

- TPMT*3A contient deux transitions G460A (exon 7) et A719G (exon 10) conduisant respectivement aux substitutions d'acide aminé Alanine → Thréonine (codon 150) et Tyrosine → Cystéine (codon 240) (Tai *et al.*, 1996 ; Szumlanski *et al.*, 1996).

- TPMT*3B contient uniquement la mutation G460A de TPMT*3A (Alanine → Thréonine).

- TPMT*3C contient uniquement la mutation A719G de TPMT*3A (Tyrosine → Cystéine).

- TPMT*3D comprend les mutations de l'allèle *3A avec en plus une mutation G292T au niveau de l'exon 5 qui résulte en un changement de l'acide glutamique (codon 98) en un codon stop (Otterness *et al.*, 1997).

- TPMT*4 contient une transition G→A à la jonction intron 9-exon 10 qui crée un épissage anormal au niveau de l'exon 10 (Otterness *et al.*, 1998).

- TPMT*5 est caractérisé par une transition T146C (exon 4) qui résulte en une substitution de la leucine en sérine (codon 49) (Otterness *et al.*, 1997). Cette mutation a été identifiée chez un sujet dont l'ethnie n'est pas précisée.

- TPMT*6, identifié chez un Coréen, correspond à une transversion A539T (exon 8) qui résulte en une substitution de la Tyrosine en Phénylalanine (codon 180) (Otterness *et al.*, 1997).

- TPMT*7, identifiée chez un Européen, caractérisée par une transversion T681G (exon 10), résulte en un remplacement de l'Histidine par l'Acide Glutamique (codon 227) (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1998b).

- TPMT*8, caractérisé chez un Afro-américain (Hon *et al.*, 1999), correspond à une transition G644A (exon 10) entraînant un changement de l'arginine par l'histidine (codon 215).

Les mutations prédominantes varient en fonction des ethnies (Tableau I). Chez les Caucasiens, c'est la mutation *3A qui est la plus fréquente (Ameyaw *et al.*, 1999 ; Spire-Vayron de la Monreyre *et al.*, 1998a ; Yates *et al.*, 1997). La mutation *3C prédomine chez les Saami du nord de l'Europe (Loennechen *et al.*, 2001). Dans la population noire-africaine, seule la mutation *3C a été retrouvée (McLeod *et al.*, 1999 ; Ameyaw *et al.*, 1999), alors que chez les afro-américains, la mutation *3C prédomine, associée aux mutations *2 et *3A, reflétant l'intégration des gènes Caucasiens et Afro-américains dans la population des Etats-Unis (Hon *et al.*, 1999). D'une façon générale, chez les Asiatiques, la fréquence des mutations est plus faible que dans les autres populations étudiées. Les résultats enregistrés chez les Chinois (Collie-Duguid *et al.*, 1999) et les Japonais (Kumagai *et al.*, 2000) montrent uniquement l'allèle *3C, alors que l'étude d'une population d'Asie du sud-ouest (Inde, Pakistan, Sri Lanka et Népal) ne retrouve que l'allèle *3A.

La mutation *3C, se retrouvant dans toutes les ethnies (sauf en Asie du sud-ouest), paraît être la mutation ancestrale ; la mutation G460A serait apparue postérieurement pour former l'allèle *3A (Ameyaw *et al.*, 1999). La diffusion de l'allèle *2 paraît être restreinte aux Caucasiens ; de ce fait, son apparition pourrait être plus récente.

ETHNIE (référence)	n	Fréquence des différents génotypes			Fréquence allélique		
		Wt/wt %	Wt/mut %	Mut/mut %	TPMT*2 %	TPMT*3A %	TPMT*3C %
Caucasiens britanniques (Ameyaw <i>et al.</i> , 1999)	199	89,9	9,6	0,5	0,5	4,5	0,3
Caucasiens français (Spire-Vayron de la Moureyre <i>et al.</i> , 1998)	191	85,9	13,5	0,5	0,5	5,7	0,8
Caucasiens américains (Yates <i>et al.</i> , 1997)	282	92,5	7,4	0,14	0,2	3,2	0,2
Afro-américains (Hon <i>et al.</i> , 1999)	248	90,7	9,2	0,2	0,4	0,8	2,4
Kenyans (Mc Leod <i>et al.</i> , 1999)	101	89,1	10,9	0	0	0	5,4
Ghanéens (Ameyaw <i>et al.</i> , 1999)	217	85,3	14,4	0,5	0	0	7,6
Chinois (Collie-Duguid <i>et al.</i> , 1999)	192	95,3	4,7	0	0	0	2,3
Japonais (Kumagai <i>et al.</i> , 2000)	553	97,3	2,4	0,4	0	0	1,5
Asiatiques du sud-ouest de l'Asie (Collie-Duguid <i>et al.</i> , 1999)	99	98,0	2,0	0	0	1	0

Saami (Nord de la Norvège) (Loennechen <i>et al.</i> , 2001)	194	93,8	6,2	0	0	0	3,3
---	-----	------	-----	---	---	---	-----

Tableau I : Variations ethniques des allèles de la TPMT

n = nombre de sujets

mut = ensemble des mutations *2, *3A, *3C

IV.4 – Mécanisme de dégradation des protéines mutantes

L'expression hétérologue des protéines TPMT fonctionnelles (wt) et non fonctionnelles dans des microorganismes et des cellules de mammifères a permis de définir l'activité catalytique et la stabilité de la protéine.

Les études réalisées chez des levures par Krynetski *et al.* (1995) et Tai *et al.* (1997) montrent que la synthèse et la stabilité de l'ARN messager sont normales pour les protéines wt et mutantes. De même, le taux de synthèse de la protéine TPMT est comparable pour les 2 types de protéines. Par contre, le taux de dégradation des protéines codées par les allèles TPMT*2 et *3 est plus important que pour l'allèle *1 : la demi-vie de la protéine wt est voisine de 18h alors que celle de *2 et *3A est d'environ 15mn et *3B environ 6h. L'effet beaucoup plus important pour TPMT *3A que pour *3B suggère qu'un impact supérieur se produit sur la structure tertiaire de la protéine quand les 2 mutations sont présentes, la rendant plus susceptible à la protéolyse. Du fait d'une dégradation plus rapide, la quantité de protéine TPMT est 400 fois plus faible pour TPMT*3A et 4 fois plus faible pour *3B que pour l'allèle wt.

De même chez l'homme, de plus faibles quantités de protéine TPMT ont été mesurées dans les érythrocytes de patients ayant les mutations *2,*3A et *3C (Tai *et al.*, 1997 ; Loennechen *et al.*, 1998), indiquant que le mécanisme de perte de fonction résulte en une faible quantité de protéine TPMT.

La seule discordance est représentée par la protéine *3C qui est présente en faible quantité dans les érythrocytes des individus TPMT *3C (Loennechen *et al.*, 1998) mais dont la demi-vie est similaire à la protéine wt lorsqu'elles sont exprimées par un microorganisme (Tai *et al.*, 1997). En fait, TPMT *3C a bien une demi-vie plus courte associée à une quantité de protéine plus faible que la protéine wt, indiquant un mécanisme de protéolyse, mais uniquement lorsque TPMT *3C est exprimée par des cellules de mammifères (Tai *et al.*, 1999).

Les 2 voies majeures de protéolyse, responsables de la dégradation des protéines au sein des cellules eucaryotes, sont :

- Par l'intermédiaire d'un protéasome ATP-dépendant
- Voie lysosomale ATP-indépendante

Les travaux de Tai *et al.* (1997) suggèrent un mécanisme protéosomal ATP-dépendant pour la dégradation des protéines TPMT issues d'allèles mutés.

Un protéasome est un complexe macromoléculaire multicatalytique assurant l'élimination de nombreuses protéines qui jouent un rôle majeur au niveau des fonctions cellulaires, tout au long du cycle cellulaire.

IV.5 – Autres facteurs influençant l'activité TPMT

IV.5.1 – Interactions médicamenteuses

L'administration de **thiopurines** augmente l'activité TPMT d'environ 30%, ainsi que le montrent les études réalisées chez les enfants leucémiques. L'activité TPMT revient à un niveau plus faible quelques mois après l'arrêt du traitement (Lennard *et al.*, 1990). On parle d'**induction** de la TPMT par les thiopurines mais le mécanisme moléculaire reste inconnu.

Pendant la caractérisation biochimique de la TPMT, Woodson *et al.* (1983) et Ames *et al.* (1986) avaient remarqué que les dérivés de l'acide benzoïque tels que l'**acide salicylique** étaient de puissants **inhibiteurs** de cette enzyme. A dose thérapeutique d'acide acétylsalicylique, les concentrations plasmatiques d'acide salicylique entraînent une inhibition de la TPMT (Woodson *et al.*, 1983). Il fallut attendre une dizaine d'années pour voir apparaître les premiers cas d'interaction entre les thiopurines et les dérivés de l'acide aminosalicylique utilisés dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Griffin et Miner, 1995 ; Hanauer, 1996). *In vitro*, la sulfasalazine et les autres dérivés de l'acide aminosalicylique sont des inhibiteurs puissants de la TPMT humaine recombinante (Szumlanski et Weinshilboum, 1995). Le premier cas d'interaction médicamenteuse grave chez un patient traité par des thiopurines à dose standard et qui recevait un dérivé de l'acide aminosalicylique a été publié en 1997 par Lewis *et al.*.

L'activité TPMT est aussi **inhibée** par certains **diurétiques** : *in vitro*, la TPMT humaine recombinante et la TPMT érythrocytaire sont inhibées par le furosémide, le bendrofluméthiazide et le trichlorméthiazide (Lysaa *et al.*, 1996). A l'inverse, des études de population ont montré que l'utilisation de diurétiques s'accompagne d'une **augmentation** de l'activité TPMT (Klemetsdal *et al.*, 1993). Ces modifications d'activité peuvent être à l'origine d'interactions médicamenteuses.

Le **disulfiram**, inhibiteur de l'aldéhyde-hydrogénase, est activé *in vivo* par réduction en diéthylthiocarbamate. Ce produit subit ensuite une méthylation et une sulfoxydation pour former le métabolite actif terminal. La TPMT catalyse la S-méthylation du diéthylthiocarbamate en présence de microsomes hépatiques humains et, d'autre part, en présence de cytosol hépatique humain. Par conséquent, l'activité TPMT pourrait influencer la biotransformation du diéthylthiocarbamate et ainsi modifier l'efficacité du disulfiram dans le traitement de l'alcoolisme (Glauser *et al.*, 1993).

IV.5.2 – Facteurs génétiques

Certains auteurs ont recherché si, en dehors des mutations au niveau des régions codantes, des mutations au niveau de la région promotrice du gène intervenaient dans la régulation de l'activité TPMT. Le promoteur d'un gène est situé en amont de celui-ci en 5' et contient de nombreuses séquences régulatrices de la transcription du gène.

Szumlanski *et al.* (1996) ont constaté que le promoteur ne contient pas l'habituelle séquence « TATA box » située près du site d'initiation de la transcription mais est une région riche en bases GC. Spire-Vayron de la Moureyre *et al.* (1998a) ont été les premiers à mettre en évidence un polymorphisme au niveau de séquences répétées en tandem en nombre variable encore appelées « Variable Number of Tandem Repeats » (VNTR). Ces VNTR sont des séquences de 17 ou 18 paires de bases répétées de 3 à 9 fois (Yan *et al.*, 2000). Les allèles VNTR les plus fréquemment retrouvés chez les Caucasiens possèdent 4 à 5 éléments (VNTR*4, VNTR*5) (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1998a ; Yan *et al.*, 2000). Ces 2 études ont mis en évidence une relation inversement proportionnelle entre le nombre de répétitions des unités (présents sur les 2 allèles) et le niveau

d'activité TPMT. Ces observations ont été confirmées et étendues avec des études utilisant une construction plasmidique comportant un gène reporteur, sous le contrôle d'un promoteur ayant différentes tailles de VNTR. Ces travaux ont montré une diminution du niveau d'expression du gène avec le nombre d'éléments (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1999). L'ensemble des auteurs a donc conclu à une modulation du niveau d'activité TPMT par le nombre de VNTR. Yan *et al.* (2000) soulignent que cette modulation est modeste par rapport aux effets des polymorphismes rencontrés au niveau des régions codantes.

Alves *et al.* (2001) ont travaillé non seulement sur le nombre de VNTR du gène TPMT dans la population portugaise, mais aussi sur la structure de ces séquences répétées. Ils ont identifié 3 séquences différentes (A,B,C) répétées plusieurs fois, A contenant 18 paires de bases, B et C 17 paires de bases. La structure de ces allèles est AxByC, C étant toujours présent 1 seule fois. Ils remarquent que les allèles VNTR*6 sont associés à une diminution de l'activité TPMT. De même, les allèles contenant 3 éléments B influencent l'expression du gène en faveur d'un abaissement de la transcription. Donc, non seulement le nombre mais aussi la structure des VNTR influenceraient l'activité TPMT.

IV.5.3 – Age des globules rouges

Les études réalisées chez des enfants leucémiques montrent, au moment du diagnostic, des activités TPMT intermédiaires associées avec des génotypes wt/wt. L'hémogramme de ces enfants met généralement en évidence une anémie importante due à un déficit de production de globules rouges. Lennard et al (2001) ont séparé les globules rouges en fonction de leur âge et montré que plus les érythrocytes sont âgés, plus l'activité TPMT est faible. Les auteurs concluent que la faible activité TPMT mesurée au diagnostic chez les enfants leucémiques peut être causée, au moins en partie, par un excès de globules rouges âgés.

IV.5.1 – Facteur biochimique

Le plasma de patients urémiques inhibe de façon réversible l'activité TPMT érythrocytaire, plus qu'un plasma normal et contient des concentrations plus élevées d'accepteurs de méthyle endogènes qu'un plasma normal (Pazmino et al, 1980). Cependant, les érythrocytes de patients urémiques ont une activité TPMT supérieure (de 24%) à ceux de contrôles non urémiques (Pazmino et al, 1980).

N.B. L'influence de l'âge et de l'ontogénèse est traitée dans la partie III.

V - PRINCIPALES IMPLICATIONS CLINIQUES DU POLYMORPHISME DE LA TPMT

V.1 – Toxicité

L'activité TPMT est associée à une sévère **toxicité hématopoïétique** lorsque les patients, déficients en activité TPMT, sont traités avec des doses standards de 6-MP, 6-TG ou azathioprine (Lennard *et al.*, 1989 ; Evans *et al.*, 1991 ; Lennard *et al.*, 1993 ; Mc Bride *et al.*, 2000 ; Evans *et al.*, 2001). Cette toxicité peut être mortelle, comme le montre le cas d'un greffé cardiaque TPMT déficient qui décéda d'une septicémie, consécutive aux leucopénies répétées, au cours du traitement par azathioprine (Schütz *et al.*, 1993). Le diagnostic de la déficience en TPMT fut établi après le décès. Cependant, des cas de thérapies réussies chez ces patients ont été rapportés, utilisant 5 à 15% de la posologie habituelle de thiopurine (Evans *et al.*, 1991 ; Lennard *et al.*, 1993 ; Evans *et al.*, 2001).

Des données plus récentes indiquent que les patients ayant un phénotype intermédiaire, généralement associé à un génotype hétérozygote, ont aussi un risque accru de toxicité hématopoïétique (Black *et al.*, 1998 ; Relling *et al.*, 1999b ; Evans *et al.*, 2001), bien que la fréquence et la sévérité de cette toxicité soit moindre que chez les patients déficients (Relling *et al.*, 1999b). Evans *et al.* (2001) montrent que, lors de la survenue d'une hématotoxicité, la prise en charge des patients hétérozygotes ne diffère pas de celle des patients déficients (absence de différence significative pour la médiane du nombre de semaines de suivi et du nombre d'épisodes de toxicité). Cependant, lors de la réintroduction du traitement, la réduction de posologie de thiopurine est plus élevée pour le groupe des homozygotes mutés par rapport au groupe des hétérozygotes (médiane : 90,7% *versus* 66,7%).

Des risques de **cancer secondaire** ont aussi été rapportés récemment. Ils seraient plus fréquents chez les patients déficients en TPMT. Relling *et al.* (1999c) montrent une incidence plus élevée de tumeurs cérébrales secondaires chez des enfants leucémiques, traités par un protocole plus intensif en anti-métabolites et ayant subi une radiothérapie crânienne, alors que cet effet secondaire est habituellement rare. Dans cette étude, 6 enfants sur 52 ont développé une tumeur cérébrale secondaire. Sur 6, 3 étaient déficients en TPMT (homozygotes ou hétérozygotes) et 4 avaient des concentrations de TGNs élevées. Par conséquent, les auteurs conseillent de limiter la radiothérapie crânienne prophylactique uniquement aux patients ayant un risque élevé de rechute du système nerveux central. En 1998, Relling *et al.* montrent que les enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique qui développent une leucémie aiguë myéloïde secondaire (8 sur 154 dans l'étude) ont généralement des activités TPMT faibles. La différence n'est cependant pas statistiquement significative. Dans l'article de Bo *et al.*, (1999), 5 enfants leucémiques sur 439 ont développé une myélodysplasie secondaire ou une leucémie aiguë myéloïde secondaire. Ces patients ont une activité TPMT significativement plus faible que les autres ($p = 0,02$), dont 2 avec un génotype hétérozygote. 4 enfants sur 5 ont des concentrations en TGNs et/ou dérivés méthylés très élevées. Les patients ayant des activités TPMT faibles auraient donc un risque leukémogène élevé, lorsqu'ils sont traités par 6-MP associée à d'autres anticancéreux.

V.2 - Efficacité

De faibles concentrations en TGNs intraérythrocytaires ont été associées à un risque de rechute plus élevé chez des enfants leucémiques prenant de la 6-MP dans leur traitement de maintenance (Lennard *et al.*, 1989a,

1990). Comme les concentrations en TGNs sont inversement proportionnelles à l'activité TPMT, une relation entre l'activité TPMT et le risque de rechute a été établie chez 95 patients (Lennard *et al.*, 1990). Dans cette étude, le sous-groupe d'enfants avec de faibles concentrations en TGNs (inférieures à la médiane) avait des activités TPMT plus élevées et un risque de rechute plus important que les enfants qui avaient des TGNs au dessus de la médiane.

Les dérivés méthylés intraérythrocytaires ont été mesurés quelques années plus tard chez les enfants leucémiques en traitement de maintenance : leurs concentrations sont inversement proportionnelles à celles des TGNs (Lennard *et al.*, 1995). La mesure conjointe des 2 métabolites permettra de mettre en évidence une mauvaise compliance au traitement lorsque les 2 métabolites sont absents ou présents en faible quantité (Lennard *et al.*, 1995). Les dérivés méthylés sont des inhibiteurs puissants de la synthèse *de novo* des purines (DNPS) *in vitro*, mais leur rôle exact *in vivo* est longtemps resté incertain (Lennard *et al.*, 1997). Récemment, Dervieux *et al.* (2001) ont montré, en utilisant des cellules qui « surexpriment » (ou n'expriment pas) la TPMT, que la méthylation de la 6-MP contribue à son propre effet antiprolifératif, probablement en inhibant la DNPS par l'intermédiaire des méthylmercaptapurine nucléotides. Ces auteurs ont aussi mis en évidence que le niveau d'inhibition de la DNPS est lié à l'importance de l'effet antileucémique (Dervieux *et al.*, 2002). L'inhibition de la DNPS, suite à une injection intraveineuse de 6-MP, existe mais est très faible, associée à un effet antileucémique minime. Cependant, lorsque la 6-MP est associée au méthotrexate (MTX), l'inhibition de la DNPS est beaucoup plus intense et l'effet antileucémique aussi.

Concernant la leucémie aiguë lymphoblastique de l'enfant (LAL), la mercaptopurine est certainement un élément déterminant dans la réussite du traitement, comme le montre l'étude rétrospective de Relling *et al.* (1999a) incluant 180 enfants. Les auteurs ont comparé la probabilité de survie (EFS =Event Free Survival) avec un certain nombre de variables pharmacocinétiques concernant à la fois les traitements d'induction et de maintenance :

- TGNs : concentration moyenne, concentration maximum,
- MeMPs : concentration moyenne, concentration maximum,
- Méthotrexate polyglutamates : concentration moyenne, concentration maximum, aire sous la courbe,
- Téponoside : concentration moyenne, aire sous la courbe,
- Cytarabine : concentration moyenne, aire sous la courbe,
- Posologie de mercaptopurine
- Posologie de méthotrexate.

L'analyse multivariée a montré que seules des doses élevées de 6-MP avec de faibles activités TPMT étaient associées à une amélioration de l'EFS. La survenue de neutropénie était par contre associée à un mauvais pronostic.

La 6-MP et le polymorphisme génétique de la TPMT sont donc fortement associés au succès de la chimiothérapie au cours de la LAL. Aussi, il était important de mettre au point des méthodes analytiques permettant d'évaluer le phénotype et le génotype de la TPMT ainsi que de mesurer les métabolites intraérythrocytaires de la 6-MP.

PARTIE II

TECHNIQUES ANALYTIQUES

I - MESURE DE L'ACTIVITE TPMT

I.1 - Evolution chronologique

I.1.1 - Techniques utilisant des molécules marquées

La première technique de mesure de l'activité TPMT chez l'homme a été publiée en 1978 par Weinshilboum *et al.*. Ces auteurs ont choisi d'utiliser une méthode radiochimique pour mesurer l'activité TPMT dans les érythrocytes, milieu facile à prélever. Cette méthode a longtemps été considérée comme la technique de référence. Elle a été modifiée par d'autres auteurs (McLeod *et al.*, 1994) et est encore pratiquée dans de nombreux laboratoires.

I.1.1.1 - Prélèvement et prétraitement de l'échantillon

Le prélèvement sanguin est réalisé sur tube hépariné de 5ml. Après centrifugation et élimination du plasma, les érythrocytes subissent un double lavage dans du NaCl 9‰. Après élimination du liquide de lavage et remise en suspension dans du NaCl 9‰, un hématocrite est réalisé. Celui-ci va permettre d'exprimer le résultat en nmol de produit formé, pour une heure d'incubation, par millilitre d'un culot globulaire qui contiendrait 100 % de globules rouges.

La suspension de globules rouges est ensuite diluée au 1/5^{ème} dans de l'eau distillée froide. Le lysat de globules rouges est alors centrifugé à 13 000 g à 4°C pendant 10 minutes pour éliminer les membranes cellulaires. Le surnageant est congelé à -85°C jusqu'à l'analyse.

I.1.1.2 - Réaction enzymatique

Le principe de la réaction est de recréer *in vitro*, dans un lysat de globules rouges, une réaction enzymatique utilisant un substrat, la 6-MP, un donneur de groupement méthyle, la S-Adénosyl-Méthionine (SAM), et de mesurer la quantité de 6-méthylmercaptapurine (6-MMP) formée.

Cette réaction a lieu pendant 1 heure à 37° C, dans un tampon phosphate à pH 7,5. Aux 2 co-substrats (6-MP, SAM), sont ajoutés du dithiothréitol (DTT) qui empêche l'oxydation de la 6-mercaptapurine et de l'allopurinol qui inhibe l'action de la xanthine-oxydase.

Préalablement, le lysat de globules rouges est mis en contact avec une résine Chelex 100 pendant 1h à 4°C sous agitation lente. Le rôle de la résine est de chélater les cations divalents, en particulier le magnésium (Mg²⁺). Cette étape permet d'inhiber l'hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransférase (HPRT), enzyme magnésium-dépendante, qui est aussi présente dans les globules rouges.

WEINSHILBOUM ET AL. (1978) ONT VERIFIÉ L'IDENTITÉ DES PRODUITS FORMÉS À L'ISSUE DE LA RÉACTION ENZYMATIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE. ILS ONT TESTÉ PLUSIEURS TAMPONS AVANT DE CHOISIR UN TAMPON PHOSPHATE. ILS ONT MONTRÉ QUE LE PH OPTIMUM DE RÉACTION EST DE 7,5. CES AUTEURS ONT AUSSI MONTRÉ LA LINEARITÉ DE LA RÉACTION ENZYMATIQUE AVEC LA QUANTITÉ DE LYSAT DE GLOBULES ROUGES, AINSI QUE LA LINEARITÉ EN FONCTION DU TEMPS DE 0 À 90 MINUTES.

Concernant les 2 cosubstrats (6-MP et SAM), ils ont calculé le K_M apparent (constante de Michaëlis Menten) : l'activité enzymatique a été mesurée en présence de différentes concentrations de chaque produit, la concentration du second produit étant fixe. Le K_M apparent était respectivement de

$3,2 \cdot 10^{-4}$ M et $1,7 \cdot 10^{-6}$ M pour la 6-MP et la SAM. Les concentrations utilisées par la suite étaient au moins 10 fois le K_M apparent.

I.1.1.3 - Mesure de la 6-MMP formée

Au bout d'une heure, la réaction enzymatique est arrêtée par addition d'un tampon borate 0,5 M (pH = 10). La SAM utilisée est marquée au Carbone 14. La quantité de 6-MMP formée au cours de la réaction enzymatique est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide.

I.1.1.4 - Résultats

LES RESULTATS OBTENUS POUR UNE POPULATION DE 73 SUJETS ADULTES VARIENT DE 4,6 A 14,2 UNITES/ML DE CULOT GLOBULAIRE AVEC UNE MOYENNE $10,2 \pm 2,4$ (MOYENNE \pm ECART TYPE).

I.1.2 - Techniques utilisant la chromatographie

D'AUTRES AUTEURS ONT, PAR LA SUITE, CHOISI D'UTILISER DE LA SAM NON MARQUEE ET DE MESURER LA 6-MMP FORMEE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP). JACQZ-AIGRAIN *ET AL.* ONT ETE LES PREMIERS A PUBLIER EN 1994 UNE TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE DE MESURE DE LA 6-MMP, APRES EXTRACTION LIQUIDE-SOLIDE.

LE PRINCIPE DE LA REACTION ENZYMATIQUE DECRIT PAR WEINSHILBOUM *ET AL.* (1978), AVEC LES MEMES CONSTITUANTS, AINSI QUE LA PREPARATION DU LYSAT DE GLOBULES ROUGES SONT CEUX UTILISES AUJOURD'HUI POUR LA MESURE DE L'ACTIVITE TPMT, DANS LA PLUPART DES METHODES.

I.1.2.1 - Technique de Jacqz-Aigrain *et al.* (1994)

◆ Réaction enzymatique

Elle est réalisée dans des tubes en verre de 5mL contenant 200 μ L de lysat, 205 μ L de tampon phosphate 0,15 M pH = 7,5 et 15 μ L d'une solution de 6-MP. Après pré-incubation pendant 3 minutes dans un bain-marie à 37°C, la réaction enzymatique démarre en ajoutant 30 μ L d'un mélange contenant la SAM, le DTT et l'allopurinol. Les concentrations des différents produits, dans un volume final de 450 μ L, sont : 10 μ M pour la SAM, 20 μ M pour l'allopurinol, 250 μ M pour le DTT et 4 mM pour la 6-MP. Au bout d'une heure, la réaction est arrêtée par addition de 100 μ L d'HCl N.

De même que dans l'étude de Weinshilboum *et al.* (1978), les K_M apparents de la 6MP et de la SAM ont été déterminés en faisant varier les concentrations de chacun des 2 produits et en mesurant la 6-MMP formée. Les K_M mesurés ($6,1 \cdot 10^{-4}$ M pour la 6-MP et $1,3 \cdot 10^{-6}$ M pour la SAM) sont assez proches de ceux de l'étude précédente de Weinshilboum *et al.* (1978).

Une production de 6-MMP est détectée quand le lysat est incubé avec de la 6-MP et en l'absence de SAM. Cette production est faible. Elle n'excède pas 20% de la valeur obtenue en présence de SAM. Elle est attribuée à la présence endogène de SAM dans le lysat de globules rouges. De ce fait, pour chaque échantillon, un tube « blanc » est réalisé contenant le lysat de globules rouges du patient auquel on additionne tous les cofacteurs nécessaires à la réaction, à l'exception de la SAM.

◆ Mesure de la 6-MMP formée : extraction et chromatographie

Une courbe de calibration en 6-MMP est réalisée de 25 à 250 ng/mL. L'extraction liquide-solide utilise des colonnes polymériques MP1 (Interaction Chemicals, Mountain View, CA, Etats Unis).

La chromatographie emploie une colonne Supelcosil LC18 5 μ m (250 x 4,6mm DI) ainsi qu'une précolonne LC18 5 μ m (20mm). La phase mobile est un mélange, d'une part, d'acétonitrile et, d'autre part, d'eau contenant 0,2% p/v d'acide acétique et 0,1 % p/v de DTT (1M). Le débit est de 1ml/mn avec un gradient 7 : 93, 80 : 20 et 7 : 93 (v/v) pendant respectivement 18,3 et 15 minutes. La détection a lieu à 280 nm. L'analyse chromatographique dure 20 minutes. Le temps de rétention de la 6-MMP est de 16,2 minutes.

◆ Comparaison technique HPLC/Radiochimie

L'ACTIVITE TPMT A ETE DETERMINEE PAR LES 2 TECHNIQUES (HPLC ET RADIOCHIMIE DE WEINSHILBOUM ET AL (1978)) CHEZ 55 ADULTES. L'ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS PAR REGRESSION LINEAIRE MONTRE UNE BONNE CORRELATION ENTRE LES 2 METHODES PERMETTANT AINSI D'UTILISER LA TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE EN ROUTINE ($Y = 1,016X - 0,083$; $R = 0,830$; $P < 0,001$).

◆ Mesure chez 300 Adultes Caucasiens

Les résultats varient de 4,8 à 35,3 nmol.h⁻¹.ml⁻¹ PRBC (Packed red blood cells) avec une moyenne de 19,3 \pm 4,9 (moyenne \pm écart type). La fréquence de distribution apparaît gaussienne. Un sujet (0,3%) a une activité très faible (4,8 nmol h⁻¹ mL⁻¹ PRBC). Environ 90% des sujets ont une activité élevée et 10% une activité intermédiaire. Avec un antimode fixé arbitrairement à 12,0 nmol. h⁻¹.ml⁻¹ PRBC, le sous-groupe à activité élevée a une activité TPMT moyenne de 20,3 \pm 4,1 (n = 267 ; 89,0%) et le sous-groupe à activité intermédiaire 10,8 \pm 1,2 (n = 32 ; 10,7%). Aucune différence significative n'a été retrouvée entre hommes et femmes.

I.1.2.2 - Technique de Médard *et al.* (1997)

MEDARD ET AL (1997) PRESENTENT UNE MODIFICATION DE LA TECHNIQUE DE JACQZ-AIGRAIN *ET AL.* (1994) : LES AUTEURS ONT MIS AU POINT UNE EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE DE LA 6-MMP QUI REMPLACE L'EXTRACTION LIQUIDE-SOLIDE. LES CONDITIONS DE LA REACTION ENZYMATIQUE DEMEURENT INCHANGEES.

Après la phase d'incubation et arrêt de la réaction par 100 μ L de HCl N, 5mL d'un mélange dichlorométhane-alcool isopropylique (80 : 20, v/v) sont ajoutés dans chaque tube. Après 15 minutes d'agitation, les tubes sont centrifugés 10 minutes à 3000 g à 4 °C. La phase organique est reprise et évaporée à sec sous azote. L'extrait est dissous dans 250 μ L de phase mobile. Après filtration et centrifugation, 50 μ L sont injectés en chromatographie. La validation de la technique montre des résultats satisfaisants.

I.2 - Technique mise au point au laboratoire

I.2.1 - Publication n° 1

AU LABORATOIRE, NOUS AVONS CHOISI D'UTILISER UNE METHODE CHROMATOGRAPHIQUE POUR MESURER LA 6-MMP FORMEE A L'ISSUE DE LA REACTION ENZYMATIQUE. NOUS AVONS MODIFIE LES DEUX METHODES DECRITES PRECEDEMMENT. NOTRE TECHNIQUE A ETE PUBLIEE SOUS LA REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE :

Ganiere-Monteil C, Pineau A, Kergueris MF, Azoulay C, Bourin M.
Thiopurine methyl transferase activity: new extraction conditions for high-performance liquid chromatographic assay.
Journal of Chromatography B 1999;727:235-9.

I.2.2 - Description de la technique (Annexe 1)

I.2.2.1 -Prélèvement et prétraitement de l'échantillon

LES PRELEVEMENTS SONT REALISES SUR DES TUBES HEPARINES COMME DANS LES TECHNIQUES PRECEDEMMENT PUBLIEES (WEINSHILBOUM *ET AL.* (1978), JACQZ-AIGRAIN *ET AL.* (1994)). CES TUBES PERMETTENT DE RECUEILLIR UN VOLUME DE 3ML DE SANG. L'ACTIVITE TPMT EST STABLE PENDANT AU MOINS 3 JOURS SI LE PRELEVEMENT EST LAISSE A TEMPERATURE AMBIANTE (LENNARD *ET AL.*, 2001).

LA PREPARATION DU LYSAT EST INCHANGEE (WEINSHILBOUM *ET AL.* (1978), JACQZ-AIGRAIN *ET AL.* (1994)). APRES LA DERNIERE CENTRIFUGATION, LE LYSAT EST COLLECTE ET CONGELE A -80°C JUSQU'A L'ANALYSE, TEMPERATURE A LAQUELLE L'ACTIVITE TPMT EST STABLE PLUSIEURS MOIS (JACQZ-AIGRAIN *ET AL.* (1994)).

I.2.2.2 - Réaction enzymatique

Pour l'analyse, le lysat est décongelé lentement à -4°C. L'addition de 500 µL de résine Chelex 100 est suivie d'une agitation lente à 4°C pendant 1 heure. Le lysat est ensuite centrifugé à 3000 tours/minute pendant 10 minutes à 4°C.

La préparation de la résine a été initialement décrite par Raymond et Weinshilboum (1975). Après mise en suspension des particules de résine dans de l'eau distillée, le pH est ajusté à 1,5 avec de l'acide chlorhydrique concentré. La résine est rincée 3 fois avec de l'eau distillée. Le pH est ensuite ajusté à 7,5 avec une solution de soude 6 N. Puis, la résine est rincée quatre fois avec de l'eau distillée. Le pH est réajusté précisément à 7,5. La suspension se conserve 3 mois à 4°C.

CONCERNANT LA REACTION ENZYMATIQUE ELLE-MEME, LES CONDITIONS SONT IDENTIQUES A CELLES DECRITES PAR JACQZ-AIGRAIN *ET AL.* (1994). SEULS, LES VOLUMES SONT MULTIPLIES PAR 3 (600 µL DE PRISE D'ESSAI DE LYSAT), POUR AUGMENTER LE SIGNAL AU COURS DE L'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE. POUR

CHAQUE PATIENT, UN SECOND TUBE DE LYSAT SERA TRAITE EN PARALLELE, SERVANT DE « BLANC ». IL CONTIENDRA TOUS LES PRODUITS SAUF LE DONNEUR DE METHYLE (SAM). LES TUBES SONT INCUBES DANS UN BAIN THERMOSTATE A 37 °C PENDANT 1 HEURE. 300 µL D'HCL N SONT ENSUITE AJOUTES POUR ARRETER LA REACTION ENZYMATIQUE.

I.2.2.3 - Gamme d'étalonnage

La gamme d'étalonnage est réalisée par surcharge de 6-MMP dans un lysat de globules rouges aux concentrations suivantes : 0, 50, 125, 200, 250 ng/mL. Les différents réactifs sont ensuite ajoutés de la même façon que les tubes « blancs » des malades.

La solution stock de 6-MMP (500 mg.L⁻¹) est préparée dans un mélange de Diméthylsulfoxyde-Méthanol (1:1, v/v). Elle est stable pendant 6 mois à -20°C.

I.2.2.4 - Extraction de la 6-MMP

NOUS AVONS CHOISI DE MODIFIER LA METHODE DE MEDARD *ET AL.* (1997). EN EFFET, APRES EVAPORATION A SEC DE LA PHASE ORGANIQUE, LE RESIDU REPRIS PAR 250 µL DE PHASE MOBILE DEVAIT ETRE FILTRE ET CENTRIFUGE AVANT D'ETRE INJECTE EN CHROMATOGRAPHIE. L'ACHAT DE CONES FILTRANTS AUGMENTAIT CONSIDERABLEMENT LE COUT DE L'ANALYSE ET LA FILTRATION ALLONGEAIT AUSSI LA DUREE DE L'ANALYSE.

La composition du mélange de solvants utilisé est inchangée (Dichlorométhane-alcool isopropylique, 80:20, v/v). Mais l'addition préalable de chlorure d'ammonium (NH₄Cl) pH 9,5 permet de précipiter l'hémoglobine. Celle-ci ne passe donc pas dans la phase organique et ne gêne pas la suite de l'analyse. La présence de résidus après l'évaporation est ainsi évitée.

Après addition de chlorure d'ammonium (1mL) et du mélange de solvants (5mL), les tubes sont agités 15 minutes puis centrifugés 10 minutes à 2500 tours/minute. Le surnageant est ensuite éliminé et 3,5 mL de phase organique sont repris pour être évaporés à sec sous courant d'azote. L'extrait sec est dissous dans 150 µL de phase mobile. 50 µL sont injectés dans le chromatographe.

I.2.2.5 - Chromatographie

La colonne est une Supelco LC 18 5µm (250 x 4,6mm DI). La composition de la phase mobile est : eau-acétonitrile-triéthylamine (91,7 : 8 : 0,03 ; v/v) avec addition de dithiotreitol (DTT) à une concentration de 0,1g/L. Le pH est ajusté à 3,2 à l'aide d'acide *o*-phosphorique. La phase mobile est ensuite filtrée. Le débit est de 1,0 mL/min.

La longueur d'onde de détection est fixée à 290 nm. La durée de l'élution chromatographique de chaque échantillon est de 20 min. avec un temps de rétention de 15,9 min pour la 6-MMP.

De l'acétonitrile pur (50 µL) est injecté entre chaque échantillon pendant 7 min. Cet acétonitrile permet l'élution rapide de tous les produits qui seraient élués avec un temps de rétention très élevé. Il évite ainsi d'utiliser un gradient de phase mobile et permet un gain de temps (et de phase mobile) au niveau de l'analyse chromatographique.

I.2.2.6 - Calcul du résultat

Après chromatographie, la surface du pic de 6-MMP mesurée pour le blanc est soustraite de la surface du pic obtenu pour le tube réaction. La concentration en 6-MMP est alors calculée et exprimée en ng/mL de 6-MMP formée pendant la réaction enzymatique.

Le calcul final tient compte de la dilution 1/5 réalisée lors de la préparation du lysat de globules rouges, de l'hématocrite, du volume de la prise d'essai initiale (600 μ L) et du poids moléculaire de la 6-méthylmercaptapurine (166,2). Il permet d'exprimer le résultat final en $\text{nmol.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ de PRBC.

I.2.3 - Validation de la technique

La validation de la technique est présentée dans la publication (3-Résultats et discussion).

La linéarité a été étudiée de 5 à 250 ng.mL^{-1} . Elle est satisfaisante, avec une équation de la droite de régression composite de $y = 1,497 x - 0,367$ (où y est la concentration en 6-MMP et x représente la surface du pic chromatographique), pour des analyses répétées pendant 8 jours. Les coefficients r sont tous $\geq 0,997$. L'homogénéité des résultats est reconnue grâce à un écart type de la pente égal à 0,075.

La précision a été étudiée par surcharge de 6-MMP dans des lysats d'érythrocytes à 3 concentrations différentes (75, 125 et 225 ng.mL^{-1}). Les valeurs des blancs sont déduites. L'étude de reproductibilité intrajour analyse 6 fois les prélèvements d'une même concentration, dans une même série. Pour la reproductibilité interjours, chaque concentration est analysée dans 6 séries différentes, sur une période de 2 semaines. La méthode montre une bonne précision avec des coefficients de variation qui varient de 2,7 à 7,3 % et de 4,1 à 9,5 %, respectivement pour la reproductibilité intrajour et interjours .

Le pourcentage de récupération est de 82,8 ; 89,2 et 82,2 %, respectivement pour les concentrations de 75, 125 et 225 ng.mL^{-1} . La nouvelle méthode d'extraction montre donc un pourcentage de récupération tout à fait satisfaisant et homogène.

La limite de détection, correspondant à une concentration qui produit une surface de pic environ égale à 3 fois le bruit de fond, est de 5 ng.mL^{-1} . La limite de quantification, définie comme la plus faible concentration analysée avec une exactitude et une précision acceptables (erreur moyenne ≤ 10 %, CV ≤ 10 %), est de 10 ng.mL^{-1} .

La stabilité des échantillons après extraction a été étudiée pendant 32 heures à température ambiante : on peut conclure à une stabilité pendant 30 heures.

Un contrôle de qualité est préparé par surcharge de lysat d'érythrocytes. Le coefficient de variation interséries est de 6,6 % (n = 6).

I.2.4 - Résultats pour une population d'adultes Caucasiens

Nous avons mesuré l'activité TPMT chez 70 sujets (résultats inclus dans la publication – Figure 3 p 239). L'étude s'est poursuivie chez 30 sujets supplémentaires. Ainsi, l'activité TPMT a été mesurée chez une population de 100 adultes Caucasiens composée de 50 hommes et 50 femmes, âgés de 19 à 78 ans (moyenne 43,5). Les résultats varient de 7,8 à 30,6 $\text{nmol.h}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ PRBC avec une moyenne de 19,3. Ces résultats sont similaires à ceux précédemment publiés (voir Tableau n°2 de l'article p 238).

L'histogramme de fréquence montre une distribution bimodale avec 9% d'activité TPMT intermédiaire et 91% d'activité élevée. Cet histogramme permet de définir les 3 classes de la façon suivante :

- activité faible : TPMT < 7,0 nmol.h⁻¹.mL⁻¹ PRBC.
- activité intermédiaire : TPMT de 7,0 à 12,0 nmol.h⁻¹.mL⁻¹ PRBC.
- activité élevée : TPMT de 13,0 à 30,6 nmol.h⁻¹.mL⁻¹ PRBC.

I.3 - Technique utilisée à partir de Décembre 2000

LORS DE LA MISE EN PLACE DE L'ETUDE DE « CORRELATION PHENOTYPE-GENOTYPE DE LA TPMT DANS UNE POPULATION DE REFERENCE », NOUS AVONS TRAVAILLE AVEC L'EQUIPE DU PROFESSEUR E. JACQZ AIGRAIN DE L'HOPITAL ROBERT DEBRE A PARIS. AU SEIN DE LEUR LABORATOIRE, LA METHODE DE DETERMINATION DE L'ACTIVITE TPMT A UNE NOUVELLE FOIS ETE MODIFIEE. EN EFFET, L'EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE A ETE REMPLACEE PAR UNE DEPROTEINISATION PAR L'ACIDE PERCHLORIQUE SUIVIE D'UNE INJECTION DIRECTE EN CLHP. CETTE TECHNIQUE A ETE VALIDEE. APRES QUELQUES ESSAIS, NOUS AVONS CHOISI D'UTILISER CETTE METHODE POUR LE GAIN DE TEMPS QU'ELLE PROCURE, PUISQUE NOUS NOUS ENGAGEONS A REALISER ENVIRON 450 PHENOTYPES POUR L'ETUDE DE L'ACTIVITE TPMT DANS UNE POPULATION DE REFERENCE.

I.3.1 - Description de la technique (Annexe 2)

Le prélèvement, le prétraitement de l'échantillon et la chélation des ions magnésium par la résine CHELEX 100 sont identiques.

I.3.1.1 - Réaction enzymatique

POUR LE TUBE DANS LEQUEL S'EFFECTUE LA REACTION ENZYMATIQUE, LES VOLUMES SONT INCHANGES PAR RAPPORT A LA METHODE DE JACQZ-AIGRAIN ET AL (1994) : 205 µL DE TAMPON PHOSPHATE 150 mM pH = 7,5, 200 µL DE LYSAT, 15 µL DE SOLUTION DE 6-MP 18 MG/ML (CONCENTRATION FINALE 4 mM) ET 30 µL DE LA SOLUTION DE COFACTEURS APRES AVOIR MELANGE ET PREINCUBE LES TUBES 3 MINUTES A 37 °C. LES CONCENTRATIONS FINALES DES COFACTEURS SONT DE : 10 µM POUR LA SAM, 20 µM POUR L'ALLOPURINOL ET 400 µM POUR LE DTT. POUR LE TUBE « BLANC », LES 30 µL DE SOLUTION DE COFACTEURS SONT REMPLACES PAR 30 µL DE TAMPON PHOSPHATE.

La réaction enzymatique est arrêtée au bout d'une heure par 50 µL d'acide perchlorique (HClO₄ 70-72%). Après agitation au vortex et centrifugation 10 minutes à 4°C, 75 µL sont injectés pour l'analyse chromatographique.

I.3.1.2 - Gamme d'étalonnage

La gamme d'étalonnage est préparée aux concentrations de 0, 10, 25, 50, 75, 100 et 150 ng/ml. A 200µl de lysat, sont ajoutés différents volumes de solution de 6-MMP à 500 ng/mL et le tampon

phosphate pH = 7,5 q.s.p. 450 μ L. La préparation a été simplifiée par rapport aux techniques précédentes : la 6-MP, l'allopurinol et le DTT ont été remplacés par du tampon phosphate 150 mM à pH = 7,5.

I.3.1.3 - Chromatographie :

La technique chromatographique reste identique à celle que nous avons publiée. Le temps de chromatographie de chaque échantillon est de 20 minutes. Le temps de rétention de la 6-MMP est de 14,8 min. De l'acétonitrile est injecté entre chaque échantillon pendant 10 minutes.

L'annexe 2 présente les tracés chromatographiques obtenus pour un patient (n° 55) (55R = tube réactionnel, 55Blc = tube blanc). La différence de surface des pics chromatographiques de 6-MMP entre les 2 enregistrements est de 23522. La concentration de 6-MMP correspondante est de 55,95 ng/mL. Avec un hémocrite de 45,0 %, l'activité TPMT de ce patient est de 18,7 nmol.h⁻¹.mL⁻¹ PRBC.

I.3.2 - Validation de la technique

La linéarité a été étudiée de 0 à 150 ng/mL. Elle est satisfaisante, l'équation de la droite de régression composite est $y = 0,221x + 1.881$ (y représente la concentration en 6-MMP et x la surface du pic chromatographique) (n = 6). Les coefficients r sont tous $\geq 0,992$. Le faible coefficient de variation de la pente (4,3%) permet de conclure à une faible dispersion des résultats.

DES SURCHARGES DE 6-MMP DANS LES LYSATS D'ERYTHROCYTES A 3 CONCENTRATIONS DIFFERENTES (20, 60 ET 100 NG/ML) ONT PERMIS DE TESTER LA PRECISION. LES RESULTATS DE LA REPRODUCTIBILITE INTRAJOUR ET INTERJOURS MONTRENT DES COEFFICIENTS DE VARIATION QUI VARIENT RESPECTIVEMENT DE 2,0 A 3,8 % ET DE 4,8 A 6,0 % (TABLEAU II).

Le pourcentage de récupération est de 100%. La limite de détection est de 5 ng.mL⁻¹. La limite de quantification est de 10 ng.mL⁻¹.

Un premier contrôle de qualité est préparé par surcharge de lysat d'érythrocytes à la concentration de 80 ng.mL⁻¹. Les résultats au cours des différentes séries donnent une valeur moyenne \pm l'écart type de $80,0 \pm 3,05$ (n = 10), (CV = 3,8%). Un second contrôle de qualité teste l'activité enzymatique d'un sujet témoin dans chaque série. La valeur de ce contrôle est de $19,4 \pm 1,13$ nmol/h/mL PRBC avec un coefficient de variation de 5,8% (n=20).

Tableau II : Etude de précision pour le dosage de la 6-Méthylmercaptopurine

Concentration en 6-MMP (ng.mL ⁻¹) (Moyenne \pm écart type)	CV (%)
<u>Etude intrajour (n = 6)</u>	
19,59 \pm 0,75	3,8
59,20 \pm 1,58	2,7

98,64 ± 2,02	2,0
<u>Etude interjours (n = 6)</u>	
20,41 ± 1,22	6,0
60,05 ± 2,88	4,8
102,48 ± 5,52	5,4

1.3.3 - Corrélation entre les deux laboratoires (Hôpital Robert Debré-Nantes)

POUR L'ETUDE DE LA THIOPURINE METHYLTRANSFERASE DANS UNE POPULATION FRANÇAISE CAUCASIENNE, NOUS AVONS MIS EN COMMUN LES RESULTATS DES MESURES D'ACTIVITE TPMT REALISEES DANS LE SERVICE DE PHARMACOLOGIE A L'HOPITAL ROBERT DEBRE A PARIS ET CEUX DU LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE DU C.H.U. DE NANTES. AUSSI, AVANT LE DEBUT DE L'ETUDE, NOUS AVONS MESURE L'ACTIVITE TPMT DE 20 LYSATS DE GLOBULES ROUGES DANS LES 2 LABORATOIRES. LA COMPARAISON DES RESULTATS MONTRE UNE BONNE CORRELATION (FIGURE 7). LA DROITE DE REGRESSION A UNE PENTE TRES VOISINE DE 1 ET UN DECALAGE A L'ORIGINE TRES PROCHE DE 0, LE COEFFICIENT DE CORRELATION $R^2 = 0,682$; $P < 0,001$.

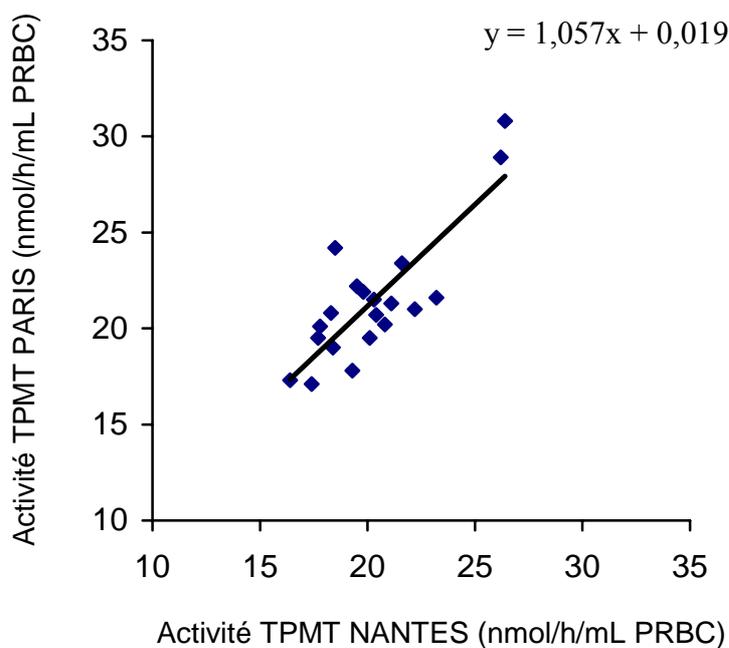


Figure 7 : Corrélation de l'activité TPMT mesurée dans 2 laboratoires différents.

$$(y = 1,057x + 0,019 ; r^2 = 0,682 ; p < 0,001)$$

1.3.4 - Corrélation entre les deux techniques

L'ACTIVITE TPMT DE 20 LYSATS DE GLOBULES ROUGES A ETE MESUREE PAR LES 2 TECHNIQUES (EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE ET DEPROTEINISATION). LA COMPARAISON DES RESULTATS MONTRE UNE BONNE CORRELATION (FIGURE 8 – COEFFICIENT DE CORRELATION $R^2 = 0.847$; $P < 0,001$)

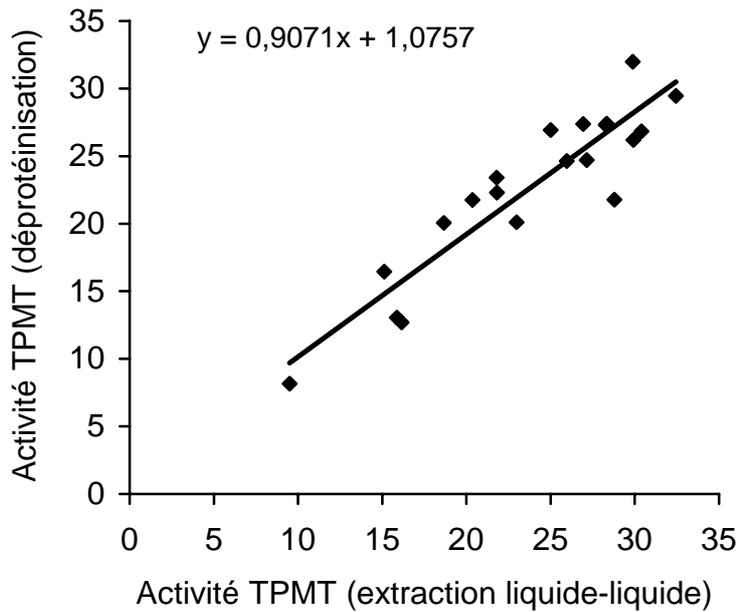


Figure 8 : Corrélation de l'activité TPMT mesurée par 2 méthodes différentes.

II - MESURE DES METABOLITES DE LA 6-MERCAPTOPURINE

II.1 – Evolution technologique

Les premières méthodes publiées se sont attachées à doser les **6TGNs** (6-Thioguanine Nucléotides) : 6-thioguanosine mono-, di- et tri-phosphate. Le problème majeur auquel se sont heurtées les premières tentatives est l'absence d'étalons en vente dans le commerce. Certaines études ont séparé les 3 composés mono- di- et tri-phosphate. Mais ces techniques utilisent plusieurs étapes d'extraction associées à des chromatographies longues (Nelson et al, 1973 ; Tidd et Dedhar, 1978 ; Lavi et Holcenberg, 1985). D'autres méthodes dosent plus spécifiquement la 6-thioguanosine monophosphate (Dooley et Maddocks, 1982 ; Zimm et Strong, 1987). Mais, du fait des interconversions des nucléotides phosphates à l'intérieur des globules rouges, cette mesure ne reflète pas le véritable potentiel cytotoxique des métabolites actifs intracellulaires (Kong et Parks, 1975 ; Dooley et Maddocks, 1982 ; Lavi et Holcenberg, 1985). Lennard et Maddocks (1983) ont utilisé une méthode basée sur la purification partielle des thionucléotides intracellulaires suivie de l'hydrolyse en thiopurine parent, avec extraction spécifique du complexe thiopurine et mesure par fluorescence de la thiopurine oxydée.

En 1987, Lennard et al ont publié une nouvelle technique basée sur l'hydrolyse en milieu acide des 6-TGNs. La conversion des 6-TGNs en 6-thioguanine libre est complète. La thioguanine ainsi libérée est ensuite mesurée par chromatographie en phase liquide avec détection UV, après formation d'un complexe phénylmercurique en présence d'acétate phénylmercurique (PMA) en milieu alcalin, réextrait en milieu acide (Lennard, 1987). La gamme d'étalonnage est réalisée avec de la 6-thioguanine. Au cours de l'hydrolyse acide, l'acide 6-thioinosique (6-TIA), autre métabolite de la 6-mercaptopurine est transformé en 6-mercaptopurine qu'il est possible de mesurer au cours de la même analyse chromatographique.

Par la suite les auteurs ont identifié un composé « inconnu » qui apparaissait sur le chromatogramme des patients traités par 6-MP, comme étant un **6-méthylmercaptopurine métabolite** (Lennard et Singleton, 1992). Celui-ci peut être dosé en utilisant la même technique d'extraction et de chromatographie que pour les TGNs, la gamme d'étalonnage étant réalisée par surcharge du culot globulaire avec de la 6-mercaptopurine (6-MMP). Le composé mesuré chez les patients traités par 6-MP n'est pas la 6-MMP elle-même car, n'ayant pas de groupement thiol libre, cette molécule ne forme pas de complexe avec le PMA. Ce composé n'est pas extrait en l'absence de chauffage ou en l'absence de PMA : il forme donc un complexe avec le PMA. Lennard et Singleton (1992) émettent l'hypothèse que la phase de chauffage modifie la molécule dosée de façon à ce qu'ensuite il se forme un complexe avec le PMA. Giverhaug et al (1997) nomment ce composé une « substance MMP-like ». Ces auteurs détaillent le métabolisme de la 6-MP et concluent que cette technique permet de mesurer la somme de la 6-MMP libre, les dérivés 6-MMP du ribonucléoside et du déoxyribonucléoside et des 6-MMP-nucléotides. Mais, comme ni la 6-MMP libre, ni les 6-MMP ribonucléosides n'ont été retrouvés dans les lysats de globules rouges, ces mêmes auteurs postulent que les méthylmercaptopurine-métabolites existent essentiellement sous forme de ribonucléotides dans les érythrocytes. Parmi ces composés, le méthylthioinosine monophosphate (MeTIMP) est un puissant inhibiteur de la phosphoribosylpyrophosphate amidotransférase, la première enzyme de la synthèse *de novo* des purines. C'est ce composé qui est mesuré sous le nom de méthylmercaptopurine nucléotide. Ce produit, en inhibant la synthèse *de novo* des purines, serait donc un métabolite actif qu'il est important de mesurer chez les patients traités par 6-MP.

Cette méthode (Lennard et Singleton 1992) considérée comme technique de référence, permet donc de mesurer les 6-TGNs et les méthylmercaptopurines nucléotides. C'est celle que nous utilisons au laboratoire. La seule modification introduite est l'ajout d'un étalon interne.

II.2 – Description de la technique (Annexe 3)

II.2.1 – Prélèvement et prétraitement de l'échantillon

Le prélèvement est réalisé sur un tube hépariné de 3 ml. Il est acheminé rapidement au laboratoire : les métabolites méthylés sont stables au moins deux jours à température ambiante (Lennard et Singleton, 1992 ; Giverhaug et al, 1997). Mais pour les 6-TGNs, on observe une diminution de 2 à 4 % par jour pendant 6 jours à température ambiante (Pike et al, 2001). Donc les prélèvements doivent être traités le plus rapidement possible. Pour le protocole « leucémie de l'enfant », la prise du médicament est éloignée du moment du prélèvement. Celle-ci a lieu soit la veille, soit après le prélèvement.

Le prétraitement consiste en 2 lavages successifs des globules rouges (GR) avec du chlorure de sodium 9 %, après avoir retiré le plasma. Après élimination du dernier liquide de lavage, des aliquots du culot globulaire sont congelés à -80°C en vue du dosage des métabolites de la 6-MP. Une numération globulaire de ce même culot est effectuée, car le résultat est exprimé en $\text{pmol}/8.10^8$ GR. Dans le lysat de globules rouges à -80°C , les métabolites méthylés sont stables pendant au moins 6 mois, mais la quantité de 6-TGNs a diminué de 6% au bout de 2 mois et 12% au bout de 6 mois (Pike et al, 2001).

II.2.2 – Gamme d'étalonnage

La gamme d'étalonnage est réalisée par surcharge de 6-TG et de 6-MMP dans un culot de globules rouges à des concentrations variant de 0 à 500 ng/100 μl de culot globulaire pour la 6-TG et de 0 à 1500 ng/100 μl de culot pour la 6-MMP. Pour les patients, la prise d'essai est de 100 μl de culot globulaire. Dans chaque tube, sont ajoutés du dithiotréitol pour éviter l'oxydation du groupement thiol de la 6-TG, et de l'acide sulfurique 1,5 M. Les tubes sont ensuite déposés dans un bloc chauffant à 100°C pendant 1 heure 30.

Les solutions mères de 6-TG et de 6-MMP sont préparées dans de l'eau distillée en ajoutant un peu de soude pour améliorer la dissolution et un peu de dithiotréitol. Elles sont stables pendant 6 mois à -20°C .

II.2.3 – Extraction

Avant le début de l'extraction, un étalon interne est ajouté à tous les tubes. Le composé choisi est aussi une thiopurine avec un groupement thiol libre, nécessaire à la formation d'un complexe avec le PMA lors de l'extraction : la 4-mercapto-1H-pyrazolo-(3,4-D)-pyrimidine (Figure 9).

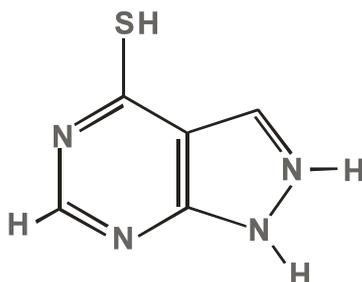


Figure 9 : Structure chimique de la 4-mercapto-1H-pyrazolo-(3,4-D)-pyrimidine.

En présence de soude et après addition de toluène contenant de l'acétate phénylmercurique (PMA), il y a formation d'un complexe de Lewis entre le mercure (Hg^{2+}) et le soufre du groupement thiol libre des thiopurines. La formation de ce complexe est maximum à un pH de 11,6 pour les 6-MMP-nucléotides. L'influence du pH sur la formation du complexe avec la 6-TG est beaucoup moins importante. Celle-ci est maximum pour un pH voisin de 12,0. Un pH de 11,6 est choisi pour extraire les 2 métabolites. La quantité de soude ajoutée est fonction du pH souhaité.

Une réextraction de cette phase organique avec de l'acide chlorhydrique 0,1N scinde les complexes et libère les thiopurines dans la phase acide. La 6-MP et la 6-TG extraites sont stables dans l'acide chlorhydrique 0,1N pendant plus de 7 jours à 4°C et plus de 36 heures à température ambiante (Lennard, 1987). Cette phase acide est injectée directement en chromatographie.

II.2.4 – Chromatographie

La colonne est une Symmetry C18 5 μ 250x4,6 mm (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

La phase mobile est constituée de méthanol et d'eau distillée (15/85 ; v/v) avec addition de dithiothréitol à la concentration de 0,2 g/L puis ajustement du pH à 3,2 avec de l'acide *o*-phosphorique 10%. La phase mobile est filtrée avant utilisation. Son débit est de 1 mL/mn.

Les temps de rétention sont de 4,3 min pour la 6-TG 4,9 min pour la 6-MP, 6,9 min pour le méthylmercaptopurine métabolite, 11,1min pour l'étalon interne et 16,0 min pour le DTT.

La détection est réalisée en UV avec changement de longueur d'ordre en cours de chromatogramme : $\lambda = 342$ nm de 0 à 5,5 min et $\lambda = 303$ nm de 5,5 à 18 minutes.

L'annexe 3 présente le chromatogramme des points de la gamme 250 ng/100 μ L de lysat de globules rouges pour les TGNs et 1000 ng/100 μ L de lysat pour les dérivés méthylés.

II.2.5 – Calcul du résultat

Le résultat final est exprimé en pmol/8.10⁸ GR pour les 2 métabolites. Pour la chromatographie, l'étalonnage est en ng/100 μ L de culot globulaire. Le calcul tient compte de la

transformation des ng en pmol et du nombre de globules rouges compris dans 100µL de culot globulaire (Poids Moléculaire de la 6-TG = 167,2 ; de la 6-MMP = 166,2).

II.3 – Validation de la technique

II.3.1 – Validation des TGNs

La linéarité a été étudiée de 0 à 500 ng/100 µL de lysat de globule rouges. Elle est satisfaisante avec une équation de la droite de régression composite $y = 289,8 \cdot x$ (y = concentration en TGNs, x = rapport de surfaces du pic de TGNs / pic d'étalon interne) pour des analyses 6 jours différents. Le coefficient de variation de la pente de la droite est de 4,6 %, ce qui assure une homogénéité des résultats. Le coefficient de corrélation r moyen est de 0,998 ($n = 6$) avec un coefficient de variation $CV = 0,4$ %.

La précision a été étudiée par surcharge de 6-TG dans du lysat de globules rouges. Trois concentrations différentes ont été étudiées : 50, 150 et 300 ng/100 µL de GR. Pour l'étude de la reproductibilité intra-jour, nous avons analysé, dans une même série, 6 échantillons surchargés à la même concentration. La reproductibilité interjours a été mesurée sur 6 échantillons d'une même concentration dans 6 séries différentes, sur une période de deux semaines. La méthode montre une bonne précision avec des coefficients de variation qui varient de 7,7 à 8,2% et de 6,9 à 9,6% respectivement pour la reproductibilité intrajour et interjours (Tableau III).

Tableau III : Précision de la méthode de dosage des 6-TGNs

Concentration en 6-TGNs d'un lysat surchargé (ng/100 µl de culot globulaire) (moyenne ± écart type)	CV (%)
<u>Reproductibilité intrajour (n=6)</u>	
50 ± 4,1	8,2
160 ± 12,9	8,1
310 ± 24,0	7,7
<u>Reproductibilité interjours (n=6)</u>	
54 ± 5,2	9,6
161 ± 11,2	6,9
306 ± 23,3	7,6

Le pourcentage de récupération est de 61,6 62,1 et 63,4% respectivement pour les concentrations 50, 150 et 300 ng/100µL de lysat de GR. La limite de détection correspondant à une concentration qui produit une surface de pic environ égale à 3 fois le bruit de fond est de 2 ng/100µL de lysat de GR. La limite de quantification définie comme la plus faible concentration analysée avec une exactitude et une précision acceptables (erreur moyenne $\leq 10\%$, $CV \leq 10\%$) est de 5 ng/100µL de lysat de GR.

La stabilité de la solution étalon de 6-thioguanine à -20°C est de 6 mois.

Un contrôle de qualité est préparé par surcharge de lysat d'érythrocytes à la concentration de 100 ng/100µl de lysat de GR. La valeur moyenne retrouvée après analyse est de 98,4 ng/100µl avec un coefficient de variation interséries de 8,0% (n = 10).

II.3.2 – Validation des dérivés méthylés

La linéarité, étudiée de 0 à 1500 ng/100µl de lysat de globules rouges, est satisfaisante avec une équation de la droite de régression composite $y = 668.x$ (y = concentration en MeMPs, x = rapport de surfaces du pic de MeMPs/pic de l'étalon interne). Le coefficient de variation de la pente de la droite est de 11,1%. Le coefficient de corrélation r moyen est de 0,995 (n = 6) avec un coefficient de variation CV = 0,7%.

La précision a été étudiée par surcharge de 6-MMP sur du lysat de globules rouges aux concentrations de 250, 750 et 1250 ng/100µL de lysat (Tableau IV). La reproductibilité montre des coefficients de variation qui varient de 4,9 à 8,7% et de 4,4 à 5,7% respectivement pour l'étude intrajour et interjours (Tableau IV).

Le pourcentage de récupération n'a pas pu être testé puisque nous ne disposons pas du composé mesuré, celui-ci se forme au cours de l'hydrolyse acide. La limite de détection est de 5 ng/100µl de lysat de GR et la limite de quantification 10 ng/100µl.

Un contrôle de qualité préparé par surcharge de lysat d'érythrocytes à la concentration de 750 ng/100µl montre un résultat moyen de 716 ng/100µl avec un coefficient de variation de 10,9% (n = 10).

Tableau IV : Précision de la méthode de dosage des méthylmercaptapurines nucléotides (MeMPs)

Concentration en MeMPs d'un lysat surchargé (ng/100 µl de culot globulaire) (moyenne ± écart type)	CV (%)
<u>Reproductibilité intrajour (n=6)</u>	
247 ± 21,4	8,7
719 ± 35,4	4,9
1173 ± 87,1	7,4
<i>Reproductibilité interjours (n=6)</i>	
240 ± 13,7	5,7
739 ± 36,4	4,9
1241 ± 54,7	4,4

III – DETERMINATION DU GENOTYPE DE LA TPMT

III.1 – Introduction

Pour déterminer le génotype de la TPMT, le séquençage du gène serait trop long et trop coûteux. Aussi seules les mutations les plus fréquentes dans une population Caucasienne sont recherchées : la mutation G238C au niveau de l'exon 5, G460A au niveau de l'exon 7 et A719G au niveau de l'exon 10. Ceci nous permet de détecter les génotypes (homozygotes ou hétérozygotes)*3A (mutations à la fois sur l'exon 7 et 10), *3B (mutation sur l'exon 7), *3C (mutation sur l'exon 10), *2 (mutation sur l'exon 5). Ces mutations représentent 95% des mutations liées à un déficit en activité TPMT.

Dans la littérature, plusieurs techniques ont été utilisées :

- Polymerase Chain Reaction - Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP)
(Spire-Vayron de la Moureyre et al, 1998b)

- Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) et PCR-allèle spécifique (Yates et al, 1997).

Deux techniques différentes ont été utilisées lors de nos travaux :

- Les génotypes de la population de référence d'adultes et d'enfants ont été réalisés à l'Hôpital Robert Debré à Paris (service de Pharmacologie) par une technique de PCR-Reverse Dot Blot.

- Les génotypes des patients suivis pour une leucémie ont été réalisés à Nantes (service de Génétique Moléculaire) par séquençage précédé d'une PCR.

III.2 – Méthode PCR-Reverse Dot Blot

III.2.1 – Extraction de l'ADN (Annexe 4)

Le prélèvement sanguin est réalisé sur un tube EDTA, l'héparine inhibant la PCR.

L'extraction de l'ADN est réalisée en 2 temps :

- La première étape consiste en une lyse différentielle des globules rouges qui permet d'isoler un culot de globules blancs. Cette lyse est obtenue grâce à un tampon à base de carbonate d'ammonium en laissant les tubes à 4°C (dans la glace pilée). Le principe utilisé est la production de CO₂ gazeux à partir du carbonate, réaction catalysée par l'anhydrase carbonique érythrocytaire.

- La seconde étape est la lyse des leucocytes à l'aide d'un tampon de lyse constitué de chlorure de potassium 1M, Tris HCl 1M à pH = 8, chlorure de magnésium hexahydraté 1M, Igepal CA-630, Tween 20, eau distillée. Après mise en suspension du culot de globules blancs dans 2ml de ce tampon, une enzyme, la protéinase K, dont la température d'activité maximum est de 56°C, est ajoutée. Après incubation pendant 1 heure à 56°C, la protéinase K est inactivée par passage à 100°C pendant 15 minutes. Les tubes sont congelés à -80°C après refroidissement.

III.2.2 – Amplification de l'ADN ou PCR (Polymerase Chain Reaction)

III.2.2.1 – Principe général de la PCR

La technique d'amplification génique *in vitro* ou *polymerase chain reaction* (PCR) permet d'amplifier de façon exceptionnelle une séquence d'acide nucléique à étudier.

Elle repose sur l'action d'une ADN-polymérase thermostable (*Taq*-polymérase) qui synthétise le brin complémentaire d'une séquence d'acide nucléique par élongation d'une amorce. L'élongation se fait toujours dans le sens 5'-3', par incorporation de déoxynucléotides libres (dNTP = dATP + dCTP + dGTP + dTTP). L'ADN étant double brin, deux amorces seront utilisées, une par brin. Les amorces sont des oligonucléotides (simple brin) de 20 à 30 bases s'hybridant parfaitement avec les extrémités 3' de la portion de séquence à amplifier.

Les réactifs nécessaires à la PCR (matrice, amorces, DNTP, tampon PCR, *Taq* polymérase) sont déposés dans un tube et soumis à des variations cycliques de température dans un « thermocycler ». La PCR commence par une dénaturation prolongée (5 min à 94-96°C) qui sépare les brins d'ADN génomique et les rend accessibles aux amorces. Ensuite commence les cycles qui comprennent 3 étapes :

1. Dénaturation : 10 s à 1 min à 94-96°C
2. Hybridation des amorces : 10 s à 1 min à la température d'hybridation de l'ADN (T_m) (la T_m dépend de la séquence des amorces, plus les amorces sont longues et riche en GC, plus la T_m est élevée).
3. Elongation : 0 s à 1 min à 65-72°C (Cette étape peut être supprimée lorsque la séquence à amplifier fait moins de 500 pb, en effet, la *Taq*-polymérase a le temps d'agir lors de la transition de température hybridation-dénaturation).

Le nombre de cycle varie entre 25 et 45 selon la sensibilité désirée.

Les produits amplifiés seront ensuite analysés selon différentes techniques.

III.2.2.2 – Description des amorces :

- Exon 5 :

L'exon 5 du gène TPMT est en position 341 à 473 de l'ADN. La mutation recherchée est en position 238 de l'ARN messager (mARN) et en position 345 de l'ADN. A cette position, l'allèle normal comporte une Guanine (G) alors que l'allèle muté comporte une Cytosine (C).

Toutes les amorces sont biotinylées en 5', la biotine (B) étant nécessaire à l'étape de Reverse Dot Blot.

Amorce Forward : 23 nucléotides 5'B - GCTTACTCTAATATAACCCTCTA-3'

Amorce Reward : 22 nucléotides 5'B - CTTTTGTGGGGATATGGATAACA-3'

Taille du fragment amplifié : 253 paires de bases.

Séquence de l'allèle normal non muté :

01 AAATTGAAAG CATTCTTCT AGTCAAATCA ATTGGTATTA AATCAGTATT TTGTTATATA
61 TCTATAATAA CATTCCCAAC TGTTTCATAA CATAAAAAA GATATATATA ATTTTCCCAA
121 ATTTTATTG TTTCTGAAT TCATATAAGT CAGTTTTTCA GAATTTTAT AAGGTTTGAA
181 AATAATATAG ATCTGCTTTC CTGCATGTTT TTTGAAACCC TATGAACCTG AATTCATATA
241 AATTCCTCTA AATTAAGAA AATATAT **GCT TACTCTAATA TAACCCTCTA** TTTAGTCATT
301 TGAAAACATA ATTTAAGTGT AAATGTATGA TTTTATGCAG GTTTGCAGAC CGGGGACACA
361 GTGTAGTTGG TGTGGAAATC AGTGAACCTG GGATAACAAGA ATTTTACAGAGCAGAAATC
421 TTTCTTACTC AGAAGAACCA ATCACCAGAA TTCCTGGAAC CAAAGTATTT AAGGTTTGTT
481 TTGATTTGGG TAAATAATTG **TATCCATATC CCCACAAAAG** TTTTCTCAG TGTGAGTATT
541 ATGAGGATAC CATTTCATGTG TCCGATGGTT CCTATTTAGC ACGCAGATTC ACTGTAGATA

- Exon 7 :

L'exon 7 est en position 341 à 473 de l'ADN. La mutation recherchée est en position 460 du mARN et en position 1208 de l'ADN. A cette position, l'allèle normal comporte une Guanine (G) et l'allèle muté une Adénine (A).

Amorce Forward : 21 nucléotides : 5'B - CGATTGTTGAAGTACCAGCAT-3'

Amorce Reward : 23 nucléotides : 5'B - CTAGAACCCAGAAAAAGTATAGT-3'

Taille du fragment amplifié : 242 de paires de bases.

Séquence de l'allèle normal non muté :

661 TTTGAATGTC TGTTCTGCAG ATATTTTTAT TACACACTCG TCTGCACACT TTAATGTGTT
721 TTGTCTTTGG TTAGCTCCCA AACTATGGGA AACTGAGGCA GCTAGGGAAA AAGAAAGGTG
781 AGTAAGACAG TGTCTTCTAC CTTGCACCTG GGCCTGTAAT AGAAATGAAT TTCAAGTAGC
841 CAAGGGAGAT AAGAGCTCAT CTCCTGAAAG TCCCTGATAC CTGAGCCAGA GCTGGGGGC
901 AGAGTTGTTG CACACTGTCC TTTGTTCTT CTTCATGTCC CCAAATCATA ACAGAGTGGG
961 GAGGCTGCTG CCACAGGCTC CTAAAACCAT GAGGGGATGG ACAGCTCTCC ACACCCAGGT
1021 CCACACATTC CTCTAGGAGG AAACGCAGAC GTGAGATCCT AATACCTTGA **GATTGTTGA**
1081 **AGTACCAGCA** TGCACCATGG GGGACGCTGC TCATCTTCTT AAAGATTGTA TTTTCTCCC
1141 AATAAATGTT TTTTCTCTT CTGGTAGGAC AAATATTGGC AAATTTGACA TGATTGGGA
1201 TAGAGGAGCA TTAGTTGCCA TTAATCCAGG TGATCGCAA TGGTAAGTAA TTTTCTTTT
1261 TTTGTTTAGC TGTCTTAATT TTTTAGTATA **CTATACTTTT TCTGGGTTCT** AGAAAAATCAG
1321 CTTAGACTTC TATGAGTTTG AAATAGGTTA TTATGTTTGG AATTTATAAA AACCTAAATC

- Exon 10 :

L'exon 10 est en position 593 – 2662 de l'ADN. La mutation recherchée est en position 719 du mARN et en position 686 de l'ADN. A cette position, l'allèle normal comporte une Adénine (A) et l'allèle muté une Guanine (G).

Amorce Forward : 23 nucléotides : 5'B – AATCCCTGATGTCATTCTTCATA-3'

Amorce Reward : 23 nucléotides : 5'B – TTCAATTCCTCAAAAACATGTCA-3'

Taille du fragment amplifié : 219 paires de bases

Séquence de l'allèle normal non muté :

361 GCATGTGCCA CCATACCCAG CTCATTTTGT ATTTTAGTA GAGACAGAGT TTCACCATCT

421 TGGCCAGGCT GGTCATGAAC TCCTGACCTC AAGTGATCCA CCTGCCTCGG CCTCCCAAAG
481 TGTTGGGATT ACAGGTGTGA GCCACCGCAC CCAGCCAATT TTGAGTATTT TAAAAAG AAT
541 CCCTGATGTC ATTCTTCATA GTATTTTAAAC ATGTTACTCT TTCTTGTTTC AGGTAATA
601 TGCAATATAC GTTGTCTTGA GAAGGTTGAT GCTTTTGAAG AACGACATAA AAGTTGGGGA
661 ATTGACTGTC TTTTGGAAAA GTTATACTCTA CTTACAGAAA AGTAAATGAG ACATAGATAA
721 AATAAAATCA CACTGACATG TTTTGGAGGA ATTGAA AATT ATGCTAAAGC CTGAAAATGT
781 AATGGATGAA TTTTAAAAAT TGTTTATAAA TCATATGATA GATCTTACT AAAAAATGGCT
841 TTTTAGTAAA GCCATTTACT TTTTCTAAAA AAGTTTTAGA AGAAAAAGAT GTAACATAAC

III.2.2.3 – PCR (Annexe 4):

- Préparation :

La réaction d'amplification est réalisée dans un volume total de 50µl en présence de 100 ng d'ADN, 0,2 µM de chaque amorce, 0,1 mM de chaque dNTP, 0,01 mM de Tris HCl pH 7,5, 0,05mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 0,025 µl de Tween 20, 0,08 U de Taq DNA polymérase.

- Programmation de température :

La PCR est réalisée à l'aide d'un thermocycleur (Applied Biosystems 9007, Les Ulis, France). Après une phase de dénaturation prolongée à 95°C pendant 5 minutes et une hybridation à 55°C pendant 2 minutes, elle se poursuit par une série de 30 cycles comportant 3 étapes : dénaturation 30 s à 95°C, hybridation des amorces 30 s à 55°C, élongation ou synthèse du brin complémentaire par l'ADN-polymérase 30 s à 72°C. Elle se termine par une élongation finale de 2 mn à 72°C.

III.2.3 – Electrophorèse

L'intensité de l'amplification est vérifiée par une électrophorèse en gel d'agarose à 3%. 5 µl de produits de PCR sont mélangés à 3 µl de « bleu » (bleu de bromophénol 25 mg, cyanoxylène 25 mg, Ficoll 400 1,5 g, eau désionisée qsp 10 ml) avant d'être déposés dans les puits du gel. Au début de chaque rangée, un marqueur de taille (nombre de bases connu) est déposé, permettant de vérifier la taille du fragment amplifié. La migration s'effectue pendant 30 mn sous une tension de 150 V.

III.2.4 – Reverse Dot Blot

III.2.4.1 – Principe général (Figure 10)

La technique de Reverse Dot Blot utilise une membrane porteuse d'allèles spécifiques (ASO = Allèles Spécifiques Oligonucléotides), allèle hybridant spécifiquement avec leur séquence complémentaire si celle-ci est présente dans un produit de PCR. Ainsi, de nombreux ASO préalablement préparés peuvent être fixés sur une membrane de nylon et être hybridés avec un produit d'amplification.

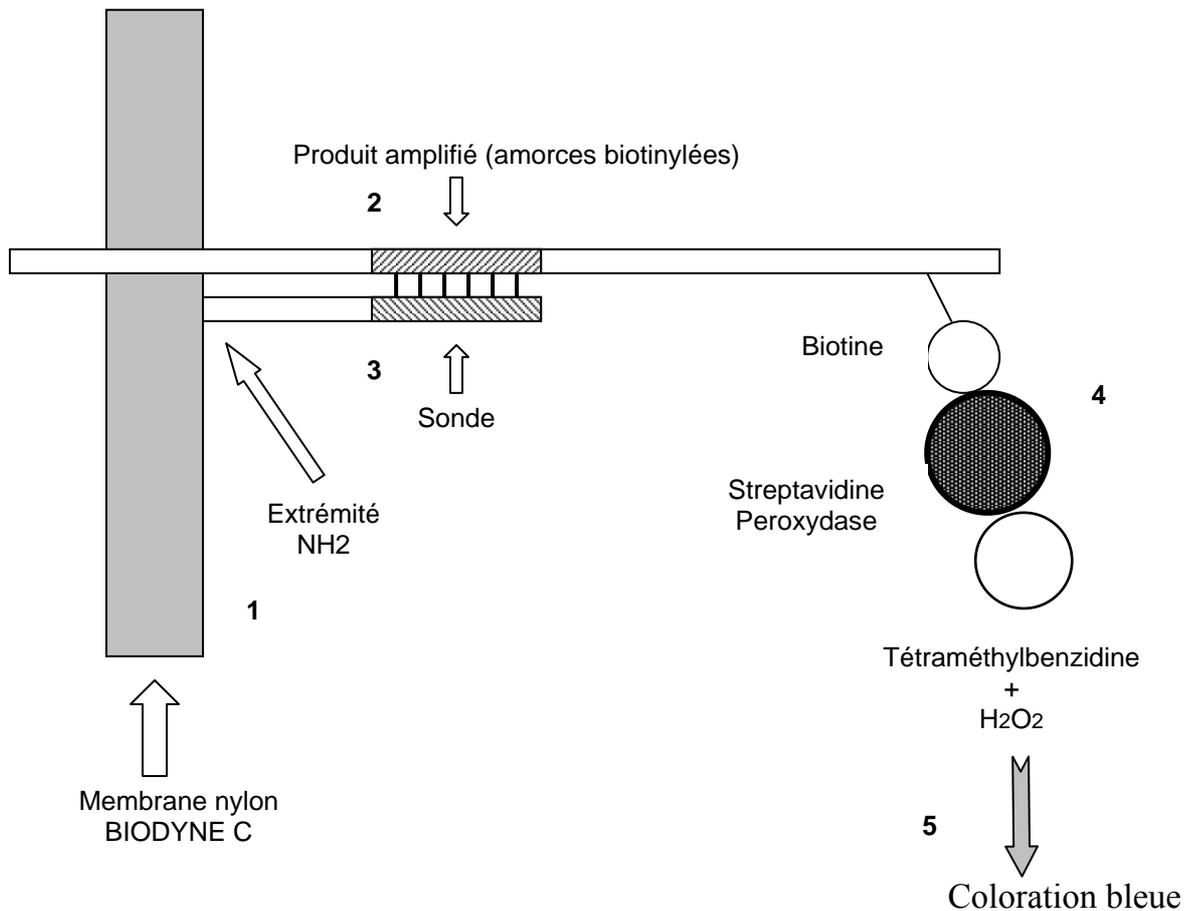


Figure 10 : Schéma de la technique du Reverse Dot Blot indiquant les différentes étapes :

1. Dépôt des sondes sur les membranes,
2. Dépôt des produits de PCR,
3. Hybridation entre la sonde et le produit amplifié,
4. Fixation du conjugué streptavidine-peroxydase
5. Coloration après addition du substrat chromogène.

Les amorces biotinylées que nous avons utilisées lors de la PCR permettent la fixation de la streptavidine, laquelle est conjuguée à une peroxydase. Après lavage, pour enlever l'excédent de conjugué, on effectue la révélation en faisant agir un substrat chromogène (tétraméthylbenzidine en milieu citrate et présence d'eau oxygénée (H₂O₂)) qui développe rapidement une coloration bleue.

III.2.4.2 – Description des sondes

Exon 5 :

Sonde pour l'allèle non muté, aminée à l'extrémité 5' : 18 nucléotides

5'NH₂-TATGCAGGTTTGCAGACC-3'

Séquence de l'allèle normal non muté :

241 AATTCCTCTA AATTAAAGAA AATATAT GCT TACTCTAATA TAACCCTCTA TTTAGTCATT
301 TGAAAACATA ATTTAAGTGT AAATGTATGA TTTTTATGCAG GTTTGCAGAC CGGGGACACA
361 GTGTAGTTGG TGTGGAAATC AGTGAACCTG GGATACAAGA ATTTTTTACA GAGCAGAATC

Sonde pour l'allèle muté, aminée à l'extrémité 5' : 18 nucléotides

5'NH₂-GGTCTGGAAACCTGCATA 3'

Séquence de l'allèle muté :

241 AATTCCTCTA AATTAAAGAA AATATAT GCT TACTCTAATA TAACCCTCTA TTTAGTCATT
301 TGAAAACATA ATTTAAGTGT AAATGTATGA TTTTTATGCAG GTTTCCAGAC CGGGGACACA
361 GTGTAGTTGG TGTGGAAATC AGTGAACCTG GGATACAAGA ATTTTTTACA GAGCAGAATC

Exon 7 :

Sonde pour l'allèle normal, aminée à l'extrémité 5' : 18 nucléotides

5'NH₂-ACTAATGCTCCTCTATCC-3'

Séquence de l'allèle normal non muté :

1081 AGTACCAGCA TGCACCATGG GGGACGCTGC TCATCTTCTT AAAGATTTGA TTTTCTCCC
1141 ATAAAATGTT TTTTCTCTTT CTGGTAGGAC AAATATTGGC AAATTTGACA TGATTTGGGA
1201 TAGAGGAGCA TTAGTTGCCA TTAATCCAGG TGATCGCAA TGGTAAGTAA TTTTCTTTT
1261 TTTGTTTAGC TGTCTTAATT TTTTAGTATA CTATACTTTT TCTGGTTCT AGAAAATCAG

Sonde pour l'allèle muté, aminée à l'extrémité 5' : 18 nucléotides

5'NH₂-GATAGAGGAACATTAGTTG-3'

Séquence de l'allèle muté :

1081 AGTACCAGCA TGCACCATGG GGGACGCTGC TCATCTTCTT AAAGATTTGA TTTTCTCCC
1141 ATAAAATGTT TTTTCTCTTT CTGGTAGGAC AAATATTGGC AAATTTGACA TGATTTGGGA
1201 TAGAGGAACA TTAGTTGCCCA TTAATCCAGG TGATCGCAA TGGTAAGTAA TTTTCTTTT
1261 TTTGTTTAGC TGTCTTAATT TTTTAGTATA CTATACTTTT TCTGGTTCT AGAAAATCAG

Exon 10 :

Sonde pour l'allèle normal, aminée à l'extrémité 5' : 21 nucléotides

5'NH₂-GAAAAGTTATATCTACTTACA-3'

Séquence de l'allèle normal non muté :

601 TGCAATATAC GTTGTCTTGA GAAGTTGAT GCTTTTGAAG AACGACATAA AAGTTGGGGA
661 ATTGACTGTC TTTTGAAAA GTTATATCTA CTTACAGAAA AGTAAATGAG ACATAGATAA
721 AATAAAATCA CACTGACATG TTTTGGAGGA ATTGAA AATT ATGCTAAAGC CTGAAAATGT

Sonde pour l'allèle muté, aminée à l'extrémité 5' : 21 nucléotides

5'NH₂-GTAAGTAGACATAACTTTTCA-3'

Séquence de l'allèle muté :

601 TGCAATATAC GTTGTCTTGA GAAGGTTGAT GCTTTTGAAG AACGACATAA AAGTTGGGGA
661 ATTGACTGTC TTTTTGAAAA GTTATGTCTA CTTACGAGAAA AGTAAATGAG ACATAGATAA
721 AATAAAATCA CACTGACATG TTTTGGAGGA ATTGAA AATT ATGCTAAAGC CTGAAAATGT

III.2.4.3 – Préparation des membranes et des réactifs

La préparation des membranes s'effectue en 2 étapes (Annexe 5). Après activation de la membrane, les sondes sont déposées, la sonde normale dans la partie supérieure et la sonde mutée dans la partie inférieure de la membrane.

III.2.4.4 – Reverse Dot Blot (Annexe 5)

- Hybridation :

Les membranes sont déposées individuellement dans des tubes en polypropylène de 15 ml puis sont recouverts de tampon 2SSC 0,1 % SDS. Les produits de PCR sont ajoutés dans chaque tube. Une dénaturation des produits d'amplification est réalisée par incubation à 100 °C pendant 10 mn. L'hybridation est réalisée par une seconde incubation à 42 °C pour les exons 7 et 10 et à 46 °C pour l'exon 5, pendant 1 heure.

- Lavage :

A l'aide d'une pince, les membranes sont transférées dans une solution de lavage (0,75 SSC 0,1 % SDS) préalablement chauffée à 46 ou 42 °C selon l'exon étudié.

- Coloration :

Après aspiration de la solution de lavage, les membranes sont incubées dans un tampon 2SSC 0,1% SDS contenant le conjugué Streptavidine-Peroxydase. Suivent 4 lavages dans un tampon 2SSC 0,1% SDS et 4 lavages en tampon citrate de sodium 0,1 M pH = 5,0. La dernière étape est l'addition du substrat chromogène (tétraméthylbenzidine et eau oxygénée, dans le tampon citrate). Après agitation douce, il faut sortir les membranes pour les faire sécher dès que les spots bleus sont bien visibles.

- Interprétation des résultats :

Sujet homozygote non muté : 1 seul spot bleu visible placé dans la partie supérieure de la membrane.

Sujet hétérozygote porteur de la mutation recherchée : 2 spots sont visibles, un dans la partie supérieure, un dans la partie inférieure de la membrane. Les spots sont d'intensité sensiblement égale ou avec un déséquilibre préférentiel pour la sonde mutée (partie inférieure).

Sujet homozygote muté : un seul spot dans la partie inférieure de la membrane.

Des contrôles sont ajoutés à chaque série : « un blanc PCR » pour vérifier l'absence de contamination lors de la PCR, un « blanc Reverse Dot Blot » pour vérifier l'absence de contamination lors du Reverse Dot Blot, trois échantillons de contrôles : un homozygote non muté, un hétérozygote muté et un homozygote muté.

L'annexe 6 présente la feuille de résultats d'une série réalisée pour la recherche de la mutation au niveau de l'exon 10. Dans cette série, les quatre premiers résultats sont ceux des contrôles. Les échantillons n° 15, 22, 28, 32, 34 et 39 sont hétérozygotes mutés (2 spots). Aucun échantillon n'est homozygote muté.

III.3 – Méthode par séquençage

Le produit de PCR est préalablement purifié à l'aide d'une colonne d'affinité afin que soient éliminés les nucléotides et les amorces non incorporées qui perturberaient la lecture finale de la séquence en créant des artéfacts et qui gêneraient l'enzyme utilisée pour le séquençage.

Lors du séquençage, l'ADN amplifié est mis en présence de déoxynucléotides non fluorescents (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), de didéoxynucléotides fluorescents (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP), d'une amorce et d'une ADN-polymérase qui est l'enzyme responsable de l'élongation de l'ADN. Cette réaction est réalisée sur les brins sens et antisens de l'ADN en utilisant les mêmes amorces que pour la PCR initiale mais dans deux tubes différents, ceci afin de confirmer d'éventuelles ambiguïtés de séquence dues à la technique.

L'élongation est effective avec les déoxynucléotides tandis qu'elle est interrompue lors de l'incorporation de didéoxynucléotide fluorescent.

La fluorescence, différente pour chaque type de didéoxynucléotide, et la différence de taille de chaque produit d'élongation vont permettre d'identifier par migration sur séquenceur automatique la dernière base utilisée pour l'élongation. Une série de pics de différentes couleurs est ainsi obtenue qui représente la séquence de l'ADN.

Les changements de bases se produisant lors des mutations TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B, TPMT*3C seront alors mis en évidence en comparant la séquence obtenue avec une séquence de référence.

Cette méthode par séquençage a été appliquée aux génotypes effectués chez les patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique, alors que la technique de PCR-Reverse dot blot a été utilisée pour l'étude de la TPMT au sein d'une population Française caucasienne de référence, composée d'adultes et d'enfants.

PARTIE III

ETUDE DE LA THIOPURINE METHYLTRANSFERASE DANS UNE POPULATION FRANCAISE CAUCASIENNE

I – INTRODUCTION

I.1 – Objectifs de l'étude

Les objectifs de l'étude étaient de répondre aux questions suivantes :

- Mesure du phénotype de la TPMT dans une population française caucasienne d'adultes et d'enfants de la naissance à 15 ans :

L'activité TPMT est-elle mature dès la naissance ou un délai de quelques mois à quelques années est-il nécessaire pour atteindre chez l'enfant des activités TPMT similaires à celles de l'adulte ?

- Détermination du génotype de la TPMT dans cette même population :
Quelles sont les mutations les plus fréquentes ? Quelle est la fréquence d'apparition des allèles mutés ?

- Etude de la corrélation phénotype-génotype au sein de cette population :
Le génotype est-il toujours prédictif du phénotype (et *vice-versa*) ? Existe-t-il un antimode permettant la classification des individus en méthyleur intermédiaire ou méthyleur rapide, ou au contraire, existe-t-il une zone de chevauchement entre les activités intermédiaires et élevées ?

I.2 – Réalisation pratique : Obtention des prélèvements sanguins

I.2.1 – Adultes

Grâce à l'Etablissement Français du Sang (EFS) de Nantes, nous avons obtenu des échantillons sanguins prélevés chez des donneurs à l'occasion d'un don de sang.

Avant le prélèvement, un « formulaire d'information » et un « consentement éclairé à la pratique des tests génétiques » (Annexe 8) étaient remis à chaque donneur. Les consentements ont été signés par toutes les personnes incluses dans le protocole.

Un certain nombre de renseignements concernant le donneur ont aussi été recueillis et consignés dans un questionnaire (Annexe 8). Outre l'âge, le sexe et l'origine ethnique, certaines informations étaient destinées à une description socio-économique de la population (profession, consommation d'alcool, consommation de cigarettes). Les autres données recueillies étaient d'ordre médical (pathologies aiguës, chroniques ou génétiques, éventuels traitements médicamenteux, pathologies familiales).

La donnée « consommation d'alcool » n'a pas été exploitée. Un certain nombre de collectes de sang ayant été réalisé sur le lieu de travail, nous avons considéré qu'il existait un biais quant au recueil de cette information.

I.2.2 – Enfants

Les prélèvements ont été réalisés dans les services de Chirurgie Infantile du C.H.U. de Nantes et de l'Hôpital Robert Debré pour les enfants les plus jeunes.

De même que pour les adultes, un « formulaire d'information » et un « consentement éclairé à la pratique des tests génétiques » (Annexe 9) étaient remis aux parents. Le consentement a été signé par tous les parents des enfants inclus. Les enfants de 12 à 15 ans avaient aussi la possibilité de l'approuver par leur signature. Les informations recueillies dans le questionnaire (Annexe 9) étaient les mêmes que pour les adultes à l'exception des informations d'ordre socio-économiques.

Le prélèvement était ensuite effectué au bloc opératoire. Tous les enfants inclus dans le protocole étaient hospitalisés pour une intervention chirurgicale nécessitant une anesthésie générale. Le prélèvement était réalisé par les anesthésistes lors de la pose du cathéter. Aucune ponction veineuse supplémentaire n'était nécessaire par rapport à la pratique habituelle de l'anesthésie.

1.2.3 – Sang de cordon

Les sangs de cordon ont tous été prélevés à l'Hôpital Robert Debré.

De même que précédemment, un « formulaire d'information » et un « consentement à la pratique des tests génétiques » étaient présentés aux mères. Les consentements ont tous été signés pour les enfants inclus dans le protocole.

En plus du sexe et de l'origine ethnique de l'enfant, d'autres informations étaient recueillies : terme de la grossesse, prise de médicaments éventuelle chez la mère, poids, taille et périmètre crânien du bébé, score d'Apgar, antécédents génétiques.

1.2.4 – Inclusions

Aucune personne incluse dans le protocole n'était atteinte de maladie grave ou de maladie génétique.

1.2.5 – Nature du prélèvement

2 tubes de sang étaient prélevés par personne :

- 1 tube hépariné (3mL) destiné au phénotype de la TPMT (mesure de l'activité TPMT)
- 1 tube EDTA (3mL) destiné à la détermination du génotype de la TPMT.

Pour les enfants les plus jeunes, les volumes de sang pouvaient être réduits à 1,5 - 2mL par tube.

1.2.6 – Prétraitement des échantillons

Les tubes étaient acheminés au laboratoire dans la demi-journée. L'extraction de l'ADN et la préparation des lysats de globules rouges pour la mesure de l'activité TPMT étaient réalisées dans un délai inférieur à 24 heures après le prélèvement.

II – ONTOGENESE DES ENZYMES DU METABOLISME DES MEDICAMENTS

II.1 – Définition de l'ontogenèse

L'ontogenèse ou l'ontogénie est la science qui étudie la croissance et le développement des individus de l'œuf à l'âge adulte (Dictionnaire Hachette 1998).

Bien que le développement représente un *continuum* d'événements biologiques qui permettent l'adaptation, la croissance et la reproduction, son impact sur le métabolisme des médicaments dépend de l'acquisition d'activités enzymatiques spécifiques.

II.2 – Métabolisme des médicaments

La plupart des médicaments utilisés en thérapeutique sont des composés lipophiles dépendant de biotransformation en métabolites plus hydrosolubles pour mettre un terme à leur activité biologique et faciliter leur élimination de l'organisme.

Ces réactions sont catabolisées par des enzymes et considérées comme importantes car elles permettent l'élimination du médicament.

Les nombreuses réactions de biotransformation sont classées conventionnellement en 2 types : réactions de phase I et réactions de phase II qui généralement se produisent séquentiellement :

- Les réactions de phase I introduisent ou révèlent (par oxydation, réduction ou hydrolyse) un groupement fonctionnel du substrat qui sert de site pour les réactions de conjugaison (phase II).

- Les réactions de phase II sont des réactions de conjugaison avec des substrats endogènes (acétate, sulfate, acide glucuronique, glutathion, glycine...). Elles augmentent la polarité d'un intermédiaire métabolique et favorisent son excrétion rénale.

La variabilité interindividuelle de l'activité enzymatique, donc du métabolisme d'un médicament, est due à des réactions complexes entre des déterminants génétiques (génotype, sexe, race ou ethnie) et des facteurs environnementaux (régime alimentaire, maladie, médications ou exposition à d'autres xénobiotiques). Donc la voie métabolique empruntée et le niveau de biotransformation d'un composé donné sont fonction du phénotype unique de chaque individu. Chez l'enfant, il faut en plus tenir compte de l'impact du développement.

II.3 – Ontogenèse des enzymes du métabolisme des médicaments

III.3.1- Enzymes de phase I : Les cytochromes P450

Les cytochromes P450 (CYP) sont quantitativement les enzymes de phase I les plus importantes chez l'Homme. Ce sont des hémoprotéines qui catalysent le métabolisme de nombreuses substances lipophiles endogènes (stéroïdes, acides gras, vitamines liposolubles, prostaglandines, leucotriène et thromboxanes) et de composés exogènes (médicaments). La proportion d'homologie de leur séquence d'acides aminés permet leur classification en familles et sous-familles. Les CYP les plus importants au cours du métabolisme du médicament chez l'homme sont retrouvés de façon prédominante dans les familles CYP1, CYP2 et CYP3.

III.3.1.1 – CYP2D6

La variation génétique la mieux étudiée dans la réponse aux médicaments est le polymorphisme débrisoquine/spartéine. Il a été découvert à la suite d'accidents thérapeutiques survenant lors de l'utilisation de la débrisoquine chez des sujets adultes hypertendus. Le gène CYP2D6 est hautement polymorphique avec plus de 50 variants alléliques décrits à ce jour.

Le phénotype métaboliseur lent est retrouvé chez environ 5 à 10% de la population blanche et 1 à 2% de la population asiatique. Il en résulte un métabolisme déficient pour plus de 40 molécules incluant les β -bloquants, antiarythmiques, antidépresseurs, autres psychotropes et dérivés de la morphine tels que la codéine.

Les bases moléculaires de l'activité CYP2D6 déficiente sont maintenant bien connues : différentes mutations ont été identifiées telles que mutations ponctuelles, délétions d'une paire de bases et délétion d'un gène entier. La plupart des métaboliseurs lents peuvent être identifiés par « screening » de 5 des allèles les plus communs.

Une activité CYP2D6 déficiente lors du métabolisme d'un médicament est à l'origine d'une accumulation de la molécule mère dans l'organisme à des taux qui excèdent la zone thérapeutique, pouvant entraîner une toxicité. C'est le cas pour un traitement par antidépresseur, mais d'autres CYP (tels que CYP1A2 et CYP3A4) sont capables de prendre le relais pour la métabolisation de ces composés.

Une autre conséquence moins fréquente de cette déficience d'activité est l'absence d'efficacité du traitement. C'est le cas pour des analgésiques tels que la codéine ou le tramadol qui ne seront pas transformés en composés pharmacologiquement actifs qui sont respectivement la morphine et le O-desméthyltramadol.

L'ontogenèse de l'activité enzymatique CYP2D6 a été étudiée en utilisant le dextrométhorphan. Celui-ci doit subir une O-déméthylation. En l'absence de cette transformation métabolique, ce produit est responsable d'une toxicité du SNC. Cette activité subit de façon importante l'influence du développement : elle est quasiment absente dans le foie foetal (Ladona *et al.*, 1991; Treluyer *et al.*, 1991) mais uniformément présente à l'âge d'une semaine (Treluyer *et al.*, 1991). Elle augmente progressivement après la naissance. A un mois elle est encore faible (approximativement 20% de celle de l'adulte) (Treluyer *et al.*, 1991). La compétence de l'adulte est atteinte vers l'âge de 3 à 5 ans (Evans *et al.*, 1989).

Le retentissement du polymorphisme du CYP2D6 en pédiatrie est limité en raison des classes thérapeutiques concernées. Cependant, l'effet analgésique de la codéine sera réduit chez les enfants phénotypiquement métaboliseurs lents (Poulsen *et al.*, 1996), et ce d'autant plus que les enfants sont jeunes.

III.3.1.2- CYP2C19

Observé à l'origine comme une inaptitude à hydroxyler en position 4 l'énantiomère S de la méphénytoïne, la déficience en CYP2C19 ou « méphénytoïne hydroxylase » est présente dans 3 à 5% de la population blanche et environ 20% de la population asiatique. Sa transmission est autosomale récessive. Au moins 5 allèles lents ont été identifiés à ce jour.

Très peu d'agents thérapeutiques sont dépendants du CYP2C19 pour leur élimination. De ce fait, l'impact clinique de ce polymorphisme est moindre que celui du CYP2D6, en particulier dans la population blanche. Cependant, des effets pharmacodynamiques prononcés sont observés après administration de substrats du CYP2C19 tels que l'oméprazole dans la population asiatique en raison de la prévalence bien supérieure de ces métaboliseurs lents dans cette population (Futura *et al.*, 1999). Comme pour la déficience en CYP2D6, l'accumulation du médicament et le risque d'une toxicité concentration-dépendante restent les conséquences les plus importantes d'une déficience en CYP2C19.

Parce que peu d'agents métabolisés par le CYP2C19 sont utilisés en pédiatrie (en dehors de la phénytoïne), l'ontogenèse du CYP2C19 a été peu étudiée. Cette activité n'est pas apparente dans le foie fœtal. Des études utilisant la phénytoïne comme substrat révèlent une faible activité dans la première semaine de vie, avec une activité similaire à l'adulte atteinte vers l'âge de 6 mois. Le pic d'activité apparaît vers l'âge de 3 – 4 ans avec diminution à la fin de la puberté pour atteindre la valeur de l'adulte (Evans *et al.*, 1989). Cependant, la phénytoïne étant un substrat pharmacologique non spécifique du CYP2C19, il faut considérer ces données avec une certaine réserve.

III.3.1.3 – CYP2C9

Des anomalies dans le métabolisme de plusieurs substrats du CYP2C9 ont été observées chez des sujets traités par des produits avec un faible index thérapeutique, tels que phénytoïne, warfarine et tolbutamide. Trois variants alléliques ont été identifiés avec des enzymes fonctionnelles mais d'activité réduite (Sullivan-Klose *et al.*, 1996; Stubbins *et al.*, 1996). La diminution d'activité est d'environ 5,5 et 27,0 fois pour respectivement CYP2C9*2 et CYP2C9*3. Dans une population blanche, une proportion de 0,5% des sujets serait homozygote CYP2C9*3/*3. Le risque d'une toxicité sévère serait élevé pour ces patients, traités à des posologies standard de substrats à faible index thérapeutique.

La biotransformation de la phénytoïne en 5-(4-hydroxyphényl) –5- phénylhydantoïne par le CYP2C9 suivie d'une conjugaison avec l'acide glucuronique représente la principale voie métabolique d'élimination de ce produit. Les nouveaux-nés semblent être déficients en activité CYP2C9. La demi-vie de la phénytoïne est élevée (environ 75 heures) et très variable chez les très jeunes enfants nés avant terme. Chez les enfants de moins d'une semaine nés à terme, elle est d'environ 20 heures, et 8 heures après l'âge de 2 semaines, indiquant une maturation enzymatique avec l'âge et l'âge gestationnel (Loughan *et al.*, 1977). Une autre étude montre que l'acquisition d'une activité CYP2C9 fonctionnelle ne se développe qu'après l'âge de 10 jours (Bourgeois et Dodson, 1993).

III.3.1.4 – CYP1A2

Le CYP1A2 est le seul membre de la sous-famille CYP1A exprimé dans le foie humain. La caféine et la théophylline sont les substrats du CYP1A2 les plus utilisées en pédiatrie. Pour l'étude de la pharmacogénétique de ce cytochrome, la caféine a été très employée, l'activité CYP1A2 étant responsable d'environ 90% de la clairance de ce produit. Le tabac et certains facteurs du régime alimentaire (la consommation de viandes grillées au barbecue contenant des hydrocarbures polyaromatiques provenant du charbon de bois, les flavonoïdes contenus dans les aliments végétaux de la famille des crucifères) augmentent l'activité CYP1A2. L'expression de l'enzyme CYP1A2 montre une variabilité extrême chez l'Homme avec un facteur allant de 1 à 100. Certaines de ces variabilités peuvent être attribuées à un polymorphisme récemment décrit au niveau de la région régulatrice du gène CYP1A2 affectant l'induction de la réponse au tabac ou à d'autres possibles inducteurs (Nakajima *et al.*, 1999).

Les études du métabolisme de la caféine et de la théophylline chez l'enfant ont montré des modifications au cours du développement. Le CYP1A2 ne semble pas être présent ni dans l'embryon humain, ni dans le foie foetal (Hakkola *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995). L'activité mesurée par la 3-déméthylation de la caféine est faible chez le nouveau-né. La maturation semble retardée par rapport aux autres isoformes du CYP : une activité équivalente à celle observée chez l'adulte ne semble pas être atteinte avant l'âge d'au moins 4 mois (Cazeneuve *et al.*, 1994). De façon similaire, la 3-déméthylation de la théophylline est aussi CYP1A2-dépendante. Mais la 8-hydroxylation de la théophylline en son métabolite majeur l'acide 1,3-diméthylurique est plus importante et catalysée aussi par le CYP1A2. D'autres CYP (CYP2E1, CYP3A4) peuvent aussi contribuer à la 8-hydroxylation de la théophylline et être quantitativement importants chez les sujets à faible activité CYP1A2 (prématurés et nouveaux-nés).

Cependant, des données pharmacocinétiques indiquent que la clairance de la théophylline est faible à la naissance et augmente de façon linéaire pendant la première année de la vie (Nassif *et al.*,

1981). Chez les enfants les plus âgés, elle dépasse généralement celle de l'adulte (Kraus *et al.*, 1993), comme l'indiquent les posologies supérieures nécessaires au maintien des concentrations plasmatiques dans la zone thérapeutique (Milavetz *et al.*, 1986). Le moment auquel cette activité relativement élevée décroît pour atteindre les valeurs de l'adulte est mal défini. Une étude réalisée chez des adolescents a montré une variation interindividuelle considérable (Lambert *et al.*, 1986).

III.3.1.5 – CYP3A4

La sous-famille CYP3A est constituée de 4 membres (CYP3A4, -3A5, - 3A7 et -3A43). Elle est quantitativement la plus importante en ce qui concerne les biotransformations médicamenteuses hépatiques. Le terme CYP3A fait souvent référence aux CYP3A4, 3A5 et 3A7 dans un sens collectif parce que, historiquement, il était difficile de différencier une isoforme d'une autre sur la base des caractéristiques physiques ou des propriétés catalytiques. Le CYP3A catalyse l'oxydation de nombreux médicaments, certains ayant une place importante lors d'une prise en charge pédiatrique.

- Le CYP3A4 est l'isoforme majoritairement exprimée dans le foie adulte, mais aussi abondamment exprimée dans l'intestin où il contribue de façon non négligeable au métabolisme de premier passage de substrats tels que le midazolam. Chez l'adulte, l'activité CYP3A4 varie dans la population d'un facteur 1 à 50. Un polymorphisme a été retrouvé récemment et concernerait 2,7% de la population blanche.

- Le CYP3A5 est exprimé de façon polymorphique. Il est présent dans environ 25% des échantillons de microsomes de foie adultes.

- Le CYP3A7 est l'isoforme prédominante du foie fœtal, représentant 30 à 50% de l'ensemble des CYP hépatiques fœtaux.

L'ontogenèse des protéines CYP3A est unique dans la famille des CYP. Une isoforme fonctionnelle CYP3A est présente pendant l'embryogenèse (50 à 60 jours de gestation) associée à une activité relativement élevée, identifiée comme une activité catalytique CYP3A7 (Yang *et al.*, 1994). Les études *in vitro* utilisant des substrats spécifiques de chaque isoforme ont montré que l'activité CYP3A7 est élevée dans le foie fœtal avec un maximum d'activité au tout début de la période néonatale. Elle décroît ensuite au cours des 2 semaines de vie postnatale. Au contraire, l'activité CYP3A4 est absente dans le foie fœtal mais augmente au cours de la première semaine de vie postnatale (Lacroix *et al.*, 1997).

L'interprétation des études *in vivo* concernant l'ontogenèse des différents isoformes de CYP3A est difficile compte tenu de la spécificité de chaque isoforme pour un substrat déterminé et de la localisation spécifique de tissu des isoformes CYP3A (hépatique et intestinale expression de CYP3A4, rénale expression de CYP3A5). La clairance du midazolam administré par voie intraveineuse reflète l'activité CYP3A hépatique (Kinirons *et al.*, 1999). Les études de cette clairance montrent que l'activité fonctionnelle CYP3A est limitée dans la période qui suit la naissance. Elle serait ensuite multipliée par 5 dans les premiers mois de la vie (Payne *et al.*, 1989).

La carbamazépine constitue un autre produit qui peut être utilisé pour suivre la maturation du CYP3A chez l'enfant. En effet, la formation de son métabolite majeur, la carbamazépine 10, 11-époxyde, est largement catabolisée par le CYP3A4. Les données recueillies grâce au « drug-monitoring » ou aux études pharmacocinétiques indiquent que la clairance de la carbamazépine est supérieure chez l'enfant à celle de l'adulte (Pynnönen *et al.*, 1977; Riva *et al.*, 1985), nécessitant des

posologies plus élevées pour maintenir des concentrations thérapeutiques. Entre 1 et 15 ans, la métabolisation de la carbamazépine diminue (Korinthenberg *et al.*, 1994), indiquant une activité CYP3A4 importante au cours de la petite enfance qui décroît régulièrement jusqu'à atteindre un niveau similaire à celui de l'adulte vers la puberté.

Les études concernant la ciclosporine et le tacrolimus (métabolisés aussi par le CYP3A) montrent que les posologies nécessaires pour atteindre les concentrations thérapeutiques sont bien supérieures chez l'enfant à celles utilisées chez l'adulte (Jain *et al.*, 1991).

III.3.2 – Enzymes de phase II

Le groupe des enzymes de phase II comprend principalement les glucuronosyltransférases, sulfotransférases, arylamine-N-acétyltransférases (NAT1 et NAT2), glutathion-S-transférases et méthyltransférases (catéchol-*o*-méthyltransférase, thiopurine-S-méthyltransférase et plusieurs N-méthyltransférases). Toutes jouent un rôle important dans la transformation des xénobiotiques.

L'ontogénèse des enzymes de phase II est moins bien connue que celle des cytochromes P450. Les données de la littérature indiquent que, pour certaines d'entre elles, comme pour les cytochromes P450, des différences importantes existent entre l'enfant et l'adulte.

III.3.2.1 – Glucuronosyltransférases (UGT)

Comme les CYP, les UGT représentent une superfamille d'enzymes qui ont en commun la faculté de conjuguer leurs substrats respectifs avec l'acide glucuronique. Plusieurs mutations du gène UGT1 ont été rapportées. La transmission de 2 allèles « défectueux » est associée à une conjugaison réduite de la bilirubine donnant lieu en clinique au syndrome de Crigler-Najjar et au syndrome de Gilbert (Mackenzie *et al.*, 1997). L'ictère néonatal et le collapsus cardiovasculaire chez les nouveau-nés traités avec le chloramphénicol, tous deux associés à l'immaturation de l'activité UGT, sont deux conséquences importantes de l'impact du développement sur l'activité UGT (Weiss *et al.*, 1960; Young et Lietman, 1978).

Un polymorphisme des UGT impliquées dans les biotransformations des médicaments a été suggéré mais le manque de substrats spécifiques d'une isoforme a gêné les recherches dans ce domaine.

Les connaissances de l'ontogénèse des UGT sont donc limitées. Quelques données fournissent cependant des indications (de Wildt *et al.*, 1999) : la conjugaison de la bilirubine, attribuée à UGT1A1, est indétectable dans le foie fœtal mais augmente immédiatement après la naissance, atteignant les niveaux adultes vers l'âge de 6 mois.

La glucuronidation du paracétamol, un substrat d'UGT1A6 et à un niveau moindre de UGT1A9, est faible chez le nouveau-né par rapport à celle de l'adolescent et de l'adulte. Mais elle est compensée, jusqu'à un certain niveau, par une augmentation de la conjugaison aux sulfates. Le pourcentage de la dose de paracétamol excrété inchangé dans l'urine est similaire chez le nouveau-né et l'adulte mais le rapport de métabolite glucuronide sur sulfate est plus élevé chez l'adulte que chez le nouveau-né (Miller *et al.*, 1976).

La glucuronidation de la morphine, substrat de l'UGT2B7, dans le foie foetal représente de 10 à 20% de l'activité observée dans le foie adulte (Pacifci *et al.*, 1982). La clairance de la morphine est corrélée de façon étroite avec l'âge gestationnel. Elle est multipliée par quatre entre 27 semaines d'âge gestationnel et le terme (Scott *et al.*, 1999).

III.3.2.2 – N-Acétyltransférase 2 (NAT2)

Le polymorphisme de l'activité NAT2 est l'un des mieux connus. Environ 50% des populations blanches et noires américaines sont phénotypiquement des métaboliseurs lents. Ces individus ont un risque élevé d'effets secondaires à certains traitements : hémolyse induite par la sulfasalazine, neuropathie périphérique induite par l'hydrazine ou arylamine, lupus érythémateux associé avec le procaïnamide ou l'isoniazide et un syndrome de Stevens-Johnson ou une nécrolyse épidermique après administration de sulfonamide (May, 1994).

La proportion des métaboliseurs lents ou rapides varie considérablement avec l'ethnie et l'origine géographique. 5% des esquimaux du Canada sont acétyleurs lents, alors que cette proportion avoisine les 90% dans certaines populations méditerranéennes (Meyer, 1990).

La fonction NAT2 est transmise selon un mode autosomal dominant avec transmission des deux allèles lents nécessaires à l'expression du phénotype métaboliseur lent.

L'ontogenèse de NAT2 a été étudiée *in vivo* et *in vitro*. Au cours de la vie fœtale, une faible activité NAT2 peut être détectée dès 16 semaines de grossesse (Peng *et al.*, 1984). Après la naissance, les études utilisant la caféine ont montré que les enfants étaient tous métaboliseurs lents jusqu'à l'âge de 2 mois (Pariante-Khayat *et al.*, 1991). Le phénotype métaboliseur rapide se met ensuite en place progressivement. Après l'âge de 3 à 4 ans, les enfants européens et blancs et noirs américains ont des phénotypes NAT2 correspondant à la fréquence de distribution rapportée pour les adultes de la même race (Hadasova *et al.*, 1990).

III.3.2.3 – Thiopurine-S-Méthyltransférase (TPMT)

L'ontogenèse de la TPMT a été étudiée au niveau fœtal (Pacifci *et al.*, 1991) : l'activité TPMT est présente chez le fœtus à mi-gestation et ubiquitairement distribuée. Au niveau hépatique, l'activité fœtale retrouvée correspond au tiers de l'activité mesurée chez l'adulte. McLeod et al (1995) ont trouvé une activité TPMT supérieure chez le nouveau-né (sang de cordon et sang recueilli 12 heures après la naissance) par rapport à des adultes de la même race. Ferroni *et al.* (1996) ont retrouvé des résultats similaires avec un nombre d'échantillons plus important (100 sangs de cordon, 100 sangs d'adultes). Chez les enfants plus grands, l'étude de Lennard *et al.* en 1990 montre que les résultats de l'activité TPMT dans une population de 130 enfants et adultes jeunes âgés de 4 à 23 ans sont similaires à ceux rapportés pour des populations d'adultes. Mais aucun article de la littérature n'a

étudié l'activité TPMT en fonction de l'âge et chez le jeune enfant pour déterminer un éventuel impact du développement sur l'activité TPMT.

III – PUBLICATION N°2

Phenotype and genotype for thiopurine methyltransferase activity in the French Caucasian population: impact of age.

Ganiere-Monteil C, Medard Y, Lejus C, Bruneau B, Auget JL, Pineau A, Fenneteau O, Bourin M, Jacqz-Aigrain E.

Soumis pour publication à « Pediatric Research ».

Paru dans :

Eur J Clin Pharmacol. 2004 Apr;60(2):89-96. Epub 2004 Mar 12.

PMID: 15022030 [PubMed - in process]

Ce travail a fait l'objet de deux posters :

International Congress on Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology , Bâle, Suisse, Septembre 2003.

Le résumé a été publié :

Ganiere-Monteil C, Medard Y, Lejus C, Bruneau B, Auget JL, Pineau A, Fenneteau O, Bourin M, Jacqz-Aigrain E.

Phenotype and genotype for thiopurine methyltransferase activity in the French Caucasian population: impact of age.

Therapeutic Drug Monitoring, 2003, 25, 4, 522.

7^{ème} Congrès Annuel de la Société Française de Pharmacologie, Lille, Avril 2003.

Le résumé a été publié :

D. Zhang, C. Ganiere-Monteil, Y. Medard, M. Bourin, E. Jacqz-Aigrain.

Phenotype and genotype for thiopurine methyltransferase activity in the French Caucasian population: impact of age.

Fundamental and Clinical Pharmacology, 2003 ,17, 255.

Cette étude du phénotype et du génotype de la TPMT nous a apporté une meilleure connaissance de cette enzyme au sein d'une population Française caucasienne d'individus adultes et enfants en bonne santé. Elle nous a aussi permis d'avoir des valeurs de référence d'activité TPMT mesurées chez un grand nombre de sujets adultes et enfants.

Le but de ce travail est d'appliquer ces techniques analytiques à des patients traités par 6-MP, dans le but d'améliorer leur prise en charge médicale et de prévenir les effets toxiques pouvant survenir chez ces sujets. Nous avons choisi d'étudier la TPMT chez des enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique, prenant de la 6-MP au cours de leur traitement de maintenance.

TPMT in Caucasians: impact of age

Corresponding author: Catherine Ganiere-Monteil

Address: Laboratoire de Pharmacologie, Hôtel-Dieu, 9, Quai Moncousu, 44093 Nantes cedex 1, France.

E-mail : catherine.ganiere@chu-nantes.fr

Phone number: 33 2 40 08 40 87

Fax number: 33 2 40 08 39 96

Address for reprint requests: Catherine Ganiere-Monteil, Laboratoire de Pharmacologie, Hôtel-Dieu, 9, Quai Moncousu, 44093 Nantes cedex 1, France.

Phenotype and genotype for thiopurine methyltransferase activity in the French Caucasian population : impact of age

Catherine Ganiere-Monteil¹, PharmD, Yves Medard², MT, Corinne Lejus³, PhD, Béatrice Bruneau⁴, MD, PhD, Alain Pineau¹, PhD, Odile Fenneteau⁵, MD, Michel Bourin¹, PhD, Evelyne Jacqz-Aigrain², MD, PhD.

1- Laboratoire de Pharmacologie, Hôtel-Dieu, 44093 Nantes, France

2- Laboratoire de Pharmacologie Pédiatrique et Pharmacogénétique, Hôpital Robert Debré, 75019
Paris, France

3- Anesthésiologie, Hôtel-Dieu, 44093 Nantes, France

4- Anesthésiologie, Hôpital Robert Debré, 75019 Paris, France

5- Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Robert Debré, 75019 Paris, France

Paru dans :

Eur J Clin Pharmacol. 2004 Apr;60(2):89-96. Epub 2004 Mar 12.

PMID: 15022030 [PubMed - in process]

ABSTRACT

Thiopurine drugs are commonly used in pediatric patients for the treatment of acute leukemia, organ transplantation and inflammatory diseases. They are catabolized by the cytosolic thiopurine methyltransferase (TPMT), which is subject to a genetic polymorphism. In children enzyme activities are immature at birth and developmental patterns vary widely from one enzyme to another. The present study was undertaken to evaluate erythrocytes TPMT activity and the correlation between genotype and phenotype in different age groups from birth to adolescence and adulthood.

The study included 304 healthy adult blood donors, 147 children and 18 neonates (cord bloods). TPMT activity was measured by liquid chromatography and genotype was determined by a PCR-reverse dot blot analysis identifying the predominant TPMT mutant alleles (TPMT*3A, TPMT*3B, TPMT*3C, TPMT*2).

TPMT was significantly lower in young subjects (cord bloods and children, $n = 165$) than in adults ($n = 303$): 18.49 ± 4.13 versus 19.38 ± 4.09 U/mL respectively ($p = 0.016$). In the whole population, there were 91.9% homozygous wild-type, 7.9% heterozygous mutants and 0.2% homozygous mutant. The frequency of mutant alleles was 3.0% for TPMT*3A, 0.7% for TPMT*2 and 0.4% for TPMT*3C.

No impact of age on TPMT activity could be evidenced, suggesting that TPMT activity is already mature at birth. When individual TPMT activity was compared with genotype, there was an overlapping region where subjects (4.5%, 12 adults – 9 children) were either homozygous wild-type or heterozygous. Further studies are required to determine, in such intermediate methylators receiving thiopurines, if TPMT genotype has an impact on the modifications of TPMT activity and response to treatment (including side-effects).

Keywords: thiopurine methyltransferase, ontogeny, phenotype, genotype.

INTRODUCTION

Thiopurine methyltransferase (TPMT, EC 2.1.1.67) is a cytosolic enzyme which catalyses the S-methylation of thiopurine drugs such as 6-mercaptopurine (6-MP) and thioguanine (1, 2). It is present in various organs (liver, kidneys) and cells (erythrocytes, leukocytes). Its physiological role remains unknown and there is no endogenous substrate identified (3).

TPMT activity can be measured in red blood cells using a radiochemical method (4, 5) or an HPLC assay (6). It is highly variable and under genetic control. The distribution of TPMT activity in adult volunteers appears trimodal in initial reports: approximately 89% of Caucasians are homozygous for the high activity allele, 11% are heterozygous and 1 subject in 300 inherits TPMT deficiency as an autosomal recessive trait (7). The gene (34Kb) is located on chromosome 6 (6 p22.3) and has 10 exons and 9 introns (8, 9). To date, eight mutant alleles have been associated with deficient TPMT activity (10) but three mutated alleles (TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3C) account for 80 to 95% of intermediate or low activity cases (11, 12): TPMT*2 carries a single nucleotide transversion (G238C) in the open reading frame (exon 5) leading to an amino acid substitution at codon 80 (Ala→Pro) (13), TPMT*3A contains two nucleotides transition mutations (G460A (exon 7) and A719G (exon 10)) leading to amino acid substitutions respectively at codon 154 (Ala→Thr) and codon 240 (Tyr→Cys) (14) and TPMT*3C carries the single transition A719G (exon 10). Most genotyping studies use allele-specific PCR or PCR-RFLP in order to detect these three single nucleotides polymorphisms (SNPs) (11, 12). The SNPs prevalence varies according to the ethnic origin (10). Heterologous expression in yeast established an enhanced rate of proteolysis of mutant TPMT encoded by TPMT*2 and TPMT*3A alleles, with degradation half lives of approximately 15 min for both mutant proteins compared with 18h for the wild-type protein (15).

TPMT catabolizes the thiopurine drugs 6-mercaptopurine and thioguanine and interindividual variations in TPMT activity have major clinical consequences in both adults and children receiving these drugs for the treatment of leukemia (10, 16) or chronic inflammatory diseases (17). The impact of age has been demonstrated for many drug metabolizing enzymes (18). We studied the impact of age on TPMT activity by comparing TPMT activity in healthy young Caucasians from birth (by the use of cord blood) to adolescence with adult Caucasians. TPMT phenotype and genotype were determined and their correlation was examined. We also investigated the impact of age on TPMT activity and the correlation between phenotype and genotype in different age groups.

METHODS

The study was approved by the Ethic Committee of the two participating centers. A written informed consent was obtained from all adult subjects and from all the children's parents.

Subjects

A questionnaire was filled for all the patients. The data age, sexe and ethnicity were collected and only Caucasians were included. Patients with a past history of acute, chronic or genetic diseases and/or receiving medications were not included.

Adults were 304 blood donors, 229 men and 75 women, aged 40.9 ± 10.0 years (mean \pm sd). Children (n = 147) were hospitalized for day-care surgery: they were 97 boys and 50 girls, aged 5.7 ± 4.2 years. For one child, blood could not be available for genotype. 18 umbilical cord bloods were obtained after normal pregnancy. They were 11 girls and 7 boys, with an Apgar score over 9 at 5 minutes. Birth weight was 3401 ± 354 g and term was 40 ± 1.2 week's gestation.

Blood samples were collected in 3-mL EDTA tubes for genotype and 3-mL lithium heparinised tubes for phenotype determination. The volume of blood was reduced (1 to 2 mL) for the youngest children.

HPLC assay for red cell thiopurine methyltransferase activity determination

Erythrocyte lysate preparation and incubation conditions were similar to those previously described by Jacqz-Aigrain et al. (6). Erythrocyte lysates were kept at -80°C until analysis. After slow thawing, magnesium chelation was performed by addition of Chelex 100 resin. Incubation conditions were: 205 μL phosphate buffer 150 mM pH 7.5, 200 μL erythrocyte lysate, 15 μL of 6-MP 18 mg/mL solution (final concentration 4 mM), 30 μL of cofactors mixture. Final cofactors concentrations were 10 μM for S-adenosyl-L-methionine (SAM), 20 μM for allopurinol and 400 μM for dithiotreitol (DTT). In the blank tubes, phosphate buffer replaced cofactors solution. The enzymatic reaction was stopped after 60 min at 37°C by addition of 50 μL of perchloric acid 70-72%. After vortex stirring and centrifugation 10 min at 4°C , the amount of 6-methylmercaptapurine formed during incubation was measured by liquid chromatography: 75 μL of supernatant were injected into the chromatographic system. The chromatographic conditions were reported elsewhere (19). Briefly, the mobile phase consisted of water-acetonitrile-triethylamine (91.7:8:0.03, v/v) with dithiotreitol 0.65 mM, adjusted to pH 3.2 with *o*-phosphoric acid. The flow rate was 1 mL.min⁻¹, the detection wavelength 290 nm and 75 μL of acetonitrile was injected between two samples. TPMT activities were determined in the two different sites, after blinded assessment of 20 samples showing a significant correlation between the two HPLC methods measuring TPMT activity ($y = 1.059x + 0.019$; $r^2 = 0.682$; $p < 0.001$).

The calibration curve was linear over the range of 5 to 150 ng.mL⁻¹ 6-methylmercaptapurine. The precision was studied by adding 6-methylmercaptapurine to erythrocyte lysate at three different concentrations (25, 75, 125 ng.mL⁻¹). The intra-day and inter-days coefficients of variation were 1.7 – 4.3% (n = 6) and 0.8 - 6.0% (n = 6) for both laboratories. The limit

of detection was 5 ng.mL⁻¹ and the limit of quantification 10 ng.mL⁻¹. Quality controls (TPMT activity measured in adult volunteers) showed inter-assay variations of 5.8% (n = 20) and 5.2% (n =5) for a mean TPMT activity of 19.4 and 17.6 nmol.h⁻¹.mL⁻¹ PRBC (U/mL PRBC) for two different erythrocyte lysates analyzed respectively in each laboratory.

Determination of thiopurine methyltransferase genotype by PCR-reverse dot blot

DNA was extracted by an erythrocyte differential lysis with ammonium carbonate buffer followed by a leukocyte lysis obtained by proteinase K and tensioactive agents (tween 20). DNA fragments were amplified by PCR. We searched SNPs on exons 5, 7 and 10 to detect variants alleles TPMT *2, *3A, *3B and *3C. The following 5'biotinylated oligonucleotides forward primer (FP) and reverse primer (RP) were used:

exon 5-FP: 5'-GCTTACTCTAATATAACCCTCTA-3'

exon 5-RP: 5'-CTTTTGTGGGGATATGGATACA-3'

exon 7-FP: 5'-CGATTGTTGAAGTACCAGCAT-3'

exon 7-RP: 5'-CTAGAACCCAGAAAAAGTATAGT-3'

exon 10-FP: 5'B-AATCCCTGATGTCATTCTTCATA-3'

exon 10-RP: 5'B-TTCAATTCTCAAAAACATGTCA-3'

The amplified fragment size were 253 bp (exon 5), 242 bp (exon 7), 219 bp (exon 10). The amplification reaction was carried out in a total volume of 50 µL in the presence of 100 ng of DNA, 0.01 mM TrisHCl pH 7.5, 0.05 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.025 µL tween 20, 0.1 mM each dNTP, 0.2 µM of each primer, 0.08 U *Taq* DNA polymerase. The amplification profile of the thermocycler (Applied Biosystems 9007, Les Ulis, France) consisted of an initial denaturation step of 95°C for 5 min, an hybridization step for 2 min at 55°C followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s and a final extension at 72°C for 2 min. Mutations were identified by a reverse dot blot assay performed on amplified DNA. This technique used Allele Specific Oligonucleotides (ASO) linked to a membrane. The amino-linked oligonucleotides sequences for normal alleles (wt) and alleles with SNP were:

exon 5-wt: 5'NH₂-TATGCAGGTTTGCAGACC-3'

exon 5-SNP: 5'NH₂-GGTCTGGAAACCTGCATA 3'

exon 7-wt: 5'NH₂-ACTAATGCTCCTCTATCC-3'

exon 7-SNP: 5'NH₂-GATAGAGGAACATTAGTTG-3'

exon 10-wt: 5'NH₂-GAAAAGTTATATCTACTTACA-3'

exon 10-SNP: 5'NH₂-GTAAGTAGACATAACTTTTCA-3'

After a DNA denaturation step, hybridization with ASO was realized at specific temperatures (46°C for G238C, 42°C for G460A and A719G). After a washing step, the streptavidine-peroxydase conjugate added bound with biotine of

amplified DNA. After other washing steps, the addition of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (chromogene substrate of streptavidine-peroxydase) gives a blue spot on the membrane in presence of hydrogen peroxyde. Blanks and controls (known homozygote wild-type DNA, heterozygote DNA, homozygote mutant DNA except G238C/G238C) were included into each batch and always gave expected results.

Data analysis

Statistical analysis was performed using Systat 9.0 for Windows (SPSS Inc, Chicago, Ill). Results are expressed as mean \pm standard deviation. According to the central limit theorem for big size groups ($n > 30$), *t* test was used to compare TPMT activity between 2 groups and ANOVA for more than 2 groups. Correlations were studied by the Pearson coefficient for quantitative variables and Spearman coefficient for quantitative noncontinued variables. Nonparametric tests were used for the analysis of TPMT in cord blood. *P* value < 0.05 was considered as significant. Confidence intervals (CI) are presented at 95%.

RESULTS

TPMT phenotype and genotype were determined in a population of 469 healthy Caucasian subjects (except one genotype for a child): there were 304 adults, 147 children and 18 neonates (cord blood).

Adults

TPMT activity ($n = 304$) ranged from 0.43 to 30.38 U/mL PRBC. The frequency distribution histogram appeared optically trimodal (Fig 1a). One individual had a very low TPMT activity of 0.43 U/mL PRBC. Intermediate activities were between 7.14 and 12.01 U/mL PRBC and high activities were between 13.27 and 30.38 U/mL PRBC. When the individual with a very low activity was not included, mean TPMT activity was 19.38 ± 4.09 U/mL PRBC (Table I). TPMT activity was significantly higher in men than in women (19.62 ± 4.20 versus 18.61 ± 3.59 U/mL PRBC respectively, $p = 0.044$).

Genotype results are presented Table II. The frequency of homozygous wild-type is 92.1%. One adult individual had a homozygous mutated genotype *3A/*3A. 23 (7.6%) individuals were heterozygous. The mutant allele TPMT*3A ($n = 18$) was predominant, while TPMT*2 ($n = 3$) and TPMT *3C ($n = 2$) were less frequent.

The correlation between individual phenotype and genotype was analyzed. The homozygous deficient individual (*3A/*3A) had the lowest TPMT activity of 0.43 U/mL PRBC. TPMT activity ranged from 7.14 to 13.34 U/mL PRBC in heterozygous individuals and from 10.82 to 30.38 U/mL PRBC in homozygous wild-type individuals. 12 subjects had a TPMT

activity between 10.82 and 13.34 U/mL PRBC, within an overlapping region between heterozygous or homozygous wild-type individuals.

Children

TPMT activity was 18.62 ± 4.14 U/mL PRBC (range 8.25 to 30.0) ($n = 147$) and it was 17.48 ± 4.04 U/mL PRBC (range 9.24 to 22.79) in cord bloods ($n = 18$) - (Table I). There was no significant difference in TPMT activity between the two groups ($p = 0.424$). Therefore, the data obtained in children and in cord blood were pooled ($n = 165$). When the whole group was considered, the frequency distribution histogram appeared bimodal (Fig 1b). In addition, there was no difference between TPMT activity measured in cord blood and in adults ($p = 0.107$). Mean TPMT activity was not significantly different between boys and girls (18.34 ± 4.21 versus 18.87 ± 3.98 respectively, $p = 0.424$). There was no correlation between TPMT and age ($p = 0.127$, Fig 2). When children were separated into 5 age-groups (Table III) and heterozygous children were withdrawn to remove the influence of the genetic factor, TPMT activity was not significantly different between the 5 groups ($p = 0.492$). In addition, there was no significant correlation between TPMT activity and individual erythrocytes counts ($p = 0.976$) or reticulocytes counts ($p = 0.145$). And there was no significant correlation between TPMT activity in cord blood and fetal hemoglobin ($p = 0.88$) or term at birth ($p = 0.95$).

One hundred and fifty children (91.5%) had a homozygous wild-type genotype and 14 (8.5 %) were heterozygous. The mutant allele TPMT*3A was predominant followed by TPMT*2 and TPMT*3C (Table II).

The correlation between individual phenotype and genotype showed a TPMT activity ranging from 8.25 to 13.05 U/mL PRBC in heterozygous children and from 9.95 to 30.00 U/mL PRBC in homozygous children, with 9 children having a TPMT activity within an overlapping region of 9.95 to 13.05 U/mL PRBC.

Comparison adult/children

TPMT activity was significantly lower in children than in adults ($p = 0.016$).

When the whole group of individuals ($n = 468$) was considered, 91.9% (CI 88.2-94.5) were homozygous wild-type, 7.9% (CI 5.2-11.3) were heterozygous mutants and one individual (0.2%, CI 0.0-1.4) was a homozygous mutant. The frequency of mutant alleles was 3.0% (CI 1.8-4.7) ($n = 28$) for TPMT*3A, 0.7% (CI 0.2-1.8) ($n = 7$) for TPMT*2 and 0.4% (CI 0.1-1.3) ($n = 4$) for TPMT*3C.

The overlapping regions comprised 12 adults (TPMT activity 10.82-13.34) and 9 children (TPMT activity 9.95-13.05) - (Fig 3) or 21 subjects (4.5%) for the entire group. Among these subjects, 18 (3.8%) were heterozygous and 3 (0.6%) were homozygous. If the higher limit of TPMT activity in the heterozygous group is selected, 3 individuals (1 adult and 2 children) would have been classified as heterozygous but were homozygous wild-type at the genotype level.

DISCUSSION

Most drug-metabolizing enzymes are immature during fetal life and at birth and reach adult activities after a few months (20) or years (21, 22, 23). Therefore, in addition to genetic factors, the impact of ontogeny should be analyzed in pediatric populations (24, 18). In the present study, we investigated the developmental pharmacogenetics of TPMT activity. We compared TPMT activity in large groups of adults and children and showed that there was no major impact of age on TPMT activity and that the phenotype was correlated with genotype in both age groups in almost all subjects.

Thiopurine drugs are widely administered both in adult and pediatric patients. Major indications include leukemia occurring primarily during childhood (16, 25), chronic inflammatory bowel diseases (26), organ transplantations (27) and more recently dermatologic diseases (28). These drugs are highly metabolized, through three competing pathways, TPMT being a catabolic pathway under genetic control (7).

In order to investigate the impact of age on TPMT activity, we first studied an adult population of 304 healthy volunteers. The frequency distribution histogram appeared trimodal, in agreement with the reference data initially published by Weinshilboum and Sladek (7). In our population, we evidenced the gender difference reported by McLeod et al (5) in high methylators.

Some data studying the developmental aspects of TPMT activity have already been published. Pacifici et al (29) showed that TPMT activity was 3 times lower in the human fetal liver at midgestation than in the adult liver. The data by Ferroni et al (30) and McLeod et al (3) reported that TPMT activity was higher in cord and peripheral blood at birth than in adults, while TPMT activity was similar in children, aged 4 to 23 years and in adults (16). In contrast, we did not evidence differences in TPMT activity between neonates at birth, infants and children. Our data did not show a gender difference for children at the opposite of adults, but in agreement with other children studies (31, 32). Differences between studies, particularly in the determination of TPMT activity at birth, may be related to analytical differences. High TPMT activities in cord blood were measured by radiochemical method (3, 30) and 6-methylmercaptopyrimidine may have been overestimated while we used a HPLC method, which specifically measured 6-methylmercaptopyrimidine. Although TPMT activity was lower in children than in adults, the difference was small and the clinical impact is expected to be reduced. In our study that included children from birth to adolescence, no impact of age could be evidenced. Consequently, TPMT appears functional in infants and children and dosage adjustment should not be required in the youngest patients treated with thiopurines.

We determined TPMT genotypes in a large group of Caucasians, including both adults and children. As expected, the homozygous TPMT wild-type patients were predominant and the frequency of heterozygous subjects (7.9%) was very close to the frequencies reported in other Caucasian populations already studied ranging from 7.4% to 9.6% (12, 33, 34). The TPMT*3A variant allele was predominant in these 3 studies with frequencies ranging from 3.2% to 5.7% as in our study (3.0%). The TPMT*3C and TPMT*2 mutant alleles were detected at lower frequencies, TPMT*2 being more frequent than TPMT*3C.

The correlation between phenotype and genotype was also studied in the whole group of adults and children. There was an overlap in TPMT activity between homozygous wild-type and heterozygous subjects but only 21 subjects (4.5%) (12 adults and 9 children) were concerned. This is in agreement with previous studies that showed a good correlation between phenotype and genotype in healthy non-treated patients (11, 12, 35). The reasons for the overlap that we observed may be related to the measurement of TPMT activity (although all TPMT below 15.0 U/mL PRBC were assayed in triplicate), to the

possible impact of environmental factors and/or the role of the polymorphic variable number of tandem repeats in the 5' flanking region of the TPMT gene modulating gene expression (36). In addition, other SNPs in the open reading frame of the TPMT gene, although rare, have been identified (10), which were not tested here. Three subjects in the overlapping region had a low activity and were homozygous wild-type. Such individuals were already identified in previous studies (11, 37) where DNA was sequenced and no other polymorphism was detected inside the coding region. Using a HPLC for the determination of TPMT activity, as reported antimode values seem to depend, at least in part, on the method used to measure TPMT activity (6, 7), the antimode value separating homozygous wild-type and heterozygous subjects was close to 13.5 both for adults and children. This allows to classify patients as either high or intermediate methylators before starting thiopurine treatment. For individuals having a TPMT activity close to the antimode value, it may be cautious in addition to phenotype to study TPMT genotype.

In conclusion, we determined TPMT phenotype and genotype in a French healthy Caucasian population including both adults and children. No impact of age on TPMT activity during childhood and very young children could be evidenced, suggesting that TPMT activity is already mature at birth. Only one subject (0.2%) was homozygous mutant and the proportion of heterozygous subjects was 7.9 % (CI 5.2-11.3), *3A being the preponderant mutant allele. In the whole population, the comparison between phenotype and genotype showed that a limited number of patients having a TPMT activity close to the antimode could be either homozygous wild-type or heterozygous subjects. Further studies are required to understand if these subjects will behave as intermediate methylators when treated with a thiopurine drug, requiring low thiopurine doses to avoid adverse effects.

Acknowledgments

We thank A. Benoussaidh, N. Ripoll and V. De Burgat for their technical assistance.

REFERENCES

1. Remy CN 1963 Metabolism of thiopyrimidines and thiopurines: S-Methylation with S-adenosylmethionine transmethylase and catabolism in mammalian tissue. *J Biol Chem* 238:1078-84.
2. **WOODSON LC, WEINSHILBOUM RM 1983 HUMAN KIDNEY THIOPURINE METHYLTRANSFERASE : PURIFICATION AND BIOCHEMICAL PROPERTIES. *BIOCHEM PHARMACOL* 32:819-26.**
3. McLeod HL, Krynetski EY, Wilimas JA, Evans WE 1995 Higher activity of polymorphic thiopurine-S-methyltransferase in erythrocytes from neonates compared to adults. *Pharmacogenetics* 5:281-6.
4. Weinshilboum RM, Raymond FA, Pazmino PA 1978 Human erythrocyte thiopurine methyltransferase: radiochemical microassay and biochemical properties. *Clin Chim Acta* 85:323-33.
5. McLeod HL, Lin JS, Scott EP, Pui CH, Evans WE 1994 Thiopurine methyltransferase activity in American white subjects and black subjects. *Clin Pharmacol Ther* 55:15-20.
6. Jacqz-Aigrain E, Bessa E, Medard Y, Mircheva Y, Vilmer E 1994 Thiopurine methyltransferase activity in a French population: h.p.l.c. assay conditions and effects of drugs and inhibitors. *Br J Clin Pharmacol* 38:1-8.
7. Weinshilboum RM, Sladek SL 1980 Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 32:651-62.
8. Szumlanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kelsell D, et al 1996 Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol* 15:17-30.
9. Krynetski EY, Fessing MY, Yates CR, Sun D, Schuetz JD, Evans WE 1997 Promoter and intronic sequences of the human thiopurine-S-methyltransferase (TPMT) gene isolated from a human PACI genomic library. *Pharm Res* 14:1672-8.
10. **MCLEOD HL, KRYNETSKI EY, RELING MV, EVANS WE 2000 GENETIC POLYMORPHISM OF THIOPURINE METHYLTRANSFERASE AND ITS CLINICAL RELEVANCE FOR CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. *LEUKEMIA* 14:567-72.**
11. Otterness D, Szumlanski C, Lennard L, Klemetsdal B, Aarbakke J, Park-Hah JO, et al 1997 Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 62:60-73.

12. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, et al 1997 Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med* 126:608-14.
13. Krynetski EY, Schuetz JD, Galpin AJ, Pui CH, Relling MV, Evans WE 1995 A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:949-53.
14. Tai HL, Krynetski EY, Yates CR, Loennechen T, Fessing MY, Krynetskaia NF, et al 1996 Thiopurine-S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *Am J Hum Genet* 58:694-702.
15. Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG, Yanishevsky Y, Evans WE 1997 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* 94:6444-9.
16. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM 1990 Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 336:225-9.
17. Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H, Marteau P, Gendre JP, Bonaz B et al 2000 Genotypic analysis of thiopurine-S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology* 118:1025-30.
18. **KEARNS GL 1995 PHARMACOGENETICS AND DEVELOPMENT: ARE INFANTS AND CHILDREN AT INCREASED RISK FOR ADVERSE OUTCOMES? *CURR OPIN PEDIATR* 7:220-33.**
19. **GANIERE-MONTEIL C, PINEAU A, KERGUERIS MF, AZOULAY C, BOURIN M 1999 THIOPURINE METHYL TRANSFERASE ACTIVITY : NEW EXTRACTION CONDITIONS FOR HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC ASSAY. *J CHROMATOGR B* 727:235-9.**
20. Cazeneuve C, Pons G, Rey E, Treluyer JM, Cresteil T, Thiroux G et al 1994 Biotransformation of caffeine in human liver microsomes from fetuses, neonates, infants and adults. *Br J Clin Pharmacol* 37:405-12.
21. Pariente-Khayat A, Pons G, Rey E, Richard MO, D'Athis P, Moran C et al 1991 Caffeine acetylase phenotyping during maturation in infants. *Pediatr Res* 29:492-5.
22. Hadasova E, Brysova V, Kadlcakova E 1990 N-Acetylation in healthy and diseased children. *Eur J Clin Pharmacol* 39:43-7.
23. Jacqz-Aigrain E, Cresteil T 1992 Cytochrome P450-dependent metabolism of dextromethorphan: fetal and adult studies. *Dev Pharmacol Ther* 18:161-8.

24. Leeder JS, Kearns GL 1997 Pharmacogenetics in pediatrics Implications for practice. *Ped Clin North Am* 44:55-77.
25. Dervieux T, Medard Y, Verpillat P, Guignonis V, Duval M, Lescoeur B, Suciou S, Vilmer E, Jacqz-Aigrain E 2001 Possible implication of thiopurine S-methyltransferase in occurrence of infectious episodes during maintenance therapy for childhood lymphoblastic leukemia with mercaptopurine. *Leukemia* 15:1706-12.
26. Paerregaard A, Schmiegelow 2002 Monitoring azathioprine metabolite levels and thiopurine methyltransferase (TPMT) activity in children with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 37:371-2.
27. Smith L, Morris M, Wrong W 1997 Renal transplantation in children; the Auckland experience 1980-1996. *N Z Med J* 110:202-4.
28. Murphy LA, Atherton D 2002 A retrospective evaluation of azathioprine in severe childhood atopic eczema, using thiopurine methyltransferase levels to exclude patients at high risk of myelosuppression. *Br J Dermatol* 147:308-15.
29. Pacifici GM, Romiti P, Giliani L, Rane A 1991 Thiopurine methyltransferase in humans :
Developpement and tissue distribution. *Dev Pharmacol Ther* 17:16-23.
30. Ferroni MA, Marchi G, Sansone E, Romeo P, Giulianotti PC, Pietrabissa A, et al 1996 Variability in the rate of 6-mercaptopurine methylation in the erythrocytes, liver and kidney in an Italian population. *Eur J Clin Pharmacol* 51:23-29.
31. Keizer-Garritsen JJ, Brouwer C, Lambooy LH, Ter Riet p, Bokkerink JP, Trijbels FJ, De Abreu RA 2003 Measurement of thiopurine S-methyltransferase activity in human blood samples based on high-performance liquid chromatography: reference values in erythrocytes from children. *Ann Clin Biochem* 40:86-93.
32. Lennard L, Singleton HJ 1994 High-performance liquid chromatographic assay of red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *J Chromatogr B* 661:25-33.
33. Alves S, Amorim A, Ferreira F, Prata MJ 2001 Influence of the variable number of tandem repeats located in the promoter region of the thiopurine methyltransferase gene on enzymatic activity. *Clin Pharmacol Ther* 70:165-74.
34. Ameyaw MM, Collie-Duguid ES, Powrie RH, Ofori-Adjei D, McLeod HL 1999 Thiopurine methyltransferase alleles in British and Ghanaian populations. *Hum Mol Genet* 8:367-70.
35. Coulthard SA, Rabello C, Robson J, Howell C, Minto L, Middleton PG, et al 2000 A comparison of molecular and enzyme-based assays for the detection of thiopurine methyltransferase mutations. *Br J Haematol* 110:599-604.

36. Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Fazio F, Sergent E, Bernard C, Sabbagh N, et al 1999 Characterization of a variable number tandem repeat region in the thiopurine S-methyltransferase gene promoter. *Pharmacogenetics* 9:189-98.
37. Hon YY, Fessing MY, Pui Ch, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE 1999 Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Hum Mol Genet* 8:371-76.

Table I.

TPMT activity (nmol.h⁻¹.mL⁻¹ PRBC) in newborn, children and adult Caucasians

	Mean	<i>Standard deviation</i>
Cord Bloods (n=18)	17.48	4.04
Children (n=147)	18.62	4.14
Adults* (n=303)	19.38	4.09

* : the subject having a very low activity and genotyped as homozygous deficient is not included.

Table II.**Genotype frequencies in adults and children from 0 to 15 years.**

	Adults (n=304)			Children (n=164)		
	n	Frequency	(95% CI)	n	Frequency	(95% CI)
Homozygous mutant (*3A/*3A)	1	0.3	(0.0-2.3)	0	0	
Heterozygous *1/*3A	18	5.9	(2.9-10.2)	8	4.8	(1.5-10.5)
*1/*3C	2	0.7	(0.0-2.9)	2	1.2	(0-5.2)
* 1/*2	3	1.0	(0.1-3.4)	4	2.4	(0.3-7.1)
<i>TOTAL *1/M</i>	<i>23</i>	<i>7.6</i>	<i>(4.3-11.9)</i>	<i>14</i>	<i>8.5</i>	<i>(4.2-14.6)</i>
Homozygous wild-type*1/*1	280	92.1	(86.9-95.4)	150	91.5	(84.0-95.8)

n: number of subjects, 95% CI: 95% confidence interval, M: TPMT variant allele (TPMT*3A, TPMT*3C or TPMT*2)

Table III.

TPMT activity in the different age-groups.

	Cord Blood	4 months to 2 years	3 to 5 years	6 to 10 years	11 to 15 years
Number of children	15	21	47	45	23
TPMT activity (U/ml PRBC) mean	18.99	18.61	18.94	19.55	20.23
Standard deviation	2.24	4.53	3.50	2.63	4.07

Results are presented as mean and standard deviation

Figure legends

Figure 1.

Frequency distribution histogram of red blood cell TPMT activity

a: adult population (n = 304)

b: pediatric population and cord blood samples (n = 165)

Figure 2.

RBC TPMT activities according to age in the pediatric population and in cord blood (n=165).

Figure 3.

Relation between TPMT phenotype and genotype in Caucasians

a: 304 adults

b: 164 children/neonates

PARTIE IV

ETUDE DU METABOLISME DE LA 6-MERCAPTOPURINE DANS LA LEUCEMIE AIGUE LYMPHOBLASTIQUE DE L'ENFANT

I – LA LEUCEMIE AIGUE LYMPHOBLASTIQUE

La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) correspond à une **prolifération maligne du tissu hématopoïétique** caractérisée par une expansion clonale de cellules immatures de la lignée lymphoïde. La multiplication anarchique des cellules leucémiques inhibe la croissance des lignées hématopoïétiques normales. L'infiltration des organes périphériques par voie sanguine provoque un syndrome tumoral de degré variable.

C'est la plus fréquente des leucémies aiguës de l'enfant. La fréquence des leucémies aiguës est de 3 pour 100 000 habitants/an dans les pays occidentaux. Les leucémies aiguës lymphoblastiques sont moins fréquentes que les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), sauf chez l'enfant avant 15 ans.

Le **tableau clinique** au diagnostic associe le plus fréquemment une pancytopenie (pâleur, asthénie, syndrome hémorragique, état infectieux), un syndrome tumoral modéré atteignant les organes hématopoïétiques (adénopathie, hépatosplénomégalie), des douleurs osseuses spontanées (10% des cas) et de la fièvre (25% des cas). Les atteintes neurologiques initiales sont rares (5% des cas).

Concernant le **diagnostic hématologique**, l'hémogramme suffit le plus souvent à évoquer le diagnostic en montrant une anémie normochrome normocytaire arégénérative, une neutropénie, une thrombopénie et des cellules blastiques circulantes qui peuvent cependant manquer. Le myélogramme est indispensable pour confirmer le diagnostic et compléter le bilan : il permet de pratiquer le caryotype, la biologie moléculaire et l'immunophénotypage. Le frottis riche montre une infiltration avec plus de 30% de blastes sans grains.

Une **classification des LAL** est établie en fonction de la cytologie (classification FAB (Franco-American-British)), de l'immunophénotype, du caryotype et de la biologie moléculaire. Certains aspects biologiques correspondent à des tableaux cliniques et éventuellement à des pronostics particuliers.

- L'étude immunologique permet de préciser le type et le pronostic de la LAL. Les antigènes membranaires et intracytoplasmiques sont regroupés en clusters de différenciation (CD). En fonction des CD exprimés par les cellules leucémiques, on peut déterminer si les lymphoblastes appartiennent à la lignée B ou T et préciser leur stade de différenciation. L'immunophénotype est défini par l'ensemble des CD exprimés par les cellules leucémiques. Chez l'enfant, la majorité des LAL possèdent le marqueur CD 10 ou Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen (CALLA) et n'ont pas d'immunoglobuline intracytoplasmique. Ce phénotype est corrélé à un bon pronostic.
- Le caryotype est anormal dans 50% des cas environ et son résultat est indispensable pour la conduite à tenir ultérieure (intensification thérapeutique) il permet d'observer d'éventuelles anomalies numériques (hyperploïdie, hypoploïdie) et de structure. Certaines anomalies récurrentes sont associées à un mécanisme moléculaire connu et sont de mauvais pronostic.
- La biologie moléculaire permet de détecter les translocations ou mutations au niveau moléculaire lorsque le caryotype est un échec ou semble normal. Elle permet aussi de suivre la maladie résiduelle au cours des différentes phases du traitement.

Un certain nombre de **facteurs pronostiques** permettent de classer les patients en différents groupes au moment du diagnostic (groupes à risque élevé, intermédiaire, faible) et ainsi d'adapter l'intensité des traitements afin d'obtenir les meilleurs résultats.

- Les facteurs liés aux patients sont :

- o L'âge : la tranche d'âge associée au meilleur pronostic s'étend de 2 à 10 ans. Un âge situé au-delà de cet intervalle constitue un facteur de risque significatif.
- o Le sexe : les filles disposent en général d'un meilleur pronostic que les garçons.
- o L'ethnie : la race noire est associée à un mauvais pronostic.

- Les facteurs liés à la maladie sont :

- o Le taux de leucocytes : une hyperleucocytose > 50000 constitue un facteur défavorable
- o Le syndrome tumoral : son absence représente un élément de bon pronostic.

- L'immunophénotype : les LAL pré-B et pré-pré B s'associent à un meilleur pronostic, à l'inverse des LAL T.
- La cytogénétique : l'hyperploïdie (>50 chromosomes), la fusion TEL/AML1 (t(12 ;21)) ou l'anomalie dic (9 ; 12) représentent des éléments de bon pronostic. A l'inverse, la présence de réarrangements MLL (t(4 ; 11)), du chromosome Philadelphie ou d'une hypoploïdie constituent un facteur de risque important.
- La réponse précoce aux corticoïdes : la sensibilité aux corticoïdes est évaluée après 8 jours de traitement. La cortico-sensibilité constitue un facteur pronostique favorable.
- La réponse au traitement d'induction : l'obtention d'une rémission complète en fin d'induction (moins de 5% de blastes au niveau du myélogramme) et une maladie résiduelle négative en biologie moléculaire sont associées à un meilleur pronostic.

II – TRAITEMENT DE LA LEUCEMIE AIGÛ LYMPHOBLASTIQUE

II 1 – Généralités

LE TRAITEMENT DES LEUCEMIES LYMPHOBLASTIQUES A REPRESENTE LE PREMIER SUCCES DES CHIMIOETHERAPIES. C'EST AUSSI DANS LES LAL QUE SONT APPARUS, DANS LES ANNEES 60, LES PROTOCOLES MULTICENTRIQUES QUI ONT PERMIS DES PROGRES REGULIERS. ACTUELLEMENT CHEZ LES ENFANTS, LES TRAITEMENTS SONT ADAPTES AU PRONOSTIC DETERMINE AU DIAGNOSTIC ET A LA REPONSE THERAPEUTIQUE INITIALE. LES LAL DE RISQUE « STANDARD » SONT TRAITEES MOINS AGRESSIVEMENT QUE LES LAL « DE HAUT RISQUE ».

Traitement d'induction

Il a pour objectif de faire passer la masse des cellules leucémiques de l'organisme de 10^{12} à environ 10^9 cellules. La rémission complète est définie par un hémogramme normal avec une moelle de richesse normale comportant moins de 5% de blastes. A ce stade, la maladie n'est donc plus détectable cytologiquement, mais elle peut être détectée par les techniques de biologie moléculaire (maladie résiduelle). Les meilleurs résultats en terme d'obtention de rémission complète et de morbidité sont obtenus avec une polychimiothérapie associant vincristine, anthracyclines et corticoïdes. On peut y associer la cytarabine, le cyclophosphamide et l'asparaginase. On obtient avec ce type de traitement environ 70% de rémission complète. La rapidité d'obtention de celle-ci est un facteur pronostic majeur.

Traitement de postinduction

En l'absence de traitement après l'obtention de la rémission complète, la rechute est constatée généralement en quelques semaines. Ces traitements de postinduction comportent, de façon variable selon les âges, les types de pronostics et de protocoles, des phases de consolidation, de réinduction, de maintenance et de prévention des rechutes du système nerveux central. L'allogreffe représente une forme plus lourde de consolidation proposée dans les formes de très haut risque.

Consolidation ou intensification

CETTE PHASE DE TRAITEMENT VISE A ERADIQUER LES CELLULES LEUCEMIQUES RESIDUELLES. LES AGENTS UTILISES DANS LE TRAITEMENT DE CONSOLIDATION SONT LE METHOTREXATE A FORTE DOSE, LE CYCLOPHOSPHAMIDE, L'ASPARAGINASE, LA CYTARABINE ET L'ETOPOSIDE QUI N'ONT EN GENERAL PAS ETE UTILISES LORS DE L'INDUCTION. ILS PEUVENT ETRE ASSOCIES A LA 6-MERCAPTOPYRIMIDINE. CE TRAITEMENT DURE 1 A 3 MOIS APRES LE TRAITEMENT D'INDUCTION ET EST GENERALEMENT MOINS INTENSIF.

L'intensification est une phase de chimiothérapie lourde, similaire à l'induction. Elle est réalisée précocement après la rémission complète. Sa modalité est discutée et semble dépendre des facteurs pronostiques initiaux.

Chez l'enfant, les résultats se sont considérablement améliorés avec l'utilisation de méthotrexate à forte dose (3 à 8 g/m²) suivi d'acide folinique et des protocoles d'intensification thérapeutique.

Traitement de maintenance

LE TRAITEMENT DE MAINTENANCE EST INDISPENSABLE. IL UTILISE UNE CHIMIOETHERAPIE A FAIBLE DOSE, CONTINUE, NON APLASIANTE, EN AMBULATOIRE. LA PHASE DE MAINTENANCE DURE 18 MOIS A 2 ANS AVEC UN PROTOCOLE INCLUANT GENERALEMENT :

- Mercaptopurine par voie orale, en traitement journalier,
- Méthotrexate par voie orale, une fois par semaine,
- Un corticoïde (prednisone ou dexaméthasone) 5 à 7 jours par mois pendant un an,
- Une injection de vincristine mensuelle pendant la première année.

La mercaptopurine prise de façon quotidienne joue donc un rôle essentiel dans la réussite du traitement de maintenance.

Prophylaxie neuro-méningée

AUJOURD'HUI, LA PREVENTION DES ATTEINTES NEURO-MENINGEES FAIT PARTIE INTEGRANTE DU TRAITEMENT. EN EFFET, LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL CONSTITUE UN SITE SANCTUAIRE POUR LES CELLULES LEUCEMIQUES, LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE S'OPPOSANT A LA PENETRATION DES ANTICANCEREUX.

L'IRRADIATION CRANIENNE, LONGTEMPS UTILISEE COMME PROPHYLAXIE DE REFERENCE, PROVOQUE DE NOMBREUX EFFETS INDESIRABLES GRAVES (ANOREXIE, TROUBLES HEMATOLOGIQUES, TUMEURS CEREBRALES RADIO-INDUITES, PROBLEMES NEUROENDOCRINIENS) ASSOCIES A DES SEQUELLES (RETARD STATURO-PONDERAL, RETARD INTELLECTUEL ET NEUROPSYCHIQUE). CE TRAITEMENT EST DONC RESERVE AUX PATIENTS AYANT UNE ATTEINTE NEURO-MENINGEE DECLAREE OU UN RISQUE TRES ELEVE.

ACTUELLEMENT, LA PROPHYLAXIE REPOSE SUR 2 PROTOCOLES GENERALEMENT ASSOCIES AFIN D'OBTENIR LE MAXIMUM D'EFFICACITE :

- Des injections intrathécales de méthotrexate (MTX), parfois associées à d'autres anticancéreux (corticoïde, ou corticoïde et aracytine), accompagnées d'une chimiothérapie systémique intensive.
- L'administration de hautes doses de MTX (3 à 8 g/m²) en IV. Cette méthode présente une efficacité comparable à celle de l'injection intrathécale, avec cependant moins d'effets indésirables. Elle permet également une prophylaxie des rechutes testiculaires (autre sanctuaire) et médullaires.

Greffes de moelle

LA GREFFE DE MOELLE EST ENVISAGEE DES LA PREMIERE REMISSION COMPLETE DES PATIENTS A RISQUE TRES ELEVE, LORSQU'IL EXISTE UN DONNEUR HLA IDENTIQUE DANS LA FRATRIE.

EN L'ABSENCE DE DONNEUR FAMILIAL, D'AUTRES TYPES DE GREFFE PEUVENT ETRE ENVISAGES : GREFFES REALISEES A PARTIR DE DONNEURS HLA IDENTIQUES NON APPARENTES PROVENANT DE FICHIERS NATIONAUX OU INTERNATIONAUX DE DONNEURS VOLONTAIRES DE MOËLLE, ALLOGREFFES A PARTIR D'UN SANG DE CORDON, ALLOGREFFES GENO-IDENTIQUES (UTILISATION DE SANG DE CORDON HLA COMPATIBLE).

II 2 – PROTOCOLES DE TRAITEMENT UTILISES

Après le diagnostic, dès que les principaux facteurs pronostics sont connus, les enfants sont inclus dans un protocole de traitement. Lorsque nous avons débuté l'étude en 1999, le protocole en vigueur était le protocole EORTC 58881. Par la suite, c'est le protocole FRALLE 2000 qui a été appliqué. Les enfants ayant moins d'un an au diagnostic sont inclus dans le protocole INTERFANT.

Au niveau de la phase de maintenance, le traitement diffère assez peu d'un protocole à l'autre. L'adaptation de posologie de la 6-MP n'est pas la même dans le protocole EORTC 58881 et FRALLE 2000 :

- Dans le protocole EORTC 58881, l'adaptation de posologie est réalisée en fonction de la leucocytose : le but est de maintenir la leucocytose entre 2 et $3.10^9/L$. La posologie de base est de 50 mg/m^2 , qui correspond à une posologie de 100%. La règle appliquée fait l'objet du tableau V. La posologie du méthotrexate est de 20 mg/m^2 et reste inchangée.

Tableau V : Adaptation de la posologie de 6-MP dans le protocole EORTC 58881

nombre de leucocytes $.10^9/L$	% de la posologie de 6-MP
< 1	0
1 – 1,999	50
2 – 2,999	100
3 – 3,999	125
4 ou plus	150 ou plus

- Dans le protocole FRALLE 2000, l'objectif est de maintenir le nombre de polynucléaires neutrophiles (PNN) entre 0,8 et $1,2.10^9/L$ sans lymphopénie $< 0,5.10^9/L$ ni cytolysse sévère (SGPT < 10 fois la normale (10N)), en adaptant la posologie à la fois du méthotrexate (MTX) et de la 6-MP selon le tableau VI. La posologie de base de 6-MP est de 75mg/m^2 et de MTX 20 mg/m^2 .

Tableau VI : Adaptation de la posologie de 6-MP et de MTX dans le protocole FRALLE 2000

SGPT		
< 5N	entre 5 et 10N	> 10N

PNN	<500/mm³	ARRET du ttt (1 semaine)	ARRET du ttt (1 semaine)	ARRET du ttt (1 semaine)
	entre 500 et 800	Ne pas arrêter le ttt Baisser d'1/3 6-MP et MTX	Baisser d'1/3 le 6-MP et arrêter le MTX en cas d'hépatite clinique	ARRET du ttt (1 semaine)
	entre 800 et 1200	Ne pas modifier le ttt	Ne pas modifier le ttt	ARRET du MTX (1 semaine)
	> 1200/mm³	Augmenter d'1/4 6-MP et MTX	Diminuer le MTX d'1/3 en cas d'hépatite clinique	ARRET du MTX (1 semaine)

III – ETUDE REALISEE

III.1 – Objectifs

L'objectif de cette étude était le suivi du métabolisme de la 6-mercaptopurine au sein d'une population d'enfants atteints de LAL, au cours de leur traitement de maintenance.

Les moyens utilisés étaient la détermination du phénotype et du génotype de la TPMT au diagnostic de la leucémie, associée à la mesure de l'activité TPMT et des métabolites intraérythrocytaires de la 6-MP au cours de la phase de maintenance.

Nous nous proposons de répondre aux questions suivantes :

- Quel bénéfice peuvent apporter les différentes analyses réalisées, pour le suivi médical du patient ?
- Au diagnostic, l'activité TPMT est-elle toujours diminuée en présence d'une anémie ?
- Dans quelle proportion l'enzyme TPMT est-elle induite lors de la prise régulière de 6-MP ?
- Dans quelle proportion varient les métabolites de la 6-MP ?
- Comment se comportent les enfants porteurs d'un polymorphisme de la TPMT ?

III.2 – Description de la population

Au moment du bilan, 54 enfants traités au CHU de Nantes pour une leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) ont été inclus dans le protocole.

Tous les parents ont pris connaissance de la lettre d'information et ont signé le consentement éclairé (annexe 10). Le protocole a reçu un avis favorable du Comité Consultatif de Protection des Personnes se prêtant à la Recherche Biomédicale (CCPPRB) n° 2 de la région des Pays de Loire.

Les caractéristiques descriptives de cette population sont les suivantes :

- 28 filles, 26 garçons, tous caucasiens,
- L'âge au diagnostic varie de 3 mois à 19 ans, moyenne 6,9 ans avec un écart type de 5,2.
- Type de leucémie : 48 LAL B, 6 LAL T
- Facteurs pronostics :
 - Caryotype (4,11) ou Philadelphie : 1 patient
 - Corticosensibilité à J8 : 41 corticosensibles, 6 corticorésistants, 7 non cortico-évaluables
 - Rémission complète à J 35 : 51 enfants
1 enfant non testé (diagnostic récent)
 - Maladie résiduelle à J 35 : négative : 44 positive : 6,
non évaluable : 1 résultat non reçu : 3
 - Leucocytose au diagnostic > 50000 : 12 enfants
< 50000 : 42 enfants

Stade de traitement des patients au moment du bilan :

- Traitement terminé avec rémission complète persistante : 8 patients.
- En cours de maintenance : 27 enfants
- En cours d'induction : 14 patients
- Sortis du protocoles pour une allogreffe : 4 enfants
- 1 patiente décédée quelques mois après le début de l'induction.

Protocoles de traitement des patients :

Les 9 premiers patients ont été inclus dans le protocole EORTC 58881. Tous les autres sont traités selon le protocole FRALLE 2000, sauf 2 dont l'âge au diagnostic est inférieur à 1 an et qui, de ce fait, sont inclus dans le protocole INTERFANT.

III 3 – Tests statistiques

Les tests utilisés sont des tests paramétriques pour les grands échantillons ($n > 30$) selon le théorème central limite : coefficient de corrélation r de Pearson, test t de comparaison de moyennes.

Nous avons eu recours aux tests non paramétriques pour des échantillons dont la taille est inférieure à 30 et pour l'analyse des dérivés méthylés, variable pour laquelle on observe manifestement une absence de normalité dans la distribution : coefficient de corrélation de Spearman, test U de Mann et Whitney.

IV – RESULTATS

IV 1 – Génotypes TPMT

Pour 11 enfants, le prélèvement pour le génotype n'a pas encore été effectué.

Sur 43 génotypes, 39 (90,7%) sont homozygotes « sauvages » et 4 (9,3%) sont hétérozygotes, tous *1/*3A. Aucun n'est homozygote muté.

IV 2 – Activité TPMT

L'activité TPMT au diagnostic a été mesurée chez 35 patients. Pour certains enfants le dosage n'a pas pu être réalisé, en particulier lorsque les patients avaient été transfusés avant leur arrivée au CHU. Les valeurs d'activité TPMT sont comprises entre 7,3 et 23,4 nmol/h/mL PRBC avec une moyenne de 14,8 (Tableau V). L'histogramme de fréquence (Figure 11) montre la répartition de l'activité TPMT avec une tendance à une activité plus faible au diagnostic de LAL (a) que pour les enfants de la population de référence (b). La comparaison des résultats montre effectivement une activité TPMT significativement plus faible chez les enfants leucémiques au diagnostic ($p < 0,001$), avec une diminution moyenne de 20,4% par rapport à la population de contrôle.

Tableau V : Activités TPMT des enfants de la population de référence (n = 147) et des enfants atteints de LAL, au diagnostic (n = 35) et au cours du traitement de maintenance (n = 35).

	Activité TPMT (nmol/h/mL PRBC)	
	Moyenne \pm écart type	Valeurs extrêmes
LAL au diagnostic (n = 35)	14,8 \pm 4,2	7,3 – 23,4
Population d'enfants de référence (n = 147)	18,2 \pm 4,1	8,2 – 30,0
LAL en maintenance (n = 35)	23,7 \pm 4,49	11,6 – 30,2

Si l'on prend en compte l'antimode déterminé pour la population de référence qui a une valeur de 13,5 :

- 13 patients ont une TPMT > 13,5 et ont tous un génotype *1/*1,
- 11 patients ont une TPMT \leq 13,5 dont 9 ont un génotype *1/*1, et 2 ont un génotype *1/*3A. Ces patients hétérozygotes ont les valeurs de TPMT les plus basses : 7,3 et 9,6.

On voit donc que si l'on considère l'antimode habituel, 9 patients (soit 37,5%) auraient une activité TPMT classée « intermédiaire » au diagnostic alors qu'ils n'ont pas de mutation *3A *3B *3C *2.

Les enfants atteints de LAL, ayant souvent au diagnostic une anémie importante, nous avons recherché s'il existait une corrélation entre l'activité TPMT et les valeurs de l'hémogramme le jour du prélèvement. Mais nous n'avons retrouvé aucune corrélation entre l'activité TPMT et, d'une part, le nombre de globules rouges ($p = 0,713$) et, d'autre, part le taux d'hémoglobine ($p = 0,992$) chez les patients génotypés *1/*1 (n = 22).

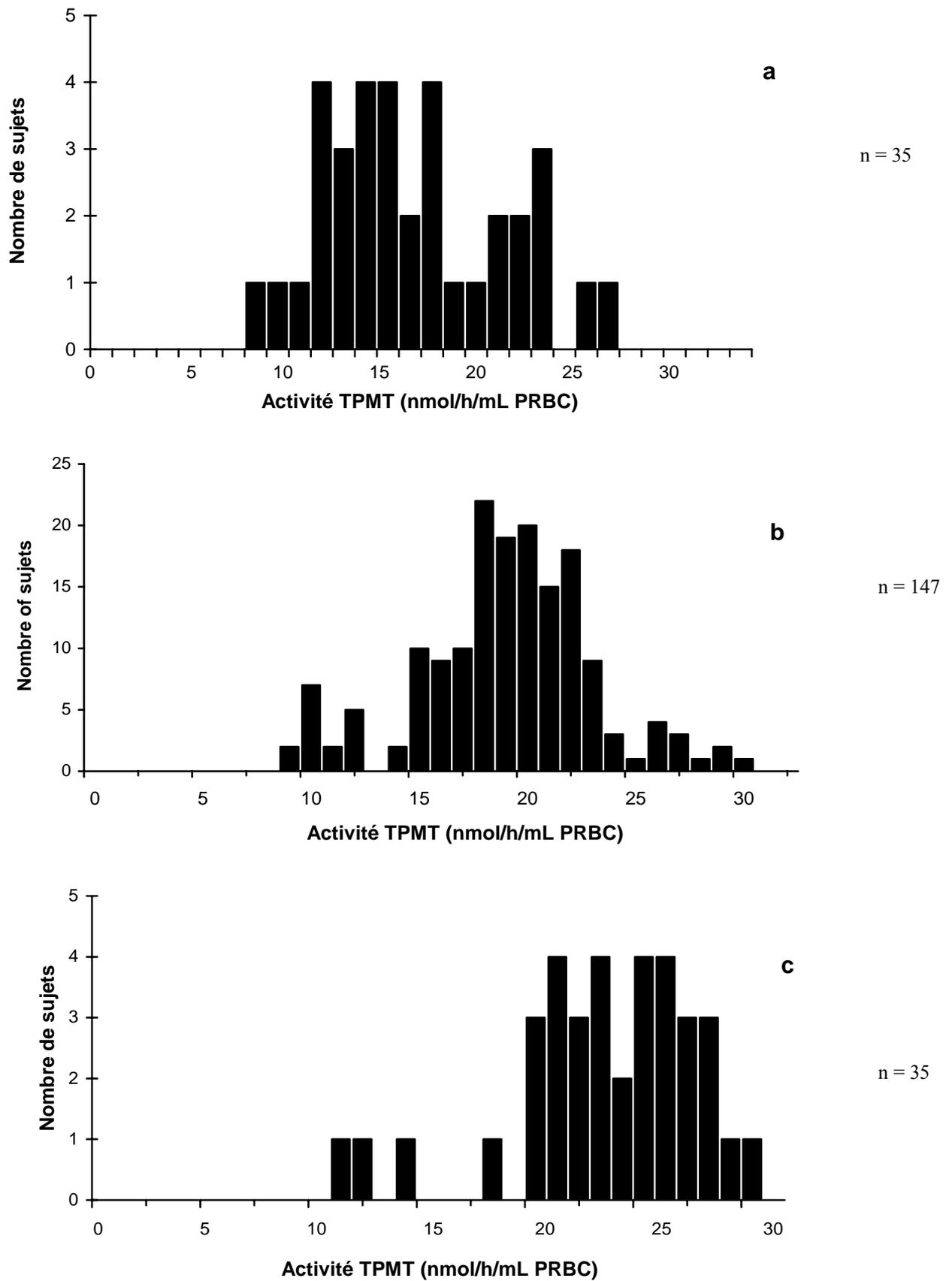


Figure 11 : Répartition de l'activité TPMT chez les enfants atteints de LAL, au diagnostic (a), au cours du traitement de maintenance (c), chez les enfants de la population de référence (b).

Au cours du traitement de maintenance, plusieurs mesures de l'activité TPMT ont été effectuées pour chaque patient (de 1 à 11). Nous n'avons pas observé d'augmentation régulière de l'activité TPMT tout au long du traitement d'entretien. Chez certains patients, l'activité TPMT est assez stable tout au long du traitement, chez d'autres elle est un peu plus variable. Nous avons calculé, pour chaque patient, une valeur moyenne de l'activité TPMT au cours de la phase de maintenance. Ces valeurs sont comprises entre 11,6 et 30,2 avec une moyenne de 23,7 (Tableau V). La répartition des résultats est représentée par l'histogramme de fréquence (Figure 11). Les valeurs d'activité TPMT sont significativement plus élevée chez les patients traités par 6-MP ($n = 35$) que dans la population d'enfants de référence ($n = 147$) ($p < 0,001$). L'augmentation moyenne de l'activité TPMT au cours du traitement est de 27,4%.

IV 3 – Métabolites de la 6-MP :

Les TGNs ont été mesurés plusieurs fois pour chaque patient (de 1 à 10) au cours du traitement de maintenance, chez 34 patients. Les valeurs retrouvées varient de 32 à 631 pmol/8.10⁸ GR avec une moyenne de 226 et un écart type de 109 ($n = 173$).

Les résultats des dérivés méthylés sont compris entre 51 et 32499 pmol/8.10⁸ GR avec une moyenne de 5546 et un écart type de 6129 ($n = 174$). La figure 12 montre la répartition des résultats de TGNs (a) et de dérivés méthylés (b).

Les enfants ayant un génotype TPMT *1/*1 ont des TGNs plus faibles que les enfants ayant un génotype TPMT *1/*3A (médianes respectives 204 ($n = 157$) versus 350 ($n = 16$) ; $p < 0,001$). A l'inverse, les résultats des dérivés méthylés sont plus élevés chez les patients génotypés *1/*1 que chez les patients hétérozygotes (médianes respectives 5015 ($n = 158$) versus 271 ($n = 16$) ; $p < 0,001$).

Une patiente a des résultats de TGNs et dérivés méthylés inférieurs à la limite de détection de la méthode. Cela signifie une absence d'observance du traitement. Les résultats des dosages n'ont pas été pris en compte dans l'étude, ni pour les métabolites de la 6-MP, ni pour l'activité TPMT au cours du traitement de maintenance.

Nous avons mis en évidence une corrélation inverse entre les TGNs et l'activité TPMT au cours du traitement de maintenance ($p < 0,001$) (Figure 13). Par contre nous n'avons pas retrouvé de corrélation significative entre les TGNs et les dérivés méthylés ($p = 0,111$), d'une part, et l'activité TPMT pendant la maintenance et les dérivés méthylés ($p = 0,319$), d'autre part. La figure 13 montre les représentations graphiques des résultats, les valeurs retrouvées chez les patients hétérozygotes sont en noir, pour les différencier de celles des patients homozygotes.

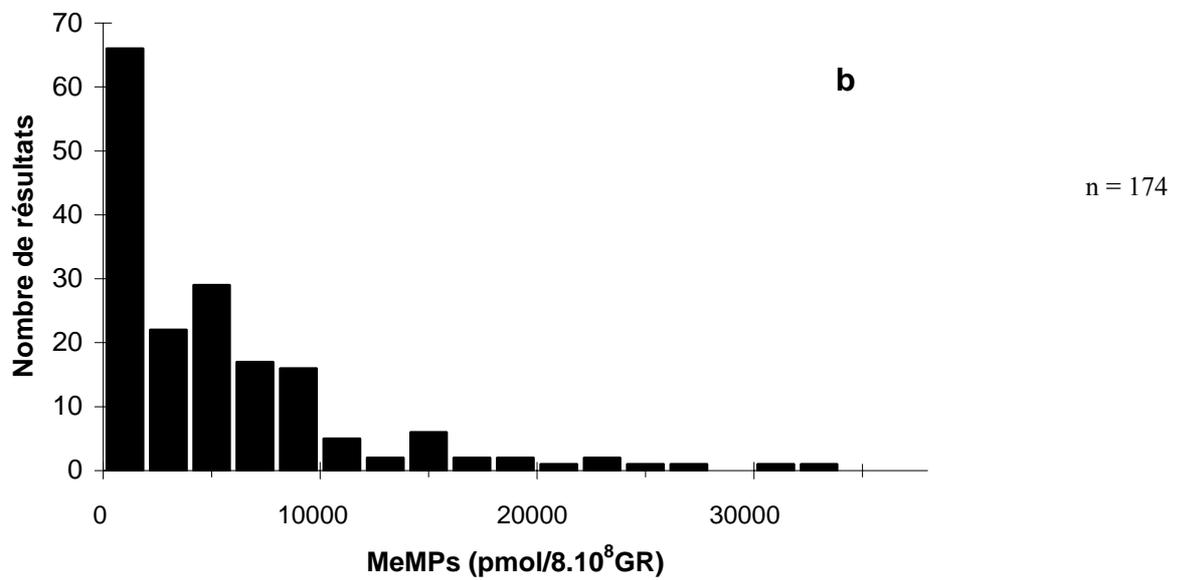
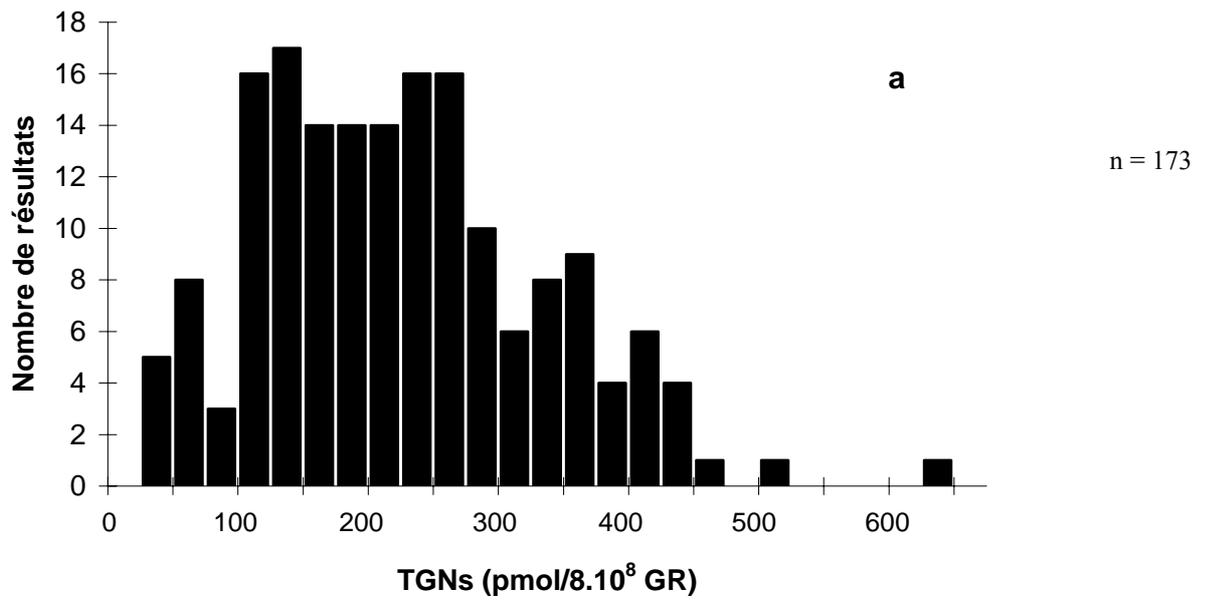


Figure 12 : Répartition des résultats de TGNs (a), des dérivés méthylés (b).

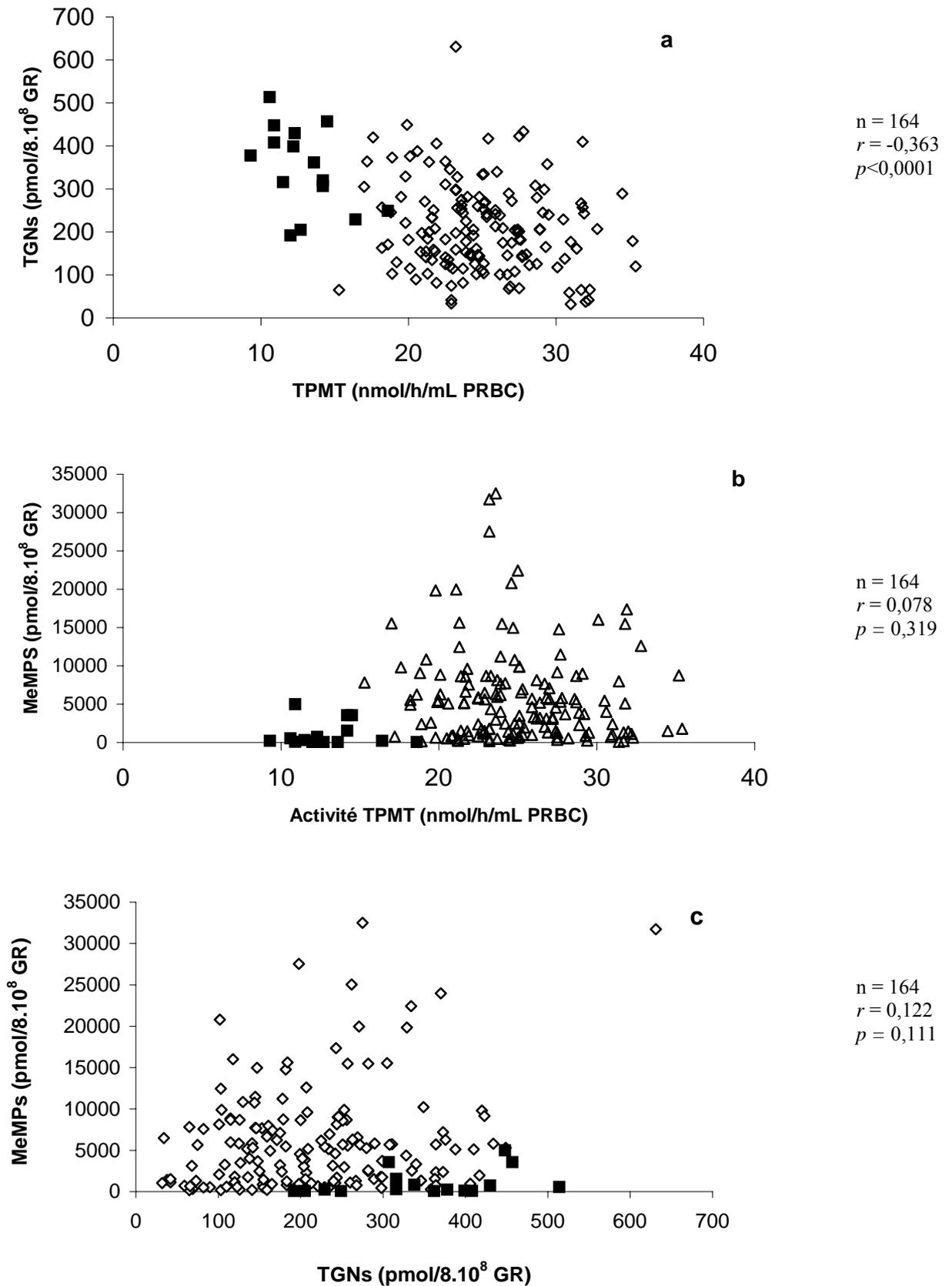


Figure 13 : Représentation graphique des relations entre l'activité TPMT et les métabolites de la 6-MP mesurés pendant la phase de maintenance : (a) variation des TGNs en fonction de l'activité TPMT (b) variation des dérivés méthylés en fonction de l'activité TPMT (c) variation des dérivés méthylés en fonction des TGNs.

L'efficacité du traitement est évaluée par la diminution du nombre de leucocytes au niveau sanguin, notamment les polynucléaires neutrophiles (PNN). Nous avons comparé le résultat des métabolites de la 6-MP avec les numérations correspondants à J15 et J30 (respectivement 15 jours et 30 jours après le prélèvement pour le dosage des métabolites de la 6-MP).

TGNs

Pour l'ensemble des leucocytes, une corrélation inverse a été retrouvée à la fois à J15 et J30 avec un niveau de significativité plus important à J30 :

J30 : $r = -0,300$ $p = 0,0003$ $n = 139$
J15 : $r = -0,249$ $p = 0,006$ $n = 122$

Pour les PNN, la corrélation inverse est significative à J30 avec un niveau de significativité plus faible à J15 :

J30 : $r = -0,333$ $p < 0,0001$ $n = 139$
J15 : $r = -0,211$ $p = 0,019$ $n = 122$

Pour les plaquettes, on observe aussi une diminution du nombre de plaquettes avec l'augmentation des TGNs, avec un niveau de significativité important à la fois à J30 et J15 :

J30 : $r = -0,262$ $p = 0,002$ $n = 139$
J15 : $r = -0,310$ $p = 0,0005$ $n = 122$

Pour les GR, la corrélation est non significative à J30 ($p = 0,152$), mais significative à J15 :

J15 : $r = -0,180$ $p = 0,047$ $n = 122$

Pour l'hémoglobine, il n'y a pas de corrélation significative, ni à J15 ($p = 0,138$), ni à J30 ($p = 0,152$).

Dérivés méthylés

Nous n'observons aucune corrélation significative à J30.

A J15 seule la corrélation inverse avec les GR est significative :

J15 : $r = -0,187$ $p = 0,037$ $n = 124$

IV 4 – Comportement des enfants hétérozygotes :

La posologie de base de 6-MP durant le traitement de maintenance est de 75 mg/m². Rétrospectivement, nous avons constaté que les enfants hétérozygotes avaient reçu une posologie correspondant à 20 à 60% de la posologie de base, alors que, chez les enfants homozygotes *1/*1, cette même proportion est voisine de 90 à 100%.

Aucun épisode de neutropénie sévère, ayant entraîné une hospitalisation, n'a été enregistré chez les patients hétérozygotes. Ceci est vraisemblablement dû à un réajustement de posologie constant au cours du traitement, consécutif à des numérations/formules réalisées toutes les 2 semaines, ou plus fréquemment si nécessaires.

V – DISCUSSION

Après avoir étudié le polymorphisme de la TPMT au sein d'une population de référence, nous avons choisi d'évaluer ses conséquences en clinique chez des patients traités par 6-MP. Un suivi du métabolisme de la 6-MP a été réalisé chez des enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique au cours de leur traitement de maintenance, associé à une évaluation de leur « statut » TPMT si possible avant le début du traitement.

Dans cette population, 43 patients ont été génotypés. La proportion d'enfants hétérozygotes (9,3%) est assez voisine de celle retrouvée dans la population caucasienne de référence (7,9%). Le polymorphisme *3A retrouvé chez ces 4 patients est le plus fréquent chez les Caucasiens.

L'activité TPMT au diagnostic est 20,4% plus faible que pour la population de référence. La comparaison phénotype-génotype montre une activité TPMT < 10,0 chez les patients hétérozygotes (n = 2) et une activité TPMT > 10,0 chez tous les patients homozygotes « sauvages » (n = 22). Il ne semble pas y avoir de chevauchement entre les 2 populations, mais le nombre de patients peu important impose une prudence quant aux conclusions. On peut cependant noter que 37,5% des patients ont une activité TPMT < 13,5 (l'antimode de la population de référence) associé à un génotype *1/*1. 37,5% des patients auraient été classés comme déficients si nous n'avions pas réalisé le génotype. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lennard *et al.* (2001) qui ont enregistré une diminution de la médiane de 4,5 unités entre les TPMT au diagnostic et chez des enfants de leur population de contrôle. Ils ont aussi montré que l'activité TPMT est significativement plus importante pour des globules rouges (GR) jeunes que pour des globules rouges âgés. En effet, les érythrocytes circulants ne constituent pas une population homogène. Leur durée de vie est d'environ 120 jours et, au cours de ce laps de temps, se produit un processus de vieillissement. L'anémie observée au moment du diagnostic de LAL chez les enfants est due à un déficit de production de GR par les tissus hématopoïétiques. Les enfants ont donc certainement une majorité de GR circulants âgés. Lennard *et al.* (2001) stipulent que le fait que l'activité TPMT soit faible au diagnostic de la LAL est certainement dû, au moins en partie, à un excès de GR âgés chez ces patients. En considérant que l'anémie se traduit par un faible taux d'hémoglobine, souvent associé à un nombre de GR insuffisant, nous avons recherché une corrélation entre ces 2 paramètres et l'activité TPMT, chez les patients homozygotes *1/*1 (n = 22). Les résultats ont montré une absence de corrélation significative. L'ensemble de ces données montre que le « statut » TPMT du patient ne peut pas être déterminé par le phénotype au moment du diagnostic, mais uniquement par le génotype. Les phases d'intensification et de consolidation comprenant généralement de la 6-TG et/ou de la 6-MP, il est important de connaître dès le début du traitement quels sont les patients les plus à risque d'une hématotoxicité due à la chimiothérapie.

L'activité TPMT au cours du traitement de maintenance est plus élevée que pour la population de référence. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lennard *et al.* (1990) qui l'avaient déjà observé et qui avaient aussi montré que, après la fin du traitement, l'activité TPMT revient à des valeurs similaires à celles de la population de contrôle. L'activité TPMT subit certainement une induction enzymatique en présence de 6-MP (Lennard *et al.*, 1990), dont le mécanisme n'a pas été élucidé (Krynetsky *et al.*, 2000). Il faut noter que, lors de cette induction, les patients ayant des valeurs de TPMT faibles du fait de la présence d'un polymorphisme ont, encore en maintenance, des valeurs de TPMT plus faibles que les patients homozygotes.

Les valeurs mesurées des métabolites sont en accord avec les résultats de la littérature (Innocenti *et al.*, 2000, pour les TGNs ; Lennard *et al.*, 1990, pour les dérivés méthylés). Comme prévu, les patients hétérozygotes ont des valeurs de TGNs élevées associés à de faibles MeMPS.

Nos résultats montrent une corrélation significative entre les valeurs élevées de TGNs et de faibles TPMT. Ceci est en accord avec les résultats de Lennard *et al.* (1990) et Dervieux *et al.* (2001b). Cette corrélation montre le rôle majeur joué par la TPMT dans l'effet anti-leucémique, puisque les TGNs ont un effet antiprolifératif par incorporation dans l'ADN au niveau des cellules cibles.

Par contre, nous ne retrouvons pas de corrélation significative entre les TGNs et les dérivés méthylés. Le rôle *in vivo* des dérivés méthylés est longtemps resté hypothétique, bien que l'inhibition de la synthèse *de novo* des purines (DNPS) *in vitro* par ces produits soit reconnue. La conséquence de l'inhibition de la DNPS est une déplétion en purine, conduisant à une inhibition de synthèse de l'ADN, une diminution de la prolifération cellulaire et une cytotoxicité. Récemment, Dervieux *et al.* (2001) ont montré *in vitro*, sur des cellules leucémiques humaines, que les dérivés méthylés contribuent à l'action antiproliférative de la 6-MP, vraisemblablement par l'inhibition de la synthèse *de novo* des purines.

Le véritable site d'action de la chimiothérapie est constitué par les lymphocytes résiduels de la moelle osseuse. Ces cellules n'étant pas facilement accessibles, l'efficacité du traitement est mesurée par la diminution du nombre de cellules sanguines, notamment les leucocytes et PNN. La comparaison des numérations à J15 et J30 avec les résultats de TGNs montre une meilleure efficacité à J30 qu'à J15 pour les leucocytes et PNN. A l'inverse, la diminution des plaquettes et des GR est plus importante à J15 qu'à J30. L'absence de corrélation avec l'hémoglobine s'explique par le fait que l'augmentation du volume corpusculaire pendant la maintenance est responsable du maintien des concentrations d'hémoglobine dans des limites normales. Innocenti *et al.* (2000) trouvent une efficacité maximum du traitement à J14

(diminution des leucocytes et PNN avec corrélation significative), mais n'ont pas testé J30. Nos résultats ne sont pas en contradiction avec cette étude, puisqu'à J15 la diminution des leucocytes et PNN est significative. Cependant, nos résultats montrent un délai d'action et une durée d'action plus longue des TGNs. Ces résultats peuvent s'expliquer par une accumulation lente des TGNs dans les cellules cibles. En effet, Lennard et Lilleyman (1989a) ont montré que l'accumulation des TGNs dans les globules rouges est déjà importante à J14, mais chez certains patients, elle n'est pas achevée avant J28.

Les dérivés méthylés ne montrent aucune corrélation significative avec la leucocytose et les PNN (réponse au traitement). Cette absence de corrélation peut signifier que, *in vivo*, l'inhibition de la DNPS seule, exercée par les dérivés méthylés, est insuffisante pour entraîner un effet cytotoxique sur les leucocytes et PNN. Cependant, les dérivés méthylés jouent, au niveau cellulaire, un rôle majeur en augmentant l'incorporation des TGNs dans l'ADN (Bo *et al.*, 1999, Andersen *et al.*, 1998).

Pour l'effet anticancéreux, il faut aussi prendre en compte l'administration concomitante du MTX, qui agit par transformation en polyglutamates-MTX, métabolites actifs, et qui augmentent les concentrations intracellulaires de TGNs (Dervieux *et al.*, 2002b). Tout ceci montre que les mécanismes d'action anticancéreux sont multiples et complexes.

Relling *et al.* (1999a) ont montré que seules les posologies les plus élevées de 6-MP et de MTX sont prédictives des EFS (Survie sans événement) les plus élevées et que la survenue de neutropénie est associée à un mauvais pronostic pour la LAL de l'enfant. Si l'on augmente trop l'intensité de la chimiothérapie, on peut provoquer une neutropénie qui aboutira à l'effet inverse de celui recherché. La marge de posologie entre toxicité et efficacité est donc étroite. Compte tenu de la connaissance de l'ensemble des mécanismes d'action et de l'index thérapeutique étroit de la 6-MP, l'adaptation de posologie de la 6-MP continuera d'être réalisée à l'aide des leucocytes et/ou PNN. Le dosage des métabolites actifs de la 6-MP renseigne le clinicien sur l'observance du traitement et la métabolisation de la 6-MP par le patient.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis une étude approfondie du polymorphisme génétique de la TPMT et de ses conséquences en clinique.

Après une mise au point des techniques analytiques destinées à l'exploration de ce métabolisme, l'étude d'une population de référence d'enfants a permis une comparaison de ce polymorphisme avec celui d'une population de référence d'adultes, les analyses étant réalisées dans les mêmes conditions. Nous avons mis en évidence une légère diminution de l'activité TPMT chez l'enfant par rapport à l'adulte, vraisemblablement sans conséquence clinique. Mais surtout, nous avons montré l'absence d'impact de l'ontogenèse sur l'activité TPMT, justifiant l'absence d'adaptation de posologie des thiopurines chez les très jeunes enfants. En effet, les leucémies aiguës lymphoblastiques peuvent débiter chez des enfants de moins de 3 ans et le protocole de traitement comportera de la 6-MP.

L'étude génotypique a permis de déterminer les fréquences des différents génotypes et les fréquences des allèles au sein d'une population Caucasienne comportant un nombre important de sujets. La comparaison phénotype-génotype a montré une bonne corrélation dans plus de 95% des cas. Cependant, il existe une zone d'incertitude d'activité TPMT à la limite entre les patients hétérozygotes et homozygotes sauvages. Cette zone se situe dans une zone de valeurs inférieure à l'antimode et comporte une majorité de patients hétérozygotes et quelques patients homozygotes sauvages. Il est intéressant de constater que les cas rapportés de discordance phénotype-génotype ont toujours un phénotype intermédiaire associé avec un génotype homozygote sauvage. Ces cas sont assez rares. Tout ceci nous permet une meilleure connaissance de ce polymorphisme et nous donne une vue d'ensemble conséquente de la population Caucasienne, pour déterminer par la suite le statut TPMT de nouveaux patients, avant le début de leur traitement.

En oncologie, l'étude a montré un rôle majeur de la TPMT dans la formation des TGNs, métabolites actifs de la 6-MP, et une relation entre les métabolites et l'effet antileucémique mesuré par la diminution des leucocytes et des polynucléaires neutrophiles. Un délai d'un mois semble être nécessaire à l'efficacité maximum des TGNs, lors d'une administration quotidienne de 6-MP. L'étude se poursuit pour inclure quelques patients supplémentaires et suivre le traitement de maintenance des patients dont le diagnostic a été posé il y a quelques mois. Ce bilan a permis d'ores et déjà de voir que certaines analyses ont peu d'intérêt dans la pratique courante du suivi médical du patient, notamment l'activité TPMT au diagnostic et en maintenance. Mais la détermination du génotype au diagnostic ainsi que quelques mesures de métabolites de 6-MP pendant la maintenance peuvent être poursuivies. Le suivi des patients inclus continuera après la fin du traitement pour essayer d'évaluer si les métabolites de la 6-MP ont un impact sur d'éventuelles rechutes.

En dehors de l'étude, une demande de dosages a émané de certains services hospitaliers. Les méthodes de dosage ayant été mises au point, nous avons pu répondre favorablement à leur attente. Ces applications se sont traduites par une détermination de l'activité TPMT pour certains patients atteints de pathologie inflammatoire rhumatoïdale. Les cliniciens souhaitent savoir si les patients ont un risque élevé d'hématotoxicité avant de débiter un traitement par azathioprine.

En gastro-entérologie, des dosages de TGNs ont été effectués pour les patients atteints de maladie inflammatoire chronique de l'intestin nonrépondeurs au traitement par azathioprine. Les cliniciens vérifient ainsi la compliance au traitement. Ils s'assurent aussi que le résultat de TGNs est situé loin de la zone toxique, pour pouvoir ensuite augmenter la posologie. Le bilan des résultats obtenus chez une quarantaine de ces patients a permis la rédaction d'un poster :

A. Bourreille, M. Doubremelle, C. Ganiere-Monteil, J.P. Galmiche.

Should 6-thioguanine nucleotides be monitored in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine ?

Francophones de Gastro-entérologie, Paris, Mars 2003.

Un certain nombre de questions se pose encore quant à la relation concentration en TGNs-efficacité, pour les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. De plus, chez certains de ces patients, l'augmentation de posologie n'est pas toujours suivie d'une augmentation des TGNs, mais parfois uniquement d'une augmentation des dérivés méthylés (2 patients). La mesure de l'activité TPMT, chez ces patients, apporterait peut-être une réponse à la compréhension de ce phénomène.

REFERENCES

- Allan PW, Bennett LL. 6-methylthioguanilic acid, a metabolite of 6-thioguanine. *Biochem Pharmacol*, 1971, 20, 847.
- Ameyaw MM, Collie-Duguid ES, Powrie RH, Ofori-Adjei D, McLeod HL. Thiopurine methyltransferase alleles in British and Ghanaian populations. *Hum Mol Genet*, 1999, 8, 367-370.
- Ames MM, Selassie CD, Woodson LC, Van Loon JA, Hansch C, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase: structure-activity relationships for benzoic acid inhibitors and thiophenol substrates. *J Med Chem*, 1986, 29, 354-358.
- Andersen JB, Szumlanski C, Weinshilboum RN, Schmiegelow K. Pharmacokinetics, dose adjustments, and 6-mercaptopurine/methotrexate drug interactions in two patients with thiopurine methyltransferase deficiency. *Acta Paediatr*, 1998, 87, 108-11.
- Black AJ, McLeod HL, Capell HA, Powrie RH, Matowe LK, Pritchard SC, Collie-Duguid ES, Reid DM. Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine. *Ann Intern Med*, 1998, 129, 716-718.
- 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, 1080-1086.
- Bourgeois BFD, Dodson WE. Phenytoin elimination in newborns. *Neurology*, 1953, 33, 173-178.
- Burchenal JH, Murphy ML, Ellisson RR, Sykes MP, Tan TC, Leone LA, Karnofsky DA, Craver LF, Dargeon HW, Rhoads CP. Clinical evaluation of a new antimetabolite, 6-mercaptopurine, in the treatment of leukaemia and allied diseases. *Blood*, 1953, 8, 965-999.
- Brunschede H, Krooth RS. Studies on the xanthine oxidase activity of mammalian cells. *Biochem Genet*, 1973, 8, 341-350.
- Calne RY, Alexandre GPJ, Murray JE. A study of the effects of drugs in prolonging survival of homologous renal transplants in dogs. *Ann NY Acad Sci*, 1962, 99, 743-761.
- Cazeneuve C, Pons G, Rey E, Treluyer JM, Cresteil T, Thiroux G, D'Athis P, Olive G. Biotransformation of caffeine in human liver microsomes from fetuses, neonates, infants and adults. *Br J Clin Pharmacol*, 1994, 37, 405-412.
- Chalmers AH. Studies on the mechanism of formation of 5-mercapto-1-methyl-4-nitro-imidazole. A metabolite of the immunosuppressive drug azathioprine. *Biochem Pharmacol*, 1974, 23, 1891-1901.
- Chan GLC, Erdmen GR, Gruber SA, Matas AJ, Canafax DM. Azathioprine metabolism: pharmacokinetics of 6-mercaptopurine, 6-thiouric acid and 6-thioguanine nucleotides in renal transplant patients. *J Clin Pharm*, 1990, 30, 358-363.
- Collie-Duguid ES, Pritchard SC, Powrie RH, Sludden J, Collier DA, Li T, McLeod HL. The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics*, 1999, 9, 37-42.
- Cory JG. Purine and pyrimidine nucleotide metabolism. In TM Devlin (ed) *Testbook of biochemistry*, 2nd edn, Wiley, New York, 1986, 489-529.
- Deininger M, Szumlanski CL, Otterness DM, Van Loon J, Ferber W, Weinshilboum RM. Purine substrates for human thiopurine methyltransferase. *Biochem Pharmacol*, 1994, 48, 2135-2138
- De Miranda P, Beacham LM 3rd, Creagh TH, Elion GB. The metabolite fate of the methylnitroimidazole moiety of azathioprine in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 1973, 187, 588-601.
- 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 research*, 2001, 61, 5810-5816.

Dervieux T, Brenner TL, Hon YY, Zhou Y, Hancock ML, Sandlund JT, Rivera GK, Ribeiro RC, Boyett JM, Pui CH, Relling MV, Evans WE. De novo purine synthesis inhibition and antileukemic effects of mercaptopurine alone or in combination with methotrexate in vivo. *Blood*, 2002, 100, 1240-1247.

Dervieux T, Hancock M, Evans W, Pui CH, Relling MV. Effect of methotrexate polyglutamates on thioguanine nucleotides concentrations during continuation therapy of acute lymphoblastic leukemia with mercaptopurine. *Leukemia*, 2002b, 16,209-212.

Dervieux T, Medard Y, Verpillat P, Guignonis V, Duval M, Lescoeur B, Suci 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, 15,1706-1712.

De Wildt SN, Kearns GL, Leeder JS, Van Den Anker JN. Glucuronidation in humans: Pharmacogenetic and developmental aspects. *Clin Pharmacokin*, 1999, 36, 439-452.

Dooley T, Maddocks JL. Assay of an active metabolite of 6-thioguanine, 6-thioguanosine 5'-monophosphate, in human red blood cells. *J Chromatogr*, 1982, 229, 121-127.

Elion GB. The purine path to chemotherapy. *Science*, 1989, 244, 41-47.

Elion GB, Callahan SW, Hitchings GH, Rundles RW. The metabolism of 2-amino-6-[(1-methyl-4-nitro-5-imidazolyl)thiolpurine (BW 57-323) in man. *Cancer Chemother Rep*, 1960, 8, 47-52.

Endresen L, Lie S, Stom-Methiesen I, Rugstad HE, Stokke O. Pharmacokinetics of oral 6-mercaptopurine: relationship between plasma levels and urine excretion of parent drug. *Ther Drug Monit*, 1990, 12, 227-234.

Evans WE, Hon YY, Bomgaars L, Coutre S, Holdsworth M, Janco R, Kalwinski 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, 2293-2301.

Evans WE, Horner M, Chu YQ, Kalwinsky D, Roberts WM. Altered mercaptopurine metabolism toxic effects and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphocytic leukemia. *J Pediatr*, 1991, 119, 985-989.

Evans WE, Relling MV, Petros WP, Meyer WH, Mirro J, Crom WR. Dextromethorphan and caffeine as probes for simultaneous determination of debrisoquin-oxidation and N-acetylation phenotypes in children. *Clin Pharmacol Ther*, 1989, 45, 568-573.

Furuta T, Ohashi K, Kosuge K, Zhao XJ, Takashima M, Kimura M, Nishimoto M, Hanai H, Kaneko E, Ishizaki T. CYP2C19 genotype status and effect of omeprazole on intragastric pH in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 1999, 65, 552-561.

Giverhaug T, Bergan S, Loennechen T, Rugstad HE, Aarbakke J. Analysis of methylated 6-mercaptopurine metabolites in human red blood cells: comparison of two methods. *Ther Drug Monit*, 1997, 19, 663-668.

Glauser TA, Nelson MD, Zembower DE, Lipsky JJ, Weinshilboum RM. Diethylthiocarbamate S-methylation : evidence for catalysis by human liver thiol methyltransferase and thiopurine methyltransferase. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993, 266, 23-32.

Griffin MG, Miner PB. Conventional drug therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*, 1995, 24, 509-521.

Guerciolini R, Szumlanski C, Weinshilboum RM. Human liver xanthine oxidase: nature and extent of individual variation. *Clin Pharmacol Ther*, 1991, 50, 663-672.

Hadasova E, Brysova V, Kadlcakova E. N-Acetylation in healthy and diseased children. *Eur J Clin Pharmacol*, 1990, 39, 1, 43-47.

Hakkola J, Pasanen M, Purkunen R, Saarikoski S, Pelkonen O, Maenpaa J, Rane A, Raunio H. Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 forms in human adult and fetal liver. *Biochem Pharmacol*, 1994, 48, 59-64.

- Hanauer SB. Drug therapy: Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 1996, 334, 841-848.
- Hayder S, Lafolie P, Björk O, Peterson C. 6-mercaptopurine plasma levels in children with acute lymphoblastic leukaemia: relation to relapse risk and myelotoxicity. *Ther Drug Monit*, 1989, 11, 617-622.
- Holmes EW, Wyngaarden JB. Hereditary xanthinuria In : Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Vale D (eds). *The metabolic basis of inherited disease*. McGraw-Hill USA, 1989, 1085-94.
- Hon YY, Fessing MY, Pui CH, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE. Polymorphism of the thiopurine-S-methyltransferase gene in African-Americans. *Hum Mol Genet*, 1999, 8, 371-376.
- Innocenti F, Danesi R, Favre C, Nardi M, Menconi MC, Di Paolo A, Bocci G, Fogli S, Barbara C, Barachini S, et al. Variable correlation between 6-mercaptopurine metabolites in erythrocytes and hematologic toxicity: Implications for drug monitoring in children with acute lymphoblastic leukemia. *Ther Drug Monit*, 2000, 22, 375-382.
- Jacqz-Aigrain E, Bessa E, Medard Y, Mircheva Y, Vilmer E. Thiopurine methyltransferase activity in a French population: h.p.l.c. assay conditions and effects of drugs and inhibitors. *Br J Clin Pharmacol*, 1994, 38, 1-8.
- Jain AB, Fung JJ, Tzakis AG, Venkataramanan R, Abu-Elmagdk, Alessiani M, Reyes J, Irish W, Warty V, Mehta S, et al. Comparative study of cyclosporine and FK506 dosage requirements in adult and pediatric orthotopic liver transplant patients. *Transplant Proc*, 1991, 23, 2763-2766.
- Jang JJ, Shin SG, Lee KH, Yim DS, Lee MS, Koo HH, Sohn DR. Erythrocyte thiopurine methyltransferase activity in a Korean population. *Br J Pharmacol*, 1996, 42, 638-641
- Jones CD, Smart C, Titus A, Blyden G, Dorvil M, Nwadike N. Thiopurine methyltransferase activity in a sample population of black subjects in Florida. *Clin Pharmacol Ther*, 1993, 53, 348-353.
- Kong CM, Parks RE. Incorporation of the purine moieties of guanosine and inosin analogs into nucleotide pools of human erythrocytes. *Biochem Pharmacol*, 1975, 24, 807-813.
- Kinirons MT, O'Shea D, Kim RB, Groopman JD, Thummel KE, Wood AJ, Wilkinson GR. Failure of erythromycin breath test to correlate with midazolam clearance as a probe of cytochrome P4503A. *Clin Pharmacol Ther*, 1999, 66, 224-231.
- Klemetsdal B, Straume B, Wist E, Aarbakke J. Identification of factors regulating thiopurine methyltransferase activity in a Norwegian population. *Eur J Clin Pharmacol*, 1993, 44, 147-152.
- Korinthenberg R, Haug C, Hannak D. The metabolism of carbamazepine to CBZ-10,11-epoxide in children from the newborn age to adolescence. *Neuropediatrics*, 1994, 25, 214-216.
- Kraus DM, Fischer JH, Reitz SJ, Kecskes SA, Yeh TF, McCulloch KM, Tung EC, Cwik MJ. Alterations in the theophyllin metabolism during the first year of life. *Clin Pharmacol Ther*, 1993, 54, 351-359.
- Krynetskaia NF, Krynetski EY, Evans WE. Human RNase H-mediated RNA cleavage from DNA-RNA duplexes is inhibited by 6-deoxythioguanosine incorporation in DNA. *Mol Pharmacol*, 1999, 56, 841-848.
- Krynetski EY, Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: molecular mechanisms and clinical importance. *Pharmacology*, 2000, 61, 136-146.
- Krynetski EY, Fessing MY, Yates CR, Sun D, Schuetz JD, Evans WE. Promoter and intronic sequences of the human thiopurine-S-methyltransferase (TPMT) gene isolated from a human PAC 1 genomic library. *Pharm Res*, 1997, 14, 1672-1678.
- Krynetski EY, Krynetskaia NF, Gallo AE, Murti KG, Evans WE. A novel protein complex distinct from mismatch repair binds thioguanylated DNA. *Mol Pharmacol*, 2001, 59, 367-374.
- Krynetski EY, Krynetskaia NF, Yanishevski Y, Evans WE. Methylation of mercaptopurine thioguanine and their nucleotide metabolites by heterologously expressed human thiopurine S-methyltransferase. *Mol Pharmacol*, 1995a, 47, 1141-1147.

- Krynetski EY, Schuetz JD, Galpin AJ, Pui CH, Relling MV, Evans WE. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995b, 92, 949-953.
- Kumagai K, Hiyama K, Ishioka S, Sato H, Yamanishi Y, McLeod HL, Konishi F, Maeda H, Yamakido M. Allelotype frequency of the thiopurine methyltransferase gene in Japanese. *Pharmacogenetics*, 2001, 11, 275-278.
- Lacroix D, Sonnier M, Moncion A, Cheron G, Cresteil T. Expression of CYP3A in the human liver: Evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. *Eur J Biochem*, 1997, 247, 625-634.
- Ladona MG, Lindström B, Thyr C, Dun-Ren P, Rane A. Differential foetal development of the O- and N-demethylation of codeine and dextromethorphan in man. *Br J Clin Pharmacol*, 1991, 32, 295-302.
- Lafolie P, Hayder S, Björk O, Peterson C. Intraindividual variation in 6-mercaptopurine pharmacokinetics during oral maintenance therapy of children with acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Clin Pharmacol*, 1991, 40, 599-601.
- Lambert GH, Schoeller DA, Kotake AN, Flores C, Hay D. The effect of age, gender and sexual maturation on the caffeine breath test. *Dev Pharmacol Ther*, 1986, 9, 375-388.
- Lavi LE, Holcenberg JS. A rapid sensitive high-performance liquid chromatographic assay for 6-mercaptopurine metabolites in red blood cells. *Anal Biochem*, 1985, 144, 514-521.
- Lee D, Szumlanski C, Houtman J, Honchel R, Rojas K, Overhauser J, Wieben ED, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: cloning of human liver cDNA and a processed pseudogene on human chromosome 18q21.1. *Drug Metab Disp*, 1995, 23, 398-405.
- Lee EJ, Kalow W. Thiopurine S-methyltransferase activity in a Chinese population. *Clin Pharmacol Ther*, 1993, 54, 28-33.
- Lennard L. Assay of 6-thioinosic acid and 6-thioguanine nucleotides, active metabolites of 6-mercaptopurine, in human red blood cells. *J chromatogr*, 1987, 423, 168-178.
- Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol*, 1992, 43, 329-339.
- Lennard L, Brown CB, Fox M, Haddocks JL. Azathioprine metabolism in kidney transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol*, 1984, 18, 693-700.
- Lennard L, Chew TS, Lilleyman JS. Human thiopurine methyltransferase activity varies with red blood cell age. *Br J Clin Pharmacol*, 2001, 52, 539-546.
- Lennard L, Gibson BES, Nicole T, Lilleyman JS. Congenital thiopurine methyltransferase deficiency and 6-mercaptopurine toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukaemia. *Arch Dis Child*, 1993, 69, 577-579.
- Lennard L, Hale JP, Lilleyman JS. 6-mercaptopurine metabolism and hypoxanthine phosphoribosyltransferase activity in childhood leukaemia. *Br J Clin Pharmacol*, 1991, 32, 659p.
- Lennard L, Lilleyman JS. Variable mercaptopurine metabolism and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 1989a, 7, 1816-1823.
- Lennard L, Lilleyman JS. Individualizing therapy with 6-mercaptopurine and 6-thioguanine related to the thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Ther Drug Monit*, 1996, 18, 328-334.
- Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 1990, 336, 225-229.
- Lennard L, Maddocks JL. Assay of 6-thioguanine nucleotide, a major metabolite of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine, in human red blood cells. *J Pharm Pharmacol*, 1983, 35, 15-18.
- Lennard L, Singleton HJ. High-performance liquid chromatographic assay of the methyl and nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine: quantitation of red blood cell 6-thioguanine nucleotide, 6-thioinosic acid and 6-methylmercaptopurine metabolites in a single sample. *J Chromatogr*, 1992, 583, 83-90

- Lennard L, Van Loon JA, Weinshilboum RM. Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Clin Pharmacol Ther*, 1989b, 46, 149-154.
- Lennard L, Welch JC, Lilleyman JS. Intracellular metabolites of mercaptopurine in children with lymphoblastic leukaemia: a possible indicator of non-compliance ? *Br J Cancer*, 1995, 72, 1004-1006.
- 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, 455-461.
- Lewis LD, Benin A, Szumlanski CL, Otterness DM, Lennard L, Weinshilboum RM, Nierenberg DW. Olsalazine and 6-mercaptopurine-related hematologic suppression: a possible drug-drug interaction. *Clin Pharmacol Ther*, 1997, 62, 464-475.
- Lin SN, Jessup K, Floyd M, Wang TPF, Van Buren CT, Capricioli RM, Kahan BD. Quantitation of azathioprine and 6-mercaptopurine levels in renal transplant patients. *Transplantation*, 1980, 29, 290-294.
- 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, 183-188.
- Loennechen T, Yates CR, Fessing M, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE. Isolation of a human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) complementary DNA with a single nucleotide transition A719G (TPMT*3C) and its association with loss of TPMT protein and catalytic activity in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 1998, 64, 46-51.
- Loughan PM, Greenwald A, Purton WW, Aranda JV, Watters G, Neims AH. Pharmacokinetic observations of phenytoin disposition in the newborn and young infant. *Arch Dis Child*, 1977, 52, 302-309.
- Lysaa RA, Giverhaug T, Wold HL, Aarbakke J. Inhibition of human thiopurine methyltransferase by furosemide, bendroflumethiazide and trichlormethiazide. *Eur J Clin Pharmacol*, 1996, 49, 393-396.
- Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Block KW, Bairoch A, Belanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, et al. The UDP glucuronosyltransferase gene superfamily: Recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*, 1997, 7, 255-269.
- May G. Genetic differences in drug disposition. *J Clin Pharmacol*, 1994, 34, 881-890.
- Maybaum J, Mandel HG. Unilateral chromatid damage: a new basis for thioguanine cytotoxicity. *Cancer Res*, 1983, 43, 3852-3856.
- McBride KL, Gilchrist GS, Smithson WA, Weinshilboum RM, Szumlanski CL. Severe 6-thioguanine-induced marrow aplasia in a child with acute lymphoblastic leukemia and inherited thiopurine methyltransferase deficiency. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2000, 22, 441-445.
- McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV, Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2000, 14, 567-572.
- 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.
- McLeod HL, Pritchard SC, Githang'a J, Indalo A, Ameyaw MM, Powrie RH, Booth L, Collie-Duguid ESR. Ethnic differences in thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: evidence for allele specificity in Caucasian and Kenyan subjects. *Pharmacogenetics*, 1999, 9, 773-776.
- McLeod HL, Relling MV, Liu Q, Pui CH, Evans WE. Polymorphic thiopurine methyltransferase in erythrocytes is indicative of activity in leukemic blasts from children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1995b, 85, 1897-1902.
- Medard Y, Nafa S, Jacqz-Aigrain E. Thiopurine methyltransferase activity: new high-performance liquid chromatographic assay conditions. *J Chromatogr B*, 1997, 700, 275-277.
- Meyer UA. Genetic polymorphisms of drug metabolism. *Fundam Clin Pharmacol*, 1990, 4, 595-615.

- Meyer UA. Genotype or phenotype: the definition of a pharmacogenetic polymorphism. *Pharmacogenetics*, 1991, 1, 66-67.
- Milavetz G, Vaughan LM, Weinberger MM, Hendeles L. Evaluation of a scheme for establishing and maintaining dosage of theophylline in ambulatory patients with chronic asthma. *J Pediatr*, 1986, 109, 351-354.
- Miller RP, Roberts RJ, Fischer LJ. Acetaminophen elimination kinetics in neonates, children, and adults. *Clin Pharmacol Ther*, 1976, 19, 284-294.
- Murray JE, Merrill JP, Harrison JH, Wilson RE, Dammin GJ. Prolonged survival of human kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *New Engl J Med*, 1963, 268, 1315-1323.
- Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M. Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans. *J Biochem*, 1999, 125, 803-808.
- Nassif EG, Weinberger MM, Shannon D, Guiang JF, Hendeles L, Jimenez D, Ekwo E. Theophylline disposition in infancy. *J Pediatr*, 1981, 98, 158-161.
- Nelson DL, Bugge CJL, Krasny HC, Zimmerman TP. Separation of 6-thiopurine derivatives on DEAE-Sephadex columns and in the high-pressure liquid chromatograph. *J Chromatogr*, 1973, 77, 181-190.
- Nyhan WL, Sweetman L, Carpenter DG, Carter CH, Hoefnagel D. Effects of azathioprine in a disorder of uric acid metabolism and cerebral function. *J Pediatrics*, 1968, 72, 111-118.
- Odlind B, Hartvig P, Lundstrom B, Lonnerholm G, Tufveson G, Grefberg N. Serum azathioprine and 6-mercaptopurine levels and immunosuppressive activity after azathioprine in uremic patients. *Int J Immunopharmacol*, 1986, 8, 1-11.
- Otterness D, Szumlanski C, Lennard L, Klemetsdal B, Aarbakke J, Park-Hah JO, Iven H, Schmiegelow K, Branum E, O'Brien J, Weinshilboum RM. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther*, 1997, 62, 60-73.
- Otterness DM, Szumlanski CL, Wood TC, Weinshilboum RM. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: linked with a terminal exon splice junction mutation that results in loss of activity. *J Clin Invest*, 1998, 101, 1036-1044.
- Pacifici GM, Säwe J, Kager L, Rane A. Morphine glucuronidation in human fetal and adult liver. *Eur J Clin Pharmacol*, 1982, 22, 553-558.
- Pariante-Khayat A, Pons G, Rey E, Richard MO, D'Athis P, Moran C, Badoual J, Olive G. Caffeine acetylase phenotyping during maturation in infants. *Pediatr Res*, 1991, 29, 5, 492-495.
- Park-Hah JO, Klemetsdal B, Lysaa R, Choi KH, Aarbakke J. Thiopurine methyltransferase activity in a Korean population sample of children. *Clin Pharmacol Ther*, 1996, 60, 68-74.
- Parks DA, Granger DN. Xanthine Oxidase: biochemistry distribution and physiology. *Acta Physiol Scand* 1986 Suppl, 548, 89-99
- Payne K, Mattheyse FJ, Liedenberj D, Dawes T. The pharmacokinetics of midazolam in paediatric patients. *Eur J Clin Pharmacol*, 1989, 37, 267-272.
- Pazmino PA, Sladek SL, Weinshilboum RM. Thiol S-methylation in uremia: erythrocyte enzyme activities and plasma inhibitors. *Clin Pharmacol Ther*, 1980, 28, 356-367.
- Peng D, Birgersson C, Von Bahr C, Rane A. Polymorphic acetylation of 7-aminoclonazepam in human liver cytosol. *Pediatr Pharmacol*, 1984, 4, 155-159.
- Poulsen L, Brosen K, Arendt-Nielsen L, Gram LF, Elbaek K, Sindrup SH. Codeine and morphine in extensive and poor metabolizers of sparteine: pharmacokinetics, analgesic effect and side effects. *Eur J Clin Pharmacol*, 1996, 51, 289-295.

Pynnönen S, Sillanpää M, Frey H, Iisalo E. Carbamazepine and its 10,11-epoxide in children and adults with epilepsy. *Eur J Clin Pharmacol*, 1977, 11, 129-133.

Raymond FA, Weinshilboum RM. Microassay of human erythrocyte catechol-O-methyltransferase: removal of inhibitory calcium ion with chelating resin. *Clin Chim Acta*, 1975, 58, 185-194.

Relling MV, Hancock ML, Boyett JM, Pui CH, Evans WE. Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1999a, 93, 2817-2823.

Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY, Pui CH. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst*, 1999b, 91, 2001-2008.

Relling MV, Lin JS, Ayers G, Evans WE. Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase and CYP 1A2 activities. *Clin Pharmacol Ther*, 1992, 52, 643-658

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*, 1999c, 354, 34-39.

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

Remy CN. Metabolism of thiopyrimidines and thiopurines. *J Biol Chem*, 1963, 238, 1078-1084.

Riva R, Contin M, Albani F, Perucca E, Procaccianti G, Baruzzi A. Free concentration of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in children and adults: Influence of age and phenobarbitone co-medication. *Clin Pharmacokinet*, 1985, 10, 524-531.

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

Schwartz RS, Stack J, Dameshek W. Effect of 6-mercaptopurine on antibody production. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1958, 99, 164-167.

Scott CS, Riggs KW, Ling EW, Fitzgerald CE, Hill ML, Grunau RV, Solimano A, Craig KD. Morphine pharmacokinetics and pain assessment in premature newborns. *J Pediatr*, 1999, 135, 423-429.

Somerville L, Krynetski EY, Krynetskaia NF, Beger RD, Zhang W, Marhefka CA, Evans WE, Kriwacki RW. Structure and dynamics of thioguanine-modified duplex DNA. 2003, 278, 1005-1011.

Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Mastain B, Vinner E, Marez D, Lo Guidice JM, Chevalier ED, 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, 879-887.

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, 177-185.

Stubbins MJ, Harries LW, Smith G, Tarbit MH, Wolf CR. Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus. *Pharmacogenetics*, 1996, 6, 429-439.

Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM, Miners JO, Birkett DJ, Goldstein JA. The role of the CYP2C9-Leu(359) allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics*, 1996, 6, 341-349.

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

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

Szumslanski CL, Weinshilboum RM. Sulphasalazine inhibition of thiopurine methyltransferase: possible mechanism for interaction with 6-mercaptopurine and azathioprine. *Br J Clin Pharmacol*, 1995, 39, 456-459.

Tai HL, Fessing MY, Bonten EJ, Yanishevsky Y, d'Azzo A, Krynetski EY, Evans WE. Enhanced proteosomal 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, 641-650.

Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG, Yanishevsky 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, 6444-6449.

Tai HL, Krynetski EY, Yates CR, Loennechen T, Fessing MY, Krynetskaia NF, Evans WE. Thiopurine-S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *Am J Hum Genet*, 1996, 58, 694-702.

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, 936-938.

Tidd DM, Dedhar S. Specific and sensitive combined high-performance liquid chromatographic-flow fluorometric assay for intracellular 6-thioguanine nucleotides metabolites of 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Chromatogr*, 1978, 145, 237-246.

Tidd DM, Patterson ARP. A biochemical mechanism for the delayed cytotoxic reaction of 6-mercaptopurine. *Cancer Res*, 1974, 34, 738-746.

Tinel M, Berson A, Pessayre D, Letteron P, Cattoni MP, Horsmans Y, Larrey D. Pharmacogenetics of human erythrocyte thiopurine methyltransferase activity in a French population. *Br J Clin Pharmacol*, 1991, 32, 729-734.

Treluyer JM, Jacqz-Aigrain E, Alarez F, Cresteil T. Expression of CYP2D6 in developing human liver. *Eur J Biochem*, 1991, 202, 583-588.

Van Loon JA, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase biochemical genetics : human lymphocyte activity. *Biochem Genet*, 1982, 20, 637-658.

Van Loon JA and Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase isozymes in human renal tissue. *Drug Metab Dispos*, 1990, 18, 632-638.

Weinshilboum RM. Methylation pharmacogenetics: thiopurine methyltransferase as a model system. *Xenobiotica*, 1992, 22, 1055-1071.

Weinshilboum RM, Raymond FA, Pazmino PA. Human erythrocyte thiopurine methyltransferase: radiochemical microassay and biochemical properties. *Clin Chim Acta*, 1978, 85, 323-333.

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

Weiss CF, Glazko AJ, Weston JK. Chloramphenicol in the newborn infant: A physiologic explanation of its toxicity when given in excessive doses. *New Engl J Med*, 1960.

Wilson JM, Young AB, Kelley WN. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase deficiency. The molecular basis of the clinical syndromes. *N Eng J Med*, 1983, 309, 900-910.

Woodson LC, Ames MM, Selassie CD, Hansch C, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase: aromatic thiol substrates and inhibition by benzoic acid derivatives. *Mol Pharmacol*, 1983, 24, 471-478.

Woodson LC, Dunette JH, Weinshilboum RM. Pharmacogenetics of human thiopurine-S-methyltransferase: kidney-erythrocyte correlation and immunotitration studies. *J Pharmacol Exp Ther*, 1982, 222, 174-181.

Woodson LC, Weinshilboum RM. Human kidney thiopurine methyltransferase: purification and biochemical properties. *Biochem Pharmacol*, 1983, 32, 819-826.

Yang HY, Lee QP, Rettie AE, Juchan MR. Functional cytochrome P4503A isoforms in human embryonic tissues: Expression during organogenesis. *Mol Pharmacol*, 1994, 46, 922-928.

Yang HY, Namkung MJ, Juchan MR. Expression of functional cytochrome P450 1A1 in human embryonic hepatic tissues during organogenesis. *Biochem Pharmacol*, 1995, 49, 717-726.

Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, Relling MV, Evans WE. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med*, 1997, 126, 608-614.

Young WS III, Lietman PS. Chloramphenicol glucuronyl transferase: Assay, ontogeny and inducibility. *J Pharmacol Exp Ther*, 1978, 204, 203-211.

Zimm S, Collins JM, O'Neill D, Chabner BA, Poplack DG. Inhibition of first pass metabolism in cancer chemotherapy. Interaction of 6-mercaptopurine and allopurinol. *Clin Pharmacol Ther*, 1983b, 34, 810-817.

Zimm S, Collins JM, Riccardi R, O'Neill D, Narang PK, Chabner B, Poplack DG. Variable bioavailability of oral mercaptopurine. Is maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukaemia being optimally delivered? *New England J Med*, 1983a, 308, 1005-1009.

Zimm S, Strong JM. A clinically useful ion-pairing high-performance liquid chromatographic assay for the monophosphate metabolites of thioguanine and mercaptopurine in human neoplastic cells. *Anal Biochem*, 1987, 160, 1-6.

ANNEXES

Annexe 1

~

Mesure de l'activité TPMT (technique publiée)

Mode opératoire

~

9140 Laboratoire de Pharmacologie Institut de BIOLOGIE 9, quai Moncoussu 44093 NANTES	MODE OPERATOIRE MESURE de l'ACTIVITE TPMT « Thiopurine Méthyl Transférase » DANS LES GLOBULES ROUGES	MO - REV. A	P. 176/ 132
--	---	------------------------	-------------

1 - PREPARATION DES REACTIFS

CHELEX 100 Résine :

CHELEX 100 résine + eau distillée ultrapure :

- Ajouter HCl 6N (Salle Hormono sous la hotte) jusqu'à pH = 1,5
- Rincer 3 fois avec de l'eau distillée,
- Ajouter NaOH 5N jusqu'à pH = 7,5,
- Laver 4 fois avec de l'eau distillée,
- Conserver à 4°C dans de l'eau distillée.

KH₂PO₄ 0,15 M pH = 7,5 :

- Peser 4,08 g de KH₂PO₄ dans 200 ml d'eau distillée,
- Ajuster à pH = 7,5 avec NaOH 5N.

HCl N :

- Diluer HCl 6 N (Salle Hormonologie).

6-METHYLMERCAPTOPYRINE 500 mg/l -(solution mère) :

- Peser 50 mg dans 100 ml d'un mélange méthanol /DMSO (50-50 v/v),
- Conserver à -20°C (Congélateur pièce HPLC).

MERCAPTOPYRINE :

- Peser 91,3 mg dans 5 ml DMSO,
- Répartir dans des godets en plastique (500 µl),
- Conserver à -20°C (congélateur pièce HPLC).

DITHIOTREITOL (DTT) :

- Peser 115,7 mg dans 20 ml d'eau distillée,
- Répartir dans des tubes plastiques (1,2 ml) (16 tubes),
- Conserver à -80°C (6 mois).

ALLOPURINOL :

- Peser 20,4 mg dans 5 ml de DMSO, passer aux ultrasons
- Répartir dans des godets en plastique (200 µl) (25 godets),
- Conserver à - 80°C (6 mois) ;

S-ADENOSYL-L-METHIONINE (SAM) :

- Peser 24,3 mg dans 20 ml d'eau,
- Répartir dans des godets en plastique (750 µl) (25 godets),
- Conserver à -80°C (6 mois).

SOLVANT d'EXTRACTION :

- 160 ml dichlorométhane,
- 40 ml isopropanol.

TAMPON AMMONIAQUE pH 9,5 :

- NH₄Cl saturé
- à diluer au ¼ en eau D et ajuster à pH 9.5 avec de l'ammoniaque à 28 %.

2 - PREPARATION DU LYSAT DE GLOBULES ROUGES :

Prélèvement 5 ml de sang total sur tube hépariné.

- Prélever les globules rouges dans un tube plastique de 5 ml,
- Laver avec 3 ml de NaCl 9 ‰,

- Centrifuger à 2300 tours/minute à 4°C 10 minutes (salle HPLC),

- Eliminer le liquide de lavage,

- 2EME LAVAGE AVEC 3 ML DE NaCl 9 ‰ IDENTIQUE AU 1^{ER}. CENTRIFUGER, ELIMINER LE LIQUIDE DE LAVAGE.

- Ajouter 2 ml de Na Cl 9 ‰,

- Prélever 1 ml dans un tube plastique de 5 ml,

- Le reste du tube est utilisé pour déterminer l'hématocrite au laboratoire d'Hématologie,

- Dans le tube contenant 1 ml de GR dans NaCl, ajouter 4 ml d'eau distillée froide (4°C) pour lyser les globules rouges, homogénéiser,

- Répartir dans 2 godets de 2 ml pour centrifugation,

- Centrifuger (pièce des centrifugeuses) 13 000 g 10 minutes à 4°C,

- Réunir le surnageant des 2 godets dans 1 tube plastique de 5 ml,

- Congeler à -80°C jusqu'à analyse (stable pendant plusieurs mois).

3 - REACTION ENZYMATIQUE :

Attention : les lysats de GR doivent être décongelés lentement.

La veille, mettre à 4°C :

- les lysats de GR,
- 1 tube DTT,
- 1 tube SAM,
- 1 tube allopurinol,
- 1 godet 6 MP.

- Dans chaque tube, ajouter 500 µl de résine CHELEX 100,

- Agitation horizontale lente 1 H. à 4°C,

(Préparer la phase mobile, les 2 mélanges réactionnels, la solution fille de Méthyl/MP pour la gamme d'étalonnage, allumer le bain-marie à 37°C),

- Centrifuger 10 minutes à 4°C à 5000 tours/minute (salle HPLC).

- Préparation de la gamme d'étalonnage :

- préparer la solution fille de Méthyl/MP :

- solution mère de Méthyl/MP à 500 mg/l.

- 1ère dilution : 1/100 100 µl dans 9,9 ml d'eau distillée,

- 2^{ème} dilution : 1/10 500 µl dans 4,5 ml de tampon KH₂PO₄,

= solution fille à 500 ng/ml

- Gamme d'étalonnage (dans des tubes Vénoject).

Cc (ng/ml)	0	50	100	150	200	250
Lysat (µl)*	600	600	600	600	600	600
6 MMP (sol. Fille) (µl)	0	60	120	180	240	300

Tampon KH₂PO₄ (µl)	615	555	495	435	375	315
---	-----	-----	-----	-----	-----	-----

- Pour chaque malade, préparer 3 tubes Venoject (1 pour le blanc, 2 pour la réaction) dans lesquels on introduit 600 µl de lysat,

- Dans chaque tube (gamme et malade) ajouter :

- 615 µl de K₂ HPO₄ 0,15 M pH = 7,5
- 45 µl de 6-Mercaptopurine.

- Préincubation à 37°C pendant 3 minutes,

- Préparation du mélange réactionnel :

- Mélange blanc : 0,5 ml DTT

50 µl Allopurinol
4,45 ml Eau distillée.

- Mélange réactionnel : 0,5 ml DTT
- 50 µl Allopurinol
0,5 ml SAM
3,95 ml Eau distillée.

- Ajouter 90 µl de :

- Mélange blanc dans les tubes blancs des malades et tous les tubes de la gamme,
- Mélange réactionnel dans tous les tubes réaction des malades.

- Incuber 1 Heure à 37°C,

- Arrêter la réaction par 300 µl HCl N.

4 - EXTRACTION LIQUIDE -LIQUIDE:

- Ajouter 1,0 ml NH₄CL pH = 9,5 (frigo toxico),
- Ajouter 5,0 ml de solvant d'extraction,
- Agiter 15 minutes,
- Centrifuger 2500 tours/minute : 10 minutes, 10 °C,
- Aspirer le surnageant,
- Reprendre 3,5 ml de solvant,
- Evaporer 25 minutes,
- reprendre par 150 µl de phase mobile.

5 - DOSAGE HPLC :

- Phase mobile :

- Eau 920ml,
- Acétonitrile 80 ml,
- TEA 340 µl,
- DTT 0,1 g.

- Ajuster le pH à 3,2

- Filtrer,

- Circuit ouvert,

- Débit = 1,0 ml/minute,

- λ = 290 nm,

- durée d'analyse = 20 minutes,

- injecter 50 µl d'acétonitrile entre chaque tube (malade et gamme) pendant 7 minutes.

6 - RESULTAT :

- Le résultat x est exprimé en ng/ml,

- La réponse finale est exprimée en nmol/h/ml PRBC,
- Formule de calcul :

$$\frac{x \cdot 5}{166,2} \cdot \frac{10}{6} \cdot \frac{100}{\text{Hte}} = \frac{x}{\text{Hte}} \cdot 5,014$$

- Poids moléculaire de la méthylmercaptopurine = 166,2

Annexe 2

~

*Mesure de l'activité TPMT
(technique utilisée à partir de décembre 2000)*

Mode opératoire et tracé chromatographique

~

9140 Laboratoire de Pharmacologie Institut de BIOLOGIE 9, quai Moncoussu 44093 NANTES	MODE OPERATOIRE MESURE de l'ACTIVITE TPMT « Thiopurine Méthyl Transférase » DANS LES GLOBULES ROUGES	MO - REV. B	P. 181/ 132
--	---	--------------------	-------------

1 – PRINCIPE DU DOSAGE

La détermination de l'activité TPMT se fait dans les érythrocytes. On crée *in vitro* une réaction enzymatique : après incubation pendant 1 heure d'un milieu contenant le lysat de globules rouges, une concentration connue de substrat (6-MP) et de donneur de groupement méthyle (S-Adénosyl méthionine ou SAM), la quantité de méthyl-mercaptopurine formée par la TPMT est mesurée par HPLC-UV.

2 – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

Réaction enzymatique : Thiopurine methyltransferase activity in a French population : h.p.l.c. assay conditions and effects of drugs and inhibitors. *Br J Clin Pharmacol.* 1994, 38, 1-8

E. JACQZ-AIGRAIN, E. BESSA, Y. MEDARD *et al*

Chromatographie : Thiopurine methyl transferase activity : new extraction conditions for high-performance liquid chromatographic assay. *J Chromtogr B.* 1999, 727, 235-239.

C GANIERE-MONTEIL, A. PINEAU, M. F. KERGUERIS *et al*

3 – PRODUITS CHIMIQUES

SIGMA : 6-méthylmercaptopurine 500 mg Ref : M3877

Allopurinol 1g Ref A8003

1,4-Dithiothréitol 5g

6-mercaptopurine

S- Adénosyl-L méthionine (chlorure) 25 mg Ref A7007 (stockage : congélateur n°7 tiroir n°3)

BIORAD : Chelex 100 Resin sodium form 500 g 200 à 400 mesh Ref 142-2842

4 - PREPARATION DES REACTIFS

CHELEX 100 Résine :

Attention : Ne pas conserver le flacon initial (Biorad) plus de 2 ans après ouverture.

Introduire 50 g de résine dans un bécher de 500 ml et ajouter 50 ml d'eau ultrapure.

Agiter lentement jusqu'à hydratation complète et mise en suspension des microparticules de résine.

Ajuster le pH à 1,5 avec HCl 6N précisément à l'aide du pHmètre et sous agitation constante.

Rincer 3 fois avec 200 ml d'eau distillée, avec agitation entre chaque rinçage.

Ajuster le pH à 7,5 avec NaOH 5N précisément.

Rincer 4 fois avec de l'eau distillée, sous agitation, comme à l'étape précédente.

Remettre en suspension dans 100 ml d'eau distillée pure, contrôler que le pH = 7,5.

Conserver à +4°C dans un flacon bouché pendant à 3 mois (Frigo n°5).

Tampon phosphate 150 mM pH = 7,5

Peser 5,103 g de KH₂PO₄ et dissoudre dans une fiole jaugée de 250 ml dans de l'eau distillée ultrapure.

Peser 6,531 g de K₂HPO₄ et dissoudre dans une fiole jaugée de 250 ml dans de l'eau distillée ultrapure.

Mettre 200 ml de K₂HPO₄ dans un bécher et ajuster le pH à 7,5 par addition de KH₂PO₄.

Conserver dans un flacon à +4°C pendant à 1 mois (Frigo n°5).

6-METHYLMERCAPTOPYRINE 500 mg/l -(solution mère) :

Peser 50 mg dans 100 ml d'un mélange méthanol /DMSO (50-50 v/v),

Conserver à -20°C (Congélateur n°8) pendant 6 mois.

MERCAPTOPYRINE :

Peser 91,3 mg dans 5 ml DMSO,

Répartir dans des godets en plastique (600 µl),
Conserver à -20°C (congélateur n°6).

DITHIOTREITOL (DTT) (concentration finale dans le milieu d'incubation : 400µM) :
Peser 92,5 mg dans 10 ml d'eau distillée,
Répartir dans des godets en plastique (600 µl)
Conserver à -80°C 6 mois).

ALLOPURINOL (concentration finale dans le milieu d'incubation : 20µM) :
Peser 4,08 mg dans 1 ml de DMSO, passer aux ultrasons
Répartir dans des godets en plastique (60 µl) (16 godets),
Conserver à - 80°C (6 mois)

S-ADENOSYL-L-METHIONINE (SAM) (concentration finale dans le milieu d'incubation : 10µM) :
Peser 8,6 mg dans 10 ml d'eau distillée,
Répartir dans des godets en plastique (600 µl) (16 godets),
Conserver à -80°C (6 mois).

5 - PREPARATION DU LYSAT DE GLOBULES ROUGES :

Prélèvement 3 ml de sang total sur tube hépariné.
Centrifuger 5 min à 4°C. Eliminer le plasma.
1^{er} lavage : Ajouter 3 ml de NaCl 9 ‰. Homogénéiser. Centrifuger 10 min à 4°C. Eliminer le liquide de lavage.
2^{ème} lavage : Ajouter 3 ml de NaCl 9 ‰. Homogénéiser. Centrifuger 10 min à 4°C. Eliminer le liquide de lavage.
Ajouter 1 ml de Na Cl 9 ‰, homogénéiser.
Déterminer l'hématocrite au laboratoire d'Hématologie.
Prélever 1 ml et le transférer dans un tube Nalgen de 8 ml, ajouter 4 ml d'eau distillée froide (4°C) pour lyser les globules rouges.
Centrifuger à 13 000 g 10 minutes à 4°C, pour éliminer les membranes cellulaires.
Répartir le surnageant dans 2 tubes plastique de 5 ml, à raison de 1 ml par tube.
Congeler à -80°C jusqu'à analyse (stable pendant plusieurs mois).

6 – PREPARATION DE LA GAMME D'ETALONNAGE :

Préparer la solution fille de Méthyl-MP à la concentration de 500 ng/ml : dilution 1/1000 de la solution mère à 500 mg/l.

- 1^{ère} dilution : 1/100 100 µl dans 9,9 ml d'eau distillée,
- 2^{ème} dilution : 1/10 500 µl dans 4,5 ml de tampon phosphate,

Concentration en méthyl MP(ng/ml)	10	25	50	75	100	150
Lysat de globules rouges (µl)	200	200	200	200	200	200
Tampon d'incubation(µl)	240	225	200	175	150	100
6 MMP (sol. Fille) (µl)	10	25	50	75	100	150
HClO₄ 70-72%(µl)	50	50	50	50	50	50

Vortexer et centrifuger 10 min à 4°C à 3000 tours/min. Décanter et injecter 75µl de surnageant (voir paragraphe dosage HPLC)

7 - REACTION ENZYMATIQUE :

Attention : les lysats de GR doivent être décongelés lentement.

La veille, mettre à 4°C les lysats de GR (malades + contrôle)

Le jour de l'analyse, décongeler : 1 godet DTT, 1 godet SAM, 1 godet allopurinol, 1 godet 6 MP, 1 point de gamme.

Dans chaque tube de lysat (malades + contrôle), ajouter 500 µl de résine CHELEX 100,

Agitation horizontale lente 1 heure à 4°C,

Centrifuger 10 minutes à 4°C à 3000 tours/minute.

Pour chaque malade, préparer 2 tubes à hémolyse en verre (1 pour le blanc, 1 pour la réaction)

Dans chaque tube introduire :

Réactifs	Blanc témoin (µl)	Réaction (µl)
Tampon pH 7,5	235	205
Lysat chélaté	200	200
6-MP 18 mg/ml	15	15

Mixer et préincuber à 37°C pendant 3 minutes,

Préparer le mélange réactionnel : 0,5 ml DTT

50 µl Allopurinol

0,5 ml SAM

3,95 ml Eau distillée.

Déclencher la réaction par addition de 30 µl de cette solution uniquement dans le tube de réaction

Incuber 60 minutes à 37 °C

Arrêter la réaction par addition de 50 µl d'HClO₄ 70-72%

Vortexer les tubes 15 secondes

Centrifuger 10 minutes à 4 °C

Décanner et injecter 75µl

8 - DOSAGE HPLC :

Phase mobile :

- Eau 1373 ml,
- Acétonitrile 127 ml,
- TEA 675 µl,
- DTT 0,15 g.

Ajuster le pH à 3,2 avec de l'acide *o*-phosphorique à 10 %

Filtrer,

Circuit ouvert,

Débit = 1,0 ml/minute, Pression = 80 à 85 psi

Colonne SUPELCOSIL LC 18 25cm x 4.6 mm, 5µm

λ = 290 nm,

Durée d'analyse = 20 minutes,

Temps de rétention : 16,9 minutes

Injecter 75 µl d'acétonitrile entre chaque tube (malade et gamme) pendant 10 minutes.

9 - RESULTAT :

Soustraire la surface du pic de méthylmercaptopurine du tracé du tracé « blanc » à celle du tracé « réaction »

Calculer la concentration en méthylmercaptopurine exprimée en ng/ml,

La réponse finale est exprimée en nmol/h/ml PRBC,

Formule de calcul : $x(\text{ng/ml}) \cdot (25/166.2) \cdot (100/\text{Hte}) = x/\text{Hte} \cdot 15,042 \text{ nmol/h/ml PRBC}$

Poids moléculaire de la méthylmercaptopurine = 166,2

Annexe 3



*Mesure des métabolites intraérythrocytaires
de la 6-mercaptopurine*

Mode opératoire et tracé chromatographique



9140 Laboratoire de Pharmacologie Institut de BIOLOGIE 9, quai Moncoussu 44093 NANTES	MODE OPERATOIRE MESURE DES METABOLITES INTRA- ERYTHROCTAIRES DE LA MERCPTOPURINE Protocole Mercaptopurine	MO - REV. C	P. 185/ 5
--	--	--------------------	-----------

1 - PREPARATION DES REACTIFS :

H2SO4 1,5 M

- 10 ml H2SO4 22,5 N (Salle Hormono.)
- 65 ml eau distillée

HCl 0,1 N

A préparer extemporanément :

NaOH 3,8 N

- 7,6 g de pastilles de soude
- 50 ml ED

DTT 3,75 mM :

- peser 28,9 mg de Dithiotreitol (DTT)
- dissoudre dans 50 ml ED (= quantité pour 30 tubes)

Ne pas garder la poudre de DTT plus d'un an après ouverture du flacon.

Solution de PMA - toluène :

- peser 131,1 mg de PMA (Acétate phényl mercurique)
- heptanol-1 : 7,2 ml
- toluène qsp 300 ml

- Agitateur magnétique pendant 1H
- Protéger de la lumière avec du papier d'aluminium

2 - GAMME d'ETALONNAGE :

- Solution-mère de 6 méthylmercaptapurine à 1000 mg/l dans du méthanol : Dans une fiole jaugée de 10 ml, peser 10 mg de 6 méthylmercaptapurine. Ajouter 10 µl de DTT 1M et quelques gouttes de soude 3,8N pour aider à la dissolution, puis compléter avec du méthanol. conserver à -20°C 6 mois (Congélateur n°6).

Faire une dilution 1/100 (100µl dans 10 ml ED) pour obtenir une solution à 10 mg/l.

- Solution-mère de 6 thioguanine à 1000 mg/l dans du méthanol : Dans une fiole jaugée de 10 ml, peser 10 mg de 6 thioguanine. Ajouter 10 µl de DTT 1M et quelques gouttes de soude 3,8N pour aider à la dissolution, puis compléter avec du méthanol. conserver à -20°C 6 mois (Congélateur n°6).

Faire une dilution 1/100 (100µl dans 10 ml ED) pour obtenir une solution fille SF1 à 10 mg/l.

Faire une 2^{ème} dilution au 1/10 (dilution totale 1/1000) pour obtenir une solution fille SF2 à 1 mg/l.

- Solution mère de 4- mercapto-1H-pyrazolo(3,4-D) pyrimidine (Etalon interne) à 1000 mg/l dans du méthanol : Dans une fiole jaugée de 10 ml, peser 10 mg. Ajouter 10 µl de DTT 1M et quelques gouttes de soude 3,8N pour aider à la dissolution, puis compléter avec du méthanol.

Faire une dilution 1/200 (50µl dans 10 ml ED) pour obtenir une solution fille SF à 5 mg/l.

Cc ng/100µl 6TG/6MeMP	0	25/250	50/500	100/750	250/1000	500/1500
E.D. (µl)	500	450	400	325	375	300
Sol.MMP 10 mg/l (µl)	0	25	50	75	100	150
Sol. 6TG (µl)	0	25 SF2	50 SF2	100 SF2	25 SF1	50 SF1
Lysat de Globules Rouges (µl)	100	100	100	100	100	100

3 Extraction :

Utiliser des tubes. de 15 ml à bouchon à vis ;

- 500 µl d'eau distillée
- 100 µl de lysat de globules rouges
- 1,6 ml de DTT
- 1,0 ml de H₂SO₄ 1,5 M
- Boucher les tubes. Vortexer.
- Chauffer à 100°C 1 H 30 au bloc chauffant

Après refroidissement des tubes, ajouter :

- 100 µL de solution fille d'étalon interne
- 1 ml de NaOH 3,8N
- 8 ml de solution PMA-toluène
- Agiter 10 minutes à l'agitateur à secousses (vitesse 3.5)
- Centrifuger 8min 3000 tours/min (Centrifugeuse JOUAN. Plots oranges)
- Transférer 6 ml de toluène dans des tubes Venoject
- Ajouter 200 µl de HCl 0,1 N
- Agiter 10 minutes à l'agitateur à secousses (vitesse 4,5)
- Centrifuger 10 minutes 3000 tours/minute à 4°C
- Eliminer le toluène
- Prélever 120 µl d'HCl pour injecter 50 µl en HPLC

4 - CHROMATOGRAPHIE :

Préparation de la phase mobile

- Méthanol : 225 ml

- ED : 1275 ml

- Dithiotreitol : 0,3 g

Ajuster le pH à 3,2 avec acide ortho phosphorique 10 % (2 gouttes environ).

- Filtrer
- Circuit ouvert

Colonne : TGN Colonne Symmetry C18 5 μ 250x4,6 mm (WATERS)

Débit de la phase mobile : 1,0 ml/minute

Longueur d'onde : De 0 à 5,5 min : 342 nm
De 5,5 à 18 min : 303 nm.

Durée du chromatogramme : 18 minutes

Pression : 115 psi

Temps de rétention : TGNs : 4,3 min 6MP : 4,9 min EI : 11,1 min MeMPs : 6,9 min
DTT : 16,0 min

Mélange essai :

- 100 μ l de solution de 6TG à 10 mg/l (SF1)
- 100 μ l de solution de EI à 5 mg/l
- 400 μ l HCl 0,1 N

Appareillage :

- Chaîne Millennium
- Projet : Méthyl MP
- Méthode : Métabolites

Préparation du Contrôle de Qualité :

4ml de lysat de globules rouges à une numération voisine de $5,0 \cdot 10^8$ GR/100 μ l

et 30 μ l de MMP à 1000 mg/l (SM)

et 40 μ l de 6TG à 100 mg/l (SM 1/10)

Concentration théorique : TGNs = 100 ng/100 μ l

MeMPs = 750 ng/100 μ l

Aliquoter : 16 tubes de 250 μ l

Congeler à - 80 °C

Durée de vie : 6 mois.

5 - Résultat :

TGNs : - Le résultat x est exprimé en ng/100 μ l

- La réponse finale est exprimée en pmol/ $8 \cdot 10^8$ GR par le calcul suivant :

$$x \cdot 1000 / 167,2 \cdot \text{Nombre de GR dans } 100\mu\text{l} / 8 \cdot 10^8 = x \cdot 47,85 / \text{Numération}$$

Numération = nbre de GR (rapport héματο) x 2 exemple : 4,81 x 2

- Poids moléculaire de la thioguanine = 167,2

MeMPs : - Le résultat x est exprimé en ng/100 μl

- La réponse finale est exprimée en pmol/8.10⁸ RBC par le calcul suivant :

$$x \cdot 1000 / 166,2 \cdot \text{Nombre de GR dans } 100\mu\text{l} / 8 \cdot 10^8 = x \cdot 48,13 / \text{Numération}$$

Numération = nbre de GR (rapport héματο) x 2 exemple : 4,81 x 2

- Poids moléculaire de la méthylmercaptopurine = 166,2

Annexe 4

~

Extraction de l'ADN

Mode opératoire

~

Annexe 5

~

PCR et Reverse Dot Blot

Modes opératoires

~

Annexe 6

~

Reverse Dot Blot

Résultats d'une série

~

Annexe 7

~

Détermination du génotype TPMT par séquençage

Mode opératoire

~

Annexe 8



Etude de la TPMT au sein d'une population adulte de référence

Formulaire d'information

Consentement éclairé à la pratique des tests génétiques

Questionnaire



Annexe 9

~

*Etude de la TPMT au sein d'une population d'enfants
de référence*

Formulaire d'information

Consentement éclairé à la pratique des tests génétiques

Questionnaire

~

Annexe 10

~

Etude au sein d'une population d'enfants leucémiques

Formulaire d'information

Consentement éclairé

~

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Variations ethniques des allèles de la TPMT.

Tableau II : Etude de précision pour le dosage de la 6-méthylmercaptopurine.

TABLEAU III : PRECISION DE LA METHODE DE DOSAGE DES 6-TGNS.

TABLEAU IV : PRECISION DE LA METHODE DE DOSAGE DES METHYLMERCAPTOPYRINE NUCLEOTIDES.

Tableau V : Adaptation de posologie de la 6-MP dans le protocole EORTC 58881 ;

Tableau VI : Adaptation de posologie de la 6-MP et du méthotrexate dans le protocole FRALLE 2000.

Tableau V : Comparaison des activités TPMT des enfants de la population de référence (n = 147) avec les enfants atteints de LAL, au diagnostic (n = 35) et au cours du traitement de maintenance.

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA 6-MP, 6-TG, AZATHIOPRINE ET DES BASES PURIQUES.

Figure 2 : Formation de la 6-MP à partir de l'azathioprine.

Figure 3 : Métabolisme de la 6-MP et 6-TG.

Figure 4 : Méthylation de la 6-MP sous l'action de la TPMT.

Figure 5 : Distribution trimodale de la TPMT de Weinshilboum et Sladek.

Figure 6 : Variants alléliques du gène TPMT.

Figure 7 : Corrélation de l'activité TPMT mesurée dans 2 laboratoires différents.

Figure 8 : Corrélation de l'activité TPMT mesurée par 2 méthodes différentes.

Figure 9 : Structure chimique de la 4-mercapto-1H-pyrazolo (3,4-D) pyrimidine.

Figure 10 : Principe du Reverse-Dot-Blot.

FIGURE 11 : REPARTITION DE L'ACTIVITE TPMT CHEZ LES ENFANTS ATTEINTS DE LAL, AU DIAGNOSTIC (A), AU COURS DU TRAITEMENT DE MAINTENANCE (C), CHEZ LES ENFANTS DE LA POPULATION DE REFERENCE (B).

Figure 12 : Répartition des résultats des TGNs (a), des dérivés méthylés (b).

FIGURE 13 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DES RELATIONS ENTRE L'ACTIVITE TPMT ET LES METABOLITES DE LA 6-MP MESURES AU COURS DE LA MAINTENANCE : (A) VARIATION DES TGNs EN FONCTION DE L'ACTIVITE TPMT, (B) VARIATION DES DERIVES METHYLES EN FONCTION DE L'ACTIVITE TPMT, (C) VARIATION DES DERIVES METHYLES EN FONCTION DES TGNs.

MONTEIL Catherine née le 14 Septembre 1962, à Tulle (19)

1, Avenue de Brocéliande, 44 300 NANTES

Directeurs de Thèse : Pr Alain PINEAU et Pr Michel BOURIN

MERCAPTOPURINE ET POLYMORPHISME GENETIQUE

RESUME : Le polymorphisme génétique de l'activité thiopurine-méthyltransférase (TPMT), enzyme qui catabolise les thiopurines, a des répercussions importantes en clinique.

Le génotype et l'activité TPMT ont été déterminés chez 304 adultes donneurs de sang, 147 enfants et 18 nouveaux-nés (sang de cordon) tous Caucasiens. L'activité TPMT varie de 0,43 à 30,38 U/mL PRBC chez l'adulte, de 8,25 à 30,0 U/mL PRBC chez l'enfant et 9,24 à 22,79 U/mL PRBC pour les sangs de cordons. Il n'y a pas de différence significative entre les activités TPMT des sangs de cordon et des adultes ($p = 0,424$). Mais on retrouve une activité légèrement plus faible chez l'enfant que chez l'adulte ($p = 0,016$). Dans le groupe constitué d'enfants et nouveaux-nés, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation significative entre l'activité TPMT et l'âge ($p = 0,127$), ce qui indique que l'activité TPMT est déjà mature à la naissance. Dans l'ensemble de la population, 91,9% sont homozygotes sauvages, 7,9% hétérozygotes et 0,2% homozygote muté. La fréquence des allèles mutés est 3,0% pour TPMT*3A, 0,7% pour TPMT*2 et 0,4% pour TPMT* 3C. Pour les valeurs d'activité TPMT proches de l'antimode, il existe un chevauchement entre les sujets homozygotes et hétérozygotes concernant 4,5% de la population.

Les conséquences du polymorphisme de la TPMT ont été étudiées chez 54 enfants leucémiques traités par 6-mercaptopurine (6-MP) au cours de la phase de maintenance. 39 (90,7%) génotypes TPMT sont homozygotes *1/*1 et 4 (9,3%) hétérozygotes *1/*3A. L'activité TPMT au diagnostic est 20,4% plus faible que celle de la population d'enfants de référence. Pendant la maintenance, l'activité TPMT est 27,4% plus élevée que pour la population de référence. Nos résultats montrent une corrélation inverse entre l'activité TPMT et les TGNs intraérythrocytaires, métabolites actifs de la 6-MP, responsables, au moins en partie, de l'effet antileucémique. L'enzyme TPMT joue donc un rôle majeur au niveau de la métabolisation de 6-MP et de la réussite du traitement.

MOTS CLES : THIOPURINE-METHYLTRANSFERASE, POLYMORPHISME, PHENOTYPE, GENOTYPE, ONTOGENESE, LEUCEMIE.

MERCAPTOPURINE AND GENETIC POLYMORPHISM

SUMMARY : Thiopurine methyltransferase (TPMT), enzyme which catabolizes thiopurine drugs, is subject to genetic polymorphism.

TPMT genotype and activity were determined in 304 adult blood donors, 147 children and 18 newborns (cord bloods), all Caucasian. TPMT activity ranged from 0.43 to 30.38 U/mL PRBC in adults, from 8.25 to 30.0 U/mL PRBC in children and from 9.24 to 22.79 U/mL PRBC in cord bloods. There was no significant difference between cord bloods and adults ($p = 0.424$). But we found a slightly lower TPMT activity in children than in adults ($p = 0.016$). In the children and cord bloods group, no significant correlation was evidenced between TPMT and age ($p = 0.127$): TPMT is already mature at birth. In the whole population, 91.9% was homozygous wild-type, 7.9% heterozygous and 0.2% homozygous mutant. The frequency of mutant allele was 3.0% for TPMT/*3A, 0.7% for TPMT*2 and 0.4% for TPMT*3C. For TPMT activities close to the antimode value, there was an overlap between homozygous and heterozygous subjects concerning 4.5% of subjects.

Consequences of TPMT polymorphism were studied in 54 leukemic children treated with 6-MP during maintenance phase. 39 (90.7%) TPMT genotypes were homozygous *1/*1 and 4 (9.3%) heterozygous *1/*3A. Diagnosis TPMT activity is 20.4% lower than in the reference children population. During maintenance, TPMT activity was 27.4% higher than the reference population. Our results showed an inverse correlation between TPMT activity and red blood cells TGNs, which are 6-MP active metabolites, responsible, at least in part, for the anti-leukemic effect. TPMT enzyme plays a major role for 6-MP metabolisation and treatment success.

KEY WORDS : THIOPURINE METHYLTRANSFERASE, POLYMORPHISM, PHENOTYPE, GENOTYPE, ONTOGENESIS, LEUKEMIA.

