

Université de Montréal

Les polymorphismes des gènes encodant les protéines apoptotiques Bim et Bax : leur
rôle dans la réponse thérapeutique chez les enfants ayant la leucémie
lymphoblastique aiguë

par

Julie Rousseau

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

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

Juillet, 2009

© Julie Rousseau, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Les polymorphismes des gènes encodant les protéines apoptotiques Bim et Bax : leur
rôle dans la réponse thérapeutique chez les enfants ayant la leucémie
lymphoblastique aiguë

présenté par :

Julie Rousseau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Guy Rousseau, président-rapporteur

Maja Krajinovic, directeur de recherche

Jean-François Gauchat, membre du jury

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS

Introduction Des réponses thérapeutiques variables aux glucocorticoïdes (GCs) sont observées parmi les patients atteints de la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA). Les protéines Bax et Bim ont déjà montré un rôle important dans l'apoptose des cellules leucémiques. L'expression de Bax était plus basse chez les patients leucémiques résistants au médicament, de même une sensibilité diminuée aux GCs a été associée avec une expression réduite de Bim. La différence dans l'expression pourrait être due à des polymorphismes présents dans ces gènes et donc être associés avec la résistance aux GCs. **Méthode** Dix-huit polymorphismes en régions régulatrices, 2 polymorphismes exoniques et 7 polymorphismes en région 3'UTR de ces gènes ont été analysés chez les témoins (n=50) et ont permis de déterminer un nombre minimal de polymorphismes suffisants pour définir les haplotypes (tagSNPs). Ces 8 polymorphismes ont ensuite été génotypés chez 286 enfants atteints de la LLA et ont été testés pour l'issue de la maladie par l'analyse de survie. **Résultats** Une survie sans évènement et une survie sans rechute diminuées ont été observées pour l'haplotype 3 ($p=0,03$ et $p=0,02$). Une survie globale diminuée a été associée avec l'homozygotie pour l'allèle exonique T298C>T ($p=0,03$), de même que pour les haplotypes 1 et 4 ($p=0,04$ et $p=0,02$) du gène Bim. **Conclusion** Les polymorphismes ont été associés avec une survie diminuée chez des enfants atteints de LLA. Il reste à tester d'autres polymorphismes présents dans ces deux gènes ainsi qu'à définir leurs fonctions afin de comprendre leurs rôles dans la réponse aux GCs.

Mots clés : leucémie lymphoblastique aiguë, pharmacogénétique, glucocorticoïdes, polymorphisme, apoptose, Bim, Bax

ABSTRACT AND KEYWORDS

Introduction Variable therapeutic responses to glucocorticoids (GCs) are observed for acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients. Proteins Bax and Bim have already shown to play a major role in mediating GC-induced apoptosis in leukemia cells. Bax expression was lower in drug-resistant leukemia samples; likewise lower sensitivity to GC was associated with reduced Bim expression. The difference in the expression can be due to polymorphisms in these genes and therefore associated to GC resistance. **Method** Eighteen polymorphisms in the regulatory region, two exonic polymorphisms and seven polymorphisms in 3'UTR of these genes were analysed in controls (n=50) and have permitted to determine a minimal number of polymorphisms sufficient to define haplotypes (tagSNPs). These 8 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were then genotyped in 286 LLA children and were tested for disease outcome by survival analysis. **Results** A diminished event free survival and a diminished relapse free survival were observed for haplotype 3 (p=0,03 and p=0,02). A diminished overall survival was associated with the exonic T298C>T allele (p=0,03) and with haplotypes 1 and 4 (p=0,04 and p=0,02) of Bim gene. **Conclusion** Bax and Bim were associated with a diminished survival in LLA children. We still have to test other polymorphisms located in these genes and to define their functions in order to understand their roles in GC response.

Keywords : acute lymphoblastic leukemia, pharmacogenetic, glucocorticoid, polymorphism, SNP, apoptosis, Bim, Bax

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS.....	iii
ABSTRACT AND KEYWORDS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xi
REMERCIEMENTS	xii
A INTRODUCTION	1
A.1 Leucémie lymphoblastique aiguë	1
A.1.1 Différentiation normale de la lignée lymphoïde.....	1
A.1.2 Introduction à la LLA	2
A.1.3 Épidémiologie	2
A.1.4 Critères diagnostiques	3
A.1.5 Facteurs de risques pronostiques	5
A.1.6 Traitement de la LLA	8
A.2 Glucocorticoïdes	10
A.2.1 Rôles des GCs	10
A.2.2 Glucocorticoïdes de synthèse : dexaméthasone et prednisone	10
A.2.3 Toxicité	11
A.2.4 Résistance	12
A.2.5 Apoptose induite par les GCs	15
A.3 Gènes candidats	17
A.3.1 Famille BCL-2	17
A.3.2 Bax	18
A.3.2.1 Généralités	18

A.3.2.2 Implication pathologiques.....	20
A.3.3 Bim	21
A.3.3.1 Généralités	21
A.3.3.2 Implications pathologiques	23
B PHARMACOGÉNÉTIQUE	25
B.1 Methotrexate	25
B.2 6-Mercaptopurine	27
C HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	29
D MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	30
D.1 Matériel biologique (ADN)	30
D.2 Polymorphismes	30
D.3 Génotypage	31
D.4 Patients et protocoles.....	32
D.5 Analyses statistiques.....	32
E RÉSULTATS.....	36
E.1 Gène Bax.....	36
E.1.1 Détermination des TagSNPs.....	36
E.1.2 Issue de la LLA : analyse de survie selon les génotypes de Bax.....	37
E.1.3 Haplotypes de BAX.....	39
E.1.3.1 Répartition des haplotypes.....	39
E.1.3.2 Impact des haplotypes de Bax.....	39
E.1.3.2.1 Issue de la LLA : analyse de survie selon les haplotypes.....	39
E.1.3.2.2 Perte ou gain de sites de liaison	44
E.2 Gène Bim.....	45
E.2.1 Détermination des TagSNPs.....	45
E.2.2 Issue de la LLA : analyse de survie selon les génotypes.....	46
E.2.3 Impact des haplotypes de Bim.....	52
E.2.3.1 Répartition des haplotypes.....	52

E.2.3.2 Issue de la LLA : analyse de survie selon les génotypes	53
E.2.3.2.1 Analyse de survie de l'haplotype 1	55
E.2.3.2.2 Analyse de survie de l'haplotype 4	58
E.2.3.3 Perte ou gain de sites de liaison	60
E.3 Toxicité liée aux GCs	61
F DISCUSSION.....	68
F.1 Gène Bax	68
F.1.1 Polymorphismes de Bax	68
F.1.2 Haplotypes de Bax	70
F.2 Gène Bim	72
F.2.1 Polymorphismes de Bim	73
F.2.2 Haplotypes de Bim	74
G CONCLUSION	76
H RÉFÉRENCES	78
ANNEXES	xiii

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
I.	Fréquence de marqueurs de la lignée B selon le degré de différenciation	3
II.	Profil immunophénotypique de la lignée T selon le degré de différenciation	4
III.	Protocoles de traitement du DFCI LLA	33
IV.	Fréquence des génotypes du gène Bax chez des enfants ayant la LLA avec et sans évènement	37
V.	Fréquence des génotypes du gène Bax chez des enfants ayant la LLA avec et sans rechute	38
VI.	Fréquence des génotypes du gène Bax chez des enfants ayant la LLA avec et sans décès	38
VII.	Fréquences des haplotypes de Bax dans la cohorte LLA	39
VIII.	Fréquence des haplotypes du gène Bax chez des enfants ayant la LLA avec et sans évènement	40
IX.	Fréquence des haplotypes du gène Bax chez des enfants ayant la LLA avec et sans rechute	40
X.	Fréquence des haplotypes du gène Bax chez des enfants ayant la LLA avec et sans décès	41
XI.	Régression de Cox : tous les paramètres pronostiques communs	43
XII.	Analyse de l'EFS par régression de Cox	43
XIII.	Analyse de la RFS par régression de Cox	43
XIV.	Perte ou gain de sites de liaison à des facteurs de transcription pour l'haplotype 3	44
XV.	Fréquence des génotypes du gène Bim chez des enfants ayant la LLA avec et sans évènement	47
XVI.	Fréquence des génotypes du gène Bim chez des enfants ayant la LLA avec et sans rechute	48
XVII.	Fréquence des génotypes du gène Bim chez des enfants ayant la LLA avec et sans décès	49
XVIII.	Régression de Cox pour le variant Bim298C>T avec les paramètres significatifs pour la survie globale	50
XIX.	Association du variant 298C>T avec le traitement à la prednisone ou à la dexaméthasone pour la survenue de décès	51

XX.	Fréquences des haplotypes de Bim dans la cohorte LLA	52
XXI.	Fréquence des haplotypes du gène Bim chez des enfants ayant la LLA avec et sans évènement	53
XXII.	Fréquence des haplotypes du gène Bim chez des enfants ayant la LLA avec et sans rechute	54
XXIII.	Fréquence des haplotypes du gène Bim chez des enfants ayant la LLA avec et sans décès	55
XXIV.	Analyse de l'OS par régression de Cox	56
XXV.	Association de l'haplotype 1 avec le traitement à la prednisone ou à la dexaméthasone pour la survenue de décès	57
XXVI.	Analyse de l'OS par régression de Cox	59
XXVII.	Association de l'haplotype 4 avec le traitement à la prednisone ou à la dexaméthasone pour la survenue de décès	59
XXVIII.	Perte ou gain de sites de liaison à des facteurs de transcription pour les différents haplotypes de Bim	61
XXIX.	Associations du diabète cortico-induit avec les génotypes du gène Bax	62
XXX.	Association de l'obésité avec les génotypes du gène Bax	63
XXXI.	Association des génotypes du gène Bax avec les infections de grades 3 et 4	63
XXXII.	Association des haplotypes du gène Bim avec l'ostéonécrose	64
XXXIII.	Association des génotypes du gène Bax avec les troubles de comportement	65
XXXIV.	Association des génotypes du gène Bax avec les troubles de comportement	66
XXXV.	Association du changement de prednisone avec les génotypes du gène Bim	67

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
1	Fréquences estimées de génotypes spécifiques de la LLA chez l'enfant	4
2	Structures chimiques de la dexaméthasone et de la prednisone	10
3	Principaux mécanismes de résistance aux GCs	12
4	Modèle d'induction de l'apoptose médiée par les GCs	14
5	Membres de la famille Bcl-2	18
6	Représentation des 3 isoformes majeurs de Bim avec leurs sites de phosphorylation pour MAPK et JNK	22
7	Voies d'action du MTX	26
8	Métabolisme de la 6-Mercaptopurine (6-MP)	28
9	Position et fréquences alléliques des variants du gène Bax génotypés	36
10	Déséquilibre de liaison entre les polymorphismes du gène Bax (A) et présentation des haplotypes définis à partir de ceux-ci (B)	37
11	Courbe de survie pour la survenue d'un événement (A), pour la survenue de rechute (B) et pour la survenue de décès (C) pour l'haplotype 3	42
12	Courbe de survie sans événement associée à l'haplotype 3 selon le traitement, soit à la prednisone (A) ou à la dexaméthasone (B)	44
13	Position et fréquences alléliques des variants du gène Bim génotypés	45
14	Déséquilibre de liaison entre les polymorphismes du gène Bim	46
15	Courbe de survie pour la survenue d'un événement (A), pour la survenue de rechute (B) et pour la survenue de décès (C) du polymorphisme 298C>T	50
16	Courbe de survie globale associée au polymorphisme 298C>T selon le traitement, soit à la prednisone (A) ou à la dexaméthasone (B)	51
17	Courbe de survie pour la survenue d'un événement (A), pour la survenue de rechute (B) et pour la survenue de décès (C) pour l'haplotype 1	56
18	Courbe de survie globale associée à l'haplotype 1 selon le traitement, soit à la prednisone (A) ou à la dexaméthasone (B)	57
19	Courbe de survie pour la survenue d'un événement (A), pour la survenue de rechute (B) et pour la survenue de décès (C) pour l'haplotype 4	58
20	Courbe de survie globale associée à l'haplotype 4 selon le traitement, soit à la prednisone (A) ou à la dexaméthasone (B)	60

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abréviation	Signification
ASO	Hybridation allèle-spécifique
Bcl	B cell lymphoma
CLL	Leucémie lymphoïde chronique
CS	Corticostéroïde
DFCI	Dana Farber Cancer Institute
DHFR	Dihydrofolate réductase
EFS	Event free survival
GC	Glucocorticoïde
GR	Récepteur aux glucocorticoïdes
GRE	Glucocorticoid response element
LLA	Leucémie lymphoblastique aiguë
6-MP	6-Mercaptopurine
MRD	Maladie résiduelle minimale
NCI	National Cancer Institute
OS	Overall survival
PCR	Polymerase chain reaction
RFS	Relapse free survival
TPMT	Thiopurine méthyltransférase
TS	Thymidylate synthase
UTR	Untranslated region
WBC	White blood cell count

REMERCIEMENTS

Je remercie ma directrice de recherche, Dr Maja Krajinovic, pour ses échanges scientifiques, ses conseils et sa motivation qui m'ont permis de mener à bien mon projet de maîtrise.

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

Je remercie la Société de Recherche sur le Cancer pour le support financier de ce projet ainsi que le département de Pharmacologie pour leur bourse de soutien.

Je remercie ma famille pour leur soutien psychologique et leur motivation à toujours aller plus loin. Je remercie mon amoureux pour ses encouragements et ses taquineries.

Je remercie tous les enfants et leur famille pour leur participation à notre étude.

A INTRODUCTION

A.1 LEUCÉMIE LYMPHOBLASTIQUE AIGUË

A.1.1 Différentiation normale de la lignée lymphoïde

Les cellules progénitrices de la lignée lymphoïde se différencient afin de former les lymphocytes B et T. La maturation des cellules B s'effectue dans la moelle osseuse et implique la transition cellulaire pro-B → pré-B → immature → mature. L'activation et la prolifération des lymphocytes B en plasmocytes durant une réponse immune peut se faire, entre autres, par l'activation des cellules B naïves dans la rate, par l'activation des cellules folliculaires B dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes ou suite à la stimulation antigénique de cellules B mémoires [1]. La maturation des cellules T s'effectue dans le thymus. Les cellules T naïves se différencient en plusieurs sous-classes de cellules effectrices, telles que les cellules T helper 1 (Th1), Th2 et Th17, impliquées dans la défense contre les pathogènes et dans l'aide à la réponse cellulaire des cellules B, ainsi qu'en cellules T cytotoxiques [2]. Plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation et la maturation cellulaire. Bcl-6 est un régulateur critique de la différenciation des cellules B matures. La protéine Bcl-6 est fortement induite dans les cellules B des centres germinatifs où elle promouvoit leur prolifération [3]. Elle vient réprimer de nombreux gènes, tel que Blimp-1 [1] et p53 [4]. Bcl-6 serait aussi impliqué dans la différenciation des cellules T. Ce facteur de transcription serait spécifique à la différenciation de la lignée cellulaire d'aide aux cellules B au niveau des centres germinatifs soit les Tfh (T follicular helper) en réprimant les facteurs de transcription impliqués dans l'expression de Th1, Th2 et Th17 [2]. Un autre facteur de

transcription important est c-Maf. Il promouvoit le développement des cellules Th2 et atténue la différenciation en cellules Th1 [5]. Il vient transactiver le promoteur endogène de l'IL-4 dans les cellules se développant en Th2 et viendrait réguler l'expression apoptotique lors de la différenciation cellulaire [6]. Le facteur c-Maf serait aussi impliqué dans la différenciation des cellules Th17 et Thf [7].

A.1.2 Introduction à la LLA

La leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) est un cancer qui prend origine dans la moelle osseuse. Elle résulte de la prolifération clonale incontrôlée de précurseurs des lymphocytes B et T, les lymphoblastes, qui envahissent la moelle osseuse, le sang et d'autres organes [8]. Les principaux symptômes de la LLA sont causés par l'augmentation du nombre de blastes dans le sang qui réduit le nombre de cellules sanguines normales. Ils incluent la pâleur, la fatigue, les douleurs osseuses, l'anémie, un état fébrile persistant et le purpura. L'invasion leucémique peut être vue par une lymphadénopathie et une hépatosplénomégalie [9].

A.1.3 Épidémiologie

Dans les pays occidentaux, moins de 1% des cancers diagnostiqués annuellement sont des cancers pédiatriques [8]. Le cancer affecte 1 enfant sur 500 avant l'âge de 14 ans [10]. La LLA est la maladie maligne la plus fréquente à l'âge pédiatrique. Elle représente environ 25 % de l'ensemble des cancers observés chez l'enfant [8, 10] et 80% de tous les cas de leucémies [11]. Son incidence annuelle est de 3 à 4 nouveaux cas pour 100 000 enfants et adolescents de moins de 16 ans [12]. Elle peut affecter l'enfant à n'importe quel âge, mais elle est diagnostiquée

principalement à l'âge préscolaire vers 3 à 6 ans [13]. La LLA chez l'enfant en bas âge, soit diagnostiqué à un an ou moins, est peu commune, représentant de 2 à 4 % des cas pédiatrique de LLA [14]. Le type pré-B est le plus retrouvé soit dans 80% des cas contrairement au pré-T qui est présent dans 15 % des cas [8, 10]. La LLA à cellules B matures est très rare et est retrouvée dans 2 à 4 % des cas [15].

A.1.4 Critères diagnostiques

Le diagnostic de la LLA inclut l'évaluation de la présence et de la morphologie des lymphoblastes, un nombre élevé soit plus de 10×10^9 leucocytes/L étant retrouvé chez la moitié des patients atteints de LLA. Il inclut aussi des analyses cytogénétiques et moléculaires ainsi que l'analyse de l'immunophénotype [16].

Tableau I. Fréquence de marqueurs de la lignée B selon le degré de différenciation [15]

Subtype	Immunologic marker (% cases positive for marker)								Frequency
	CD19	CD20	CD22	CD79 α^a	CD10	cyt μ	sig μ	sig κ or λ	
Early pre-B (pro-B)	100	35	99	99	95	0	0	0	60-65%
Pre-B	100	45	100	100	100	100	0	0	20-25%
Transitional pre-B (late pre-B)	100	55	100	100	100	100	100	0	10-12%
Mature B	100	99	100	99	50	100	~95 ^b	~95 ^b	3-5%

Abbreviations cyt μ , cytoplasmic immunoglobulin mu heavy chain; sig μ , surface immunoglobulin mu heavy chain; sig κ or λ , surface immunoglobulin kappa or lambda light chain.

^a Cytoplasmic expression

^b From 2% to 5% of cases with t(8;14), t(2;8), or t(8;22) may lack surface immunoglobulin or express only cytoplasmic immunoglobulin.

Tableau II. Profil immunophénotypique de la lignée T selon le degré de différenciation (adapté de [15])

Subgroup	Immunophenotype profile
Pre-T	CD7 ⁺ , cysCD3 ⁺ , sCD3 ⁻ , CD2 [±] , CD5 ⁻ , CD1a ⁻ , CD10 ⁻ , CD4 ⁻ , CD8 ⁻
Early T	CD7 ⁺ , cysCD3 ⁺ , sCD3 ⁻ , CD2 ⁺ , CD5 [±] , CD1a ⁻ , CD10 ⁻ , CD4 ⁻ , CD8 ⁻
Common T	CD7 ⁺ , cysCD3 ⁺ , sCD3 ⁺ , CD2 ⁺ , CD5 ⁺ , CD1a [±] , CD10 [±] , CD4 [±] , CD8 [±]
Late T	CD7 ⁺ , cysCD3 ⁺ , sCD3 ⁺ , CD2 ⁺ , CD5 ⁺ , CD1a ⁻ , CD10 ⁻ , CD4 ⁺ or CD8 ⁺

Abbreviations : cysCD3, cytoplasmic CD3; sCD3, surface CD3; TCR, T-cell receptor antigen

Ainsi, pour classifier les différents types de LLA, l'expression de molécules à la surface des cellules permet de différencier la lignée cellulaire. Les cellules leucémiques pré-B présenteront des antigènes communs des progéniteurs B tels que le CD19, CD20, CD24, CD22, CD21 et CD79 alors que les cellules leucémiques pré-T présenteront des antigènes des précurseurs T tel que le CD3 [15-17]. De même, le profil de marqueurs permet d'évaluer le degré de différenciation des 2 lignées (tableaux I, p.3 et II, p.4).

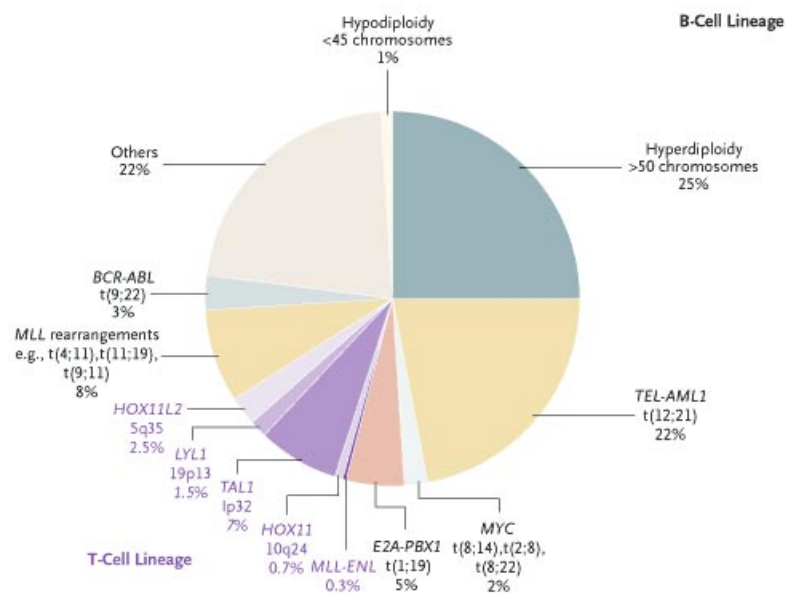


Figure 1. Fréquences estimées de génotypes spécifiques de la LLA chez l'enfant [18]

De même, l'analyse des anomalies génétiques moléculaires et cytogénétiques aide au diagnostic. En effet, les cellules LLA présentent des irrégularités communes fréquentes telles que des translocations spécifiques et des changements du nombre de chromosomes. La probabilité des diverses anomalies retrouvées diffèrent selon la lignée cellulaire (figure 1, p.4) [16, 18].

A.1.5 Facteurs de risques pronostiques

Le traitement de la LLA est une thérapie dite adaptée au risque, soit que l'intensité du traitement est adaptée au risque relatif de rechute du patient [19]. Ainsi, le pronostic s'établit sur de nombreux facteurs.

Les deux plus importants facteurs prédictifs sont l'âge et le compte du nombre de leucocytes (WBC) au diagnostic. Les critères du National Cancer Institute (NCI) stratifient les patients selon ces 2 facteurs, 1 à 9,99 ans et $WBC < 50\,000/\mu L$ étant un risque standard et ≥ 10 ans et/ou $WBC \geq 50\,000\ \mu L$ étant associé à un risque plus élevé [20]. De même, un diagnostic en bas âge, soit 12 mois et moins, est un mauvais pronostic [14]. Le sexe est aussi un critère de risque, les filles ayant une plus grande survie sans évènement que les garçons, même en étant traitée avec moins de thérapie [20]. Les patients ayant l'immunophénotype pré-T ont aussi un taux de survie inférieur [20, 21]. La présence d'une maladie du système nerveux central au diagnostic est un mauvais signe pronostique [20]. Un index ADN de blastes entre 1,16 et 1,6 est un pronostic favorable [13].

La sensibilité aux corticostéroïdes (CS) est un aussi critère de risque [11] pour certains protocoles qui font usage de prednisone en monothérapie, tels que les protocoles Berlin-Frankfurt-Munich (BFM) [22]. Ainsi, une résistance *in vitro* à la prednisolone, à la vincristine et à l'asparaginase est un facteur pronostique négatif [23]. De plus, suite à la fenêtre initiale du monotraitement avec la prednisone qui s'intensifie de 20 à 60 mg/m² et d'une dose intratécale ajustée à l'âge de méthotrexate, la sensibilité *in vivo* des blastes leucémiques à l'apoptose induite par les stéroïdes peut être mesurée chez le patient. Les patients qui ont une clairance plus rapide de blastes dans le sang périphérique, soit moins de 1x10⁹ blastes/L au jour 8, sont classés comme de bon répondeur à la prednisone et ont une issue plus favorable [13]. Ainsi, une mauvaise réponse précoce à la thérapie [14, 20], soit une présence de blastes périphérique après 1 semaine d'induction conventionnelle de chimiothérapie, est un mauvais pronostic [20].

La maladie résiduelle minimale (MRD) est aussi un critère de risque pronostique. Elle représente le nombre réduit de cellules leucémiques ayant échappées au traitement d'induction [12]. Des essais de MRD fournissent une estimation directe de la réponse précoce au traitement et sont associés avec l'issue finale [24]. Les changements dans les essais séquentiels précoces de MRD ont été associés à la variation de la réponse au traitement durant les 4 à 6 semaines de thérapie d'induction. [25, 26]. Les analyses de la MRD reposent sur la détection de phénotypes uniques à la surface des cellules leucémiques et non présents sur les cellules hématopoïétiques normales. Ainsi, les patients sans MRD à la fin de l'induction présentent une bonne issue de la maladie, c'est-à-dire une survie sans évènement à 3 ans plus grande que 90%. Au contraire, les patients présentant une haute MRD, soit $\geq 10^{-2}$ cellules leucémiques, sont associés à un mauvais pronostic,

soit à une survie sans évènement à 3 ans d'environ 25% [20]. Une concentration de blastes leucémiques de 10% au jour 15 ou de 1% à la fin de l'induction de la thérapie ou plus tard est corrélée avec un risque de rechute de leucémie très élevé [13].

Enfin, la présence d'anormalités cytogénétiques ou génétiques moléculaires spécifiques est aussi associée au risque de la LLA. L'hyperdiploïdie (> 50 chromosomes) est associée à un bon pronostic [14, 20, 24] alors que l'hypodiploïdie (< 45 chromosomes) est vu comme un facteur de risque [24]. La fusion des gènes TEL/AML1 est observée dans environ 25% des cas de LLA à précurseurs B et est associée à un bon pronostic, soit à une survie sans évènement de 75%-90% [14, 20]. De même, les trisomies 4, 10 et 17 confèrent un meilleur pronostic [13, 24]. La fusion des gènes BCR/ABL qui correspond au chromosome de Philadelphie est retrouvée chez environ 2,5% des enfants et est associée à une mauvaise issue, tout comme la fusion E2A/PBX [13] et le réarrangement du gène MLL [14, 20, 24].

Ainsi, tous ces critères pronostiques servent à stratifier les traitements selon le risque du patient, les doses et les médicaments utilisés étant modifiés en fonction du groupe. Les protocoles DFCI 87-01, 91-01, 95-01 et 2000-01 du Consortium du Dana-Farber Cancer Institute (DFCI), qui sont les protocoles suivis par tous les patients de notre cohorte, divisent les patients en 3 groupes, soit risque standard (SR), haut risque (HR) ou très haut risque (VHR). Chaque groupe est défini selon les critères pronostiques suivant : SR : âge 2-9 ans, WBC au diagnostic < 50 X 10⁹/L, phénotype de progéniteurs B, absence de masse médiastinale, absence du chromosome de Philadelphie et absence d'implication du système nerveux central; VHR: âge < 12 mois et/ou WBC > 100 X 10⁹/L; HR : tous les autres [27]. Seulement

quelques rares patients du protocole 87-01 ont été classifiés VHR. Les protocoles sont présentés au tableau III à la page 33.

A.1.6 Traitement de la LLA

La survie des enfants atteints de LLA s'est beaucoup améliorée au cours des dernières décennies, atteignant aujourd'hui un taux de 80% grâce à des thérapies combinées adaptées au risque [9]. Cependant, la résistance au traitement constitue encore un obstacle majeur au succès. Vingt à 25% de tous les enfants ayant la LLA développeront une récurrence [12]. Les patients à haut risque ayant des facteurs pronostiques moins favorables vont nécessiter des traitements plus agressifs [28].

Le traitement de la LLA inclut l'usage d'une combinaison de médicaments de différentes classes. Elle comprend des antimétabolites tels que le méthotrexate, la cytarabine et la 6-mercaptopurine, des alcaloïdes telle que la vincristine, des anthracyclines telle que la doxorubicine, des glucocorticoïdes telles que la prednisone et la dexaméthasone ainsi que l'asparaginase qui est une enzyme isolée d'une bactérie. Les antimétabolites sont des analogues de métabolites endogènes. En prenant leur place, elles inhibent la réplication et division cellulaire en s'incorporant directement dans l'ADN ou en interférant avec sa synthèse [29]. Les alcaloïdes empêchent la synthèse des microtubules et la formation du fuseau, inhibant ainsi la division cellulaire [30]. Les anthracyclines s'intercalent entre les bases d'ADN et inhibent l'enzyme topoisomérase II [31]. Les glucocorticoïdes induisent l'apoptose des cellules en agissant directement ou indirectement sur l'expression de gènes [32]. Enfin, l'asparaginase hydrolyse l'asparagine ce qui résulte en une diminution du niveau sanguin de cette dernière et de glutamine et inhibe la synthèse protéique, les

cellules tumorales étant incapable de synthétiser l'asparagine [33]. Ainsi, l'inhibition de plusieurs voies permet une meilleure cytotoxicité des cellules leucémiques.

La thérapie consiste en plusieurs phases [13, 24]. Tout d'abord, l'induction de la rémission avec une chimiothérapie intensive d'une durée de 4 à 5 semaines permet une cytoréduction, soit des blastes résiduels de moins de 5% à la fin de l'induction et de diminuer le risque d'infection. Elle comprend la combinaison de 3 à 5 médicaments. Il y a aussi thérapie directe du système nerveux central avec des médicaments et de la radiothérapie afin de prévenir la progression ou la rechute méningiale. Ensuite, une thérapie d'intensification est utilisée afin d'éliminer les maladies résiduelles. Les bénéfices de ce second traitement intensif ont fait leurs preuves, même chez les patients atteints de LLA à faible risque [22]. Enfin, il y a le maintient de la thérapie afin de compléter 2 ans de traitement continu dans le but d'assurer la poursuite d'une rémission complète et de reprendre l'hématopoïèse normale.

A.2 GLUCOCORTICOÏDES

A.2.1 Rôles des GCs

Les GCs sont des hormones stéroïdiennes produites par les glandes corticosurrénales suite à une stimulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien [34]. Ils sont impliqués dans une variété de processus biologiques. Ils ont un effet sur le métabolisme en catabolisant les protéines, les lipides et les carbohydrates ainsi qu'en augmentant la glycémie sanguine [32]. Ils jouent un rôle

important dans la réponse au stress [32] et sont impliqués dans la croissance cellulaire et la prolifération, les réponses immunitaires, le développement et la reproduction [34]. Les GCs induisent une apoptose massive dans certaines cellules de la lignée lymphoïde ainsi que dans quelques tissus et cellules non-lymphoïdes comme l'hippocampe et certaines cellules cancéreuses [32]. Ses effets immunosuppresseur et anti-inflammatoire à des doses thérapeutiques sont exploités dans de nombreux traitements thérapeutiques par l'utilisation d'homologues synthétiques telles que la dexaméthasone et la prednisonne [35].

A.2.2 Homologues de synthèse : dexaméthasone et prednisonne

La dexaméthasone et la prednisonne sont 2 médicaments glucocorticoïdes importants impliqués dans le traitement de plusieurs maladies, telles que la LLA [27] et le myélome [36]. Elles sont dérivées d'hormones endogènes via des modifications structurales (voir figure 2, p.10).

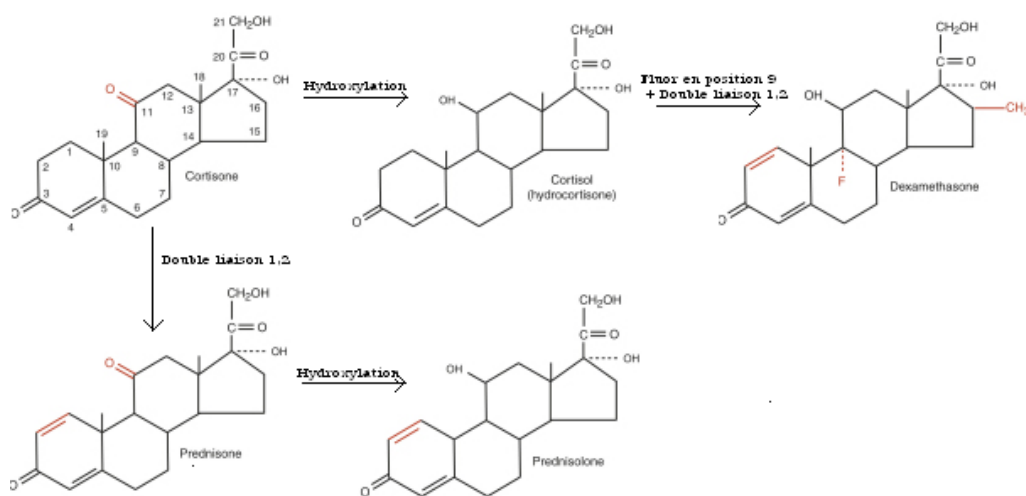


Figure 2. Structures chimiques de la dexaméthasone et de la prednisonne (adaptée de [37])

La dexaméthasone est une molécule pharmacologiquement active qui dérive du cortisol, un composé endogène actif, via l'addition d'une double liaison 1,2 et l'ajout d'un groupe fluor en position 9. Ces 2 modifications augmentent de façon importante son activité glucocorticoïde [38]. La dexaméthasone a une demi-vie biologique de 36 à 54 heures et sa demi-vie d'élimination est de 1,8 à 3,5 heures [39]. La dexaméthasone a un taux de liaison à la transcortine plus faible que pour les autres glucocorticoïdes synthétiques, permettant ainsi une fraction libre plus élevée [40]. De même, sa plus faible liaison permet une meilleure pénétration cérébrospinale [40, 41]. Son élimination se fait principalement par sa métabolisation hépatique en composés inactifs qui sont ensuite excrétés par le foie [38]. Elle est aussi éliminée dans l'urine et les fèces [39].

La prednisone est une prodrogue analogue à la cortisone, un composé endogène inactif, qui est rapidement activée par hydroxylation hépatique en son composé actif, la prednisolone. Cette dernière contient l'addition de la double liaison 1,2 qui rend l'activité glucocorticoïde plus élevée [38]. La demi-vie biologique de la prednisone est de 18 à 36 heures et sa demi-vie d'élimination est d'environ 3,5 heures [39]. La prednisone est majoritairement retrouvée sous une forme liée à des protéines plasmatiques (65% à 91%) et plus particulièrement à la transcortine, rendant ainsi sa clairance dose-dépendante [38, 39]. Elle est principalement éliminée par métabolisme hépatique. Une petite portion est éliminée telle quelle dans l'urine [38].

A.2.3 Toxicité

L'utilisation de hautes doses de dexaméthasone est associée avec de hauts taux de morbidité incluant des infections bactériennes et fongiques, des altérations du

comportement et des nécroses avasculaires [13]. Les infections sont une complication sérieuse et majeure à la thérapie de la LLA et sont, après les rechutes, la 2^{ème} cause la plus commune de décès parmi ces enfants [20]. Les GCs sont aussi connus comme causant l'ostéoporose [34]. L'usage de corticostéroïdes augmente les risques de morbidité osseuse, telles que l'ostéopénie, les fractures [42] et l'ostéonécrose [42-44]. Ils causent la réduction de la densité minérale osseuse durant et même plusieurs années après la fin de la thérapie [42]. L'obésité est aussi une complication retrouvée [45]. Le traitement à long terme affecte le comportement et l'humeur pouvant résulter parfois en un syndrome de psychose stéroïdienne, la dexaméthasone semblant plus neurotoxique que la prednisone [46].

A.2.4 Résistance

Un problème important à la thérapie aux GCs est la résistance au traitement chez un nombre significatif d'individus. Les cellules des patients atteints de LLA ayant fait une rechute ont été montrées comme étant beaucoup plus résistantes à la prednisone et à la dexaméthasone, soit environ 300 fois et 20 fois plus résistantes respectivement, que les cellules leucémiques initiales prises au diagnostic. Ainsi, une résistance initiale et une résistance acquise au cours du traitement seraient impliquées dans les mauvaises réponses des patients et avec les risques de rechutes [47]. La sensibilité aux GCs est d'ailleurs un facteur de risque pronostique [11], la résistance cellulaire étant liée à la réponse clinique [48].

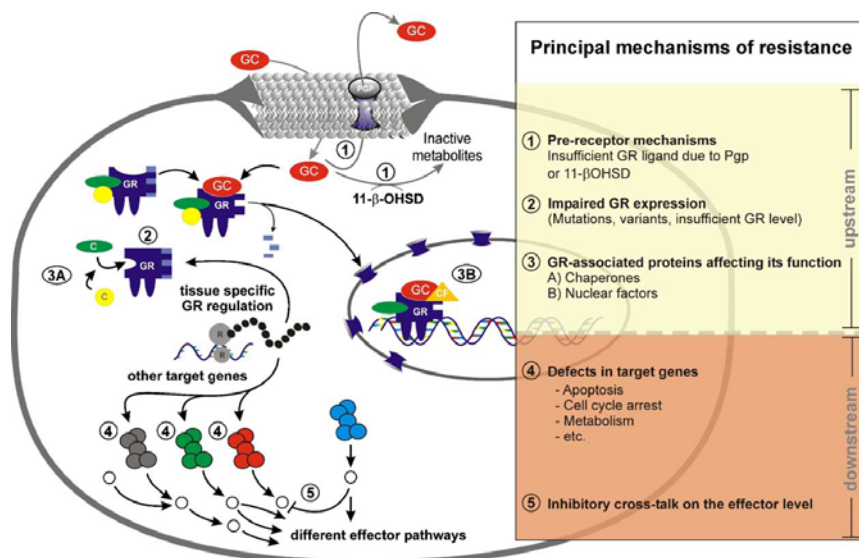


Figure 3. Principaux mécanismes de résistance aux GCs [49]

La résistance aux GCs peut être due à de nombreux mécanismes [50] (voir figure 3, p12).

Il peut y avoir une insuffisance du ligand. En effet, un niveau intracellulaire suffisant des composés actifs des GCs est nécessaire afin d'avoir l'effet biologique recherché, soit la cytotoxicité [32]. Ceci pourrait être dû à une augmentation de l'expression du transporteur multi-drogue MDR1, ce dernier ayant démontré sa capacité à transporter les stéroïdes. Son expression dans les lignées cellulaires de lymphomes T murins a montré une diminution de l'accumulation de dexaméthasone dans ces cellules [51]. De même, l'expression de la 11β hydroxystéroïde déshydrogénase 2, une enzyme qui catalyse la conversion du cortisol, le composé actif, en cortisone, un composé inactif, pourrait aussi être une cause [32].

Plusieurs mutations dans le gène du GR pouvant avoir un impact sur la sensibilité aux GCs ont été rapportées [52, 53]. Celles-ci pourraient causer des défauts du récepteur menant à des interactions ligand-récepteurs déficients et ainsi à une résistance à l'apoptose dans des lignées cellulaires leucémiques [54]. De même,

une résistance pourrait être due à une expression insuffisante du GR [55, 56]. Une augmentation de l'isoforme bêta du récepteur, qui atténue les effets géniques de la transcription de gènes médiés par le GRalpha dans les cellules lymphoïdes, a été corrélée *in vitro* avec le développement de la résistance aux GCs [57]. Une surexpression des protéines de choc thermique, avec lesquelles sont complexés les GRs lorsque ceux-ci sont inactifs, a été associée à la résistance à l'apoptose dans la leucémie aiguë [58].

Le problème peut survenir au niveau des cibles des GCs, ceux-ci pouvant être non répondeur ou leur expression étant altérée [59]. Un changement de l'expression des membres de la famille Bcl-2 semble être lié à la résistance aux GCs [60, 61]. Des molécules pouvant interférer avec les voies de signalisation modulées par les GCs, tel que l'IL-2, sont aussi de bons candidats à la résistance [62]. En effet, des études *in vitro* ont démontré que le traitement à l'IL-2 de lymphocytes T induisait une résistance aux glucocorticoïdes [63, 64]. L'IL-2 a le potentiel d'activer des molécules de signalisation qui peuvent inhiber le récepteur glucocorticoïde (GR) tel que STAT5. Des études ont démontré la formation de complexes cellulaires entre STAT5 et le GR, cette hétérodimérisation inhibant le transport nucléaire du récepteur, d'où une explication à l'insensibilité observée [65].

A.2.4 Apoptose induite par les GCs

Les GCs médient leurs effets via le récepteur glucocorticoïde (GR). Le GR est exprimé de façon ubiquitaire et est un facteur de transcription ligand-dépendant [34]. Il est lié à des chaperons moléculaires et à des protéines de choc thermique dans le cytoplasme [66]. Suite à la liaison d'un ligand, le GR se dissocie du complexe

protéique. Ainsi, ses signaux de localisation nucléaire sont exposés, ce qui permet sa translocation au niveau du noyau où il va y avoir homodimérisation du récepteur et liaison [50]. Une interaction directe à des séquences conservées d'ADN appelées éléments de réponses aux GCs (GREs) va permettre la transactivation de gènes cibles, de même qu'une répression de leur activation via des éléments des GREs négatifs aux GCs [67]. Le récepteur peut aussi moduler la transcription de gènes par des interactions directes ADN-indépendantes avec d'autres facteurs de transcription tels que la protéine activatrice-1 (AP-1) [68] et le facteur nucléaire kB (NFkB) [69] (voir figure 4, p.14).

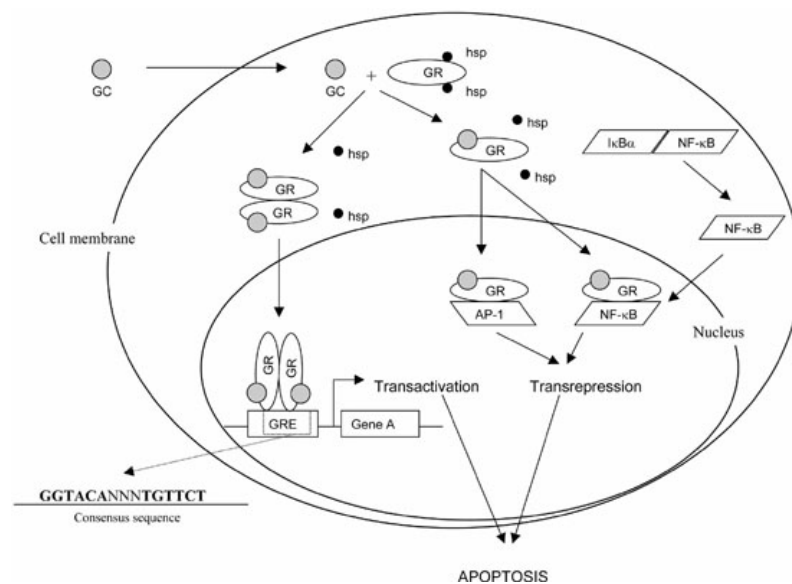


Figure 4. Modèle d'induction de l'apoptose médiée par les GCs [70]

L'augmentation du nombre de cellules apoptotiques suite à l'administration de GCs survient dans les premières heures de traitement [71]. L'induction de la mort cellulaire se fait via plusieurs voies.

Les GCs pourraient activer directement la machinerie apoptotique en régulant les composantes de la voie extrinsèque de l'apoptose et plus certainement la voie intrinsèque. Entre autre, ils agiraient sur la balance apoptotique de la famille Bcl-2 (B

cell lymphoma-2) qui est critique dans la régulation mitochondriale. Les GCs viendrait induire l'expression de protéines pro-apoptotiques et/ou diminueraient l'expression de protéines pro-survie [50, 70]. Ultimement, il va y a voir activation des caspases effectrices. Ces dernières viennent cliver des substrats critiques et causent les changements typiques de la cellule en apoptose [34].

Les GCs induisent l'apoptose en interférant avec les voies critiques de survie de la cellule. NFkB est impliqué dans la survie cellulaire en agissant sur de nombreux gènes, tels que TRAF1 (TNFR-associated factor 1), TRAF2, c-IAP1 (inhibitor of apoptosis protein 1) et c-IAP2 [72]. Son expression génique est réprimée par les GCs via des interactions directes ainsi que par l'augmentation de la synthèse d'IkB α , un inhibiteur de NFkB qui séquestre ce dernier dans le cytoplasme [73]. Les GCs interfèrent dans la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt en diminuant l'activité d'Akt. Cette voie a un effet prolifératif et la protéine PI3K est connue pour jouer un rôle important dans plusieurs circuits de signalisation cellulaire dont la progression du cycle cellulaire, la survie et l'angiogénèse [74]. AP-1, une protéine qui médie la transcription de nombreux gènes de survie, est diminuée par les GCs, de même l'expression de c-myc et de la cycline qui sont des régulateurs du cycle cellulaire [34]. Les GCs ont d'ailleurs été démontrés comme menant à l'arrêt du cycle cellulaire en G1 dans les lignées cellulaires lymphoïdes humaines [75], cet arrêt servant de signal apoptotique [34]. L'induction d'une détresse cellulaire suite à la dérégulation de gènes affectant entre autres la voie métabolique, la production de radicaux de l'oxygène et le calcium seraient aussi impliquée dans l'apoptose [70]. Le traitement aux GCs a d'ailleurs été associé à un déclin de la concentration de Ca²⁺ dans la lumière du réticulum endoplasmique, augmentant la concentration totale calcique, la susceptibilité à l'apoptose et pouvant servir de signal d'initiation à

l'apoptose [50]. Une augmentation de l'expression de canaux sodiques IP3 (inositol triphosphate receptor) induite par les GCs seraient en cause [76]. L'expression du facteur de croissance pléiotropique IL-6 serait aussi régulée de façon négative par les GCs [77]. Plusieurs autres protéines semblent impliquées dans l'apoptose induite par les GCs telles que RAFTK et STAT3 [34].

Ainsi, de nombreuses molécules semblent impliquées dans l'apoptose médiée par les glucocorticoïdes. D'ailleurs, *Ploner et al.* rapporte plus d'une trentaine de gènes régulés par les GCs dans la médiation de l'apoptose chez l'humain et/ou la souris ayant et ayant fait l'objet d'au moins 3 publications et/ou impliqués dans au moins 3 systèmes [49].

A.3 GÈNES CANDIDATS

A.3.1 FAMILLE BCL-2

La famille Bcl-2 joue un rôle majeur dans l'induction de l'apoptose. Ces protéines sont composés de 4 motifs structuraux conservés appelés domaines homologues Bcl-2, soit BH1 à BH4 (voir figure 5, p.18). Elles comprennent des protéines anti-apoptotiques, telles que Bcl-2 et Mcl-1, et des protéines pro-apoptotiques multidomaines, telles que Bax et Bak, qui partagent au moins 3 des 4 domaines homologues ainsi que des membres pro-apoptotiques BH3, telles que Bim et Bad, qui ne contiennent que ce dernier domaine. Les interactions protéines-protéines régulent la balance pro-apoptotique/anti-apoptotique de la cellule [78]. Ainsi, une surexpression de Bax a été démontrée comme pouvant contrer l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 [79].

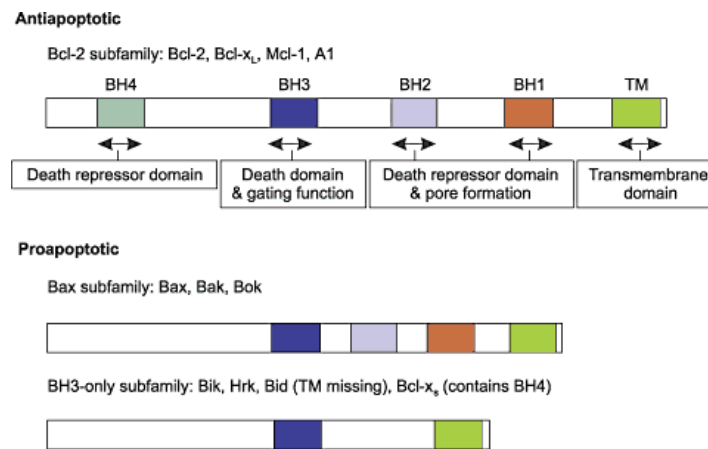


Figure 5. Membres de la famille Bcl-2 [80]

A.3.2 BAX

A.3.2.1 Généralités

Le gène Bax humain se situe dans la région q13.3-q13.4 du chromosome 19 et est composé de 6 exons. L'exon 4 code pour le domaine BH1 et l'exon 5 le domaine BH2 de la protéine. Ce gène code pour la protéine Bax α de 21kDa. Via l'épissage alternatif des exons, trois autres variants mineurs de Bax α ont été documentés. Bax β est formé par les exons 1 à 5 et contient les introns 5 et 6, Bax τ ne contient pas l'exon 2 et Bax δ ne contient pas l'exon 3. Bax β et Bax δ ne présentent pas non plus de domaines d'ancrage membranaire [79]. La protéine Bax est cruciale pour l'induction de la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie par la formation de pores. La relâche de molécules apoptogéniques, tels que le cytochrome c et DIABLO, qui interagissent dans le cytosol afin d'activer les caspases induisant la mort va ensuite suivre [81]. Les régions BH1, BH2 et BH3 de la protéine se replient de façon à former une poche hydrophobique qui séquestre la

queue C-terminale de la protéine. C'est dans cette même poche que la séquence BH3 des protéines se lie.

Bax est une protéine constitutivement exprimée et est régulée entre autre post-traductionnellement par d'autres membres de la famille Bcl-2 [81]. Bax est surtout retrouvé dans le cytosol et une petite fraction est liée faiblement à la membrane externe de la mitochondrie [82]. Suite à l'induction de l'apoptose, il y a changement conformationnel de Bax qui ainsi a aux moins 3 hélices, incluant sa queue C-terminale maintenant relâchée, qui s'insèrent dans la membrane de la mitochondrie avec exposition de son N-terminal [81]. Les protéines Bax et Bak semblent se lier à la mitochondrie en formant des régions focales, formant probablement ainsi des homodimères et hétérodimères qui enclenchent la relâche de protéines apoptogéniques et la fragmentation de la mitochondrie [79, 83]. Bax est une cible transcriptionnelle et un médiateur de l'apoptose induite par c-Myc [84, 85] et p53 [34, 86]. L'oncoprotéine c-Myc est un facteur de transcription impliqué dans la transformation cellulaire de même que dans la mort cellulaire par apoptose. La surexpression de c-Myc régule vers le haut l'ARNm et l'expression protéique de Bax dans les cellules humaines. c-Myc se lie à des éléments E-box localisés dans la région promotrice de Bax [84]. P53 est un suppresseur de tumeur qui est inactivé fréquemment dans les cancers humains et qui est connu pour réguler plusieurs protéines apoptotiques impliquées dans la mort cellulaire induite par les GCs tels que Bcl-2 et Bax [34].

A.3.2.2 Implications pathologiques

Plusieurs études ont rapporté le ratio Bcl-2/Bax comme étant un marqueur pronostique potentiel [87-90]. Ainsi, une prédominance de Bax plutôt que de Bcl-2 accélère l'apoptose en réponse à certains stimuli [91].

Un ratio élevé a été associé avec l'incapacité à atteindre une rémission complète dans la leucémie myéloïde aiguë [89]. De même, il a été corrélé avec la réponse au traitement [88], avec une résistance *in vitro* à l'apoptose médiée par les GCs [92] ainsi qu'avec la progression de la maladie [93] dans la leucémie lymphoïde chronique. Le ratio a été corrélé inversement avec le compte total de leucocytes chez les patients LLA et principalement dans les cellules leucémiques de lignées B comparativement aux cellules de lignées T [90]. La comparaison des ratios des patients LLA avec ceux des lignées cellulaires leucémiques a révélé une correspondance entre l'échelle de ratios dans les échantillons LLA et les différentes sensibilités à la dexaméthasone retrouvées dans les lignées cellulaires [87]. Les cellules chimiosensibles ont montré une induction rapide de Bax [94]. Une expression diminuée de l'ARNm et de la protéine Bax a été observée dans le cancer métastatique du sein [95-97] et associée avec une survie globale diminuée et à une mauvaise réponse à la chimiothérapie [97]. Une perte de l'expression de Bax a été associée avec un stade avancé et avec une tumeur de haut grade dans l'adénocarcinome rectal. Son expression a été corrélée avec une issue défavorable [98] et le ratio élevé Bcl-2/Bax avec une mauvaise réponse thérapeutique à la radiothérapie [99]. Son expression a été corrélée avec la prédiction de la survie globale et avec une survie sans événement dans le lymphome à cellules B larges diffuses [100].

Des mutations de Bax ont été trouvées dans environ 21% de lignées hématopoïétiques humaines malignes. Les mutations BAXG108V située dans le domaine BH1 et BAXG67R située dans le domaine BH3 mènent à la perte de l'activité pro-apoptotique en modifiant l'homodimérisation et l'hétérodimérisation [101]. Deux lignées cellulaires dérivées de lymphomes et de leucémies ont été identifiées comme ayant un manque de la protéine Bax à cause d'insertions ou de délétions d'un résidu dans la séquence de 8 résidus déoxyguanosines dans la séquence codant les nucléotides 114 à 121 de Bax, ceci causant un décalage de la fenêtre de lecture qui résulte en une terminaison prématurée de traduction. Ces cellules se sont avérées être moins sensibles à l'apoptose [102]. Les souris Bax^{-/-} sont viables, cependant, elles présentent une surcroissance de neurones et une légère hyperplasie lymphoïde [81].

A.3.3 BIM

A.3.3.1 Généralités

Le gène Bim se situe dans la région q12-13 du chromosome 2 et contient 6 exons [103]. Bim est une protéine à domaine BH3 seulement qui contient aussi une région transmembranaire. Trois variants majeurs de Bim ont été décrit soit Bim_S, Bim_L et Bim_{EL}, chacun codant pour leur protéine respective [104] (voir figure 6, p.22). La protéine Bim_S est la plus effective comme pro-apoptotique [104, 105] et est formée des exons 2, 5 et 6. Bim_L est formée des exons 2,4,5,6. Enfin, Bim_{EL}, qui est l'isoforme la plus abondante, est formée des exons 2,3,4,5,6, et serait la moins effective [105]. Bim_S est constitutivement pro-apoptotique alors que Bim_L et Bim_{EL} peuvent être exprimés dans une forme inactive et doivent ainsi être activés par leur

relâchement au complexe moteur de dynéine suite à un stimulus. Les trois variants majeurs de Bim ont été démontré comme contribuant à l'induction de l'apoptose [106].

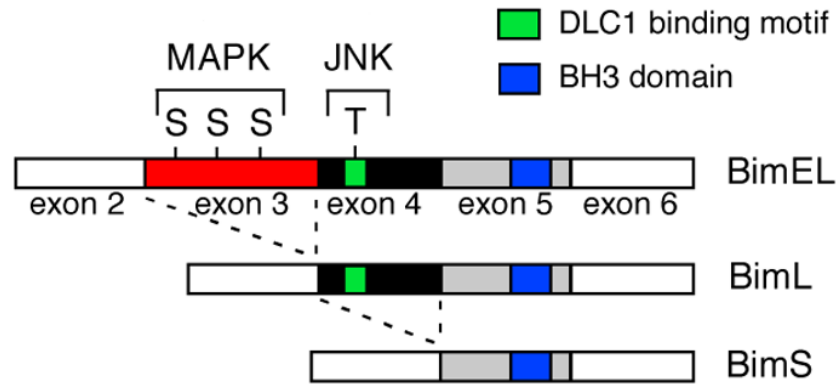


Figure 6. Représentation des 3 isoformes majeurs de Bim avec leurs sites de phosphorylation pour MAPK et JNK [107]

La protéine Bim est activée par son relâchement du complexe moteur dynéine ou par la perte du signal ERK (extracellular regulated kinase) médiée par phosphorylation. Bim peut se lier à tous les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Suite à son relâchement, elle vient interagir avec les protéines de la famille Bcl-2 afin de promouvoir l'apoptose en inhibant premièrement les protéines anti-apoptotiques et ainsi libérant les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak [81]. Il a été démontré que Bim peut être régulé post-traductionnellement par phosphorylation, les kinases impliquées étant ERK, JNK, p38 et Akt [108]. La protéine Bim est rapidement dégradée par ubiquitination médiée par l'activation de la voie ERK/MAPK [107].

A.3.2.2 Implications pathologiques

Il a été démontré que les GCs induisent l'apoptose des cellules leucémiques via une augmentation de l'ARNm et de la protéine de Bim [109].

Bim est fréquemment mis silencieux dans différents sous-types de lymphomes non-hodgkiniens à cellules B par des mécanismes qui incluent une délétion homozygote du gène dans le lymphome du manteau [59, 110] et la méthylation du promoteur dans le lymphome de Burkitt et le lymphome à cellules B larges diffus [59]. Une délétion homozygote de Bim a été trouvée chez 17% de patients ayant le lymphome du manteau [110].

Les cellules primaires de la leucémie myéloïde chronique montrent une expression significativement diminuée du taux d'ARNm et de la quantité protéine de Bim comparativement aux cellules normales [111]. La réduction du niveau d'ARNm de Bim par des ARN interférents rend les cellules humaines pré-B LLA partiellement résistante aux GCs et inhibe l'activité caspase-3 induite par ceux-ci [106]. Suite à l'exposition à la dexaméthasone, les cellules LLA montre une expression augmentée de Bim. La résistance aux GCs est associée avec une profonde atténuation de l'induction de la protéine Bim quand les cellules de xénogreffes LLA étaient exposées à la dexaméthasone [112]. Il a été démontré que le niveau d'expression de Bim est un important déterminant pour la sensibilité des cellules T-LLA à l'apoptose induite par des médicaments [108].

Les souris Bim^{-/-} ont une augmentation de 2 à 4 fois du nombre de cellules B et T matures, de macrophages et de granulocytes et 60% d'entre elles ont

développés ultérieurement une glomérulonéphrite auto-immune fatale. Chez les souris hétérozygote, le développement de la maladie a été de 30% [113]. De plus, les thymocytes et les lymphocytes matures ont été montrés comme partiellement réfractaires à l'apoptose induite par les GCs [103, 114]. L'inactivation d'un seul allèle de Bim chez la souris accélère le développement de tumeurs induite par c-Myc, particulièrement la leucémie aiguë à cellules B [103].

B PHARMACOGÉNÉTIQUE

La pharmacogénétique étudie l'impact des variations génétiques interindividuelles sur les différences de réponse aux drogues observées. Elle est basée sur une approche phénotype-génotype, son but étant de prédire la réponse des patients au traitement afin d'en maximiser l'efficacité tout en minimisant les toxicités. Comme la majorité des agents antileucémiques présentent des variabilités interpatients suite à une exposition systémique, une thérapie basée sur le génotype en optimiserait le rendement [11, 20]. Ainsi, des variations dans les gènes impliqués dans les voies d'actions des différents médicaments utilisés dans le traitement de la LLA pourraient permettre d'expliquer la résistance et/ou toxicité et la différence d'efficacité observées chez les patients.

B.1 Méthotrexate

Le méthotrexate (MTX) est un médicament clé dans le traitement de la LLA [115]. Il est un analogue du folate 1000 fois plus puissant que le substrat endogène lui-même [116]. De nombreux gènes candidats de la voie du MTX ont été étudiés à ce jour et pourraient être impliqués dans les différentes réponses interindividuelles observées chez les patients LLA, dont la dihydrofolate réductase (DHFR) et la thymidylate synthase (TS). Les principales voies d'action du MTX sont présentées en figure 7 p. 26.

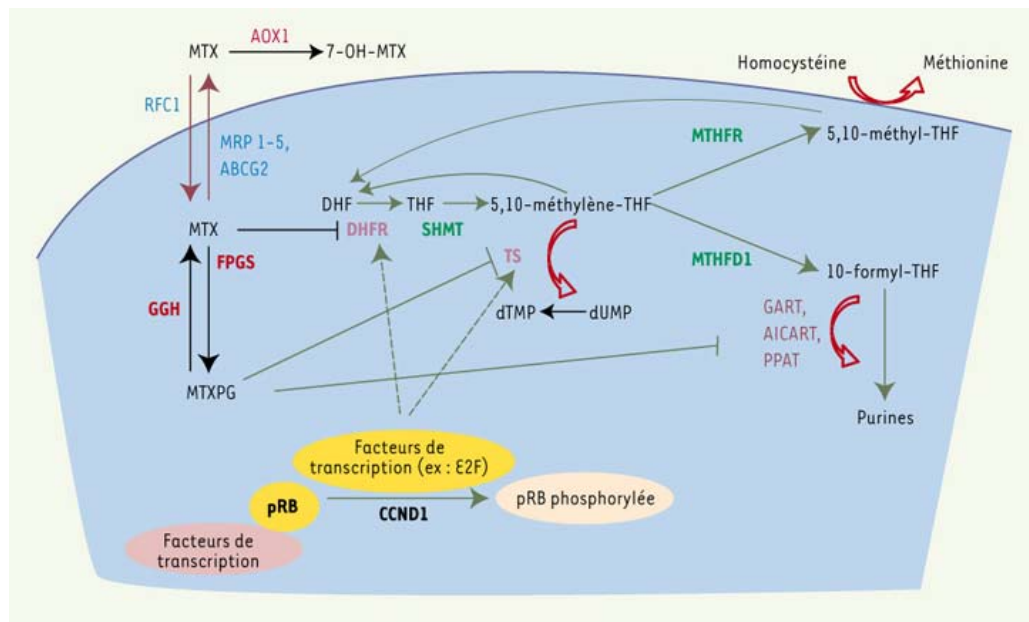


Figure 7. Voies d'action du MTX [11]

RFC1 : transporteur des folates réduits ; MRP 1-5 : famille des protéines associées aux résistances thérapeutiques multiples ; ABCG2 : membre de la famille des transporteurs ABC également connu comme la protéine de résistance au cancer du sein (*breast cancer resistance protein*, BCRP) ; MTXPG : MTX polyglutamates ; FPGS : folylpolyglutamate synthase ; GGH : g-glutamyl hydrolase ; AOX1 : aldéhyde oxydase ; DHF : dihydrofolate ; THF : tétrahydrofolate ; DHFR : dihydrofolate réductase ; TS : thymidylate synthase ; dUMP : désoxyuridine monophosphate ; dTMP : désoxythymidine monophosphate ; GART : glycénamide ribonucléotide transformylase ; AICART : aminoimidazole carboxamide ribonucléotide transformylase ; PPAT : amido phosphoribosyltransférase ; MTHFR : méthylène-tétrahydrofolate réductase ; MTHFD1 : méthylène-tétrahydrofolate déhydrogénase ; SHMT : sérine hydroxyméthyltransférase ; pRB : protéine du rétinoblastome ; CCND1 : cycline D1 ; E2F : facteur de transcription

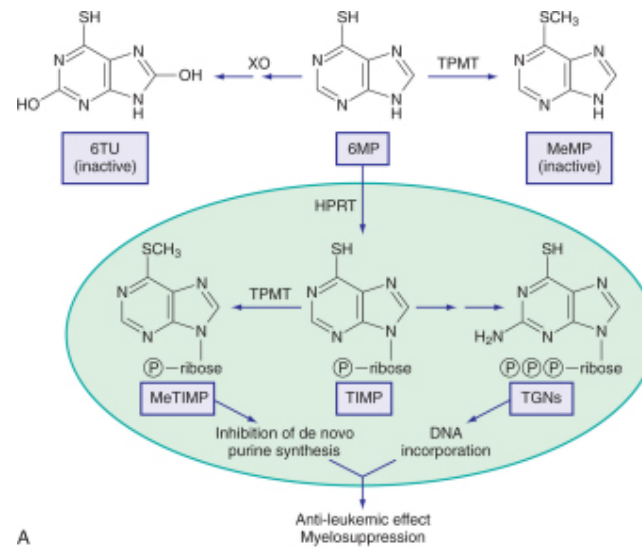
Le MTX mène indirectement à un manque des coenzymes du folate en inhibant l'enzyme DHFR ce qui bloque la synthèse de tétrahydrofolate (THF) à partir du dihydrofolate (DHF) [11]. Les patients ayant rechutés et les cellules résistantes au MTX ont montré des niveaux augmentés de DHFR et/ou une diminution de la formation des complexes DHFR/MTX [117, 118]. Des polymorphismes localisés au niveau du promoteur ont été associés avec une augmentation de l'expression de DHFR et avec une issue défavorable chez les patients LLA [118].

Via sa forme polyglutamate, le MTX inhibe directement l'enzyme TS, cette dernière participant à la synthèse des purines et des pyrimidines en catalysant la conversion du dUMP en dTMP [11]. Une séquence répétée en tandem, soit double

(2R) ou triple (3R), de 28 paires de bases (pb) a été identifiée dans la région promotrice du gène. L'allèle 3R est associé avec une expression plus grande de TS que l'allèle 2R [119]. L'homozygotie pour l'allèle 3R chez les enfants atteints de LLA a été corrélée avec un taux de survie sans évènement plus faible que ceux ayant au moins une allèle 2R [120]. De même, une augmentation du risque d'ostéonécrose a été associée avec les patients homozygotes 2R/2R, ce génotype conférant une sensibilité accrue au MTX [11].

B.2 6-Mercaptopurine

Un exemple concret de l'application de la pharmacogénétique à la clinique chez les patients LLA est celui de la 6-mercaptopurine (6-MP). Cette dernière est un médicament qui constitue, avec d'autres, la base de toute thérapie de la LLA [115]. En bref, la 6-MP est métabolisée en composés actifs en plusieurs étapes, menant ultimement à la formation des nucléotides thioguanines (TGN) [121] (voir figure 8, p.28). Ces derniers s'incorporent dans l'ADN, donnant ainsi des effets cytotoxiques. L'enzyme thiopurine méthyltransférase (TPMT) inactive plusieurs composés actifs de la 6-MP. Une réduction de son activité a été observée chez un nombre de patients, l'augmentation associée de métabolites actifs causant des effets secondaires importants telle qu'une myélosuppression sévère [122]. Ainsi, chez ces patients, les doses administrées de 6-MP doivent être réduite [123]. 95% de cette diminution d'activité de la TPMT est due à 3 allèles du gène, soit les allèles 2, 3A et 3C, les polymorphismes fonctionnels associés étant respectivement G238C, G460A/A719G et A719G [11]. La *Food and Drug Administration* a approuvé l'utilisation de tests diagnostiques de génotypage pour la TPMT afin de prédire, et ainsi réduire, les risques sévères de toxicité associée au médicament [124].



A

Figure 8. Métabolisme de la 6-Mercaptopurine [125]

Légende : 6TU, 6-thiouric acid; MeMP, 6-methylmercaptopurine; HPRT, 6-thiométhylinosine 5-monophosphate; MeTIMP, hypoxanthine phosphoribosyl transferase; 6MP, 6-mercaptopurine

C HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Bien que la survie des patients LLA se soit grandement améliorée depuis les 4 dernières décennies, la résistance au traitement chez un nombre significatif d'enfants est encore un obstacle majeur au succès du traitement. Les GCs constituent une composante majeure du traitement de la LLA. Cependant, des réponses thérapeutiques variables à ceux-ci sont observées parmi les patients. Le but de cette étude est d'analyser la variabilité génétique modulant la réponse aux GCs.

Plusieurs protéines ont montré un rôle important dans l'apoptose cellulaire induite par les GCs. Plus particulièrement, les protéines Bax et Bim ont déjà montré un rôle majeur dans l'induction de l'apoptose des cellules leucémiques. Des expressions diminuées des protéines ont été associées avec la résistance aux GCs. De plus, la perte *in vitro* de la sensibilité à ces médicaments est commune et fortement corrélée avec la probabilité diminuée de survie chez les patients LLA. La différence dans leur expression pourrait être due à des polymorphismes présents dans ces gènes. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que ces polymorphismes sont associés avec la résistance et/ou toxicité aux GCs chez les patients LLA.

Toutefois, aucune donnée n'est encore disponible à cet égard. Les buts spécifiques de ce projet sont donc de génotyper les polymorphismes potentiellement fonctionnels présents dans les gènes Bax et Bim chez les patients atteints de LLA diagnostiqués à l'Hôpital Sainte-Justine pour ensuite évaluer l'impact des génotypes sur les paramètres cliniques traditionnellement utilisés pour estimer la résistance et/ou toxicité au traitement chez les patients LLA. Les résultats, combinés avec d'autres déjà obtenus par le laboratoire de Dr Krajinovic, aideront à établir un traitement personnalisé pour les patients atteints de LLA.

D MATÉRIEL ET MÉTHODES

D.1 Matériel biologique (ADN)

Le comité d'éthique de l'Hôpital Sainte-Justine a approuvé le protocole de recherche de l'étude et les formulaires de consentement signés par les volontaires participants, leurs parents ou leurs tuteurs légaux ont été obtenus. L'ADN des patients a été extrait à partir de différents spécimens biologiques, soit à partir de prélèvements sanguins, de biopsies de moelle osseuse ou de frottis buccaux, en utilisant le kit d'extraction PUREGENE DNA (Gentra Systems, Minneapolis, USA).

D.2 Polymorphismes

Huit polymorphismes du gène Bax situés en région régulatrice, 1 polymorphisme situé dans l'exon 3 et 1 polymorphisme situé en 3'UTR ont été sélectionnés (voir figure 9, p.36).

Dix polymorphismes du gène Bim situés en région régulatrice, 1 polymorphisme situé dans l'exon 3 et 6 polymorphismes situés en région 3'UTR ont été sélectionnés (voir figure 13, p.45).

Les polymorphismes ont été sélectionnés à partir de la base de données de SNPs du NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov). Les variants et leur numéro de référence sont présentés en Annexes I et III p. xiii et xiv.

D.3 Génotypage

Les fragments d'intérêt contenant un ou des SNPs ont été amplifiés par PCR (polymerase-chain reaction) et ces derniers ont été génotypés par la méthode d'hybridation allèle-spécifique (ASO : allele specific oligonucleotide).

L'hybridation par ASO est une méthode simple et efficace [126]. En bref, elle consiste à transférer le fragment d'ADN d'intérêt amplifié sur une membrane de nylon, à le fixer par UV, pour ensuite l'hybrider en présence de sondes radiomarquées au γP^{32} et de sondes non marquées constituant le compétiteur selon un ratio permettant une bonne visibilité. Les réactifs et conditions de PCR et d'ASO sont présentés en Annexes I à IV aux pages xiii à xv.

L'ADN de 46 témoins a été amplifié et génotypé afin de déterminer les fréquences alléliques de chaque SNPs. Les SNPs ayant une fréquence de l'allèle mineure $\geq 5\%$ ont été retenus pour notre étude. Le génotypage chez les témoins a aussi permis de déterminer un nombre minimal de polymorphismes qui sont suffisants pour définir les haplotypes (tagSNPs). Les haplotypes et les paires d'haplotypes ont été déterminées par le logiciel Phase version 2.1 (Seattle, WA) [127].

Les tagSNPs ont été amplifiés et génotypés dans l'ADN de 286 patients.

Le choix des tagSNPs a été basé sur le coefficient de déséquilibre de liaison R^2 et a été réalisé par le programme Haploview [128].

D.4 Patients et protocoles

Entre janvier 1989 et décembre 2003, plus de 400 enfants ont été diagnostiqués avec une LLA à l'Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Canada. De ce nombre, une portion de patients correspond aux critères de sélection de notre étude.

Tous les patients de notre cohorte ont suivi les protocoles 87-01, 91-01, 95-01 et 2000-01 du Consortium LLA du DFCI (voir tableau III p 33). Ils sont âgés entre 0 et 18 ans et ont été diagnostiqués LLA à précurseurs B ou à précurseurs T, les patients ayant le phénotype à cellules B matures ou présentant le chromosome de Philadelphie étant exclus des protocoles du DFCI [27]. Ils sont caucasiens de descendance européenne. Leur consentement éclairé devait avoir été donné et leurs informations cliniques devaient être disponibles. Ils devaient avoir été suivis assez longtemps pour que nous puissions avoir une évolution de leur maladie.

D.5 Analyses statistiques

L'analyse des individus porteurs des différents génotypes et haplotypes a été estimée pour l'issue de la LLA chez les patients par l'analyse de survie.

L'analyse de survie comprend les notions d'évènement, de rechute et de décès, un évènement étant défini comme étant une rechute, un échec d'induction de rémission ou un décès. Les associations de survie ont été évaluées par la méthode de Kaplan-Meier et la significativité a été estimée par le test du Log-Rank. Le temps jusqu'à un évènement est mesuré comme étant le temps entre le diagnostic et la fin de l'évènement, soit 5 ans après la fin du traitement (84 mois après le diagnostic) ou

Tableau III. Protocoles de traitement du DFCI-LLA (adapté de [27])

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

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

la dernière période d'observation. Le risque est estimé par le *hazard ratio* (HR) et son intervalle de confiance à 95% (IC à 95%) par la méthode d'analyse de régression de Cox par l'inclusion ou non des facteurs communs de pronostic caractérisés selon les risques de rechute, soit : garçon ou fille; moins d'un an, 1 à 9,99 ans et plus de 10 ans; WBC plus petit ou plus grand que 50 X10⁹/L ou type à cellule T; index ADN plus grand ou plus petit que 1,16; groupe à risque standard ou à haut risque selon les critères cliniques. De même, le protocole a été inclus dans les analyses multivariées.

Les différents glucocorticoïdes ont démontré des intensités différentes d'effets antileucémiques [40, 129]. Comme l'administration des glucocorticoïdes lors de la phase d'intensification diffèrent selon les protocoles de traitement de notre

cohorte d'étude, nous avons stratifié les analyses de survie significatives selon le type. Les protocoles DFCI 87-01 et 95-01 usent de la prednisone alors que le protocole 91-01 fait plutôt l'emploi de la dexaméthasone et que le protocole 2000-01 fait usage de prednisone ou de dexaméthasone selon une randomisation.

De fortes doses prolongées de corticostéroïdes peuvent induire une toxicité qui peut être observée par plusieurs signes cliniques. Nous avons analysé :

- le diabète cortico-induit insulino-réquant au cours de l'induction de la rémission;
- l'obésité : index de surface corporel plus grand que le 95^{ième} percentile selon l'âge des courbes de références du National Center for Health Statistics (NCHS) après 1 an de corticothérapie prolongée;
- les infections au cours de l'induction de la rémission : classement en grades selon les critères de toxicité CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events 3.0) du National Institute of Health (NIH);
- les complications osseuses tout au long de la thérapie : ostéonécrose et fractures;
- les troubles de comportement nécessitant une modification du traitement.

De même, la toxicité peut mener à des changements de dosage. Tous ces facteurs ont été évalués par analyse d'association avec les génotypes et les haplotypes, la significativité (valeur p) étant donnée par le test exact de Fisher et l'évaluation du risque par l'*odd ratio* (OR) avec son intervalle de confiance (IC) à 95%. Pour la toxicité infectieuse, nous avons pris en considération la totalité des infections de grades 3 et 4, ces dernières étant les plus à risques et nécessitant une révision de dosage.

Les valeurs de significativité des différents tests ont par la suite été ajustées pour les tests multiples en tenant compte des 8 polymorphismes analysés afin d'avoir un seuil de significativité plus restrictif.

Toutes les analyses de l'impact des génotypes et haplotypes ont été exécutées par le logiciel SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) version 17.0. La prédiction de pertes et de gains de sites de facteurs de transcription pour chaque haplotype de Bax et de Bim a été obtenue par le programme Match de *Biobase biological databases* (<http://www.biobase-international.com/pages/index.php?id=291>).

E RÉSULTATS

E.1 Gène Bax

E.1.1 Détermination des TagSNPs

Les fréquences alléliques des 10 polymorphismes ont été déterminées chez 46 témoins (figure 9, p.36). Trois polymorphismes situés dans la région régulatrice se sont avérés non polymorphiques et deux autres polymorphismes, l'un situé dans l'exon 3 et l'autre en 3'UTR, ont une fréquence allélique trop basse, soit plus petite que 5%. Cinq polymorphismes ont donc été évalués afin de déterminer les tagSNPs à partir de la fonction Tagger du logiciel Haploview.



Figure 9. Position et fréquences alléliques des variants du gène Bax génotypés. Le symbole – signifie que le SNP est non polymorphique dans notre population témoin.

Le déséquilibre de liaison entre ces 5 polymorphismes situés dans la région régulatrice du gène Bax a été exprimé par la valeur du r^2 (figure 10, p.37). Les variants -1962T>G, -1836A>T et -1076G>A ont ainsi été sélectionnés afin d'être génotypés chez la cohorte de patients LLA.

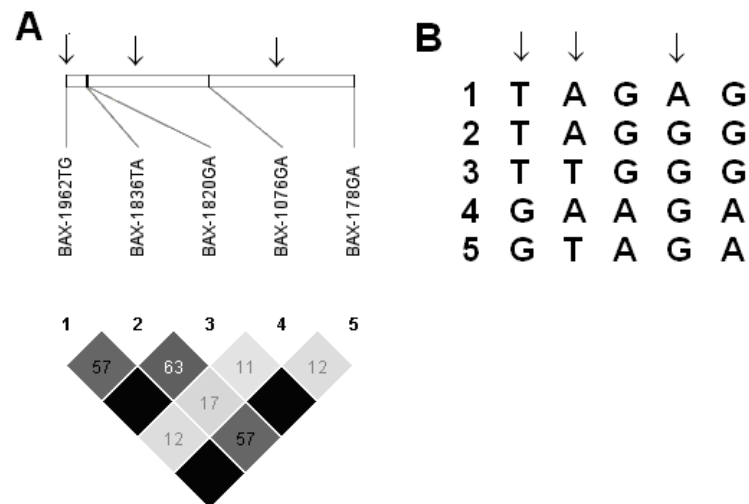


Figure 10. Déséquilibre de liaison entre les polymorphismes du gène Bax (A) et présentation des haplotypes définis à partir de ceux-ci (B). La valeur du r^2 est inscrite dans les cases, une case noire correspondant à un $r^2 = 1$. Les flèches indiquent les SNPs sélectionnés comme tagSNPs.

E.1.2 Issue de la LLA : analyse de survie selon les génotypes de Bax

Aucune différence significative n'a été trouvée dans la survenue d'évènement pour les 3 variants de Bax (tableau IV, p.37).

Tableau IV. Fréquence des génotypes du gène Bax chez des enfants ayant la LLA avec et sans évènement

Génotypes de BAX	Évènement (%)	Pas d'évènement (%)	Total (%)	p^a
-1962T>G				
TT	44 (77,2)	167 (71,1)	211 (72,3)	0,40
GT	11 (19,3)	63 (26,8)	74 (25,3)	-
GG	2 (3,5)	5 (2,1)	7 (2,4)	-
Total	57 (100,0)	235 (100,0)	292 (100,0)	-
-1836A>T				
TT	2 (3,6)	2 (0,9)	4 (1,4)	0,16
AT	12 (21,4)	60 (25,5)	72 (24,7)	-
AA	42 (75,0)	173 (73,6)	215 (73,9)	-
Total	56 (100,0)	235 (100,0)	291 (100,0)	-
-1076G>A				
GG	20 (37,0)	102 (44,0)	122 (42,7)	0,51
AG	14 (25,9)	59 (25,4)	73 (25,5)	-
AA	20 (37,0)	71 (30,6)	91 (31,8)	-
Total	54 (100,0)	232 (100,0)	286 (100,0)	-

p^a La valeur est estimée par le test du Log-Rank du Kaplan-Meier

Il n'existe aucune différence significative dans la survenue de rechute pour les 3 variants de Bax (tableau V, p.38).

Tableau V. Fréquence des génotypes du gène Bax chez des enfants ayant la LLA avec et sans rechute

<i>Génotypes de BAX</i>	<i>Rechute (%)</i>	<i>Pas de rechute (%)</i>	<i>Total (%)</i>	<i>p^a</i>
-1962T>G				
GG	2 (3,7)	5 (2,1)	7 (2,4)	0,34
GT	10 (18,5)	64 (26,9)	74 (25,3)	-
TT	42 (77,8)	169 (71,0)	211 (72,3)	-
Total	54 (100,0)	238 (100,0)	292 (100,0)	-
-1836A>T				
TT	2 (3,8)	2 (0,8)	4 (1,4)	0,12
AT	11 (20,8)	61 (25,6)	72 (24,7)	-
AA	40 (75,5)	175 (73,5)	215 (73,9)	-
Total	53 (100,0)	238 (100,0)	291 (100,0)	-
-1076G>A				
GG	20 (39,2)	102 (43,4)	122 (42,7)	0,57
AG	12 (23,5)	61 (26,0)	73 (25,5)	-
AA	19 (37,3)	72 (30,6)	91 (31,8)	-
Total	51 (100,0)	235 (100,0)	286 (100,0)	-

p^a La valeur est estimée par le test du Log-Rank du Kaplan-Meier

Aucune différence significative n'a été trouvée pour les 3 variants de Bax dans la survenue de décès (tableau VI, p.38).

Tableau VI. Fréquence des génotypes du gène Bax chez des enfants ayant la LLA avec et sans décès

<i>Génotypes de BAX</i>	<i>Décès (%)</i>	<i>Pas de décès (%)</i>	<i>Total (%)</i>	<i>p^a</i>
-1962T>G				
TT	21 (80,8)	190 (71,4)	211 (72,3)	0,46
GT	4 (15,4)	70 (26,3)	74 (25,3)	-
GG	1 (3,8)	6 (2,3)	7 (2,4)	-
Total	26 (100,0)	266 (100,0)	292 (100,0)	-
-1836A>T				
TT	1 (3,8)	3 (1,1)	4 (1,4)	0,48
AT	5 (19,2)	67 (25,3)	72 (24,7)	-
AA	20 (76,9)	195 (73,6)	215 (73,9)	-
Total	26 (100,0)	265 (100,0)	291 (100,0)	-
-1076G>A				
GG	8 (34,8)	114 (43,3)	122 (42,7)	0,63
AG	6 (26,1)	67 (25,5)	73 (25,5)	-
AA	9 (39,1)	82 (31,2)	91 (31,8)	-
Total	23 (100,0)	263 (100,0)	286 (100,0)	-

p^a La valeur est estimée par le test du Log-Rank du Kaplan-Meier

E.1.3 Haplotypes de Bax

E.1.3.1 Répartition des haplotypes

Les polymorphismes du gène Bax ont permis de définir 5 haplotypes, leur fréquence allant de 0,6% à 43,7% (tableau VII, p.39). Les individus ayant l'haplotype rare 3 ont été regénotypés afin de s'assurer que ce dernier existe bel et bien et n'est donc pas dû à des erreurs de génotypage.

Tableau VII. Fréquences des haplotypes de Bax dans la cohorte LLA

	-1962	-1836	-1076	Fréquence (%)
*1	T	A	A	43,7
*2	T	A	G	40,3
*3	T	T	G	0,6
*4	G	A	G	2,3
*5	G	T	G	13,1

E.1.3.2 Impact des haplotypes de Bax

E.1.3.2.1 Issue de la LLA : analyse de survie selon les haplotypes

Une survie sans évènement significativement diminuée est observée pour l'haplotype 3, défini par les allèles T-1962, T-1836 et G-1076 (tableau VIII, p.40).

Tableau VIII. Fréquence des haplotypes du gène Bax chez des enfants ayant la LLA avec et sans évènement

<i>Haplotype</i>	<i>Évènement (%)</i>	<i>Pas d'évènement (%)</i>	<i>Total (%)</i>	<i>p^a</i>
*1				
Présence	32 (61,5)	127 (55,7)	159 (56,8)	0,39
Absence	20 (38,5)	101 (44,3)	121 (43,2)	
*2				
Présence	25 (48,1)	129 (56,6)	154 (55,0)	0,25
Absence	27 (51,9)	99 (43,4)	126 (45,0)	
*3				
Présence	2 (3,8)	2 (0,9)	4 (1,4)	0,03
Absence	50 (96,2)	226 (99,1)	276 (98,6)	
*4				
Présence	0 (0,0)	12 (5,3)	12 (4,3)	0,11
Absence	52 (100,0)	216 (94,7)	268 (95,7)	
*5				
Présence	11 (21,2)	59 (25,9)	70 (25,0)	0,42
Absence	41 (78,8)	169 (74,1)	210 (75,0)	
Total	52 (100,0)	228 (100,0)	280 (100,0)	

p^a La valeur est estimée par le test du Log-Rank du Kaplan-Meier

Une diminution significative de la survie sans rechute est observée pour l'haplotype

3 (tableau IX, p.40).

Tableau IX. Fréquence des haplotypes du gène Bax chez des enfants ayant la LLA avec et sans rechute

<i>Haplotypes</i>	<i>Rechute (%)</i>	<i>Pas de rechute (%)</i>	<i>Total (%)</i>	<i>p^a</i>
*1				
Présence	29 (59,2)	130 (56,3)	159 (56,8)	0,61
Absence	20 (40,8)	101 (43,7)	121 (43,2)	
*2				
Présence	24 (49,0)	130 (56,3)	154 (55,0)	0,32
Absence	25 (51,0)	101 (43,7)	126 (45,0)	
*3				
Présence	2 (4,1)	2 (0,9)	4 (1,4)	0,02
Absence	47 (95,6)	229 (99,1)	276 (98,6)	
*4				
Présence	0 (0,0)	12 (5,2)	12 (4,3)	0,12
Absence	49 (100,0)	219 (94,8)	268 (95,7)	
*5				
Présence	10 (20,4)	60 (26,0)	70 (25,0)	0,36
Absence	39 (76,9)	171 (74,0)	210 (75,0)	
Total	49 (100,0)	231 (100,0)	280 (100,0)	

p^a La valeur est estimée par le test du Log-Rank du Kaplan-Meier

Aucune différence significative n'a été trouvée parmi les haplotypes de Bax pour la survenue de décès (tableau X, p.41).

Tableau X. Fréquence des haplotypes du gène Bax chez des enfants ayant la LLA avec et sans décès

<i>Haplotypes</i>	<i>Décès (%)</i>	<i>Pas de décès (%)</i>	<i>Total (%)</i>	<i>p^a</i>
*1				
Présence	15 (65,2)	144 (56,0)	159 (100,0)	0,36
Absence	8 (34,8)	113 (44,0)	121 (43,2)	
*2				
Présence	11 (47,8)	143 (55,6)	154 (55,0)	0,45
Absence	12 (52,5)	114 (44,4)	126 (45,0)	
*3				
Présence	1 (4,3)	3 (1,2)	4 (1,4)	0,18
Absence	22 (95,7)	254 (98,8)	276 (98,6)	
*4				
Présence	0	12 (4,7)	12 (4,3)	0,30
Absence	23 (100,0)	245 (95,3)	268 (95,7)	
*5				
Présence	5 (21,7)	65 (25,3)	70 (25,0)	0,67
Absence	18 (78,3)	192 (74,7)	210 (75,0)	
Total	23 (100,0)	257 (100,0)	280 (100,0)	

p^a La valeur est estimée par le test du Log-Rank du Kaplan-Meier

L'analyse de survie Kaplan-Meier montre une survie sans évènement (EFS : event free survival) et une survie sans rechute (RFS : relapse free survival) significativement diminuées ($p=0,03$ et $0,02$, respectivement) pour les porteurs de l'haplotype 3, alors que la survie globale (OS : overall survival) est non significative ($p=0,1$) (figure 11, p.42). Le nombre d'individus porteurs ou non de l'haplotype 3 est inscrit sur la courbe respective et de ce chiffre le nombre d'individus ayant l'évènement est inscrit à la suite entre parenthèse. Le *hasard ratio* (HR) est donné dans le bas de chaque courbe dont la différence est significative.

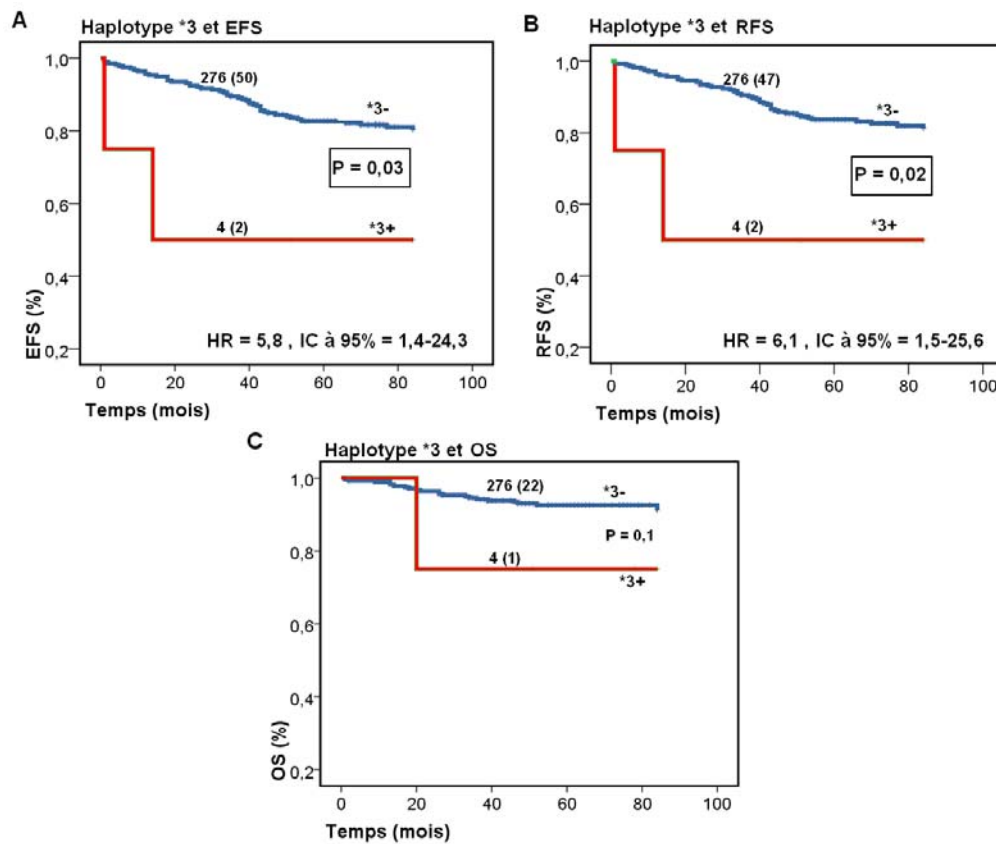


Figure 11. Courbe de survie pour la survenue d'un évènement (A), pour la survenue de rechute (B) et pour la survenue de décès (C) pour l'haplotype 3

La régression de Cox des 7 paramètres pronostiques communs montre que 2 paramètres sont significatifs, soit l'âge et le nombre de lymphocytes (tableau XI, p.43). Donc seuls ces 2 paramètres sont analysés ensuite avec l'haplotype 3 afin d'obtenir une estimation du risque. La survie sans évènement pour l'haplotype 3 de Bax en présence de ces facteurs pronostiques reste significatif après l'analyse multivariée (HR=5,8 , IC à 95% =1,4-24,3) (tableau XII, p.43), de même que la survie sans rechute (HR=6,1 , IC à 95% =1,5-25,6) (tableau XIII, p.43).

Tableau XI. Régression de Cox : tous les paramètres pronostiques communs

	B	E.S.	Wald	ddl	Signif.	Exp(B)	95,0% IC pour Exp(B)	
							Inférieure	Supérieure
Âge	,662	,288	5,284	1	0,02	1,939	1,103	3,410
Phénotype	-,587	,557	1,110	1	,292	,556	,187	1,657
Sexe	,415	,293	1,999	1	,157	1,514	,852	2,689
Nb lymphocytes	,814	,378	4,649	1	0,03	2,258	1,077	4,733
Index	,291	,416	,489	1	,484	1,337	,592	3,019
Risque	-,466	,374	1,549	1	,213	,628	,301	1,307
Protocole	,303	,180	2,833	1	,092	1,354	,951	1,927

Tableau XII. Analyse de l'EFS par régression de Cox

	B	E.S.	Wald	ddl	Signif.	Exp(B)	95,0% IC pour Exp(B)	
							Inférieure	Supérieure
Âge	,628	,244	6,647	1	,010	1,874	1,163	3,021
Nb lymphocytes	,523	,326	2,569	1	,109	1,686	,890	3,195
Haplotype 3	1,757	,731	5,783	1	,016	5,794	1,384	24,259

Tableau XIII. Analyse de la RFS par régression de Cox

	B	E.S.	Wald	ddl	Signif.	Exp(B)	95,0% IC pour Exp(B)	
							Inférieure	Supérieure
Âge	,602	,255	5,575	1	,018	1,826	1,108	3,011
Nb lymphocytes	,399	,348	1,313	1	,252	1,490	,753	2,948
Haplotype 3	1,809	,732	6,108	1	,013	6,107	1,454	25,646

L'analyse de survie de Kaplan-Meier montre cette diminution de survie sans évènement liée à l'haplotype 3 plus prononcée pour ceux ayant été traités à la prednisone ($p=0,003$) versus ceux ayant été traités à la dexaméthasone ($p=0,7$) (figure 12, p.44).

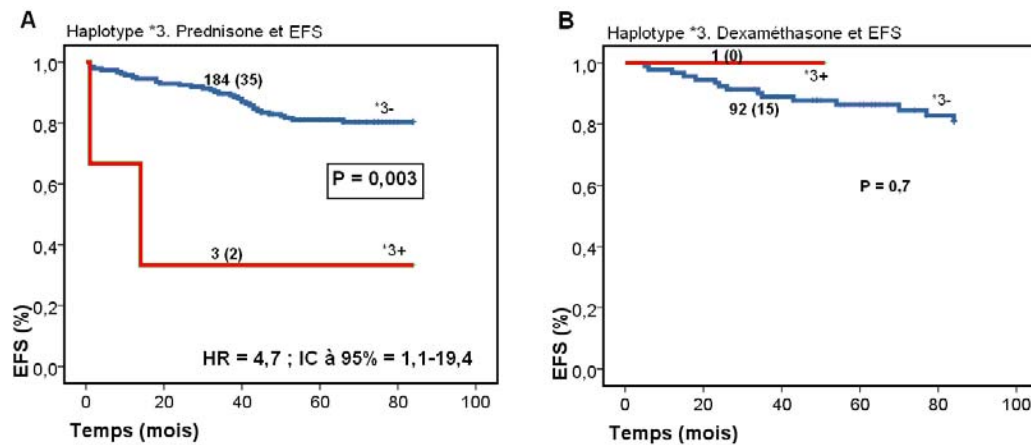


Figure 12. Courbe de survie sans évènement associée à l'haplotype 3 selon le traitement, soit à la prednisone (A) ou à la dexaméthasone (B)

E.1.3.2.2 Perte ou gain de sites de liaison

L'haplotype 2 de Bax est composé uniquement d'allèles majeures et est donc utilisé comme l'haplotype de comparaison. L'analyse par le programme Biobase de l'haplotype 3, qui ne présente comme différence avec l'haplotype 2 que la mutation -1836A>T, prédit la perte de 3 sites de liaison et le gain de 7 sites (tableau XIV, p.44).

Tableau XIV. Perte ou gain de sites de liaison à des facteurs de transcription pour l'haplotype 3

Haplotypes	Polymorphismes					Gain	Perte
	- 1962	- 1836	- 1820	- 1076	-178		
*2	T	A	G	G	G	Aucune	Aucun
*3	T	T	G	G	G	CHOP_Q1, P300_Q1, PAX4_Q3, EFC_Q6, SREBP_Q3, BCL6_Q3, LRH1_Q5	DR3_Q4, PPARA_Q2, ZF5_B

PAX : Paired Box Gene; SREBP : Sterol Regulatory Element Binding Protein; B-Cell Lymphoma; PPARA : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Alpha

E.2 Gène Bim

E.2.1 Détermination des TagSNPs

Les fréquences alléliques des 13 polymorphismes ont été déterminées chez 46 témoins (figure 13, p.45). Trois variants situés en région régulatrice du gène sont non polymorphiques et un variant a une fréquence basse chez nos témoins. Ainsi, 9 polymorphismes ont été évalués afin de déterminer les tagSnps du gène.



Figure 13. Position et fréquences alléliques des variants du gène Bim génotypés. Le symbole – signifie que le SNP est non polymorphique dans notre population témoin.

Le déséquilibre de liaison entre ces 9 polymorphismes situés dans les régions régulatrice, exonique et 3'UTR du gène Bim a été exprimé par la valeur du r^2 (figure 14, p.46). Les variants -1928T>G, -1894T>C, 298C>T, 2251A>T et 2252G>T ont ainsi été sélectionnés afin d'être génotypés chez la cohorte de patients LLA.

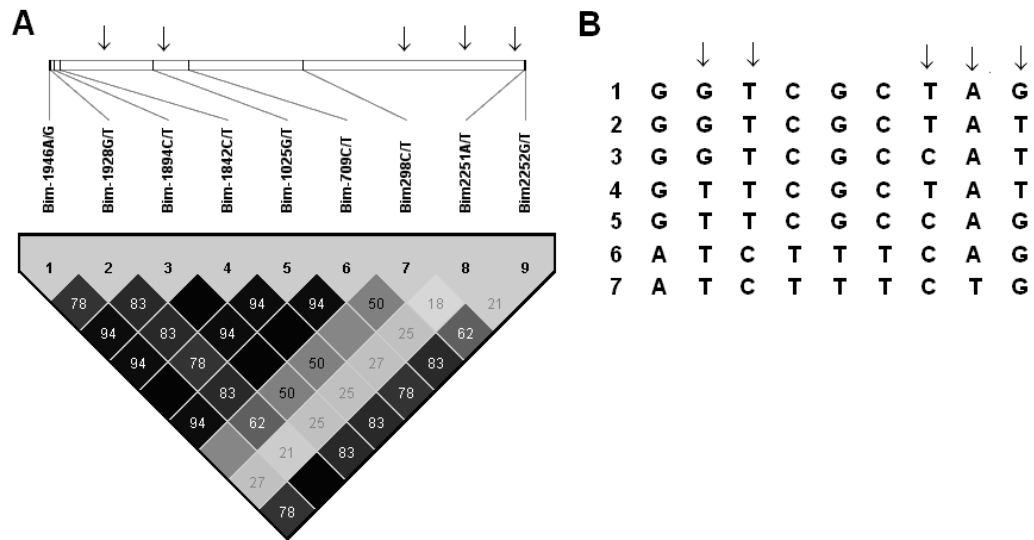


Figure 14. Déséquilibre de liaison entre les polymorphismes du gène Bim (A) et présentation des haplotypes définis à partir de ceux-ci (B). La valeur du r^2 est inscrite dans les cases, une case noire correspondant à un $r^2 = 1$. Les flèches indiquent les SNPs sélectionnés comme tagSNPs.

E.2.2 Issue de la LLA : analyse de survie selon les génotypes de Bim

Aucun variant de Bim n'a été associé significativement avec la survenue d'évènement (tableau XV, p.47).

Tableau XV. Fréquence des génotypes du gène Bim chez des enfants ayant la LLA avec et sans évènement

<i>Génotypes de BIM</i>	<i>Évènement (%)</i>	<i>Pas d'évènement (%)</i>	<i>Total (%)</i>	<i>p^a</i>
-1928T>G				
TT	16 (29,1)	67 (28,8)	83 (28,8)	0,92
GT	28 (50,9)	112 (48,1)	140 (48,6)	-
GG	11 (20,0)	54 (23,2)	65 (22,6)	-
Total	55 (100,0)	233 (100,0)	288 (100,0)	-
-1894T>C				
TT	19 (34,5)	67 (28,6)	86 (29,8)	0,41
CT	23 (41,8)	119 (50,9)	142 (49,1)	-
CC	13 (23,6)	48 (20,5)	61 (21,1)	-
Total	55 (100,0)	234 (100,0)	289 (100,0)	-
298C>T				
CC	20 (39,2)	93 (39,6)	113 (39,6)	0,41
CT	21 (41,2)	112 (47,7)	133 (46,5)	-
TT	10 (19,6)	30 (12,8)	40 (14,0)	-
Total	51 (100,0)	235 (100,0)	286 (100,0)	-
2251A>T				
AA	34 (61,8)	153 (65,7)	187 (64,9)	0,81
AT	19 (34,5)	72 (30,9)	91 (31,6)	-
TT	2 (3,6)	8 (3,4)	10 (3,5)	-
Total	55 (100,0)	233 (100,0)	288 (100,0)	-
2252G>T				
GG	16 (29,6)	68 (30,0)	84 (29,9)	0,69
GT	28 (51,9)	112 (49,3)	140 (49,8)	-
TT	10 (18,5)	47 (20,7)	57 (20,3)	-
Total	54 (100,0)	227 (100,0)	281 (100,0)	-

p^a La valeur est estimée par le test du Log-Rank du Kaplan-Meier

Aucune différence significative n'est observée dans la survenue de rechute pour les polymorphismes de Bim (tableau XVI, p.48).

Tableau XVI. Fréquence des génotypes du gène Bim chez des enfants ayant la LLA avec et sans rechute

<i>Génotypes de BIM</i>	<i>Rechute (%)</i>	<i>Pas de rechute (%)</i>	<i>Total (%)</i>	<i>p^a</i>
-1928T>G				
TT	16 (30,2)	67 (28,5)	83 (28,8)	0,82
GT	27 (50,9)	113 (48,1)	140 (48,6)	-
GG	10 (18,9)	55 (23,4)	65 (22,6)	-
Total	53 (100,0)	235 (100,0)	288 (100,0)	-
-1894T>C				
CC	13 (24,5)	48 (20,3)	61 (21,1)	0,40
CT	22 (41,5)	120 (50,8)	142 (49,1)	-
TT	18 (34,0)	68 (28,8)	86 (29,8)	-
Total	53 (100,0)	236 (100,0)	289 (100,0)	-
298C>T				
CC	20 (41,7)	93 (39,1)	113 (39,6)	0,43
CT	19 (39,6)	114 (47,9)	133 (46,5)	-
TT	9 (18,8)	31 (13,0)	40 (14,0)	-
Total	48 (100,0)	238 (100,0)	286 (100,0)	-
2251A>T				
AA	32 (61,5)	155 (65,7)	187 (64,9)	0,74
AT	18 (34,6)	73 (30,9)	91 (31,6)	-
TT	2 (3,8)	8 (3,4)	10 (3,5)	-
Total	52 (100,0)	236 (100,0)	288 (100,0)	-
2252G>T				
GG	16 (31,4)	68 (29,6)	84 (29,9)	0,57
GT	26 (51,0)	114 (49,6)	140 (49,8)	-
TT	9 (17,6)	48 (20,9)	57 (20,3)	-
Total	51 (100,0)	230 (100,0)	281 (100,0)	-

p^a La valeur est estimée par le test du Log-Rank du Kaplan-Meier

Le polymorphisme exonique Bim298C>T est le seul variant du gène à être significatif pour la survenue du décès ($p=0,03$) (tableau XVII, p.49).

Tableau XVII. Fréquence des génotypes du gène Bim chez des enfants ayant la LLA avec et sans décès

<i>Génotypes de BIM</i>	<i>Décès (%)</i>	<i>Pas de décès (%)</i>	<i>Total (%)</i>	p^a
-1928T>G				
TT	7 (48,0)	76 (28,9)	83 (28,8)	0,98
GT	12 (48,0)	128 (48,7)	140 (48,6)	-
GG	6 (24,0)	59 (22,4)	65 (22,6)	-
Total	25 (100,0)	263 (100,0)	288 (100,0)	-
-1894T>C				
TT	10 (40)	76 (28,8)	86 (29,8)	0,36
CT	9 (36,0)	133 (50,4)	142 (49,1)	-
CC	6 (24,0)	55 (20,8)	61 (21,1)	-
Total	25 (100,0)	264 (100,0)	289 (100,0)	-
298C>T				
CC	5 (22,7)	108 (40,9)	113 (39,5)	0,03
CT	10 (45,5)	123 (46,6)	133 (46,5)	-
TT	7 (31,8)	33 (12,5)	40 (14,0)	-
Total	22 (100,0)	264 (100,0)	286 (100,0)	-
2251A>T				
AA	18 (72,0)	169 (64,3)	187 (64,9)	0,65
AT	7 (28,0)	84 (31,9)	91 (31,6)	-
TT	0 (0,0)	10 (3,8)	10 (3,5)	-
Total	25 (100,0)	263 (100,0)	288 (100,0)	-
2252G>T				
GG	7 (29,2)	77 (30,0)	84 (29,9)	0,58
GT	11 (45,8)	129 (50,2)	140 (49,8)	-
TT	6 (25,0)	51 (19,8)	57 (20,3)	-
Total	24 (100,0)	247 (100,0)	281 (100,0)	-

p^a La valeur est estimée par le test du Log-Rank du Kaplan-Meier

Le polymorphisme 298C>T a été recodé selon le modèle récessif, CC et CT étant ainsi regroupés ensemble et analysés versus TT. L'analyse de survie Kaplan-Meier montre une diminution significative de la survie globale associée à TT (figure 15, p.50) alors que ni la survie sans événement ni la survie sans rechute ne sont significatives.

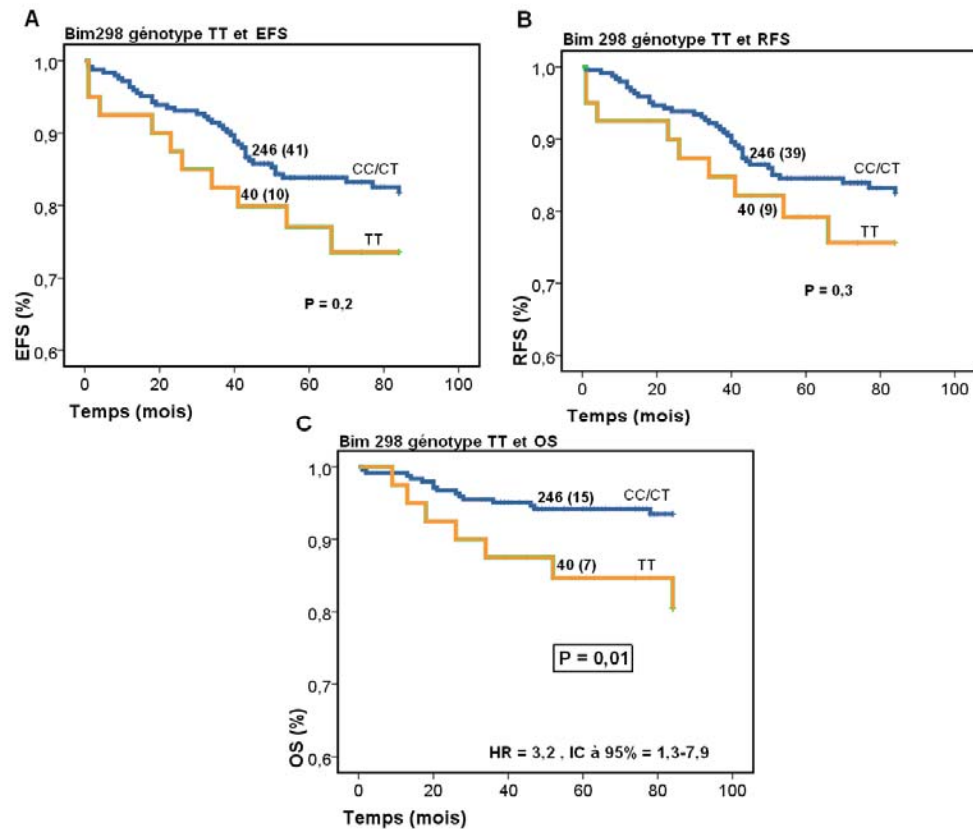


Figure 15. Courbe de survie pour la survenue d'un évènement (A), pour la survenue de rechute (B) et pour la survenue de décès (C) du polymorphisme 298C>T

La survie globale de TT vs CC/CT du variant 298C>T de Bim reste significative après régression de Cox (HR=3,2 , IC à 95% =1,3-7,9) (tableau XVIII, p.50).

Tableau XVIII. Régression de Cox pour le variant Bim298C>T avec les paramètres significatifs pour la survie globale

	B	E.S.	Wald	ddl	Signif.	Exp(B)	95,0% IC pour Exp(B)	
							Inférieure	Supérieure
Âge	1,118	,345	10,512	1	,001	3,060	1,556	6,017
Nb lymphocytes	1,273	,445	8,166	1	,004	3,571	1,492	8,550
Bim298 TT vs CC/CT	1,163	,464	6,270	1	0,01	3,199	1,287	7,947

Cette diminution de survie globale associée à TT semble liée au type de corticostéroïdes utilisés lors de l'intensification et de la maintenance car l'évolution de la LLA semble significativement moins favorable pour ceux génotypés TT et ayant été traités à la dexaméthasone (p=0,001) (tableau XIX, p.51).

Tableau XIX. Association du variant 298C>T avec le traitement à la prednisone ou à la dexaméthasone pour la survenue de décès

				BIM298C/T		Total
				CC/CT	TT	
Prednisone	décès	non	Effectif	153	22	175
			%	87,4%	12,6%	100,0%
	oui	Effectif	14	4	18	
		%	77,8%	22,2%	100,0%	
Total		Effectif	167	26	193	
		%	86,5%	13,5%	100,0%	
Dexaméthasone	décès	non	Effectif	78	11	89
			%	87,6%	12,4%	100,0%
	oui	Effectif	1	3	4	
		%	25,0%	75,0%	100,0%	
Total		Effectif	79	14	93	
		%	84,9%	15,1%	100,0%	

L'analyse de survie de Kaplan-Meier montre cette diminution de survie globale liée à TT significativement plus prononcée pour ceux ayant été traités à la dexaméthasone ($p=0,001$) versus ceux ayant été traités à la prednisone ($p=0,2$) (figure 16, p.51).

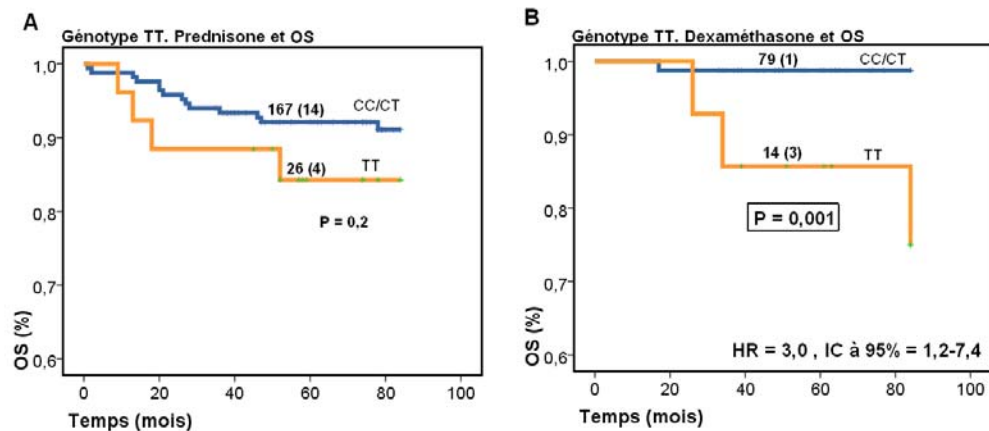


Figure 16. Courbe de survie globale associée au polymorphisme 298C>T selon le traitement, soit à la prednisone (A) ou à la dexaméthasone (B)

E.2.3 Impact des haplotypes de Bim

E.2.3.1 Répartition des haplotypes de Bim

Les polymorphismes du gène Bim ont permis de définir 7 haplotypes, leur fréquence variant de 1,0% à 34,0% (tableau XX, p.52). Les individus ayant les haplotypes rares 1 et 6 ont été regénotypés afin de s'assurer que ces génotypes existent bel et bien et ne sont donc pas dus à des erreurs de génotypages.

Tableau XX. Fréquences des haplotypes de Bim dans la cohorte LLA

Fréquences des haplotypes						
	-1928	-1894	298	2251	2252	Fréquence (%)
*1	G	T	T	A	G	2,6
*2	G	T	T	A	T	34,0
*3	G	T	C	A	T	10,5
*4	T	T	T	A	T	1,0
*5	T	T	C	A	G	6,2
*6	T	C	C	A	G	27,7
*7	T	C	C	T	G	18,0

E.2.3.2 Issue de la LLA : analyse de survie selon les génotypes de Bim

Aucune différence significative n'a été trouvée dans la survenue d'évènement parmi les 7 haplotypes de Bim (tableau XXI, p.53).

Tableau XXI. Fréquence des haplotypes du gène Bim chez des enfants ayant la LLA avec et sans évènement

<i>Haplotype</i>	<i>Évènement (%)</i>	<i>Pas d'évènement (%)</i>	<i>Total (%)</i>	<i>p^a</i>
*1				
Présence	4 (9,1)	10 (4,6)	14 (5,3)	0,18
Absence	40 (90,9)	209(95,4)	249 (94,7)	
*2				
Présence	26 (59,1)	124 (56,6)	150 (57,0)	0,84
Absence	18 (40,9)	95 (43,4)	113 (43,0)	
*3				
Présence	6 (13,6)	49 (22,4)	55 (20,9)	0,20
Absence	38 (86,4)	170 (77,6)	208 (79,1)	
*4				
Présence	2 (4,5)	4 (1,8)	6 (2,3)	0,30
Absence	42 (95,5)	215 (98,2)	257 (97,7)	
*5				
Présence	5 (11,4)	26 (11,9)	31 (11,8)	0,93
Absence	39 (88,6)	193 (88,1)	232 (88,2)	
*6				
Présence	19 (43,2)	108 (49,3)	127 (48,3)	0,46
Absence	25 (56,8)	111 (50,7)	136 (51,7)	
*7				
Présence	15 (34,1)	71 (32,4)	86 (32,7)	0,82
Absence	29 (65,9)	148 (67,6)	177 (67,3)	
Total	44 (100,0)	219 (100,0)	263 (100,0)	

p^a La valeur est estimée par le test du Log-Rank du Kaplan-Meier

Il n'existe aucune différence significative dans la survenue de rechute pour les haplotypes de Bim (tableau XXII, p.54).

Tableau XXII. Fréquence des haplotypes du gène Bim chez des enfants ayant la LLA avec et sans rechute

<i>Haplotypes</i>	<i>Rechute (%)</i>	<i>Pas de rechute (%)</i>	<i>Total (%)</i>	<i>p^a</i>
*1				
Présence	4 (9,5)	10 (4,5)	14 (5,3)	0,15
Absence	38 (90,5)	211 (95,5)	249 (94,7)	
*2				
Présence	24 (57,1)	126 (57,0)	150 (57,0)	0,95
Absence	18 (42,9)	95 (43,0)	113 (43,0)	
*3				
Présence	6 (14,3)	49 (22,2)	55 (20,9)	0,25
Absence	36 (85,7)	172 (77,8)	206 (79,1)	
*4				
Présence	2 (4,8)	4 (1,8)	6 (2,3)	0,27
Absence	40 (95,2)	217 (98,2)	257 (97,7)	
*5				
Présence	5 (11,9)	26 (11,8)	31 (11,8)	0,98
Absence	37 (88,1)	195 (88,2)	232 (88,2)	
*6				
Présence	18 (42,9)	109 (49,3)	127 (48,3)	0,45
Absence	24 (57,1)	112 (50,7)	136 (51,7)	
*7				
Présence	15 (35,7)	71 (32,1)	86 (32,7)	0,65
Absence	27 (64,3)	150 (67,9)	177 (67,3)	
Total	42 (100,0)	221 (100,0)	263 (100,0)	

p^a La valeur est estimée par le test du Log-Rank du Kaplan-Meier

L'haplotype 1, défini par les allèles G-1928, T-1894, T-298, A2251 et G2252, et l'haplotype 4, défini par les allèles T-1928, T-1894, T298, A2251 et T2252, sont significativement associés avec la survenue de décès ($p=0,03$ et $p=0,02$) (tableau XXIII, p.55). Ces haplotypes contiennent l'allèle T298 dont l'homozygotie a été associée avec la survenue de décès. L'haplotype 4 contient aussi cet allèle mais n'est pas associé significativement ($p=0,09$).

Tableau XXIII. Fréquence des haplotypes du gène Bim chez des enfants ayant la LLA avec et sans décès

<i>Haplotypes</i>	<i>Décès (%)</i>	<i>Pas de décès (%)</i>	<i>Total (%)</i>	<i>p^a</i>
*1				
Présence	3 (15,8)	11 (4,5)	14 (5,3)	0,03
Absence	16 (84,2)	233 (95,5)	249 (94,7)	
*2				
Présence	14 (73,7)	136 (55,7)	150 (57,0)	0,14
Absence	5 (26,3)	108 (44,3)	113 (43,0)	
*3				
Présence	1 (5,3)	54 (22,1)	55 (20,9)	0,09
Absence	18 (94,7)	190 (77,9)	206 (79,1)	
*4				
Présence	2 (10,5)	4 (1,6)	6 (2,3)	0,02
Absence	17 (89,5)	240 (98,4)	257 (97,7)	
*5				
Présence	1 (5,3)	30 (12,3)	31 (11,8)	0,36
Absence	18 (94,7)	214 (87,7)	232 (88,2)	
*6				
Présence	7 (36,8)	120 (49,2)	127 (48,3)	0,32
Absence	12 (63,2)	124 (50,8)	136 (51,7)	
*7				
Présence	3 (15,8)	83 (34,0)	86 (32,7)	0,11
Absence	16 (84,2)	161 (66,0)	177 (67,3)	
Total	19 (100,0)	244 (100,0)	263 (100,0)	

p^a La valeur est estimée par le test du Log-Rank du Kaplan-Meier

E.2.3.2.1 Analyse de survie de l'haplotype 1

L'analyse de survie Kaplan-Meier montre une diminution significative de la survie globale associée à l'haplotype 1 ($p=0,03$), alors que ni la survie sans événement ni la survie sans rechute ne sont significatives ($p=0,2$ et $p=0,2$) (figure 17, p.56).

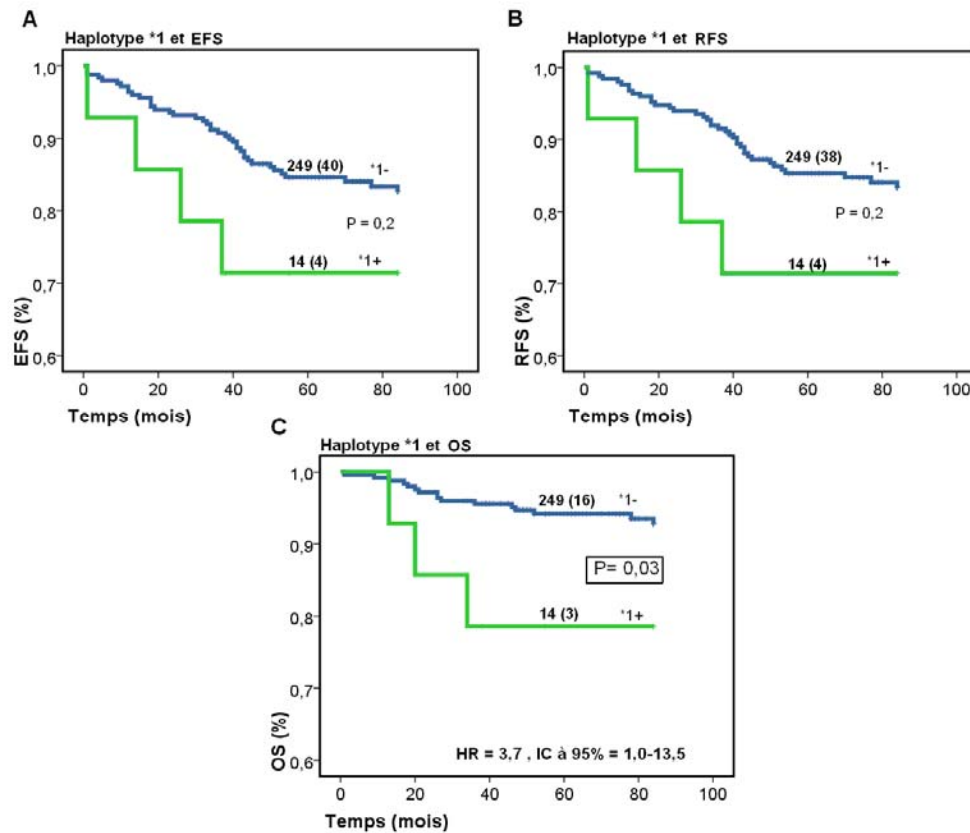


Figure 17. Courbe de survie pour la survenue d'un évènement (A), pour la survenue de rechute (B) et pour la survenue de décès (C) pour l'haplotype 1

La survie globale pour l'haplotype 1 de Bim reste significative après régression de Cox (HR=3,7 , IC à 95% =1,0-13,5) (tableau XXIV, p.56).

Tableau XXIV. Analyse de l'OS par régression de Cox

	B	E.S.	Wald	ddl	Signif.	Exp(B)	95,0% IC pour Exp(B)	
							Inférieure	Supérieure
Âge	1,066	,354	9,043	1	,003	2,903	1,449	5,815
Nb lymphocytes	1,234	,491	6,315	1	,012	3,436	1,312	8,999
Bim Haplotype 1	1,308	,662	3,907	1	0,05	3,698	1,011	13,523

Cette diminution de survie globale associée à l'haplotype 1 semble liée au type de corticostéroïdes utilisés lors de l'intensification et de la maintenance car l'évolution de la LLA semble significativement moins favorable pour ceux ayant été traités à la prednisone (tableau XXV, p.57).

Tableau XXV. Association de l'haplotype 1 avec le traitement à la prednisone ou à la dexaméthasone pour la survenue de décès

				Haplotype 1		Total
				1-	1+	
Prednisone	Décès	non	Effectif	157	5	162
			%	96,9%	3,1%	100,0%
	oui	Effectif	13	2	15	
		%	86,7%	13,3%	100,0%	
Total		Effectif	170	7	177	
		%	96,0%	4,0%	100,0%	
Dexaméthasone	Décès	non	Effectif	76	6	82
			%	92,7%	7,3%	100,0%
	oui	Effectif	3	1	4	
		%	75,0%	25,0%	100,0%	
Total		Effectif	79	7	86	
		%	91,9%	8,1%	100,0%	

L'analyse de survie de Kaplan-Meier montre cette diminution de survie globale liée à l'haplotype 1 significativement plus prononcée pour ceux ayant été traités à la prednisone ($p=0,04$) versus ceux ayant été traités à la dexaméthasone ($p=0,3$) (figure 18, p.57).

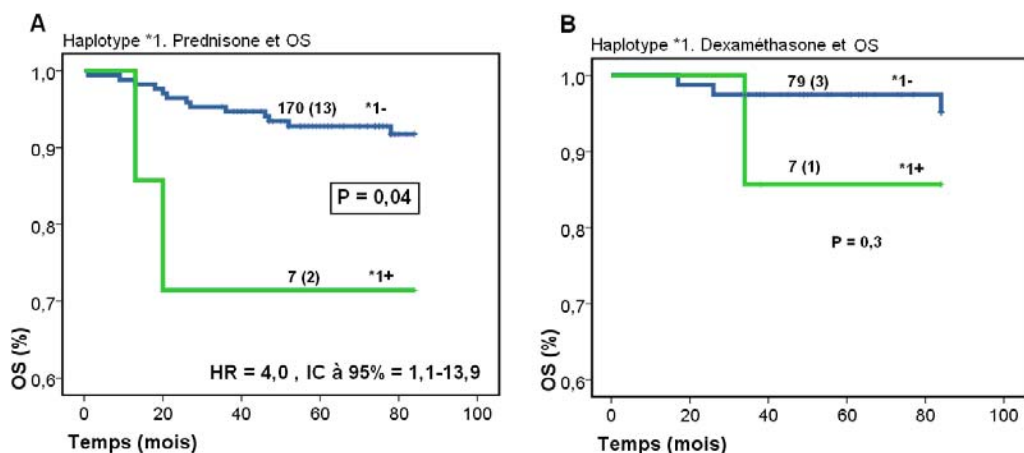


Figure 18. Courbe de survie globale associée à l'haplotype 1 selon le traitement, soit à la prednisone (A) ou à la dexaméthasone (B)

E.2.3.2.2 Analyse de survie de l'haplotype 4

L'analyse de survie Kaplan-Meier montre une diminution significative de la survie globale associée à l'haplotype 4 ($p=0,02$), alors que ni la survie sans évènement ni la survie sans rechute ne sont significatives ($p=0,3$ et $p=0,3$) (figure 19, p.58).

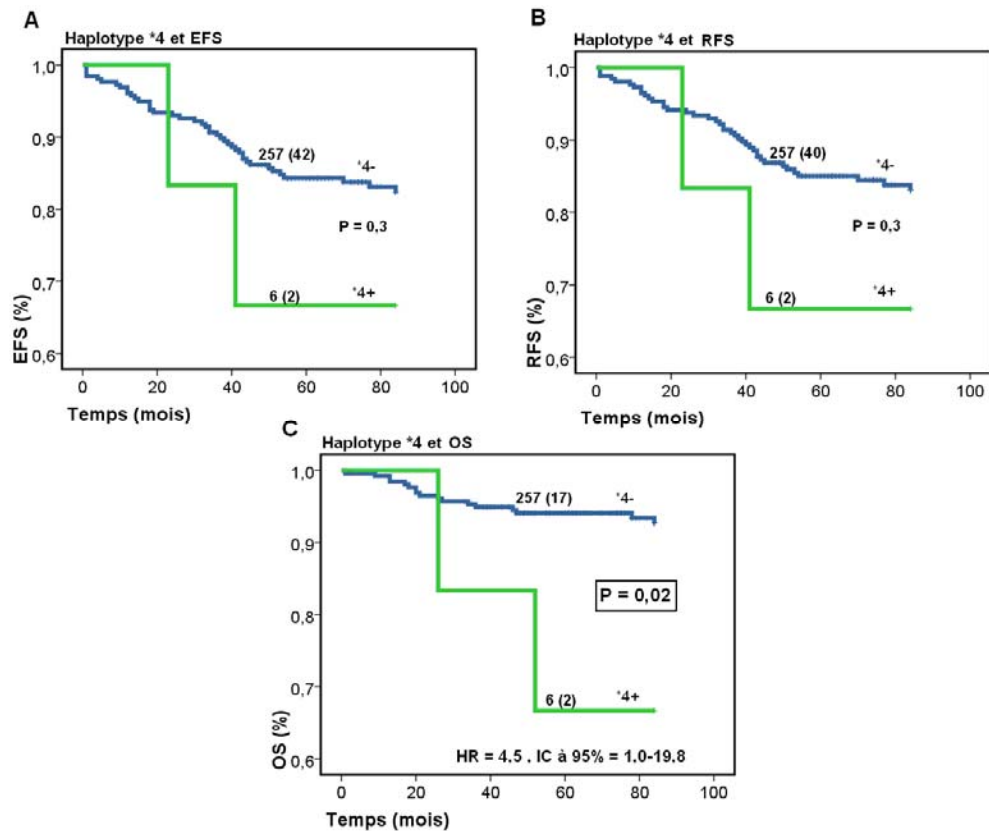


Figure 19. Courbe de survie pour la survenue d'un évènement (A), pour la survenue de rechute (B) et pour la survenue de décès (C) pour l'haplotype 4

La survie globale pour l'haplotype 4 de Bim reste significative après régression de Cox (HR=4,5 , IC à 95% =1,0-19,8) (tableau XXVI, p.59).

Tableau XXVI. Analyse de l'OS par régression de Cox

	B	E.S.	Wald	ddl	Signif.	Exp(B)	95,0% IC pour Exp(B)	
							Inférieure	Supérieure
Âge	1,131	,379	8,912	1	,003	3,098	1,475	6,507
Nb lymphocytes	1,115	,485	5,290	1	,021	3,048	1,179	7,881
Haplotype 4	1,504	,756	3,954	1	,047	4,501	1,022	19,827

Cette diminution de survie globale associée à l'haplotype 4 semble liée au type de corticostéroïdes utilisés lors de l'intensification et de la maintenance car l'évolution de la LLA semble significativement moins favorable pour ceux ayant été traités à la dexaméthasone (tableau XXVII, p.59).

Tableau XXVII. Association de l'haplotype 4 avec le traitement à la prednisone ou à la dexaméthasone pour la survenue de décès

					Haplotype 4		Total
					*4-	*4+	
Prednisone	Décès	non	Effectif	159	3	162	
			%	98,1%	1,9%	100,0%	
	oui	Effectif	14	1	15		
		%	93,3%	6,7%	100,0%		
	Total	Effectif	173	4	177		
		%	97,7%	2,3%	100,0%		
Dexaméthasone	Décès	non	Effectif	81	1	82	
			%	98,8%	1,2%	100,0%	
	oui	Effectif	3	1	4		
		%	75,0%	25,0%	100,0%		
	Total	Effectif	84	2	86		
		%	97,7%	2,3%	100,0%		

L'analyse de survie de Kaplan-Meier montre cette diminution de survie globale liée à l'haplotype 4 significativement plus prononcée pour ceux ayant été traités à la dexaméthasone ($p=0,001$) versus ceux ayant été traités à la prednisone ($p=0,3$) (figure 20, p.60).

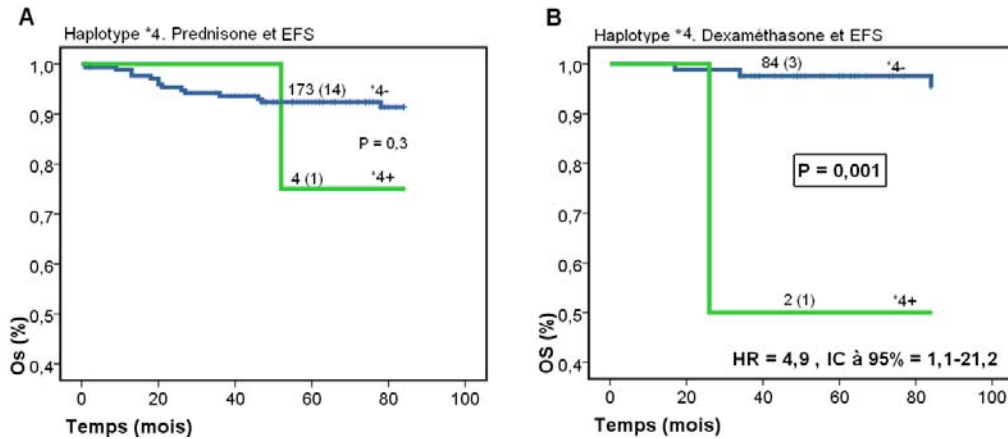


Figure 20. Courbe de survie globale associée à l'haplotype 4 selon le traitement, soit à la prednisone (A) ou à la dexaméthasone (B)

E.2.3.3 Perte ou gain de sites de liaison

Les 6 polymorphismes se situant en région régulatrice du gène Bim ont été analysés par le programme Biobase qui permet de prédire quels sites de liaison à des facteurs de transcription sont gagnés ou perdus à cause de chacune des mutations (tableau XXVIII, p.61). L'analyse de l'haplotype 1, qui présente les variations mutationnelles G-1928 et C-1842, prédit la perte de 7 sites de liaison à des facteurs de transcription et le gain de 6 sites. L'haplotype 4 présente une des mêmes variations mutationnelles que l'haplotype 1 soit C-1842 ce qui lui ferait perdre 5 sites de liaison et gagner 2 sites.

Tableau XXVIII. Perte ou gain de sites de liaison à des facteurs de transcription pour les différents haplotypes de Bim

Haplotypes	Polymorphismes						Perte	Gain
	-1946	-1928	-1894	-1842	-1025	-709		
*1	G	G	T	C	G	C	GEN_INI3_B, CMAF_01	AP2_Q6_01, PAX4_01, TAXCREB_02, WT1_Q6
*1	-	-	-	C	-	-	CP2_02, DBP_Q6, CMAF_01, PAX4_03, PAX5_02	AP4_01, PAX_Q6
*4	G	T	T	C	G	C	IDEM	IDEM

AP : activator protein; PAX : paired box gene; TAXCREB : Tax/CREB complex; WT : Wilms Tumor

E.3 Toxicité liée aux GCs

De fortes doses prolongées de corticostéroïdes peuvent induire une toxicité qui peut être observée par plusieurs signes cliniques dont le diabète cortico-induit, l'obésité, les infections, les complications osseuses et les troubles de comportement. De même, la toxicité peut mener à des changements de dosage. Tous ces facteurs ont été évalués par analyses d'associations. Vu le peu d'associations trouvées, un seul exemple de tableau pour chacun est présenté, soit le tableau présentant l'association significative observée ou sinon, à titre indicatif, un tableau présentant tous les génotypes de Bax. Dans le cas où les homozygotes pour l'allèle mineur sont rares, ils sont regroupés avec l'hétérozygote.

E.3.1. Diabète cortico-induit

Aucune association avec le diabète cortico-induit n'a été observée pour l'ensemble des génotypes et haplotypes des gènes Bax et Bim (tableau XXIX, p.62).

Tableau XXIX. Associations du diabète cortico-induit avec les génotypes du gène Bax

<i>Génotypes de Bax</i>	<i>Diabète cortico-induit</i>			<i>p^b</i>
	Non (%)	Oui (%)	Total (%)	
-1962T>G				
TT	161 (72,2)	11 (68,8)	172 (72,0)	0,8
GG/TG	62 (27,8)	5 (31,3)	67 (28,0)	-
Total	223 (100,0)	16 (100,0)	239 (100,0)	-
-1836T>A				
TT/AT	57 (25,7)	5 (29,4)	62 (25,9)	0,8
AA	165 (74,3)	12 (70,6)	177 (74,1)	-
Total	222 (100,0)	17 (100,0)	239 (100,0)	-
-1076G>A				
GG	90 (41,5)	7 (43,8)	97 (41,6)	0,1
GA	58 (26,7)	4 (25,0)	62 (26,6)	-
AA	69 (31,8)	5 (31,3)	74 (31,8)	-
Total	217 (100,0)	16 (100,0)	233 (100,0)	-

^b La valeur est estimée par le test du Chi-deux si 3 groupes ou par le test exact de Fisher si regroupé en 2.

E.3.2. Obésité

La seule association significative liée à l'obésité est Bax-1962T>G. L'allèle mutant G est associé avec une diminution du risque d'obésité (OR=0,28, IC à 95% = 0,08-0,95, p=0,04) (tableau XXX, p.63).

Tableau XXX. Association de l'obésité avec les génotypes du gène Bax

<i>Génotype</i>	<i>Obésité</i>			<i>p^b</i>
	Non (%)	Oui (%)	Total (%)	
-1962T>G				
TT	147 (69,7)	25 (89,3)	172 (72,0)	0,04
GG/TG	64 (30,0)	3 (10,7)	67 (28,0)	-
Total	211 (100,0)	28 (100,0)	239 (100,0)	-
-1836T>A				
TT/AT	59 (28,0)	3 (10,7)	62 (25,9)	0,07
AA	152 (72,0)	25 (89,3)	177 (74,1)	-
Total	211 (100,0)	28 (100,0)	239 (100,0)	-
-1076G>A				
GG	85 (41,1)	12 (46,2)	97 (41,6)	0,06
GA	60 (29,0)	2 (7,7)	62 (26,6)	-
AA	62 (30,0)	12 (46,2)	74 (31,8)	-
Total	207 (100,0)	26 (100,0)	233 (100,0)	-

p^b La valeur est estimée par le test du Chi-deux si 3 groupes ou par le test exact de Fisher si regroupé en 2.

E.3.3. Infections grades 3 et 4

Aucune association avec les infections de grades 3 et 4 n'a été observée pour l'ensemble des génotypes et haplotypes des gènes Bax et Bim (tableau XXXI, p.63).

Tableau XXXI. Association des génotypes du gène Bax avec les infections de grades 3 et 4

<i>Génotype</i>	<i>Infection grade 3 et 4</i>			<i>p^b</i>
	Non (%)	Oui (%)	Total (%)	
-1962T>G				
TT	123 (72,8)	49 (70,0)	172 (72,0)	0,8
GG/TG	46 (27,2)	21 (30,0)	67 (28,0)	-
Total	169 (100,0)	70 (100,0)	239 (100,0)	-
-1836T>A				
TT/AT	42 (24,9)	20 (28,6)	62 (25,9)	0,6
AA	127 (75,1)	50 (71,4)	177 (74,1)	-
Total	169 (100,0)	70 (100,0)	239 (100,0)	-
-1076G>A				
GG	68 (41,5)	29 (42,0)	97 (41,6)	0,8
GA	42 (25,6)	20 (29,0)	62 (26,6)	-
AA	54 (32,9)	20 (29,0)	74 (31,8)	-
Total	164 (100,0)	69 (100,0)	233 (100,0)	-

p^b La valeur est estimée par le test du Chi-deux si 3 groupes ou par le test exact de Fisher si regroupé en 2.

E.3.4 Complications osseuses

Une association significative est observée entre l'ostéonécrose et l'haplotype 4 de Bim (tableau XXXII, p.64). La présence de l'haplotype 4 est associée avec une augmentation du risque (Test exact de Fisher $p=0,045$, OR=9,4, IC à 95% =1,4-60,8). Aucune association avec les fractures n'a été observée.

Tableau XXII. Association des haplotypes du gène Bim avec l'ostéonécrose

<i>Haplotype</i>	<i>Ostéonécrose</i>			p^b
	Non (%)	Oui (%)	Total (%)	
Haplotype 1				
Absence	189 (94,5)	15 (93,8)	204 (94,4)	1,0
Présence	11 (5,5)	1 (6,3)	12 (5,6)	-
Haplotype 2				
Absence	83 (41,5)	7 (43,8)	90 (41,7)	1,0
Présence	117 (58,5)	9 (56,3)	126 (58,3)	-
Haplotype 3				
Absence	156 (78,0)	14 (87,5)	170 (78,7)	0,5
Présence	44 (22,0)	2 (12,5)	46 (21,3)	-
Haplotype 4				
Absence	197 (98,5)	14 (87,5)	211 (97,7)	0,05
Présence	3 (1,5)	2 (12,5)	5 (2,3)	-
Haplotype 5				
Absence	176 (88,0)	14 (87,5)	190 (88,0)	1,0
Présence	24 (12,0)	2 (12,5)	26 (12,0)	-
Haplotype 6				
Absence	105 (52,5)	7 (43,8)	112 (51,9)	0,6
Présence	95 (47,5)	9 (56,3)	104 (48,1)	-
Haplotype 7				
Absence	134 (67,0)	10 (62,5)	144 (66,7)	0,8
Présence	66 (33,0)	6 (37,5)	72 (33,3)	-
Total	200 (100,0)	16 (100,0)	216 (100,0)	

p^b La valeur est estimée par le test exact de Fisher.

E.3.5 Troubles de comportement

Aucune association avec les troubles de comportement n'a été observée pour l'ensemble des génotypes et haplotypes des gènes Bax et Bim (tableau XXXIII, p.65).

Tableau XXXIII. Association des génotypes du gène Bax avec les troubles de comportement

<i>Génotype</i>	<i>Troubles de comportement</i>			<i>p^b</i>
	Non (%)	Oui (%)	Total (%)	
-1962T>G				
TT	161 (72,5)	11 (64,7)	172 (72,0)	0,6
GG/TG	61 (27,5)	6 (35,3)	67 (28,0)	-
Total	222 (100,0)	17 (100,0)	239 (100,0)	-
-1836T>A				
TT/AT	58 (26,1)	4 (23,5)	62 (25,9)	1,0
AA	164 (73,9)	13 (76,5)	177 (74,1)	-
Total	222 (100,0)	17 (100,0)	239 (100,0)	-
-1076G>A				
GG/GA	148 (68,5)	11 (64,7)	159 (68,2)	0,8
AA	68 (31,5)	6 (35,6)	74 (31,8)	-
Total	216 (100,0)	17 (100,0)	233 (100,0)	-

^b La valeur est estimée par le test du Chi-deux si 3 groupes ou par le test exact de Fisher si regroupé en 2.

E.3.6. Changement de dexaméthasone

Le changement de dexaméthasone n'a été associé à aucun génotype ni haplotype des gènes Bax et Bim (tableau XXXIV, p.66).

Tableau XXXIV. Association des génotypes du gène Bax avec le changement de dexaméthasone.

<i>Génotype</i>	<i>Changement dexaméthasone</i>			<i>p^b</i>
	Non (%)	Oui (%)	Total (%)	
-1962T>G				
TT	153 (71,8)	19 (73,1)	172 (72,0)	1,0
GG/TG	60 (28,2)	7 (26,9)	67 (28,0)	-
Total	213 (100,0)	26 (100,0)	239 (100,0)	-
-1836T>A				
TT/AT	143 (69,1)	16 (61,5)	159 (68,2)	0,5
AA	64 (30,9)	10 (38,5)	74 (31,8)	-
Total	207 (100,0)	26 (100,0)	233 (100,0)	-
-1076G>A				
GG	87 (42,0)	10 (38,5)	97 (41,6)	0,7
GA	56 (27,1)	6 (23,1)	62 (26,6)	-
AA	64 (30,9)	10 (38,5)	74 (31,8)	-
Total	213 (100,0)	26 (100,0)	239 (100,0)	-

^b La valeur est estimée par le test du Chi-deux si 3 groupes ou par le test exact de Fisher si regroupé en 2.

E.3.7. Changement de prednisone

La seule association significative avec le changement de prednisone est Bim-1894T>C. L'allèle C est associé avec une augmentation du risque comme démontrée par un changement dans la dose de prednisone. (Test exact de Fisher $p=0,04$, OR=2,6, IC à 95% = 1,1-6,6) (tableau XXXV, p.67).

Tableau XXXV. Association du changement de prednisone avec les génotypes du gène Bim

<i>Génotypes de Bim</i>	<i>Changement prednisone</i>			<i>p^b</i>
	Non (%)	Oui (%)	Total (%)	
-1928T>G				
TT	57 (28,2)	12 (31,6)	69 (28,8)	0,3
GT	95 (47,0)	21 (55,3)	116 (48,3)	-
GG	50 (24,8)	5 (13,2)	55 (22,9)	-
Total	202 (100,0)	38 (100,0)	240 (100,0)	-
-1894T>C				
TT	67 (33,2)	6 (15,8)	73 (30,4)	0,04
CC/CT	135 (66,8)	32 (84,2)	167 (69,9)	-
Total	202 (100,0)	38 (100,0)	240 (100,0)	-
298C>T				
CC	79 (39,5)	12 (33,3)	91 (38,6)	0,6
CT	92 (46,0)	20 (55,6)	112 (47,5)	-
TT	29 (14,5)	4 (11,1)	33 (14,0)	-
Total	200 (100,0)	36 (100,0)	236 (100,0)	-
2251A>T				
AA/AT	172 (96,6)	32 (94,1)	204 (96,2)	0,6
TT	6 (3,4)	2 (5,9)	8 (3,8)	-
Total	178 (100,0)	34 (100,0)	212 (100,0)	-
2252G>T				
GG	55 (31,4)	10 (29,4)	65 (31,1)	0,1
GT	81 (46,3)	21 (61,8)	102 (48,8)	-
TT	39 (22,3)	3 (8,8)	42 (20,1)	-
Total	175 (100,0)	34 (100,0)	209 (100,0)	-

^b La valeur est estimée par le test du Chi-deux si 3 groupes ou par le test exact de Fisher si regroupé en 2.

F DISCUSSION

F.1 Gène Bax

Le gène Bax code pour une protéine pro-apoptotique multi-domaines. Bien que son rôle dans l'induction de l'apoptose induite via les GCs par la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie soit reconnu [130, 131], les interactions protéines-protéines qui médient la cascade l'est beaucoup moins [132].

F.1.1 Polymorphismes de Bax

Dans notre étude, nous avons analysé 10 polymorphismes situés dans la région régulatrice du gène Bax. Les trois variants -1962T>G, -1836T>A et -1076G>A ont été génotypés dans notre cohorte d'enfants LLA suite à leur sélection via l'analyse de leurs fréquences alléliques et du déséquilibre de liaison.

Le polymorphisme G-248A a été associé statistiquement avec une expression réduite de la protéine dans la leucémie lymphoïde chronique (CLL), soit une réduction de 50% pour l'hétérozygote et une absence d'expression protéique pour l'homozygote AA. Il a été associé à la progression de la maladie via le stade de Rai et à l'échec d'atteindre une réponse complète [133]. De même, ce polymorphisme a été corrélé avec une survie globale diminuée dans la CLL [134].

Nous avons obtenu une fréquence allélique plus élevée dans notre population plus grande d'enfants LLA (0,1, n=286) que dans la population plus âgée CLL de

Saxena et al. ayant une moyenne d'âge de 71 ans (0,03, n=34) [133]. L'étude de *Starczynski et al.* présentait quant à elle une population plus grande (n=203) mais une fréquence allélique elle aussi plus petite (0,01) [134]. Par opposition, *Strogsberg et al.* n'ont trouvé aucune association avec la survie globale ou avec l'évolution de la maladie chez 463 patients CLL, leur fréquence allélique étant de 0,10 [135]. De même, *Nüchel et al.* n'ont trouvé aucune association avec l'incidence, le stade de la maladie ou sa progression chez 112 patients CLL [136]. Ainsi, l'impact de ce polymorphisme chez les patients CLL semble incertain. De plus, la LLA est une maladie distincte de la CLL.

Ce polymorphisme a été testé dans notre cohorte LLA sous l'appellation G-178A, car nous avons pris en considération le site de transcription comme premier nucléotide alors que les autres études citées précédemment ont considéré le site de traduction. Comme ce polymorphisme était en déséquilibre de liaison avec le polymorphisme T-1962G, l'impact de G-178A a été évalué via ce dernier, l'allèle A-178 étant lié à l'allèle T-1962.

Le génotype TT du polymorphisme -1962T>G démontre une légère augmentation non significative du risque liée à la survenue d'évènement et de rechute. Plusieurs études ont démontré une augmentation du risque d'obésité suite à la thérapie pour la LLA [45, 137]. Le génotype TT-1962 est associé significativement avec une augmentation du risque d'obésité liée à la toxicité aux GCs. Cependant, cette association ne demeure pas significative suite à l'ajustement pour les tests multiples.

Malgré une certaine tendance péjorative qui a déjà été démontrée dans la littérature, notre étude ne fournit par une évidence suffisante de l'impact de ce polymorphisme. Ce dernier seul ni aucun des autres variants n'ont été associés significativement avec l'évolution de la LLA que ce soit pour la survenue d'évènement, de rechute ou de décès suggérant que pris séparément ils ne jouent pas de rôle dans l'issue de la maladie ou la toxicité. Cela reste à être confirmé dans une plus grande cohorte (n estimé à 300 patients). La mesure de l'expression de la protéine n'a pas été mesurée à cause du manque de temps et reste à être testée pour l'évolution de la maladie.

F.1.2 Haplotypes de Bax

Nous avons défini 5 haplotypes à partir de nos polymorphismes du gène Bax. L'haplotype 3, défini par les allèles des tagSNPs et des autres variants associés T-1962, T-1836, G-1820, G-1076 et G-178, est associé avec une survie sans évènement et avec une survie sans rechute significativement diminuées mais non avec la survie globale. Ces associations demeurent après régression de Cox. Cet haplotype a une fréquence rare de 0,6% dans notre population LLA et donc les individus ayant cet haplotype ont été régénotypés par la suite afin de s'assurer que ce dernier n'est pas dû à des erreurs de génotypage. Cependant, après ajustement pour les tests multiples et pour les 8 polymorphismes analysés dans les 2 gènes, ces associations ne peuvent être prises en considération. La survie sans évènement a été associée au type de corticostéroïdes utilisé lors du traitement. Ainsi, l'évolution de la LLA semble significativement moins favorable pour les individus ayant l'haplotype 3 et traités à la prednisone. Cette association demeure significative après ajustement pour les tests

multiples. Cependant, il est difficile d'évaluer son impact réel à cause du nombre de patients (n=3).

Le programme Biobase prédit le gain de 7 sites de liaison aux facteurs de transcription CHOP, p300, PAX4, EFC, SREBP, BCL-6 et LRH1, ainsi que la perte de 3 sites, soit à DR3, PPARA et ZF5, pour l'haplotype 3 de Bax versus l'haplotype wild-type. Ces modifications sont dues à la mutation du polymorphisme -1836A>T. Une fréquence plus élevée de rechute est observée pour les porteurs du génotype TT de ce variant (3,8%) versus les autres génotypes AT et AA (0,8%). Le programme Biobase utilise une librairie de matrices de poids par position. À partir de cette librairie, il cherche des sites potentiels de facteurs de transcription sur la séquence d'ADN voulue. L'algorithme de recherche utilise 2 valeurs de score afin de mesurer la qualité de l'appariement entre la séquence et la matrice et donne une évaluation de la similitude sur une échelle de 0 à 1, 1 étant un appariement exact. Il y a un calcul de la probabilité de l'occurrence des nucléotides à chaque position de la matrice. La limite a été fixée de sorte d'avoir une valeur permettant une reconnaissance d'au moins 90% des nucléotides générés, laissant ainsi place à un taux d'erreur de 10%. Il y a donc des possibilités de faux-négatifs et de faux-positifs [138]. Afin de vérifier expérimentalement l'ajout ou la perte d'un site de liaison pour un facteur de transcription, nous pourrions, par exemple, mettre en commun les séquences régulatrices non mutées ou mutées amplifiées par PCR contenant le site du facteur de transcription avec ce facteur de façon à les faire interagir ensemble et à saturer les sites de liaison du facteur de transcription. Ensuite, en faisant une électrophorèse, nous pourrions observer s'il y a une interaction ou non en comparant les poids moléculaires obtenus à ceux de la protéine libre et de la séquence d'ADN libre [139]. Ainsi, s'il y a un site de liaison présent sur la séquence, le fragment combiné d'ADN

et de la protéine migrera moins rapidement sur le gel. En comparant les différences d'interactions de chaque protéine spécifique avec les séquences mutées versus celles non mutées, nous pourrions mettre en évidence une perte ou gain du site de liaison d'un facteur.

La protéine Bcl-6 est détectable faiblement dans de multiples tissus et exprimée à de hauts taux dans les cellules B matures et les cellules Tfh. Elle a des implications dans le développement lymphoïde normal et la lymphomagénèse [140]. La dérégulation par des translocations chromosomales et des mutations en région non codante 5' du gène est commune dans le lymphome non-hogkinien. Bcl-6 a été identifié comme étant un inhibiteur de la sénescence induite par p53 et ainsi sa surexpression pourrait réprimer la voie antiproliférative p53 [4]. Elle agit en tant que répresseur transcriptionnel. Ainsi, le gain d'un site de liaison pour Bcl-6 rajouterait un effet répresseur sur le gène Bax ce qui pourrait expliquer entre autre la diminution de l'expression de la protéine qui est observée dans plusieurs études [90, 133, 141].

F.2 Gène Bim

Le gène Bim code pour une protéine pro-apoptotique BH3-only qui semble importante dans l'induction de l'apoptose médiée par les GCs. En effet, plusieurs études semblent démontrer son implication directe via une augmentation de la protéine suite au traitement [112, 142].

F.2.1 Polymorphismes de Bim

Nous avons analysé 13 polymorphismes localisés dans le gène Bim. Les 5 variants -1928T>G, -1894T>C, 298C>T, 2251A>T et 2252G>T ont été génotypés dans notre population d'étude suite à leur sélection.

Le polymorphisme 298C>T a été corrélé significativement avec une survie globale diminuée. L'homozygote TT est associé à une évolution péjorative de la LLA, 7 des 40 individus TT étant décédés comparativement à 15 des 246 individus CT/CC. Cette association demeure significative après une analyse selon la régression de Cox. Cette diminution de survie globale associée à TT semble liée au type de corticostéroïdes utilisés lors de l'intensification et de la maintenance car l'évolution de la LLA semble significativement moins favorable pour ceux génotypés TT et ayant été traités à la dexaméthasone. L'activité antileucémique *in vitro* de la dexaméthasone est d'ailleurs plus forte que celle de la prednisone [129].

Le polymorphisme codant 298C>T se situe dans l'exon 3 et est synonyme, c'est-à-dire qu'il se situe dans la partie codante sans causer de changement d'un acide aminé. Il a été démontré qu'un variant synonyme pouvait avoir un impact fonctionnel. En effet, *Kimchi-Sarfaty et al.* ont démontré qu'un polymorphisme synonyme du gène MDR1 résulte en une P-glycoprotéine ayant des conformations altérées [143]. Leur hypothèse est que ces altérations de conformation pourraient survenir à cause d'un changement dans le taux de traduction de l'ARNm par le ribosome. Ainsi, le changement d'un codon fréquent par un codon synonyme plus rare, à cause d'une quantité plus faible et/ou d'une recharge plus lente de l'ARNt, résulterait en un temps de pause augmenté du ribosome sur l'ADN. Ceci modifierait

la cinétique de repliement de la protéine, plus la pose étant longue plus le changement cinétique étant important [143, 144]. De même, l'impact fonctionnel d'un variant synonyme peut être dû à un déséquilibre de liaison qui existe entre ce dernier et d'autres polymorphismes fonctionnels.

Une sensibilité au traitement chez des individus mène à une réduction de la dose de médicaments afin de prévenir les effets secondaires graves associés. Le polymorphisme -1894T>C a été associé avec le changement de dose de la prednisone. L'allèle C a été corrélé avec une augmentation du risque comme démontrée par la diminution de la dose. Cette association n'est pas restée significative après ajustement pour les tests multiples. Donc, aucune conclusion ne peut être tirée concernant le changement de dose de la prednisone pour ce polymorphisme dans notre population.

F.2.2 Haplotypes de Bim

L'haplotype 1, défini par les allèles G-1928, T-1894, T-298, A2251 et G2252, a été associé significativement avec une survie globale diminuée mais non avec la survie sans événement et la survie sans rechute. Le risque de décès est 3,7 fois plus élevé chez les porteurs. Cet haplotype a une fréquence de 2,6% dans notre cohorte LLA. Cette tendance défavorable pour l'évolution de la maladie semble liée au type de corticostéroïdes utilisés, principalement la prednisone qui démontre une association significative. Cependant, cette corrélation ne demeure pas suite à l'ajustement de la valeur pour les tests multiples.

La même association pour une survie globale diminuée est trouvée pour les porteurs de l'haplotype 4 qui est défini par les allèles T-1928, T-1894, T298, A2251 et T2252. Cet haplotype présente une fréquence rare de 1,0% dans notre population. Cette diminution de survie globale semble plus prononcée pour ceux ayant été traités à la dexaméthasone. Cette association demeure significative après ajustement mais il est difficile d'évaluer son impact dû au nombre d'individus (n=2).

L'ostéonécrose est une complication associée au traitement de la LLA [43, 44]. Nos études d'association montrent une augmentation du risque d'ostéonécrose associée à l'haplotype 4. Ce dernier a d'ailleurs été associé à une évolution péjorative de la survie globale de la LLA, surtout pour le traitement à la dexaméthasone. D'ailleurs un effet plus négatif de la dexaméthasone sur la morbidité osseuse a été rapporté chez les enfants LLA [42]. Cependant, suite à l'ajustement pour les tests multiples, cette tendance n'est pas restée parce qu'à cause des nombreux tests effectués nous ne pouvons pas être sûr que cette association n'est pas survenue au hasard. Afin d'avoir une évaluation plus sûre de l'association, il faudrait augmenter la taille de notre population afin d'avoir une puissance statistique plus élevée compte tenu du nombre de tests réalisés.

L'analyse par le programme Biobase prédit la perte des sites des liaisons pour les facteurs de transcription CP2, DBP, CMAF, PAX4 et PAX5 ainsi que le gain de AP4 et PAX pour les haplotypes 1 et 4 de Bim. L'haplotype 1 présente en plus la perte de GEN_INI3_B et CMAF et le gain d'AP2_Q6, PAX4, TAXCREB et WT1.

Un facteur de transcription intéressant est c-Maf. Ce dernier est impliqué dans la différenciation des cellules T. Une surexpression de c-Maf a été associée à une

augmentation de la sensibilité des cellules CD4 à l'apoptose induite par plusieurs stimuli dont la dexaméthasone. Cette augmentation de sensibilité à l'apoptose a été associée à une réduction de la transcription du gène antiapoptotique Bcl-2 [6]. Ainsi, s'il y a perte d'un site de liaison pour cette protéine activatrice de l'apoptose sur le gène Bim, il va y avoir diminution de l'expression de Bim, ce qui est d'ailleurs observé dans les cellules leucémiques résistantes [111].

G CONCLUSION

La résistance au traitement chez un nombre significatif d'enfants est encore un obstacle majeur au succès du traitement de la LLA. L'identification de polymorphismes fonctionnels de gènes contrôlant les enzymes médiateurs des effets des médicaments pourraient contribuer significativement à la variabilité interindividuelle des réponses thérapeutiques et pourraient prédire le patron de résistance et de toxicité chez les patients. La personnalisation du traitement pour chaque individu selon son génotype constitue donc une voie prometteuse afin de réduire le risque en ajustant les doses ou en choisissant des médicaments spécifiques chez des répondeurs potentiels.

Les gènes Bax et Bim ont été choisis comme gènes candidats dans notre étude sur la réponse aux GCs chez les enfants atteints de LLA. Nous avons trouvé une association significative de l'haplotype 3 de Bax, défini par les allèles des tagSNPs T-1962, T-1836 et G-1076, avec une survie sans événement significativement diminuée. Nous avons aussi observé une association de l'haplotype 1, défini par les allèles G-1928, T-1894, T298, A2251 et G2252, de l'haplotype 4, défini par les allèles T-1928, T-1894, T298, A2251 et T2252, ainsi que du polymorphisme 298C>T, qui est présent dans ceux-ci, du gène Bim avec une survie globale significativement diminuée. Ainsi, nous avons des haplotypes rares qui semblent contribuer, chacun participant à la toxicité et/ou résistance aux GCs avec un petit effet qui s'additionne. L'ajout de d'autres polymorphismes de ces gènes à d'autres gènes de la voie d'action des GCs pourrait contribuer à avoir un meilleur traitement individualisé ultérieurement.

Pour conclure, nous pouvons voir que la survie des enfants ayant la LLA de notre cohorte à l'Hôpital Sainte-Justine est relativement bonne, avec une survie sans évènement approximative de l'ordre de 80-85%. Ceci montre l'efficacité des protocoles de traitement utilisés en clinique. La combinaison des médicaments est donc effective et spécifique dans le traitement de cette maladie chez les enfants. Cependant, les rechutes et les décès sont encore des évènements retrouvés chez une bonne proportion d'enfants. En effet, environ 15 à 20% de nos patients ont rechutés et environ 10% sont décédés. De même, des effets secondaires liés à l'utilisation des médicaments sont encore rencontrés chez un certain pourcentage de patients. La recherche actuelle va donc plus se concentrer sur ces patients qui ne répondent pas bien au traitement afin d'en trouver les raisons et ainsi de personnaliser leur médication. Enfin, les études rétrospectives sont toujours importantes afin de continuer à apporter des modifications aux protocoles de traitement de la LLA au fil des connaissances afin de maximiser les chances de survie et de minimiser les effets secondaires, ainsi qu'afin de raffiner les stratifications des populations plus à risques qui nécessiteront des changements de doses et/ou de médicaments.

H RÉFÉRENCES

1. LIN, K.I., TUNYAPLIN, C., CALAME, K., *Transcriptional regulatory cascades controlling plasma cell differentiation*. Immunological Reviews, 2003. **194**: p. 19-28.
2. YU, D., RAO, S., TSAI, L.M., LEE, S.K., SUTCLIFFE, E.L., SRIVASTAVA, M., LINTERMAN, M., ZHENG, L., SIMPSON, N., ELLYARD, J.I., PARISH, I.A., MA, C.S., LI, Q.J., PARISH, C.R., MACKAY, C.R., VINUESA, C.G., *The follicular repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment*. Immunity, 2009. **31**: p. 457-468.
3. KUSAM, S., DENT, A., *Common mechanisms for the regulation of B cell differentiation and transformation by the transcriptional repressor protein BCL-6*. Immunol Res, 2007. **37**(3): p. 177-186.
4. LINDSTRÖM, M.S., WIMAN, K.G., *Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma*. seminars in Cancer Biology, 2002. **12**(5): p. 381-387.
5. HO, I.C., LO, D., GLIMCHER, L.H., *c-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms*. J Exp Med, 1998. **188**(10): p. 1859-1866.
6. PENG, S., LALANI, S., LEAVENWORTH, J.W., HO, I.C., PAUZA, M.E., *c-Maf interacts with c-Myb to down-regulate Bcl-2 expression and increase apoptosis in peripheral CD4 cells*. EUR J Immunol, 2007. **37**: p. 2868-2880.
7. BAUQUET, A.T., JIN, H., PATERSON, A.M., MITSDOERFFER, M., HO, I.C., SHARPE, A.H., KUCHROO, V.K., *The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and Th-17 cells*. Nature Immunology, 2008. **10**: p. 167-175.
8. SINNETT, D., N'DIAYE, N., LABUDA, D., KRAJINOVIC, M., *Les déterminants génétiques de la leucémie de l'enfant*. Bulletin du Cancer, 2006. **93**(9): p. 857-865.
9. VON DER WEID, N.X., *Spécificités du cancer de l'enfant et de l'adolescent*. Revue médicale suisse, 2005. **1**(39): p. 2544-2547.
10. SINNETT, D., N'DIAYE, N., ST-ONGE, P., HEALY, J., *La leucémie de l'enfant : une maladie génétique!* M S-Medecine Sciences, 2007. **23**(11): p. 968-974.
11. ANSARI, M., ST-ONGE, G., KRAJINOVIC, M., *Pharmacogénétique de la leucémie lymphoblastique aiguë*. Medecine Sciences, 2007. **23**: p. 961-967.
12. VON DER WEID, N.X., POPOVIC, M., *Leucémie lymphoblastique aiguë de l'enfant et de l'adolescent*. Revue médicale suisse, 2006. **2**(59): p. 873-876.
13. TUCCI, F., ARICÒ, M., *Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia*. Haematologica, 2008. **93**(8): p. 1124-1128.
14. SILVERMAN, L.B., *Acute lymphoblastic leukemia in infancy*. Pediatr Blood Cancer, 2007. **49**(7 Suppl): p. 1070-1073.
15. BEHM, F.G., *Immunophenotyping*, in *Childhood leukemias*, C.-H. PUI, Editor. 2006, Cambridge University Press: New York. p. 150-175.
16. SATAKE, N., YOON, J.M. *Aacute Lymphoblastic Leukemia*. 2009; Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/990113-overview>.
17. SILVERMAN, L.B., GELBER, R.D., DALTON, V.K., BARR, R.D., SALLAN, S.E., *Induction failure in acute lymphoblastic leukemia of childhood*. 1999, 1999. **85**(6): p. 1395-1404.

18. PUI, C.H., RELING, M.V., DOWNING, J.R., *Acute lymphoblastic leukemia*. N Engl J Med, 2004. **350**(15): p. 1535-1548.
19. YEOH, E.J., ROSS, M.E., SHURTLEFF, S.A., WILLIAMS, W.K., PATEL, D., MAHFOUZ, R., BEHM, F.G., RAIMONDI, S.C., RELING, M.V., PATEL, A., CHENG, C., CAMPANA, D., WILKINS, D., ZHOU, X., LI, J., LIU, H., PUI, C.H., EVANS, W.E., NAEVE, C., WONG, L., DOWNING, J.R., *Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling*. Cancer Cell, 2002. **1**(2): p. 133-143.
20. CARROLL, W.L., BHOJWANI, D., MIN, D-J., RAETZ, E., RELING, M., DAVIES, S., DOWNING, J.R., WILLMAN, C.L., REED, J.C., *Pediatric acute lymphoblastic leukemia* Hematology, 2003. **102-31**.
21. HOLLEMAN, A., DEN BOER, M.L., DE MENEZES, R.X., CHEOK, M.H., CHENG, C., KAZEMIER, K.M., JANKA-SCHAUB, G.E., GÖBEL, U., GRAUBNER, U.B., EVANS, W.E., PIETERS, R., *The expression of 70 apoptosis genes in relation to lineage, genetic subtype, cellular drug resistance, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2006. **107**: p. 769-776.
22. REITER, A., SCHRAPPE, M., LUDWIG, W.D., HIDDEMANN, W., SAUTER, S., HENZE, G., ZIMMERMANN, M., LAMPERT, F., HAVERS, W., NIETHAMMER, D., *Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86*. Blood, 1994. **84**(9): p. 3122-3133.
23. HONGO, T., YAMADA, S., YAJIMA, S., WATANABE, C., FUJI, Y., KAWASAKI, M., HANADA, R., HORIKOSHI, Y., *Biological characteristics and prognostic value of in vitro three-drug resistance to prednisolone, L-asparaginase, and vincristine in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Int J Hematol, 1999. **70**(4): p. 268-277.
24. SILVERMAN, L.B., SALLAN, E.S., *Newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia : update on pronostic factors and treatment*. Curr Opin Hematol, 2003. **10**: p. 290-296.
25. YANG, J.J., CHENG, C., YANG, W., PEI, D., CAO, X., FAN, Y., POUNDS, S.B., NEALE, G., TREVINO, L.R., FRENCH, D., CAMPANA, D., DOWNING, J.R., EVANS, W., E., PUI, C-H., DEVIDAS, M., BOWMAN, W.P., CAMITTA, B.M., WILLMAN, C.L., DAVIES, S.M., BOROWITZ, M.J., CARROLL, W.L., HUNGER, S.P., RELING, M.V., *Genome-wide interrogation of germline genetic variation associated with treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia*. JAMA., 2009. **301**(4): p. 393-403.
26. SZCZEPANSKI, T., ORFAO, A., VAN DER VALDEN, V.H., SAN MIGUEL, J.F., VAN DONGEN, J.J., *Minimal residual disease in leukaemia patients* Lancet Oncology, 2001. **2**(7): p. 409-417.
27. DALLE, J.-H., MOGHRABI, A., ROUSSEAU, P., LECLERC, J.-M., BARRETTE, S., BERNSTEIN, M.L., CHAMPAGNE, J., DAVID, M., DEMERS, J., DUVAL, M., HUME, H., MEYER, P., CHAMPAGNE, M.A., *Second induction in pediatric patients with recurrent acute lymphoid leukemia using DFCI-ALL protocols*. J Pediatr Hematol Oncol., 2005. **27**(2): p. 73-79.
28. CSOKA, M., BOCSI, J., FALUS, A., SZALAI, CS., KLUJBER, V., SZENDE, B., SCHULER, D., *Glucocorticoid-induced apoptosis and treatment*

- sensitivity in acute lymphoblastic leukemia of children. Pediatr Hematol Oncol.*, 1997. **14**(5): p. 433-442.
29. LANSIAUX, A., *Quelles nouvelles à propos des antimétabolites en oncologie ?*, in *Oncologie*. 2007, Springer Paris: France, **9** (11). p. 746-750.
 30. ROBERT, J., *Les poisons du fuseau*, in *Oncologie*. 2007, Springer Paris: France, **9** (11). p. 766-772.
 31. MORO, S., BERETTA, G.L., DAL BEN, D., NITISS, J., PALUMBO, M., CAPRANICO, G., *Interaction model for anthracycline activity against DNA topoisomerase II*. *Biochem*, 2004. **43**(23): p. 7503-7513.
 32. SCHMIDT, S., RAINER, J., PLONER, C., PRESUL, E., RIML, S., KOFLER, R., *Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance*. *Cell Death Diff*, 2004. **11**: p. S45-S55.
 33. BROOME, J.D., *Studies on the mechanism of tumor inhibition by L-asparaginase*. *J Exp Med*, 1968. **127**(6): p. 1058.
 34. GREENSTEIN, S., GHIAS, K., KRETT, N.L., ROSEN, S.T., *Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(6): p. 1681-1694.
 35. BUTTGEREIT, F., BURMESTER, G.R., LIPWORTH, B.J., *Optimised glucocorticoid therapy: the sharpening of an old spear*. *Lancet*, 2005. **365**: p. 801-803.
 36. PALUMBO, A., RAJKUMAR, S.V., *Treatment of newly diagnosed myeloma*. *Leukemia*, 2009. **23**(3): p. 449-456.
 37. JACOBS, J.W.G., BIJLSMA, J.W.J., *Glucocorticoid therapy*, in *Kelley's textbook of rheumatology*, Saunders, Editor. 2008: Canada.
 38. Phillip A. Pizzo, D.G.P., *Corticosteroids*, in *Principles and practice of pediatric oncology, 5th edition*. 2006, Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphie. p. 339-340.
 39. LACEY, C.F., ARMSTRONG, L.L., GOLDMEN, M.P., LANCE, L.L., *Drug information handbook : a comprehensive resource for all clinicians and healthcare professionals*, ed. 18. 2009.
 40. HURWITZ, C.A., SILVERMAN, L.B., SCHORIN, M.A., CLAVELL, L.A., DALTON, V.K., GLICK, K.M., GELBER, R.D., SALLAN, S.E., *Substituting dexamethasone for prednisone complicates remission induction in children with acute lymphoblastic leukemia*. *Cancer*, 2000. **88**(8): p. 1964-1969.
 41. BALIS, F.M., LESTER, C.M., CHROUSOS, G.P., HEIDEMAN, R.L., POPLACK, D.G., *Differences in cerebrospinal fluid penetration of corticosteroids: possible relationship to the prevention of meningeal leukemia*. *J Clin Oncol*, 1987. **5**(2): p. 202-207.
 42. STRAUSS, A.J., SU, J.T., DALTON, V.M., GELBER, R.D., SALLAN, S.E., SILVERMAN, L.B., *Bone Morbidity in Children Treated for Acute Lymphoblastic Leukemia*. *J Clin Onc*, 2001. **19**(12): p. 3066-3072.
 43. MATTANO, L., SATHER, H. et al., *Osteonecrosis as a complication of treating acute lymphoblastic leukemia in children : a report from the children's cancer group*. *J Clin Onc*, 2000. **18**: p. 3262-3272.
 44. BURGER, B., BEIER, R., ZIMMERMANN, M., BECK, J.D., REITER, A., SCHRAPPE, M., *Osteonecrosis: a treatment related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL)--experiences from trial ALL-BFM 95*. *Pediatr Blood Cancer*, 2005. **44**(3): p. 220-225.

45. MERRITT, R.J., HACK, S.L., KALSCH, M., OLSON, D., *Corticosteroid Therapy-induced Obesity in Children*. Clinical Pediatrics, 1986. **25**(3): p. 149-152.
46. WABER, D.P., CARPENTIERI, S.C., KLAR, N., SILVERMAN, L., SCHWENN, M., HURWITZ, C.A., MULLENIX, P., TARBELL, N.J., SALLAN, S.E., *Cognitive Sequelae in Children Treated for Acute Lymphoblastic Leukemia With Dexamethasone or Prednisone*. J Pediatr Hematol Oncol., 2000. **22**(3): p. 206-213.
47. KLUMPER, E., PIETERS, R., VEERMAN, A.J., HUISMANS, D.R., LOONEN, A.H., HAHLEN, K., KASPERS, G.J., VAN WERING, E.R., HARTMANN, R., HENZE, G., *In vitro cellular drug resistance in children with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1995. **86**(10): p. 3861-3868.
48. SRINIVAS, G., KUMUMAKUMARY, P., JOSEPH, T., PILLAI, M.R., *In vitro drug sensitivity and apoptosis induction in newly diagnosed pediatric acute lymphoblastic leukemia: correlation with overall survival*. Pediatr Hematol Oncol., 2004. **21**: p. 465-473.
49. PLONER, C., SCHMIDT, S., PRESUL, E., RENNER, K., SCHRÖCKSNADL, K., RAINER, J., RIML, S., KOFLER, R., *Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2005. **93**(2-5): p. 153-160.
50. FRANKFURT, O., ROSEN, S.T., *Mechanisms of glucocorticoid-induced apoptosis in hematologic malignancies: updates*. Curr Opin Oncol, 2004. **16**(6): p. 553-563.
51. GRUOL, D.J., BOURGEOIS, S., *Expression of the mdr1 P-glycoprotein gene: a mechanism of escape from glucocorticoid-induced apoptosis*. Biochem Cell Biol, 1994. **72**(11-12): p. 561-571.
52. HUIZENGA, N.A., KOPER, J.W., DE LANGE, P., POLS, H.A., STOLK, R.P., BURGER, H. GROBBEE, D.E., BRINKMANN, A.O., DE JONG, F.H., LAMBERTS, S.W., *A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo*. J Clin Endocrinol, 1998. **83**(1): p. 144-151.
53. HILLMANN, A.G., RAMDAS, J., MULTANEN, K., NORMAN, M.R., HARMON, J.M., *Glucocorticoid receptor gene mutations in leukemic cells acquired in vitro and in vivo*. Cancer Res, 2000. **60**: p. 2056-2062.
54. HALA, M., HARTMANN, B.L., BÖCK, G., GELEY, S., KOFLER, R., *Glucocorticoid receptor gene defects and resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in human leukemic cell lines*. Int J Cancer, 1996. **68**: p. 663-668.
55. GELEY, S., HARTMANN, B.L., HALA, M., STRASSER-WOZAK, E.M.C., KAPELARI, K., KOFLER, R., *Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in human T-cell acute lymphoblastic leukemia CEM-C1 cells due to insufficient glucocorticoid receptor expression*. Cancer Res, 1996. **56**: p. 5033-5038.
56. SCHAAF, M.J., CIDLOWSKI, J.A., *AUUUA motifs in the 3'UTR of human glucocorticoid receptor alpha and beta mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression*. Steroids, 2002. **67**(7): p. 627-636.
57. WEBSTER, J.C., OAKLEY, R.H., JEWELL, C.M., CIDLOWSKI, J.A., *Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta*

- isoform : a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(12): p. 6865-6870.
58. HOLLEMAN, A., DEN BOER, M.L., KAZEMIER, K.M., JANKA-SCHAUB, G.E., PIETERS, R., *Resistance to different classes of drugs is associated with impaired apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood*, 2003. **102**: p. 4541-4546.
 59. MESTRE-ESCORIHUELA, C., RUBIO-MOSCARDO, F., RICHTER, J.A., SIEBERT, R., CLIMENT, J., FRESQUET, V., BELTRAN, E., AGIRRE, X., MARUGAN, I., MARIN, M., ROSENWALD, A., SUGIMOTO, K-J., WHEAT, L.M., KARRAN, E.L., GARCIA, J.F., PROSPER, F., STAUDT, L.M., PINKEL, D., DYER, M.J.S., MARTINEZ-CLIMENT, J.A., *Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. Blood*, 2006. **109**(1): p. 271-280.
 60. SALOMONS, G.S., SMETS, L.A., VERWIJS-JANSSEN, M., HART, A.A., HAARMAN, E.G., KASPERS, G.J., WERING, E.V., DER DOES-VAN DEN BERG, A.V., KAMPS, W.A., *Bcl-2 family members in childhood acute lymphoblastic leukemia: relationship with features at presentation, in vitro and in vivo drug response and long-term clinical outcome. Leukemia*, 1999. **13**: p. 1574-1580.
 61. LAANE, E., PANARETAKIS, T., POKROVSKAJA, K., BUENTKE, E., CORCORAN, M., SÖDERHÄLL, S., HEYMAN, M., MAZUR, J., ZHIVOTOVSKY, B., PORWIT, A., GRANDÉR, D., *Dexamethasone-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia involves differential regulation of Bcl-2 family members. Haematologica*, 2007. **92**(11): p. 1460-1469.
 62. NORMAN, M., HEARING, S.D., *Glucocorticoid resistance - what is known ? Curr Opin Pharmacol*, 2002. **2**(6): p. 723-729.
 63. NIETO, M.A., LOPEZ-RIVAS, A., *IL-2 protects T lymphocytes from glucocorticoid-induced DNA fragmentation and cell death. J Immunol*, 1989. **143**(12): p. 4166-4170.
 64. ZUBIAGA, A.M., MUNOZ, E., HUBER, T., *IL-4 and IL-2 selectively rescue Th cell subsets from glucocorticoid-induced apoptosis. J Immunol*, 1992. **149**(1): p. 107-112.
 65. BIOLA, A., LEFEBVRE, P., PERRIN-WOLFF, M., STURM, M., BERTOGLIO, J., PALLARDY, M., *Interleukin-2 inhibits glucocorticoid receptor transcriptional activity through a mechanism involving STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) but not AP-1. Mol Endocrinol*, 2001. **15**(7): p. 1062-1076.
 66. PRATT, W.B., TOFT, D.O., *Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. Endocr Rev*, 1997. **18**: p. 306-360.
 67. DOSTERT, A., HEINZEL, T., *Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action Curr Pharm Des*, 2004. **10**: p. 2807-2816.
 68. HERRLICH, P., *Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. Oncogene*, 2001. **20**(19): p. 2465-2475.
 69. RAY, A., SIEGEL, M.D., PREFONTAINE, K.E., RAY, P., *Anti-inflammation: direct physical association and functional antagonism between transcription factor NF-KB and the glucocorticoid receptor. Chest*, 1995. **107**(Suppl 3): p. 139S.

70. TISSING, W.J.E., MEIJERINK, J.P.P., DEN BOER, M.L., PIETERS, R., *Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 2003. **17**: p. 17-25.
71. SCHULER, D., SZENDE, B., BORSI, J.D., MARTON, T., BOCSI, J., MAGYAROSSY, E., KOOS, R., CSOKA, M., *Apoptosis as a Possible Way of Destruction of Lymphoblasts After Glucocorticoid Treatment of Children with Acute Lymphoblastic Leukemia*. *Pediatr Hematol Oncol.*, 1994. **11**(6): p. 641-649.
72. WANG, C.Y., MAYO, M.W., KORNELUK, R.G., GOEDDEL, D.V., BALDWIN, A.S.Jr., *NK-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation*. *Science*, 1998. **281**(5383): p. 1680-1683.
73. DE BOSSCHER, K., BERGHE, W.V., HAEGEMAN, G., *The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression*. *Endocr Rev*, 2003. **24**(4): p. 488-522.
74. LEIS, H., PAGE, A., RAMIREZ, A., BRAVO, A., SEGRELLES, C., PARAMIO, J., BARETTINO, D., JORCANO, J.L., PÉREZ, P., *Glucocorticoid receptor counteracts tumorigenic activity of Akt in skin through interference with the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway*. *Mol Endocrin*, 2004. **18**(2): p. 303-311.
75. HARMON, J.M., NORMAN, M.R., FOWLKES, B.J., THOMPSON, E.B., *Dexamethasone induces irreversible G1 arrest and death of a human lymphoid cell line*. *J Cell Physiol*, 1979. **98**: p. 267-278.
76. KHAN, A.A., SOLOSKI, M.J., SHARP, A.H., SCHILLING, G., SABATINI, D.M., LI, S.H., ROSS, C.A., SNYDER, S.H., *Lymphocyte apoptosis: mediation by increased type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate* *Science*, 1996. **273**: p. 503-507.
77. SHIAO, R.T., MCLESKEY, S.B., KHERA, S.Y., WOLFSON, A., FRETER, C.E., *Mechanisms of inhibition of IL-6-mediated immunoglobulin secretion by dexamethasone and suramin in human lymphoid and myeloma cell lines*. *Leuk Lymphoma*, 1996. **21**: p. 293-303.
78. ADAMS, J.M., CORY, S., *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy*. *Oncogene*, 2007. **26**(9): p. 1324-1337.
79. APTE, S.S., MATTEI, M-G., OLSEN, B.R., *Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAXdelta*. *Genomics*, 1995. **26**: p. 592-594.
80. OGATA, Y., TAKAHASHI, M., *Bcl-XL as an antiapoptotic molecule for cardiomyocytes*. *Drug News Perspect*, 2003. **16**(7): p. 446.
81. YOULE, R.J., STRASSER, A., *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(1): p. 47-59.
82. HSU, Y.T., WOLFER, K., YOULE, R.J., *Cytosol to membrane redistribution of members of the Bcl-2 family during apoptosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997. **94**: p. 3668-3672.
83. NECHUNSHAN, A., SMITH, C.L., LAMENSDORF, I., YOON, S.H., YOULE, R.J., *Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis*. *J Cell Biol*, 2001. **153**(6): p. 1265-1276.
84. MITCHELL, K.O., RICCI, M.S., MIYASHITA, T., DICKER, D.T., JIN, Z., REED, J.C., *Bax is a transcriptional target and mediator of C-Myc-induced apoptosis*. *Cancer Res*, 2000. **60**(22): p. 6318-6325.

85. DANSEN, T.B., WHITFIELD, J., ROSTKER, F., BROWN-SWIGART, L., EVAN, G.I., *Specific requirement for Bax, not Bak, in Myc-induced apoptosis and tumor suppression in vivo*. J Biol Chem, 2006. **281**(16): p. 10890-10895.
86. BASU, A., HALDAR, S., *The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death*. Mol Hum Reprod., 1998. **4**(12): p. 1099-1109.
87. SALOMONS, G., BRADY, H.J.M., VERWIJS-JANSSEN, M., VAN DEN BERG, J.D., HART, A.A.M., VAN DEN BERG, H., BEHRENDT, H., HÄHLEN, K., SMETS, L.A., *The Bax:Bcl-2 ratio modulates the response to dexamethasone in leukaemic cells and is highly variable in childhood acute leukaemia*. Int J Cancer, 1997. **71**(6): p. 959-965.
88. SAXENA, A., VISWANATHAN, S., MOSHYNKA, O., TANDON, P., SANKARAN, K., SHERIDAN, D.P., *Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. American Journal of Hematology, 2004. **75**(1): p. 22-33.
89. STOETZER, O.J., NÜESSLER, V., DARSOW, M., GULLIS, E., PELKA-FLEISCHER, R., SCHEEL, U., WILMANN, W., *Association of bcl-2, bax, bcl-xL and interleukin-1 beta-converting enzyme expression with initial response to chemotherapy in acute myeloid leukemia*. Leukemia, 1996. **10**: p. S18-S22.
90. NARAYAN, S., CHANDRA, J., SHARMA, M., NAITHANI, R., SHARMA, S., *Expression of apoptosis regulators Bcl-2 and Bax in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Hematology, 2007. **12**(1): p. 39-43.
91. OLTVAI, Z., MILLIMAN, C., KORSMEYER, S.J., *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*. Cell, 1993. **74**: p. 609-619.
92. PEPPER, C., HOY, T., BENTLEY, D.P., *Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance*. Br J Cancer, 1997. **76**: p. 935-938.
93. AGUILAR-SANTELISES, M., ROTTENBERG, M.E., LEWIN, N., MELLESED, H., JONDAL, M., *Bcl-2, Bax and P53 expression in B-CLL in relation to in-vitro survival and clinical progression*. Int J Cancer, 1996. **69**: p. 114.
94. PEPPER, C., THOMAS, A., HOY, T., COTTER, F., BENTLEY, P., *Antisense-mediated suppression of Bcl-2 highlights its pivotal role in failed apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol., 1999. **107**: p. 611-615.
95. BARGOU, R.C., DANIEL, P.T., MAPARA, M.Y., BOMMERT, K., WAGENER, C., KALLINICH, B., ROYER, H.D., DORKEN, B., *Expression of the bcl-2 gene family in normal and malignant breast tissue: low bax-alpha expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis*. Int J Cancer, 1995. **60**(6): p. 854-859.
96. REDONDO, M., GARCIA, J., RODRIGO, I., VILLAR, E., GONZALEZ, C., MORELL, M., *Expression of bax and p53 proteins in the tumorigenesis and progression of breast carcinomas*. Tumour Biology, 2003. **24**(1): p. 23-31.
97. KRAJEWSKI, S., BLOMQVIST, C., FRANSSILA, K., KRAJEWSKA, M., WASENIUS, V.M., NISKANEN, E., NORDLING, S., REED, J.C., *Reduced expression of proapoptotic gene Bax is associated with poor response rates to*

- combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma.* Cancer Res, 1995. **55**: p. 4471.
98. TSAMANDAS, A.C., KARDAMAKIS, D., PETSAS, T., ZELOTA, V., VASSALIOU, V., MATATSORIS, T., KALOFONOS, H., VAGIANOS, C.E., SCOPA, C.D., *Bcl-2, bax and p53 expression in rectal adenocarcinoma. Correlation with classic pathologic prognostic factors and patients' outcome.* In Vivo, 2007. **21**(1): p. 113-118.
99. SCOPA, C.D., VAGIANOS, C., KARDAMAKIS, D., KOURELIS, T.G., KALOFONOS, H.P., TSAMANDAS, A.C., *Bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with rectal cancer.* Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2001. **9**(4): p. 329-334.
100. SOHN, S.K., JUNG, J.T., KIM, J.G., KWAK, E.K., PARK, T., SHIN, D.G., SOHN, K.R., LEE, K.B., *Prognostic significance of bcl-2, bax, and p53 expression in diffuse large B-cell lymphoma.* American Journal of Hematology, 2003. **73**(2): p. 101-107.
101. MEIJERINK, J.P.P., MENSINK, E.J.B.M., WANG, K., SEDLAK, T.W., SLÖETJES, A.W., DE WITTE, T., WAKSMAN, G., KORSMEYER, S.J., *Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of Bax* Blood, 1998. **91**(8): p. 2991-2997.
102. BRIMMELL, M., MENDIOLA, R., MANGION, J., PACKHAM, G., *BAX frameshift mutations in cell lines derived from human haemopoietic malignancies are associated with resistance to apoptosis and microsatellite instability.* Oncogene, 1998. **16**: p. 1803-1812.
103. EGGLE, A., HARRIS, A.W., BOUILLET, P., CORY, S., *Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia.* Proc. Natl. Acad. Sci., 2004. **101**: p. 6164-6169.
104. STRASSER, A., PUTHALAKATH, H., BOUILLET, P., HUANG, D.C.S., O'CONNOR, L., O'REILLY, L.A., CULLEN, L., CORY, S., ADAMS, J.M., *The role of Bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl2- family, in cell-death control.* Ann N Y Acad Sci 2000. **917**: p. 541-548.
105. LEY, R., EWINGS, K.E., HADFIELD, K., COOK, S.J., *Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK.* Cell Death and Differentiation, 2005. **12**: p. 1008-1014.
106. ABRAMS, M.T., ROBERTSON, N.M., YOON, K., WICKSTROM, E., *Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by targeting the major splice variants of BIM mRNA with small interfering RNA and short hairpin RNA.* J Biol Chem, 2004. **279**(53): p. 55809-55817.
107. HÜBNER, A., BARRETT, T., FLAVELL, R.A., DAVIS, R.J., *Multi-site Phosphorylation Regulates Bim Stability and Apoptotic.* Mol Cell., 2008. **30**(4): p. 415-425.
108. LEUNG, K.T., LI, K.K-W., SUN, S.S-M., CHAN, P.K.S, OOI, V.E-C, CHIU, L.C-H., *Activation of the JNK pathway promotes phosphorylation and degradation of Bim_{EL}—a novel mechanism of chemoresistance in T-cell acute lymphoblastic leukemia.* Carcinogenesis, 2008. **29**(3): p. 544-551.
109. IGLESIAS-SERRET, D., DE FRIAS, M., SANTIDRIAN, A.F., COLL-MULET, L., COSIALLS, A.M., BARRAGAN, M., DOMINGO, A., GIL, J., PONS, G., *Regulation of the proapoptotic BH3-only protein BIM by glucocorticoids, survival signals and proteasome in chronic lymphocytic leukemia cells.* Leukemia, 2007. **21**: p. 281-287.
110. TAGAWA, H., KARNAN, S., SUZUKI, R., MATSUO, K., ZHANG, X., OTA, A., MORISHIMA, Y., NAKAMURA, S., SETO, M., *Genome-wide*

array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene*, 2005. **24**(8): p. 1348-1358.

111. AICHBERGER, K.J., MAYERHOFER, M., KRAUTH, M-T., VALES, A., KONDO, R., DERDAK, S., PICKL, W.F., SELZER, E., DEININGER, M., DRUKER, B.J., SILLABER, C., ESTERBAUER, H., VALENT, P., *Low-Level Expression of Proapoptotic Bcl-2-Interacting Mediator in Leukemic Cells in Patients with Chronic Myeloid Leukemia: Role of BCR/ABL, Characterization of Underlying Signaling Pathways, and Reexpression by Novel Pharmacologic Compounds* *Cancer Res*, 2005. **65**: p. 9436-9444.
112. BACHMANN, P.S., GORMAN, R., MACKENZIE, K.L., LUTZE-MANN, L., LOCK, R.B., *Dexamethasone resistance in B-cell precursor childhood acute lymphoblastic leukemia occurs downstream of ligand-induced nuclear translocation of the glucocorticoid receptor.* *Blood*, 2005. **105**: p. 2519-2526.
113. BOUILLET, P., METCALF, D., HUANG, D.C.S., TARLINTON, D.M., KAY, T.W.H., KÖNTGEN, F., ADAMS, J.M., STRASSER, A., *Proapoptotic Bcl-2 Relative Bim Required for Certain Apoptotic Responses, Leukocyte Homeostasis, and to Preclude Autoimmunity* *Science*, 1999. **286**(5445): p. 1735-1738.
114. ERLACHER, M., MICHALAK, E.M., KELLY, P.N., LABI, V., NIEDEREGGER, H., COULTAS, L., ADAMS, J.M., STRASSER, A., VILLUNGER, A., *BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo.* *Blood*, 2005. **106**(13): p. 4131-4138.
115. APLENC, R., LANGE, B., *Pharmacogenetic determinants of outcome in acute lymphoblastic leukaemia.* *Br J Haematol.*, 2004. **125**(4): p. 421-434.
116. HUANG, L., TISSING, W.J.E., DE JONGE, R., VAN ZELST, B.D., PIETERS, R., *Polymorphisms in folate-related genes: association with side effects of high-dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia.* *Leukemia*, 2008. **22**(9): p. 1798-1800.
117. MATHERLY, L.H., TAUB, J.W., RAVINDRANATH, Y., PROEFKE, S.A., WONG, S.C., GIMOTTY, P., BUCK, S., WRIGHT, J.E., ROSOWSKY, A., *Elevated dihydrofolate reductase and impaired methotrexate transport as elements in methotrexate resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia.* *Blood*, 1995. **85**(2): p. 500-509.
118. DULUCQ, S., ST-ONGE, G., GAGNÉ, V., ANSARI, M., SINETT, D., LABUDA, D., MOGHRABI, A., KRAJINOVIC, M., *DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL.* *Blood*, 2008. **111**(7): p. 3692-3700.
119. HORIE, N., AIBA, H., OGURO, K., HOJO, H., TAKEISHI, K., *Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase.* *Cell Struct Funct*, 1995. **20**(3): p. 191-197.
120. KRAJINOVIC, M., COSTEA, I., CHIASSON, S., *Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia.* *Lancet*, 2002. **359**(9311): p. 1033-1034.
121. CAPDEVILLE, R., MOUSSON, B., BAX, G., BERTRAND, Y., PHILIPPE, N., *Interactions between 6-mercaptopurine therapy and thiopurine-methyltransferase (TPMT) activity.* *Eur J Clin Pharmacol*, 1994. **46**(4): p. 385-386.

122. KRYNETSKI, E., EVANS, W.E., *Pharmacogenetics as a molecular basis for individualized drug therapy : the thiopurine s-methyltransferas paradigm.* Pharm Res, 1999. **16**(3): p. 342-349.
123. LENNARD, L., LILLEYMAN, J.S., VAN LOON, J., WEINSHILBOUM, R.M., *Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia.* Lancet, 1990. **336**(8709): p. 225-229.
124. PAYNE, K., NEWMAN, W.G., GURWITZ, D., IBARRETA, D., PHILLIPS, K.A., *TPMT testing in azathioprine: a 'cost-effective use of healthcare resources'?* Personalized Medicine, 2009. **6**(1): p. 103-113.
125. LEEDER, J.S., KOREN, G., ARANDA, J., *Pharmacogenetics, Pharmacogenomics, and Pharmacoproteomics*, in Kliegman: Nelson textbook of pediatrics, 18th edition, Saunders, Editor. 2007, Elsevier Inc.
126. LABUDA, D., KRAJINOVIC, M., RICHER, C., SKOLL, A., SINNETT, H., YOTOVA, V., SINNETT, D., *Rapid detection of CYP1A1, CYP2D6, and NAT variants by multiplex polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide assay.* Anal Biochem, 1999. **275**(1): p. 84-92.
127. STEPHENS, M., SCHEET, P., *Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation.* Am J Hum Genet, 2005. **76**(3): p. 449-462.
128. BARRETT, J.C., FRY, B., MALLER, J., DALY, M.J., *Haploview: analysis and visualization of LD and halotype maps.* Bioinformatics, 2005. **21**(2): p. 263-265.
129. KASPERS, G.J.L., VEERMAN, A.J.P., POPP-SNIJDERS, C., LOMECKY, M., VAN ZANTWIJK, C.H., SWINKELS, L.M.J.W., VAN WERING, E.R., PIETERS, R., *Comparison of the antileukemic activity in vitro of dexamethasone and prednisolone in childhood acute lymphoblastic leukemia.* Medical and pediatric oncology, 1996. **27**: p. 114-121.
130. LALIER, L., CARTRON, P-F., JUIN, P., NEDELKINA, S, MANON, S., BECHINGER, B., VALLETTE, F.M., *Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis.* Apoptosis, 2007. **12**(5): p. 887-896.
131. CARTRON, P.F., BELLOT, G., OLIVER, L., GRANDIER-VAZEILLE, X., MANON, S., VALLETTE, F.M., *Bax inserts into the mitochondrial outer membrane by different mechanisms.* FEBS Letters, 2008. **582**(20): p. 3045-3051.
132. CHIPUK, J.E., GREEN, D.R., *How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?* Trends in Cell Biology, 2008. **18**(4): p. 157-164.
133. SAXENA, A., MOSHYNSKA, O., SANKARAN, K., VISWANATHAN, S., SHERIDAN, D.P., *Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance.* Cancer Lett., 2002. **187**(1-2): p. 199-205.
134. STARCZYNSKI, J., PEPPER, C., PRATT, G., HOOPER, L., THOMAS, A., MILLIGAN, D., BENTLEY, P., FEGAN, C., *Common polymorphism G(-248)A in the promoter region of the bax gene results in significantly shorter survival in patients with chronic lymphocytic Leukemia once treatment is initiated.* J Clin Onc, 2005. **23**(7): p. 1514-1521.
135. STROGSBERG, S., TOBIN, G., KROBER, A., KIENLE, D., THUNBERG, U., KARLSSON, K., LAURELL, A., MERUP, M., VILPO, J., SUNDSTROM, C., ROOS, G., JERNBERG-WIKLUND, H., DOHNER, H., NILSSON, K., STILGENBAUER, S., ROSENQUIST, R., *The G(-248)A*

- polymorphism in the promoter region of the Bax gene does not correlate with prognostic markers or overall survival in chronic lymphocytic leukemia.* Leukemia, 2006. **20**(1): p. 77-81.
136. NUCKEL, H., FREY, UH., SELLMANN, L., BAU, M., DURIG, J., DUHRSEN, U., SIFFERT, W., *Bax gene G(-248)A promoter polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: lack of association with incidence, disease stage and progression-free survival.* Leukemia, 2006. **20**(4): p. 724.
137. ASNER, S., AMMANN, R.A., OZSAHIN, H., BECK-POPOVIC, M., VON DER WEID, N.X., *Obesity in Long-Term Survivors of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia.* Pediatr Blood Cancer, 2008. **51**: p. 118-122.
138. KEL, A.E., GÖBLING, E., REUTER, I., CHEREMUSHKIN, E., KEL-MARGOULIS, O.V., WINGENDER, E., *Match : a tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences.* Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3576-3579.
139. CEGLAREK, J.A., REVZIN, A., *Studies of DNA-protein interactions by gel electrophoresis.* Electrophoresis, 1989. **10**(5-6): p. 360-365.
140. CHANG, C.-C., YE, B.H., CHAGANTI, R.S.K., DALLA-FAVERA, R., *BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor.* Proc. Natl. Acad. Sci., 1996. **93**: p. 6947-6952.
141. NUSSLER, V., STOTZER, O., GULLIS, E., PELKA-FLEISCHER, R., POGREBNIK, A., GIESELER, F., WILMANN, W., *Bcl-2, bax and bcl-xL expression in human sensitive and resistant leukemia cell lines.* Leukemia, 1999. **13**: p. 1864-1872.
142. WANG, Z., MALONE, M.H., HE, H., MCCOLL, K.S., DISTELHORST, C.W., *Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis.* J Biol Chem, 2003. **278**: p. 23861-23867.
143. KIMCHI-SARFATY, C., OH, J.M., KIM, I.W., SAUNA, Z.E., CALCAGNO, A.M., AMBUDKAR, S.V., GOTTESMAN, M.M., *A «silent» polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity.* Science, 2007. **328**(5855): p. 1382-1383.
144. TSAI, C.J., SAUNA, Z.E., KIMCHI-SARFATY, C., AMBUDKAR, S.V., GOTTESMAN, M.M., NUSSINOV, R., *Synonymous mutations and ribosome stalling can lead to altered folding pathways and distinct minima.* J Mol Bio, 2008. **383**(2): p. 281-291.

ANNEXE I

Tableau : Polymorphismes du gène BAX et détails du PCR et de l'hybridation par ASO

PCR					
Identité	Source du SNP	Fragment d'ADN	Taille pb	Amorces	Sondes pour l'ASO
-1962G/T	11667351	1	217	F1:gtggaaatttgggtggatg R1:gggaatcgtttgaatctgga	ccaacatTaaattaa, ccaacatGaaattaa
-1836A/T	11671610	1	—	—	gctggagTgcaaggt, gctggagAgcaaggt
-1820A/G	12983717	1	—	—	cgatctcGgctcact, cgatctcAgctcact
-1217C/T	12976283	2	447	F2: caagtcttatgtgtacagctcaatg R2:aggggccacaagagacact	gaccagcCtgaccaa, gaccagcTgaccaa
-1076A/G	11668424	2	—	—	gtaagccGagatcgt, gtaagccAagatcgt
-203-/G	36096807	3	187	F3:attttgggcctctgagcttt R3:cacgtgactgtccaatgagc	aaatgaaggcgta, aaatgaaGggcatta
-178A/G	4645878	3	—	—	tggacggGcggtgt, tggacggAcggctgt
-155A/T	28450536	3	—	—	ccactgcTggcactt, ccactgcAggcatt
184G/C	36017265	4	295	F4:ttcatccaggatcgagcag R4:agagaggaggctgggagt	gcgaatgGgggggga, gcgaatgCgggggga
735C/T	4645900	5	171	F5:ccttctggagcaggtcaca R5:agggcagaaggcactaatca	caatcccGgattcat, caatcccTgattcat

ANNEXE II

Tableau : Réactifs et conditions pour PCR de Bax

	Fragments 1-2	Fragment 3	Fragments 4-5
DMSO	-	-	-
PCR Buffer	1 X	1 X	1 X
MgCl ₂	2,25 mM	2,5 mM	2,25 mM
dNTP	200 µM	200 µM	100 µM
F Primer	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM
R Primer	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM
Taq platinum	1 U	1 U	1 U
ADN	2 µl	2 µl	2 µl
Volume total	20 µl	20 µl	20 µl
Activation de la Taq	95°C-3 min.	95°C-3 min.	95°C-3 min.
Dénaturation	94°C-30 sec	94°C-30 sec	94°C-30 sec
Appariement	57°C-30 sec	57°C-30 sec	57°C-30 sec
Élongation	72°C-45 sec	72°C-45 sec	72°C-45 sec
Nombre de cycles	40	40	40
Élongation finale	72°C-7 min	72°C-7 min	72°C-7 min

ANNEXE III

Tableau : Polymorphismes du gène BIM et détails du PCR et de l'hybridation par ASO

PCR					
Identité	Source du SNP	Fragment d'ADN	Taille pb	Amorces	Sondes pour l'ASO
-1946A/G	2241844	1	225	F1 : atgcgtgagccgctaagata, R1 :ctcattcaggccaaggttc	tcctgcaGagcaagc, tcctgcaAagcaagc
-1928G/T	2241843	1	—	—	ggcacagTccgcagg, ggcacagGccgcagg
-1894C/T	2241842	1	—	—	cctagatTtctcgct, cctagatCtctcgct
-1875A/G	4146118	1	—	—	tccaggtGgtcaggg, tccaggtAgtcaggg
-1842C/T	2241841	1	—	—	gttctgcTggccgcg, gttctgcCggccgcg
-1647C/G	41309780	2	249	F2: ggggtgtaattactcgatgg, R2: tggagacaaagcaggacttg	gcacgtgCgcgtccg, ggacgtgGgcgtccg
-1465C/G	6739756	2	—	—	ccctgcgGgtccggg, ccctgcgCgtccggg
-1025G/T	4302219	3	193	F3: gaggaggcggaggatgtt, R3: ctgaccgtcaccacgaaag	gctgctgGagccctc, gctgctgTagccctc
-709C/T	7602904	4	164	F4: cgtgagtttcggtgtgattg, R4: cgtgaggtgcacatctctaaa	tgtagacCttgcagg, tgtagacCttgcagg
-359-/G	35544509	5	167	F5: ctgacattttcggaac, R5: tctttcccaggacagactt	taaccccgggaagt, taaccccGgggaagt
298C/T	724710	6	159	F6: ttgttctgatgcagttcca, R6: gagggtgtgagcagaaaaagc	ggcgtatCggagacg, ggcgtatTggagacg
462A/G	10199276	7	244	F7: tgcattgacaggttctttgc R7: agcaaagaatgctccctct	ccatgcaGacatttt, ccatgcaAacatttt
517C/T	12996100	7	—	—	gtgcatTattatgc, gtgcatCattatga
557A/C	12989846	7	—	—	gcaggtgAcgtttca, gcaggtgCggtttca
1970A/G	13422314	8	201	F8: cagtcatttcagaggcagca, R8: tgggcaaaactagtgg	taaacaActtttaa, taaacaGcttttaa
2251A/T	6750142	9	168	F9: tctttcccagaatctcc, R9: ggtgtatgtgtgtccagca	tggagctcAGcttgttcc tggagctcATcttgttcc,
2252G/T	6753785	9	—	—	tggagctcTGcttgttcc, tggagctcTTcttgttcc

ANNEXE IV

Tableau : Réactifs et conditions pour PCR de Bim

	Fragments 1 et 7	Fragments 2 et 3	Fragments 4, 5 et 9	Fragments 6 et 8
DMSO	-	10%	-	-
PCR Buffer	1 X	1 X	1 X	1 X
MgCl ₂	2,25 mM	1,0 mM	2,5 mM	2,25 mM
dNTP	100 µM	200 µM	200 µM	200 µM
F Primer	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM
R Primer	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM
Taq platinum	1 U	1 U	1 U	1 U
ADN	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Volume total	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Activation de la Taq	95°C-3 min.	95°C-3 min.	95°C-3 min.	95°C-3 min.
Dénaturation	94°C-30 sec	94°C-40 sec	94°C-30 sec	94°C-30 sec
Appariement	57°C-30 sec	60°C-40 sec	57°C-30 sec	57°C-30 sec
Élongation	72°C-45 sec	72°C-50 sec	72°C-45 sec	72°C-45 sec
Nombre de cycles	40	40	40	40
Élongation finale	72°C-7 min	72°C-7 min	72°C-7 min	72°C-7 min