Université TOULOUSE III PAUL SABATIER

FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2017

2017 TOU3 2059

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

obtenu après soutenance

du Mémoire du DIPLÔME d'ÉTUDES SPÉCIALISÉES de BIOLOGIE MÉDICALE (conformément à l'article 25 de l'arrêté du 8 avril 2013 relatif au régime des études en vue du diplôme d'état de Docteur en Pharmacie)

présentée et soutenue publiquement par

Louis-Thomas DANNUS Le 27 Septembre 2017 à TOULOUSE

Pharmacogénomique des leucémies aiguës myéloïdes

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Eric DELABESSE

JURY

Président : Madame le Professeur Bettina COUDERC 1^{er} assesseur : Monsieur le Professeur Christian RECHER 2^{ème} assesseur : Monsieur le Professeur Eric DELABESSE 3^{ème} assesseur : Madame le Docteur Véronique DE MAS



PERSONNEL ENSEIGNANT de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier au 17 février 2017

Professeurs Emérites

- M. BENOIST H. M. BERNADOU J M. CAMPISTRON G. M. CHAVANT L. Mme FOURASTÉ I. M. MOULIS C. M. ROUGE P. M. SIÉ P.
- Immunologie Chimie Thérapeutique Physiologie Mycologie Pharmacognosie Pharmacognosie Biologie Cellulaire Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CHATELUT E. M. FAVRE G. M. HOUIN G. M. PARINI A. M. PASQUIER C. (Doyen) Mme ROQUES C. Mme ROUSSIN A. Mme SALLERIN B. M. VALENTIN A.

Pharmacologie Biochimie Pharmacologie Physiologie Bactériologie - Virologie Bactériologie - Virologie Pharmacologie Pharmacie Clinique Parasitologie Mme AYYOUB M. Mme BARRE A Mme BAZIARD G. Mme BENDERBOUS S. Mme BERNARDES-GÉNISSON V. Mme COUDERC B. M. CUSSAC D. (Vice-Doyen) Mme DOISNEAU-SIXOU S. M. FABRE N. M. GAIRIN J-E. Mme GIROD-FULLANA S. Mme MULLER-STAUMONT C. Mme NEPVEU F. M. SALLES B. M. SÉGUI B. M. SOUCHARD J-P. Mme TABOULET F. M. VERHAEGHE P.

Universitaires

Immunologie Biologie Chimie pharmaceutique Mathématiques - Biostat. Chimie thérapeutique Biochimie Physiologie Biochimie Pharmacognosie Pharmacologie Pharmacie Galénique Toxicologie - Sémiologie Chimie analytique Toxicologie **Biologie Cellulaire** Chimie analytique Droit Pharmaceutique Chimie Thérapeutique

PERSONNEL ENSEIGNANT de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier (version du 17 février 2017

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CESTAC P.

Mme DE MAS MANSAT V. (*) Mme GANDIA-MAILLY P. (*) Mme JUILLARD-CONDAT B. M. PUISSET F. Mme ROUZAUD-LABORDE C. Mme SÉRONIE-VIVIEN S. Mme THOMAS F. (*) Pharmacie Clinique Hématologie Pharmacologie Droit Pharmaceutique Pharmacie Clinique Pharmacie Clinique Biochimie Pharmacologie Mme ARÉLLANO C. (*) Mme AUTHIER H. M. BERGÉ M. (*) Mme BON C. M. BOUAJILA J. (*) Mme BOUTET E. (*) M. BROUILLET F. Mme CABOU C. Mme CAZALBOU S. (*) Mme CHAPUY-REGAUD S. Mme COLACIOS-VIATGE C. Mme COSTE A. (*) M. DELCOURT N. Mme DERAEVE C. Mme ÉCHINARD-DOUIN V. Mme EL GARAH F. Mme EL HAGE S. Mme FALLONE F. Mme FERNANDEZ-VIDAL A. Mme HALOVA-LAJOIE B. Mme JOUANJUS E. Mme LAJOIE-MAZENC I. Mme LEFEVRE L. Mme LE LAMER A-C. M. LEMARIE A. M. MARTIG. Mme MIREY G. (*) Mme MONFERRAN S. M. OLICHON A. PEM. PERE D. Mme PORTHE G. Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*) M. SAINTE-MARIE Y. M. STIGLIANI J-L. M. SUDOR J. (*) Mme TERRISSE A-D. Mme TOURRETTE A. Mme VANSTEELANDT M. Mme WHITE-KONING M. (*)

Universitaires

Chimie Thérapeutique Parasitologie Bactériologie - Virologie Biophysique Chimie analytique Toxicologie - Sémiologie Pharmacie Galénique Physiologie Pharmacie Galénique Bactériologie - Virologie Immunologie Parasitologie Biochimie Chimie Thérapeutique Physiologie Chimie Pharmaceutique Chimie Pharmaceutique Toxicologie Toxicologie Chimie Pharmaceutique Pharmacologie Biochimie Physiologie Pharmacognosie **Biochimie** Pharmacognosie Toxicologie Biochimie Biochimie Pharmacognosie Immunologie Chimie Analytique Physiologie Chimie Pharmaceutique Chimie Analytique Hématologie Pharmacie Galénique Pharmacognosie Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme COOL C. Mme FONTAN C. Mme KELLER L. Mme PALUDETTO M.N. M. PÉRES M. Mme ROUCH L. Physiologie Biophysique Biochimie Chimie thérapeutique Immunologie Pharmacie Clinique

PERSONNEL ENSEIGNANT de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier (version du 17 février 2017

Remerciements

Je tiens à remercier :

Madame le Professeur Bettina Couderc,

Pour l'honneur que vous me faites en acceptant la présidence de mon jury de thèse. Merci pour la qualité de votre enseignement de la biologie moléculaire au cours de ces années à la faculté. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Christian Recher,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être membre de ce jury et d'y apporter votre regard de clinicien. Soyez assuré de ma plus profonde considération.

Monsieur le Professeur Eric Delabesse,

Pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Merci pour votre disponibilité et votre aide précieuse tout au long de ce travail ainsi que de la confiance que vous m'avez accordée. Merci pour vos conseils, votre accessibilité et votre rigueur. Soyez assuré de ma gratitude et de ma reconnaissance.

Madame le Docteur Véronique De Mas,

Merci pour tout ce que tu m'as apporté durant ces années d'internat et pour ta gentillesse au quotidien. Je te remercie vivement d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également Naïs Prade et Stéphanie Lagarde, ingénieurs hospitaliers, pour leur contribution à ce travail. Votre disponibilité et votre patience auront été précieuses pour moi.

Merci à toute l'équipe du laboratoire d'hématologie du CHU de Toulouse, pour tout ce que vous m'avez appris durant ces années. Merci d'avoir contribué à faire de l'hématologie ma vocation. Un remerciement particulier à JB pour ton soutien sans faille.

A mes parents et à ma famille, pour votre affection et votre soutien permanents.

A mes amis de longue date Robin, Bastien, Marion, Denis, Anthony, Kalou, Thomas. Je ne serais pas le même sans vous.

A mes amis que l'internat m'a permis de rencontrer, Elo, Jules, le caporal Janin, le Pr Lakhdar, Juju, Camille, Quentin. Pour tous les bons moments partagés et pour tous ceux à venir.

A tous ceux que j'ai eu la chance de côtoyer au cours de mon internat : Jérôme, Brungsy, Audrey, Martial, Camille, Etienne, Greg, Tiphaine, Romain, Inès, PY, JK alias Thomas Müller, Cédric, Morgane, Manu, Marion, Jeannot, Agnès et tous les autres... Merci pour tous ces bons moments partagés.

Liste des abréviations

- 6-Me-8-OH-MP: 6-Méthylmercapto-8-Hydroxypurine
- 6-MP: 6-Mercaptopurine
- 6-MMP: 6-MéthylMercaptoPurine
- 6-TG: 6-Thioguanine
- 6-TGN : 6-ThioGuanine Nucléotides
- 6-TIMP : 6-ThioInosine MonoPhosphate
- ABC : ATP binding cassette
- ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- AMM : Autorisation de mise sur le marché
- Ara-C : Cytarabine
- ARN : Acide RiboNucléique
- AVK : Anti-Vitamine K
- BCRP : Breast Cancer Resistance Protein
- **CBF** : Core binding factor
- CDA : Cytidine Désaminase
- CIVD : Coagulation intra-vasculaire disséminée
- CMPK1 : Cytidine monophosphate kinase 1
- CBR : Carbonyl réductase
- CSH : Cellules souches hématopoïétiques
- CTPS : Cytidine 5-triphosphate synthétase
- CYP : Cytochrome P
- dCTP : Désoxycytydine triphosphate
- dCK : Désoxycytidine kinase
- DCTD : Deoxycytidylate deaminase
- ddNTP : Didésoxyribonucléotide
- **DNR**: Daunorubicine
- EFS : Event Free Survival
- ELN : European Leukemia Net
- FDA : Food ans Drug Administration
- **GIT** : G-protein-coupled receptor kinase interactor
- GO: Gemtuzumab ozogamicine

GST : Glutathion S-Transférase

hENT1 : Human equilibrative nucleoside transporter 1

- HLA: Human Leukocyte Antigen
- HPRT : Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase
- **INR :** International Normalized Ratio
- LAL : Leucémie aigue lymphoïde
- LAM : Leucémie aigue myéloïde
- MAF : Minor allele frequency
- MDA : Malondialdéhyde
- MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
- MRD : Maladie résiduelle
- NBD : Nucleotide Binding Domain
- NGS : Next Generation Sequencing
- NT5C2: 5' Nucléotidase
- **OCT1**: Organic cationic transporter 1
- **OS**: Overall Survival
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- **PDGF** : Platelet Derived Growth Factor
- PPAT : Phosphoribosyl-Pyrophosphate AmidoTransférase
- **PRPP**: PhosphoRibosylPyroPhosphate
- RAD51AP1 : RAD5 Associated protein1
- **ROS** : Reactive Oxygen Species
- **RRM**: Ribonucléotide Réductase
- SAM : S-Adénosyl-Méthionine
- SAMHD1 : SAM and HD domain containing deoxynucleoside triphosphate

triphosphohydrolase

- SOD : Superoxyde dismutase
- TMD : Transmembranary Domain
- TPMT : Thiopurine méthyltransférase
- VKORC1 : Vitamine K époxyde réductase 1
- WT: Wild type
- XO: Xanthine Oxydase

Liste des figures

- Figure 1 : Incidence des LAM Figure 2 : Pronostic des LAM selon leur caryotype Figure 3 : Structure de la déoxycytidine et de la cytarabine Figure 4 : Métabolisme cellulaire de l'Ara-C et de la 2'déoxycytidine Figure 5 : Structure moléculaire de la daunorubicine Figure 6 : Mécanisme de perturbation de l'action de la topoisomérase II Figure 7 : Mécanismes d'action de la DNR Figure 8 : Structure chimique de la purine et des bases puriques Figure 9 : Cycle de carboxylation vitamine K dépendant Figure 10 : Préparation de la librairie d'ADN à séquencer Figure 11 : Principe du séquençage Illumina Figure 12 : Schéma thérapeutique du protocole CBF2006 Figure 13 : Schéma thérapeutique du protocole LAM2006IR Figure 14 : Survie globale (A.) et survie sans événement (B.) des patients mutés et sauvages pour le polymorphisme rs2125739 de l'ABCC10 Figure 15 : Survie globale (A.) et survie sans événement (B.) des patients mutés et sauvages pour le polymorphisme rs2231142 de l'ABCG2 Figure 16 : Survie globale (A.) et survie sans événement (B.) des patients mutés et sauvages pour le polymorphisme rs1130609 de la RRM2 Figure 17 : Survie globale (A. wt/wt vs wt/var et var/var) (B. wt/wt vs wt/var vs var/var) des 173 patients CBF pour le polymorphisme rs2125739 de l'ABCC10. Figure 18 : Survie globale (A. wt/wt vs wt/var et var/var) (B. wt/wt vs wt/var vs var/var) des 173 patients CBF pour le polymorphisme rs1130609 de la RRM2. Figure 19 : Survie globale (wt/wt vs wt/var et var/var) des 172 patients CBF pour le polymorphisme rs2231142 de l'ABCG2. Figure 20 : Survie globale (A. wt/wt vs wt/var et var/var) (B. wt/wt vs wt/var vs var/var) et sans événement (C. wt/wt vs wt/var et var/var) (D. wt/wt vs wt/var vs var/var) des 272 patients LAM2006IR pour le polymorphisme rs2125739 de l'ABCC10. Figure 21 : Survie globale (A. wt/wt vs wt/var et var/var) (B. wt/wt vs wt/var vs var/var) et sans événement (C. wt/wt vs wt/var et var/var) (D. wt/wt vs wt/var vs var/var) des 270 patients LAM2006IR pour le polymorphisme rs1130609 de la RRM2. Figure 22 : Survie globale (A. wt/wt vs wt/var) et sans événement (B. wt/wt vs wt/var) des 272 patients LAM2006IR pour le polymorphisme rs2231142 de l'ABCG2.
- Figure 23 : Schémas simplifiés des protocoles thérapeutiques CBF2006 (A.) et LAM2006IR (B.)
- Figure 24 : Mécanisme de fonctionnement d'un ABC transporteur
- Figure 25 : Mécanismes de résistance aux anthracyclines

Table des matières

Liste des abréviations	2
Liste des figures	8
Table des matières	9
Introduction et objectifs	11
GENERALITES	13
1. Les LAM	13
1.1 Epidémiologie	13
1.2 Données clinico-biologiques	14
1.3 Prise en charge des LAM	16
2. Chimiothérapie des LAM	19
2.1 La Cytarabine	19
2.2 La Daunorubicine	22
3. Pharmacogénomique	26
3.1 Variants génétiques de TPMT et thiopurines	26
3.2 Variants génétiques de VKORC1 et anti-vitamine K	29
MATERIELS ET METHODES	32
1. Sélection des variants fréquents de structure	32
2. Génotypage par séquençage de nouvelle génération (N	NGS, Next
Generation Sequencing)	34
3. Statistiques	37
RESULTATS	
1. Protocole CBF2006	38
2. Protocole LAM2006IR	40
3. Analyse initiale des 29 SNP	44
3.1 Réponse moléculaire CBFB-MYH11	45
3.2 Survie globale	64
4. Analyses de validation des 3 SNP	66

4.1 Protocole CBF2006	
4.2 LAM2006IR	71
DISCUSSION	74
1. Analyse des protocoles CBF2006 et LAM2006IR	75
2. Cytarabine : variant de structure, surexpression	77
3. Daunorubicine : variant de structure, surexpression	83
4. Limites de l'étude	85
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	
Bibliographie	
Annexes	

Introduction et objectifs

Les leucémies aiguës myéloïdes affectent environ 3000 patients par an en France. Leur fréquence augmente progressivement avec l'âge, l'incidence passant de 2 pour 100.000 à l'âge de 50 ans, à 18 pour 100.000 à l'âge de 70 ans¹. Leur traitement repose principalement sur l'utilisation de deux médicaments, la Cytarabine (AraC, 1- β -arabinofuranosylcytosine) associée à une anthracycline comme la Daunorubicine (DNR).

Longtemps utilisées en monothérapie, ces deux molécules furent combinées dans les années 1970². La combinaison de 3 jours de DNR 45 mg/m² et d'AraC 100 mg/m² pendant 7 jours se révélant la plus efficace. Elle conduit à une rémission complète de 40 à 60% des LAM du sujet âgé et de 60 à 80% des LAM du sujet jeune³. L'AraC est un analogue nucléosidique qui, après passage intracellulaire, subit plusieurs phosphorylations afin de conduire à sa forme active 5'-triphosphate (AraCTP). L'incorporation de l'AraCTP dans l'ADN en compétition avec la désoxycytidine triphosphate (dCTP) aboutit à l'arrêt de l'élongation des acides nucléiques bloquant les synthèses d'ADN et d'ARN. La concentration d'AraCTP intracellulaire est associée à l'efficacité de l'AraC. La DNR appartient à la famille des anthracyclines, dont le mécanisme d'action fait appel à une intercalation de l'ADN, un blocage de réplication de l'ADN par stabilisation et inhibition de la topoisomérase II et à la production de dérivés oxygénés réactifs issus de la partie quinone des anthracyclines.

L'étude pharmacogénomique présentée ici cherche à évaluer l'impact de variants de structure des protéines participant au métabolisme de ces 2 drogues. Elle a été menée sur les blastes des patients inclus dans les protocoles CBF2006 (patients possédant un pronostic cytogénétique favorable), et LAM2006IR (patients possédant un pronostic cytogénétique intermédiaire).

Dans un premier temps, 29 variants fréquents de structure (variants ayant une fréquence de l'allèle minoritaire supérieure à 0,1) des gènes des principales protéines pouvant influencer la réponse au traitement ont été évalués chez 70 patients du bras CBFB-MYH11 du protocole CBF2006. Ce protocole ayant pour

objectif de comparer deux schémas thérapeutiques d'induction dans un groupe de LAM favorables possédant soit une translocation t(8;21) (fusion RUNX1-RUNX1T1), soit une inversion péricentrique du chromosome 16 (inv16), ou une translocation entre les 2 chromosomes 16 t(16;16) (fusion CBFB-MYH11). Outre les indicateurs classiques de survie, le protocole évaluait la maladie résiduelle moléculaire de manière répétée à l'issue de chaque bloc thérapeutique. Ceci permet ainsi d'utiliser cette maladie résiduelle comme « biomarqueur » de la réponse thérapeutique, en comparaison de la survie, afin d'évaluer l'efficacité directe des médicaments (la survie combinant d'autres facteurs comme la greffe ou les soins de support).

Dans un deuxième temps, notre étude a été étendue à l'intégralité des patients inclus dans le protocole CBF2006 ainsi que sur des patients provenant du protocole LAM2006IR en ciblant l'analyse sur 3 variants identifiés au cours de la 1^{ère} phase. Le critère de réponse porte sur l'évaluation de la maladie résiduelle et la survie. L'objectif étant de confirmer les résultats préalables sur un groupe de patients étendu et hétérogène en terme de pronostic.

GENERALITES

1. Les LAM

1.1 Epidémiologie

Les leucémies aiguës myéloïdes sont des affections définies par la présence de plus de 20% de blastes myéloïdes (cellules myéloïdes immatures) dans la moelle osseuse ou le sang⁴.

Il s'agit d'une pathologie rare (d'incidence 3,9 cas pour 100.000 habitants chez les hommes, 3,4 cas pour 100.000 habitants chez les femmes) touchant essentiellement les sujets âgés (médiane au diagnostic 71 ans)¹ (figure 1A). Il existe une grande disparité de pronostic selon les âges. En effet, un observatoire européen portant sur la période 2000-2002 estime la survie à 5 ans à environ 17%, celle des plus jeunes (15-49 ans) atteignait 47%, alors qu'elle n'était que de 15% chez les 50-69 ans, et de 2,7% chez les plus de 70 ans⁵.

Le pronostic de cette pathologie reste donc très sombre et bien que l'on observe une amélioration du pronostic des LAM depuis 1980, une disparité persiste selon les âges puisqu'en effet cette amélioration du pronostic (principalement liée aux soins de support et aux antifongiques) a surtout concerné les patients jeunes (figure 1B)⁶.

A







A : Incidence des LAM en France en 2012. (données INVS et INCa)

B : Survie à 10 ans de patients LAM par groupe d'âge. Les périodes estimées sont 1980-84 (trait plein) et 2000-04 (pointillés)

1.2 Données clinico-biologiques

La présentation clinique résulte de deux conséquences de la maladie : l'insuffisance médullaire et le syndrome tumoral dû à la prolifération blastique. Les signes liés à l'insuffisance médullaire sont les conséquences des cytopénies d'installation rapide avec :

- Un syndrome anémique souvent mal toléré ;
- Un syndrome infectieux en rapport avec la neutropénie touchant souvent la sphère ORL ;
- Un syndrome hémorragique cutané ou muqueux, conséquence de la thrombopénie, avec parfois une CIVD.

Les signes tumoraux sont inconstants avec :

- Des localisations cutanées sous formes de leucémides (LA monoblastiques);
- Des hyperplasies gingivales (LA monoblastiques) ;
- Une leucostase lorsque l'hyperleucocytose est majeure (>100 G/L) pouvant se traduire par une détresse respiratoire ;
- Une splénomégalie dans environ 15 à 20% des cas.

peut retrouver une anémie normo- ou modérément L'hémogramme macrocytaire, parfois sévère, une thrombopénie, une neutropénie ainsi que des blastes circulants sur le frottis sanguin qui peuvent parfois être rares, voire absents. La ponction médullaire permet un examen cytologique (myélogramme) ainsi que la réalisation de techniques complémentaires⁷. Le myélogramme est l'examen clé du diagnostic (identifiant plus de 20% de blastes). Des critères morphologiques permettront de différencier les blastes lymphoïdes des myéloïdes. Les blastes myéloïdes seront, le plus souvent de plus grande taille, à chromatine fine, avec un rapport nucléo-cytoplasmique faible à modéré et possédent des granulations cytoplasmiques, voire des corps d'Auer (bâtonnets azurophiles pathognomoniques du caractère myéloïde de la cellule leucémique). L'immunophénotypage par cytométrie en flux évalue l'expression de divers antigènes membranaires ou intracytoplasmiques, il permet de confirmer le diagnostic de LAM et d'évaluer l'existence sur les blastes de profils antigéniques particuliers permettant la recherche d'une maladie résiduelle. La cytogénétique via l'étude du caryotype est indispensable au diagnostic, la classification OMS utilisant ce résultat du fait de son caractère pronostique⁸. Enfin, la recherche d'anomalies moléculaires a un intérêt pronostique et permet le suivi de la maladie résiduelle après traitement.

La classification OMS 2016 regroupe les LAM en 4 grandes catégories : les LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes, les LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies, les LAM secondaires aux traitements et les LAM sans autre spécification. Cette dernière entité reprend les caractéristiques morphologiques de la classification FAB de 1976.

Le pronostic des LAM dépend d'un certain nombre de facteurs dont les plus significatifs sont l'âge (mauvais pronostic après 60 ans), la leucocytose, l'existence de comorbidités, la réponse au traitement d'induction, les critères cytogénétiques⁹ et moléculaires. L'examen cytogénétique définit trois groupes pronostiques : les LAM de bon pronostic, de pronostic intermédiaire et de mauvais pronostic (figure 2).



Figure 2: Pronostic des LAM selon leur caryotype (d'après Grimwade *et al,* Blood 2010⁹)

1.3 Prise en charge des LAM

La base du traitement des LAM repose sur une polychimiothérapie intensive en plusieurs phases. Le traitement d'induction a pour objectif la rémission complète. Le traitement de consolidation a pour objectif de prévenir la rechute, il débute après la rémission complète clinique et biologique. Le traitement d'entretien, réalisé en ambulatoire, peut ne pas être nécessaire, notamment en cas de greffe de CSH.

La rémission complète, est définie par¹⁰ :

- L'amélioration de l'hémogramme (absence de blastes circulants, nombre de polynucléaires > 1 G/L, nombre de plaquettes > 100 G/L);
- Un frottis médullaire riche (comportant moins de 5 % de cellules blastiques et ne contenant pas de corps d'Auer);
- La disparition de tous les autres signes de la maladie et l'indépendance transfusionnelle.

En dehors des LAM promyélocytaires, dont la chimiothérapie d'induction spécifique inclura l'acide tout trans rétinoïque (ATRA), le protocole de référence de la chimiothérapie d'induction associe une anthracycline et la cytarabine¹¹ selon un schéma 7+3 avec 7 jours de perfusion continue de cytarabine et de la daunorubicine des jours 1 à 3.

Quatre grandes études ont évalué une augmentation des doses de daunorubicine^{12,13,14,15}. L'étude de l'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)¹² inclut des patients de moins de 60 ans, alors que l'étude HOVON-SAKK-AMLSG¹³ inclut des patients de plus de 60 ans. Elles se proposent de comparer une induction 7+3 comprenant un bras avec 45 mg/m2 de daunorubicine et un bras avec 90 mg/m². La population jeune de l'étude ECOG voit son OS significativement prolongé par la double dose de daunorubicine, ainsi qu'un meilleur taux de réponse complète, pour une toxicité identique. En ce qui concerne la population âgée de l'étude HOVON-SAKK-AMLSG, bien que le taux de réponse complète soit meilleur chez les patients ayant reçu la double dose, le bénéfice sur l'OS n'est visible que pour les patients entre 60 et 65 ans et pour les patients ayant une LAM CBF (la toxicité de la double dose étant identique à la simple dose). Une étude coréenne¹⁴ menée sur 383 patients de 15 à 60 ans est concordante en terme de résultats avec l'étude ECOG. L'étude NCRI AML 17¹⁵ a quant à elle comparé chez 1206 patients âgés de 16 à 72 ans, 60 et 90 mg/m² de daunorubicine en traitement d'induction. Non seulement I'EFS et I'OS sont identiques dans les deux bras mais on observe une augmentation de la mortalité précoce dans le bras daunorubicine 90 mg/m². Il semble donc qu'une augmentation des doses de daunorubicine lors du traitement d'induction puisse bénéficier aux patients jeunes.

En ce qui concerne la cytarabine, deux études historiques^{16,17} n'ont pu démontrer la supériorité d'une augmentation de dose au moment de l'induction, elles ont même rapporté une augmentation de la toxicité du médicament.

De nouvelles stratégies d'induction des LAM ont vu le jour au fil du temps, parmi elles, on peut citer l'adjonction d'une 3^{ème} molécule à la cytarabine et à la daunorubicine. Une des plus étudiées est le Gemtuzumab-ozogamicine, un anti-CD33 couplé à un agent toxique, la calichéamicine. Il a été démontré que cette molécule, à la dose de 3 mg/m² pouvait apporter un bénéfice aux patients possédant un caryotype de bon pronostic, de pronostic intermédiaire ainsi que les patients possédant une mutation FLT3-ITD mais pas à ceux ayant un caryotype défavorable¹⁸. Cependant, après avoir été approuvé par la Food and Drug Administration dans la LAM du sujet âgé, un excès de toxicité hépatique a entraîné le retrait de son AMM aux Etats-Unis. Parmi les autres molécules ayant été testées en induction, on peut citer le sorafénib, un inhibiteur multikinases, qui, combiné à la cytarabine et à la daunorubicine chez le patient âgé ne semble pas montrer de bénéfice significatif en termes d'EFS et d'OS¹⁹.

L'étape de consolidation pour les patients jeunes ayant obtenu une rémission après l'induction peut se résumer en deux grandes stratégies, d'une part plusieurs cycles de cytarabine hautes doses (jusqu'à 3 g/m²)²⁰, d'autre part la greffe allogénique de cellules souches. La décision de greffer les patients en consolidation de LAM est à évaluer individuellement selon le rapport bénéfice/risque que peut apporter cette greffe. Elle reste à ce jour le meilleur moyen de prévenir la rechute mais est associée avec une plus grande morbi-mortalité liée au traitement. De manière générale, tout patient jeune se trouvant dans le groupe de pronostic intermédiaire ou défavorable doit être considéré comme susceptible d'être greffé²¹. De plus, le conditionnement atténué²², se basant sur un traitement moins intense que le traitement myélo-ablatif utilisé généralement dans le conditionnement des greffes de cellules souches allogéniques, est de plus en plus proposé. Il utilise le principe de l'effet anti-tumoral et immunologique du greffon (effet GVL - Graft Versus Leukemia). Il va s'ensuivre un chimérisme mixte, c'est-à-dire une coexistence des cellules malades du patient avec le greffon du donneur. Puis progressivement, les lymphocytes du greffon vont prendre le dessus et éliminer les cellules délétères du malade. Son principal intérêt est de pouvoir greffer des patients plus âgés par rapport à un conditionnement myélo-ablatif.

Chez les patients âgés, la tolérance d'une chimiothérapie intensive est moindre, du fait de comorbidités fréquentes et d'une plus grande susceptibilité à développer des infections. De plus, ces patients ont souvent des LAM de moins bon pronostic du fait de la fréquence augmentée de LAM secondaires aux myélodysplasies. Il semble toutefois que les LAM de bon pronostic du sujet âgé selon la classification de l'ELN puissent bénéficier d'un traitement standard. Chez les patients ne pouvant pas en bénéficier, un traitement par des doses faibles de cytarabine ou par agents déméthylants (azacytidine) peut-être proposé²³. Il semble que les agents déméthylants démontrent une supériorité sur les doses faibles d'Ara-C²⁴.

2. Chimiothérapie des LAM

2.1 La cytarabine

La cytarabine ou cytosine arabinoside (1- β -D-arabinofuranosylcytosine, Ara-C) est un anti-métabolite anti-pyrimidique faisant partie de la famille des analogues nucléosidiques. Il s'agit d'un analogue de la 2'-déoxycytidine qui diffère structuralement de son homologue grâce à l'ajout d'un groupement hydroxyl²⁵ en position trans sur la cytarabine. Ce groupement en 2'-trans change la conformation dans l'espace de la molécule et est probablement responsable de l'interaction entre le 1- β -D-arabinofuranosylcytosine triphosphate (Ara-CTP) et l'ADN polymérase α^{26} .



Figure 3 : Structure de la déoxycytidine et de la cytarabine

Le passage de l'Ara-C à travers les membranes cellulaires dépend de sa concentration plasmatique. A haute concentration, il se fait par diffusion passive, facilitée dans le sens du gradient de concentration, tandis qu'à faible concentration, il fait intervenir un transporteur actif²⁷ hENT1/ SLC29A1. L'Ara-C est une prodrogue, ayant besoin d'être convertie en son dérivé l'Ara-CTP afin d'exercer son pouvoir cytoxique²⁸. Après passage membranaire, il est converti en dérivé nucléotidique par la désoxycytidine kinase (dCK). Après deux phosphorylations successives par une monophosphate et une diphosphate kinase, l'Ara-C est convertie en sa forme active : Ara-CTP.

L'Ara-CTP inhibe l'ADN polymérase α (POLA) et β (POLB) et est incorporé au sein du brin d'ADN en élongation afin de bloquer cette dernière²⁹. L'efficacité de l'Ara-C est conditionnée de façon physiologique par des enzymes de dégradation : la cytidine désaminase (CDA) et la désocytidilate désaminase (DCTD) qui convertissent respectivement l'Ara-C et l'Ara-CMP en dérivés Ara-U et Ara-UMP inactifs ainsi que par la 5'nucléotidase (NT5C), capable de déphosphoryler l'Ara-CMP en Ara-C. De plus, des voies de rétrocontrôle cellulaire existent afin de réguler la formation d'Ara-CTP, la plus importante étant la présence de dCTP qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la déoxycytidine kinase (DCK), enzyme constituant l'étape limitante dans la formation du dérivé actif³⁰. Les taux de dCTP sont régulés par la ribonucléotide réductase (RRM1/RRM2) qui est responsable de la transformation de CTP en dCTP. A contrario, le dTTP exerce un rétrocontrôle positif puissant sur cette enzyme. Il est à noter que les taux de dCK décroissent avec la maturation des cellules³¹. Les conversions de l'Ara-CMP en Ara-CTP par les enzymes de faible affinité dCMP kinase (CMPK1) et dCDP kinase (NME1) ne sont pas des étapes limitantes de par leur relative abondance cellulaire.

D'autres protéines conditionnent l'efficacité de l'Ara-C :

- CTPS1 (Cytidine 5-triphosphate synthétase), enzyme responsable de la conversion de l'UTP en CTP et donc impliquée dans la synthèse de novo de CTP ;
- CTPS2 codant pour la CTP synthetase II, catalysant le même type de réaction;

- GIT1³² protéine d'échafaudage impliquée dans divers processus notamment dans la régulation de cascades de signalisation intra-cellulaire ;
- Des transporteurs d'efflux tels que ABCC10 et ABCC11.

Les mécanismes par lesquels l'Ara-CTP exerce sa toxicité sont multiples :

- Inhibition des ADN polymérases α et $\beta^{28,33}$;
- Incorporation à l'ADN en compétition avec le dCTP³⁴ ;
- Induction de l'apoptose et production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)³⁵;
- Perturbation de la synthèse des lipides et glycoprotéines membranaires³⁶.



Figure 4 : Métabolisme cellulaire de l'Ara-C et de la 2'déoxycytidine (d'après Lamba.)

Après administration IV, la disparition plasmatique est biphasique, avec, une demi-vie d'élimination initiale ($T_{1/2A}$:10min), suivie d'une deuxième phase d'élimination plus lente ($T_{1/2B}$:3h). La cytarabine diffuse dans le SNC, la rate, la salive, les larmes, le tube digestif, le thymus, la moelle osseuse. L'élimination est essentiellement urinaire, après 24h, 80% du produit est retrouvé dans les urines. Cette excrétion urinaire se fait essentiellement sous forme d'Ara-U.

2.2 La daunorubicine

Les anthracyclines sont une famille de médicaments anticancéreux d'origine naturelle. En 1963, Di Marco détecte une activité antitumorale à une nouvelle classe d'antibiotiques sur un modèle murin³⁷. La daunorubicine est la première molécule de cette famille suivie peu de temps après par la doxorubicine. Les anthracyclines ont pour structure commune un noyau polyaromatique tétracyclique (aglycone) attaché à un amino-sucre, la daunosamine par liaison glycosidique. Tous les agents de cette classe possèdent une structure quinone et hydroquinone, ce qui leur permet d'agir comme donneur et accepteur d'électrons.

Bien que l'activité antitumorale de cette molécule soit connue depuis plus de 50 ans, les connaissances pharmacodynamiques la concernant demeurent incomplètes. Ce n'est qu'en 2016, qu'a été démontré le rôle de l'OCT1, un transporteur cationique membranaire dans le passage intracellulaire de la daunorubicine³⁸. Il en va de même pour ses mécanismes d'actions qui ne sont pas tous élucidés à ce jour.



Figure 5 : Structure moléculaire de la daunorubicine

Parmi ses principaux mécanismes d'actions, on peut citer :

- L'intercalation dans la molécule d'ADN ;
- L'inhibition de la topoisomérase II ;
- L'induction de l'apoptose ;
- La production de ROS.

L'intercalation dans l'ADN se produit au niveau de zones riches en GC de par la formation de liaisons hydrogènes spécifiques entre la guanine et l'anthracycline³⁹. Cette intercalation résulte de l'insertion de la structure plane tétracyclique entre des bases d'ADN adjacentes, stabilisée par des interactions électrostatiques entre le groupement phosphate de l'ADN et le groupement amine chargé positivement de l'anthracycline⁴⁰. Il a été démontré que la formation de complexe anthracycline-ADN induit des dommages à l'ADN indépendamment de l'activité exercée sur la topoisomérase II, notamment via une activation des phénomènes d'apoptose⁴¹.



Figure 6 : Mécanisme de perturbation de l'action de la topoisomérase II (d'après Beretta et al.). A. Complexe topoisomérase II-ADN. B. La molécule stabilise le complexe C. Collision avec la fourche de réplication D. Lésions irréversibles de l'ADN

Les topoisomérases sont des enzymes contrôlant la structure topologique de l'ADN permettant de lui ajouter ou enlever des supertours, leur mécanisme passe par une liaison réversible à l'ADN. Elles jouent un rôle essentiel notamment dans les processus de réplication, transcription, séparation des chromosomes, etc. L'inhibition de la topoisomérase II passe par la formation d'un complexe ternaire ADNanthracycline-enzyme. La stabilisation du complexe clivable formé entre l'enzyme et l'ADN est responsable de dommages irréversibles après collision avec la fourche de réplication (figure 6).

L'implication de la production de ROS dans le mécanisme d'action de la daunorubicine est sujette à débat⁴² (Les études ayant tenté de démontrer leur implication utilisent les anthracyclines à des doses au-delà de celles utilisées usuellement en thérapeutique). La partie quinone de l'anthracycline peut être réduite en forme hydroguinone. Elle forme des radicaux libres semi-guinones pouvant réduire l'oxygène et ainsi produire des anions superoxydes et d'autres ROS dont le peroxyde d'hydrogène et des radicaux hydroxyl. Ces espèces réactives sont susceptibles d'induire des dommages sur l'ADN et contribuer à la peroxydation lipidique pouvant conduire à la formation de malondialdéhyde (MDA). Le MDA peut avec le groupement amine exocyclique de la désoxyguanosine, réagir désoxyadénosine et désoxycytidine afin de former des produits alkylés⁴³. Dans des cellules en prolifération, la formation de complexes MDA-ADN est responsable d'un arrêt du cycle cellulaire⁴⁴.



Figure 7 : Mécanismes d'action de la DNR (d'après Beretta et al.).

La détoxification de la daunorubicine fait également intervenir des carbonyl réductases notamment CBR1 et CBR3. Le principal métabolite formé est le daunorubicinol qui possède une activité négligeable comparée à celle de la DNR⁴⁵.

Après injection IV, le médicament a une demi-vie plasmatique biphasique (40min et 45-55h). Son métabolisme est hépatique, son excrétion est majoritairement urinaire sous forme de métabolites inactifs.

Il est important de signaler qu'il existe une toxicité cardiaque spécifique aux anthracyclines. La formation de radicaux libres est déterminante car les cellules myocardiques sont riches en mitochondries et donc sensibles à la peroxydation des lipides de la membrane mitochondriale et pauvres en enzymes de détoxification des ROS telles que superoxyde dismutase (SOD1-3) et catalase (CAT)⁴⁶. De plus, le doxorubicinol, est toxique pour le cœur en raison de son activité sur la pompe à calcium du sarcoplasme.

3. Pharmacogénomique

La pharmacogénomique étudie les relations entre des variations génétiques (ADN, ARN) et la réponse aux médicaments⁴⁷. Elle a pour but d'arriver à dépister des personnes susceptibles de développer une réponse anormale à des traitements, aussi bien en ce qui concerne l'efficacité que la toxicité. Elle vise à une optimisation thérapeutique individuelle en vue de l'amélioration de la balance bénéfice/risque du traitement. Dans ce chapitre, nous allons voir à travers deux exemples quelles peuvent être les applications de la pharmacogénomique.

3.1 Variants génétiques de TPMT et thiopurines

La thiopurine S-méthyltransférase (TPMT) est une enzyme cytosolique qui catalyse la méthylation des cycles aromatiques, plus particulièrement des thiopurines, en utilisant la S-adénosyl L-méthionine (SAM) comme donneur de méthyle.

La classe pharmacologique des thiopurines est actuellement représentée par trois médicaments : la 6-mercaptopurine (6-MP, Purinethol[®]), l'azathioprine (Imurel[®]) et la 6-thioguanine (6-TG, Lanvis[®]). Elles possèdent une structure chimique dérivée de la purine qui sera à l'origine des bases puriques : l'adénine et la guanine.



Figure 8 : Structure chimique de la purine et des bases puriques

La 6-MP et la 6-TG sont notamment utilisées dans le traitement des LA. L'azathioprine est utilisée de par ses propriétés immunosuppressives dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), de la maladie de Cröhn et de la rectocolite hémorragique. Elle est également utilisée dans le traitement de maladies auto-immunes et dans la prévention du rejet de greffe d'organes solides.

Les thioguanines sont des prodrogues, actives sous forme de nucléotides, c'està-dire après ajout d'un ribose et de 3 phosphates. Elles agissent selon 3 mécanismes. Le premier est l'inhibition de la phosphoribosyl-pyrophosphate amidotransférase (PPAT), bloquant le passage du phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) au 5-phosphoribosylamine et entraînant une inhibition de la synthèse de novo des purines⁴⁸. Le second est l'incorporation au sein de l'ADN et l'ARN entraînant un arrêt de la réplication cellulaire⁴⁹. Le troisième est plus complexe et implique le phénomène d'apoptose⁵⁰.

Les thioguanines sont rapidement absorbées au niveau intestinal. L'azathioprine subit une hydrolyse rapide et est convertie en 6-MP et en méthylnitroimidazole par des glutathion S-transférases (GST) notamment GST-A1, GST-A2 et GST-M1⁵¹. La distribution tissulaire de cette famille de molécule est grande et leur demi-vie plasmatique est courte (1 à 2h)⁵².

Environ 12 % de la dose de 6-MP administrée est retrouvée sous forme inchangée dans les fèces⁵³. Le reste de la dose, après une première métabolisation précoce dans la paroi intestinale, est métabolisé au sein du cytoplasme intracellulaire par trois voies enzymatiques compétitives :

- Deux voies sont cataboliques : les voies de XDH et de la thiopurine Sméthyltransférase (TPMT) ;
- Une est anabolique : débutant par HPRT1 (Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase 1).

L'HPRT catalyse la formation de 6-thioinosine monophosphate (6-TIMP) qui aboutira, après plusieurs réactions enzymatiques à la formation de métabolites actifs. La principale voie enzymatique de détoxification est celle de la xanthine dehydrogenase, qui convertit la 6-MP en acide thiourique, métabolite inactif hydrosoluble, éliminé dans les urines. La TPMT, quant à elle, permet la méthylation de la 6-MP en 6-méthylmercaptopurine (6-MMP) qui sera secondairement transformé en 6-méthylmercapto-8-hydroxypurine (6-Me-8-OH-MP) par l'aldéhyde oxydase. TPMT est également capable de transformer 6-TIMP en dérivés méthylés et donc d'empêcher la formation de métabolites actifs.

Les thiopurines sont des médicaments à index thérapeutique étroit. Parmi les principaux effets indésirables, la toxicité hématologique est la plus fréquente. Elle se traduit par des neutropénies le plus souvent modérées. Dans certains cas, cette toxicité peut engendrer une pancytopénie⁵⁴. Les cas d'aplasies médullaires induites par les traitements par thiopurines ont une issue fatale dans environ 1% des cas⁵⁵. Les thiopurines peuvent être également responsable d'une toxicité hépatique avec des cholestases ou des hépatites. Sont également décrites des toxicités pancréatiques d'origine immuno-allergique, et gastro-intestinale.

Le suivi thérapeutique pharmacologique des thiopurines est basé sur le dosage des concentrations intra-érythrocytaires des métabolites actifs, les 6-thioguanine nucléotides (6-TGN). Des concentrations intra-érythrocytaires élevées en 6-TGN ont été associées à une myélosuppression⁵⁶ et donc à une potentielle toxicité. Or, une activité TPMT basse est fortement corrélée à des taux élevés de 6-TGN⁵⁶ via la potentialisation de leur formation par le biais de la voie de l'HPRT. L'étude de Lennard et al. de 1990 sur les LAL a montré que les patients peu répondeurs aux thiopurines présentaient une activité TPMT plus élevée que les autres et avaient des concentrations en 6-TGN plus faibles⁵⁷.

Les variations inter-individuelles d'activité de TPMT sont responsables des variations du métabolisme des thiopurines. Elles sont sous la dépendance de polymorphismes génétiques. A ce jour, environ 40 polymorphismes génétiques ont été décrits pour le gène codant TPMT. L'allèle sauvage est appelé TPMT*1 et la quasi totalité de ces polymorphismes correspond à des mutations faux-sens. Devant la distribution familiale des polymorphismes au cours des différentes études menées sur la TPMT, l'hypothèse la plus probable est que leurs transmissions soient codominantes. Une première étude menée en 1980 sur 298 patients a permis de les diviser en 3 catégories d'activité pour TPMT : 88,6% avaient une activité élevée,

28

11,1% une activité intermédiaire et 0,3% une activité indétectable⁵⁸.

Les principaux variants alléliques retrouvés chez les caucasiens sont c.460G>A (rs1800460, p.Ala154Thr) représentant TPMT*3B, c.719A>G (rs1142345, p.Tyr240Cys) ou TPMT*3C, le TPMT*3A étant l'association de ces 2 SNP, et SNP c.238G>C (rs1800462, p.Ala80Pro) correspondant à l'allèle TPMT*2. Ils représentent plus de 90% des individus caucasiens ayant un déficit en TPMT⁵⁹.

A titre d'exemple et afin d'illustrer l'importance de la pharmacogénomique dans le cas des thiopurines, la FDA recommande le génotypage ou phénotypage de la TPMT avant de démarrer un traitement par azathioprine. Les patients pour lesquels on identifie un risque élevé de toxicité auront des doses réduites à l'initiation du traitement. Ceux qui auront une activité très diminuée de TPMT devront se voir proposer une alternative thérapeutique⁶⁰.

3.2 Variants génétiques de VKORC1 et anti-vitamine K

Les anti-vitamine K (AVK) sont des médicaments anticoagulants à index thérapeutique étroit. D'abord utilisés en tant que raticide, c'est dans les années 50 que leur utilisation va débuter chez l'Homme dans la prévention de la maladie thromboembolique veineuse et artérielle⁶¹. Leur emploi est délicat car ces médicaments font l'objet d'une grande variabilité inter- et intra-individuelle.

La vitamine K intervient sous forme réduite dans la γ-carboxylation hépatique de 4 facteurs de coagulation, les facteurs II, VII, IX et X. Cette carboxylation est essentielle dans le fonctionnement de ces facteurs puisqu'elle permet de les rapprocher de surfaces phospholipidiques (via le calcium) catalysant leur réaction. Les AVK bloquent la vitamine K époxyde réductase (VKORC1) intervenant dans la régénération de la vitamine K sous forme réduite (figure 10).



Figure 9 : Cycle de carboxylation vitamine K dépendant (d'après Moreau et al.) VKOR : vitamine K époxyde réductase ; Glu : résidu glutamate ; Gla : résidu gamma-carboxy-glutamate.

Un surdosage en AVK expose le patient à un risque de saignement tandis qu'un sous dosage entraîne un risque thrombotique. L'INR permet le suivi biologique du traitement. Les facteurs de variabilité de réponse au traitement entraînant une variation de l'INR sont nombreux, ils peuvent être d'ordre physiologique (âge, sexe, co-morbidités...), environnemental (alimentation, prise d'autres médicaments), mais aussi génétiques (variations de gènes codant pour les gènes du métabolisme, transport ou cible pharmacologique des AVK). Deux gènes sont particulièrement impliqués dans la variabilité génétique de la réponse aux AVK, VKORC1 et CYP2C9.

CYP2C9 est la principale enzyme responsable du métabolisme des dérivés coumariniques. De nombreux polymorphismes affectant son activité ont été décrits. L'allèle sauvage est l'allèle CYP2C9*1. Les deux principaux variants dans la population caucasienne sont CYP2C9*2 (p.Arg144Cys, rs1799853) et CYP2C9*3 (p.Ile359Leu, rs1057910), ils induisent une diminution de la clairance hépatique des AVK. Une étude, publiée en 1999, corrèle ces 2 génotypes à la nécessité de doses plus faibles en AVK, à des difficultés à l'induction du traitement (séjour prolongé à l'hôpital) et à un risque accru en ce qui concerne les risques de complications majeures dues à des saignements⁶². L'impact des polymorphismes de VKORC1 sur la réponse au traitement par AVK a été étudié plus récemment. Les polymorphismes rs9923231 et rs9934438 semblent jouer un rôle majeur dans la réponse à la warfarine, et ce quelle que soit l'origine ethnique des patients⁶³. Une étude menée en 2008 sur 297 patients concernant le rôle des polymorphismes du CYP2C9 et de VKORC1 dans la réponse aux AVK permet même de conclure que la variabilité de l'INR à l'initiation du traitement est plus fortement associée à la variabilité génétique de la VKORC1 qu'à celle du CYP2C9⁶⁴. De plus, comparativement aux homozygotes sauvages, les patients homozygotes mutés pour VKORC1 ont un délai significativement réduit pour atteindre le 1^{er} INR dans la cible thérapeutique, ainsi qu'un délai plus court de survenue de surdosage (INR>4). Or, la phase d'instauration du traitement est connue comme étant la phase critique durant laquelle le risque hémorragique par surdosage est le plus élevé.

Il n'existe pas de consensus à ce jour quant à l'étude systématique du polymorphisme des principaux gènes impliqués dans la réponse aux AVK chez tous les patients à l'instauration du traitement. Malgré tout, certaines études laissent penser que des algorithmes tenant compte, à l'initiation du traitement, des données de pharmacogénomique des AVK permettent de mieux prédire les doses nécessaires à l'équilibre par rapport à des algorithmes considérant seulement des critères purement cliniques⁶⁵.

MATERIELS ET METHODES

1. Sélection des variants fréquents de structure

Le but de notre étude est d'identifier l'impact potentiel de variants de structure des principales protéines intervenant dans le métabolisme de la cytarabine ou de la daunorubicine dans la réponse au traitement en termes de maladie résiduelle et de survie. Pour cela, les variants de structure ayant une fréquence de l'allèle minoritaire (MAF) supérieure à 0,1 ont été recherchés dans la base de données dbSNP. Une MAF de 0,1 correspond à une fréquence dans la population de 81% d'homozygotes « normaux » (0,9x0,9), 1% d'homozygotes « variants » (0,1x0,1) et 18% d'hétérozygotes (2x0,1x0,9).

Pour le métabolisme de l'AraC, aucun variant fréquent n'a été identifié pour :

- CTPS1 (cytidine 5-triphosphate synthétase) ;
- CTPS2 (CTP synthetase II);
- GIT1;
- RAD51AP1 ;
- DCK (déoxycytidine kinase);
- NT5C2 (5'nucleotidase);
- DCTD (deoxycytidilate deaminase);
- RRM1 (sous-unité 1 de la ribonucléotide réductase) ;
- SLC29A1 (transporteur hENT1).

En revanche, 11 variants fréquents du métabolisme de l'Ara-C ont été identifiés :

- 1 pour ABCC10 (rs2125739, p.I948T, MAF 0,19);
- 5 pour ABCC11 (rs1122416246, p.R19H, MAF 0,12; r16945916, p.G180R, MAF 0,17; rs17822931, p.A317E, MAF 0,31; rs16945988 p.A666T, MAF 0,11; rs11863236, p.H1344R, MAF 0,12);
- 2 pour SLC25A37 (rs2942194, p.R77Q, MAF 0,20; rs3736032, p.87V, MAF 0,13);

- 1 pour CMPK1 (rs7543016, p.G8R, MAF 0,41);
- 1 pour RRM2 (rs1130609, p.S59A, MAF 0,35) ;
- 1 pour CDA (rs2072671, p.K27Q, MAF 0,21).

En ce qui concerne le métabolisme de la DNR, aucun variant fréquent n'a été identifié pour ABCC1, GSTT1 et TOP2A (sous-unité alpha de l'ADN topoisomérase II).

18 variants fréquents de structure ont été identifiés pour le métabolisme de la DNR :

- 1 pour ABCB1 (rs2032582, p.S829A, MAF 0,4);
- 2 pour ABCG2 (rs2231137, p.V12M, MAF 0,14; rs2231142, p.Q141K, MAF 0,14);
- 3 pour AKR1C3 (rs4881396, p.M1I, MAF 0,12; rs12387, p.H5Q, MAF 0,13; rs12529, p.K104N, MAF 0,43);
- 3 pour GSTM1 (rs200184852, p.D9N, MAF 0,17; rs201967146, p.C78R, MAF 0,10; rs74837985, p.K173N, MAF 0,44);
- 1 pour GSTP1 (GSTPi1) (rs1695, p.1105V, MAF 0,32);
- 1 pour NQO1 (NAD(P)H quinone dehydrogenase 1) (rs1800566, p.P149S, MAF 0,28);
- 2 pour SLC22A16 (rs12210538, p.H49R, MAF 0,11; rs714368, p.M326T, MAF 0,31);
- 1 pour SOD2 (rs4880, p.V16A, MAF 0,37) ;
- 2 pour CBR1 (rs1005696, p.F174L, MAF 0,44; rs2835265, p.R208W, MAF 0,13);
- 2 pour CBR3 (rs1056892, p.CY4, MAF 0,38; rs8133052, p.V244M, MAF 0,40).

2. Génotypage par séquençage de nouvelle génération (NGS, Next Generation Sequencing)

Les différentes techniques de séquençage NGS⁶⁶ possèdent 4 étapes communes :

- La préparation d'une banque d'ADN simple brin associé à des ligands ;
- L'amplification de l'ADN par PCR ;
- Le séquençage des fragments d'ADN ;
- L'analyse des données par informatique.

La technique utilisée dans notre cas est celle d'Illumina. Sa particularité réside en un séquençage sur support solide qui s'effectue sur une plaque de verre appelée Flow Cell après amplification en pont des fragments à séquencer.

L'ADN est dans un premier temps fragmenté. Des adaptateurs sont liés à chaque fragment d'ADN au niveau de leurs extrémités. Ces adaptateurs contiennent des primers de PCR, des primers de séquençage, une zone de 6 nucléotides propres à chaque fragment d'ADN lui servant de « code barre » afin d'identifier l'échantillon et une partie nucléotidique complémentaire aux amorces tapissant la Flow Cell (cf. Annexes 1, 2, 3 et 4).

Les fragments d'ADN vont se fixer au support solide via leurs adaptateurs. Un nouveau brin sera alors synthétisé par une polymérase. Il sera fixé de façon covalente à la Flow Cell. Le brin d'origine est éliminé par dénaturation, l'extrémité libre du brin restant va s'hybrider à une amorce adjacente pour former un pont. La polymérase synthétise alors le brin complémentaire pour former un pont double brin qui sera ensuite dénaturé. Ce cycle d'amplification sera répété afin de former un regroupement d'ADN clonal appelé *cluster*. Les brins anti-sens seront ensuite clivés, c'est l'étape de linéarisation. L'extrémité 3' des brins d'ADN est ensuite bloquée et l'étape de séquençage à proprement parler peut débuter.



Figure 10 : Préparation de la librairie d'ADN à séquencer (d'après Illumina, 2014) a. Hybridation de l'ADN sur la Flow Cell ; b. Synthèse du brin complémentaire ; c. Elimination du brin matrice ; d. Formation d'un pont ; e. Synthèse d'ADN double brin ; f. Dénaturation de l'ADN double brin ; g. Formation de ponts ; h. Amplification de la synthèse d'ADN ; i. Linéarisation de l'ADN

Le séquençage s'effectue selon une méthode proche de celle de Sanger. Les nucléotides utilisés possèdent une partie hydrolysable bloquant l'incorporation du nucléotide suivant, ainsi qu'un fluorochrome propre à chaque nucléotide lui aussi hydrolysable. Les 4 types de nucléotides sont ajoutés en même temps, l'un d'eux est incorporé, les fluorochromes sont excités grâce à un laser. Après détection des signaux émis par les fluorophores, le groupement bloquant l'incorporation du nucléotide suivant et le fluorophore sont clivés, permettant ainsi l'ajout d'un nouveau nucléotide.



Figure 11 : Principe du séquençage Illumina (d'après M.H Stern⁶⁷, 2012)
Nous avons donc analysé dans un premier temps grâce à la technique NGS les 29 variants de structure, puis les 3 SNP sélectionnés lors de la première phase par une PCR multiplex séquencée par la même méthode (cf. Tableau 1).

dbSNP	Gène	Prot	Voie	Chrom	MAF	Sequence hg19	Forward primer	Reverse primer	Couver
rs1130609	RRM2	S59A	AraC	2	0,35	GCTGCTCGCTCTGCTTCGCTGCGCC[G/T]CCACTATGCTCTCCCTCCGTGTCCC	GTCCTGTCCTGGCTGCTC	CTCACCGTGTTCTCCTTGTC	Oui
rs2072671	CDA	K27Q	AraC	1	0,21	GCTGGTTTGCTCCCAGGAGGCCAAG[A/C]AGTCAGCCTACTGCCCCTACAGTCA	CTGAAGCCTGAGTGTGTCCA	GTGCCCACCTTTACCTTTGA	Oui
rs2125739	ABCC10	1948T	AraC	6	0,19	ACAGCCCCCTCCTCACCACCAGCA[C/T]CCCAGTGTTCCCACTGCCCAAAGCT	TTCTGGAGGGTGGGAGAGAT	CGCATACACGGTGAGGTAGA	Oui
rs2942194	SLC25A37	7 R77Q	AraC	8	0,20	ATGATTTTCTTGAGGGCTCCGTAGA[C/T]ACTTGTGTACTGGGCTTTGGGATCT	GCCCTGCACCCATGATCAT	TGTTTTCTCTTCTTGCCCGC	Oui
rs3736032	SLC25A37	7 187V	AraC	8	0,13	TACGGAGCCCTCAAGAAAATCATGC[A/G]GACCGAAGGCTTCTGGAGGCCCTTG	CACAAGTATCTACGGAGCCCT	CCTTGGTGGTGGAAAACGTC	Oui
rs7543016	CMPK1	G8R	AraC	1	0,41	GTGTATGCTGAGCCGCTGCCGCAGC[C/G]GGCTGCTCCACGTCCTGGGCCTTAG	GGTGTATGCTGAGCCGCTG	CCGAGGACGAACACGACC	Oui
rs11863236	ABCC11	H1344R	AraC	16	0,12	ATGGGTGACAGAGAAAGACATTACC[G/T]CCAGTGGGAAAAACCAGGAGATAGCA	GCATCAAATGGGTGACAGAGA	AGTACTGATCACCTGCGCAT	Oui
rs16945916	ABCC11	G180R	AraC	16	0,17	CTTCCCATTGCCCATAACCAGGATG[C/T]GGTCACAGTTCAGCACAGTGGTGAC	CAGCCTTCACCTTCCCATTG	CCACAGCCTCCATTGACATG	Oui
rs16945988	ABCC11	A666T	AraC	16	0,11	CATGTCATCGCCTATGTCGATGCCA[C/T]GATTCACGAGGCCACCAGAAGAGTT	CCTGAAACCATGTCATCGCC	AGCTTCTTCTAACTCCTGCTGT	Oui
rs17822931	ABCC11	A317E	AraC	16	0,31	TCACCAAGTCTGCCACTTACTGGCC[C/T]GAGTACACTGGCAATGCAGAAGCAG	TCCTGGCATGGACTTGAACA	TTTTCGATGCACTTCTGGGC	Oui
rs112416246	ABCC11	R19H	AraC	16	0,12	TCAAAAATGTGCTTCCCCACGTGGG[C/T]GTCCACAGCAGACAGGGGGTCGTCC	TCAATCACAGTCAGAGCCCT	TTCCGACCGTCAGATCTACC	Oui
rs1695	GSTP1	I105V	DNR	11	0,32	CGTGGAGGACCTCCGCTGCAAATAC[A/G]TCTCCCTCATCTACACCAACTATGT	CCAGGGCTCTATGGGAAGG	CCCTTTCTTTGTTCAGCCCC	Oui
rs4880	SOD2	V16A	DNR	6	0,37	AGCACCAGCAGGCAGCTGGCTCCGG[C/T]TTTGGGGTATCTGGGCTCCAGGCAG	GGCTGTGCTTTCTCGTCTTC	GCGTTGATGTGAGGTTCCAG	Oui
rs12387	AKR1C3	H5Q	DNR	10	0,13	GACCAGCCTTGGAAAACTCACTGAA[A/G/T]AAAGCTCAATTGGACTATGTTGACC	TCTGCAGCTTTGGTCCACTT	TGCTCATACAAACTGCATACCT	Oui
rs12529	AKR1C3	K104N	DNR	10	0,43	AGTGACAGGGAATGGATTCCAAACA[C/G]CAGTGTGTAAAGCTAAATGATGGCC	CATCAGTCAGTTTGCAGGGG	CCCAATACAGGCATGAAGTGG	Oui
rs714368	SLC22A16	6 M326T	DNR	6	0,31	TCTGTGTTCATGGGAGTCACCCCTC[A/G]TCATGTCTGCAGGCCCCCAGGCAAT	TTGGCTTCTGTGTTCATGGG	TCTTTCTGGCCTGAAGACAAC	Oui
rs1005696	CBR1	F174L	DNR	21	0,44	ATGGCACATATCAGCTGGCAGGAGA[A/C]AAAGCACAGAGGTCAGTGCACGTGC	CATGGGAGTGGGAGAAGTGA	TCTTTGGGGCTTGATTTGGC	Oui
rs1056892	CBR3	C4Y	DNR	21	0,38	GGATGGGAAAGACAGCATCAGGACT[A/G]TGGAGGAGGGGGGCTGAGACCCCTGT	CCAGGACCAGTGAAGACAGA	CCGAAGCAGACGTTTACCAG	Oui
rs1800566	NQ01	P149S	DNR	16	0,28	TTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAA[C/T]CTCAACTGACATATAGCATTGGGCA	CTGCATTTCTGTGGCTTCCA	GTCAAAGAGGCTGCTTGGAG	Oui
rs2032582	ABCB1	S829A	DNR	7	0,34	GAAAGATAAGAAAGAACTAGAAGGT[A/G/T]CTGGGAAGGTGAGTCAAACTAAAT	A GTCTGGACAAGCACTGAAAGAT	AGCATAGTAAGCAGTAGGGAGT	Oui
rs2231137	ABCG2	V12M	DNR	4	0,14	CAGTAATGTCGAAGTTTTTATCCCA[A/G]TGTCACAAGGAAACACCAATGGCTT	CACCTAGTGTTTGCAATCTCATT	CAGGTCATTGGAAGCTGTCG	Oui
rs2231142	ABCG2	Q141K	DNR	4	0,14	CACTCTGACGGTGAGAGAAAACTTA[A/C]AGTTCTCAGCAGCTCTTCGGCTTGC	GGATGATGTTGTGATGGGCA	CACATTACCTTGGAGTCTGCC	Oui
rs2835265	CBR1	R208W	DNR	21	0,13	TGCAAATTTGGCATTCACCTCTCTA[C/T]GGGATTGTTGCACACCTTTCTACAT	CTGCTCCAAAATCCCTGCAA	GCTTTTAAGGGCTCTGACGC	Oui
rs4881396	AKR1C3	M1I	DNR	10	0,12	CAGCCAACAACTGTTCAAGAAGGAT[G/T]CAAATATCACAGGTAAGAATCCTAC	ACTGTTCTCGGAGTTATTTCTAAACA	ACAATGTCACATCTTAGAAAATGTAGG	Oui
rs8133052	CBR3	V244M	DNR	21	0,40	GCTCCCCGCTCAGCCATGTCGTCCT[A/G]CAGCCGCGTGGCGCTGGTGACCGGG	CCCGGGAGTTGGAACAGAG	AGCCCAGCTAGTGTCAATGC	Non
rs12210538	SLC22A16	5 H49R	DNR	6	0,11	GACTGTTCTCCCCGACCTTGTCC[A/G]TGGCGATGCACACGAAGGTGTAGGC	CACCATAACGACACCACAGG	TGCTTGCTCAATGACAGGTG	Oui
rs74837985	GSTM1	K173N	DNR	1	0,44	ACCTCCACCGTATATTTGAGCCCAA[C/G]TGCTTGGACGCCTTCCCAAATCTGA	TGATGTCCTTGACCTCCACC	GTAACGGAACAAGGGGCATC	Oui
rs200184852	GSTM1	D9N	DNR	1	0,17	CATGCCCATGATACTGGGGTACTGG[A/G]ACATCCGCGGGGTGAGCGAGGGTCC	TTTAGGCCTGTCTGCGGAAT	GAACGGTCCCTAGAGTCCG	Oui
rs201967146	GSTM1	C78R	DNR	1	0,10	GATCACCCAGAGCAACGCCATCTTG[C/T]GCTACATTGCCCGCAAGCACAACCT	TGATGGGGCTCACAAGATCA	CCACCCACAAAACACAGACT	Oui

Tableau 1: Variants de structure sélectionnés et amorces utilisées pour leur amplification

3. Statistiques

La comparaison des données de biologie moléculaires entre les groupes est réalisée en utilisant un test de Mann et Whitney (U-test). L'analyse de la survie (EFS et OS) a été réalisée par la méthode de Kaplan-Meier. La date d'origine est la date de première injection du traitement d'induction. Les variables avec p<0,05 sont retenues comme significatives.

RESULTATS

1. Protocole CBF2006

Le core binding factor est un facteur de transcription qui résulte de l'assemblage de deux sous-unités $\alpha 2$ et β . Il est fortement impliqué dans l'hématopoïèse. La sous-unité CBF $\alpha 2$ (dont le nom officiel est RUNX1, aussi connue sous le nom AML1) se lie à l'ADN et est responsable du recrutement de divers facteurs activateurs ou répresseurs de la transcription. Le gène codant pour RUNX1 se situe sur le chromosome 21. La sous-unité CBF β ne se lie pas à l'ADN, le gène codant pour cette sous-unité se situe sur le chromosome 16.

La translocation t(8;21) (q22;q22) fusionne les gènes RUNX1 et RUNX1T1 (ETO,MTG8) localisé sur le chromosome 8. Elle entraîne la formation du transcrit de fusion RUNX1-RUNX1T1, marqueur utilisé dans le suivi de la maladie résiduelle. La protéine de fusion qui en résulte forme avec CBF β un complexe qui régule l'expression des cibles de RUNX1, interagit avec divers régulateurs transcriptionnels et recrute des histones désacétylases imposant une configuration compacte de la chromatine⁶⁸.

L'inversion du chromosome 16 inv(16) (p13q22) et la translocation du chromosome 16 t(16;16) (p13;q22) fusionnent le gène CBF β localisé sur le chromosome 16q22 avec le gène MYH11 situé en 16p13. La protéine de fusion CBF β -MYH11, dont le transcrit peut également constituer un marqueur de suivi, forme un complexe avec CBF α . Le mécanisme de leucémogénèse fait intervenir une séquestration de CBF α dans le cytoplasme⁶⁹.

Ces leucémies aigues dites CBF font partie du groupe des LA de bon pronostic avec une survie moyenne à 5 ans se situant autour de 60%^{70,71}. Cette survie est influencée par la présence de mutations additionnelles^{72,73} comme celles de KIT ou FLT3-TKD.

Le protocole CBF2006 avait pour but d'évaluer l'intérêt d'une induction séquentielle et de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques chez des patients possédant une LAM à *core binding factor* (CBF)⁷⁴. Pour cela, 198 patients ont été randomisés entre une induction standard et une induction séquentielle systématique. La réponse au traitement est évaluée par PCR quantitative en post-induction et post-consolidation (*Minimal Residual Disease*, MRD). L'état mutationnel de KIT, FLT3 et N/K-RAS est également évalué au diagnostic.

Le 1^{er} schéma thérapeutique (induction séquentielle) consiste en une induction par 60 mg/m²/j de DNR et 500 mg/m²/j de cytarabine des jours 1 à 3, systématiquement suivi par une seconde séquence d'induction avec 35 mg/m²/j de DNR à J8 et J9 ainsi que 1000 mg/m²/12h de cytarabine des jours 8 à 10.

Le 2nd schéma thérapeutique (induction standard) est une induction 7+3 classique avec 60 mg/m²/j de DNR des jours 1 à 3 et 200 mg/m²/j de cytarabine des jours 1 à 7. Une formule sanguine et un myélogramme sont réalisés à J15, si le taux de blastes médullaires dépasse 5%, un 2^{ème} cycle d'induction est administré à J16.

Après l'induction, en l'absence de réponse complète (RC), une cure de rattrapage est proposée par AraC (3000 mg/m²/12h aux jours 1, 3, 5 et 7) et 100 mg/m²/j d'amsacrine (un agent intercalant) aux jours 5 à 7. Les patients atteignant la RC reçoivent 3 mois de cycles de consolidation constituée par cytarabine à haute dose : 3000 mg/m²/12h aux jours 1, 3 et 5. Les patients qui ne verront pas une diminution de 3 Log de leur MRD avant l'initiation de leur second cycle de consolidation tout comme les patients ayant une MRD positive après 3 cycles de consolidation subiront une allogreffe s'ils y sont éligibles, ou un traitement par Dasatinib si ce n'est pas le cas.

L'étude permet de conclure qu'il n'y a pas de supériorité de l'induction séquentielle par rapport à l'induction standard. Les marqueurs moléculaires (FLT3, KIT, N/KRAS) constituent en analyse univariée des marqueurs prédictifs du pronostic des patients, tout comme la réduction de 3 log de la MRD. Toutefois, seule cette dernière en analyse multivariée est un marqueur prédictif du pronostic et de la survie des patients après la RC.

39



Figure 12 : Schéma thérapeutique du protocole CBF2006 (d'après Boissel.N) Les valeurs de MRD des stades MRD1 à MRD4 ainsi que les survies globales (OS) et sans maladie détectable (DFS) ont été utilisées pour évaluer l'impact des SNP.

2. Protocole LAM2006IR

La majorité des patients ayant une LAM possède un risque cytogénétique intermédiaire⁷⁵. La plupart d'entre eux n'ont aucune anomalie visible de leur caryotype. De la même manière que pour les LAM CBF, certaines mutations telles que NPM1⁷⁶ ou FLT3-ITD⁷⁷ influencent le pronostic de ces patients mais, dans ce

cas, aucun marqueur moléculaire ne peut être suivi afin d'évaluer l'efficacité de la chimiothérapie.

Le protocole LAM2006IR a pour but de tester l'efficacité du gemtuzumab ozogamicine en association avec une chimiothérapie intensive chez 323 patients de 18 à 60 ans atteints de LAM.

Les patients sont randomisés en 2 schémas thérapeutiques. Le 1er consiste en une induction classique 7+3, l'autre suit le même schéma avec l'ajout de gemtuzumab 6mg/m² à J4. L'évaluation de la RC se fait à J15. En cas de RC, les patients bénéficient d'une mini-consolidation par 2 jours de DNR (60 mg/m²) et 7 jours d'Ara-C (50 mg/m²). Les patients n'étant pas en RC après le 1^{er} myélogramme bénéficieront d'un rattrapage par 3 jours d'amsacrine, 4 jours de cytarabine haute dose (3000 mg/m2) et des facteurs de croissance hématopoïétiques. En cas d'échec du rattrapage, les patients sortent de l'étude.

Le devenir commun des phases de consolidation sera la greffe. Les patients jeunes (<51 ans) ayant des donneurs HLA compatibles subiront une allogreffe de moelle standard. Les autres patients seront traités par 2 cycles de chimiothérapie intensive comprenant :

- De la cytarabine (5 jours à 1000mg/m²/12h) ;
- Une anthracycline : la mitoxantrone ;
- Des facteurs de croissance hématopoïétiques ;
- Du gemtuzumab si les patients font partie du bras d'induction par ce médicament (pour le 1^{er} cycle de consolidation).

Après la 2^{ème} consolidation, les patients seront soit orientés vers une miniallogreffe, soit vers une autogreffe.

L'impact des SNP a été évalué sur l'OS et la DFS.





Figure 13 : Schéma thérapeutique du protocole LAM2006IR

3. Analyse initiale des 29 SNP

70 patients du bras CBFB-MYH11 du protocole CBF2006 ont pu être testés dans cette 1^{ère} phase. Ils ne diffèrent pas statistiquement de l'ensemble des patients du protocole en termes d'âge, de sexe et de mutations associées. L'évaluation de la réponse porte sur l'impact sur la maladie résiduelle CBFB-MYH11 (MRD1-MRD4) de ces variants de structure.

Sur les 29 variants de structures fréquents sélectionnés, seuls 20 ont pu être exploités pour notre étude. En effet, pour 8 d'entre eux la couverture de la séquence par NGS n'a pas été spécifique, c'est-à-dire que les amorces ont entraîné une amplification de plusieurs séquences et non pas de la seule séquence d'intérêt. Un des variants n'a quant à lui pas pu être analysé car les amorces n'étaient pas ciblées sur la séquence à amplifier. Les données de fréquence allélique retrouvées sur les 70 patients testés sont résumées dans le tableau 2 ci-dessous. Ce tableau résume les fréquences alléliques théoriques de la population générale et de la population européenne.

SNP	Prot	Voie	WT/WT CBFB	WT/VAR CBFB	VAR/VAR CBFB	Echec/non interprétable	MAF ensemble	MAF EUR	MAF CBFB
SNP01_rs1695_GSTP1	1105V	DNR	38	20	11	1	0,32	0,32	0,40
SNP02_rs4880_SOD2	V16A	DNR	19	24	21	6	0,37	0,46	0,57
SNP03_rs12387_AKR1C3	H5Q	DNR				Couverture NGS non unique	0,13		
SNP04_rs12529_AKR1C3	K104N	DNR	25	30	10	5	0,43	0,59	0,39
SNP05_rs714368_SLC22A16	M326T	DNR	45	20	3	2	0,31	0,21	0,21
SNP06_rs1005696_CBR1	F174L	DNR	16	32	21	1	0,44	0,39	0,55
SNP07_rs1056892_CBR3	C4Y	DNR	33	30	6	1	0,38	0,36	0,29
SNP08_rs1130609_RRM2	S59A	AraC	27	27	16	0	0,35	0,27	0,48
SNP09_rs1800566_NQ01	P149S	DNR	48	17	4	1	0,28	0,20	0,24
SNP10_rs2032582_ABCB1	S829A	DNR	19	38	11	2	0,34	0,43	0,40
SNP11_rs2072671_CDA	K27Q	AraC	29	28	13	0	0,21	0,33	0,43
SNP12_rs2125739_ABCC10	1948T	AraC	58	10	2	0	0,19	0,22	0,17
SNP13_rs2231137_ABCG2	V12M	DNR				Couverture NGS non unique	0,14		
SNP14_rs2231142_ABCG2	Q141K	DNR	51	18	0	1	0,14	0,10	0,00
SNP15_rs2835265_CBR1	R208W	DNR	54	15	0	1	0,13	0,10	0,00
SNP16_rs2942194_SLC25A37	R77Q	AraC	41	23	5	1	0,20	0,28	0,27
SNP17_rs3736032_SLC25A37	187V	AraC	59	8	1	2	0,13	0,07	0,12
SNP18_rs4881396_AKR1C3	M1I	DNR				Couverture NGS non unique	0,12		
SNP19_rs7543016_CMPK1	G8R	AraC				Couverture NGS non unique	0,41		
SNP20_rs8133052_CBR3	V244M	DNR				Pas de couverture du SNP par NGS	0,40		
SNP21_rs11863236_ABCC11	H1344R	AraC	55	15	0	0	0,12	0,10	0,00
SNP22_rs12210538_SLC22A16	H49R	DNR	35	27	8	0	0,11	0,25	0,34
SNP23_rs16945916_ABCC11	G180R	AraC	41	24	3	2	0,17	0,15	0,21
SNP24_rs16945988_ABCC11	A666T	AraC	66	4	0	0	0,11	0,10	0,00
SNP25_rs17822931_ABCC11	A317E	AraC	53	15	2	0	0,31	0,14	0,17
SNP26_rs74837985_GSTM1	K173N	DNR				Couverture NGS non unique	0,44		
SNP27_rs112416246_ABCC11	R19H	AraC				Couverture NGS non unique	0,12		
SNP28_rs200184852_GSTM1	D9N	DNR				Couverture NGS non unique	0,17		
SNP29_rs201967146_GSTM1	C78R	DNR				Couverture NGS non unique	0,10		

Tableau 2 : Fréquences alléliques théoriques et des 29 SNP testés

3.1 Réponse moléculaire CBFB-MYH11

3.1.a Métabolisme de la cytarabine

Onze SNP concernent le métabolisme de l'aracytine touchant 6 protéines.

• ABCC10 (rs2125739)

ABCC10 est un transporteur transmembranaire caractérisé par une cassette fixant l'ATP (ATP binding cassette, ABC). Il a également été appelé MRP7 pour Multidrug Resistance-Associated Protein 7.

(rs2125739, SNP12, I948T)

Le SNP rs2125739 est localisé au niveau des nucléotides 43.412.865 (séquence de référence GRCh37.p13=hg19) ou 43.445.127 (séquence de référence GRCh38.p7=hg38) du chromosome 6, modifiant l'acide aminé 948 d'isoleucine en thréonine (I948T). Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et montrent une couverture NGS unique sur le chromosome 6 entre les bases 43.445.032 et 43.445.200 (hg38) à 100% d'identité.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 70 patients CBF2006 dont 59 avaient un résultat de MRD1. 58 patients sont wt/wt (wild-type, identique à la séquence de référence), 10 sont var/wt et 2 patients var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 83% wt/wt (attendu 66% pour une MAF de 0,19), 14% wt/var (attendu 31%) et de 3% var/var (attendu 4%). L'impact de ce polymorphisme est très significatif sur la maladie résiduelle au stade MRD1 (mrd1_mo, p=0,021, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var) et MRD3 (mrd3_mo, p=0,020, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var) ainsi que sur les décroissances entre le stade MRD3 par rapport au diagnostic (logratiomrd3diag, p=0,042, test de Mann-Whitney, wt/var et var/var), de la MRD3 par rapport à la MRD2 (logratiomrd3mrd2, p=0,024, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var) et var/var) et de la MRD4 par rapport à la MRD3 (logratiomrd4mrd3, p=0,036, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var), Annexe 5). La

réponse moléculaire est meilleure pour les patients ayant une thréonine (à l'exception de la comparaison de la MRD4 par rapport à la MRD3).

<u>ABCC11 (rs11863236, rs16945916, rs16945988, rs17822931 et</u> <u>rs112416246)</u>

ABCC11 est également un transporteur transmembranaire caractérisé par une cassette fixant l'ATP (ATP binding cassette, ABC). Il a également été appelé MRP8 pour Multidrug Resistance-Associated Protein 8. Cinq SNP fréquents sont identifiés affectant la composition protéique de ce transporteur.

rs11863236 (SNP21, H1344R)

Le SNP rs11863236 est localisé au niveau des nucléotides 48.250.026 (hg19) ou 48.216.115 (hg38) du chromosome 16, modifiant l'acide aminé 1344 d'histidine en arginine. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et montrent une couverture NGS unique sur le chromosome 16 entre les bases 48.216.083 et 48.216.225 (hg38) à 100% d'identité.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 70 patients CBF2006 dont 59 avaient un résultat de MRD1. 55 patients sont wt/wt et 15 sont var/wt donnant respectivement les fréquences suivantes : 79% wt/wt (attendu 77% pour une MAF de 0,12), 21% wt/var (attendu 21%) et de 0% var/var (attendu 1%). L'impact de ce polymorphisme n'est pas significatif sur la maladie résiduelle au seuil de 0,05, seule la différence de maladie résiduelle entre les stades MRD1 et MRD2 ayant une significativité limite (logratiomrd2mrd1, p=0,051, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var).

rs16945916 (SNP23, G180R)

Le SNP rs16945916 est localisé au niveau des nucléotides 48.201.432 (hg19) ou 48.167.521 (hg38) du chromosome 16, modifiant l'acide aminé 180 de glycine en arginine. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et

montrent une couverture NGS unique sur le chromosome 16 entre les bases 48.167.486 et 48.167.641 (hg38) à 100% d'identité.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 68 patients CBF2006 dont 58 avaient un résultat de MRD1. 41 patients sont wt/wt, 24 sont var/wt et 3 patients var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 60% wt/wt (attendu 69% pour une MAF de 0,17), 35% wt/var (attendu 28%) et de 4% var/var (attendu 3%). L'impact de ce polymorphisme n'est pas significatif sur la maladie résiduelle au seuil de 0,05.

rs16945988 (SNP24, A666T)

Le SNP rs16945988 est localisé au niveau des nucléotides 48.265.777 (hg19) ou 48.231.866 (hg38) du chromosome 16, modifiant l'acide aminé 666 d'alanine en thréonine. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et montrent une couverture NGS unique sur le chromosome 16 entre les bases 48.231.833 et 48.231.993 (hg38) à 100% d'identité.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 70 patients CBF2006 dont 59 avaient un résultat de MRD1. 66 patients sont wt/wt et 4 sont var/wt donnant respectivement les fréquences suivantes : 94% wt/wt (attendu 79% pour une MAF de 0,17), 6% wt/var (attendu 20%) et de 0% var/var (attendu 1%). L'impact de ce polymorphisme n'est pas significatif sur la maladie résiduelle au seuil de 0,05.

rs17822931 (SNP25, A317E)

Le SNP rs17822931 est localisé au niveau des nucléotides 48.258.198 (hg19) ou 48.224.287 (hg38) du chromosome 16, modifiant l'acide aminé 317 d'alanine en acide glutamique. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et montrent une couverture NGS unique sur le chromosome 16 entre les bases 48.224.193 et 48.224.334 (hg38) à 100% d'identité.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 70 patients CBF2006 dont 59 avaient un résultat de MRD1. 53 patients sont wt/wt, 15 sont var/wt et 2 sont var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 76% wt/wt (attendu 48% pour une MAF de 0,31), 21% wt/var (attendu 43%) et de 3% var/var (attendu 10%). Seul le niveau de la maladie résiduelle sanguine au stade MRD3 est à la limite de la significativité au seuil de 0,05 (mrd3_sg, p=0,050, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var).

rs112416246 (SNP27, R19H)

Le SNP rs112416246 est localisé au niveau des nucléotides 48.234.273 (hg19) ou 48.200.362 (hg38) du chromosome 16, modifiant l'acide aminé 19 d'arginine en histidine. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et révèlent l'amplification de 2 régions différentes, toutes les 2 localisées sur le chromosome 16 entre les bases 48.200.242 et 48.200.411 (hg38) à 100% d'identité et les bases 48.115.411 et 48.115.549 (hg38) à 93% d'identité, ne permettant pas de génotyper avec certitude le SNP rs112416246. En conséquence, ce SNP n'a pas été analysé sur son impact sur la maladie résiduelle.

• CDA (rs2072671)

CDA code pour la cytidine désaminase qui catalyse de manière irréversible la désamination de la cytidine en uridine (cytidine + $H(2)O \ll H(3)$) ainsi que la 2'-désocytidine en 2'-désocyuridine (2'-deoxycytidine + $H(2)O \ll 2'$ -deoxyuridine + H(3)). Il inactive également l'AraC ainsi que la 5-azacytidine et la 2,2-difluorodeoxycytidine (gemcitabine).

rs2072671 (SNP11, K27Q)

Le SNP rs2072671 est localisé au niveau des nucléotides 20.915.701 (hg19) ou 20.589.208 (hg38) du chromosome 1, modifiant l'acide aminé 27 de lysine en glutamine. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et

montrent une couverture NGS unique sur le chromosome 1 entre les bases 20.589.157 et 20.589.297 (hg38) à 100% d'identité.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 70 patients CBF2006 dont 59 avaient un résultat de MRD1. 29 patients sont wt/wt, 28 sont var/wt et 13 sont var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 41% wt/wt (attendu 62% pour une MAF de 0,21), 40% wt/var (attendu 33%) et de 19% var/var (attendu 4%). L'impact de ce polymorphisme n'est pas significatif sur la maladie résiduelle au seuil de 0,05.

• <u>CMPK1 (rs7543016)</u>

CMPK1 code pour la cytidine/uridine monophosphate kinase 1. CMPK1 catalyse la phosphorylation de l'UMP, du CMP ainsi que celui du désoxyCMP (dCMP) à partir de l'ATP conduisant à la formation de nucléosides diphosphates nécessaires à la synthèse des acides nucléiques.

rs7543016 (SNP19, G8R)

Le SNP rs7543016 est localisé au niveau des nucléotides 47.799.639 (hg19) ou 47.333.967 (hg38) du chromosome 1, modifiant l'acide aminé 8 de glycine en arginine. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et révèlent l'amplification de 2 régions différentes, l'une localisée sur le chromosome 1 entre les bases 47.333.936 et 47.334.043 (hg38) à 100% d'identité et l'autre localisée sur le chromosome 6 entre les bases 35.765.934 et 35.765.987 (hg38) à 96% d'identité, ne permettant pas de génotyper avec certitude le SNP rs7543016. En conséquence, ce SNP n'a pas été analysé sur son impact sur la maladie résiduelle.

<u>RRM2 (rs1130609)</u>

RRM2 code pour la sous-unité régulatrice M2 de la ribonucléotide réductase (2'-deoxyribonucleoside diphosphate + thioredoxin disulfide + H(2)O <=>

ribonucleoside diphosphate + thioredoxin), étape limitante dans la production des désoxyribonucléotides nécessaires à la synthèse de l'ADN.

rs1130609 (SNP8, S59A)

Le SNP rs1130609 est localisé au niveau des nucléotides 10.262.920 (hg19) ou 10.122.793 (hg38) du chromosome 2, modifiant l'acide aminé 59 de sérine en alanine. Il est important de noter que la transcription de RRM2 est initiée au niveau de promoteurs alternatifs conduisant à la production de 2 isoformes différant sur la longueur de la région N-terminale. L'acide aminé 59 est présent seulement sur la protéine la plus longue. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et révèlent l'amplification de 2 régions différentes, l'une localisée sur le chromosome 2 entre les bases 10.122.711 et 10.122.879 (hg38) à 100% d'identité et l'autre localisée sur le chromosome X entre les bases 44.310.396 et 44.310.481 (hg38) à 89% d'identité. La différence d'identité a permis cependant de génotyper avec certitude le SNP rs1130609.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 70 patients CBF2006 dont 59 avaient un résultat de MRD1. 27 patients sont wt/wt, 27 sont var/wt et 16 patients var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 39% wt/wt (attendu 42% pour une MAF de 0,35), 39% wt/var (attendu 46%) et de 23% var/var (attendu 12%). L'impact de ce polymorphisme est très significatif sur la maladie résiduelle au stade MRD2 (mrd2_mo, p=0,013, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var) et approchant la significativité aux stades MRD3 (mrd3_mo, p=0,068, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var) et MRD4 (mrd4_mo, p=0,097, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var) ainsi que la réponse moléculaire entre le stade MRD2 et le diagnostic (logratiomrd2diag, p=0,065, test de Mann-Whitney, wt/var et var/var)). La réponse moléculaire est meilleure pour les patients ayant une sérine (cf.Figure SNP rs1130609, Annexe 5).

SLC25A37 (rs2942194 et rs3736032)

SLC25A37 code pour un transporteur (solute carrier family 25 member 37) connu également sous le nom de mitoferrine, exprimé fortement dans les cellules hématopoïétiques⁷⁸. SLC25A37 est nécessaire à l'intégration du fer dans l'hème au cours de l'érythropoïèse. Dans le cadre du projet international HapMap de cartographie des polymorphismes dans la population humaine, un polymorphisme rs2775139 non codant de SLC25A37 était significativement à la réponse à l'AraC⁷⁹. Ce SNP rs2775139 est corrélé au niveau d'expression de SLC25A37, régulant apparemment son expression.

rs2942194 (SNP16, R77Q)

Le SNP rs2942194 est localisé au niveau des nucléotides 23.423.669 (hg19) ou 23.566.156 (hg38) du chromosome 8, modifiant l'acide aminé 77 d'arginine en glutamine. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et montrent une couverture NGS unique sur le chromosome 8 entre les bases 23.566.082 et 23.566.316 (hg38) à 100% d'identité.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 69 patients CBF2006 dont 58 avaient un résultat de MRD1. 41 patients sont wt/wt, 23 sont var/wt et 5 sont var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 59% wt/wt (attendu 64% pour une MAF de 0,20), 33% wt/var (attendu 32%) et de 7% var/var (attendu 4%). Seuls le niveau de la maladie résiduelle médullaire au stade tardif MRD4 (mrd4_mo, p=0,023, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var) et la réponse entre cette MRD4 et le diagnostic (logratiomrd4diag, p=0,032, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var) sont significatifs. Cependant, il est important de noter que la moins bonne réponse au vu de la maladie résiduelle n'est retrouvée que pour les patients hétérozygotes wt/var pour ce SNP, les patients wt/wt et var/var ayant la même réponse moléculaire (Figure SNP rs2942194).

rs3736032 (SNP17, I87V)

Le SNP rs3736032 est localisé au niveau des nucléotides 23.423.697 (hg19) ou 23.566.184 (hg38) du chromosome 8, modifiant l'acide aminé 87 d'isoleucine en valine. Il est situé à 28 bases du SNP rs2942194. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP sont communs au SNP rs2942194 et montrent une couverture NGS unique sur le chromosome 8 entre les bases 23.566.082 et 23.566.316 (hg38) à 100% d'identité.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 68 patients CBF2006 dont 58 avaient un résultat de MRD1. 59 patients sont wt/wt, 8 sont var/wt et 1 sont var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 87% wt/wt (attendu 76% pour une MAF de 0,13), 12% wt/var (attendu 23%) et de 1% var/var (attendu 2%). Seul le niveau de la maladie résiduelle sanguine au stade tardif MRD4 est significatif (mrd4_sg, p=0,0033, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var) (cf. Figure SNP rs3736032, Annexe 5).

3.1.b Métabolisme de la daunorubicine

Dix-huit SNP concernent le métabolisme de la daunorubicine touchant 10 protéines.

• <u>ABCB1 (rs2032582)</u>

ABCB1 est un transporteur transmembranaire caractérisé par une cassette fixant l'ATP (ATP binding cassette, ABC). Il a également été appelé MDR1 pour Multidrug Resistance Protein 1, P-gp ou CD243. ABCB1 fut initialement identifié comme responsable de la résistance à de nombreux agents de chimiothérapie (colchicine, vinblastine, doxorubicine) d'où le symbole initial de MDR1⁸⁰.

rs2032582 (SNP10, S829A)

Le SNP rs2032582 est localisé au niveau des nucléotides 87.160.618 (séquence de référence GRCh37.p13=hg19) ou 87.531.302 (séquence de référence

GRCh38.p7=hg38) du chromosome 7, modifiant l'acide aminé 829 de sérine en alanine (S829A). Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et montrent une couverture NGS unique sur le chromosome 7 entre les bases 87.531.205 et 87.531.342 (hg38) à 100% d'identité (cf.Figure SNP rs2032582, Annexe 5).

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 68 patients CBF2006 dont 58 avaient un résultat de MRD1. 19 patients sont wt/wt, 38 sont var/wt et 11 sont var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 28% wt/wt (attendu 44% pour une MAF de 0,34), 56% wt/var (attendu 45%) et de 16% var/var (attendu 12%). Seule la réponse moléculaire entre les stades MRD1 et MRD2 est significative (logratiomrd2mrd1, p=0,031, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var). Cependant, il est important de noter que la moins bonne réponse au vu de la maladie résiduelle n'est retrouvée que pour les patients hétérozygotes wt/var pour ce SNP, les patients wt/wt et var/var ayant la même réponse moléculaire.

• <u>ABCG2 (rs2231137 et rs2231142)</u>

ABCG2 est un transporteur transmembranaire caractérisé par une cassette fixant l'ATP (ATP binding cassette, ABC). Il est le support du groupe sanguin Junior. Il a également été appelé Placenta-Specific ATP-Binding Cassette Transporter, Mitoxantrone Resistance-Associated Protein, Breast Cancer Resistance Protein, Urate Exporter et Multi Drug Resistance Efflux Transport ATP-Binding Cassette Sub-Family G (WHITE) Member 2.

rs2231137 (SNP13, V12M)

Le SNP rs2231137 est localisé au niveau des nucléotides 89.061.114 (hg19) ou 88.139.962 (hg38) du chromosome 4, modifiant l'acide aminé 12 de valine en méthionine (V12M). Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et révèlent l'amplification de 2 régions différentes, l'une localisée sur le chromosome 4 entre les bases 88.139.912 et 88.140.077 (hg38) à 100% d'identité et l'autre localisée sur le chromosome 15 entre les bases 69.022.219 et 69.022.288

(hg38) à 97% d'identité, ne permettant pas de génotyper avec certitude le SNP rs2231137. En conséquence, ce SNP n'a pas été analysé sur son impact sur la maladie résiduelle.

rs2231142 (SNP14, Q141K)

Le SNP rs2231142 est localisé au niveau des nucléotides 89.052.323 (hg19) ou 88.131.171 (hg38) du chromosome 4, modifiant l'acide aminé 141 de glutamine en lysine (Q141K). Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et révèlent l'amplification de 2 régions différentes, l'une localisée sur le chromosome 4 entre les bases 88.131.068 et 88.131.215 (hg38) à 100% d'identité et l'autre localisée sur le chromosome 15 entre les bases 69.022.592 et 69.022.688 (hg38) à 89% d'identité. La différence d'identité a permis cependant de génotyper avec certitude le SNP rs2231142.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 69 patients CBF2006 dont 58 avaient un résultat de MRD1. 51 patients sont wt/wt, 18 sont var/wt et aucun var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 74% wt/wt (attendu 74% pour une MAF de 0,14), 26% wt/var (attendu 24%) et de 0% var/var (attendu 2%). L'impact de ce polymorphisme est très significatif sur la maladie résiduelle aux stades MRD3 (mrd3_sg, p=0,031, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var) et MRD4 (mrd4_mo, p=0,030, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var). Il approche la significativité pour d'autres mesures de la réponse moléculaire aux stades MRD3 (mrd3_mo, p=0,081, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var). La réponse moléculaire est meilleure pour les patients ayant une glutamine (cf.Figure SNP rs2231142, Annexe 5).

AKR1C3 (rs12387, rs12529 et rs4881396)

AKR1C3 code pour le membre C3 de la famille 1 des aldo-céto reductases, vaste famille composée de plus de 40 membres. Ces enzymes catalysent la transformation des aldéhydes et cétones en leurs alcools respectifs en utilisant le

NADH et/ou le NADPH comme cofacteurs. AKR1C3 catalyse la réduction de la daunorubicine, conduisant à une perte de la fonction de la daunorubicine⁸¹.

rs12387 (SNP3, H5Q)

Le SNP rs12387 est localisé au niveau des nucléotides 5.139.685 (hg19) ou 5.097.493 (hg38) du chromosome 10, modifiant l'acide aminé 5 d'histidine en glutamine. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et révèlent l'amplification de 3 régions différentes toutes localisées sur le chromosome 10, l'une spécifique entre les bases 5.097.427 et 5.097.570 (hg38) à 100% d'identité correspondant à AKR1C3 et deux autres correspondant soit à AKR1C2 entre les bases 5.000.537 et 5.000.673 (hg38) à 88% d'identité ou AKR1C1 entre les bases 4.966.920 et 4.967.056 (hg38) à 88% d'identité, ne permettant pas de génotyper avec certitude le SNP rs12387. En conséquence, ce SNP n'a pas été analysé sur son impact sur la maladie résiduelle.

rs12529 (SNP4, K104N)

Le SNP rs12529 est localisé au niveau des nucléotides 5.136.651 (séquence de référence GRCh37.p13=hg19) ou 5.094.459 (séquence de référence GRCh38.p7=hg38) du chromosome 10, modifiant l'acide aminé 104 de lysine en acide aspartique (K104N). Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et montrent une couverture NGS unique sur le chromosome 10 entre les bases 5.094.341 et 5.094.510 (hg38) à 99% d'identité.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 65 patients CBF2006 dont 56 avaient un résultat de MRD1. 25 patients sont wt/wt, 30 sont var/wt et 10 sont var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 38% wt/wt (attendu 32% pour une MAF de 0,43), 46% wt/var (attendu 49%) et de 15% var/var (attendu 18%). L'impact de ce polymorphisme est très significatif sur la maladie résiduelle au stade MRD2 (mrd2_sg, p=0,025, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var). Il approche la significativité pour d'autres mesures de la réponse moléculaire aux stades MRD2 (logratiomrd2diag, p=0,085, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var) et MRD4 (logratiomrd4mrd3, p=0,068, test de Mann-Whitney,

Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var). Cependant, la réponse moléculaire est opposée pour la MRD2 sanguine pour laquelle la meilleure réponse est pour les patients ayant une lysine tandis que, pour les réponses moléculaires entre la MRD2 et le diagnostic et entre la MRD4 et la MRD3, la meilleure réponse est pour les patients ayant un acide aspartique (cf.Figure SNP rs12529, Annexe 5).

rs4881396 (SNP18, M1I)

Le SNP rs4881396 est localisé au niveau des nucléotides 5.120.157 (hg19) ou 5.077.965 (hg38) du chromosome 10, modifiant le premier acide aminé de AKR1C3 d'une méthionine en isoleucine. Il est probable que ce variant impacte également sur la taille de la protéine, ce variant touchant le codon d'initiation ATG de la protéine, le variant modifiant ce codon en ATT, devrait logiquement conduire à une initiation de la protéine à un autre codon d'initiation (ATG ou CTG).

Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et révèlent l'amplification de très nombreuses régions différentes en plus de celle spécifique sur le chromosome 10 entre les bases 5.077.843 et 5.078.012 (hg38) à 100% d'identité, ne permettant pas de génotyper avec certitude le SNP rs4881396. En conséquence, ce SNP n'a pas été analysé sur son impact sur la maladie résiduelle.

• CBR1 (rs1005696 et rs2835265)

CBR1 code pour la carbonyl réductase 1, enzyme catalysant la réduction des composés possédant un motif carbonyls en alcool correspondant en utilisant le NADPH (R-CHOH-R' + NADP(+) <=> R-CO-R' + NADPH). CBR1 est une des réductases les plus efficaces pour convertir la daunorubicine en daunorubicinol, dérivé alcoolique ayant une activité anti-tumorale réduite ainsi qu'une cardiotoxicité accrue⁸².

rs1005696 (SNP6, F174L)

Le SNP rs1005696 est localisé au niveau des nucléotides 37.443.480 (hg19) ou 36.071.182 (hg38) du chromosome 21, modifiant l'acide aminé 174 de phénylalanine en leucine. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et montrent une couverture NGS unique sur le chromosome 21 entre les bases 36.071.087 et 36.071.247 (hg38) à 100% d'identité.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 69 patients CBF2006 dont 58 avaient un résultat de MRD1. 16 patients sont wt/wt, 32 sont var/wt et 21 sont var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 23% wt/wt (attendu 31% pour une MAF de 0,44), 46% wt/var (attendu 49%) et de 30% var/var (attendu 19%). L'impact de ce polymorphisme approche la significativité pour la réponse moléculaire au stade MRD4 (mrd4_mo, p=0,070, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var ; logratiomrd4diag, p=0,084, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var). La meilleure réponse est pour les patients ayant une phénylalanine (cf.Figure SNP rs1005696, Annexe 5).

rs2835265 (SNP15, R208W)

Le SNP rs2835265 est localisé au niveau des nucléotides 37.444.696 (hg19) ou 36.072.398 (hg38) du chromosome 21, modifiant l'acide aminé 208 d'arginine en tryptophane. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et montrent une couverture NGS unique sur le chromosome 21 entre les bases 36.072.358 et 36.072.495 (hg38) à 100% d'identité.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 69 patients CBF2006 dont 58 avaient un résultat de MRD1. 54 patients sont wt/wt, 15 sont var/wt et aucun n'est var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 78% wt/wt (attendu 76% pour une MAF de 0,13), 22% wt/var (attendu 23%) et de 0% var/var (attendu 2%). L'impact de ce polymorphisme approche la significativité pour la réponse moléculaire aux stades MRD2 (logratiomrd2diag, p=0,086, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var) et MRD3 (logratiomrd3mrd2, p=0,076, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var). Cependant, la réponse moléculaire est opposée entre les 2

stades, la réponse étant meilleure pour les patients ayant une arginine au stade MRD2 et une tryptophane au stade MRD3 (Figure SNP rs2835265, Annexe 5).

• CBR3 (rs1056892 et rs8133052)

CBR3 partage une identité de séquence protéique de 71% avec CBR1.

rs1056892 (SNP7, C4Y)

Le SNP rs1056892 est localisé au niveau des nucléotides 37.518.706 (hg19) ou 36.146.408 (hg38) du chromosome 21, modifiant l'acide aminé 4 de cystéine en tyrosine. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et montrent une couverture NGS unique sur le chromosome 21 entre les bases 36.146.360 et 36.146.525 (hg38) à 100% d'identité.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 69 patients CBF2006 dont 58 ayant un résultat de MRD1. 33 patients sont wt/wt, 30 sont var/wt et 6 sont var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 48% wt/wt (attendu 38% pour une MAF de 0,38), 43% wt/var (attendu 47%) et de 9% var/var (attendu 14%). Aucun impact de ce polymorphisme n'a pu être identifié sur la réponse moléculaire.

rs8133052 (SNP20, V244M)

Le SNP rs8133052 est localisé au niveau des nucléotides 37.507.501 (hg19) ou 36.135.203 (hg38) du chromosome 21, modifiant l'acide aminé 244 de valine en méthionine. Aucune couverture de ce SNP n'a pu être obtenue, ne permettant d'évaluer son impact sur la réponse moléculaire.

• <u>GSTM1 (rs74837985, rs200184852 et rs201967146)</u>

GSTM1 code pour la glutathion S-transférase mu 1. Cette enzyme catalyse la formation de dérivés thioéthers de nombreux composés, en particulier de

xénobiotiques, formant la première étape de la détoxification de ces xénobiotiques. GSTM1 appartient à une famille de glutathion S-transférase cytosolique constituée chez l'homme de 22 membres, elle-même sous-divisée en classes dont la classe mu comportant 5 membres (GSTM1 à GSTM5). Les 5 membres de cette classe sont localisés dans la même région chromosomique 1p13. Aucun amplicon pour les 3 SNP analysés, rs74837985 (SNP26, K173N), rs200184852 (SNP28, D9N) et rs201967146 (SNP29, C78R) n'a pu donner une couverture unique de GSTM1, les amplicons croisant avec les paralogues GSTM2, GSTM4 et GSTM5, ne permettant pas de génotyper avec certitude les SNP rs74837985, rs200184852 et rs201967146. En conséquence, ces SNP n'ont pas été analysé sur leur impact sur la maladie résiduelle.

• GSTP1 (rs1695)

GSTP1 code pour la glutathion S-transférase pi 1 qui catalyse également la formation de dérivés thioéthers. A la différence de GSTM1, GSTP1 est unique dans sa classe.

rs1695 (SNP1, I105V)

Le SNP rs1695 est localisé au niveau des nucléotides 67.352.689 (hg19) ou 67.585.218 (hg38) du chromosome 11, modifiant l'acide aminé 105 d'isoleucine en valine. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et montrent une couverture NGS unique sur le chromosome 11 entre les bases 67.585.134 et 67.585.290 (hg38) à 100% d'identité.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 69 patients CBF2006 dont 58 avaient un résultat de MRD1. 38 patients sont wt/wt, 20 sont var/wt et 11 sont var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 55% wt/wt (attendu 46% pour une MAF de 0,32), 29% wt/var (attendu 44%) et de 16% var/var (attendu 10%). Ce polymorphisme est associé à une tendance sur la maladie résiduelle sanguine au stade MRD2 (mrd2_sg, p=0,063, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var).

• NQO1 (rs1800566)

NQO1 code pour une NAD(P)H quinone déshydrogénase 1, enzyme catalysant la réaction NAD(P)H + quinone <=> NAD(P)(+) + hydroquinone. De nombreuses quinones sont ainsi réduites comme la vitamine K. Cependant, les anthracyclines ne semblent pas être un substrat de NQO1, l'effet de NQO1 porterait sur la sensibilisation des cellules aux anthracyclines. Ce SNP rs1800566 accélère la dégradation de NQO1 conduisant à une moindre efficacité de la doxorubicine dans les LAM⁸³.

rs1800566 (SNP9, P149S)

Le SNP rs1800566 est localisé au niveau des nucléotides 69.745.145 (hg19) ou 69.711.242 (hg38) du chromosome 16, modifiant l'acide aminé 149 de proline en sérine. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et montrent une couverture NGS unique sur le chromosome 16 entre les bases 69.711.111 et 69.711.272 (hg38) à 100% d'identité.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 69 patients CBF2006 dont 58 avaient un résultat de MRD1. 48 patients sont wt/wt, 17 sont var/wt et 4 sont var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 70% wt/wt (attendu 52% pour une MAF de 0,28), 25% wt/var (attendu 40%) et de 6% var/var (attendu 8%). Ce polymorphisme est associé à une tendance sur la maladie résiduelle sanguine au stade MRD2 (logratiomrd2mrd1, p=0,079, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var) (cf.Figure SNP rs1800566, Annexe 5).

• SLC22A16 (rs714368 et rs12210538)

SLC22A16 code pour un transporteur transmembranaire de cations (solute carrier family 22 member 16). SLC22A16 est le médiateur de l'import de la doxorubicine dans les cellules⁸⁴.

rs714368 (SNP5, M326T)

Le SNP rs714368 est localisé au niveau des nucléotides 110.778.128 (hg19) ou 110.456.925 (hg38) du chromosome 6, modifiant l'acide aminé 326 de méthionine en thréonine. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et montrent une couverture NGS unique sur le chromosome 6 entre les bases 110.456.820 et 110.456.956 (hg38) à 100% d'identité.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 68 patients CBF2006 dont 57 avaient un résultat de MRD1. 45 patients sont wt/wt, 20 sont var/wt et 3 sont var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 66% wt/wt (attendu 48% pour une MAF de 0,31), 29% wt/var (attendu 43%) et de 4% var/var (attendu 10%). Ce polymorphisme est associé à une différence significative au stade de la MRD4 (logratiomrd4mrd3, p=0,036, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var) et à une tendance pour celle de la MRD3 (logratiomrd3mrd2, p=0,083, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var) (Figure SNP rs714368, Annexe 5). Cependant, il est important de noter que la réponse au stade MRD4 n'est retrouvée que pour les patients hétérozygotes wt/var pour ce SNP, les patients wt/wt et var/var ayant la même réponse moléculaire.

rs12210538 (SNP22, H49R)

Le SNP rs12210538 est localisé au niveau des nucléotides 110.760.008 (hg19) ou 110.438.805 (hg38) du chromosome 6, modifiant l'acide aminé 49 d'histidine en arginine. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et montrent une couverture NGS unique sur le chromosome 6 entre les bases 110.438.729 et 110.438.864 (hg38) à 100% d'identité.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 70 patients CBF2006 dont 59 avaient un résultat de MRD1. 35 patients sont wt/wt, 27 sont var/wt et 8 sont var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 50% wt/wt (attendu 79% pour une MAF de 0,11), 39% wt/var (attendu 20%) et de 11% var/var (attendu 1%). Ce polymorphisme est associé à une tendance à l'augmentation de la maladie résiduelle au niveau de la MRD4 (logratiomrd4diag, p=0,097, test de Mann-

61

Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var) (Figure SNP rs12210538, Annexe 5). Cependant, il est important de noter que la réponse au stade MRD4 n'est retrouvée que pour les patients hétérozygotes wt/var pour ce SNP, les patients wt/wt et var/var ayant la même réponse moléculaire.

• SOD2 (rs4880)

SOD2 code pour la superoxide dismutase 2 catalysant la réaction2 : superoxide + 2 H(+) <=> O(2) + H(2)O(2), conduisant à la réduction des radicaux oxygénés dans la mitochondrie.

rs4880 (SNP2, V16A)

Le SNP rs4880 est localisé au niveau des nucléotides 160.113.872 (hg19) ou 159.692.840 (hg38) du chromosome 6, modifiant l'acide aminé 16 de valine en alanine. Les produits PCR générés par les amorces de ce SNP ont été analysés et montrent une couverture NGS unique sur le chromosome 6 entre les bases 159.692.756 et 159.692.885 (hg38) à 100% d'identité.

L'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 64 patients CBF2006 dont 53 avaient un résultat de MRD1. 19 patients sont wt/wt, 24 sont var/wt et 21 sont var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 30% wt/wt (attendu 40% pour une MAF de 0,37), 38% wt/var (attendu 47%) et de 33% var/var (attendu 14%). Aucun impact de ce polymorphisme n'a pu être identifié sur la réponse moléculaire.

3.1.c SNP ayant un impact notable sur la réponse moléculaire du protocole CBF2006

Métabolisme de l'aracytine

Le polymorphisme rs2125739 d'ABCC10 (I948T) a un impact notable sur la maladie résiduelle au stade MRD1 et MRD3 ainsi que sur les décroissances entre le

stade MRD3 par rapport au diagnostic, de la MRD3 par rapport à la MRD2 et de la MRD4 par rapport à la MRD3. La réponse moléculaire est meilleure pour les patients ayant une thréonine.

Le polymorphisme rs1130609 de RRM2 (S59A) a un impact notable sur la maladie résiduelle au stade MRD2, approchant la significativité aux stades MRD3 et MRD4. La réponse moléculaire est meilleure pour les patients ayant une sérine.

Les polymorphismes rs2942194 (R77Q) et rs3736032 (I87V) de SLC25A37 ont un impact notable sur la maladie résiduelle uniquement au stade tardif MRD4. Cependant, l'effet n'est retrouvé que pour les patients hétérozygotes wt/var pour le SNP rs2942194 et n'est retrouvé que pour la maladie résiduelle sanguine pour le SNP rs3736032.

Au final, les polymorphismes rs2125739 d'ABCC10 et rs1130609 de RRM2 représentent les meilleurs candidats pouvant influencer la chimiothérapie comportant de l'aracytine.

Métabolisme de la daunorubicine

Le polymorphisme rs2032582 d'ABCB1 (S82A) a un impact notable uniquement entre les stades MRD1 et MRD2 et n'est retrouvé que pour les patients hétérozygotes.

Le polymorphisme rs2231142 d'ABCG2 (Q141K) a un impact notable aux stades MRD3 et MRD4. La réponse moléculaire est meilleure pour les patients ayant une glutamine.

Le polymorphisme rs12529 d'AKR1C3 (K104N) a un impact notable au stade MRD2. Cependant, la réponse moléculaire est opposée entre la MRD2 sanguine et celle entre la MRD2 et le diagnostic ainsi que celle entre MRD3 et MRD4.

63

Le polymorphisme rs714368 de SLC22A16 (M326T) a un impact notable au stade de la MRD4. Cependant, cette réponse n'est retrouvée que pour les patients hétérozygotes wt/var.

Au final, seul le polymorphisme rs2231142 d'ABCG2 représente le meilleur candidat pouvant influencer la chimiothérapie comportant de la daunorubicine.

3.2 Survie globale

Afin de confirmer la tendance qu'ont les 3 polymorphismes rs2231142 d'ABCG2, rs2125739 d'ABCC10 et rs1130609 de RRM2 à entraîner une modification de la réponse des patients aux chimiothérapies de la LAM, les données de survie leur correspondant ont été étudiées sur les 70 patients génotypés dans la 1^{ère} phase.

Dans le cas du polymorphisme rs2125739 de l'ABCC10, on observe une amélioration significative du pronostic des patients mutés par rapport aux patients ayant les 2 allèles sauvages.



Figure 14 : Survie globale (A.) et survie sans événement (B.) des 70 patients CBFB-MYH11 mutés et sauvages pour le polymorphisme rs2125739 de l'ABCC10

Pour le polymorphisme rs2231142 de l'ABCG2, la survie sans événement semble légèrement diminuer chez les patients mutés par rapports aux patients possédant les 2 allèles sauvages. Toutefois, cette tendance n'est pas statistiquement significative (p : 0,478).



Figure 15 : Survie globale (A.) et survie sans événement (B.) des 70 patients CBFB-MYH11 mutés et sauvages pour le polymorphisme rs2231142 de l'ABCG2

Cette tendance à la diminution de la survie est également observée pour le polymorphisme rs1130609 de la RRM2, autant pour la survie globale que sans événement. De la même manière que pour le polymorphisme rs2231142 de l'ABCG2, les résultats sont non statistiquement significatifs.



Figure 16 : Survie globale (A.) et survie sans événement (B.) des 70 patients CBFB-MYH11 mutés et sauvages pour le polymorphisme rs1130609 de la RRM2

En résumé, 3 variants de structure parmi les 20 étudiés ont été corrélés à une MRD modifiée chez 70 patients du protocole CBF2006. Parmi ces 3 variants, seul celui de l'ABCC10 (rs2125739) entraîne une survie globale et sans événement significativement meilleure que le phénotype sauvage sur un échantillonnage de 70 patients CBFB-MYH11 traités dans le protocole CBF2006.

4. Analyses de validation des 3 SNP

La cohorte de validation est composée de 173 patients sur les 198 inclus dans le protocole CBF2006 ainsi que de 278 patients sur les 323 inclus dans le protocole LAM2006IR. Seuls les 3 variants ayant présenté des résultats significatifs en terme de maladie résiduelle dans la 1^{ère} partie de l'étude sont testés.

4.1 Protocole CBF2006

173 patients de la cohorte CBF2006 serviront à valider les résultats précédemment obtenus sur une population restreinte issue du même protocole. Le bras AML1-ETO comporte 78 patients, le bras CBFB-MYH11 en comporte 95.

4.1.a Réponses moléculaires CBFB-MYH11 et AML1-ETO

• RRM2 (rs1130609)

Pour le bras AML1-ETO, l'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 78 patients. 45 patients sont wt/wt, 28 sont var/wt et 5 patients var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 58% wt/wt (attendu 42% pour une MAF de 0,35), 36% wt/var (attendu 46%) et de 6% var/var (attendu 12%). L'impact de ce polymorphisme est très significatif sur la maladie résiduelle au stade MRD2 (mrd2_mo, p=0,002, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var) ainsi que pour la réponse moléculaire entre le stade MRD2 et le diagnostic (logratiomrd2diag, p=0,007, test de Mann-Whitney, wt/wt vs wt/var et var/var). En revanche, ce polymorphisme n'a pas d'influence sur la maladie résiduelle au stades MRD1, MRD3 et MRD4, ni sur la réponse moléculaire entre les stades : MRD1 et le diagnostic, MRD4 et le diagnostic, MRD2 et MRD1, MRD3 et MRD3.

Pour le bras CBFB-MYH11, 95 patients ont été génotypés. 39 patients sont wt/wt, 40 sont var/wt et 16 patients var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 41% wt/wt (attendu 42% pour une MAF de 0,35), 42% wt/var (attendu 46%) et de 17% var/var (attendu 12%). Ce polymorphisme n'a pas d'influence sur la maladie résiduelle aux stades MRD1, MRD2, MRD3 et MRD4. Il n'a pas non plus d'influence sur la réponse moléculaire entre les stades : MRD1 et le diagnostic, MRD2 et le diagnostic, MRD3 et le diagnostic, MRD2 et MRD1, MRD2, MRD4 et le diagnostic, MRD2 et MRD1, MRD2, MRD4 et MRD3.

Au final, on ne retrouve l'impact sur la maladie résiduelle de ce polymorphisme que pour la MRD2 et la réponse moléculaire entre le stade MRD2 et diagnostic, mais, uniquement pour les 78 patients testés du bras AML1-ETO.

<u>ABCG2 (rs2231142)</u>

Pour le bras AML1-ETO, l'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 78 patients. 61 patients sont wt/wt, 17 sont var/wt et aucun var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 78% wt/wt (attendu 74% pour une MAF de 0,14), 22% wt/var (attendu 24%) et de 0% var/var (attendu 2%). Ce polymorphisme n'a pas d'influence sur les différentes maladies résiduelles ni sur la réponse moléculaire entre les stades : MRD1 et le diagnostic, MRD2 et le diagnostic, MRD3 et le diagnostic, MRD4 et le diagnostic, MRD2 et MRD1, MRD3 et MRD2, MRD4 et MRD3.

Pour le bras CBFB-MYH11, 95 patients ont été génotypés. 74 patients sont wt/wt, 21 sont var/wt et aucun var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 78% wt/wt (attendu 74% pour une MAF de 0,14), 22% wt/var (attendu 24%) et de 0% var/var (attendu 2%). De la même manière que pour le bras AML1-ETO, nous ne retrouvons pas d'impact moléculaire de ce polymorphisme en terme de maladie résiduelle.

Au final, nous ne confirmons pas l'impact sur la maladie résiduelle que nous avions observé lors de l'étude des 70 patients CBFB-MYH11.

• ABCC10 (rs2125739)

Pour le bras AML1-ETO, l'analyse de la réponse sur la maladie résiduelle a porté sur 77 patients. 38 patients sont wt/wt, 33 sont var/wt et 6 patients var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 49% wt/wt (attendu 66% pour une MAF de 0,19), 43% wt/var (attendu 31%) et de 8% var/var (attendu 4%). Ce polymorphisme n'a pas d'influence sur les différentes maladies résiduelles ni sur la réponse moléculaire entre les stades : MRD1 et le diagnostic, MRD2 et le diagnostic,

MRD3 et le diagnostic, MRD4 et le diagnostic, MRD2 et MRD1, MRD3 et MRD2, MRD4 et MRD3.

Pour le bras CBFB-MYH11, 95 patients ont été génotypés. 51 patients sont wt/wt, 36 sont var/wt et 8 patients var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 54% wt/wt (attendu 66% pour une MAF de 0,19), 38% wt/var (attendu 31%) et de 8% var/var (attendu 4%). L'impact de ce polymorphisme est peu significatif sur la maladie résiduelle au stade MRD1, MRD2, MRD3 et MRD4 (p=0,04 wt/var vs var/var). Il est également peu significatif sur la réponse moléculaire entre les stades : MRD1 et le diagnostic, MRD2 et le diagnostic, MRD3 et le diagnostic, MRD4 et le diagnostic, MRD2 et MRD1, MRD2, MRD4 et MRD3.

Au final, l'impact moléculaire de ce polymorphisme n'est retrouvé qu'à la limite de la significativité uniquement chez les patients du bras CBFB-MYH11.

4.1.b Survie globale

Les 173 patients testés (AML1-ETO et CBFB-MYH11) porteurs du polymorphisme rs2125739 de l'ABCC10 possèdent une survie globale significativement améliorée (p=0,03) par rapport aux patients sauvages (Figure 17). Ce résultat est surtout marqué pour le génotype IT (wt/var).



Figure 17 : Survie globale (**A.** wt/wt vs wt/var et var/var) (**B.** wt/wt vs wt/var vs var/var) des 173 patients CBF pour le polymorphisme rs2125739 de l'ABCC10.

Les patients porteurs du polymorphisme rs1130609 de la RRM2 n'ont quant à eux pas de différence significative (p=0,91) en terme de survie avec les patients ayant un phénotype sauvage (Figure 18).



Figure 18 : Survie globale (**A.** wt/wt vs wt/var et var/var) (**B.** wt/wt vs wt/var vs var/var) des 173 patients CBF pour le polymorphisme rs1130609 de la RRM2.

Le polymorphisme rs2231142 de l'ABCG2 n'influence pas, lui non plus, la survie globale (p=0,89) des 172 patients CBF testés (Figure 19).



Figure 19 : Survie globale (wt/wt vs wt/var et var/var) des 172 patients CBF pour le polymorphisme rs2231142 de l'ABCG2.

Au final, ces résultats permettent de confirmer sur l'ensemble de la cohorte du protocole CBF l'influence sur la survie globale du polymorphisme rs21257739 de l'ABCC10. Les patients mutés ont une survie significativement améliorée par rapport aux patients sauvages

4.2 LAM2006IR

Les patients issus du protocole LAM2006IR nous permettent de tester la validité de ces résultats sur un groupe de patients de pronostic intermédiaire. Ce protocole a inclus 323 patients.

• <u>ABCC10 (rs2125739)</u>

Pour le polymorphisme rs2125739 de l'ABCC10, l'évaluation de la survie a porté sur 272 patients. 143 patients sont wt/wt, 111 sont var/wt et 18 patients var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 52% wt/wt (attendu 66% pour une MAF de 0,19), 41% wt/var (attendu 31%) et de 7% var/var (attendu 4%).

Dans ce cas aussi, le polymorphisme de l'ABCC10 influence la survie. Cependant, ici, la survie des patients mutés est significativement moins bonne que celle des patients non mutés (survie globale : p=0,06; survie sans événement : p=0,08). Cette tendance est plus nette pour le phénotype IT (wt/var) (Figure 20).



Figure 20 : Survie globale (**A.** wt/wt vs wt/var et var/var) (**B.** wt/wt vs wt/var vs var/var) et sans événement (**C.** wt/wt vs wt/var et var/var) (**D.** wt/wt vs wt/var vs var/var) des 272 patients LAM2006IR pour le polymorphisme rs2125739 de l'ABCC10.

• RRM2 (rs1130609)

Pour le polymorphisme rs1130609 de la RRM2, 270 patients ont été analysés. 145 patients sont wt/wt, 109 sont var/wt et 16 patients var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 54% wt/wt (attendu 42% pour une MAF de 0,35), 40% wt/var (attendu 46%) et de 6% var/var (attendu 12%).

Nous ne retrouvons pas d'influence sur la survie globale ni sur la survie sans événement (Figure 21) chez ces patients.


Figure 21 : Survie globale (**A.** wt/wt vs wt/var et var/var) (**B.** wt/wt vs wt/var vs var/var) et sans événement (**C.** wt/wt vs wt/var et var/var) (**D.** wt/wt vs wt/var vs var/var) des 270 patients LAM2006IR pour le polymorphisme rs1130609 de la RRM2.

• ABCG2 (rs2231142)

L'analyse de la réponse a porté sur 272 patients. 229 patients sont wt/wt, 43 sont var/wt et aucun var/var donnant respectivement les fréquences suivantes : 84% wt/wt (attendu 74% pour une MAF de 0,14), 16% wt/var (attendu 24%) et de 0% var/var (attendu 2%).

Aucune influence sur la survie globale ni sur la survie sans événement des patients LAM2006IR n'a été retrouvée pour ce polymorphisme (Figure 22).



Figure 22 : Survie globale (**A.** wt/wt vs wt/var) et sans événement (**B.** wt/wt vs wt/var) des 272 patients LAM2006IR pour le polymorphisme rs2231142 de l'ABCG2.

Au final, seul le polymorphisme rs2125739 de l'ABCC10 influence la réponse au traitement de manière significative en termes de maladie résiduelle et de survie sur l'ensemble des patients de ces 2 protocoles. Cependant, si la survie des patients du protocole CBF2006 est significativement améliorée chez les patients mutés (surtout hétérozygotes wt/var), elle est retrouvée altérée chez les patients du protocole LAM2006IR (là aussi surtout dans le groupe wt/var).

En revanche, nous ne trouvons aucun impact des polymorphismes étudiés de RRM2 et d'ABCG2 sur la survie des patients.

DISCUSSION

ABCC10 est la seule des protéines étudiées dont le variant de fonction est associé à une modification significative de la survie des patients. Cependant, les patients de bon pronostic du protocole CBF2006 ont une survie significativement meilleure s'ils présentent le polymorphisme rs2125739 tandis que la survie des patients de pronostic intermédiaire est moins bonne pour ce même polymorphisme. Une des explications peut être la différence de dose et d'intervalles de bloc de traitement entre ces 2 cohortes. Cette différence peut induire une efficacité du traitement ou, au contraire, une toxicité altérant le pronostic des patients.

1. Analyse des protocoles CBF2006 et LAM2006IR

Les principales différences entre les 2 protocoles résident donc dans :

- L'utilisation de Gemtuzumab pour un des 2 bras de LAM2006IR ;
- La présence d'une mini consolidation pour le protocole LAM2006IR ;
- L'absence d'anthracycline dans la consolidation de CBF2006 ;
- L'utilisation de hautes doses d'AraC pour la consolidation de CBF2006 alors que les patients de LAM2006IR sont soit allogreffés soit consolidés par Ara-C et anthracycline puis greffés.

Le gemtuzumab ozogamicine (GO) est un anticorps humanisé anti CD33 couplé à une anthracycline, la calichéamicine. Il a été retiré du marché suite aux résultats de l'étude du SouthWest Oncology Group (SWOG)⁸⁵. Cette étude comparait chez 637 adultes de moins de 60 ans les effets de l'ajout de la GO à une induction standard. Les 2 groupes présentaient des taux de réponse, une RFS et une OS comparables mais une augmentation de la mortalité à l'induction pour le groupe GO (5% dans le groupe GO + induction standard contre 1% pour l'induction seule).

Cependant, d'autres études semblent montrer une efficacité du GO sans augmentation de la toxicité. L'étude du Medical Research Council en Grande-Bretagne (MRC)⁸⁶ menée sur 1113 patients démontre que 70% des patients de risque intermédiaire ont une amélioration de leur OS à 5 ans s'ils reçoivent une dose de GO à l'induction. Tous les groupes de pronostic ne bénéficient toutefois pas de cet effet. L'étude du groupe français ALFA effectuée sur des patients de 50 à 70 ans associe elle aussi le GO à une meilleure EFS et OS pour les groupes de pronostic favorable et intermédiaire⁸⁷.

Diverses études ont permis de corréler l'efficacité du GO avec l'expression membranaire d'ABC transporteurs, en particulier ABCB1 (Pgp)^{88,89,90,91}. De même, la surexpression d'ABCB1 diminue la toxicité du GO *in vitro*⁹². Cependant aucune étude n'a été menée afin de mettre en évidence que le GO était également substrat d'autres ABC transporteurs. Or, une différence d'efflux par l'ABCC10 pourrait dans notre cas, en partie expliquer les différences de résultats entre nos 2 cohortes par le

biais d'une augmentation de la toxicité du médicament. En effet, le polymorphisme rs2125739 induit une diminution de l'activité de l'ABCC10 et donc une diminution de l'efflux des drogues qui en sont substrat. Si le GO est moins efflué par les cellules, sa toxicité via une accumulation intracellulaire peut être augmentée.

A contrario, l'augmentation de la survie observée chez les patients CBF2006 possédant le polymorphisme rs2125739 peut être expliquée par les différences de doses d'Ara-C reçues entre ces 2 protocoles (voir Figure 23 ci-dessous). En effet, 2 des bras d'induction des protocoles CBF2006 (bras G) et LAM2006IR (bras B) sont strictement identiques. Cependant, il existe des différences importantes en terme de doses d'Ara-C dans leurs schémas de consolidation:

- 3 consolidations à 6 g/m²/j sur 3 jours discontinus pour CBF2006 soit 54 g/m² au total (Ara-C reçu seul) ;
- 2 consolidations à 2 g/m²/j sur 5 jours en continu pour LAM2006IR soit
 20 g/m² au total (Ara-C associé à une anthracycline).

Les patients CBF2006 ont donc reçu lors de leurs cycles de consolidation des doses d'Ara-C 2,7 fois plus importantes que les patients issus du protocole LAM2006IR. La cytarabine étant substrat d'ABCC10, une diminution de l'efficacité de ce transporteur chez les patients possédant le polymorphisme rs2125739 peut entraîner une accumulation cellulaire d'Ara-C. Cela peut ainsi engendrer une augmentation de son efficacité expliquant la survie augmentée des patients mutés issus du protocole CBF2006. Cet effet n'est peut-être pas visible chez les patients issus du protocole LAM2006IR du fait des doses sensiblement plus faibles d'Ara-C reçues.







Figure 23 : Schémas simplifiés des protocoles thérapeutiques CBF2006 (**A**) et LAM2006IR (**B**)

2. Cytarabine : variant de structure, surexpression

La résistance à l'Ara-C peut être imputable à :

- De trop faibles taux ou une trop faible activité d'hENT1 ;
- Des niveaux réduits d'enzymes activatrices, surtout dCK ;
- Des niveaux augmentés d'enzymes inactivatrices (DCA, NT5C, SAMHD1...);
- Une augmentation des pools cellulaires de dCTP ;
- Une hyperexpression de protéines d'efflux (ABC transporteurs) ;
- Des mutations de la ribonucléotide réductase.

L'hENT1 est un transporteur permettant la captation cellulaire d'analogues nucléosidiques tels que l'Ara-C, la gemcitabine, la cladribine, la fludarabine. Il est responsable de 80% du passage cytoplasmique de l'Ara-C. Chez les patients atteints de LAM, de grandes variations dans les taux d'expressions d'ARNm ont été retrouvées. De plus, des études de toxicité *in vitro* ont permis de montrer qu'il existait une relation inversement proportionnelle entre l'expression de hENT1 et les doses létales 50% en ce qui concerne l'Ara-C et les autres analogues nucléosidiques⁹³.

La déoxycytidine kinase est une enzyme impliquée dans la phosphorylation de la désoxycytidine, la désoxyguanosine et la désoxyadénosine. Cette enzyme représente l'étape limitante de l'activation d'analoges nucléosidiques tels que : Ara-C, gemcitabine, cladribine, fludarabine and clofarabine. Une perte ou réduction de l'activité dCK a été reliée à une résistance à l'Ara-C dans des lignées cellulaires⁹⁴ tandis que la transfection de la dCK à des lignées cellulaires qui en étaient dépourvues restaure *in vitro* la sensibilité à l'Ara-C⁹⁵.

Les 5'nucléotidases sont un groupe d'enzymes possédant différentes spécificités de substrat qui catalysent la déphosphorylation de ribo- et désoxyribonucléosides phosphate. La NT5C2 « cytosolic 5'nucleotidase II » est exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus humains. Une augmentation de son expression a été corrélée avec une résistance aux analogues nucléosidiques tels que l'Ara-C, la cladribine et la gemcitabine⁹⁶. Des concentrations élevées en NT5C2 ont été associées à de plus faibles DFS et OS chez des patients adultes atteints de LAM⁹⁷.

Les étapes de désamination jouent un rôle essentiel dans la réponse à la cytarabine. La cytidine désaminase est présente dans les granuleux, le plasma, le foie et les érythrocytes. Elle convertit l'Ara-C en Ara-U. Il semble que des taux élevés de cette enzyme pourraient être associés à une résistance à l'Ara-C^{98,99,100}. L'Ara-CMP est quant à elle convertie en Ara-UMP par la déoxycytidylate désaminase. Aucune étude n'a clairement pu établir à ce jour un rôle de cette enzyme dans la résistance aux inhibiteurs nucléosidiques.

SAMHD1 est une désoxynucléoside triphosphate (dNTP) triphosphohydrolase clivant physiologiquement les dNTP en désoxyribonucléosides. Son rôle dans la réponse à l'AraC dans le cadre des LAM a été démontré *in vitro*¹⁰¹. 13 lignées cellulaires ont été testées pour leur sensibilité à l'AraC. Sur ces lignées, le taux de protéine SAMHD1 et ses niveaux d'ARNm sont inversement corrélés avec la sensibilité à la cytarabine. La même étude corrèle également *in vivo* chez la souris la présence de SAMHD1 avec une diminution de la survie. De plus, sur une cohorte de 150 patients, le taux de SAMHD1 est significativement plus élevé chez ceux n'ayant pas obtenu une réponse complète. Cette protéine pourrait constituer à l'avenir un biomarqueur prédictif de la réponse à l'AraC. De plus, Vpx, une protéine issue du virus simien SIV, diminue les taux de SAMHD1 via une augmentation de sa dégradation par le protéasome, et rend les cellules *in vitro* et *ex vivo* plus sensibles au traitement par la cytarabine¹⁰². Sa transfection chez l'Homme pourrait être une voie de traitement des LAM.

Les ABC transporteurs sont une famille de 48 transporteurs transmembranaires répartis en 7 sous-familles d'ABCA à ABCG selon leurs homologies structurales. Ils sont tous, sauf exception chez l'Homme, des transporteurs d'efflux. Ils possèdent deux domaines intracellulaires appelés NBD (nucleotide binding domain) capables de fixer l'ATP ainsi que deux domaines transmembranaires TMD (transmembranary domain)¹⁰³. Les domaines transmembranaires semblent adopter une position dite « inward-facing conformation » sans ligand à exporter. L'arrivée du ligand permet aux domaines NBD de lier 2 molécules d'ATP, de se dimériser ce qui entraîne une modification de la conformation des domaines TMD (« outward-facing conformation»)

et ainsi libère le substrat vers le milieu extérieur. L'hydrolyse des molécules d'ATP permet le retour à la conformation initiale¹⁰⁴.



Figure 24 : Mécanisme de fonctionnement d'un ABC transporteur (d'après Wilkens.S) D : Drogue ; NBD : Nucleotide binding domain ; TMD : Transmembranary domain

Les ABC transporteurs sont nombreux au niveau des cellules souches hématopoïétiques et jouent un rôle dans l'hématopoïèse¹⁰⁵. Ils protègent notamment les cellules souches contre les xénobiotiques et efflueraient les facteurs de différenciation de ces cellules¹⁰⁶.

ABCC10 (MRP7) est un des ABC transporteurs découverts le plus récemment (2001). Son rôle dans la résistance aux agents anticancéreux a d'abord été démontré sur les taxanes dans le cancer du sein. En 2009, l'effet *in vitro* sur l'efflux de l'AraC est étudié¹⁰⁷. Cet efflux fait appel à des mécanismes non glutathiondépendants et diffère ainsi de celui observé chez 2 transporteurs de la même famille MRP1 et MRP2. D'après cette même étude, ABCC10 est également impliqué dans l'efflux de daunorubicine chez des fibroblastes d'embryons murins déficients en MDP1 et MDR. Son rôle *in vivo* est ensuite démontré dans l'efflux d'AraC. On observe également une accumulation intracellulaire de drogue en cas d'ajout d'inhibiteur d'ABCC10^{108,109}.

Le polymorphisme rs2125739 de ce transporteur (Thymine>Cytosine) entraîne le remplacement d'une isoleucine par une thréonine en position 948. Sa fréquence allélique est de 20% dans la population générale et de 23% chez les Européens. Cette mutation se situerait dans le site d'épissage de la protéine et induirait une déstabilisation de celle-ci. Ce polymorphisme a été étudié dans le VIH où il est associé à une diminution des concentrations sériques en névirapine¹¹⁰. Il est également associé avec une augmentation de la toxicité rénale du ténofovir par diminution de son excrétion tubulaire¹¹¹ bien que cela soit remis en cause par une étude récente¹¹². L'implication de ce polymorphisme dans la résistance à la cytarabine n'a pas été étudiée à ce jour.

La ribonucléotide réductase (RR) catalyse la réduction des ribonucléotides en leurs désoxyribonucléotides correspondants. Il s'agit d'un dimère composé de 2 sous-unités : RRM1 et RRM2. La sous-unité RRM1 permet de lier le substrat, la sous-unité RRM2, constituée notamment d'un centre ferrique, d'un atome d'oxygène, et d'un radical tyrosyl est essentielle à l'action de l'enzyme¹¹³. La ribonucléotide réductase joue un rôle important dans le devenir des cellules. Elle a été associée au développement de nombreux types de cancer. RRM2 joue notamment un rôle dans la néoangiogénèse, et la génération de métastases. La RR régule les pools intracellulaires de dCTP qui est impliqué dans la résistance à l'Ara-C. Sa sous-unité M2 a été impliquée dans la résistance à divers agents anticancéreux tels que la gemcitabine ou l'hydroxyurée¹¹⁴. Un haut niveau d'expression de RRM2 a été corrélé à un mauvais pronostic chez 54 patients possédant une LAM. Dans cette même étude, les patients résistants à la cytarabine avaient un plus haut niveau d'expression de RRM2¹¹⁵.

Le polymorphisme rs1130609 de ce transporteur (Guanine>Thymine) entraîne le remplacement d'une sérine par une alanine en position 59. Une seule étude est publiée à ce jour à propos de ce polymorphisme et de son implication dans la réponse aux traitements par LAM¹¹⁶. Dans cette étude ce polymorphisme entraîne

82

une augmentation de la sensibilité des cellules à l'AraC ainsi qu'une augmentation de l'EFS et de l'OS. Toutefois, cette étude ne porte que sur 87 patients dont seulement 4 sont homozygotes TT.

De nombreux autres polymorphismes ont montré un impact *in vitro* sur la toxicité de la cytarabine, bien que toutefois le rôle des protéines touchées par ces polymorphismes demeure souvent inconnu¹¹⁷.

3. Daunorubicine : variant de structure, surexpression

Les mécanismes de résistance à la daunorubicine sont variés. Un des principaux est la diminution de l'accumulation intracellulaire du médicament. Cette diminution est souvent médiée par les ABC transporteurs, dont deux d'entre eux sont connus pour effluer les anthracyclines : ABCB1 (P-glycoprotéine), ABCG2¹¹⁸ (B-CRP). La protection des cellules contre le stress oxydatif peut également jouer un rôle dans la résistance aux anthracyclines¹¹⁹ tout comme l'altération qualitative ou quantitative de l'enzyme cible la topoisomérase II¹²⁰.

Des modifications des voies de signalisation conduisant à l'apoptose en aval de l'action de la DNR, via la surexpression de BCL2 par exemple, entraînent, *in vitro*, une diminution de l'efficacité de cette classe médicamenteuse⁴¹. Enfin, une activité augmentée des enzymes de détoxification de la DNR peut engendrer une perte d'activité^{45,121}.

Toutefois, l'étude de 13 SNP de gènes codant pour des réductases impliquées dans la détoxification de la DNR ne montre pas de corrélation avec la réponse au traitement, malgré le fait que 5 d'entre eux aient un effet *in vitro*¹²².

ANTHRACYCLINES



Figure 25 : Mécanismes de résistance aux anthracyclines (d'après Beretta et al.)

La daunorubicine est un substrat de ABCB1 (P-glycoprotéine). Certains polymorphismes de ce transporteur (C1236T, G2677T) sont associés à une plus grande sensibilité *in vitro* aux anthracyclines ainsi qu'*in vivo* à une survie réduite des patients, probablement par augmentation de la toxicité de la DNR¹²³.

ABCG2 ou BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) a pour particularité de posséder un seul domaine NBD et 6 domaines TMD¹²⁴. Il s'agit d'une protéine fonctionnant sous forme d'homo-dimères ou d'homo-multimères¹²⁵. Elle est notamment très fortement exprimée au niveau des cellules souches. Il s'agit d'un transporteur des folates endogènes ainsi que de l'acide urique. La daunorubicine est un des principaux substrats de ce transporteur¹²⁶. Cela peut expliquer qu'il soit 10 fois plus exprimé chez des patients souffrant de LA n'ayant pas atteint la rémission après l'induction par rapport aux patients l'ayant atteinte¹²⁷. De plus, la surexpression d'ABCG2 chez des patients allogreffés pour une LAM est un facteur de risque de rechute¹²⁸.

Le polymorphisme rs2231142 de ce transporteur (Guanine>Thymine) entraîne le remplacement d'une glutamine par une lysine en position 141. Il entraîne une diminution des capacités d'efflux de la protéine via une diminution de sa stabilité¹²⁹, une légère diminution de son expression¹³⁰, et une augmentation de sa dégradation par le protéasome¹³¹. Au niveau physiologique, l'ABCG2 effluera de façon moins efficace l'acide urique dans l'urine ce qui engendrera l'apparition de crises de goutte¹³². Toutefois, l'influence de ce polymorphisme sur les paramètres pharmacocinétiques des anthracyclines est peu claire¹³³. Les études publiées à ce jour ne retrouvent pas de corrélation significative dans le cadres des LAM entre ce polymorphisme et une modification de la survie des patients¹³⁴, même si une étude récente l'associe avec une augmentation de la toxicité cardiaque et pulmonaire¹³⁵.

4. Limites de l'étude

Parmi les limites de notre étude, nous pouvons citer l'absence de patients de mauvais pronostic. Nous pouvons également citer le fait que les patients de nos deux cohortes n'aient pas reçu les mêmes traitements avec les mêmes blocs thérapeutiques. L'introduction du gemtuzumab, en particulier, retiré du marché du fait de sa toxicité, a pu créer un biais dans nos résultats. Il est également à noter que la valeur p de la survie globale et sans événement des patients de la cohorte LAM2006IR est à la limite de la significativité.

L'absence de modèle *in vitro* constitue également une limite. L'utilisation de techniques de génie génétique telles que les systèmes de type CRISPR-Cas9 sur des lignées myéloïdes nous permettrait de recréer *in vitro* les polymorphismes étudiés *in vivo* : en particulier, celui ABCC10 pour lequel nous observons une association avec le pronostic des patients mais une discordance entre nos cohortes. L'observation de la toxicité ainsi que la mesure des concentrations en médicaments sur nos lignées offrirait des pistes afin de mieux comprendre nos résultats. Cela permettrait également de tester l'efflux éventuel de gemtuzumab par ABCC10.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Il est ressorti de notre étude qu'il existe une corrélation entre la maladie résiduelle de patients atteints de LAM de bon pronostic et des variants de structures fréquents de 3 protéines (ABCC10, ABCG2, RRM2) impliquées dans le métabolisme des 2 principaux traitements des LAM : la daunorubicine et la cytarabine. Nous avons pu mettre en évidence que seul le polymorphisme de l'ABCC10 était corrélé à une survie modifiée des patients.

Nous avons ensuite pu confirmer ces résultats sur un panel étendu de patients présentant une hétérogénéité dans le pronostic. Toutefois, si l'on retrouve que seul le polymorphisme de l'ABCC10 engendre une variation dans la survie, les résultats de la cohorte des patients de pronostic intermédiaire sont discordants de ceux de la cohorte de bon pronostic. En effet, le polymorphisme rs2125739 de l'ABCC10 confère une meilleure survie pour les patients de bon pronostic, tandis qu'il entraîne une diminution de la survie pour les patients de pronostic intermédiaire. Ceci peut être imputable aux différences de schémas thérapeutiques reçus ou plus simplement à la pathologie en elle-même (physiopathologie et biologie de la LAM différentes entre les LAM CBF et celles de pronostic intermédiaire).

Ces résultats sont à mettre en parallèle avec le fait que les patients des deux cohortes n'ont pas reçu le même schéma thérapeutique de traitement de leur LAM. Il serait également intéressant de tester l'effet de ce polymorphisme sur la réponse au traitement de patients de mauvais pronostic qui n'ont pas été inclus dans notre étude. De plus, l'absence de modèle *in vitro* ne nous permet pas de confirmer les résultats observés *in vivo* ni de tester les différentes hypothèses permettant d'expliquer la discordance dans nos résultats tel qu'un excès de toxicité du gemtuzumab.

S'il venait à confirmer nos résultats, le modèle *in vitro* offrirait de nouvelles perspectives dans la prise en charge des patients atteints de leucémie aiguë myéloïde. Récemment, des molécules comme le masitinib ont fait leur apparition sur le marché. Il s'agit d'un dérivé phénylaminothiazole inhibiteur des récepteurs de tyrosine kinase de classe III. Il inhibe notamment le récepteur c-Kit, le PDGF α et β et

la tyrosine kinase LYN. Il n'est pas actif envers les kinases dont l'inhibition a été associée à des effets indésirables importants telles que BCR-ABL1, VGF, EGF. Son utilisation en essais cliniques a montré un rapport bénéfice/risque favorable dans les cancers gastro-intestinaux et pancréatiques^{136,137}. Il a démontré *in vitro* une efficacité dans l'inhibition d'ABCG2¹³⁸ avec en particulier une diminution de l'efflux de doxorubicine. Il a également montré une efficacité dans l'inhibition de l'efflux de paclitaxel médiée par ABCC10¹³⁹. Son utilisation dans le cadre des LAM pourrait être bénéfique sur des patients présentant une activité augmentée de certains de leurs transporteurs de la famille ABC.

Cette étude a donc permis de démontrer un lien entre un variant de structure d'une protéine impliquée dans la réponse à la cytarabine (ABCC10, I948T) et une modification de la survie des patients. L'addition de groupes de patients de mauvais pronostic et d'un modèle *in vitro* à notre étude permettrait de mieux comprendre et d'approfondir nos résultats.

Si le lien entre ce polymorphisme et la survie des patients atteints de LAM était confirmé, cela pourrait ouvrir la voie vers de nouvelles perspectives thérapeutiques : modulation des doses de cytarabine et de daunorubicine en fonction du profil génétique et/ou ajout de modulateurs de transporteurs tels que le masitinib.

Bibliographie

1. Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012 / Available at: http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-etsyntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2013/Estimation-nationale-de-lincidence-des-cancers-en-France-entre-1980-et-2012. (Accessed: 5th August 2017)

 Lichtman, M. A. A historical perspective on the development of the cytarabine (7days) and daunorubicin (3days) treatment regimen for acute myelogenous leukemia: 2013 the 40th anniversary of 7+3. *Blood Cells. Mol. Dis.* **50**, 119–130 (2013).

3. Rowe, J. M. Optimal induction and post-remission therapy for AML in first remission. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 396–405 (2009). doi:10.1182/asheducation-2009.1.396

4. Vardiman, J. W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **114**, 937–951 (2009).

5. Maynadié, M. *et al.* Survival of European patients diagnosed with myeloid malignancies: a HAEMACARE study. *Haematologica* **98**, 230–238 (2013).

6. Pulte, D., Gondos, A. & Brenner, H. Improvements in survival of adults diagnosed with acute myeloblastic leukemia in the early 21st century. *Haematologica* **93**, 594–600 (2008).

7. Haferlach, T., Kern, W., Schnittger, S. & Schoch, C. Modern diagnostics in acute leukemias. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **56**, 223–234 (2005).

8. Mrózek, K. & Bloomfield, C. D. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 169–177 (2006). doi:10.1182/asheducation-2006.1.169

9. Grimwade, D. *et al.* Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* **116**, 354–365 (2010).

10. Cheson, B. D. *et al.* Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 4642–4649 (2003).

11. Dombret, H. & Gardin, C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood* **127**, 53–61 (2016).

12. Fernandez, H. F. *et al.* Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1249–1259 (2009).

13. Löwenberg, B. *et al.* High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1235–1248 (2009).

14. Lee, J.-H. *et al.* A randomized trial comparing standard versus high-dose daunorubicin induction in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **118**, 3832–3841 (2011).

15. Burnett, A. K. *et al.* A randomized comparison of daunorubicin 90 mg/m2 vs 60 mg/m2 in AML induction: results from the UK NCRI AML17 trial in 1206 patients. *Blood* **125**, 3878–3885 (2015).

16. Weick, J. K. *et al.* A randomized investigation of high-dose versus standard-dose cytosine arabinoside with daunorubicin in patients with previously untreated acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* **88**, 2841–2851 (1996).

17. Bishop, J. F. et al. A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia. Blood 87, 1710–1717 (1996).

Hills, R. K. et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy 18. in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. Lancet Oncol. 15, 986–996 (2014).

Serve, H. *et al.* Sorafenib in combination with intensive chemotherapy in elderly 19. patients with acute myeloid leukemia: results from a randomized, placebo-controlled trial. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 31, 3110-3118 (2013).

20. Mayer, R. J. et al. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. N. Engl. J. Med. **331**, 896–903 (1994).

Koreth, J. et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in 21. first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. JAMA 301, 2349-2361 (2009).

Russell, N. H. et al. A comparative assessment of the curative potential of reduced 22. intensity allografts in acute myeloid leukaemia. Leukemia 29, 1478–1484 (2015).

23. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Acute Myeloid Leukemia - aml.pdf. Available at: http://williams.medicine.wisc.edu/aml.pdf. (Accessed: 25th May 2017)

Dombret, H. et al. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care 24. regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. *Blood* **126**, 291-299 (2015).

Grant, S. Ara-C: cellular and molecular pharmacology. Adv. Cancer Res. 72, 197-25. 233 (1998).

26. Yoshida, S., Yamada, M. & Masaki, S. Inhibition of DNA polymerase-alpha and beta of calf thymus by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-5'-triphosphate. Biochim. Biophys. Acta 477, 144–150 (1977).

Plagemann, P. G., Marz, R. & Wohlhueter, R. M. Transport and metabolism of 27. deoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine into cultured Novikoff rat hepatoma cells, relationship to phosphorylation, and regulation of triphosphate synthesis. Cancer Res. 38, 978–989 (1978).

28. Furth, J. J. & Cohen, S. S. Inhibition of mammalian DNA polymerase by the 5'triphosphate of 1-beta-d-arabinofuranosylcytosine and the 5'-triphosphate of 9-beta-darabinofuranoxyladenine. Cancer Res. 28, 2061–2067 (1968).

29. Mikita, T. & Beardsley, G. P. Functional consequences of the arabinosylcytosine structural lesion in DNA. Biochemistry (Mosc.) 27, 4698–4705 (1988).

Momparler, R. L. & Fischer, G. A. Mammalian deoxynucleoside kinase. I. 30. Deoxycytidine kinase: purification, properties, and kinetic studies with cytosine arabinoside. J. Biol. Chem. 243, 4298-4304 (1968).

Coleman, C. N., Stoller, R. G., Drake, J. C. & Chabner, B. A. Deoxycytidine kinase: 31. properties of the enzyme from human leukemic granulocytes. *Blood* 46, 791–803 (1975).

Lamba, J. K. Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics* 32. **10,** 1657–1674 (2009).

33. Ohno, Y., Spriggs, D., Matsukage, A., Ohno, T. & Kufe, D. Effects of 1-beta-Darabinofuranosylcytosine incorporation on elongation of specific DNA sequences by DNA polymerase beta. Cancer Res. 48, 1494–1498 (1988).

Major, P. P., Egan, E. M., Herrick, D. J. & Kufe, D. W. Effect of ARA-C incorporation 34. on deoxyribonucleic acid synthesis in cells. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 2937–2940 (1982).

Iacobini, M. et al. Involvement of oxygen radicals in cytarabine-induced apoptosis 35.

in human polymorphonuclear cells. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 1033–1040 (2001).

36. Hawtrey, A. O., Scott-Burden, T. & Robertson, G. Inhibition of glycoprotein and glycolipid synthesis in hamster embryo cells by cytosine arabinoside and hydroxyurea. *Nature* **252**, 58–60 (1974).

37. Dimarco, A., Gaetani, M., Dorigotti, L., Soldati, M. & Bellini, O. [EXPERIMENTAL STUDIES OF THE ANTINEOPLASTIC ACTIVITY OF A NEW ANTIBIOTIC, DAUNOMYCIN]. *Tumori* **49**, 203–217 (1963).

38. Andreev, E., Brosseau, N., Carmona, E., Mes-Masson, A.-M. & Ramotar, D. The human organic cation transporter OCT1 mediates high affinity uptake of the anticancer drug daunorubicin. *Sci. Rep.* **6**, 20508 (2016).

39. Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J. & Henikoff, S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **1845**, 84–89 (2014).

40. Beretta, G. L. & Zunino, F. Molecular mechanisms of anthracycline activity. *Top. Curr. Chem.* **283**, 1–19 (2008).

41. Swift, L. P., Rephaeli, A., Nudelman, A., Phillips, D. R. & Cutts, S. M. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Res.* **66**, 4863–4871 (2006).

42. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. & Gianni, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* **56**, 185–229 (2004).

43. Marnett, L. J., Riggins, J. N. & West, J. D. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J. Clin. Invest.* **111**, 583–593 (2003).

44. Ji, C., Rouzer, C. A., Marnett, L. J. & Pietenpol, J. A. Induction of cell cycle arrest by the endogenous product of lipid peroxidation, malondialdehyde. *Carcinogenesis* **19**, 1275–1283 (1998).

45. Varatharajan, S. *et al.* Carbonyl reductase 1 expression influences daunorubicin metabolism in acute myeloid leukemia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 68, 1577–1586 (2012).
46. Chung, W.-B. & Youn, H.-J. Pathophysiology and preventive strategies of

anthracycline-induced cardiotoxicity. *Korean J. Intern. Med.* **31**, 625–633 (2016).
Weinshilboum, R. & Wang, L. Pharmacogenomics: bench to bedside. *Nat. Rev.*

Drug Discov. 3, 739–748 (2004).

48. Tay, B. S., Lilley, R. M., Murray, A. W. & Atkinson, M. R. Inhibition of phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase from Ehrlich ascites-tumour cells by thiopurine nucleotides. *Biochem. Pharmacol.* **18**, 936–938 (1969).

49. Tidd, D. M. & Paterson, A. R. A biochemical mechanism for the delayed cytotoxic reaction of 6-mercaptopurine. *Cancer Res.* **34**, 738–746 (1974).

50. Tiede, I. *et al.* CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **111**, 1133–1145 (2003).

51. Eklund, B. I., Gunnarsdottir, S., Elfarra, A. A. & Mannervik, B. Human glutathione transferases catalyzing the bioactivation of anticancer thiopurine prodrugs. *Biochem. Pharmacol.* **73**, 1829–1841 (2007).

52. Zimm, S. *et al.* Variable bioavailability of oral mercaptopurine. Is maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia being optimally delivered? *N. Engl. J. Med.* **308**, 1005–1009 (1983).

53. Elion, G. B. Significance of azathioprine metabolites. *Proc. R. Soc. Med.* **65**, 257–260 (1972).

54. Gilissen, L. P. L. *et al.* Pancytopenia due to high 6-methylmercaptopurine levels in

a 6-mercaptopurine treated patient with Crohn's disease. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* **39**, 182–186 (2007).

55. Gisbert, J. P. & Gomollón, F. Thiopurine-induced myelotoxicity in patients with inflammatory bowel disease: a review. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 1783–1800 (2008).

56. Lennard, L., Van Loon, J. A. & Weinshilboum, R. M. Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Clin. Pharmacol. Ther.* **46**, 149–154 (1989).

57. Lennard, L., Lilleyman, J. S., Van Loon, J. & Weinshilboum, R. M. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Lond. Engl.* **336**, 225–229 (1990).

58. Weinshilboum, R. M. & Sladek, S. L. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am. J. Hum. Genet.* **32**, 651–662 (1980).

59. Relling, M. V. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin. Pharmacol. Ther.* **89**, 387–391 (2011).

60. Dean, L. Azathioprine Therapy and TPMT Genotype. in *Medical Genetics Summaries* (eds. Pratt, V., McLeod, H., Dean, L., Malheiro, A. & Rubinstein, W.) (National Center for Biotechnology Information (US), 2012).

61. Moreau, C., Loriot, M.-A. & Siguret, V. Les antagonistes de la vitamine K : de leur découverte à la pharmacogénétique. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **70,** 539–551 (2012).

62. Aithal, G. P., Day, C. P., Kesteven, P. J. & Daly, A. K. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet Lond. Engl.* **353**, 717–719 (1999).

63. Limdi, N. A. *et al.* Warfarin pharmacogenetics: a single VKORC1 polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups. *Blood* **115**, 3827–3834 (2010).

64. Schwarz, U. I. *et al.* Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N. Engl. J. Med.* **358**, 999–1008 (2008).

65. Burmester, J. K. *et al.* A randomized controlled trial of genotype-based Coumadin initiation. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **13**, 509–518 (2011).

66. Shendure, J. & Ji, H. Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1135–1145 (2008).

67. Stern, M. . Séquençage haut débit, Deep Sequencing or Next Generation Sequencing. *Lett. Cancérologue* **XXI**, 295–304 (2012).

68. Peterson, L. F. & Zhang, D.-E. The 8;21 translocation in leukemogenesis. *Oncogene* **23**, 4255–4262 (2004).

69. Shigesada, K., van de Sluis, B. & Liu, P. P. Mechanism of leukemogenesis by the inv(16) chimeric gene CBFB/PEBP2B-MHY11. *Oncogene* **23**, 4297–4307 (2004).

70. Nguyen, S. *et al.* A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML Intergroup. *Blood* **99**, 3517–3523 (2002).

71. Delaunay, J. *et al.* Prognosis of inv(16)/t(16;16) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 110 cases from the French AML Intergroup. *Blood* **102**, 462–469 (2003).

72. Paschka, P. *et al.* Secondary genetic lesions in acute myeloid leukemia with inv(16) or t(16;16): a study of the German-Austrian AML Study Group (AMLSG). *Blood* **121,** 170–177 (2013).

73. Faber, Z. J. *et al.* The genomic landscape of core-binding factor acute myeloid leukemias. *Nat. Genet.* **48**, 1551–1556 (2016).

74. Jourdan, E. *et al.* Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual

disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood* **121**, 2213–2223 (2013).

75. Döhner, K. & Paschka, P. Intermediate-risk acute myeloid leukemia therapy: current and future. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2014**, 34–43 (2014).

76. Döhner, K. *et al.* Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* **106**, 3740–3746 (2005).

77. Whitman, S. P. *et al.* Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res.* **61**, 7233–7239 (2001).

78. Shaw, G. C. *et al.* Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature* **440**, 96–100 (2006).

79. Hartford, C. M. *et al.* Population-specific genetic variants important in susceptibility to cytarabine arabinoside cytotoxicity. *Blood* 113, 2145–2153 (2009).
80. Roninson, I. B. *et al.* Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4538–4542 (1986).

81. Hofman, J., Malcekova, B., Skarka, A., Novotna, E. & Wsol, V. Anthracycline resistance mediated by reductive metabolism in cancer cells: the role of aldo-keto reductase 1C3. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **278**, 238–248 (2014).

82. Hintzpeter, J., Hornung, J., Ebert, B., Martin, H.-J. & Maser, E. Curcumin is a tightbinding inhibitor of the most efficient human daunorubicin reductase--Carbonyl reductase 1. *Chem. Biol. Interact.* **234,** 162–168 (2015).

83. Barragan, E. *et al.* The GST deletions and NQ01*2 polymorphism confers interindividual variability of response to treatment in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* **31**, 947–953 (2007).

84. Okabe, M. *et al.* Characterization of the organic cation transporter SLC22A16: a doxorubicin importer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**, 754–762 (2005).

85. Petersdorf, S. H. *et al.* A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **121**, 4854–4860 (2013).

86. Burnett, A. K. *et al.* Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29**, 369–377 (2011).

87. Castaigne, S. *et al.* Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Lond. Engl.* **379**, 1508–1516 (2012).

88. Linenberger, M. L. *et al.* Multidrug-resistance phenotype and clinical responses to gemtuzumab ozogamicin. *Blood* **98**, 988–994 (2001).

89. Walter, R. B. *et al.* Multidrug resistance protein attenuates gemtuzumab ozogamicin-induced cytotoxicity in acute myeloid leukemia cells. *Blood* **102**, 1466–1473 (2003).

90. Takeshita, A. Efficacy and resistance of gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia. *Int. J. Hematol.* **97,** 703–716 (2013).

91. Walter, R. B. *et al.* CD33 expression and P-glycoprotein-mediated drug efflux inversely correlate and predict clinical outcome in patients with acute myeloid leukemia treated with gemtuzumab ozogamicin monotherapy. *Blood* **109**, 4168–4170 (2007).

92. Cianfriglia, M., Mallano, A., Ascione, A. & Dupuis, M. L. Multidrug transporter

proteins and cellular factors involved in free and mAb linked calicheamicin-gamma1 (gentuzumab ozogamicin, GO) resistance and in the selection of GO resistant variants of the HL60 AML cell line. *Int. J. Oncol.* **36**, 1513–1520 (2010).

93. Hubeek, I. *et al.* The human equilibrative nucleoside transporter 1 mediates in vitro cytarabine sensitivity in childhood acute myeloid leukaemia. *Br. J. Cancer* **93**, 1388–1394 (2005).

94. Dumontet, C. *et al.* Common resistance mechanisms to deoxynucleoside analogues in variants of the human erythroleukaemic line K562. *Br. J. Haematol.* **106**, 78–85 (1999).

95. Stegmann, A. P., Honders, W. H., Willemze, R., Ruiz van Haperen, V. W. & Landegent, J. E. Transfection of wild-type deoxycytidine kinase (dck) cDNA into an AraCand DAC-resistant rat leukemic cell line of clonal origin fully restores drug sensitivity. *Blood* **85**, 1188–1194 (1995).

96. Hunsucker, S. A., Mitchell, B. S. & Spychala, J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol. Ther.* **107**, 1–30 (2005).

97. Galmarini, C. M., Cros, E., Thomas, X., Jordheim, L. & Dumontet, C. The prognostic value of cN-II and cN-III enzymes in adult acute myeloid leukemia. *Haematologica* **90**, 1699–1701 (2005).

98. Steuart, C. D. & Burke, P. J. Cytidine deaminase and the development of resistance to arabinosyl cytosine. *Nature. New Biol.* **233**, 109–110 (1971).

99. Abraham, A. *et al.* Cytidine deaminase genetic variants influence RNA expression and cytarabine cytotoxicity in acute myeloid leukemia. *Pharmacogenomics* **13**, 269–282 (2012).

100. Serdjebi, C., Milano, G. & Ciccolini, J. Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **11**, 665–672 (2015). 101. Schneider, C. *et al.* SAMHD1 is a biomarker for cytarabine response and a

therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Nat. Med.* **23,** 250–255 (2017).

102. Herold, N. *et al.* Targeting SAMHD1 with the Vpx protein to improve cytarabine therapy for hematological malignancies. *Nat. Med.* **23**, 256–263 (2017).

103. Locher, K. P. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **364,** 239–245 (2009).

104. Wilkens, S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep.* **7**, (2015).

105. Hirsch, P., Tang, R., Mohty, M., Marie, J.-P. & Legrand, O. Protéines ABC : toujours un rôle à jouer dans les leucémies aiguës myéloïdes ? *Hématologie* 20, 264–275 (2014).
106. Raaijmakers, M. H. G. P. ATP-binding-cassette transporters in hematopoietic stem cells and their utility as therapeutical targets in acute and chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 21, 2094–2102 (2007).

107. Hopper-Borge, E. *et al.* Human multidrug resistance protein 7 (ABCC10) is a resistance factor for nucleoside analogues and epothilone B. *Cancer Res.* **69**, 178–184 (2009).

108. Malofeeva, E. V., Domanitskaya, N., Gudima, M. & Hopper-Borge, E. A. Modulation of the ATPase and transport activities of broad-acting multidrug resistance factor ABCC10 (MRP7). *Cancer Res.* **72**, 6457–6467 (2012).

109. Kathawala, R. J., Wang, Y.-J., Ashby, C. R. & Chen, Z.-S. Recent advances regarding the role of ABC subfamily C member 10 (ABCC10) in the efflux of antitumor drugs. *Chin. J. Cancer* **33**, 223–230 (2014).

110. Liptrott, N. J. *et al.* Association of ABCC10 polymorphisms with nevirapine plasma concentrations in the German Competence Network for HIV/AIDS. *Pharmacogenet.*

Genomics **22**, 10–19 (2012).

111. Pushpakom, S. P. *et al.* Genetic variants of ABCC10, a novel tenofovir transporter, are associated with kidney tubular dysfunction. *J. Infect. Dis.* **204**, 145–153 (2011).

112. Salvaggio, S. E. *et al.* Clinical and genetic factors associated with kidney tubular dysfunction in a real-life single centre cohort of HIV-positive patients. *BMC Infect. Dis.* **17**, 396 (2017).

113. Shao, J., Liu, X., Zhu, L. & Yen, Y. Targeting ribonucleotide reductase for cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **17**, 1423–1437 (2013).

114. Zhou, B., Mo, X., Liu, X., Qiu, W. & Yen, Y. Human ribonucleotide reductase M2 subunit gene amplification and transcriptional regulation in a homogeneous staining chromosome region responsible for the mechanism of drug resistance. *Cytogenet. Cell Genet.* **95**, 34–42 (2001).

115. Song, J. H. *et al.* High TOP2B/TOP2A expression ratio at diagnosis correlates with favourable outcome for standard chemotherapy in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Cancer* **107**, 108–115 (2012).

116. Cao, X. *et al.* RRM1 and RRM2 pharmacogenetics: association with phenotypes in HapMap cell lines and acute myeloid leukemia patients. *Pharmacogenomics* **14**, (2013).

117. Megías-Vericat, J. E. *et al.* Impact of novel polymorphisms related to cytotoxicity of cytarabine in the induction treatment of acute myeloid leukemia. *Pharmacogenet. Genomics* **27**, 270–274 (2017).

118. Kosztyu, P., Bukvova, R., Dolezel, P. & Mlejnek, P. Resistance to daunorubicin, imatinib, or nilotinib depends on expression levels of ABCB1 and ABCG2 in human leukemia cells. *Chem. Biol. Interact.* **219**, 203–210 (2014).

119. Kuninaka, S., Ichinose, Y., Koja, K. & Toh, Y. Suppression of manganese superoxide dismutase augments sensitivity to radiation, hyperthermia and doxorubicin in colon cancer cell lines by inducing apoptosis. *Br. J. Cancer* **83**, 928–934 (2000).

120. Nielsen, D., Maare, C. & Skovsgaard, T. Cellular resistance to anthracyclines. *Gen. Pharmacol.* **27**, 251–255 (1996).

121. Varatharajan, S. *et al.* Population pharmacokinetics of Daunorubicin in adult patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **78**, 1051–1058 (2016).

122. Lubieniecka, J. M. *et al.* Single-nucleotide polymorphisms in reductase genes are not associated with response to daunorubicin-based remission induction. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **22**, 1918–1920 (2013).

123. Gréen, H. *et al.* Association of ABCB1 polymorphisms with survival and in vitro cytotoxicty in de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Pharmacogenomics J.* **12**, 111–118 (2012).

124. Taylor, N. M. I. *et al.* Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature* **546**, 504–509 (2017).

125. Natarajan, K., Xie, Y., Baer, M. R. & Ross, D. D. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 1084–1103 (2012).

126. Cusatis, G. & Sparreboom, A. Pharmacogenomic importance of ABCG2. *Pharmacogenomics* **9**, 1005–1009 (2008).

127. Steinbach, D. *et al.* BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* **16**, 1443–1447 (2002).

128. Damiani, D. *et al.* ABCG2 overexpression in patients with acute myeloid leukemia:

Impact on stem cell transplantation outcome. *Am. J. Hematol.* **90,** 784–789 (2015). 129. Woodward, O. M. *et al.* Gout-causing Q141K mutation in ABCG2 leads to

instability of the nucleotide-binding domain and can be corrected with small molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110,** 5223–5228 (2013).

130. Imai, Y. *et al.* C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 611–616 (2002).

131. Furukawa, T. *et al.* Major SNP (Q141K) variant of human ABC transporter ABCG2 undergoes lysosomal and proteasomal degradations. *Pharm. Res.* **26**, 469–479 (2009).

132. Woodward, O. M. *et al.* Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 10338–10342 (2009).

133. Lal, S. *et al.* Influence of ABCB1 and ABCG2 polymorphisms on doxorubicin disposition in Asian breast cancer patients. *Cancer Sci.* **99**, 816–823 (2008).

134. Hampras, S. S. *et al.* Genetic polymorphisms of ATP-binding cassette (ABC) proteins, overall survival and drug toxicity in patients with Acute Myeloid Leukemia. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* **1**, 201–207 (2010).

135. Megías-Vericat, J. E. *et al.* Impact of ABC single nucleotide polymorphisms upon the efficacy and toxicity of induction chemotherapy in acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* **58**, 1197–1206 (2017).

136. Mitry, E. *et al.* Safety and activity of masitinib in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **66**, 395–403 (2010).

137. Adenis, A. *et al.* Masitinib in advanced gastrointestinal stromal tumor (GIST) after failure of imatinib: a randomized controlled open-label trial. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **25,** 1762–1769 (2014).

138. Kathawala, R. J. *et al.* Masitinib antagonizes ATP-binding cassette subfamily G member 2-mediated multidrug resistance. *Int. J. Oncol.* **44**, 1634–1642 (2014).

139. Kathawala, R. J. *et al.* Masitinib antagonizes ATP-binding cassette subfamily C member 10-mediated paclitaxel resistance: a preclinical study. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 714–723 (2014).

Annexes

Annexe 1 : Principe de préparation des librairies NGS

La librairie de séquençage (voir schéma ci-dessous) contient :

- Le segment d'intérêt (avec les amorces de PCR ayant servi à l'amplifier)
- Les index (ou codes-barres) spécifiques de chaque échantillon, permettant de multiplexer plusieurs échantillons dans un run de séquençage
- Les adaptateurs P5 et P7 permettant la fixation de la librairie sur la flowcell de séquençage MiSeq Illumina.



150 à 250 pb

Cette librairie sera obtenue à partir d'un ADN génomique, grâce à deux PCRs : la PCR1 permet d'obtenir les segments d'intérêts pour chaque échantillon, la PCR2 permet d'ajouter les index et les adaptateurs grâce aux queues flottantes des amorces de PCR1.



Annexe 2 : Protocole PCR1

La PCR1 est une PCR simplex dans laquelle nous réalisons le mix suivant pour chaque SNP :

- 12.5 µL Taq GOLD 360
- 10,5 μ L d'H₂0
- 0,5 µL d'amorce sens
- 0,5 µL d'amorce antisens

Les couples d'amorces et leurs séquences respectives sont listés dans le tableau suivant :

Amorces	Séquences	Volume
CBF_SNP01_F1	CCAGGGCTCTATGGGAAGG	0,5 µL
CBE SNP01 R1	CCCTTTCTTTGTTCAGCCCC	0.5 ul
CBF SNP02 F1	GGCTGTGCTTTCTCGTCTTC	0.5 µL
CBF SNP02 R1	GCGTTGATGTGAGGTTCCAG	0.5 uL
CBF SNP03 F1	TCTGCAGCTTTGGTCCACTT	0.5 uL
CBF SNP03 R1	TGCTCATACAAACTGCATACCT	0.5 µL
CBF SNP04 F2	CAGTCAGTTTGCAGGGGTG	0.5 uL
CBF SNP04 R2	GCCAAATCCCAATACAGGCA	0.5 µL
CBF SNP05 F1	TTGGCTTCTGTGTTCATGGG	0.5 µL
CBF SNP05 R1	TCTTTCTGGCCTGAAGACAAC	0,5 µL
CBF SNP06 F1	CATGGGAGTGGGAGAAGTGA	0,5 µL
CBF SNP06 R1	TCTTTGGGGCTTGATTTGGC	0,5 µL
CBF_SNP07_F1	CCAGGACCAGTGAAGACAGA	0,5 µL
CBF_SNP07_R1	CCGAAGCAGACGTTTACCAG	0,5 µL
CBF_SNP08_F2	TAAAGGCTGCTGGAGTGAGG	0,5 µL
CBF_SNP08_R2	CAAGCTGAGCCCCTTCAG	0,5 µL
CBF_SNP09_F1	CTGCATTTCTGTGGCTTCCA	0,5 µL
CBF_SNP09_R1	GTCAAAGAGGCTGCTTGGAG	0,5 μL
CBF_SNP10_F1	GTCTGGACAAGCACTGAAAGAT	0,5 µL
CBF_SNP10_R1	AGCATAGTAAGCAGTAGGGAGT	0,5 µL
CBF_SNP11_F1	CTGAAGCCTGAGTGTGTCCA	0,5 µL
CBF_SNP11_R1	GTGCCCACCTTTACCTTTGA	0,5 µL
CBF_SNP12_F1	TTCTGGAGGGTGGGAGAGAT	0,5 µL
CBF_SNP12_R1	CGCATACACGGTGAGGTAGA	0,5 µL
CBF_SNP13_F1	CACCTAGTGTTTGCAATCTCATT	0,5 µL
CBF_SNP13_R1	CAGGTCATTGGAAGCTGTCG	0,5 µL
CBF_SNP14_F2	AGGATGATGTTGTGATGGGC	0,5 µL
CBF_SNP14_R2	TCTGCCACTTTATCCAGACCT	0,5 µL
CBF_SNP15_F1	CTGCTCCAAAATCCCTGCAA	0,5 µL
CBF_SNP15_R1	GCTTTTAAGGGCTCTGACGC	0,5 µL
CBF_SNP16_F1	GCCCTGCACCCATGATCAT	0,5 µL
CBF_SNP16_R1	TGTTTTCTCTTCTTGCCCGC	0,5 µL
CBF_SNP17_F1	CACAAGTATCTACGGAGCCCT	0,5 µL
CBF_SNP17_R1	CCTTGGTGGTGGAAAACGTC	0,5 µL
CBF_SNP18_F1	ACTGTTCTCGGAGTTATTTCTAAACA	0,5 µL
CBF_SNP18_R1	ACAATGTCACATCTTAGAAAATGTAGG	0,5 µL
CBF_SNP19_F2	GGCGCGGTGTATGCTGA	0,5 µL
CBF_SNP19_R2	ATGAGACGTGGAGAGCAGAG	0,5 µL
CBF_SNP20_F1		0,5 µL
CBF_SNP20_R1		0,5 µL
CBF_SNP21_F1	GCATCAAATGGGTGACAGAGA	0,5 µL
CBF_SNP21_R1		0,5 µL
CBF_SNP22_F1		0,5 µL
CBF_SNP22_R1		0,5 µL
CBF_SNP23_F1		0,5 µL
		0,5 µL
		0,5 µL
		0,5 µL
CBE SNP25 R1		0,5 μL 0.5 μL
CBE SNP26 E1		0,5 μL
CBF_SNP26_R1		0,5 μL
		0,5 µL
CBE SNP27 R1		0,5 μL
		0,5 µL
CBF_SNP28_R1		0,5 µL
CBF_SNP29_F1		0.5 µL
CBE SNP29 R1		0.5 µL
		0,0 μ⊏

1 μL d'ADN à 100 ng/μL est ensuite ajouté au mix et la PCR1 est alors lancée en plaque selon le programme suivant :

- 98°C pendant 3 min
- 98°C 10s/55°C 30s/ 72°C 30s et pendant 30 cycles
- 72°C 5 min

Annexe 3 : Protocole post-PCR1

- Centrifugation des plaques ;
- 1^{ère} purification sur billes (Agencourt Ampure XP Beads, beckman Coulter) à l'aide du robot HAMILTON :
 - Transfert des billes dans la plaque de purification (16µL) ;
 - ο Transfert des produits de PCR1 dans la plaque de purification (20μL) ;
 - o Incubation 5 min ;
 - Transfert sur l'aimant et incubation 4 min ;
 - o Retrait du surnageant ;
 - o Deux lavages en éthanol 80% (VWR) ;
 - Séchage 5 min ;
 - Ajout du tampon d'élution BUFFER EB (QIAGEN) ;
 - o Mélange à la pipette x 2 ;
 - o Transfert sur l'aimant et incubation 4 min ;
 - Transfert des éluâts dans la nouvelle plaque.

- Préparation du mix :

Réactifs	Volume (µL)
Buffer HF 5X	3
DNTP 10mM	0,3
H ₂ O	0,1
Phusion 5U/µL	4,1

- Centrifugation de la plaque ;
- Lancement de la PCR2 (12 cycles) :
 - o 98°C, 3 minutes ;
 - o 98°C, 10 secondes ;
 - o 55°C, 30 secondes ;
 - o 72°C, 30 secondes ;
 - o 72°C, 5 minutes ;
 - o 4°C, pause.
- Centrifugation de la plaque ;
- 2^{em} purification sur bille à l'aide du robot (volume de billes : 16 µL, volume de PCR : 15 µL, volume d'élution 30 µL) ;
- Centrifugation de la plaque ;
- Dosage fluorimétrique :
 - \circ Préparation d'une gamme d'ADN contrôle (λ DNA standard) ;
 - $\circ~$ Distribution de 45 μL de TE 1X dans tous les puits d'une plaque ;
 - $\circ~$ Ajout à chaque puits de 5 μL de produits de purification issus de la PCR2 ou de 50 μL de la gamme ;
 - \circ Distribution de 50 μL de solution de Picogreen dans chaque puits ;
 - o Centrifugation de la plaque ;
 - o Lecture au fluoroskan.

Annexe 4 : Quantification de la librairie

- Dilution de la librairie au 1000^{ème};
- Préparation du mix :
 - Master Mix + primer premix : 6 μL ;
 - $\circ \quad H_2O: 3 \ \mu L.$
- Ajout de 9 μ L de mix par puits et 1 μ L de points de gamme (Std : 1, 2 et 3) ou de dilution de la librairie ;
- Quantification sur un Light Cycler :
 - \circ 95°C, 5 minutes ;
 - $\circ~$ 25 cycles de 15 secondes à 95°C et 20 secondes à 60°C.
- Dans un tube de 1,5 ml, diluer la librairie à 5nM dans du buffer EB après l'avoir vortexée





Réponse moléculaire SNP2125739 (wt/wt vs wt/var vs var/var)



Réponse moléculaire SNP rs1130609 (wt/wt vs wt/var vs var/var)



Réponse moléculaire SNP rs29442194 (wt/wt vs wt/var vs var/var)



Réponse moléculaire SNP rs3736032 (wt/wt vs wt/var vs var/var)



Réponse moléculaire SNP rs2032582 (wt/wt vs wt/var vs var/var)



Réponse moléculaire SNP rs2231142 (wt/wt vs wt/var et var/var)



Réponse moléculaire SNP rs12529 (wt/wt vs wt/var vs var/var)



Réponse moléculaire SNP rs1005696 (wt/wt vs wt/var vs var/var)



Réponse moléculaire SNP rs2835265 (wt/wt vs wt/var et var/var)



Réponse moléculaire SNP rs1800566 (wt/wt vs wt/var vs var/var)



Réponse moléculaire SNP rs714368 (wt/wt vs wt/var vs var/var)



Réponse moléculaire SNP rs12210538 (wt/wt vs wt/var vs var/var)
Pharmacogenomics of acute myeloid leukemias

Abstract :

Acute myeloid leukemias are bad prognosis diseases whose treatment is based for 40 years on the association between daunorubicin and cytarabine. The aim of our study is to evaluate the impact on the patients' minimal residual disease and survival of 20 widespread protein structural variants taking part in the metabolism of these 2 molecules, evaluated by NGS sequencing. 70 good prognosis patients from the CBF2006 protocol compose our first study cohort. The selected polymorphisms are then evaluated on a wider cohort: 173 patients from the CBF2006 protocol and 278 intermediate risk patients from the LAM2006IR protocol.

During the first part of our study, 3 polymorphisms are correlated with a change in the minimal residual disease: rs1130609 of RRM2, rs2231142 of ABCG2 and rs2125739 of ABCC10 genes. The latter is also correlated with a significant improvement of patient's survival. The study of the wider cohort confirms the influence of the rs2125739 polymorphism on the minimal residual disease and on survival of good prognosis patients. The OS and EFS of intermediate risk patients are also modified. In contrast, in this case, they are shorter for the variant patients. This discrepancy may, for these patients, come from an increase of medication toxicity in the LAM2006IR protocol in particular due to gemtuzumab, or from an enhanced treatment's efficacy in the CBF2006 protocol (higher doses of Ara-C, substrate of ABCC10, were administered). These hypotheses need to be investigated on an in vitro model to study the influence of this polymorphism on cellular concentrations of Ara-C and gemtuzumab. A confirmation of our results can lead to a change in AML patient management.

Key words: Acute myeloid leukemias, pharmacogenomics, ABC transporter, cytarabine, daunorubicin, next generation sequencing (NGS)

Pharmacogénomique des leucémies aiguës myéloïdes

Résumé :

Les leucémies aiguës myéloïdes sont des affections de mauvais pronostic dont le traitement repose depuis 40 ans sur l'association entre la cytarabine et la daunorubicine. Le but de notre étude est d'évaluer l'impact sur la maladie résiduelle et la survie de 20 variants de structure fréquents de protéines intervenant dans le métabolisme de ces 2 molécules par séquençage NGS. La cohorte de notre 1^{ère} étude est constituée de 70 patients de bon pronostic issus du protocole CBF2006. Les polymorphismes d'intérêt retenus sont ensuite évalués sur une cohorte étendue : 173 patients issus du protocole CBF2006 et 278 patients de pronostic intermédiaire issus du protocole LAM2006IR.

Lors de la 1^{ère} partie de notre étude, 3 polymorphismes sont associés à une modification de la maladie résiduelle des patients : rs1130609 de la RRM2, rs2231142 de l'ABCG2 et rs2125739 de l'ABCC10. Ce dernier est également corrélé à une amélioration significative de la survie des patients. L'étude de la cohorte étendue de patients nous permet de confirmer l'influence du polymorphisme rs2125739 de l'ABCC10 sur la maladie résiduelle et la survie des patients de bon pronostic. L'OS et l'EFS des patients de pronostic intermédiaire porteurs de ce polymorphisme sont également modifiées. En revanche, ici, elles sont altérées chez les patients variants. Cette discordance peut provenir, chez ces mêmes patients, d'un excès de toxicité des médicaments utilisés dans le protocole LAM2006IR, en particulier le gemtuzumab ou d'une meilleure efficacité du traitement dans le protocole CBF2006 (Ara-C substrat d'ABCC10 utilisé à plus hautes doses). Ces hypothèses nécessiteraient d'être évaluées sur un modèle in vitro qui permettrait d'étudier l'influence de ce polymorphisme sur les concentrations cellulaires en Ara-C et gemtuzumab. Une confirmation de nos résultats pourrait à terme déboucher sur une modification de la prise en charge des patients possédant une LAM.

Discipline administrative : Biologie médicale

Mots clés : Leucémie aiguë myéloïde, pharmacogénomique, ABC transporteur, cytarabine, daunorubicine, séquençage nouvelle génération (NGS)

Université Paul Sabatier – Toulouse III Faculté des Sciences Pharmaceutiques 35, chemin des Maraîchers ; 31062 TOULOUSE Cedex 9

Directeur de thèse : Pr Eric Delabesse