



# Pharmacogénétique de l'Imatinib dans la Leucémie Myéloïde Chronique et Données Censurées par Intervalles en présence de Compétition

Marc Delord

► **To cite this version:**

Marc Delord. Pharmacogénétique de l'Imatinib dans la Leucémie Myéloïde Chronique et Données Censurées par Intervalles en présence de Compétition. Santé publique et épidémiologie. Université Paris-Saclay, 2015. Français. <NNT : 2015SACLS075>. <tel-01275375>

**HAL Id: tel-01275375**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01275375>**

Submitted on 17 Feb 2016

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

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

**THÈSE DE DOCTORAT**  
**UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY**  
**PRÉPARÉE À**  
**L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD**

EDSP SANTÉ PUBLIQUE  
ÉCOLE DOCTORALE N° 570  
*scd*  
Institut Universitaire d'Hématologie

Spécialité : Santé publique – Biostatistiques

par

**Marc Delord**

**Pharmacogénétique de l'Imatinib**  
**dans la Leucémie Myéloïde Chronique &**  
**Données Censurées par Intervalles**  
**en présence de Compétition**

Directeur de thèse : Dr. Emmanuelle Génin

Co-directeur de thèse : Pr. Philippe Rousselot

Thèse présentée et soutenue CESP, le 5 novembre 2015

Composition du jury :

Dr. Jean BOUYER (Président du jury)

Pr. Anita BURGUN (Examinateur)

Pr. Hervé DOMBRET (Examinateur)

Rapporteurs :

Dr. Bernard Asselain

Dr. Raphaël Porcher

Thèse préparée à  
**L'institut Universitaire d'Hématologie**  
Hopital Saint-Louis  
75475 Paris Cedex 10

---

## Remerciements

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à ma directrice de thèse, le Docteur Emmanuelle Génin, et à mon co-directeur de thèse, le Professeur Philippe Rousselot, qui ont accepté de diriger et d'encadrer cette thèse. Merci pour leurs conseils, leurs soutiens et leurs confiances.

Mes remerciements s'adressent ensuite aux cliniciens et infirmiers, biologistes et ingénieurs qui ont rendu possible ce travail grâce aux soins portés aux patients, au recueil des données cliniques et du consentement éclairé des patients, la collecte des échantillons biologiques et de leurs analyses.

En particulier, pour la cohorte Saint Louis, merci au Professeur Philippe Rousselot, au Professeur Eric Delabesse, au Docteur Heriberto Bruzzoni-Giovanelli, au Docteur Anne Marfaing Koka, au Docteur Emmanuel Raffoux au Docteur Delphine Réa et au Docteur Marc Spentchian.

Merci au Docteur Daniela Geromin pour la gestion de la tumorothèque de l'Hôpital Saint Louis et pour l'accès aux échantillons biologiques de la cohorte Saint Louis.

Merci au Docteur Jean Michel Cayuela pour l'évaluation de la réponse moléculaire des patients de la cohorte Saint Louis et plus généralement pour ses conseils précieux et son soutien tout au long de ce travail.

Par ailleurs, ce travail s'étant inscrit principalement dans le cadre de l'étude ancillaire de pharmacogénétique relative au protocole SPIRIT (PHRC11-028), mes remerciements s'adressent à tous les acteurs de ce projet, en particulier aux investigateurs principaux : le Professeur François Guilhot et le Professeur Philippe Rousselot.

Merci également au Professeur Claude Preudhomme et au Docteur Joëlle Guilhot pour les échantillons biologiques, les données cliniques et de suivi du protocole SPIRIT. Merci aussi à tous les cliniciens des différents centres participant à cette étude.

Je remercie chaleureusement le Professeur François Sigaux et le Professeur Hervé Dombret pour leurs soutiens dans la réalisation de ce travail au sein de l'Institut Universitaire d'Hématologie.

Mes remerciements s'adressent enfin au Professeur Anita Burgun ainsi qu'au Professeur Hervé Dombret, qui ont accepté de participer au jury. Merci au Docteur Bernard Asselain et au Docteur Raphaël Porcher d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci au Docteur Jean Bouyer d'avoir accepté de présider le jury.



---

## Résumé

Le traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC) par imatinib est un succès de thérapie ciblée en oncologie. Le principe de cette thérapie est de bloquer les processus biochimiques à l'origine du développement de la maladie, et de permettre à une majorité de patients de réduire leurs risques de progression mais aussi d'éviter des traitements lourds et risqués comme la greffe de cellules souches hématopoïétiques.

Cependant, même si l'efficacité de l'imatinib a été prouvée dans un contexte clinique, il n'en demeure pas moins qu'une proportion non négligeable de patients n'obtient pas de niveaux de réponse moléculaire jugés optimaux. Le but de cette thèse est de tester l'hypothèse d'un lien entre des polymorphismes de gènes impliqués dans l'absorption des médicaments et de leurs métabolisme, et la réponse moléculaire dans la leucémie myéloïde chronique en phase chronique traitée par imatinib.

Dans le but d'évaluer la réponse moléculaire des patients, des prélèvements sanguins sont réalisés tous les 3 mois afin de pratiquer le dosage d'un biomarqueur. Ce type particulier de suivi produit des données censurées par intervalles. Comme par ailleurs, les patients demeurent à risque de progression ou sont susceptibles d'interrompre leurs traitements pour cause d'intolérance, il est possible que la réponse d'intérêt ne soit plus observable sous le traitement étudié. Les données ainsi produites sont censurées par intervalles dans un contexte de compétition (risques compétitifs).

Afin de tenir compte de la nature particulière des données collectées, une méthode basée sur l'imputation multiple est proposée. L'idée est de transformer les données censurées par intervalles en de multiples jeux de données potentiellement censurées à droite et d'utiliser les méthodes disponibles pour l'analyser de ces données. Finalement les résultats sont assemblés en suivant les règles de l'imputation multiple.

### Mots clefs

Leucémie myéloïde chronique, imatinib, pharmacogénétique, niveau de preuve, incidence cumulée, données censurées par intervalle, risques concurrents, imputation multiple, censure par intervalles informative.



# Pharmacogenetics of Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia & Interval Censored Competing Risks Data

## Abstract

Imatinib in the treatment of chronic myeloid leukemia is a success of targeted therapy in oncology. The aim of this therapy is to block the biochemical processes leading to disease development. This strategy results in a reduction of the risk of disease progression and allows patients to avoid extensive and hazardous treatments such as hematologic stem cell transplantation.

However, even if imatinib efficacy has been demonstrated in a clinical setting, a significant part of patients do not achieve suitable levels of molecular response. The objective of this thesis, is to test the hypothesis of a correlation between polymorphisms of genes implied in drug absorption an metabolism and the molecular response in chronic myeloid leukemia in chronic phase treated by imatinib.

In order to evaluate patients molecular response, blood biomarker assessments are performed every 3 months. This type of follow up produces interval censored data. As patients remain at risk of disease progression, or may interrupt their treatments due to poor tolerance, the response of interest may not be observable in a given setting. This situation produces interval censored competing risks data.

To properly handle such data, we propose a multiple imputation based method. The main idea is to convert interval censored data into multiple sets of potentially right censored data that are then analysed using multiple imputation rules.

## Keywords

Chronic myeloid leukemia, imatinib, pharmacogenetics, levels of evidence, cumulative incidence, interval censored data, competing risks, multiple imputation, informative interval censoring.



---

## Travaux scientifiques issus du travail de thèse

### Articles

- Delord M, Rousselot P, Cayuela JM, Sigaux F, Guilhot J, Preudhomme C *et al.* *High imatinib dose overcomes insufficient response associated with ABCG2 haplotype in chronic myelogenous leukemia patients.* *Oncotarget.* 2013 Oct ;4(10) :1582-91.
- Delord M and Génin E, *Multiple Imputation for Competing Risks Regression with Interval Censored Data.* *Journal of Statistical Computation and Simulation.* Accépté le 6 octobre 2015.

### Communications affichées

- 13<sup>th</sup> International Conference on Chronic Myeloid Leukemia : Biology and Therapy (ESH-iCMLf) - Estoril, Portugal, 22-25 septembre 2011 : Pharmacogenomics in CML : SNPs associated with Complete Cytogenetic Response.
- 54<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting (ASH), Atlanta, Etats Unis, 8-11 décembre 2012 : Influence of ABCG2 Haplotypes on Major Molecular Response in Chronic-Phase CML Patients Treated with Imatinib.
- 18<sup>th</sup> Congress of European Hematology Association (EHA), 13-16 Juin 2013, Stockholm, Suede : Influence of ABCG2 Haplotypes on Major Molecular Response in Chronic-Phase CML Patients Treated with Imatinib.
- 31<sup>e</sup> congrès Annuel de la Société Française d'Hématologie 26-28 mars 2014 : Polymorphismes des récepteurs/ligands des cellules NK et la réponse à l'imatinib dans la LMC.

### Communications orales

- 14<sup>th</sup> International Conference on Chronic Myeloid Leukemia : Biology and Therapy (ESH-iCMLf) - Baltimore, Etats Unis, 20-23 septembre 2012 : ABCG2 Polymorphism Is Associated with Lower Major Molecular Response Rates in CML Patients Treated with 400 Mg Imatinib but Not in Patients Treated with 600 Mg Imatinib. Session Scientifique n°5 : Predicting & monitoring response in CML.
- 15<sup>th</sup> International Conference on Chronic Myeloid Leukemia : Biology and Therapy (ESH-iCMLf) - Estoril, Portugal, 26-29 septembre 2013 : Association of SNP tagging natural killer cells mediated cytotoxicity genes with imatinib response in CML. Session Scientifique n°8 : Immunotherapeutic approach to CML.

### Logiciel

- Librairie d'analyse R : MIICD : *Data Augmentation and Multiple Imputation for Interval Censored Data*  
Implements data augmentation schemes with multiple imputation steps for pro-

portional hazards regression with interval censored data or proportional sub-distribution hazards regression for interval censored competing risks data. Disponible librement sur le site *The Comprehensive R Archive Network*. MIICD est indexé dans la vue *Survival* aux sections *Regression Modelling* et *Multistate Models* (<http://cran.r-project.org/web/packages/MIICD/>).

## Travaux annexes réalisés en cours de thèse

- Ahmed I, Tamouza R, Delord M, Krishnamoorthy R, Tzourio C, Mulot C et al. *Association between Parkinson's disease and the HLA-DRB1 locus*. *Mov Disord*. 2012 Aug;27(9) :1104-10.
- Callens C, Debled M, Delord M, Turbiez-Stalain I, Veyret C, Bièche I et al. *High-throughput pharmacogenetics identifies SLCO1A2 polymorphisms as candidates to elucidate the risk of febrile neutropenia in the breast cancer RAPP-01 trial*. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 : 1-7.
- Ceccaldi R, Parmar K, Mouly E, Delord M, Kim JM, Regairaz M et al. *Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells*. *Cell Stem Cell*. 2012 Jul 6;11(1) :36-49.
- Coudé M-M, Braun T, Berrou J, Dupont M, Bertrand S, Massé A, Raffoux E, Itzykson R, Delord M, Riveiro ME, Baruchel A, Herait P, Dombret H and Gardin C. *BET inhibitor OTX015 targets BRD2 and BRD4 and decreases c-MYC in acute leukemia cells*. *Oncotarget*. 2015;6 :17698-17712.
- Groheux D, Delord M, Rubello D, Colletti PM, Nguyen ML, Hindié E. *Variation of liver SUV on (18)FDG-PET/CT studies in women with breast cancer*. *Clin Nucl Med*. 2013 Jun;38(6) :422-5.
- Groheux D, Giacchetti S, Delord M, Hindié E, Vercellino L, Cuvier C et al. *18F-FDG PET/CT in staging patients with locally advanced or inflammatory breast cancer : comparison to conventional staging*. *J Nucl Med*. 2013 Jan;54(1) :5-11.
- Groheux D, Hindié E, Delord M, Giacchetti S, Hamy AS, de Bazelaire C et al. *Prognostic impact of (18)FDG-PET-CT findings in clinical stage III and IIB breast cancer*. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Dec 19;104(24) :1879-87.
- Groheux D, Hindié E, Giacchetti S, Delord M, Hamy AS, de Roquancourt A et al. *Triple-negative breast cancer : early assessment with 18F-FDG PET/CT during neoadjuvant chemotherapy identifies patients who are unlikely to achieve a pathologic complete response and are at a high risk of early relapse*. *J Nucl Med*. 2012 Feb;53(2) :249-54.
- Groheux D, Giacchetti S, Espié M, Vercellino L, Hamy AS, Delord M et al. *The yield of 18F-FDG PET/CT in patients with clinical stage IIA, IIB, or IIIA breast cancer : a prospective study*. *J Nucl Med*. 2011 Oct;52(10) :1526-34.
- Itzykson R, Robin M, Moins-Teisserenc H, Delord M, Busson M, Xhaard A et al. *Cytomegalovirus shapes long-term immune reconstitution after allogeneic*

---

*stem cell transplantation*. Haematologica. 2015 Jan;100(1) :114-23.

- Parietti V, Nelson E, Telliam G, Le Noir S, Pla M, Delord M et al. *Dynamics of human prothymocytes and xenogeneic thymopoiesis in hematopoietic stem cell-engrafted nonobese diabetic-SCID/IL-2 $\gamma$ null mice*. J Immunol. 2012 Aug 15;189(4) :1648-60.
- Remion A, Delord M, Hance A, Saragosti S and Mammano F. *Kinetics of the establishment of HIV-1 viral interference and comprehensive analysis of the contribution of viral genes*. Virology, 2015.
- Vercellino L, Groheux D, Thoury A, Delord M, Schlageter MH, Delpech Y et al. *ypoxia imaging of uterine cervix carcinoma with (18)F-FETNIM PET/CT*. Clin Nucl Med. 2012 Nov ;37(11) :1065-8.



## Table des figures

1	Design pour le test d'un biomarqueur . . . . .	39
2	Prévalence de la LMC en France entre 1998 et 2007 . . . . .	48
3	La réponse moléculaire (RM) exprimée sur l'échelle internationale . . . . .	53
4	Maladie résiduelle et tests . . . . .	54
5	Définition de la RM optimale . . . . .	55
6	Trajectoires communes de RM . . . . .	55
7	Fonction de survie associées à des risques instantanés constants . . . . .	73
8	Représentation schématique d'un modèle de survie multiétat . . . . .	76
9	Intervalle de confiance de l'incidence cumulée de la RMM . . . . .	80
10	Incidence cumulée de base . . . . .	84
11	Puissance d'une étude ancillaire de pharmacogénétique . . . . .	86
12	Incidence cumulée de la RMM – Cohorte Saint Louis . . . . .	93
13	Incidence cumulée de la RMM – Cohorte SPIRIT . . . . .	94
14	Incidence cumulée de RMM stratifiée sur le score de Sokal . . . . .	96
15	Incidence cumulée de la RMM stratifiée sur la dose . . . . .	97
16	Incidence cumulée de la RMM stratifiée en fonction du sexe . . . . .	98
17	Incidence cumulée de la RMM stratifiée sur la dose et le score de Sokal . . . . .	102
18	Représentation schématique du <i>locus</i> ABCG2 . . . . .	104
19	Influence de G-G sur l'incidence cumulée de la RMM . . . . .	105
20	Incidence cumulée de la RMM en fonction de l'hap. G-G et de la dose . . . . .	107
21	Représentation schématique du complexe NK . . . . .	119
22	Représentation schématique du <i>locus</i> MICB . . . . .	120
23	Incidence cumulée de la RMM en fonction de l'haplotype A-A-A . . . . .	122
24	Incidence cumulée de la RMM en fonction de l'haplotype T-G . . . . .	123
25	Données censurées par intervalles . . . . .	130
26	Incidence cumulée – Censure par intervalles – PMDA . . . . .	139
27	Résultat des simulations . . . . .	148



## Liste des tableaux

1	Variations interindividuelles moyennes du génome humain ( <i>1000 genomes project</i> ) . . . . .	35
2	Niveau de preuve d'un ERC (LOE) (Hayes <i>et al.</i> ) . . . . .	40
3	Niveaux de preuves pour l'évaluation d'un biomarqueur (Simon <i>et al.</i> ) . . . . .	43
4	Influence de la dose sur le niveau de la RMM . . . . .	58
5	Scores pronostiques au diagnostic dans la LMC . . . . .	60
6	Mutations somatiques critiques de BCR-ABL . . . . .	61
7	Déterminants pharmacogénétiques sur le niveau de la RMM . . . . .	63
8	Déterminants de l'observance dans la LMC sous imatinib (Noens <i>et al.</i> ) . . . . .	65
9	Calcul de l'incidence cumulée . . . . .	81
10	Caractéristiques des patients. . . . .	95
11	Analyse de la RMM stratifiée sur la dose d'imatinib et le score de Sokal . . . . .	100
12	Analyse multivariée de la RMM – dose d'imatinib + score de Sokal . . . . .	101
13	Fréquences haplotypiques, <i>locus</i> ABCG2 (3 marqueurs) . . . . .	104
14	Fréquences haplotypiques, <i>locus</i> ABCG2 (2 marqueurs) . . . . .	105
15	Association de l'haplotype G-G avec la RMM . . . . .	105
16	Analyse stratifiée de la RMM en fonction de l'hap. G-G et de la dose . . . . .	106
17	Rapports hommes/femmes dans la LMC . . . . .	108
18	Marqueurs de la voie NK associés à la RMM . . . . .	118
19	Fréquences alléliques – marqueurs NK . . . . .	121
20	Déséquilibres de liaison au voisinage des gènes NKG2A et NKG2D . . . . .	121
21	Analyse multivariée de la RMM – A-A-A + dose d'imatinib . . . . .	122
22	Analyse multivariée de la RMM – T-G + dose d'imatinib . . . . .	124
23	Analyses multivariés de la RMM – A-A-A + T-G + dose + score de Sokal . . . . .	124
24	Paramètres de simulation . . . . .	147
25	Résultats numériques des simulations . . . . .	149



**Table des matières**

<b>Remerciements</b>	<b>III</b>
<b>Résumé</b>	<b>V</b>
<b>Travaux</b>	<b>IX</b>
<b>Table des figures</b>	<b>XIII</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>XV</b>
<b>Introduction</b>	<b>23</b>
<b>I Contexte scientifique</b>	<b>27</b>
<b>1 Pharmacogénétique &amp; pharmacogénomique</b>	<b>28</b>
1.1 Aspects historiques et définitions . . . . .	28
1.2 La réponse aux traitements en oncologie . . . . .	29
1.3 Conclusion . . . . .	30
<b>2 Notion de médecine personnalisée</b>	<b>30</b>
2.1 Généralités . . . . .	30
2.2 Pharmacocinétique et Pharmacodynamique . . . . .	31
2.3 L'exemple de la Warfarine . . . . .	32
2.4 Conclusion . . . . .	32
<b>3 Les variations génétiques</b>	<b>33</b>
3.1 Les grands projets internationaux . . . . .	33
3.2 <i>Omics</i> et réponse au traitement . . . . .	35
3.3 Les eQTL . . . . .	36
<b>4 Ressources biologiques</b>	<b>37</b>
4.1 Tester un nouveau marqueur . . . . .	37
4.2 Niveaux de preuves . . . . .	38
4.3 Essais prospectifs <i>vs.</i> essais rétrospectifs . . . . .	39
4.4 Essais prospectifs-rétrospectifs . . . . .	41
4.5 Conclusion . . . . .	43

<b>II</b>	<b>La Leucémie Myéloïde Chronique</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>Introduction</b>	<b>46</b>
5.1	Définition . . . . .	46
5.2	Aspects historiques . . . . .	46
5.3	Épidémiologie . . . . .	47
5.4	Évaluation de la réponse aux traitements . . . . .	48
<b>6</b>	<b>Évolution des thérapies</b>	<b>49</b>
6.1	Introduction . . . . .	49
6.2	Chimiothérapies conventionnelles . . . . .	50
6.3	Greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques . . . . .	50
6.4	Interféron- $\alpha$ . . . . .	51
6.5	Inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) . . . . .	51
<b>7</b>	<b>Le suivi des patients</b>	<b>52</b>
7.1	Réponse moléculaire (RM) . . . . .	52
7.2	Recommandations de l'ELN . . . . .	53
<b>8</b>	<b>Déterminants de la réponse moléculaire sous inhibiteurs de tyrosine kinase</b>	<b>55</b>
8.1	Nature du traitement . . . . .	56
8.2	Dose journalière . . . . .	56
8.3	Les scores pronostiques . . . . .	57
8.4	Mutations somatiques . . . . .	61
8.5	Polymorphismes génétiques . . . . .	62
8.6	Observance . . . . .	64
<b>9</b>	<b>Conclusion</b>	<b>66</b>
<b>III</b>	<b>Méthodes statistiques</b>	<b>69</b>
<b>10</b>	<b>Introduction</b>	<b>70</b>
<b>11</b>	<b>Données censurées</b>	<b>71</b>
11.1	Censure à droite . . . . .	71
11.2	Censure à gauche . . . . .	71
11.3	Censure par intervalles . . . . .	72

---

<b>12</b>	<b>Eléments sur les modèles de survie</b>	<b>72</b>
12.1	Risque instantané et fonction de survie . . . . .	72
12.2	Estimation non paramétrique de la survie . . . . .	74
12.3	Modèle de Cox . . . . .	74
<b>13</b>	<b>Eléments sur les modèles à risques concurrents</b>	<b>75</b>
13.1	Introduction . . . . .	75
13.2	Définitions . . . . .	76
13.3	Estimation non paramétrique de l'incidence cumulée . . . . .	77
13.4	Estimateur de Nelson-Aalen . . . . .	78
13.5	Estimation de la variance de l'incidence cumulée . . . . .	79
13.6	Modèle de Fine & Gray . . . . .	80
13.7	Incidence cumulée de base . . . . .	82
<b>14</b>	<b>Puissance statistique d'une étude de pharmacogénétique</b>	<b>83</b>
<b>IV</b>	<b>Marqueurs pharmacocinétiques liés à la réponse moléculaire dans la LMC en phase chronique traitée par imatinib</b>	<b>87</b>
<b>15</b>	<b>Introduction</b>	<b>88</b>
<b>16</b>	<b>Patients et Méthode</b>	<b>88</b>
16.1	Cohorte Saint Louis . . . . .	88
16.2	Cohorte SPIRIT . . . . .	89
16.3	Critères de jugement . . . . .	90
16.4	Covariables . . . . .	91
16.5	Génotypage . . . . .	91
16.6	Méthodes Statistiques . . . . .	91
<b>17</b>	<b>Résultats</b>	<b>92</b>
17.1	Caractéristiques des patients . . . . .	92
17.2	Incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure . . . . .	92
17.3	Déterminants de l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure . . . . .	96
17.4	Analyse multivariée . . . . .	99
17.5	Polymorphismes de transporteurs associés à la réponse moléculaire . . . . .	103
17.6	Haplotypes associés à la réponse moléculaire majeure . . . . .	103
17.7	Analyse stratifiée sur la dose . . . . .	104

<b>18 Discussion</b>	<b>108</b>
18.1 Caractéristiques des patients . . . . .	108
18.2 Déterminants de la réponse moléculaire majeure . . . . .	109
18.3 Association d'un haplotype d'ABCG2 avec la réponse moléculaire majeure	110
18.4 Conclusion . . . . .	111
<b>V Marqueurs pharmacodynamiques liés de la réponse moléculaire dans la LMC en phase chronique traitée par imatinib</b>	<b>113</b>
<b>19 Introduction</b>	<b>114</b>
19.1 Cellules NK . . . . .	114
19.2 Non reconnaissance du soi . . . . .	114
19.3 Reconnaissance du soi altéré . . . . .	115
19.4 Rôle des cellules NK dans les thérapies contre la LMC . . . . .	115
19.5 Rôle du couple NKG2D–MICA/B . . . . .	115
19.6 Surveillance immunitaire . . . . .	116
19.7 Résumé . . . . .	116
<b>20 Patients et Méthode</b>	<b>117</b>
20.1 Patients . . . . .	117
20.2 Méthode . . . . .	117
<b>21 Résultats</b>	<b>118</b>
21.1 Marqueurs . . . . .	118
21.2 Polymorphismes de gènes de la voie NK associés à la réponse moléculaire	118
21.3 Haplotypes associés à la réponse moléculaire majeure . . . . .	121
21.4 Analyse multivariée . . . . .	124
<b>22 Discussion</b>	<b>125</b>
22.1 Résumé . . . . .	125
22.2 Conclusion . . . . .	125
<b>VI Imputation multiple &amp; données censurées par intervalles</b>	<b>129</b>
<b>23 Introduction</b>	<b>130</b>
23.1 Contexte . . . . .	130
23.2 Imputation multiple . . . . .	131

---

23.3 Algorithmes d'augmentation de données . . . . .	134
<b>24 Augmentation des données censurées par intervalles</b>	<b>136</b>
24.1 <i>Poor man's Data Augmentation</i> pour la fonction d'incidence cumulée . .	136
<b>25 Augmentation des données censurées par intervalles pour l'estimation d'un coefficient de régression – Méthode de Pan</b>	<b>138</b>
25.1 <i>Poor Man's Data Augmentation</i> pour le modèle de Cox . . . . .	139
25.2 <i>Asymptotic Normal Data Augmentation</i> pour le modèle de Cox . . . . .	141
25.3 Interprétation . . . . .	142
<b>26 Extension au modèle de Fine et Gray</b>	<b>142</b>
26.1 <i>Poor Man's Data Augmentation</i> pour le modèle de Fine et Gray . . . . .	143
26.2 <i>Asymptotic Normal Data Augmentation</i> pour le modèle de Fine et Gray	145
26.3 Simulations . . . . .	145
26.4 Application . . . . .	150
<b>27 Conclusion</b>	<b>152</b>
<b>Conclusion</b>	<b>157</b>
<b>Références</b>	<b>163</b>
<b>Index</b>	<b>177</b>
<b>Acronymes</b>	<b>181</b>
<b>Annexe</b>	<b>183</b>
<b>Article 1 : High imatinib dose overcomes insufficient response associated with ABCG2 haplotype in chronic myelogenous leukemia patients</b>	<b>183</b>
<b>Article 2 : Multiple Imputation for Competing Risks Regression with Interval Censored Data</b>	<b>194</b>



# Introduction

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une maladie néoplasique rare touchant les cellules souches hématopoïétiques. Elle représentant de 15 à 20% des leucémies de l'adulte et son incidence est de 1 cas pour 100 000 personnes environ. Sans prise en charge appropriée, cette maladie, souvent asymptomatique dans sa phase chronique, évolue inexorablement vers une phase aiguë rapidement fatale. Le seul traitement curatif a longtemps été la greffe allogénique de moelle osseuse. Cependant, les contraintes lourdes liées à cette pratique thérapeutique ainsi que les risques importants encourus par les patients greffés, comme la maladie du greffon contre l'hôte, ont conduit les cliniciens à ne retenir cette option que pour de jeunes patients disposant d'un donneur compatible.

La LMC a été la première maladie associée à une anomalie chromosomique : le chromosome Philadelphie qui résulte de la translocation  $t(9;22)$  et qui conduit à la production de la protéine de fusion BCR-ABL suite au réarrangement des gènes partenaire BCR et ABL. Elle est aussi la première maladie maligne traitée efficacement par thérapie ciblée. L'imatinib, médicament à l'origine de ce succès thérapeutique, est le premier représentant d'une famille de molécules ciblant de manière spécifique l'activité kinase de la protéine de fusion à l'origine de la LMC. Les patients qui obtiennent une réponse optimale à l'imatinib peuvent espérer un maintien de leur maladie en phase chronique. Le plus souvent, cet état est compatible avec la poursuite d'une activité professionnelle et est synonyme d'une espérance de vie comparable à celle de la population générale. Cependant, près d'un quart des patients n'obtient pas de réponse jugée suffisante par les experts. D'autres encore subissent des effets indésirables potentiellement graves pouvant être à l'origine d'une moindre observance du traitement ou entraîner un arrêt de la thérapie.

L'objectif principal de cette thèse est de mettre en relation, d'une part, la variabilité observée dans la réponse à l'imatinib dans la LMC en phase chronique, et d'autre part, la variabilité génétique observée des patients. En d'autres termes, il s'agit d'étudier la pharmacogénétique de l'imatinib dans le traitement de la LMC en phase chronique.

La pharmacogénétique, c'est-à-dire, la discipline qui se propose d'étudier la distribution des bénéfices et des effets indésirables d'un traitement en fonction des caractéristiques génétiques des patients, doit son essor aux progrès de la biologie moléculaire et des techniques dites à haut débit permettant d'identifier facilement

les polymorphismes génétiques potentiellement liés à la réponse aux traitements. Les progrès de la pharmacogénétique sont aussi étroitement liés à la création et à l'organisation des centres de ressources biologiques (CRB), permettant la bonne conservation des échantillons biologiques dûment annotés.

Une question fondamentale, souvent négligée dans le cadre des études de pharmacogénétique, à trait aux niveaux de preuve susceptibles d'être attribués à ce type d'études, rétrospectives par nature. Le niveau de preuve ne sera en effet pas du même ordre pour une étude A exploitant la disponibilité d'échantillons biologiques dont l'annotation n'a pas été réalisée en vue de répondre à une question spécifique ou pour l'étude B pour laquelle une stratégie de conservation, d'annotation ainsi qu'une méthode de génotypage ont été décidés de manière prospective à l'occasion du design d'un essai prospectif contrôlé randomisé (ECR). Si les études A et B sont rétrospectives par nature, l'étude B est dite ancillaire à l'ECR et son niveau de preuve est supérieur à celui de l'étude A. De plus, et sous certaines conditions, il est proche de celui d'un ECR.

Il existe une différence fondamentale entre un ECR et une étude de pharmacogénétique associée. D'une part, l'ECR – procédure standard permettant d'apporter la preuve de la supériorité d'un nouveau traitement ou d'une nouvelle pratique médicale sur une pratique standard à l'aide d'une expérience sur une population de patients atteint d'une pathologie commune – fait appel à la théorie de la randomisation, c'est-à-dire, la répartition au hasard des patients recrutés en différents bras de traitements. Le but de cette procédure est de réduire au maximum, voir de neutraliser, l'effet de variables autres que le traitement testé, comme la variabilité génétique des patients par exemple. C'est la raison pour laquelle un ECR ne donne pas d'information sur la variabilité individuelle de la réponse au traitement, son but étant de s'en affranchir.

A l'opposé, une étude de pharmacogénétique a pour but de déterminer dans quelle mesure la variabilité génétique peut influencer la réponse au traitement. L'utilisation, dans les modèles de régression, de variables d'ajustement comme le traitement ou le sexe peut être nécessaire lors d'une étude ancillaire de pharmacogénétique. Par ailleurs, on observe le plus souvent une perte de puissance statistique, les patients n'étant pas forcément répartis de manière optimale pour répondre à la question posée par l'étude ancillaire.

Un aspect important de l'étude de la réponse thérapeutique à l'imatinib dans la LMC est le caractère longitudinal du suivi des patients. Il est maintenant établi dans la pratique clinique courante ou dans des études biomédicales en cancérologie que le dosage d'un biomarqueur sur prélèvements biologiques, réalisés à intervalles de temps – idéalement – réguliers soit le critère principal de jugement dans la détermination d'un temps de progression ou de rémission. Dans le cas du traitement de la LMC par inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) cette pratique

est largement admise et le suivi des patients consiste à pratiquer un dosage de biomarqueur sur des échantillons sanguins ou de moelle osseuse réalisés généralement tous les trois mois. Une conséquence importante de ce type de suivi est qu'il génère des données censurées par intervalles. En effet, si pour un patient, le test est positif pour la première fois, l'information dont nous disposons est que l'évènement d'intérêt a eu lieu entre la date de prélèvement de l'échantillon positif et la date du précédent prélèvement. L'autre objectif de cette thèse est de poser le problème de la censure par intervalles pour l'analyse de la réponse thérapeutique dans la LMC, de tenter d'évaluer les conséquences éventuelles de la non prise en compte de ce type de censure et de proposer une méthode simple susceptible d'être employée dans ce cas.

Cette thèse est organisée de la manière suivante :

- la I<sup>re</sup> partie présente les contextes sémantique et méthodologique des études de pharmacogénétique en oncologie. Les principales définitions y sont données ainsi que les précisions nécessaires sur la terminologie employée lorsque la littérature ne propose pas de définitions claires. La notion de variabilité génétique est brièvement abordée au travers des avancées majeures de ces dernières années ayant permis d'estimer cette variabilité (projet *HapMap* et *1000 Genomes Project*). Cette partie fait aussi référence à des éléments méthodologiques relatifs à l'utilisation de ressources biologiques conservées pour l'évaluation de biomarqueurs pronostiques ou prédictifs, notamment les différents niveaux de preuve scientifique auxquels une étude de pharmacogénétique peut prétendre en fonction des conditions dans lesquelles cette étude a été réalisée ;
- la II<sup>e</sup> partie est une introduction à la LMC. Les principales définitions y sont proposées ainsi que les données épidémiologiques, l'évolution des thérapies, la définition de la réponse aux traitements et les principaux déterminants de la réponse à l'imatinib ;
- la III<sup>e</sup> partie est une partie méthodologique où les outils statistiques utilisés pour les études d'associations des parties IV et V sont présentés brièvement. En particulier, le calcul de l'incidence cumulée et de sa variance et le modèle de régression à risques de sous-répartition proportionnels de Fine & Gray. La question de la puissance d'une étude de pharmacogénétique y est aussi abordée ;
- les parties IV et V ont pour but de présenter les résultats obtenus lors de l'étude d'association de la réponse moléculaire dans la LMC en phase chronique avec des polymorphismes liés à des transporteurs d'une part et des

polymorphismes associés aux gènes de la voie NK (*Natural Killer*) d'autre part ;

- finalement, la VI<sup>e</sup> partie présente une méthode basée sur l'imputation multiple permettant de prendre en compte le phénomène de censure par intervalles dans un contexte de compétition. Des résultats de simulations et une application y sont proposés.

## Première partie

# Contexte scientifique

## Sommaire

---

<b>1</b>	<b>Pharmacogénétique &amp; pharmacogénomique</b>	<b>28</b>
1.1	Aspects historiques et définitions . . . . .	28
1.2	La réponse aux traitements en oncologie . . . . .	29
1.3	Conclusion . . . . .	30
<b>2</b>	<b>Notion de médecine personnalisée</b>	<b>30</b>
2.1	Généralités . . . . .	30
2.2	Pharmacocinétique et Pharmacodynamique . . . . .	31
2.3	L'exemple de la Warfarine . . . . .	32
2.4	Conclusion . . . . .	32
<b>3</b>	<b>Les variations génétiques</b>	<b>33</b>
3.1	Les grands projets internationaux . . . . .	33
3.2	<i>Omics</i> et réponse au traitement . . . . .	35
3.3	Les eQTL . . . . .	36
<b>4</b>	<b>Ressources biologiques</b>	<b>37</b>
4.1	Tester un nouveau marqueur . . . . .	37
4.2	Niveaux de preuves . . . . .	38
4.3	Essais prospectifs <i>vs.</i> essais rétrospectifs . . . . .	39
4.4	Essais prospectifs-rétrospectifs . . . . .	41
4.5	Conclusion . . . . .	43

---

# 1 Pharmacogénétique & pharmacogénomique

## 1.1 Aspects historiques et définitions

La réponse aux médicaments est variable d'une personne à une autre. Cette variabilité observée peut être attribuée, en partie, à des facteurs de type comportementaux et/ou environnementaux, tels que les habitudes alimentaires, l'absorption d'autres médicaments, le tabagisme, la consommation d'alcool ou encore l'observance du traitement. Des facteurs propres aux individus tels que l'âge, le sexe, l'état de santé ou les caractéristiques génétiques sont aussi susceptibles d'expliquer une partie de cette variabilité. La pharmacogénétique est la discipline qui se propose d'étudier l'influence de la variabilité génétique sur la réponse aux traitements.

L'idée qu'il existe des facteurs propres à chaque personne pouvant prédisposer à certaines maladies ou être associés à la réponse aux médicament remonte aux travaux de Sir Archibald Garrod. Dans *The Inborn Factors in Disease : An Essay*, qu'il publie en 1931, [1] Garrod développe le concept de *chemical individuality*, c'est-à-dire, d'une variabilité interindividuelle relative aux processus biochimiques physiologiques pouvant expliquer la diversité des réactions observées suite à la prise d'un médicament, de certains aliments, ou de produits stimulants. Garrod suggère que les processus physiologiques de détoxification mettent en jeu des enzymes dans des mécanismes biochimiques aux rendements variables et que cette variabilité est d'origine génétique.

Dans les années 1950, la pharmacogénétique s'impose comme discipline scientifique avec la publication d'études confirmant les hypothèses originales de Garrod, notamment, celle de Alving *et al.* (1956) [2] montrant que le risque d'hémolyse lié à la prise de primaquine est associé à un déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD). Des études ultérieures ont montré que ce déficit est attribuable au gène G6PD, c'est-à-dire d'origine génétique. [3]

Depuis, les progrès des techniques de génotypages ont permis de dresser le profil des variations génétiques d'une personne sur plusieurs millions de polymorphismes répartis sur tout le génome en une seule expérience. Cette avancée a permis de vérifier facilement des hypothèses de pharmacogénétique en mettant en relation profils pharmacogénétiques et réponses thérapeutiques d'un ensemble de patients.

Par contraste avec les approches plus anciennes où seuls quelques polymorphismes étaient testés sur un nombre limité de gènes, certains auteurs proposent dans les années 2000 le terme de pharmacogénomique pour qualifier une étude pharmacogénétique sur le génome entier (ou étude pangénomique). [4, 5]

D'autres définitions précisent que la pharmacogénomique est l'étude des variations de l'ADN mais aussi de l'expression des gènes (niveau de l'ARN) en réaction à la prise d'un médicament. [6]

L'*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) donne les définitions suivantes :

- la pharmacogénomique est l'étude des variations des caractéristiques de l'ADN et de l'ARN en relation avec la réponse aux traitements ;
- la pharmacogénétique est une sous discipline de la pharmacogénomique qui étudie des variations des caractéristiques de l'ADN (seulement) en relation avec la réponse aux traitements.

Ces définitions ont été adoptées à partir de 2007 par l'Agence Européenne de Médecine (*European Medicine Agency* (EMA)), le ministère Japonais de la santé et par l'organisme américain de santé *food and drug administration* (FDA). [7]

## 1.2 La réponse aux traitements en oncologie

En oncologie, la notion de variation génétique doit être précisée. On y distingue en effet deux types de génomes : le génome constitutionnel duquel va dépendre les fonctions physiologiques de l'organisme et le génome somatique d'une tumeur, issue d'une cellule somatique (transformée) ayant acquis une ou plusieurs mutations.

Généralement, peu de précisions sont données dans les différentes définitions de la pharmacogénétique et de la pharmacogénomique et les auteurs ne font pas explicitement mention du type de génome étudié [6, 4] ou bien, précisent-ils qu'ils étudient le génome constitutionnel. [5, 8, 9, 10]

Par soucis de simplification, d'autres auteurs déclarent utiliser le terme *pharmacogénétique* pour désigner une étude des variations du génome constitutionnel ou somatique susceptibles de prédire la réponse aux traitements, que ces variations soient recherchées sur un petit nombre de gènes candidats ou bien sur le génome entier. [11]

Hertz *et al.* (2013) [12] dans une revue récente de pharmacogénétique en oncologie, discute de la différence fondamentale entre génome somatique et génome constitutionnel. Selon leurs auteurs, les deux génomes déterminent le résultat de la thérapie : pronostique et réponse dépendent du génome somatique alors que le génome constitutionnel module l'exposition de la cible mais aussi la toxicité du traitement. Cependant, les auteurs utilisent le terme de pharmacogénétique qu'ils fassent allusion au génome somatique ou constitutionnel.

### 1.3 Conclusion

Les termes *pharmacogénétique* et *pharmacogénomique* semblent interchangeables. Ils sont employés indistinctement qu'il s'agisse d'étudier l'effet des variations du génome constitutionnel ou somatique en relation avec la prise d'un médicament. Cependant, ces deux termes possèdent des connotations distinctes.

Pour le premier on y attache les notions suivantes :

- variations génétiques héréditaires (ADN constitutionnel) ;
- gènes candidats ;
- relation simple (monofactorielle).

Pour le deuxième :

- variations de l'ADN et de l'ARN ;
- étude génome entier ;
- génome constitutionnel et somatique ;
- effet de plusieurs gènes/voie de signalisation.

Ici, la définition *historique* de la pharmacogénétique est retenue, c'est-à-dire, l'étude de la réponse au traitement en lien avec la variabilité génétique héritée.

## 2 Notion de médecine personnalisée

### 2.1 Généralités

La médecine est par nature *médecine personnalisée* dès lors que se rencontrent médecins et patients. La prise en charge d'un patient est de fait variable selon l'âge, le sexe et l'histoire du patient, mais aussi selon les caractéristiques du clinicien (§ 8.6). Les facteurs individuels sont pris en compte par le médecin lorsqu'il y a lieu de prescrire un médicament afin de déterminer la nature et la dose optimale d'un médicament. La pharmacogénétique, c'est-à-dire, la reconnaissance des caractéristiques interindividuelles (génétiques) liées à la réponse aux traitements représente une étape supplémentaire dans le processus de personnalisation de la prise en charge d'un patient.

Lors de la prescription, le clinicien fait face à un éventail d'options. Ces options sont relatives, entre autre, à la nature et à la dose optimale du traitement. Dans ce choix, outre les informations propres au patient, le clinicien dispose d'informations relatives à l'efficacité d'un médicament et aux effets secondaires associés à ce médicament.

Or, seul un essai contrôlé randomisé (ECR) est susceptible d'apporter la preuve de la supériorité d'un traitement ou d'une pratique médicale sur une autre.

Cette méthodologie *fondée sur les faits (evidence based)* fournit des résultats vérifiables pour le grand nombre. En revanche, elle ne donne pas d'information sur la réponse individuelle d'un patient, hormis la réponse moyenne espérée pour la dose moyenne. On estime que le taux de réponse se situe entre 30 et 60% pour le traitement de la plupart des maladies communes. [13] Cette impossibilité de prévoir la réponse au niveau individuel conduit inévitablement à administrer à un grand nombre de patients des traitements inefficaces pour eux.

Les coûts liés à cette incertitude sont supportés en premier lieu par les patients. En effet, les patients mauvais répondeurs subissent les effets toxiques liés au traitement sans contrepartie thérapeutique. Ou encore, certains patients subissent une toxicité sans rapport avec le bénéfice attendu, ou des effets indésirables graves conduisant à un arrêt de traitement. Par ailleurs, les patients ne bénéficiant pas, de prime abord, d'une combinaison traitement/dose appropriée supportent également un coût d'opportunité lié au délai d'ajustement. Ce délai, souvent propice au développement de la maladie, a pour conséquence une prise en charge en deuxième ligne plus délicate et une perte de chance pour le patient. En second lieu, il est aussi nécessaire de prendre en compte les coûts financiers liés à cette allocation non-optimale des ressources supportées par les systèmes de soins.

## 2.2 Pharmacocinétique et Pharmacodynamique

La première condition nécessaire afin qu'un médicament puisse exercer une action mesurable dans l'organisme est que ce médicament atteigne sa cible. Dans ce but, il doit être absorbée en quantité suffisante. Ce premier déterminant de l'action d'un médicament est la pharmacocinétique. La seconde condition nécessaire à trait à la sensibilité de la cible au médicament absorbée. La pharmacodynamique est l'étude du degré de réaction de la cible au médicament, c'est-à-dire sa sensibilité. Il s'agit du deuxième déterminant majeur de la réponse aux traitements.

La pharmacocinétique étudie l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion des métabolites (ADME). La pharmacodynamique décrit l'action moléculaire d'un médicament sur sa cible. La cible peut être un récepteur de surface, comme les récepteurs au œstrogène ciblés par le tamoxifène pour le traitement du cancer du sein, [14] un canal ionique ou un récepteur intracellulaire comme la protéine de fusion BCR-ABL ciblée par l'imatinib, le dasatinib ou le nilotinib dans le traitement de la LMC. [15, 16, 17] Les variations observées dans la réponse aux traitements sont dues à une combinaison de facteurs génétiques, environnementaux pouvant affecter la pharmacocinétique et/ou la pharmacodynamique d'un médicament.

Les gènes impliqués dans la variabilité de la réponse thérapeutique appartiennent principalement aux deux groupes de fonctions suivantes :

- fonctions définissant les propriétés pharmacocinétiques d'un médicament : gènes liés à l'absorption, la distribution, et l'excrétion des métabolites du médicament ;
- fonctions définissant les propriétés pharmacodynamiques d'un médicament : gènes qui encodent la cible du médicament (connue ou inconnue) et les voies métaboliques associées. Les gènes qui influencent la susceptibilité à la maladie ou la progression de la maladie y compris les gènes de l'immunité.

### 2.3 L'exemple de la Warfarine

La recherche en pharmacogénétique est à l'origine de découvertes fondamentales sur l'effet de variations génétiques héritées affectant efficacité et toxicité des médicaments. [18] Cependant, il n'existe qu'un nombre limité de traitements pour lesquels la recherche pharmacogénétique a donné lieu à une modification de la pratique clinique. La Warfarine en est une illustration.

La Warfarine est un anticoagulant prescrit dans la prévention et le traitement des maladies thromboemboliques veineuses. Sa prescription est rendue délicate en raison de l'étroitesse de son index thérapeutique et de la grande variabilité des réponses observées. Par conséquent, les dosages de Warfarine peuvent aller de 0,5 à 20 mg/jour. Les patients sous-dosés risquent un événement thrombotique tandis que les patients surdosés risquent un événement hémorragique.

Rieder *et al.* (2005) [19] ont montré que des polymorphismes du gène *VKORC1* codant la protéine cible de la Warfarine, sont impliqués à hauteur de 25% dans la réponse thérapeutique. Avec d'autres facteurs comprenant l'âge, le sexe, l'indice de masse corporel, le régime alimentaire, le tabagisme, les interactions médicamenteuses, l'origine ethnique du patient ainsi que certains polymorphismes du gène *CYP2C9*, *VKORC1* explique jusqu'à 60% de la réponse au traitement. Un algorithme en ligne permet de définir la dose optimale de Warfarine (<http://www.warfarinedosing.org>).

### 2.4 Conclusion

L'exemple de la Warfarine montre quelles sont les étapes nécessaires pour que des données de type pharmacogénétique puissent être prises en compte dans un processus de personnalisation d'un traitement. Ces étapes sont les suivantes :

- observations d'une variabilité interindividuelle dans la réponse au traitement ;

- établissement d'une association statistique forte entre variations génétiques et variabilité interindividuelle dans la réponse au traitement ;
- création et validation d'un algorithme incluant ces facteurs génétiques.

Cet exemple montre qu'il est nécessaire que des hypothèses fortes soient présentes dès le départ. L'hypothèse la plus importante étant qu'une part importante de la variabilité de la réponse thérapeutique soit expliquée par une ou plusieurs variations génétiques.

Par ailleurs, si ces hypothèses fortes sont présentes, elles ne sont pas suffisantes. En effet, seule la réalisation d'analyses de type coût-bénéfice et/ou coût-efficacité seraient susceptibles de répondre de manière rationnelle à la question de l'utilité de mettre en place un processus de personnalisation pour un traitement donné. Ces analyses économiques mettent en balance coûts liés à la personnalisation d'une pratique médicale, c'est à dire, coûts des tests génétiques et de leurs interprétations, et bénéfices attendus issus de cette personnalisation.

## 3 Les variations génétiques

### 3.1 Les grands projets internationaux

L'idée de médecine personnalisée se retrouve à l'origine de projets décisifs pour la biologie tel que le *Human Genome Project* lancé en 1990. Cet ambitieux projet international s'est donné pour objectif principal de déterminer la séquence d'ADN humain afin d'obtenir une estimation plus précise du nombre de gènes constituant le génome humain, de déterminer la localisation de ces gènes, et leurs fonctions.

Achévé en 2003, [20] cet effort a permis d'établir une référence consensus haploïde du génome humain. Entre temps, d'autres projets focalisés sur la détermination de la variabilité du génome humain ont été lancés notamment, le *SNP Consortium* [21] et le projet international *HapMap*.

Le projet *HapMap* (phase I et II) s'est donné pour objectif de développer une base publique de données des variations de l'ADN humain (principalement des *single nucleotide polymorphisms* (SNP)) dans le but de déterminer les gènes ou les parties du génome (haplotypes) dont la variabilité est associée, entre autre, aux maladies et à la réponse aux médicaments<sup>1</sup>.

La phase I du projet s'est achevée en 2005 avec la description de 1,3 million de SNP génotypés sur 270 individus issus de populations d'origines ethniques

---

1. "The goal of the International HapMap Project is to develop a haplotype map of the human genome, the HapMap, which will describe the common patterns of human DNA sequence variation. The HapMap is expected to be a key resource for researchers to find genes affecting health, disease, and responses to drugs and environmental factors." (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/abouthapmap.html>).

différentes (Europe de l'ouest, Afrique, Chine et Japon). [22] La deuxième phase s'est achevée en 2007 avec la publication de 3,1 millions de SNP supplémentaires génotypés sur les mêmes populations. [23]

Les résultats d'une troisième phase ont été publiés en 2010. [24] Cette troisième phase, plus ambitieuse, a permis de génotyper 1184 génomes appartenant à 11 populations sur environ 1,6 millions de SNP mais aussi de séquencer 10 régions de 100 kilobases chacune chez un sous groupe de 692 personnes. Ces données intègrent en plus des (SNP) des variations de nature différentes comme les *copy number variations* (CNV).

Plus récemment (2012) ont été publiés les résultats du *1000 genomes project*. Comme son nom l'indique, ce projet a pour but de séquencer le génome diploïde de plus de 1000 individus issus de 14 populations, afin de dresser un panorama plus précis des différences génétiques entre individus et populations humaines. Ce travail, rendu possible grâce à l'avènement de nouvelles technologies de séquençage (*next generation sequencing (NGS)*), a permis de dresser la carte mise à jour des haplotypes humains à l'aide de plus de 38 millions de SNP dont la moitié ont une fréquence  $\geq$  à 1%. En outre, plus de 1,4 million d'insertions/délétions courtes et plus de 14 000 délétions plus larges ont ainsi pu être identifiées. Parmi les populations séquencées figurent 76 personnes non-apparentées d'origine européenne (*Northern Europeans from Utah (CEU)*) pouvant servir de population témoin dans l'analyse de la susceptibilité à une maladie chez des patients d'origine européenne.

L'étude de la répartition de ces variations a montré que des personnes d'origines ethniques différentes présentaient des profils distincts en terme de variations rares et communes, que les variations rares étaient distribuées de manière inégale en fonction des voies métaboliques. Par ailleurs, chaque personne possède en moyenne des centaines de variations rares non codantes dans des régions telles que les sites de fixation de facteurs de transcriptions, sites hautement conservés par ailleurs.

Remarquablement, un individu en bonne santé apparente possède en moyenne 2500 variations non synonymes aux niveaux de sites conservés dont 20 à 40 sont considérés comme étant dommageables ainsi que 150 variations à l'origine d'une perte totale de fonction (*Loss-of-function (LoF)*). La table 1 résume l'étendue des variations observées en moyenne d'un individu à un autre.

Finalement, chaque génome possède des mégabases de séquences d'ADN apparentés ni à la séquence haploïde de référence, ni à d'autres génomes. Ces données permettent de conclure qu'il existe une grande diversité génétique interindividuelle, cette diversité ne se réduisant pas à des changements ponctuels d'une seule lettre (SNP). Toutefois, l'interprétation fonctionnelle de cette diversité n'est pas

encore clairement établie ni son lien éventuel avec la réponse aux médicaments.

Variations de l'ADN
~ 3,5 millions de SNP dont 400 à 600 000 <i>private</i> <sup>†</sup> SNP
~ 1 000 CNV de plus de 500 paires de bases (2 900 paires de bases en moyenne) et autres différences structurales (petites et plus grandes insertions, délétions, inversions)
~ 20 000 à 25 000 variations au sein de régions codantes parmi lesquelles de 9 à 11 000 non-synonymes
~ 100 variations entraînant une perte totale de fonction de la région impliquée (dont 20 gènes environ)
~ 1 à 2 % de la séquence totale

†. Polymorphismes présents chez une ou seulement quelque personnes

TABLE 1 – Variations du génome humain : Estimation du nombre moyen de variations chez une personne en bonne santé.

### 3.2 Omics et réponse au traitement

La question de la relation entre génotype et phénotype est l'une des questions fondamentales de la biologie. Les progrès récents de la biologie moléculaire d'une part et des techniques de génotypage et de séquençage d'autre part, ont permis de réaliser de grandes avancées dans la compréhension des phénomènes en jeu. Comment, quand, et dans quels tissus l'information génétique s'exprime. Par quels mécanismes est-elle modulée en réponse à des facteurs internes, environnementaux, ou en réponse à un médicament afin de générer/modifier un phénotype ?

L'étude à grande échelle de ces phénomènes ne se résume donc pas à l'analyse du génome et de ses variations mais doit intégrer aussi l'analyse de l'expression des gènes (transcriptome) ainsi que la quantification des protéines (protéome). L'analyse du transcriptome peut inclure aussi l'analyse des formes alternatives de transcrits (épissage alternatif), elle est effectuée à l'aide d'outils tels que les puces à oligonucléotides et/ou du séquençage des ARN. L'intégration de ces données à celles issues du séquençage de l'ADN, et leurs associations éventuelles avec un trait qualitatif ou quantitatif montre que la relation génotype/phénotype n'est pas aussi simple que ne le suggère le dogme de la biologie moléculaire.

Aux variations génétiques s'ajoutent aussi des facteurs épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et la régulation induite par les micro-ARN. Ces facteurs épigénétiques sont aussi susceptibles d'induire une variabilité de la réponse aux traitements. Il faut cependant noter que l'influence de ces facteurs épigénétiques n'a été rapportée que dans le cadre d'études

en cancérologie [25, 26] où différents profils de méthylation des tumeurs se sont révélés prédictifs de la réponse aux traitements. L'exemple de la méthylation de MGNT en est une illustration : MGNT est un antagoniste de l'effet génotoxique des agents alkylants comme le Temodal (utilisé dans le traitement du glioblastome). Or la méthylation du promoteur de MGNT induit son inactivation, ce qui a pour effet de rendre la thérapie plus efficace. [27]

### 3.3 Les eQTL

Les études d'associations à grande échelle permettent de mesurer un lien statistique entre variations génétiques observées sur une population et un phénotype d'intérêt. La recherche d'une association entre variations génétiques et réponse à un traitement est un exemple d'étude d'association. Cependant, ces études ne donnent pas d'indications sur les mécanismes biologiques, potentiellement associées aux variations génétiques observées, permettant d'expliquer le phénotype observé.

Deux questions restent le plus souvent en suspend :

- quel gène ou groupe de gènes permettraient d'expliquer la variation phénotypique observée ;
- quels sont le ou les variants causaux, c'est à dire, ayant un lien fonctionnel avec la variation phénotypique observée.

S'il apparaît qu'un SNP est associé de manière significative avec un trait d'intérêt, en fonction de la localisation du SNP, plusieurs cas de figure se présentent, parmi lesquels :

1. le SNP se situe dans une région codante (exon) ;
  - (a) le SNP modifie la séquence des acides aminés de la protéine produite : le gène impliqué est très probablement le gène au sein duquel le variant est observé et, le variant observé est très probablement le variant causal ;
  - (b) le SNP ne modifie pas la séquence des acides aminés de la protéine induite : le gène impliqué est probablement le gène au sein duquel le variant est observé et, le variant observé n'est pas forcément le variant causal (il peut être en déséquilibre de liaison avec le variant causal) ;
2. le SNP se situe dans une région non codante (introns, région 3'UTR ou 5'UTR, ou région intergénique) : le gène impliqué peut être le gène au sein duquel, ou au voisinage duquel, le variant est observé et, le variant observé n'est pas forcément le variant causal (il peut être en déséquilibre de liaison avec le variant causal).

Pour tenter d'apporter des éléments de réponse, il est nécessaire d'obtenir des informations supplémentaires sur l'association éventuelle entre l'expression d'un gène et la présence d'une variation génétique. [28] Les *expression quantitative trait loci* (eQTL) désignent une variation génétique en lien fonctionnel avec l'expression d'un gène à proximité (*cis*-eQTL) ou à distance (*trans*-eQTL). Ils sont l'une des pistes avancées par les chercheurs afin de répondre à la question du lien fonctionnel entre variations génétiques et phénotypes dans la mesure où la grande majorité des associations identifiées dans les études pan-génomiques ont impliqué des variants non codants. C'est dans ce contexte que les eQTL ont pris une grande importance dans l'interprétation des résultats obtenus à l'aide des études d'associations à grande échelle.

## 4 Utilisation de ressources biologiques pour l'évaluation de biomarqueurs pronostiques ou prédictifs

L'utilisation de ressources biologiques pour l'évaluation de biomarqueurs pronostiques ou prédictifs a été rendue possible grâce à la constitution de collections dans les centres de ressources biologiques (CRB). Ces collections ont été constituées, le plus souvent, en vue d'une exploitation ultérieure, grâce aux techniques à haut débit de la biologie moléculaire.

L'exploitation de ces ressources a été à l'origine d'un grand nombre d'études rétrospectives produisant une littérature abondante mais peu convaincante en raison du manque de reproductibilité des résultats obtenus. L'échec relatif de la définition de signatures moléculaires des tumeurs du sein à des fins pronostiques ou prédictifs en est l'illustration. [29]

### 4.1 Tester un nouveau marqueur

Il existe une littérature abondante traitant de l'évaluation de biomarqueurs pronostiques. Dans une revue consacrée à ce sujet, Tajik *et al.* [30] en dénombre plus d'une centaine. A titre d'exemple et dans le but d'illustrer les contraintes méthodologiques liées à un *design* susceptible de fournir un niveau de preuve comparable à celui d'un ECR (méthode de référence permettant d'établir l'utilité d'une intervention médicale nouvelle) lors du test d'un biomarqueur, Simon et Wang (2006) [31] ont proposé et discuté plusieurs *design* prospectifs dont le *marker strategy design*.

Ce *design* permet de tester l'hypothèse selon laquelle la prise en compte d'un biomarqueur est susceptible d'améliorer une pratique médicale. Son principe est le suivant : les patients sont d'abord randomisés en deux bras distincts, le bras

*témoin* et le bras *test*. L'attribution du traitement se fait ensuite en fonction des pratiques standards pour le groupe témoin et selon le marqueur à tester dans l'autre groupe (éventuellement en conjonction avec les marqueurs standards). Le biomarqueur n'est mesuré (testé) que dans le groupe *test*. Finalement, les résultats sont comparés entre les deux groupes. Les auteurs conviennent que le nombre de sujets permettant de tirer une conclusion à l'aide d'un tel *design* devrait être grand en raison du nombre de patients potentiellement important pour lesquels la prise en compte de l'information apportée par le biomarqueur ne conduit pas à une modification de la décision thérapeutique.

Simon et Wang (2006) proposent en outre une alternative au *marker strategy design* consistant à tester tous les patients à l'aide de la méthode de référence d'une part, et du biomarqueur candidat d'autre part. Les patients pour lesquels la décision thérapeutique diverge seront alors randomisés dans un bras où la décision thérapeutique sera prise à l'aide de la méthode de référence et un bras où la décision thérapeutique sera prise en fonction du biomarqueur. Finalement, une analyse standard sera réalisée sur ces deux bras et l'utilité du biomarqueur sera démontrée si les résultats du bras *biomarqueur* sont meilleurs que ceux du bras de référence (figure 1).

Cette stratégie est testée pour deux essais : *Microarray in Node-Negative Disease may Avoid Chemotherapy (MINDACT)* [32] et *Trail Assigning Individualized Options for Treatment (Rx)* (TAILORx). [33] Ces deux essais évaluent respectivement des classifieurs de 70 et 21 gènes permettant d'optimiser la stratégie thérapeutique dans le cancer du sein.

Bien que Simon *et al.* (2009) reconnaissent la supériorité de ce *design* par rapport au *randomized marker strategy trial design*, les auteurs remarquent par ailleurs que plusieurs milliers de patientes seront nécessaires afin de mener à bien ces études et que le recrutement prendra près d'une dizaine d'années pour chacune d'entre elles. Ils prédisent aussi que l'évolution des techniques et des connaissances auront rendu obsolètes les premiers résultats de ces études avant même qu'elles ne soient publiées. [34]

## 4.2 Niveaux de preuves

Hayes *et al.* (1996) [35] ont proposé une échelle des niveaux de preuves (*Levels of Evidence* (LOE)) pour évaluer l'utilité d'un biomarqueur (table 2). Cette échelle a été adoptée par l'*American Society of Clinical Oncology* (ASCO).

Comme indiqué plus haut, les exigences méthodologiques et le coût d'une étude permettant d'atteindre le niveau I sont lourdes et rendent ce type d'études difficiles à mettre en œuvre dans la pratique. Simon *et al.* (2009) [34] ont pro-

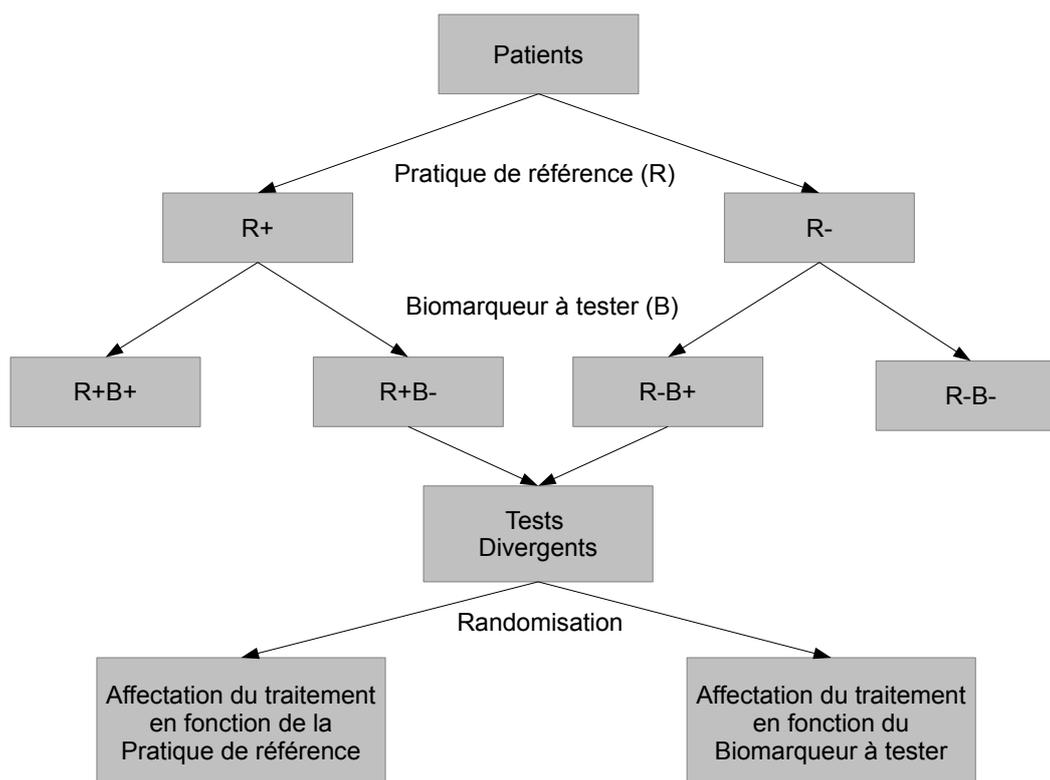


FIGURE 1 – Design pour tester l'utilité d'un biomarqueur : tous les patients sont testés selon les critères classiques (pratique de référence). Dans la pratique de référence, si les patients sont positifs, ils reçoivent le traitement A, et le traitement B sinon. Les patients sont aussi évalués à l'aide du biomarqueur à tester. Les patients pour lesquels les tests sont convergents sont traités selon la pratiques standard, ils sortent de l'essai. Les patients pour lesquels les tests sont divergent sont randomisés dans deux bras, le bras pratique standard et le bras Biomarqueur. Le résultats de l'essai dépendra des performances observées dans ces deux bras.

posé que le niveau I de preuve puisse être accordé à un type particulier d'étude rétrospective. En effet, pour ces auteurs, il est possible d'utiliser des échantillons biologiques archivés lors d'un essai prospectif afin d'évaluer un biomarqueur tout en gardant les caractéristiques de l'étude mère (contrôle de l'erreur de type I et puissance statistique). Le cas de KRAS dans le cancer colorectal en est une illustration. [36, 37]

### 4.3 Essais prospectifs vs. essais rétrospectifs

Dans *Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers*, Simon *et al.* (2009) s'interrogent sur la distinction classique entre essais prospectifs et essais rétrospectifs. Ils remarquent que cette distinction est souvent confondue avec la distinction entre nature expérimentale et observationnelle d'une étude. Ils observent en outre qu'en épidémiologie du cancer, le terme rétrospectif peut effectivement porter à confusion, car aussi bien les études rétrospectives que les études prospectives de cohortes sont observationnelles plutôt qu'expérimentales.

Niveau	Type de preuve
I	Preuve issue d'une étude prospective contrôlée élaborée dans le but de prouver l'utilité d'un biomarqueur. Eventuellement, ce biomarqueur a été mis en évidence lors d'une étude de niveau de preuve II ou III. Idéalement, cette étude est un essai prospectif contrôlé randomisé du type <i>randomized marker strategy trial design</i> .
II	Preuve issue d'une étude dans laquelle les données ont été obtenues à partir d'un essai prospectif contrôlé randomisé afin de tester l'utilité d'une pratique qui n'est pas en relation avec le biomarqueur testé (type étude ancillaire). Cependant, le protocole de collection des échantillons biologiques et les méthodes statistiques appropriées ont été prévus dans l'étude principale.
III	Preuve issue d'une étude rétrospective de grande taille pour laquelle des échantillons biologiques sont disponibles. Les données cliniques n'ont pas été collectées de manière prospective.
IV	Preuve issue d'une étude rétrospective de petite taille pour laquelle des échantillons biologiques sont disponibles. Les données cliniques n'ont pas été collectées de manière prospective.
V	Preuve issue d'une étude pilote établie pour déterminer la distribution du niveau d'un marqueur dans une population échantillonnée.

TABLE 2 – Niveaux de preuve pour l'évaluation de l'utilité clinique d'un biomarqueur. (D'après Hayes et al.. [35])

tales dans la mesure où ni dans les unes, ni dans les autres, les expositions ne sont déterminées par un processus de randomisation.

Les auteurs en déduisent que les associations observées en épidémiologie ne sont pas au même niveau de preuve que celles observées dans les études expérimentales et que la limite principale des études épidémiologiques ne provient non pas de leurs natures prospectives ou rétrospectives mais de leurs natures observationnelles.

Part ailleurs, si une étude rétrospective prévoit l'utilisation de ressources biologiques ayant été collectées de manière prospective, suivant le protocole d'une étude prospective préalable et si les paramètres de l'analyse ont également été fixés de manière prospective, les auteurs proposent alors pour ce type études l'appellation d'étude *prospective-rétrospective*.

#### 4.4 Essais prospectifs-rétrospectifs

Le niveau de preuve d'un essai *prospectif-rétrospectif* doit être considéré comme supérieur à celui d'une étude pour laquelle du matériel biologique est disponible ainsi qu'un test. Cependant, si le nombre de biomarqueurs à tester est important, il est alors nécessaire de prendre les mesures qui s'imposent afin de maintenir le taux d'erreur de type I à un niveau acceptable. C'est la raison pour laquelle, une confirmation à l'aide d'une ou de plusieurs études *prospectives-rétrospectives* est alors nécessaire.

Dans l'échelle des niveaux de preuves proposés par Hayes *et al.* (1996), une étude rétrospective possède au mieux le niveau II (table 2). Simon *et al.* (2009) ont proposé une révision des niveaux de preuves dans laquelle, une distinction particulière est attribuée aux études utilisant des échantillons biologiques conservés de manière prospective afin que ces études puissent obtenir le premier niveau de preuve.

Quatre catégories sont proposées :

- la catégorie A correspond aux essais prospectifs randomisés. Les patients sont recrutés, traités et suivis de manière prospective selon un protocole préétabli. L'étude est calibrée de sorte que l'utilité éventuelle du marqueur puisse être démontrée. Les échantillons sont collectés et analysés au moment de l'essai selon le protocole préétabli. Bien qu'une confirmation provenant d'une étude indépendante soit la bienvenue, elle n'est cependant pas requise. Cette procédure est incluse dans la catégorie LOE-I, elle est la procédure de référence ;
- la catégorie B correspond à une deuxième procédure pouvant prétendre à un niveau LOE-I : il s'agit d'une étude utilisant des échantillons conservés d'un ECR afin d'étudier une nouvelle pratique ou un autre biomarqueur. Comme pour la catégorie A, dans une étude de la catégorie B, les patients sont recrutés, traités et suivis de manière prospective. Les échantillons sont aussi collectés de manière prospective et conservés selon les procédures standards. La question d'intérêt peut être posée après la réalisation de l'étude mère. Les échantillons ne doivent pas être testés avant que le protocole de l'étude ancillaire n'ait été établi et un plan d'analyse statistique déterminé. L'analyse des échantillons biologiques doit être réalisée en aveugle et indépendamment de l'obtention des données cliniques. L'étude ayant été calibrée afin de répondre à une question thérapeutique il est probable qu'elle n'ait pas la puissance statistique nécessaire pour mettre en évidence une éventuelle interaction entre traitement et biomarqueurs testés. En revanche, cette étude pourra mettre en évidence un effet lié au

biomarqueur s'il est suffisamment important. Cependant, le risque de faux positifs est plus important que pour une étude de catégorie A et ce risque augmente avec le nombre de biomarqueurs testés.

Pour que cette procédure soit à un niveau LOE-I, il est indispensable que les résultats de l'étude soient confirmés par une autre étude de type B basée sur un autre essai prospectif randomisé. Enfin il est aussi nécessaire que cette nouvelle étude utilise la même procédure (technologie) de test afin d'identifier et mesurer le biomarqueur dans les mêmes conditions. En outre, la question adressée doit être strictement la même que pour la première étude.

Les études qui ont montré puis confirmé l'association d'une mutation de KRAS avec une efficacité moindre de traitements du cancer colorectal par anticorps monoclonaux anti-EGFR (cetuximab et panitumumab) fournissent une bonne illustration du succès des études rétrospectives sur tissus conservés lors d'essais prospectifs. [38, 36] Dans l'échelle des niveaux de preuve révisée par Simon *et al.* le résultat de ces études est LOE-I; [39]<sup>2</sup>

- la catégorie C correspond aux études pour lesquelles des patients sont inclus dans des protocoles et bénéficient de traitements standards. Les échantillons biologiques sont conservés et testés après la fin de l'étude. Aucune étude de puissance n'a été réalisée à l'avance. L'allocation des traitements, la collecte des résultats cliniques et le prélèvement des échantillons biologiques n'ont pas été prévus dans un protocole prospectif. Les résultats d'une étude de catégorie C sont sujet à biais de confusion et le risque de donner un résultat faussement positif est plus élevé que pour une étude de catégorie A ou B. Une étude de catégorie C peut prétendre à un niveau LOE-II si elle valide une ou plusieurs études de catégorie C;
- la catégorie D correspond à un type d'études très fréquentes de recherche de biomarqueurs dans lesquels des échantillons biologiques et une technique d'analyse sont disponibles. Les résultats de ces études sont en générale peu reproductibles et par conséquent peu fiables.

---

2. Dans l'article *American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion : Testing for KRAS Gene Mutations in Patients With Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy (Journal of clinical Oncology)*, [39] les auteurs déclarent : *Provisional Clinical Opinion Based on systematic reviews of the relevant literature, all patients with metastatic colorectal carcinoma who are candidates for anti-EGFR antibody therapy should have their tumor tested for KRAS mutations in a CLIA-accredited laboratory. If KRAS mutation in codon 12 or 13 is detected, then patients with metastatic colorectal carcinoma should not receive anti-EGFR antibody therapy as part of their treatment.*

La table 3 donne une correspondance entre les niveaux de preuves classiques (Hayes *et al.*) et ceux proposés par Simon *et al.*.

Niveaux de preuves proposés par Hayes <i>et al.</i>	Niveaux révisés par Simon <i>et al.</i>	Validation
I	A	Non requise
I	B	Une ou plusieurs
II	B	Non requise
II	C	Deux ou plus
III	C	Non requise
IV-V	D	Sans objet †

†Les études de niveau LOE-IV ou V n'ont pas d'utilité clinique.

TABLE 3 – Niveaux de preuves pour l'évaluation de l'utilité clinique d'un biomarqueur révisés par Simon *et al.*.

## 4.5 Conclusion

Idéalement, toute nouvelle pratique médicale ne peut être adoptée qu'à condition qu'elle soit d'un niveau de preuve LOE-I. Or, seuls les essais prospectifs contrôlés randomisés sont susceptibles de fournir un tel niveau de preuve. En ce qui concerne les études pharmacogénétiques ou pharmacogénomiques, de tels essais ne sont pas toujours réalisables dans la pratique en raison de contraintes méthodologiques lourdes attachées à ce type d'études. Cependant, Simon *et al.* proposent qu'une étude ancillaire à un essai prospectif contrôlé randomisé (étude de type B) puisse prétendre à un niveau de preuve I si une ou plusieurs études de même catégorie venaient valider ses résultats.

La découverte puis la validation de l'influence d'une mutation de KRAS sur l'efficacité des traitements par anticorps monoclonaux anti-EGFR pour le traitement du cancer colorectal en est une illustration. Par conséquent, l'utilisation d'échantillons biologiques collectés conservés et annotés sous certaines conditions est d'une grande importance pour établir l'utilité d'un biomarqueur pronostic ou prédictif même si, en toute rigueur, cette utilisation est nécessairement rétrospective.



---

## Deuxième partie

# La Leucémie Myéloïde Chronique

---

## Sommaire

---

<b>5</b>	<b>Introduction</b>	<b>46</b>
5.1	Définition . . . . .	46
5.2	Aspects historiques . . . . .	46
5.3	Épidémiologie . . . . .	47
5.4	Évaluation de la réponse aux traitements . . . . .	48
<b>6</b>	<b>Évolution des thérapies</b>	<b>49</b>
6.1	Introduction . . . . .	49
6.2	Chimiothérapies conventionnelles . . . . .	50
6.3	Greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques . . . . .	50
6.4	Interféron- $\alpha$ . . . . .	51
6.5	Inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) . . . . .	51
<b>7</b>	<b>Le suivi des patients</b>	<b>52</b>
7.1	Réponse moléculaire (RM) . . . . .	52
7.2	Recommandations de l'ELN . . . . .	53
<b>8</b>	<b>Déterminants de la réponse moléculaire sous inhibiteurs de tyrosine kinase</b>	<b>55</b>
8.1	Nature du traitement . . . . .	56
8.2	Dose journalière . . . . .	56
8.3	Les scores pronostiques . . . . .	57
8.4	Mutations somatiques . . . . .	61
8.5	Polymorphismes génétiques . . . . .	62
8.6	Observance . . . . .	64
<b>9</b>	<b>Conclusion</b>	<b>66</b>

---

## 5 Introduction

### 5.1 Définition

La leucémie myéloïde chronique Philadelphie positive (LMC-Ph+) est une affection maligne clonale des cellules souches hématopoïétiques. Elle se traduit aussi par une hyperplasie myéloïde dans la moelle osseuse, et par une production excessive de cellules myéloïdes, érythroïdes et des plaquettes dans le sang périphérique. [40]

Au diagnostic, les symptômes de la LMC peuvent être les suivants : fatigue, anorexie, perte de poids, suées ou douleurs osseuses. Cependant, environ 40% des patients sont asymptomatiques. [40] Dans ce cas, le diagnostic est le plus souvent posé de manière fortuite suite à une numération sanguine de routine considérée comme anormale et conduisant à des examens plus poussés. La splénomégalie, présente dans environs la moitié des cas, est le symptôme physique le plus courant. Il conduit à la réalisation d'un examen sanguin et/ou de la moelle (myélogramme). Dans tous les cas, le diagnostic est confirmé par la mise en évidence du chromosome de Philadelphie et du gène de fusion BCR-ABL.<sup>3</sup> [40, 41]

En l'absence de traitement, la maladie évolue inexorablement d'une phase chronique d'une durée de 3 à 5 ans, vers une crise blastique rapidement fatale (de 3 à 6 mois en médiane). [42] Cette crise blastique est souvent précédée d'une phase d'accélération. La phase d'accélération peut être caractérisée par une évolution clonale des cellules leucémiques, c'est-à-dire, par l'apparition dans ces cellules de nouvelles anomalies cytogénétiques. [43]

Contrairement à la phase chronique où l'on observe une prolifération de cellules leucémiques différenciées, la crise blastique se traduit par un envahissement médullaire de cellules leucémiques immatures (blastes) comparables à celles caractérisant les leucémies aiguës. [40]

### 5.2 Aspects historiques

La cellule souche leucémique à l'origine de la LMC-Ph+ est caractérisée par la présence du chromosome Philadelphie. Cette anomalie cytogénétique a été décrite pour la première fois par Nowell et Hungerford à Philadelphie en 1960. [44]

Il s'agit du premier exemple d'anomalie cytogénétique associée à une maladie néoplasique. [45] Contredisant l'idée qu'il s'agissait d'un chromosome 21 supplémentaire, Janet Rowley a montré en 1973 que le chromosome Philadelphie résultait de la translocation entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 (t(9;22)).

---

3. Ne sont considérés ici que les leucémies myéloïdes chroniques à chromosome Philadelphie.

[46]

De Klein *et al.* (1982) [47] ont montré que lors de la formation du chromosome Philadelphie, l'oncogène Abelson (ABL) était *transloqué* du chromosome 9 au chromosome 22. Shtivelman *et al.* (1985) [48] ont montré que la translocation mettait en contact une région appelée *breakpoint cluster region* (BCR) [49] avec une partie du gène ABL, faisant apparaître un gène de fusion, le gène BCR-ABL. L'ARN de fusion résultant de la transcription de BCR-ABL étant aussi associé à la LMC. Ce transcrit est traduit et donne naissance à la protéine de fusion P210 BCR-ABL.

En fonction du point de cassure au sein du gène BCR, les transcrits de fusion sont traduits en protéines de fusion de tailles variables, la partie ABL restant constante. Outre l'association statistique entre LMC et protéine de fusion BCR-ABL, le caractère oncogénique de cette dernière a d'abord été suggéré par le fait que le pronostic des patients variait en fonction de la taille de BCR-ABL. [50] Lugo *et al.* (1990) [51] ont montré que l'activité tyrosine kinase était dépendante du point de cassure dans la région BCR, cette activité pouvant être en relation avec la gravité de la maladie.

### 5.3 Épidémiologie

Il existe peu de données épidémiologiques relatives à la leucémie myéloïde chronique (LMC). Elles proviennent principalement de registres européens dédiés au cancer (le registre suédois du cancer et celui du *land* de la Sarre en Allemagne) ou encore du programme *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) <sup>4</sup> du *national cancer institute* (NCI). D'après Orphanet <sup>5</sup>, la LMC est le syndrome myéloprolifératif le plus fréquent, elle représente de 15 à 20% de tous les cas de leucémies. D'autres études estiment que cette proportion se situe entre 7 et 20%. [42]

Rohrbacher *et al.* (2009), [52] dans une revue dédiée à l'épidémiologie de la LMC, rapportent des taux d'incidences (n<sup>bre</sup> de cas /100 000 hab. /an) allant de 0,6 à 2. Corm *et al.* (2008) [53] estiment que pour la France, le taux d'incidence est de 0,8.

Par ailleurs, Rohrbacher *et al.* rapportent les éléments suivants :

- une incidence qui augmente avec l'âge, avec un pic entre 50 et 60 ans ;
- un âge médian se situant autour de 65 ans <sup>6</sup> ;

---

4. <http://seer.cancer.gov/>

5. <http://www.orpha.net/>

6. les patients âgés étant sous représentés dans les études clinique, cette valeur ne peut être déterminée qu'à l'aide des registres. Rohrbacher *et al.* estiment à 10,7 en moyenne la différence d'âge entre les patients qui participent à des études et ceux qui n'y participent pas.

- une prédominance masculine (1,3 à 1,8 pour 1).

Les données sur la prévalence ( $n^{\text{bre}}$  de cas /100 000 hab.) de la maladie sont plus rares encore. Cependant, la publication française Corm *et al.*, rapporte les résultats d'une étude épidémiologique basée sur des données couvrant la période allant de 1985 à 2007. Les résultats sont les suivants (figure 2) :

- en 1998, la prévalence estimée est de l'ordre de 5,80 ;
- sur la période 1998–2002 la prévalence augmente en moyenne à un taux de 4,1% par an pour atteindre 6,77 en 2002 ;
- sur la période 2003–2007, elle a progressé au taux annuel de 9,3% pour atteindre 10,42 en 2007.

Les auteurs de cette étude attribuent ce changement dans le taux d'augmentation de la prévalence à l'introduction de l'imatinib en 2001. En effet Corm *et al.* (2011) [54] estiment que le taux de survie à 5 ans pour la période 1900–1999 est de 65% *vs.* 88% pour la période 2001–2007. L'augmentation du nombre de malade, et donc de la prévalence de la maladie, étant la conséquence directe des progrès observés en terme de survie.

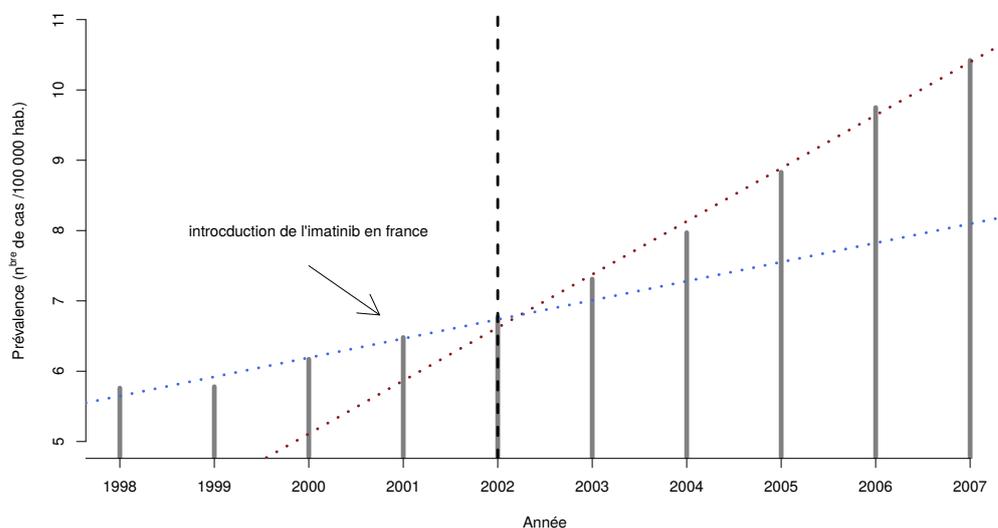


FIGURE 2 – Prévalence de la LMC en France entre 1998 et 2007 : la prévalence de la LMC progresse à un taux de 4,1% par an entre 1998 et 2002, elle augmente à un taux de 9,3% par an entre 2002 et 2007.

#### 5.4 Évaluation de la réponse aux traitements

Dans la LMC, la réponse aux thérapies peut être évaluée à l'aide de critères hématologiques, cytogénétiques et moléculaires.

La réponse hématologique complète correspond à la normalisation de la numération sanguine, une régression de la splénomégalie et à la disparition de tous les autres symptômes et signes de la maladie. [42] La réponse hématologique complète peut être obtenue à l'aide de chimiothérapie (§ 6.2), de l'interferon-alfa recombinant (rIFN $\alpha$ ) (§ 6.4) ou d'inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) (§ 6.5), cependant, les patients en rémission hématologique présentent des niveaux détectables de cellules Philadelphie positives (Ph+) et de transcrits BCR-ABL.

Une réponse cytogénétique complète (RCyC) correspond à un niveau indétectable de mitose Ph+ en analyse cytogénétique. [42] Pour les patients atteignant ce niveau de réponse, une mesure plus sensible encore, dite de la *maladie résiduelle*, peut être effectuée par détection du transcrit de fusion BCR-ABL par *reverse transcriptase quantitative-polymerase chain reaction* (RTQ-PCR).

La RTQ-PCR est une technique sensible de détection de la maladie résiduelle qui permet de détecter de l'ordre de 1 cellule exprimant le transcrit de fusion BCR-ABL sur  $10^5$  à  $10^6$  cellules saines. [55] Les différents niveaux de maladie résiduelle sont décrits plus loin (§ 7). Brièvement, la réponse moléculaire majeure correspond à un ratio BCR-ABL/ABL de 0,1%. [56] Elle correspond au maintien de la LMC en phase chronique avec risques limités de progression en phase accélérée et/ou crise blastique. [57] Les figures 4 et 6 illustrent les différents niveaux de maladie résiduelle en terme de réponse moléculaire ainsi que la sensibilité et les limites des différents méthodes d'évaluation.

## 6 Évolution des thérapies

### 6.1 Introduction

Depuis les premières descriptions de la LMC au milieu du XIX<sup>e</sup> siècle jusque vers la fin des années 1970, les thérapies utilisées pour le traitement de la LMC, telles l'arsenic, la radiothérapie, ou les chimiothérapies conventionnelles (busulfant et l'hydroxyurée) n'étaient que palliatives. En d'autres termes, ces traitements étaient susceptibles d'agir sur la qualité de vie des patients en phase chronique, mais n'étaient d'aucune aide pour stopper ou ralentir de manière significative la progression de la maladie vers ses formes avancées. L'introduction de la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (ou transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques (*allogenic stem cell transplantation* (alloSCT)) dans les années 1970, marque une première avancée significative dans le traitement de la LMC, dans la mesure où environ 50% des patients candidats à la greffe peuvent espérer une rémission durable. Cependant, les patients greffés en rémission sont sujets à des effets indésirables, potentiellement graves, tels que la maladie du greffon contre l'hôte (*graft versus host* (GVH)). Les autres patients

greffés peuvent être victimes de rechutes et/ou des complications liées à la greffe.

L'introduction de l'interféron- $\alpha$  (rIFN $\alpha$ ) marque une nouvelle avancée dans la prise en charge de la LMC, dans la mesure où l'rIFN $\alpha$  est susceptible d'induire une RCyC (§ 5.4) dans 15 à 30% des cas ainsi qu'un gain significatif en terme de survie comparé aux chimiothérapies conventionnelles.

L'avènement des ITK marque un tournant décisif dans l'histoire de la LMC. Ces molécules ciblent de manière plus ou moins spécifique l'activité tyrosine kinase de la protéine de fusion BCR-ABL et sont capables d'induire une réponse moléculaire prolongée chez une majorité de patients tout en présentant un profil de toxicité supportable.

## 6.2 Chimiothérapies conventionnelles

Le principe des chimiothérapies dans le traitement de la LMC est de limiter les complications liées à un niveau important de neutrophiles issues des précurseurs leucémiques. Cette stratégie exploite le fait que les cellules leucémiques sont sensibles à ces agents. [40] 90% des patients traités à l'hydroxyurée ou au busulfan obtiennent une rémission hématologique. [58] Les chimiothérapies sont considérées comme des traitements palliatifs dans la mesure où ces agents se montrent incapables d'induire des réponses cytogénétiques significatives, et par conséquent de stopper la progression de la maladie. Cependant, bien que la supériorité de l'hydroxyurée sur le busulfant ait été démontrée formellement en terme de survie, avec une médiane de 58 mois *vs.* 45 respectivement, [59] c'est sur des critères liés à la tolérance que l'hydroxyurée a été considérée comme supérieur au busulfan. [59, 40, 42]

L'opportunité d'une association chimiothérapie-rIFN $\alpha$  n'est plus mentionnée dans les recommandations d'experts après 1998. [42, 60, 56] Cependant, Baccarani *et al.* (2013) précisent dans la dernière version des recommandations de l'*European LeukemiaNet* (ELN) que l'hydroxyurée peut être utilisée temporairement jusqu'à ce qu'un diagnostic soit établi. [56]

## 6.3 Greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques

La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques est considérée comme le seul traitement curatif pour la LMC. [61] Les propriétés curatives de la greffe sont attribuées, entre autre, à l'effet *greffon contre leucémie* (*graft versus leukemia* (GVL)), un phénomène immunothérapeutique grâce auquel les lymphocytes T et NK allogéniques reconnaissent et détruisent les cellules leucémiques du patient. [62, 63] La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques s'est imposée dans les années 1980 comme une alternative aux chimiothérapies dans

la mesure où elle permettait un gain en terme de survie [64] mais surtout une rémission durable chez un nombre significatif de patients : vers la fin des années 1990 on estimait que la moitié des patients restait en vie de 5 à 10 ans après leur transplantation. [42] Cependant, la probabilité de survie à long terme est significativement réduite chez les patients transplantés en phase accélérée ou en crise blastique mais aussi chez les patients âgés. [61, 65, 64, 40, 66] C'est la raison pour laquelle certains auteurs préconisaient cette pratique pour de jeunes patients nouvellement diagnostiqués disposant d'un donneur HLA-compatible apparenté. [65] Dans la pratique, pour des raisons liées à l'âge et à la disponibilité d'un donneur HLA-compatible apparenté, cette possibilité ne se présente que dans 15 à 20% des cas. Cette proportion s'élève à environ 30% si l'on prend en compte les donneurs HLA-compatibles non apparentés, mais au prix d'une morbidité et d'une mortalité accrue. [40]

La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques reste une pratique risquée, principalement à cause des effets dus aux traitements toxiques utilisés pour le conditionnement (chimiothérapie à haute dose et radiothérapie) mais surtout à cause d'une morbidité accrue liée à la maladie du *greffon contre l'hôte* (GVH) susceptible de se déclarer dans presque la moitié des cas. [56] C'est la raison pour laquelle, selon les recommandations actuelles, la transplantation n'est envisagée qu'en cas d'échec d'une prise en charge en seconde ligne par ITK. [56]

#### 6.4 Interféron- $\alpha$

Dans un contexte où seule une minorité de patients étaient susceptibles de bénéficier d'une transplantation, l'rIFN $\alpha$  s'est imposé dans les années 1990 comme traitement de première ligne dans la LMC, ce traitement étant la seule alternative thérapeutique pouvant induire une réponse cytogénétique complète. [42, 67] Il offre une survie globale à 10 ans allant de 27 à 53%. [68] Bien que son mécanisme d'action reste peu connu, et malgré une faible tolérabilité, l'rIFN $\alpha$  reste une option thérapeutique pour des patients intolérants aux ITK sans autre alternative thérapeutique.

l'rIFN $\alpha$  a aussi été utilisé en combinaison avec des chimiothérapies [58] et il a été testé en combinaison avec l'imatinib dans l'étude française *STI571 Prospective Randomized Trial* (SPIRIT). [69]

#### 6.5 Inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK)

Après les premières descriptions, par Nowell et Hunferford, d'une anomalie cytogénétique associée à la LMC, [44] puis la démonstration que la protéine de fusion BCR-ABL possédait des propriétés oncogéniques en lien avec l'intensité de son

activité tyrosine kinase, [51] l'oncoprotéine BCR-ABL s'est imposée comme cible pertinente pour le traitement de la LMC. C'est dans ce contexte que la recherche de molécules ciblant spécifiquement l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL (inhibitrices de tyrosine kinase) a débuté au début des années 1990, notamment dans les laboratoires Ciba-Geigy (prédécesseurs de Novartis). L'imatinib est le résultat de cette recherche. Outre une haute affinité et spécificité pour la protéine tyrosine kinase Abelson, l'imatinib possède des propriétés pharmacocinétiques et un profil de toxicité acceptable. Son efficacité et sa tolérabilité, dans un contexte clinique, ont été rapportés dans une série d'articles restés célèbres :

- en 1996, Druker *et al.* [70] ont montré l'efficacité de l'imatinib *in vitro* ;
- en 2001, Druker *et al.* [71] ont montré que l'imatinib était efficace et bien toléré dans un essai de phase I débuté en 1998 ;
- en 2002, Kantarjian *et al.* [72] ont montré l'efficacité de l'imatinib dans un essai de phase II débuté en 1999.

Finalement, la supériorité de l'imatinib sur les traitements de référence durant cette période (rIFN $\alpha$  + cytarabine à faible dose) a été rapportée en 2003 par O'Brien *et al.* [73] dans un essai de phase III débuté en 2000 (*International Randomized Study of Interferon and STI571* (IRIS)).

Les résultats de l'étude IRIS sont les suivants : 87,1% des patients en réponse cytogénétique majeure (de 0 à 35% de cellules ph+ en métaphase) *vs.* 34,7% pour les bras imatinib *vs.* rIFN $\alpha$  + cytarabine à faible dose après 18 mois de traitement, respectivement.

Suite à ces résultats, la FDA en 2001 suivie par l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps) en 2002 ont octroyé à l'imatinib une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement de la LMC en première ligne. Depuis, des molécules dites de deuxième génération ont fait leur apparition pour une prise en charge de la LMC en première ou seconde ligne, notamment, le dasatinib et le nilotinib. Récemment des molécules de troisième génération ont également obtenu une AMM (bosutinib et ponatinib). Ces traitements sont indiqués en cas d'intolérance ou d'échec à l'imatinib.

## 7 Le suivi des patients

### 7.1 Réponse moléculaire (RM)

La réponse moléculaire est définie comme l'amplitude de la diminution du taux BCR-ABL/ABL par rapport à la valeur de 100% définie par convention comme valeur de référence au diagnostic dans l'étude IRIS. [74] La majorité des patients répondant à l'imatinib dans l'étude IRIS ont aussi obtenu une ré-

ponse moléculaire majeure, c'est-à-dire, une diminution de 3 log par rapport au niveau de base au diagnostique (100%). Exprimée sur l'échelle internationale (*international scale* (IS)) cette valeur est de 0,1%. Plus généralement, sur une échelle logarithmique, les valeurs 10, 1, 0,1 0,01 0,0032 et 0,001% de l'IS correspondent à des réponses de 1, 2, 3, 4, 4,5 et 5 log respectivement en dessous de la ligne de base. La figure 3 illustre les différents niveaux de réponses et leur correspondances sur l'échelle internationale. [75]

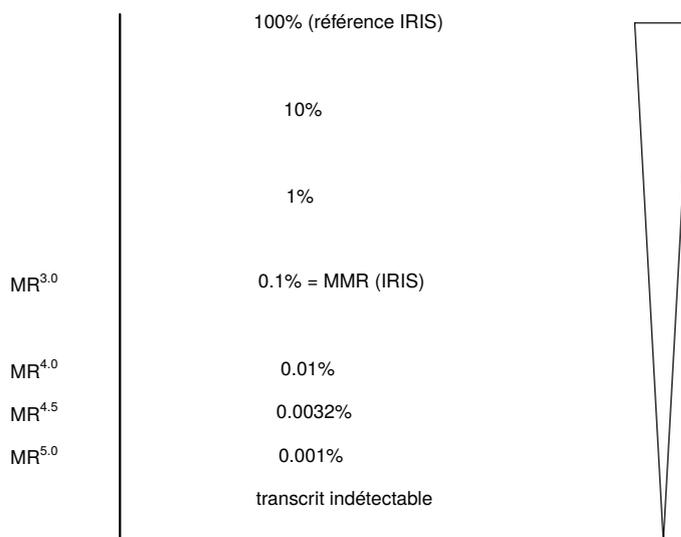


FIGURE 3 – La réponse moléculaire exprimée sur l'échelle internationale. (D'après Cross *et al.* (2012). [75])

La figure 4 [76] illustre les différents niveaux de réponses moléculaires et les limites de précisions des tests utilisés en routine pour le monitoring de la maladie résiduelle.

## 7.2 Recommandations de l'ELN

Sur recommandations de l'ELN (Baccarani *et al.* (2013) [56]), le suivi des patients dans la LMC en phase chronique est préférentiellement réalisé à l'aide de la mesure de la maladie résiduelle par RTQ-PCR sur échantillon sanguin. En outre, ce monitoring doit être réalisé au minimum tous les trois mois afin de déterminer une trajectoire de réponse chez un patient.

Les réponses peuvent être optimales, ou bien traduire un échec de la thérapie. Une réponse optimale est associée avec la meilleure survie sans progression à long

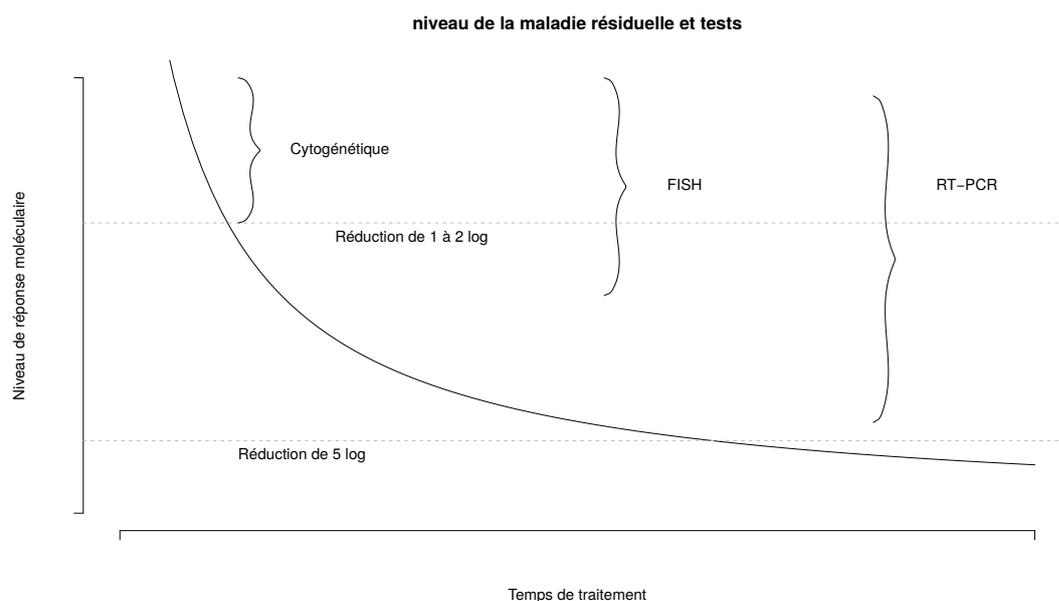


FIGURE 4 – *Maladie résiduelle et tests. La surveillance moléculaire par RTQ-PCR permet de rendre compte de la réponse au traitement, cette technique permet de détecter des niveaux de maladie résiduelle indétectables avec les examens de cytogénétique ou le fluorescence in situ hybridization (FISH). (D'après Radich (2009). [76])*

terme, c'est à dire, une survie comparable à celle de la population générale. Cette situation, la meilleure, indique qu'aucun changement de stratégie thérapeutique n'est nécessaire. En revanche, l'échec indique que le patient devrait se voir administrer un traitement alternatif afin de limiter le risque de progression et de décès. Entre ces deux zones, les experts de l'ELN ont défini une zone d'alarme. Cette zone indique qu'un suivi resserré doit être pratiqué afin de permettre un changement de stratégie dans les meilleurs délais en cas d'échec de la thérapie.

Une réponse optimale est définie par une chute du ratio BCR-ABL/ABL (exprimé sur l'IS) de 1 log à trois mois (réponse moléculaire précoce), de 2 log à 6 mois et de 3 logs après 12 mois de thérapie (réponse moléculaire majeure (RMM)). Un échec est défini lorsque la réponse moléculaire reste supérieure à 10% après 6 mois, et supérieure à 1% après 12 mois de thérapie. La figure 5 illustre les recommandations de l'ELN.

La figure 6 illustre trois profils de réponses : le patient A (courbe A) n'obtient pas de RMM avant 18 mois de traitement, le patient B obtient une RMM avant 200 jours de traitement et le patient C obtient une RMM puis une réponse moléculaire profonde (réduction supérieure à 4 log (RM<sup>4.0</sup> ou *deep molecular response*)).

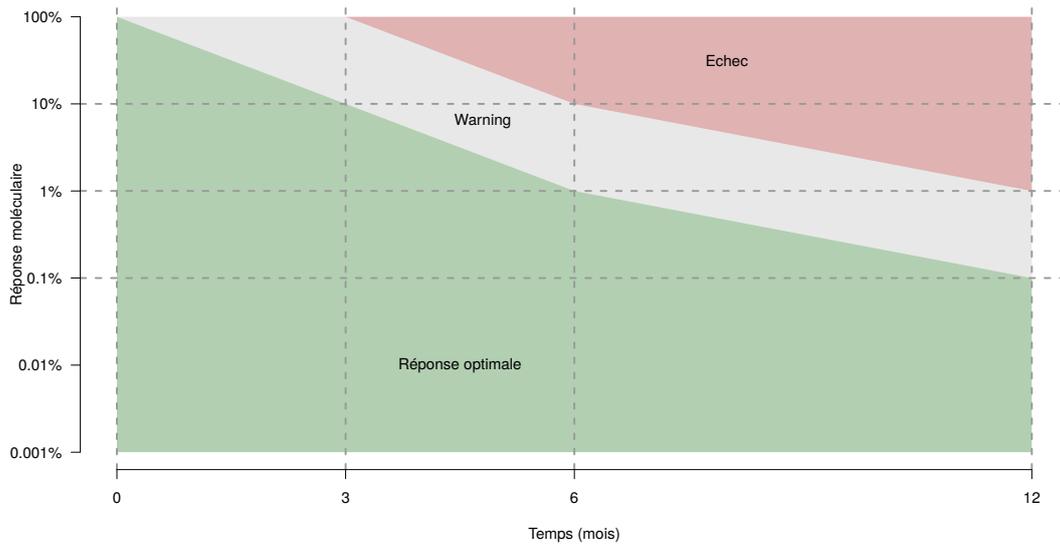


FIGURE 5 – Définition de la réponse moléculaire optimale. Les patients avec un ratio BCR-ABL/ABL inférieur à 10%, 1% et 0,01% à 3, 6 et 12 mois respectivement, sont répondeurs optimaux (zone en vert). Les patients avec un ratio BCR-ABL/ABL supérieur à 10%, 1% à 6 et 12 mois respectivement, sont en échec (zone rouge). Entre ces deux limites, les patients sont en zone d'alarme (zone grise). (D'après Baccarani et al. (2013). [56])

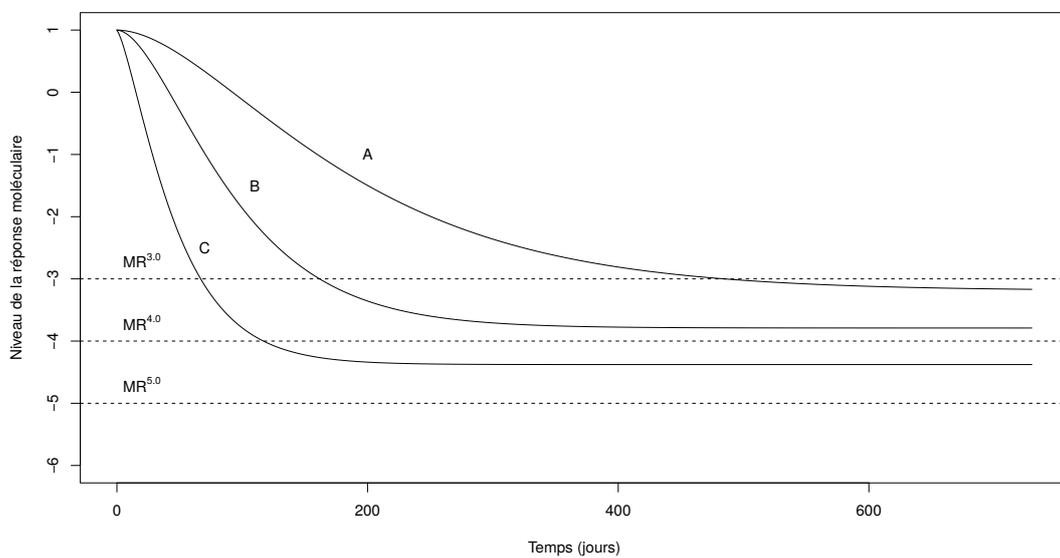


FIGURE 6 – Profils de réponses moléculaires communs dans la LMC en phase chronique traitée par ITK.

## 8 Déterminants de la réponse moléculaire sous inhibiteurs de tyrosine kinase

La réponse aux ITK dans la LMC en phase chronique, peut être déterminée par des facteurs parmi lesquels certains sont liés aux patients (âge, sexe, déter-

minants génétiques), des facteurs cliniques ou liés à la maladie (notamment la taille de la rate ou la numération sanguine). Par ailleurs, le type même d'ITK (de première génération (imatinib) ou de seconde génération comme le dasatinib ou le nilotinib) peut avoir un impact. La dose journalière est aussi un facteur permettant d'influencer la réponse thérapeutique. D'autres facteurs liés à la tolérabilité du traitement, à l'environnement médical, la relation patient-clinicien ou l'environnement socio-économique du patient sont aussi susceptibles d'influencer, plus ou moins directement, la réponse aux traitements.

### 8.1 Nature du traitement

Suite à la publication des résultats de l'étude IRIS démontrant une supériorité de l'imatinib sur rIFN $\alpha$  (+ cytarabine à faible dose), [73] d'autres molécules ont fait leur apparition pour le traitement en première ligne de la LMC en phase chronique. Ces ITK de seconde génération sont principalement le dasatinib et du nilotinib, développés par Bristol-Myers Squibb et Novartis. Ces molécules ont obtenu une AMM en 2006 et 2007 respectivement.

Deux études (promues par les fabricants) ont montré que ces ITK de seconde génération étaient susceptibles d'induire des réponses cytogénétiques et moléculaires plus rapides et plus profondes que l'imatinib. En terme de réponse moléculaire majeure (RMM) à 12 mois, Kantarjian *et al.* [77] ont montré qu'elle était de 46% pour le dasatinib *vs.* 28% pour l'imatinib. Saglio *et al.* [78] rapportent 44% pour le nilotinib *vs.* seulement 22% pour l'imatinib pour le même critère de jugement. Depuis d'autres études ont apporté des conclusions similaires, cependant aucune d'entre elles ne montrent de supériorité des ITK de seconde génération sur l'imatinib en terme de survie globale.

Par ailleurs, l'étude française SPIRIT [69] a montré que la réponse moléculaire profonde (MR<sup>4</sup>) à 1 an était significativement supérieure chez des patients en phase chronique traités à l'aide d'une combinaison d'imatinib 400 mg/j + rIFN $\alpha$  *vs.* imatinib seul (30% *vs.* 14%).

Il n'existe pas de consensus sur l'opportunité de prescrire imatinib ou ITK de seconde génération en première ligne, notamment en termes de survie globale et d'effets indésirables au long cours. Cependant, il semble admis que la réponse moléculaire précoce puisse être déterminée, en partie, par la nature de l'ITK administré, éventuellement en combinaison avec l'rIFN $\alpha$ .

### 8.2 Dose journalière

La question de la dose optimale d'imatinib pour le traitement en première ligne de la LMC en phase chronique s'est posée très tôt après la publication des

résultats de l'étude IRIS. Selon cette étude, 38% des patients obtiennent une réponse moléculaire majeure à 12 mois de traitement avec une dose journalière de 400 mg. [74] Ce point, peu controversé, n'a fait l'objet d'études approfondies que récemment.

En 2004, Kantarjian *et al.* [79] rapportent de meilleurs taux de réponses cytogénétiques et moléculaires pour des patients traités à 400 mg deux fois par jour, c'est-à-dire 2 fois la dose standard, tandis que cette dose restait bien tolérée. Cette première étude montre que 63% de ces patients obtiennent une réponse moléculaire majeure à 12 mois de thérapie. Cortes *et al.* (2009) [80] dans une stratégie similaire obtient 54% de réponse moléculaire majeure.

Comparés aux 38% de référence de l'étude historique IRIS, ces résultats semblent trancher nettement en faveur d'une efficacité accrue de l'imatinib à forte dose. Cependant, ces deux études ne sont pas des études contrôlées randomisées (ECR), elles sont par conséquent sujettes à des biais de sélection potentiellement importants.

Depuis, des études prospectives ont abordé cette question dans le cadre d'ECR où des patients ont été randomisés en différents bras de traitements afin de tester l'effet d'une dose journalière de 600 ou 800 mg/j *vs.* 400 mg/j. Il s'agit des essais *Tyrosine Kinase Inhibitor Optimization and Selectivity* (TOPS) (Cortes *et al.* (2010) [81]), SPIRIT (Preudhomme *et al.* (2010) [69]), CML *study* IV (Hehlmann *et al.* (2011) [82]) et plus récemment l'essai S0325 du *Southwest Oncology Group* (SWOG) (Deininger *et al.* (2014) [83]). Ces études sont plus nuancées sur l'écart observé en terme de proportion de patients atteignant une réponse moléculaire majeure à 12 mois par rapport aux différentes doses. Elles montrent néanmoins un avantage pour une dose journalière de 600 ou 800 mg/j *vs.* 400 mg/j. Les fortes doses permettent d'obtenir de 46 à 53% de réponses moléculaires majeures *vs.* 34 à 40% pour la dose standard. Les résultats de ces différentes études sont résumés table 4.

### 8.3 Les scores pronostiques

En 1984, Sokal *et al.* [85] ont publié une analyse multivariée sur la survie de 813 patients diagnostiqués en phase chronique entre 1962 et 1981 et traités en majorité par chimiothérapie (busulfan). Cette étude a montré que la taille de la rate et le nombre de blastes circulant dans le sang périphérique étaient fortement associés à la survie globale.

Sokal *et al.* en ont déduit un score pronostique où sont pris en compte, outre la taille de la rate et le nombre de blastes, l'âge et la numération des plaquettes. Les auteurs de cette étude ont proposé trois catégories de risques : le risque

Etude	ECR†	Dose d'imatinib (mg/j)	# patients	Biais de sélection potentiel	MMR à 12 mois
IRIS [74]	Oui	400	553	–	38 %
Kantarjian <i>et al.</i> (2004) [79]	Non	800	114	Sokal‡ faible (70%)	63 %
Cortes <i>et al.</i> (2009) [80]	Non	800	115	Sokal‡ faible (70%)	54 %
Cortes <i>et al.</i> (2010) [81]	Oui	400	157	–	40%
		800	319	–	46%
Preudhomme <i>et al.</i> (2010) [69]	Oui	400	159	–	38%
		600	160	–	49%
Hehlmann <i>et al.</i> (2011) [82]	Oui	400	325	–	34%
		800	338	–	46 %
Deininger <i>et al.</i> (2014) [83]	Oui	400	72	–	36%
		800	73	–	53%

†Essai contrôlé randomisé; ‡Voir 8.3; §*Eastern Cooperative Oncology Group* [84] Le score ECOG est une échelle de performance utilisée en oncologie permettant de chiffrer l'état de santé général d'un patient.

TABLE 4 – Niveau de la réponse moléculaire majeure en fonction de la dose d'imatinib journalière.

faible correspond à un score inférieur à 0,8. Ce groupe comprend environ 39% des patients. Le risque intermédiaire correspond à un score compris entre 0,8 et 1,2. 38% des patients sont diagnostiqués avec ce score. Enfin, le risque élevé correspond à un score supérieur à 1,2, ce risque concerne environ 23% des patients.

Depuis les années 2000, deux autres scores pronostiques sur la probabilité d'obtenir une réponse cytogénétique complète ont été introduits dans la pratique clinique. Il s'agit des scores Euro (ou score de Hasford) et EUTOS (*European Treatment and Outcome Study*) proposés par Hasford *et al.* en 1998 et 2011 respectivement. [86, 87] Ces scores ont été élaborés afin de tenir compte de l'évolution de la prise en charge thérapeutique des patients. Alors que le score de Sokal *et al.* a été mis au point grâce à une étude réalisée à l'aide de patients traités par chimiothérapie, Euro et EUTOS ont été construits à partir d'études menées sur des patients traités par interféron et imatinib respectivement. La table 5 détaille le calcul des différents scores et présente les principales informations à leurs sujets.

Bien que les scores Euro et surtout EUTOS ont permis de mettre à jour des éléments pronostiques dans le contexte des thérapies actuelles au regard de la réponse cytogénétique, le score de Sokal reste un score pronostique toujours pertinent en terme de survie globale à l'ère des ITK. [56]

### Taille de la rate

L'élément prépondérant dans le calcul de ces différents scores est la taille de la rate. Ce paramètre est le seul à entrer dans le calcul des trois scores. Malgré l'imprécision liée à la mesure de ce facteur, cette information pourrait être en lien avec le niveau d'avancement de la maladie. Hasford *et al.* (2011) avance l'hypothèse d'un lien avec une hématopoïèse extra médullaire potentiellement préjudiciable pour le patient.

### L'âge

Avant l'introduction des ITK dans la pratique clinique courante, l'âge était considéré comme un critère de mauvais pronostic. Il entrait dans la composition des scores Sokal et Euro. En revanche, il n'est plus présent dans la composition du score EUTOS. Il semble donc que l'abolition du caractère péjoratif de l'âge dans la LMC soit concomitant avec la l'apparition des ITK.

Se basant sur l'étude allemande CML *study IV* relative à la comparaison des doses 400 *vs.* 600 mg/j d'imatinib, Proetel *et al.* (2014) proposent l'explication suivante : outre un effet global positif sur la réponse moléculaire d'une dose journalière de 800 mg/j d'imatinib, la dose standard de 400 mg/j est associée à une réponse plus aléatoire chez les patients de plus de 65 ans, une augmentation de la

Etude/Score	Traitement	Formule	Niveaux de risque	Proportion de patients
Sokal <i>et al.</i> [85]	chimiothérapie	$\exp(0,0116 \times \text{âge (années)} - 43,4) +$	risque faible : $\leq 0,8$	39%
		$(0,0345 \times (\text{taille de la rate (cm)} - 7,51) +$ $(0,188 \times ((\text{plaquettes (10}^9/\text{L)})/700)^2 - 0,563)) +$ $(0,0887 \times (\text{blastés (\%)} - 2,10))$	risque intermédiaire : $0,8 - 1,2$ risque élevé : $> 1,2$	38 % 23%
Euro, Hasford <i>et al.</i> [86]	interféron alpha	$(0,666 \times I_{\text{âge} \geq 50}) + (0,042 \times \text{taille de la rate (cm)}) +$	risque faible : $\leq 780$	40,6%
		$(1,0956 \times I_{\text{plaquettes} > 1500 \times 10^9/\text{L}}) + (0,0584 \times \text{blastés (\%)}) +$ $(0,20399 \times I_{\text{basophiles} > 3\%}) + (0,0413 \times \text{éosinophiles (\%)})$	risque intermédiaire : $781 - 1480$ risque élevé : $> 1480$	44,7 % 14,6 %
EUTOS, Hasford <i>et al.</i> [87]	imatinib	taille de la rate $\times 4 +$ basophiles $\times 7$	risque faible : $\leq 87$ risque élevé : $> 87$	79% 21%

TABLE 5 – Scores pronostiques de la leucémie myéloïde chronique en phase chronique. Ces scores peuvent être calculés grâce à des outils en ligne : [http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/cml\\_score/index\\_eng.html](http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/cml_score/index_eng.html) pour le score Sokal et [http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/eutos\\_score/index\\_eng.html](http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/eutos_score/index_eng.html) pour le score EUTOS

dose ayant tendance à homogénéiser la réponse de ces patients vers des niveaux de réponse satisfaisants. En d'autres termes, les patients âgés sont plus sensibles que les autres à une modulation de la dose journalière d'imatinib, cette modulation permettant de gommer l'effet péjoratif lié à l'âge. [88]

Proetel *et al.* concluent que malgré un retard en terme de vitesse et de profondeur de la réponse chez les patients de plus de 65 ans sous dose standard, une optimisation du traitement permet de rattraper ce retard.

## 8.4 Mutations somatiques

Plus de 80 substitutions d'acides aminés ont été associés à des résistances à l'imatinib. [56] Brièvement, ces mutations ont pour effet de modifier la conformation de la protéine de fusion BCR-ABL *standard* de sorte que l'imatinib perd de son affinité avec elle. Il en résulte une perte d'efficacité de l'imatinib dans l'inhibition de la fonction tyrosine kinase de la protéine BCR-ABL et donc de son potentiel oncogénique. Dans la pratique clinique, seules une petite dizaine de ces mutations sont couramment rencontrées, notamment la mutation T315I (isoleucine remplaçant une thréonine en position 315) chez des patients en phase accélérée ou en crise blastique. Cette mutation n'est sensible qu'au ponatinib. La table 6 recense certaines de ces mutations en regard avec les médicaments peu ou pas sensibles à ces mutations.

Mutations de BCR-ABL	Peu sensible à	Résistante à
G250E	Bosutinib	
Q252H	Dasatinib	
Y253H	Nilotinib	
E255K/V	Bosutinib, dasatinib nilotinib, ponatinib	
T315I		Bosutinib, dasatinib, nilotinib
F317L	Dasatinib	
F355V	Nilotinib	
H396R	Ponatinib	

TABLE 6 – Mutations somatiques critiques de BCR-ABL : Toutes les mutations présentées dans la table sont peu sensibles voir résistantes à l'imatinib, elles sont sensibles ou résistantes aux autres ITK présentés dans la table. (D'après Baccarani *et al.* (2015). [89])

## 8.5 Polymorphismes génétiques

La pharmacogénétique met en relation variabilité génétique des patients et variabilité de la réponse au traitement. La pharmacogénétique de l'imatinib est un sujet qui a été largement étudié. [90, 91, 92] On distingue deux aspects dans cette problématique : la pharmacocinétique et la pharmacodynamique, c'est-à-dire, l'effet de la variabilité génétique en amont ou en aval de la cible du médicament respectivement.

### Pharmacocinétique

L'imatinib est administré par voie orale, ce médicament est donc sujet aux variations interindividuelles dans les processus d'absorption gastro-intestinales, l'effet de premier passage hépatique, les pompes d'influx et efflux cellulaires. L'efflux de l'imatinib est médié par les protéines MDR1 (*multi drug resistance*, ou ABCB1) et BCRP (*breast cancer resistance protein* codée par le gène ABCG2), et son influx par hOCT1 (*human organic cation transporter 1*). Il est métabolisé principalement par deux protéines du cytochromes P450 (CYP3A4 et CYP3A5). [93]

Diverses études ont été réalisées pour étudier la pharmacocinétique de l'imatinib. Dulucq *et al.* (2010) [91] dans une revue consacrée à ce sujet relève une vingtaine de polymorphismes appartenant à 6 gènes, étudiés dans 11 publications. Parmi les associations testées seuls 9 polymorphismes ont donné des résultats sur un ensemble de critères de jugement de la réponse thérapeutique comme la réponse moléculaire ou la réponse cytogénétique complète. Les gènes impliqués sont hOCT1, CYP3A, ABCB1 et ABCG2. La table 7 reprend les résultats de ces études pour les associations observées avec la réponse moléculaire.

### Pharmacodynamique

La pharmacodynamique des ITK est un domaine de recherche actif. Il a été montré que les ITK prescrits pour le traitement de la LMC ne sont pas spécifiques de l'onco-protéine BCR-ABL et que leur spectre d'action est variable. Hantschel *et al.* [98] dénombrent 7 cibles pour l'imatinib et le nilotinib et jusqu'à 68 cibles pour le dasatinib, parmi lesquelles, ABL, KIT, PDGFR ou DDR1. Par ailleurs, certaines de ces cibles sont directement impliquées dans le développement et la régulation du système immunitaire. Cependant, l'influence des inhibiteurs de BCR-ABL sur le système immunitaire est un sujet controversé.

Tandis que certains auteurs rapportent un effet immunosuppresseur *in vitro* des ITK, [99] d'autres études *in vivo* montrent qu'ils induisent une restauration voir

Gène	Fonction	SNP	Bases	Nombre de patients	Dose (mg/j)	Allèle associé avec une meilleure réponse moléculaire	Auteurs
ABCB1	Excrétion	rs1128503	C1236T	90	400	T	Dulucq <i>et al.</i> (2008) [94]
-	-	-	-	46	800	C-C	Deenik <i>et al.</i> (2008) [95]
-	-	rs2032582	G2677T/A	90	400	T/A	Dulucq <i>et al.</i> (2008) [94]
hOCT1	Absorption	rs34130495	G1201A	132	400	A	Bazeos <i>et al.</i> (2010) [96]
-	-	rs34130495	A1222G	62	≤ 400	G-G	Takahashi <i>et al.</i> (2010) [97]

TABLE 7 – Polymorphismes génétiques liés à la pharmacocinétique et associés à la réponse moléculaire dans la LMC traitée par imatinib.

une stimulation du système immunitaire *via* une élévation du nombre de cellules CD8+, NK ou NKT-like. [100, 101, 102] Par ailleurs, des études récentes montrent qu'un arrêt de l'imatinib avec maintien de niveaux bas voir indétectables de maladies résiduelles est corrélé avec un nombre élevé de cellules NK effectrices et que cet effet est potentiellement induit par l'imatinib. [103, 104] Ces études sont à l'origine d'un regain d'intérêt pour le rôle anti-leucémique des cellules NK dans le traitement de la LMC élucidé préalablement dans le cadre de la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques, mais aussi, plus généralement, leurs rôle dans la surveillance immunitaire vis-à-vis des cellules transformées. [63, 105]

Récemment, plusieurs études ont rapporté des données relatives à l'effet de la variabilité immuno-génétique sur la réponse aux ITK en testant l'association entre répertoire des gènes codant pour les récepteurs *Killer-cell immunoglobulin-like receptors* (KIR) et la réponse aux ITK (Marin *et al.* (2012), [106] Kreutzman *et al.* (2012), [107] Ali *et al.* (2012), [108] et Nasa *et al.* (2013) [109]). Seuls Marin *et al.* et Nasa *et al.* fournissent des données en relation avec l'imatinib.

## 8.6 Observance

L'observance ou niveau d'adhérence, c'est-à-dire, la précision avec laquelle un patient suit un programme de soin, est un déterminant essentiel du succès d'une thérapie. Souvent caricaturé comme un problème lié au patient, le niveau d'adhérence est déterminé par un ensemble facteurs anthropologiques et sociologiques tels que les caractéristiques du clinicien, le système de santé, la maladie et son traitement mais aussi des facteurs économiques et sociaux. [110] Un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [110] précise que l'observance des patients atteints de maladies chroniques telles que le diabète ou la dépression n'est que de 50% dans les pays industrialisés et bien moindre dans les pays où les systèmes de santé sont moins efficaces.

La définition de la réponse optimale aux ITK dans la LMC en phase chronique n'est pas l'éradication de la maladie mais son maintien à un niveau de maladie résiduelle en deçà de MR<sup>3</sup>, c'est-à-dire, à l'obtention rapide d'une réponse moléculaire majeure et à son maintien (objectif coïncidant avec le maintien en phase chronique de la maladie § 9). Cette réponse optimale est associée au meilleur pronostic à long terme c'est-à-dire une espérance de vie comparable à celle de la population générale du même âge. [56] Par conséquent, tout l'enjeu pour ces patients répondeurs optimaux est de maintenir un niveau minimum d'observance de leur traitement.

Noens *et al.* (2009) [111] montrent que l'observance à l'imatinib des patients en phase chronique n'est pas aussi bonne que celle observée en générale et surtout

en cancérologie. Cette observation peut paraître surprenante compte tenu de la gravité de la maladie. Paradoxalement, il est probable que la révolution thérapeutique introduite par les ITK ait entraîné un changement dans la perception des patients au sujet de la gravité de la LMC. La table 8.6 présente les déterminants de l'observance à l'imatinib rapportés par Noens *et al.*.

Facteur		Observance
Patient	Age -	-
	Vit seul	-
	Homme	-
	Etudes secondaires	+
	Connaissances de la maladie	+
Traitement	Durée	-
	Dose élevée	-
	Nombre de prise quotidienne	-
Clinicien	Années d'expérience	+
	Hématologue ( <i>vs</i> cancérologue)	+
	Nombre de patients suivis par an	+
	Durée de la consultation au diagnostique	+
	Exerce en hôpital universitaire	+

TABLE 8 – Déterminant de l'observance à l'imatinib dans la leucémie myéloïde chronique en phase chronique. (D'après Noens *et al.* [111])

### Effets secondaires

Les effets secondaires dus aux ITK sont de trois ordres :

- les effets secondaires de grade 3 ou 4. Ils apparaissent principalement au début du traitement, ils sont susceptibles d'entraîner un arrêt de traitement dans 10% des cas [56] et une diminution de la dose ;
- les effets secondaires de grade 1 ou 2. Ils surviennent précocement et peuvent devenir chroniques. Ils sont en principe tolérables, cependant, ils altèrent la qualité de vie et sont à l'origine d'une moindre observance des patients ce qui est préjudiciable pour la réponse thérapeutique ;
- les effets secondaires de long terme. Ils sont attribuables à une prise prolongée des ITK. Ils sont aussi susceptibles d'altérer la santé et la qualité de vie des patients et d'entraîner des ajustements de dose et d'avoir une influence négative sur l'observance du traitement. [112, 113]

Certain effets secondaires comme les affections du système cardiovasculaire sont communs à tous les ITK mais avec une disparité en fréquence et en intensité,

de sorte qu'il peut être avantageux pour certains patients de changer de traitement.

Plus précisément, le nilotinib est associé avec des effets au niveau du système circulatoire (artères et coronaires) et le dasatinib est associé à des complications pulmonaires et pleurales.

L'observance de la prescription est un facteur fondamental pour le succès du traitement de la LMC en phase chronique par ITK. [56, 111, 112, 113] Pour l'imatinib, Noens *et al.* estiment qu'en moyenne, les patients qui n'obtiennent pas de réponse optimale ont pris entre 74 et 77% de la dose prescrite *vs.* 90 à 93% pour les patients qui obtiennent une réponse optimale. L'observance est déterminée par des facteurs liés au patient (environnement socio-culturel), au traitement, et à l'environnement médical (clinicien et structure de prise en charge). Elle est aussi liée à la tolérance du patient envers son traitement et à la survenue d'effets indésirables tout au long du traitement.

La question de la distribution des effets indésirables liés à un traitement en fonction des caractéristiques génétiques d'un patient reste ouverte dans le cas des ITK et constitue pour la suite un axe de recherche important.

## 9 Conclusion

Jusqu'à l'introduction des ITK dans le traitement de la LMC, le but des thérapies se limitait à améliorer la qualité de vie des patients en induisant une rémission hématologique à l'aide de chimiothérapies. Éventuellement, grâce à l' $rIFN\alpha$ , une petite proportion de patients pouvait espérer une réponse cytogénétique partielle voire complète. Pour les patients éligibles à une transplantation de cellules souches hématopoïétiques, le but de la thérapie est de parvenir à un niveau de maladie résiduelle faible voire indétectable tout en limitant les effets indésirables liés à cette pratique thérapeutique comme la GVH par exemple. Par ailleurs, la greffe est toujours considérée comme le seul traitement curatif de la LMC, mais pour une proportion très faible de patients.

Les objectifs du traitement de la LMC par ITK sont incontestablement plus ambitieux. [114] Le but principal de toute thérapie dans la LMC, c'est-à-dire, limiter les risques de décès en empêchant la maladie de progresser vers ses phases d'accélération et/ou crise blastique étant atteints pour une majorité de patients sous ITK, l'espoir est maintenant de permettre aux patients d'obtenir une espérance de vie comparable à celle de la population générale du même âge dans un souci de conservation de la qualité de vie. [114]

Outre les enjeux liés à la progression de la maladie, il s'agit donc maintenant de limiter au maximum le risque de décès lié aux traitements et les complications

éventuelles liées à la prise prolongée d'un médicament. Cette équation reste délicate à résoudre dans la mesure où la survenue d'effets secondaires, conséquence inévitable liée à la prise d'un principe actif, [115] est susceptible de nuire à l'observance du traitement par les patients, et par conséquent de nuire aussi à l'efficacité du traitement. [111]

Dans la pratique, cet objectif coïncide avec l'obtention et le maintien durable d'une réponse moléculaire majeure (RMM). Certains auteurs ont parlé de *safe haven* pour les patients ayant atteint cet objectif. [57] Cependant, environ 30% des patients sous imatinib ne l'atteignent pas en raison d'une résistance et/ou d'un abandon de traitement pour cause d'intolérance. [57]

D'autres études préconisent de placer le curseur en amont et de s'intéresser au niveau de la réponse moléculaire précoce c'est-à-dire la mesure du *ratio* BCR-ABL/ABL à 3 mois. [116] Ces subtilités ne doivent pas cacher que le véritable débat se focalise maintenant sur la possibilité d'un arrêt de traitement avec conservation d'une rémission durable chez des patients en situation de réponse optimale. Bien que les recommandations indiquent clairement que ces patients devraient poursuivre indéfiniment leur traitement, [56] la faisabilité d'un arrêt de traitement a été testée dans plusieurs essais contrôlés sur des patients en réponse profonde et durable (MR<sup>4,5</sup> ou en maladie résiduelle indétectable). [117, 118, 119, 120]

Les premiers résultats montrent qu'environ 40% des patients éligibles maintiennent leur niveau de maladie résiduelle (avec un suivi moyen de 4 ans) mais aussi que les patients en perte de réponse ont de grandes chances de recouvrer leurs niveaux antérieurs de maladie résiduelle à la reprise du traitement. Ces études montrent donc qu'un arrêt de traitement est envisageable, chez une partie des patients au moins, et qu'un échec dans cette tentative n'est pas synonyme de perte de chance pour le patient. Un essai de plus grande envergure (plus de 500 patients) dont les premiers résultats sont attendus pour 2016 permettra de répondre de manière plus précise à la question des critères d'éligibilité pour un arrêt de traitement (*European Stop Tyrosine Kinase Inhibitor Study* (EURO-SKI)).

Ces évolutions montrent à quel point le pronostic des patients s'est amélioré dans la LMC depuis la fin des années 1970. Passant du gain de quelques mois de (sur)vie supplémentaire (de 45 à 58 mois pour le busulfan *vs.* l'hydroxyurée) à la possibilité d'une rémission durable sans traitement. Elles montrent aussi, par contraste, quel est l'objectif raisonnable du traitement de la LMC en phase chronique traitée par ITK. Cet objectif est le maintien en phase chronique de la maladie plutôt que son éradication. En effet, la préoccupation première est bien la quête d'un équilibre bénéfice/risque optimal pour le patient, le but étant de permettant à un maximum de patients de poursuivre leurs traitements le plus longtemps possible et dans les meilleures conditions. Ce but n'est pas encore

compatible avec une course à l'éradication de la maladie, et les tentatives d'arrêt de traitement ne sont admises que dans le cadre de protocoles expérimentaux pour un nombre restreint de patients.

Par ailleurs, plusieurs études montrent que des traces de maladie résiduelle sont potentiellement observables chez des patients en rémission durable, obtenue aussi bien dans le cadre d'une transplantation que d'un d'arrêt de traitement par ITK chez des patients répondeurs optimaux. [121] Ces succès thérapeutiques ne sont donc pas synonymes d'éradication de la maladie et l'idée de *porteurs sains* semble appropriée.<sup>7</sup> Par ailleurs, ces observations sont aussi compatibles avec l'hypothèse d'une restauration d'un équilibre immunologique obtenu grâce aux thérapies. Cette hypothèse semble acquise dans le cadre de la transplantation, en revanche des données cliniques nouvelles sont nécessaires afin d'étayer cette hypothèse dans le cadre du traitement de la LMC par ITK. [40]

---

7. Plusieurs études rapportent des niveaux détectables de transcrits BCR-ABL chez des personnes en bonne santé. [122, 123]

---

## Troisième partie

# Méthodes statistiques

---

## Sommaire

---

<b>10 Introduction</b>	<b>70</b>
<b>11 Données censurées</b>	<b>71</b>
11.1 Censure à droite . . . . .	71
11.2 Censure à gauche . . . . .	71
11.3 Censure par intervalles . . . . .	72
<b>12 Eléments sur les modèles de survie</b>	<b>72</b>
12.1 Risque instantané et fonction de survie . . . . .	72
12.2 Estimation non paramétrique de la survie . . . . .	74
12.3 Modèle de Cox . . . . .	74
<b>13 Eléments sur les modèles à risques concurrents</b>	<b>75</b>
13.1 Introduction . . . . .	75
13.2 Définitions . . . . .	76
13.3 Estimation non paramétrique de l'incidence cumulée . . . . .	77
13.4 Estimateur de Nelson-Aalen . . . . .	78
13.5 Estimation de la variance de l'incidence cumulée . . . . .	79
13.6 Modèle de Fine & Gray . . . . .	80
13.7 Incidence cumulée de base . . . . .	82
<b>14 Puissance statistique d'une étude de pharmacogénétique</b>	<b>83</b>

---

## 10 Introduction

Le but principal de ce travail de thèse est de déterminer une éventuelle association entre génotypes et réponse moléculaire dans la leucémie myéloïde chronique en phase chronique traitées par imatinib.

Le suivi des patients dans la LMC est préférentiellement réalisé à l'aide du dosage par RTQ-PCR du transcrite de fusion BCR-ABL (partie II et [56]). Dans les études présentées aux parties IV et V, le critère de jugement est la réponse moléculaire majeure (RMM), c'est-à-dire une chute de 3 log du taux de transcrite BCR-ABL par rapport à la valeur 100% au diagnostique. Afin de déterminer si un patient a obtenu une RMM, un examen est réalisé tous les 3 mois.

Dans de nombreuses études où la réponse thérapeutique aux inhibiteurs de tyrosine kinase est le critère de jugement d'intérêt, [78, 69, 124, 125] l'obtention d'un niveau de réponse moléculaire chez un groupe de patients est réalisée par l'estimation de l'incidence cumulée de cette réponse. Par ailleurs, dans la LMC, lors du suivi, les patients restent à risque d'évènements alternatifs tels la mort, le passage en phase d'accélération/acutisation, ou un changement de traitement. L'observation de ces évènements est, dans le cadre de l'étude de la réponse à l'imatinib, de nature à s'opposer ou à altérer de manière fondamentale la probabilité d'observer la réponse d'intérêt. D'après Gooley [126] ces évènements sont des évènements concurrents.

Dans les études présentées aux parties IV et V, le niveau de la réponse thérapeutique des différents groupes de patients sont estimée par le calcul de l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure. L'estimation de l'association entre génotype et niveau de la réponse a été réalisée à l'aide du modèle de régression à risques de sous-répartition proportionnels de Fine et Gray. Ce modèle, emprunté de l'analyse de survie permet, en présence de risques concurrents, de comparer directement l'incidence cumulée d'un évènement d'intérêt entre différents groupes de patients et d'ajuster les résultats en fonction de covariables telles que l'exposition à un traitement (ce qui est utile dans le cadre d'une étude de pharmacogénétique).

Cette partie se propose de présenter les principaux éléments statistiques ayant permis, dans les parties V et IV, de mesurer l'association entre réponse moléculaire majeure et génotypes ou haplotypes chez les patients étudiés.

## 11 Données censurées

### 11.1 Censure à droite

La recherche clinique fournit de nombreux exemples où des patients sont suivis afin d'étudier le temps d'apparition d'un événement d'intérêt. Il peut s'agir du décès, de la rémission ou de tout événement présentant un intérêt clinique. Pour de multiples raisons, les données ainsi recueillies sont le plus souvent incomplètes. La censure est un phénomène couramment rencontré lors de l'étude des données de survie. Si à la fin de la période d'observation, l'évènement d'intérêt n'a pas été observé, on parle alors de données *censurées à droite*.

Une manière simple de noter les données censurées à droite consiste à associer à chaque patient un couple de variables aléatoires  $(T, \delta)$ , où  $T$  est un temps d'observation et  $\delta$  est un indicateur de censure. Avec  $X$  la date de défaillance et  $C$  la date de la censure, on obtient  $(T, \delta)$  comme suit :

$$T = \min(X, C),$$

avec

$$\delta = \begin{cases} 0 & \text{si } X > C, \\ 1 & \text{sinon.} \end{cases}$$

Dans la pratique, on observe  $T$  et l'on fait l'hypothèse que  $X$  et  $C$  sont deux variables aléatoires indépendantes.

### 11.2 Censure à gauche

Une observation est censurée à gauche si le patient observé a expérimenté l'évènement d'intérêt avant le début de l'étude. Il s'agit d'un cas de données incomplète bien moins fréquent que la censure à droite car les critères d'inclusions des études cliniques précisent, le plus souvent, qu'il est nécessaire que l'évènement d'intérêt n'ait pas encore eu lieu au début de l'étude. De même que pour la censure à droite, un couple de variable aléatoire  $(T, \delta)$  est associé à chaque patient :

$$T = \max(X, C).$$

avec

$$\delta = \begin{cases} 0 & \text{si } X < C, \\ 1 & \text{sinon.} \end{cases}$$

Dans la pratique, on observe  $T$  et l'on fait l'hypothèse que la date de défaillance

$X$  et  $C$ , la date de censure, sont deux variables aléatoires indépendantes.

### 11.3 Censure par intervalles

La censure par intervalles est présente lorsque l'évènement d'intérêt a eu lieu dans un intervalle de temps. Cette situation apparaît lorsque des patients sont examinés à intervalles de temps prédéterminés par exemple.

La définition d'un critère principal de jugement à l'aide de l'imagerie médicale ou de la recherche d'un biomarqueur moléculaire sur prélèvement sanguin est devenu une pratique courante en recherche clinique. Des évènements tels que la progression ou la réponse à un traitement peuvent donc être déterminés aux dates où sont pratiqués ces examens ou les prélèvements biologiques.

Cette pratique est bien établie pour le suivi de la réponse moléculaire dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) ou leucémies myéloïdes chroniques (LMC), où le suivi des patients consiste à doser un transcrit moléculaire à l'aide d'un échantillon sanguin ou de moelle osseuse prélevé à intervalles réguliers.

Dans le cas de la censure par intervalles,  $T$ , le temps de l'évènement d'intérêt est compris dans l'intervalle  $]L, R]$ . Par ailleurs, les données censurées à droite et à gauche peuvent être interprétées comme des cas particuliers de données censurées par intervalles, avec  $L = R$  dans le cas d'une observation exacte,  $R = \infty$  pour une donnée censurée à droite et  $R = 0$  pour une donnée censurée à gauche.

## 12 Eléments sur les modèles de survie

### 12.1 Risque instantané et fonction de survie

On se place dans le contexte où les évènements sont observés exactement ou censurés à droite et où la distribution des temps est continue. Pour chaque patient, on observe  $t_i = \min(x_i, c_i)$  et  $\delta_i = \mathbf{I}_{x_i \leq c_i}$ . L'indépendance entre la distribution des censures et celle des temps d'évènements est une hypothèse fondamentale des modèles standards de survie pour les données censurées à droite. Ainsi, à tout moment, les patients censurés sont théoriquement représentés par ceux encore sous observation. Pas conséquent, la fonction de risque instantané :

$$\lambda(t) = \lim_{\Delta t \searrow 0} \frac{\text{Prob}(t \leq T < t + \Delta t | T > t)}{\Delta t}, \quad (1)$$

joue un rôle fondamentale dans l'analyse de survie. Elle représente le risque instantané des patients encore sous observation, mais aussi celui des patients

censurés.

Il existe une relation simple entre le risque instantané et la fonction de survie  $S(t)$  :

$$\lambda(t) = \frac{f(t)}{S(t)} = -\frac{S'(t)}{S(t)} = -\frac{d}{dt}\text{Ln}[S(t)], \quad (2)$$

où  $f(t)$  est la densité des évènements.

En intégrant, on obtient :

$$\int_0^t \lambda(u) du = -\log(S(t))$$

$$\Leftrightarrow S(t) = \exp(-\Lambda(t)),$$

où  $\Lambda(t) = \int_0^t \lambda(u) du$  est la fonction de risque cumulé.

La figure 7 illustre des exemples de courbes de survie associées à des fonctions de risques instantanés constants.

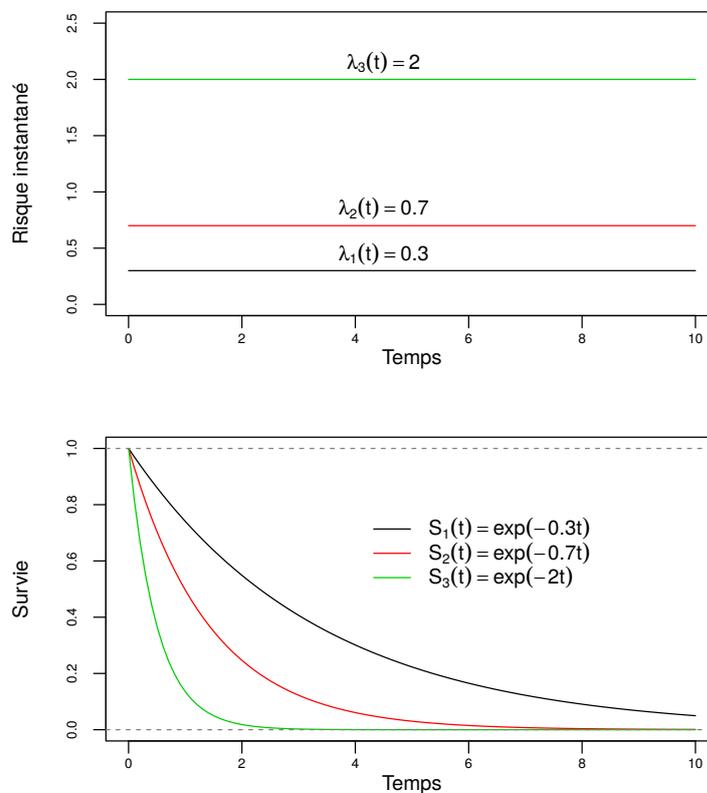


FIGURE 7 – Fonctions de survie (2<sup>e</sup> cadran) associées à des risques instantanés constants (1<sup>er</sup> cadran).

## 12.2 Estimation non paramétrique de la survie

Kaplan et Meier (1958) [127] ont proposé un estimateur non paramétrique de la survie. Pour le calcul de cet estimateur, les auteurs ont fait l'hypothèse que la distribution de survie est discrète. Une heuristique de cet estimateur est la suivante :

- $0 < t_1 < \dots < t_N$  étant les temps ordonnés où chaque évènement a eu lieu ;
  - $R(t)$  est l'ensemble des patients à risque, c'est-à-dire, l'ensemble des patients sous observation n'ayant pas expérimenté l'évènement d'intérêt à  $t$  ;
  - pour tout  $t_j$ ,  $n_j$  est la taille de  $R(t_j)$  ;
  - pour tout  $t_j$ ,  $d_j$  est le nombre d'évènements observés ;
- (a) la fonction de risque instantané donnée en (1) pouvant s'écrire sous forme discrète :  $\lambda(t_j) = \text{Prob}(T = t_j | T > t_{j-1})$ , toujours sous l'hypothèse d'indépendance entre la distribution des censures et celle des temps,  $\lambda(t_j)$  peut être estimée simplement par la proportion du nombre d'évènements observés à  $t_j$  par rapport au nombre de patients à risque :

$$\hat{\lambda}(t_j) = \frac{d_j}{n_j} ; \quad (3)$$

- (b) la probabilité de survivre jusqu'à  $t_j$  est le produit de la probabilité de survivre jusqu'à  $t_{j-1}$  et de la probabilité conditionnelle de survivre jusqu'à  $t_j$ , c'est-à-dire :

$$\hat{S}(t_j) = \hat{S}(t_{j-1}) \left(1 - \hat{\lambda}(t_j)\right) = \hat{S}(t_{j-1}) \left(1 - \frac{d_j}{n_j}\right) ; \quad (4)$$

- (c) en appliquant (4) pour tous les temps, on obtient l'estimateur de Kaplan-Meier :

$$\hat{S}(t) = \prod_{j:t_j \leq t} \left(1 - \frac{d_j}{n_j}\right). \quad (5)$$

## 12.3 Modèle de Cox

Le modèle de Cox à risques proportionnels peut être employé afin de déterminer l'effet d'une covariable sur la survie. Il s'écrit :

$$\lambda(t|Z_i) = \lambda_0(t)\exp(Z_i\beta), \quad (6)$$

où  $Z = (Z^1, \dots, Z^p)$  est une matrice de  $p$  covariables,  $Z_i$  est un vecteur de covariables pour le patient  $i$ ,  $\beta$  est un vecteur de coefficients de régression et  $\lambda_0(t)$  est une fonction inconnue qui n'est généralement pas estimée.

Dans l'hypothèse où tous les temps d'évènements sont distincts, le vecteur de paramètre  $\beta$  est obtenu en maximisant la vraisemblance partielle : elle est le produit sur les différents temps d'évènements d'un quotient comparant le risque instantané des patients à  $t_j$  au risque instantané de tous les patients à risque à  $t_j$  :

$$L(\beta) = \prod_{j=1}^n \frac{\exp(Z_j \beta)}{\sum_{l \in R_j} \exp(Z_l \beta)}. \quad (7)$$

En intégrant 6 de 0 à  $t$ , le modèle peut aussi s'écrire :

$$S(t|Z) = S_0(t)^{\exp(Z_i \beta)}, \quad (8)$$

où  $S_0(t)$  (survie de base) est l'estimation de la survie pour des patients (hypothétiques) dont toutes les covariables seraient nulles.  $S_0(t)$  peut être évaluée à l'aide de la méthode de Breslow : dans un premier temps, on maximise la vraisemblance de Cox afin d'obtenir  $\hat{\beta}$ , puis, on calcule :

$$\hat{\Lambda}_0(t) = \sum_{j:t_j \leq t} \frac{1}{\sum_{l \in R_j} \exp(Z_l \hat{\beta})}. \quad (9)$$

On en déduit  $\hat{S}_0(t)$  :

$$\hat{S}_0(t) = \exp(-\hat{\Lambda}_0(t)). \quad (10)$$

## 13 Éléments sur les modèles à risques concurrents

### 13.1 Introduction

Un modèle de survie à *risques concurrents* ou *compétitifs*, fait référence à un modèle où plusieurs causes de défaillances, potentiellement exclusives les unes des autres, sont possibles. Le concept de *risques concurrents* remonte aux travaux de Bernoulli de 1760 sur l'estimation des avantages de la vaccination contre la variole sur l'espérance de vie. [128] Une définition plus récente et habituellement donnée est celle de Gooley *et al.* [126] : il s'agit d'un évènement dont l'occurrence s'oppose à l'observation de l'évènement d'intérêt ou altère de manière fondamentale

la probabilité d'observer cet évènement<sup>8</sup>. Cette définition est large puisqu'elle concerne à la fois le cas où la survenue d'un évènement concurrent *empêche* la survenue des autres mais aussi, le cas où la survenue d'un évènement concurrent *altère* de manière fondamentale la survenue des autres. Cette 2<sup>nd</sup> acception ne sera pas considérée ici. Un exemple classique tiré de la littérature médicale est la rémission de patients traités par greffe de cellules souches hématopoïétiques dans le cadre du traitement d'une hémopathie maligne, le décès dû à la rechute hématologique ou la mort due à la maladie du greffon contre l'hôte ou tout autre cause. Dans le cas de l'étude de la réponse thérapeutique dans le traitement de la LMC par imatinib chez des patients en phase chronique, à partir d'un état initial au diagnostique et au cours du suivi, plusieurs évènements en compétition sont susceptibles d'être observés : la réponse d'intérêt, la mort toutes causes, une toxicité ou un manque d'efficacité important ayant entraîné un changement de stratégie thérapeutique. La figure 8 schématise les différents états possibles.

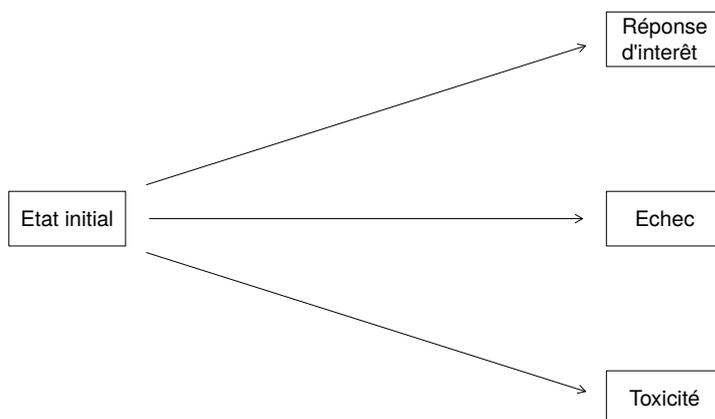


FIGURE 8 – Représentation schématique d'un modèle de survie où trois causes de défaillances sont possibles.

## 13.2 Définitions

La quantité fondamentale pour les modèles de survie à risques concurrents est la fonction de risque cause spécifique, c'est-à-dire, le risque instantané d'apparition d'un évènement dans un contexte de risques concurrents. Les données étant  $T$ , le temps observé pour la défaillance  $D = k$ ,  $k = 1 \dots C$  la définition du risque cause-spécifique est :

$$\lambda_k(t) = \lim_{\Delta t \searrow 0} \frac{\text{Prob}(t \leq T < t + \Delta t, D = k | T > t)}{\Delta t}. \quad (11)$$

8. We shall define a competing risk as an event whose occurrence either precludes the occurrence of another event under examination or fundamentally alters the probability of occurrence of this other event.

Toute quantité qui découle uniquement de la fonction de risque cause-spécifique est identifiable. Parmi lesquelles, le risque cause spécifique cumulé :

$$\Lambda_k(t) = \int_0^t \lambda_k(s) ds. \quad (12)$$

A l'aide des fonctions de risques causes-spécifiques cumulés pour tous les types d'évènements, il est possible d'estimer la fonction de survie globale :

$$S(t) = \exp\left(-\sum_{k=1}^K \Lambda_k(t)\right). \quad (13)$$

Dans ce contexte, cette fonction à l'interprétation suivante : il s'agit de la probabilité de n'avoir expérimenté aucun évènement au temps  $t$ .

La fonction d'incidence cumulée pour la cause  $k$ , notée  $I_k(t)$ , est la probabilité d'expérimenter l'évènement de type  $k$  avant le temps  $t$  :  $\text{Prob}(T \leq t, D = k)$ . Son expression en fonction du risque cause spécifique est :

$$I(t) = \int_0^t \lambda_k(s) S(s) ds. \quad (14)$$

**Remarque 1** L'incidence cumulée n'est pas à proprement parlé une fonction de répartition puisque  $I_k(\infty) = \text{Prob}(D = k) < 1$ .

### 13.3 Estimation non paramétrique de l'incidence cumulée

Comme pour l'estimation non paramétrique de la survie par la méthode de Kaplan-Meier, nous pouvons obtenir une estimation non paramétrique de l'incidence cumulée :

- $0 < t_1 < \dots < t_N$  sont les temps ordonnés où chaque évènement a eu lieu ;
- $R(t)$  est l'ensemble des patients à risque, c'est-à-dire, l'ensemble des patients sous observation n'ayant pas expérimenté l'évènement d'intérêt à  $t$  ;
- pour tout  $t_j$ ,  $n_j$  est la taille de  $R(t_j)$  ;
- pour tout  $t_j$ ,  $d_{kj}$  est le nombre d'évènements de type  $k$  observés et  $d_j$  est le nombre d'évènement toute cause confondue observé ;

(a) la survie globale peut être estimée à l'aide de la méthode de Kaplan-Meier (voir § 12.2) :

$$\hat{S}(t) = \prod_{j:t_j \leq t} \left(1 - \frac{d_j}{n_j}\right); \quad (15)$$

- (b) de même que pour la fonction de risque instantané dans le cas où une seule cause de défaillance est considérée, la fonction de risque cause spécifique (11) peut être écrite sous forme discrète :

$$\lambda_k(t_j) = \text{Prob}(T = t_j, D = k \mid T > t_{j-1}); \quad (16)$$

de même qu'en (3) et sous l'hypothèse d'indépendance entre distributions des censures et des temps, cette quantité peut être estimée par :

$$\hat{\lambda}_k(t_j) = \frac{d_{kj}}{n_j}, \quad (17)$$

c'est-à-dire la proportion de patient à risque pour l'évènement  $k$ .

**Remarque 2** (15) peut aussi s'écrire :

$$\hat{S}(t) = \prod_{j:t_j \leq t} \left(1 - \sum_{k=1}^K \hat{\lambda}_k(t_j)\right). \quad (18)$$

La probabilité non conditionnelle d'expérimenter l'évènement de type  $k$  à  $t_j$ ,  $p_k(t_j) = \text{Prob}(T = t_j, D = k)$  est le produit du risque instantané cause spécifique de l'évènement  $k$  et de la probabilité de n'avoir subi aucun évènement à  $t_j$ . Cette probabilité peut être estimée par :

$$\hat{p}_k(t_j) = \hat{\lambda}_k(t_j) \hat{S}(t_{j-1}); \quad (19)$$

- (c) finalement, l'incidence cumulée de l'évènement  $k$  à  $t$ ,  $I_k(t)$ , est estimée en prenant la somme de ces termes pour tous les instants jusqu'à  $t$ . En résumé, nous avons :

$$\hat{I}_k(t) = \sum_{j:t_j \leq t} \hat{p}_k(t_j), \quad \hat{p}_k(t_j) = \hat{\lambda}_k(t_j) \hat{S}(t_{j-1}), \quad \hat{\lambda}_k(t_j) = \frac{d_{kj}}{n_j}. \quad (20)$$

### 13.4 Estimateur de Nelson-Aalen

La fonction de risque cumulé cause-spécifique de type  $k$  peut être obtenue par l'estimateur de Nelson-Aalen :

$$\hat{\Lambda}_k(t) = \sum_{j:t_j \leq t} \frac{d_{kj}}{n_j}. \quad (21)$$

La formulation :

$$\hat{I}_k(t) = \sum_{j:t_j \leq t} \hat{S}_{t(j-1)} \frac{d_{kj}}{n_j}, \quad (22)$$

dans laquelle l'expression de la survie globale au temps  $t_{j-1}$  est insérée à l'estimateur de Nelson-Aalen est une version de l'estimation de l'incidence cumulée équivalente à celle de l'expression (20).

### 13.5 Estimation de la variance de l'incidence cumulée

Une estimation de la variance de la fonction d'incidence cumulée peut être obtenue à l'aide de la *Delta method*. [129, 130] Elle a pour expression :

$$\begin{aligned} \text{Var}\{\hat{I}_k(t_j)\} &= \sum_{\alpha=1}^j \left[ \left\{ \hat{I}_k(t_j) - \hat{I}_k(t_\alpha) \right\}^2 \frac{d_\alpha}{n_\alpha(n_\alpha - d_\alpha)} \right] \\ &+ \sum_{\alpha=1}^j \left[ \left\{ \hat{S}(t_{\alpha-1}) \right\}^2 \left( \frac{n_\alpha - d_{k\alpha}}{n_\alpha} \right) \left( \frac{d_{k\alpha}}{n_\alpha^2} \right) \right] \\ &- 2 \sum_{\alpha=1}^j \left[ \left\{ \hat{I}_k(t_j) - \hat{I}_k(t_\alpha) \right\} \left\{ \hat{S}(t_{\alpha-1}) \right\} \left( \frac{d_{k\alpha}}{n_\alpha^2} \right) \right], \end{aligned} \quad (23)$$

où,  $d_j = \sum_{k=1}^C d_{kj}$  et  $C$  est le nombre de causes de défaillances.

A chaque point, l'intervalle de confiance de l'estimation de la fonction d'incidence cumulée peut être obtenue directement à l'aide de l'estimation de la fonction d'incidence cumulée et de sa variance obtenue à l'aide de l'expression (23). Cependant, cette estimation linéaire peut conduire à des intervalles dont les bornes inférieures et supérieures sont inférieures à 0 ou supérieures à 1 respectivement. Une méthode permettant d'obtenir des intervalles de confiance compris entre 0 et 1 consiste à utiliser la transformation  $\log(-\log)$ , c'est-à-dire, de calculer l'écart type et l'intervalle de confiance de  $\log(-\log(\hat{I}_k(t)))$  et d'en déduire l'intervalle de confiance désiré par transformation inverse. En utilisant la *delta method*, on montre que :

$$\sqrt{\text{Var}\{\ln(-\ln(\hat{I}_k(t)))\}} = \frac{\hat{\sigma}_k(t)}{\hat{I}_k(t) |\ln(\hat{I}_k(t))|}, \quad (24)$$

où,  $\hat{\sigma}_k(t) = \sqrt{\text{Var}\{\hat{I}_k(t_j)\}}$ . [131]

Au temps  $t$ , l'estimation de l'intervalle de confiance à  $100 - \alpha\%$  est : [132]

$$\hat{I}_k(t) \exp\left[ \frac{\pm z_{\alpha/2} \hat{\sigma}_k(t)}{\hat{I}_k(t) |\ln(\hat{I}_k(t))|} \right], \quad (25)$$

où,  $z_{\alpha/2}$  est le quantile d'ordre  $\alpha/2$  de la distribution normale centrée réduite. La table 9 détaille les étapes permettant d'obtenir les estimations de l'incidence cumulée et donne la valeur de l'intervalle de confiance à 95% points par points

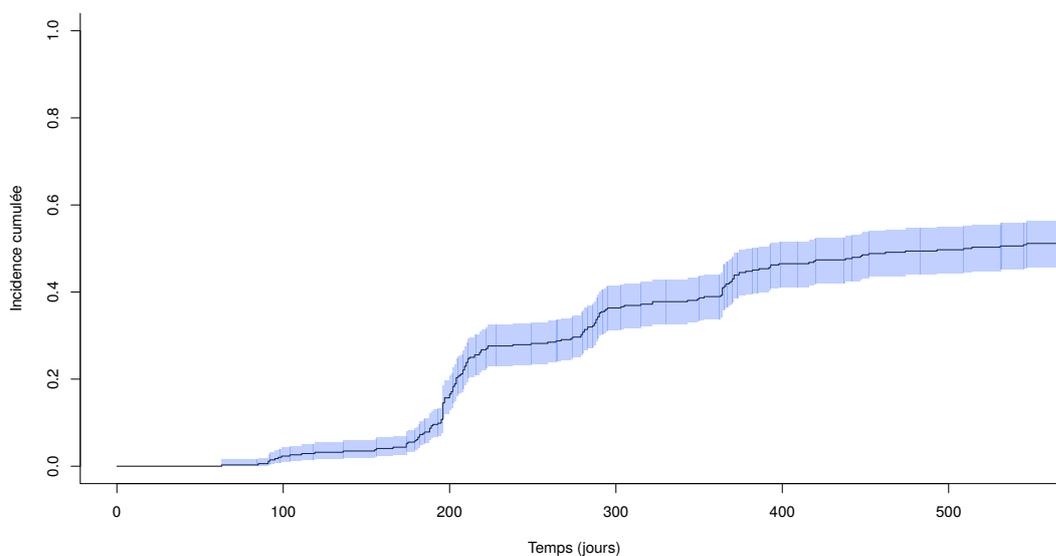


FIGURE 9 – *Intervalle de confiance de l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure estimée points par points.*

pour la réponse moléculaire majeure à l'aide des données LMC. La figure 9 illustre les résultats obtenus.

### 13.6 Modèle de Fine & Gray

Lorsque plusieurs types d'évènements en compétition sont susceptibles d'être observés, il est possible de régresser directement sur la fonction de risque cause-spécifique liée à chaque type d'évènement à l'aide du modèle de Cox, le risque cause-spécifique étant parfaitement déterminé par les données. Cependant, comme le montre l'équation (18), la fonction d'incidence cumulée pour la cause  $k$  dépend non seulement du risque cause-spécifique de l'évènement de type  $k$  mais aussi des fonctions de risques cause-spécifiques de tous les autres types d'évènements. Il en résulte que l'influence d'une covariable sur l'incidence cumulée de l'évènement de type  $k$  va dépendre non seulement de l'influence de cette covariable sur le risque cause-spécifique de la cause  $k$  mais aussi de son influence sur le risque-cause spécifique de tous les autres types d'évènements. La relation complexe qui existe entre risque cause-spécifique et incidence cumulée d'un évènement particulier à conduit Fine et Gray (1999) à proposer un modèle de régression permettant de régresser directement sur la fonction d'incidence cumulée. [133] Par analogie avec la relation (2) entre le risque instantané et la fonction de survie, Gray a défini une quantité nommée risque de sous-répartition. [134]

$j$	$t_j$	$d_{t_j}$	$d_{k,t_j}$	$n_{t_j}$	$\hat{\lambda}_{t_j}$	$\hat{H}_{t_j}$	$\hat{S}_{t_j}$	$\hat{S}_{t_{j-1}}$	$\hat{\lambda}_{k,t_j}$	$\hat{I}_{k,t_j}$	$\hat{\sigma}_{k,t_j}$	BI	BS
0	0	0	0	344	1.00000	0.00000	1.00000	1.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
1	63	1	1	344	0.00291	0.00291	0.99710	1.00000	0.00291	0.00291	0.00290	0.00028	0.01533
2	82	1	0	343	0.00292	0.00582	0.99419	0.99710	0.00000	0.00291	0.00290	0.00028	0.01533
3	84	1	0	342	0.00292	0.00875	0.99129	0.99419	0.00000	0.00291	0.00290	0.00028	0.01533
4	85	1	1	341	0.00293	0.01168	0.98839	0.99129	0.00293	0.00581	0.00410	0.00119	0.01953
5	91	2	2	340	0.00588	0.01756	0.98259	0.98839	0.00588	0.01163	0.00578	0.00391	0.02790

TABLE 9 – Etapes permettant de calculer l'estimation de l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure :  $j$  est l'indice des temps,  $t_j$  correspond au temps (jours),  $d_{t_j}$  est le nombre d'événements observés à  $t_j$  (toutes causes confondues),  $d_{k,t_j}$  est le nombre d'événements de type  $k$  (ici réponse moléculaire majeure),  $n_{t_j}$  est le nombre de patients à risque,  $\hat{\lambda}_{t_j}$  est le risque instantané d'observer un événement,  $\hat{H}_{t_j}$  est le risque cumulé global,  $\hat{S}_{t_j}$  est la survie globale,  $\hat{\lambda}_{k,t_j}$  est le risque instantané cause spécifique de l'événement de type  $k$ ,  $\hat{I}_{k,t_j}$  est l'incidence cumulée de l'événement de type  $k$ ,  $\hat{\sigma}_{k,t_j}$  est l'écart type de l'incidence cumulée,  $BI$  est la borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95% de l'incidence cumulée et  $BS$ , la borne supérieure de l'intervalle de confiance à 95% de l'incidence cumulée. Exemples : la colonne  $\hat{\lambda}_{t_j}$  est obtenue en divisant le nombre d'événements observés par le nombre de patients à risque ( $2/336 \approx 0.0060$ ). La colonne  $\hat{H}_{t_j}$  est la somme cumulée de  $\hat{\lambda}_{t_j}$  ( $0.00291 + 0.00292 + 0.00292 + 0.00293 + 0.00588 = 0.01756$ ).  $\hat{S}_{t_j} = \exp(-\hat{H}_{t_j})$ .  $\hat{\lambda}_{k,t_j}$  est le nombre d'événements de type  $k$  au temps  $j$  divisé par le nombre de patients à risque (pour  $j = 5$ ,  $2/340 \approx 0.00588$ ).  $\hat{I}_{k,t_j}$  est obtenue en sommant le produit des colonnes  $\hat{S}_{t_{j-1}}$  et  $\hat{\lambda}_{k,t_j}$ , puis en prenant l'exponentielle de l'opposé :  $\exp\{-\{(1 \times 0) + (1 \times 0.00291) + (0.99710 \times 0) + (0.99419 \times 0) + (0.99129 \times 0) + (0.98839 \times 0.00588)\}\} \approx 0.01163$ .  $\hat{\sigma}_{k,t_j}$  est obtenue à l'aide de la formule 23 et les intervalles de confiance à l'aide de la formule 25.

$$\begin{aligned}\bar{\lambda}_k(t) &= \lim_{\Delta t \searrow 0} \frac{\text{Prob}(t \leq T < t + \Delta t, D = k \mid T > t \cup \{T \leq t, D \neq k\})}{\Delta t} \\ &= -\frac{d \log(1 - I_k(t))}{dt}.\end{aligned}\quad (26)$$

Contrairement au risque cause-spécifique pour lequel l'ensemble des patients à risque décroît à chaque instant où un évènement est observé, pour le risque de sous-répartition, les patients ayant expérimenté des évènements concurrents restent dans l'ensemble des patients à risque. En absence de censure, ils demeurent à risque pour un temps infini. Par analogie au modèle de Cox, Fine et Gray ont imposé pour leur modèle une hypothèse de proportionnalité pour les risques de sous-répartition de sorte que :

$$\bar{\lambda}_k(t|Z_i) = \bar{\lambda}_k^0(t) \exp(Z_i \beta), \quad (27)$$

où  $Z = (Z^1, \dots, Z^p)$  est une matrice de  $p$  covariables,  $Z_i$  étant un vecteur de covariables pour le patient  $i$ ,  $\beta$  un vecteur de coefficients de régression et  $\bar{\lambda}_k^0(t)$  est le risque instantané de sous répartition de base.

Cette relation peut aussi s'écrire :

$$1 - I_k(t|Z_i) = \left(1 - I_k^0(t)\right)^{\exp(Z_i \beta)} \quad (28)$$

$$\Leftrightarrow I_k(t|Z_i) = 1 - \left(1 - I_k^0(t)\right)^{\exp(Z_i \beta)}, \quad (29)$$

$I_k^0(t)$  étant l'incidence cumulée de base, c'est-à-dire, celle d'un groupe de patients (virtuels) dont l'ensemble des covariables seraient nulles.

### 13.7 Incidence cumulée de base

On souhaite obtenir une estimation de l'incidence cumulée de base, de sorte que pour un patient possédant les caractéristiques moyennes du groupe de patients ayant permis d'estimer  $I_k(t)$ , on puisse retrouver  $\hat{I}_k(t)$ .

Avec  $Z^* = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Z_i$ , valeur moyenne des covariables pour le groupe de patients, à l'aide de 28, on cherche  $\hat{I}_k^0(t)$  de sorte que :

$$\begin{aligned}
\hat{I}_k(t|Z^*) &= 1 - \left(1 - \hat{I}_k^0(t)\right)^{\exp(Z^*\hat{\beta})} \\
\Leftrightarrow \quad &\left(1 - \hat{I}_k^0(t)\right)^{\exp(Z^*\hat{\beta})} = 1 - \hat{I}_k(t) \\
\Leftrightarrow \quad &\log\left(1 - \hat{I}_k^0(t)\right) = \frac{\log(1 - \hat{I}_k(t))}{\exp(Z^*\hat{\beta})} \quad (30) \\
\Leftrightarrow \quad &1 - \hat{I}_k^0(t) = (1 - \hat{I}_k(t))^{\exp(-Z^*\hat{\beta})} \\
\Leftrightarrow \quad &\hat{I}_k^0(t) = 1 - (1 - \hat{I}_k(t))^{\exp(-Z^*\hat{\beta})}
\end{aligned}$$

**Remarque 3** Par analogie avec (10), on peut définir un risque de sous-distribution cumulé pour l'évènement de type  $k$  :

$$\bar{\Lambda}_k(t) = -\log(1 - I_k(t)), \quad (31)$$

puis un risque de sous distribution cumulé de base pour l'évènement de type  $k$  :

$$\bar{\Lambda}_k^0(t) = \frac{-\log(1 - I_k(t))}{\exp(Z^*\beta)}, \quad (32)$$

enfin, l'incidence cumulée de base pour l'évènement de type  $k$  :

$$I_k^0(t) = 1 - \exp(-\bar{\Lambda}_k^0). \quad (33)$$

Avec  $Z^* = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Z_i$ , l'estimation de  $I_k^0(t)$  à l'aide de 33 donne le résultat obtenu en 30.

La figure 10 illustre le calcul de l'incidence cumulée de base et de l'estimation de l'incidence cumulée pour un groupe de patient traités à 600 mg/j.

## 14 Puissance statistique d'une étude de pharmacogénétique

L'un des aspects relatif à la planification d'un essai clinique consiste à obtenir une estimation du nombre de sujets permettant de mettre en évidence un effet d'amplitude déterminé avec une probabilité prédéterminée aussi (la puissance souhaitée). Dans le cadre d'une étude où plusieurs types de défaillances sont en concurrence, Latouche, Porcher et Chevret (2004) [135] ont proposé la relation suivante :

$$n = \frac{\left(u_{\alpha/2} + u_{\beta/2}\right)^2}{(\log(\theta))^2 p (1 - p) \psi}, \quad (34)$$

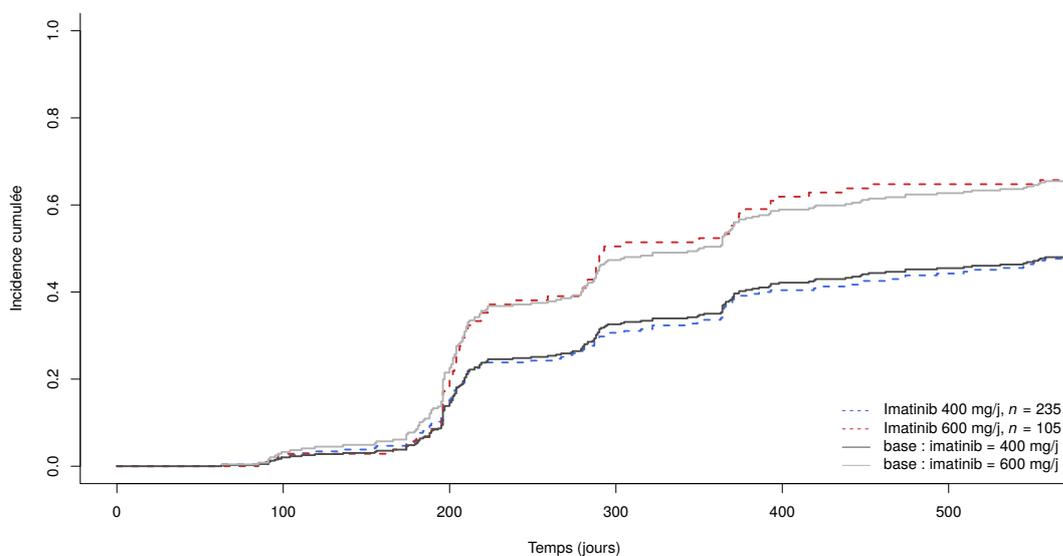


FIGURE 10 – Incidence cumulée de base (données LMC) : la courbe en noire représente l'incidence cumulée de base obtenue à l'aide de (33). La ligne grisée est l'estimation de l'incidence cumulée pour un patient ayant reçu une dose de 600 mg d'imatinib par jour obtenue à l'aide de (28). Les courbes en pointillées sont les estimations de l'incidence cumulée stratifiée sur la dose journalière d'imatinib.

où  $u_\gamma$  est le quantile d'ordre  $1-\gamma$  de la distribution de Laplace-Gauss standard,  $\psi$  est la proportion d'évènements d'intérêts,  $\theta$  est le *ratio* des risques de sous-répartition entre le groupe des patients exposés et le groupe des patients non exposés, et  $p$  est la proportion des patients exposés.

Pour des risques de 1<sup>er</sup> et de 2<sup>e</sup> espèce déterminés, le nombre de sujets nécessaire est d'autant plus petit que l'effet attendu sur l'incidence cumulée de l'évènement d'intérêt est important, que la proportion entre patients exposés et patients non exposés est équitable et que la proportion d'évènements d'intérêt est importante.

Pour un risque de 1<sup>er</sup> espèce  $\alpha = 5\%$ , une puissance statistique souhaitée de 80%, c'est à dire un risque de 2<sup>e</sup> espèce de 20%, une valeur attendue du rapport des risques de sous-répartition de 2 ( $\theta = 2$ ), une proportion de patients exposés à un nouveau traitement de 50%, et une estimation de la proportion d'évènements d'intérêt de 70%, on obtient :

$$n = \frac{(1.96 - 0.84)^2}{(\log(2))^2 \times 0.25 \times 0.5} \approx 93. \quad (35)$$

Dans le cadre d'une étude ancillaire de pharmacogénétique à un essai contrôlé randomisé, cette formule peut être utilisée afin d'obtenir une estimation de la

fréquence allélique *minimum* permettant de mettre en évidence un effet dont l'amplitude serait cliniquement intéressant :

$$p(1-p) = \frac{(u_{\alpha/2} + u_{\beta/2})^2}{(\log(\theta)^2) \psi n}. \quad (36)$$

Cette équation du 2<sup>nd</sup> degrés en  $p$  donne pour la proportion de l'allèle mineur :

$$p = -\frac{1}{2} - 1 + \sqrt{1 - 4 \frac{(u_{\alpha/2} + u_{\beta/2})^2}{(\log(\theta)^2) \psi n}}. \quad (37)$$

Avec  $\alpha = 5\%$ ,  $\beta = 80\%$ ,  $\theta = 2$ ,  $\psi = 70\%$  et  $n = 340$ , on obtient une valeur de  $p$  de l'ordre de 7%.

Il convient lors d'une études de pharmacogénétiques, où un grand nombre de marqueurs sont testés, de prendre les dispositions permettant de maintenir le taux d'erreur de type I à un niveau prédéterminé. Afin de tenir compte de cette contrainte particulière, il est utile d'obtenir des valeurs de  $p$  correspondant à un risque de première espèce nominal permettant de maintenir le taux d'erreur de type I à un niveau souhaité. La figure 11 donne, en fonction du nombre de test effectué, la fréquence allélique minimum permettant le contrôle du taux d'erreur de type I à 5% si  $\alpha$  (*nominal*) est choisis par la méthode de Bonferroni.

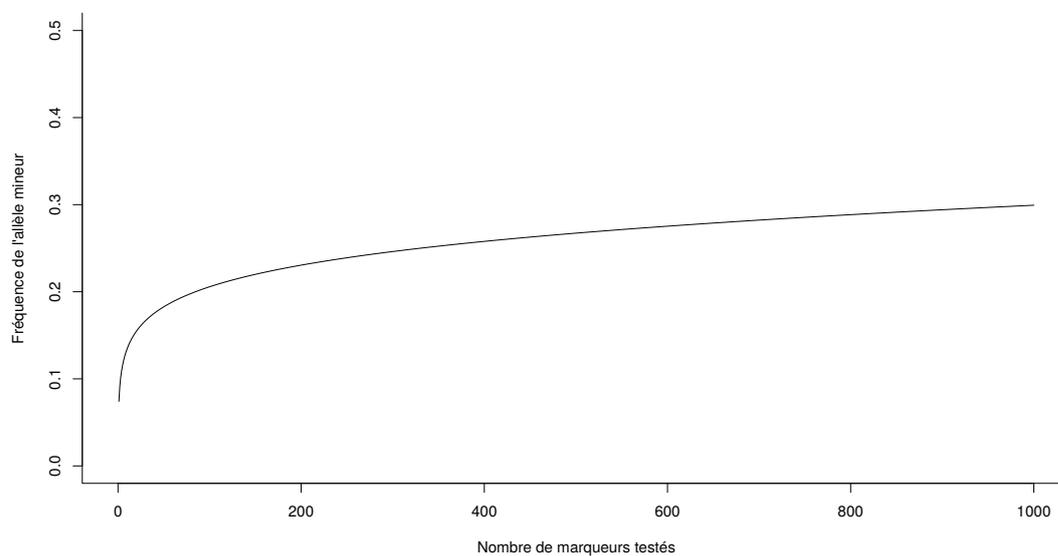


FIGURE 11 – Puissance d'une étude ancillaire de pharmacogénétique : Fréquence allélique minimale requise pour le contrôle du taux d'erreur de type I en fonction du nombre de tests effectué. Les paramètres de l'exemple sont : le nombre de patients et de 340, l'effet attendu sur le risque de sous-répartition de l'évènement d'intérêt est  $\theta = 2$ , la proportion d'évènement d'intérêt est 70%, la puissance souhaitée est  $\beta = 80\%$ .

---

## Quatrième partie

# Marqueurs pharmacocinétiques liés à la réponse moléculaire dans la LMC en phase chronique traitée par imatinib

## Sommaire

---

<b>15 Introduction</b>	<b>88</b>
<b>16 Patients et Méthode</b>	<b>88</b>
16.1 Cohorte Saint Louis . . . . .	88
16.2 Cohorte SPIRIT . . . . .	89
16.3 Critères de jugement . . . . .	90
16.4 Covariables . . . . .	91
16.5 Génotypage . . . . .	91
16.6 Méthodes Statistiques . . . . .	91
<b>17 Résultats</b>	<b>92</b>
17.1 Caractéristiques des patients . . . . .	92
17.2 Incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure . . . . .	92
17.3 Déterminants de l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure	96
17.4 Analyse multivariée . . . . .	99
17.5 Polymorphismes de transporteurs associés à la réponse moléculaire .	103
17.6 Haplotypes associés à la réponse moléculaire majeure . . . . .	103
17.7 Analyse stratifiée sur la dose . . . . .	104
<b>18 Discussion</b>	<b>108</b>
18.1 Caractéristiques des patients . . . . .	108
18.2 Déterminants de la réponse moléculaire majeure . . . . .	109
18.3 Association d'un haplotype d'ABCG2 avec la réponse moléculaire majeure . . . . .	110
18.4 Conclusion . . . . .	111

---

## 15 Introduction

Cette partie présente les résultats de l'étude d'association entre réponse moléculaire majeure (RMM) et profil génétique dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) en phase chronique traitée par imatinib. Les variations génétiques retenues ici sont relatives à des gènes de la pharmacocinétique.

## 16 Patients et Méthode

### 16.1 Cohorte Saint Louis

La cohorte *Saint Louis* est composée de 105 patients atteints de LMC et diagnostiqués en phase chronique. Ces patients proviennent du CHU de Versailles et de l'hôpital Saint Louis de Paris. Les patients de cette cohorte ont été identifiés à l'aide des données de suivi de biologie moléculaire du Laboratoire Central d'Hématologie de l'hôpital Saint Louis de Paris.

### Ethique

Un consentement écrit et éclairé, relatif aux prélèvements d'échantillons biologiques a été obtenu pour chaque patient préalablement à sa participation à l'étude.

### Eligibilité/Exclusion

Les critères d'éligibilité / exclusion étaient les suivants :

- avoir au moins 18 ans à la date du diagnostique ;
- être diagnostiqué en phase chronique de LMC à chromosome Philadelphie LMC-Ph+ ;
- avoir été traité par imatinib avec une dose de 400 mg/jour ;
- disposer d'une quantité suffisante de matériel (échantillons sanguins) prélevé en rémission cytogénétique (absence de cellules Philadelphie positives) ;
- avoir signé un consentement éclairé.

Les patients pour lesquels aucune information n'était disponible sur le score de Sokal ne sont pas exclus.

Par ailleurs les patients de ce groupe ont pu avoir été inclus dans différents protocoles expérimentaux.

## Evaluation de la réponse moléculaire

Tous les patients ont été régulièrement évalués sur la base de prélèvements sanguins analysés au Laboratoire Central d'Hématologie de l'hôpital Saint Louis. Cette analyse a été réalisée par dosage du transcrit de fusion BCR-ABL par RTQ-PCR.

Ces données constituent le suivi moléculaire pour chaque patient, elles sont exprimées sur l'échelle internationale en *delta* de  $\log_{10}$  par rapport à 100% qui est la valeur théorique attribuée à chaque patient au diagnostique (§ 7.1). Afin de les obtenir on utilise la transformation :  $\log_{10}(x/100)$ , où  $x$  est le résultat du dosage exprimé en pourcentage. A l'aide de ces données, une trajectoire de la réponse moléculaire a pu être déterminée pour chaque patient.

## 16.2 Cohorte SPIRIT

SPIRIT (*phase 3 STI571 Prospective Randomized Trial*) est un essai prospectif contrôlé randomisé de phase III qui a pour but d'évaluer l'impact sur la réponse moléculaire de différentes stratégies thérapeutiques dans la LMC en phase chronique et précédemment non traitée. Les deux stratégies principales testées sont l'augmentation de la dose d'imatinib, et la combinaison d'imatinib avec interféron alpha (Peg-IFNa2a) ou Cytarabine (ara-C). (clinicaltrials.gov : NCT00219739)

La cohorte SPIRIT désigne *l'étude ancillaire de pharmacogénétique relative au protocole SPIRIT* (PHRC11-028, Pr. François Guilhot et Pr. Philippe Rousselot). L'étude ancillaire comprend 239 patients randomisés dans les bras 400 et 600 mg/j de l'essai SPIRIT. La participation des patients a été conditionnelle à la disponibilité des échantillons biologiques.

### Ethique

Tous les patients de l'essai SPIRIT ont donné leur consentement éclairé avant la randomisation. L'essai a été conduit en accord avec la déclaration d'Helsinki.

### Eligibilité/Exclusion

Les critères d'éligibilité/exclusion sont les suivants :

Eligibilité :

1. critères propres au protocole SPIRIT ;
  - avoir au moins 18 ans à la date du diagnostique,
  - être BCR-ABL positif (LMC-Ph+) en phase chronique,

- avoir signé un consentement éclairé,
  - être diagnostiqué dans les 14 semaines et précédemment non traité pour une LMC sauf par hydroxyurée et/ou anagrélide,
  - ne pas présenter de signe de localisation extra médulaire,
  - présenter un score de performance ECOG compris entre 0 et 2,
  - conserver des fonctions hépatiques, rénales, et cardiaques satisfaisantes ;
2. Critères propres à l'étude ancillaire de pharmacogénétique ;
- avoir été traité par imatinib 400 mg/jour ou 600 mg/j,
  - disposer d'une quantité suffisante d'ADN disponible pour le génotypage (collection constituée au Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille).

Exclusion :

1. critères propres au protocole SPIRIT ;
  - présenter un syndrome dépressif,
  - être atteint d'une ou plusieurs autres maladies incontrôlées,
  - être une femme en âge de procréer ou un homme ne désirant pas utiliser de méthode contraceptive pour la période de l'étude.

### Évaluation de la réponse moléculaire

Les prélèvements biologiques ont été réalisés dans les différentes institutions participant au protocole SPIRIT et ont été évalués dans le même centre de biologie moléculaire (Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille). Les données ont ensuite été collectées par les attachés de recherche clinique du centre hospitalo-universitaire de Poitiers. Pour l'étude ancillaire de pharmacogénétique, les données anonymisées de biologie moléculaire disponibles pour les patients éligibles ont été envoyées, stockées, et analysées à l'Institut Universitaire d'Hématologie de l'Université Paris 7 situé dans l'enceinte de l'hôpital Saint Louis à Paris.

### 16.3 Critères de jugement

Le critère de jugement principal pour cette analyse est la *réponse moléculaire majeure* (RMM), c'est-à-dire, la diminution de 3 log du niveau de la maladie résiduelle par rapport à la valeur théorique de 100% attribuée au diagnostique pour chaque patient.

Si par ailleurs un patient a subi un des événements suivants au cours de son traitement :

- changement de dosage (passer de 400 mg/jour à 600 mg/jour d'imatinib) pour cause inefficacité ;

- changement de la nature du traitement (inhibiteurs de tyrosine kinase de 2<sup>e</sup> génération (dasatinib . . .), allogreffe de cellules souches hématopoïétiques; interféron seul . . .) pour cause d'inefficacité ou d'effet indésirable;
- passage en phase d'accélération/acutisation;
- mort (toute cause),

la date de l'arrêt du traitement a été relevée et l'évènement *Toxicité* a été attribué aux patients ayant subi un effet indésirable, l'évènement *Echec de la thérapie* a été attribué aux autres.

#### 16.4 Covariables

En plus du type d'évènement observé et de la date de l'observation, nous disposons pour chaque patient des informations suivantes : âge, sexe, score de Sokal (§ 8.3) (éventuellement), et la dose journalière.

#### 16.5 Génotypage

Le génotypage des patients a été réalisé à l'aide d'une puce à façon illumina avec la technologie GoldenGate. Cette puce permet de génotyper 16561 SNP. Parmi ces SNP, 857 appartenant à 94 transporteurs ont été sélectionnés. Les critères de sélection sont un *call rate* de 90% minimum et une proportion d'allèles mineurs supérieur à 10%.

#### 16.6 Méthodes Statistiques

L'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure (§ 7.1) est estimée à l'aide de la méthode non paramétrique de Kalbfleisch et Prentice (§ 13.3). [136] L'estimation de la variance de l'incidence cumulée d'un évènement a été calculée par la méthode décrite §13.5. Les tests d'indépendance entre covariables qualitatives ont été réalisés à l'aide du test exact de Fisher ou du test du  $\chi^2$ .

L'association entre les covariables (y compris génotypes ou haplotypes) et l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure a été estimée à l'aide du modèle semi-paramétrique à risques de sous-répartition proportionnels associés à la fonction d'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure (Fine et Gray (1999)). [133]

Les questions liées à la multiplicité des tests et au contrôle du risque de première espèce ont été abordées par le calcul du taux de fausses découvertes (*False discovery rate* (FDR)) à l'aide de la méthode de Benjamini et Hochberg (1995). [137]

Une première étude d'association *exploratoire* a été réalisée sur la cohorte *Saint Louis* sur l'ensemble des marqueurs. Cette étude exploratoire a permis de définir l'ensemble des marqueurs associés à la réponse moléculaire majeure avec un niveau de signification inférieur à 5% et pour lequel l'estimation du FDR est inférieur à 50%. Une seconde étude, dite de *validation*, a été réalisée à l'aide des patients de la cohorte SPIRIT sur l'ensemble des marqueurs identifiés dans la phase exploratoire. Les marqueurs associés à la réponse moléculaire majeure avec un niveau de signification standard (5%) ont été considérés pour analyses complémentaires.

Les fréquences haplotypiques ont été estimées à l'aide de la méthode de Schaid *et al.* (2001). [138]

Les calculs et les représentations graphiques ont été réalisés sous environnement R (version 2.15.2), [139] à l'aide des bibliothèques suivantes : *cmprsk*, [140] *haplo.stat*, [141] *stats*. [139]

## 17 Résultats

### 17.1 Caractéristiques des patients

Les caractéristiques des patients sont présentées table 10. 105 patients sont éligibles pour la cohorte Saint Louis. Tous ont reçu une dose de 400 mg/j d'imatinib pour la durée de l'étude. Ce groupe de patients représente un peu moins d'un tiers du total des patients (31%). 239 patients de l'étude ancillaire SPIRIT sont éligibles et ils représentent 69% des patients. 45% d'entre eux ont reçu 600 mg/j *vs.* 400mg/j pour les 55% restant. Le nombre total des patients disponibles pour l'étude est de 344. Leur âge médian est de 51,5 ans et 3/5<sup>e</sup> sont des hommes. Ces caractéristiques sont distribuées de manière homogène entre les différents groupes de patients.

### 17.2 Incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure

#### Cohorte Saint Louis

L'estimation non paramétrique de la fonction d'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure pour la cohorte Saint Louis est représentée graphiquement sur la figure 12. A un an, elle est de 31% (intervalle de confiance à 95% (IC 95%) : de 22% à 40%). A 18 mois, elle s'élève à 42% (IC 95% : de 32% à 50%).

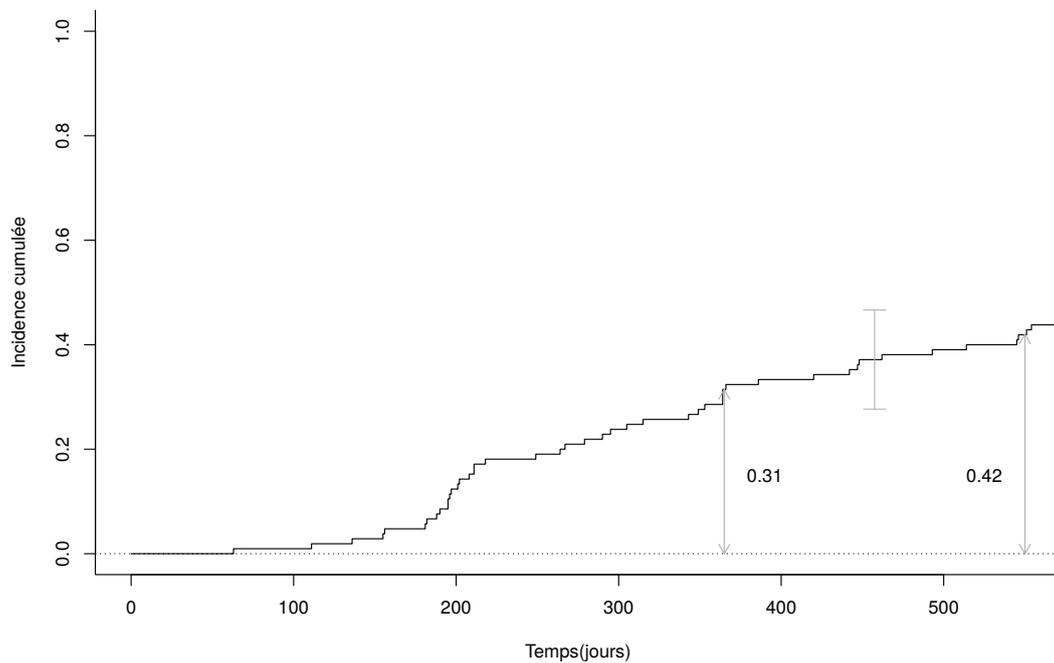


FIGURE 12 – Incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure pour la cohorte Saint Louis.

### Cohorte étude ancillaire SPIRIT

L'estimation non paramétrique de la fonction d'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure pour la cohorte SPIRIT est représentée graphiquement sur la figure 13. A un an, elle est de 46% (IC 95% : de 39% à 53%). A 18 mois, elle s'élève à 55% (IC 95% : de 48% à 62%).

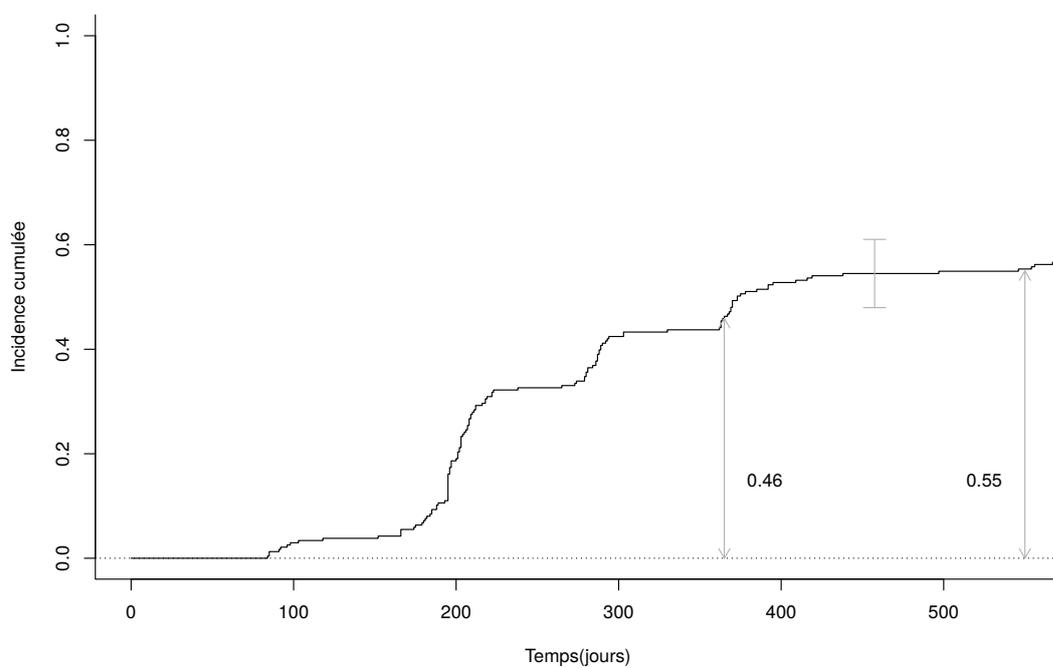


FIGURE 13 – Incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure pour la cohorte SPIRIT.

	Cohorte Saint Louis		Etude Ancillaire SPIRIT		Total
	400 mg/j	600 mg/j	400 mg/j	600 mg/j	
Dose	105	132	107	239	344
Sexe					
Hommes	63 (60%)	88 (67%)	52 (49%)	143 (60%)	206 (60%)
Femmes	42 (40%)	44 (33%)	55 (51%)	96 (40%)	138 (40%)
Score de Sokal					
Faible	34 (32%)	52 (39%)	38 (36%)	90 (38%)	124 (36%)
Intermédiaire	24 (23%)	54 (41%)	54 (42%)	99 (41%)	123 (36%)
Elevé	15 (14%)	26 (20%)	24 (22%)	50 (21%)	65 (19%)
Non déterminé	32 (30%)	0	0	0	32 (9%)
Age médian (années)	50,5	51,8	51,5	51,5	51,5

TABLE 10 - Caractéristiques des patients.

### 17.3 Déterminants de l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure

#### Score de Sokal

L'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure stratifiée en fonction des 3 niveaux de risques définis par Sokal *et al.* (§ 8.3) est représentée figure 14. Les niveaux après un an de traitement sont de 27% (IC 95% : de 16% à 38%), 42% (IC 95% : de 33% à 51%) et 55% (IC 95% : de 46% à 64%) pour les groupes de risques faibles, intermédiaires, et élevés respectivement.

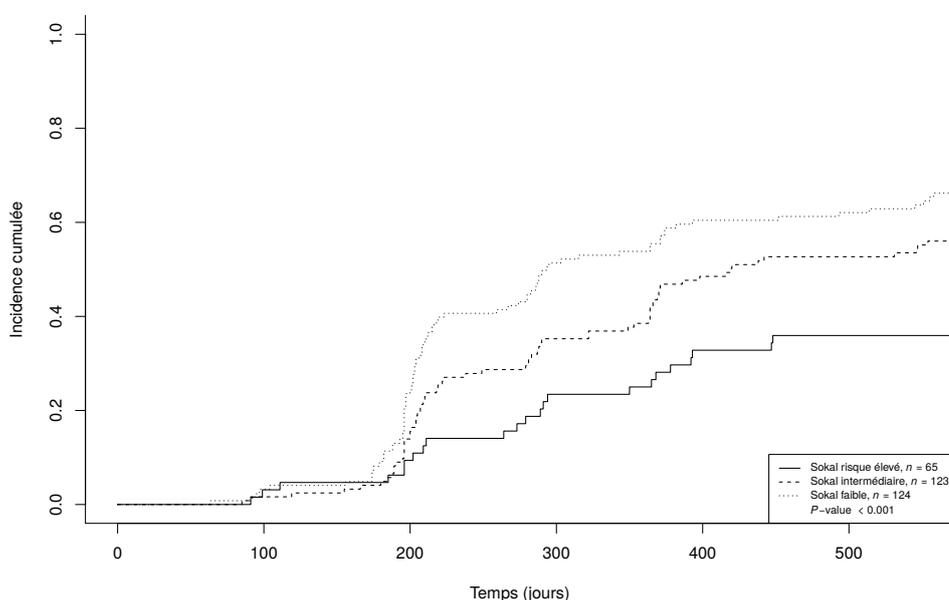


FIGURE 14 – Incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure stratifiée en fonction des 3 niveaux de risques du score de Sokal ( $n = 312$ ).

#### Dose journalière

Les patients issus du bras 600 mg/j de l'étude ancillaire SPIRIT ( $n = 107$ ) ont une incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure significativement supérieure aux patients traités à la dose de 400mg/j ( $n = 206$ ,  $P = 0,002$ ). A 12 mois, on observe les valeurs suivantes : 53% (IC 95% : de 43% à 63%) *vs.* 36% (IC 95% : de 30% à 42%) pour les doses 600, et 400 mg/j respectivement. (Illustration figure 15.)

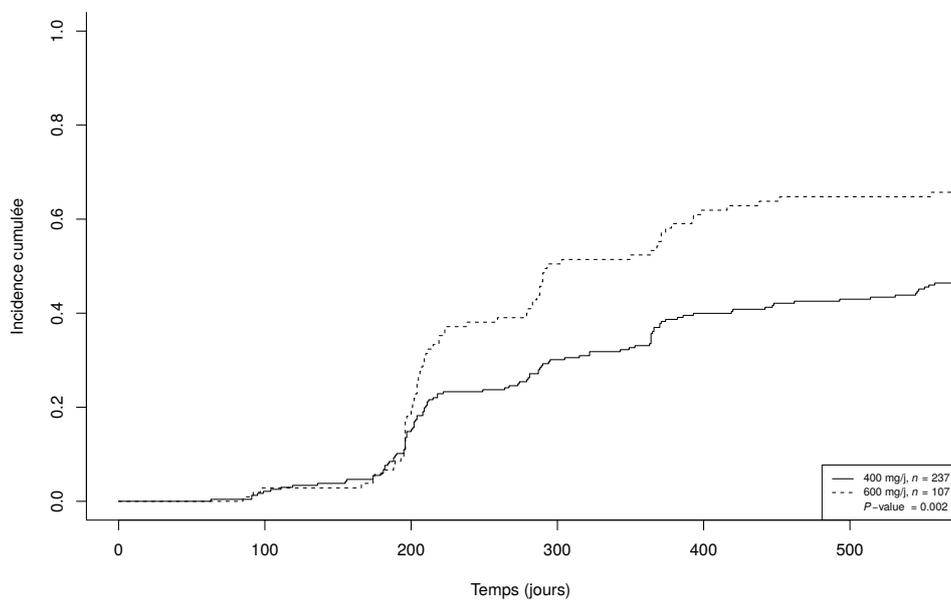


FIGURE 15 – Incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure stratifiée en fonction de la dose journalière d'imatinib reçue ( $n = 344$ ).

## Autres déterminants

### Sexe

La figure 16 représente l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure stratifiée en fonction du sexe. Bien que les hommes accusent un léger retard, cette différence n'est pas significative et elle semble s'estomper avec le temps ( $P = 0,21$ ).

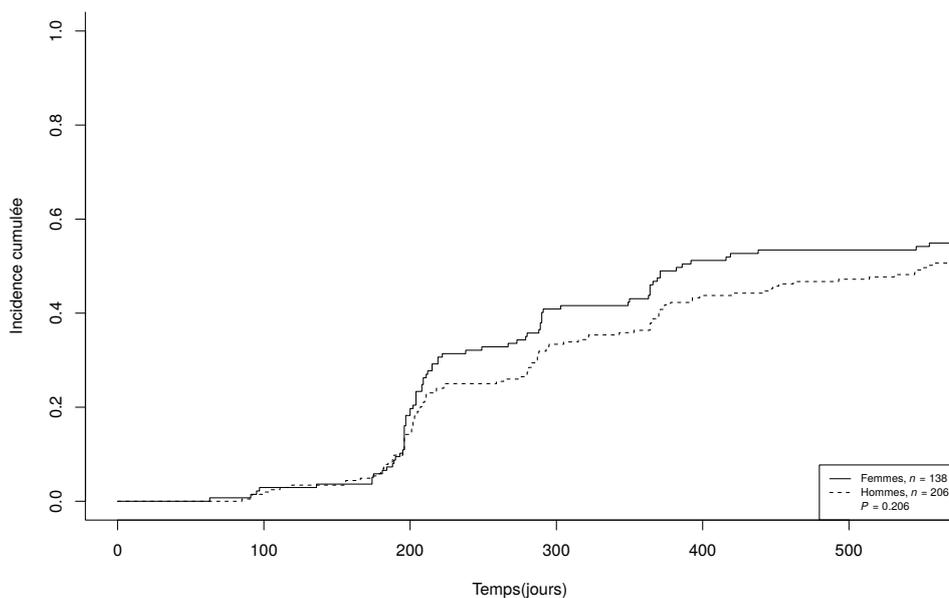


FIGURE 16 – Incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure stratifiée en fonction du sexe ( $n = 344$ ).

### Age

L'âge ne semble pas avoir d'influence significative sur la réponse moléculaire majeure ( $P = 0,82$ ).

## 17.4 Analyse multivariée

La distribution des différents niveaux du score de risque de Sokal est homogène entre les différentes doses de traitement. L'effet de la dose sur l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure n'est pas le même selon que les patients ont un risque Sokal faible/intermédiaire ou élevé. La figure 17 illustre cette observation et les principales statistiques montrant cette différence sont rassemblées dans la table 11. L'analyse multivariée à proprement parler pour la dose journalière et le score de Sokal est présentée table 12.

		Score de Sokal		
		Faible <i>n</i> = 124	Intermédiaire <i>n</i> = 123	Élevé <i>n</i> = 65
Incidence cumulée [IC 95%] à 12 mois				
Dose	400 mg/j	0,48 [0,37 ; 0,59] <i>n</i> = 86	0,33 [0,22 ; 0,44] <i>n</i> = 78	0,32 [0,17 ; 0,47] <i>n</i> = 41
	600 mg/j	0,71 [0,56 ; 0,86] <i>n</i> = 38	0,57 [0,42 ; 0,72] <i>n</i> = 54	0,17 [0,01 ; 0,33] <i>n</i> = 24
Coefficient <sup>†</sup>		$\underbrace{1,75 (P = 0,01) \quad 1,61 (P = 0,06)}_{1,91 (P \leq 0,001)}$ $n = 247$		

<sup>†</sup>Exponentiel du coefficient calculé à l'aide du modèle de régression de Fine et Gray

TABLE 11 – Analyse de l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure en fonction de la dose journalière d'imatinib et du score de risque de Sokal.

---

	Coefficient	Ecart type	Statistique de test (z)	P	Exp(coef.) [IC 95%]
Dose : 600 mg/j	0,40	0,16	2,63	0,009	1,50 [1,11 ; 2,04]
Sokal score élevé	-0,79	0,46	-3,63	$\leq 0,001$	0,46 [0,30 ; 0,70]

---

TABLE 12 – Analyse multivariée de l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure en fonction de la dose journalière d'imatinib et du score de risque de Sokal.

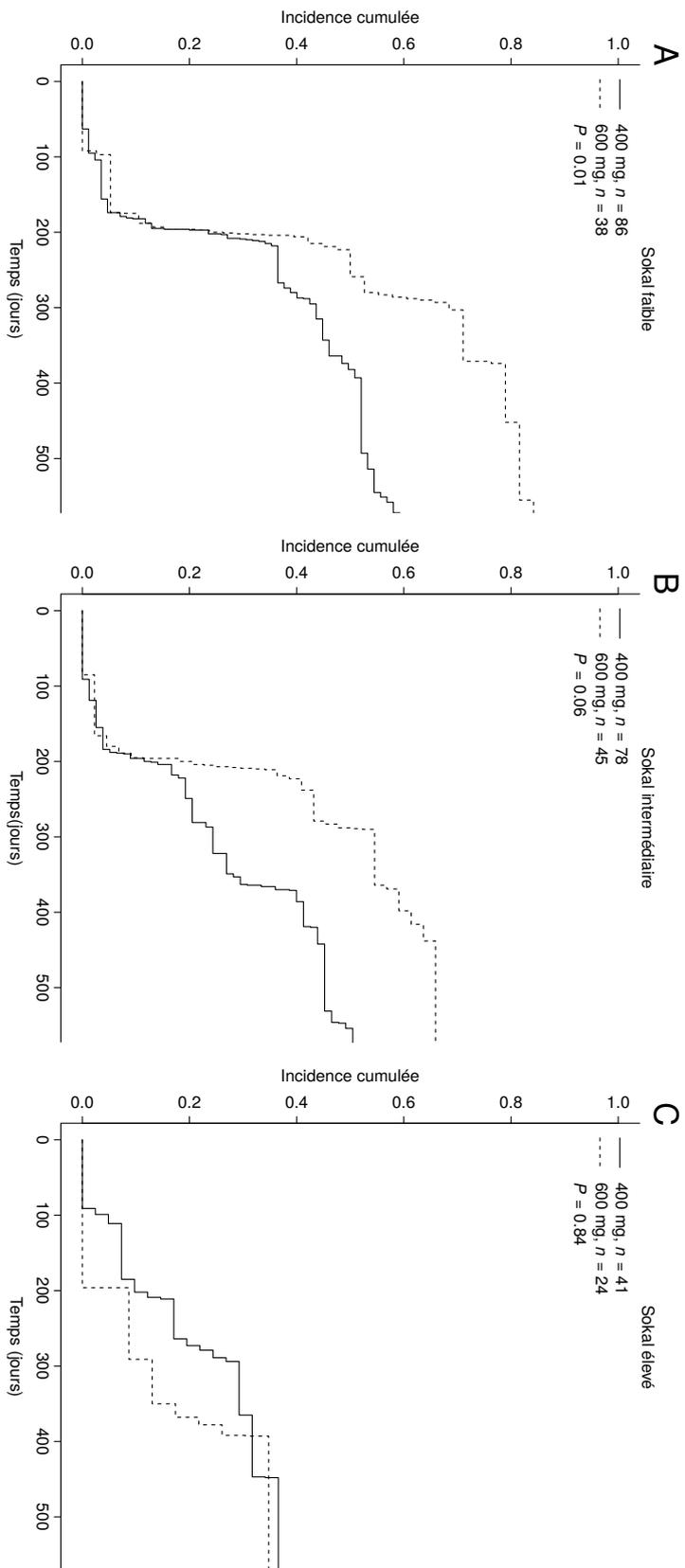


FIGURE 17 – Incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure stratifiée en fonction de la dose journalière reçue par les patients pour les différents scores de risques de Sokal.

### 17.5 Polymorphismes de transporteurs associés à la réponse moléculaire

Dans cette section, nous résumons les résultats obtenus lors de l'étude d'association entre la réponse moléculaire majeure et les données de génotypage disponibles pour chaque patient.

413 marqueurs représentant 86 transporteurs sont éligibles pour l'étude d'association. L'analyse exploratoire fait apparaître 12 marqueurs potentiellement associés à la réponse moléculaire majeure pour lesquels le FDR est inférieur à 50%. Parmi ces marqueurs, 3 appartiennent au gène ABCG2.

L'association entre ces 12 marqueurs et la réponse moléculaire majeure a donc été testée à l'aide des patients de la cohorte SPIRIT. Parmi les 12 marqueurs, seul *rs12505410*, situé entre les 9<sup>e</sup> et 10<sup>e</sup> exon du gène ABCG2 atteint un seuil de signification de 5% (figure 18).

Cependant, l'analyse par bras de traitement montre que les 3 marqueurs du gène ABCG2 atteignent un seuil de signification de 5% dans le bras 400 mg/j et aucun dans le bras 600 mg/j (Table 2 article n°1). La position de ces 3 marqueurs est schématisée figure 18.

### 17.6 Haplotypes associés à la réponse moléculaire majeure

Les déséquilibres de liaison existant au voisinage du gène ABCG2 ont permis d'estimer les fréquences haplotypiques au sein de chaque groupe de patients à l'aide des 3 polymorphismes du gène ABCG2 confirmés à l'aide des patients du bras 400 mg/j de la cohorte SPIRIT. Les fréquences haplotypiques ont aussi été estimées sur un échantillon de 76 personnes issues de la population séquencée dans le cadre du *1000 genomes project* (§ 3.1).

L'association entre réponse moléculaire majeure et haplotypes identifiés au locus ABCG2 montre que les patients porteurs d'au moins une copie des haplotypes 1 et 3, ont un taux de réponse moléculaire majeure significativement plus important. Ces haplotypes partagent l'allèle G aux positions *rs12505410* et *rs2725252*.

Le calcul des fréquences haplotypiques a donc été réalisé aux positions *rs12505410* et *rs2725252*. Comme attendu, les fréquences sont distribuées de manière homogène entre les différentes populations étudiées. Les fréquences des 4 haplotypes obtenus sont présentées table 14.

L'influence de l'haplotype G-G sur la réponse moléculaire majeure a été déterminée à l'aide d'un modèle de Fine et Gray ajusté sur la dose et le score de Sokal. L'haplotype G-G est associé de manière significative à la réponse moléculaire ma-

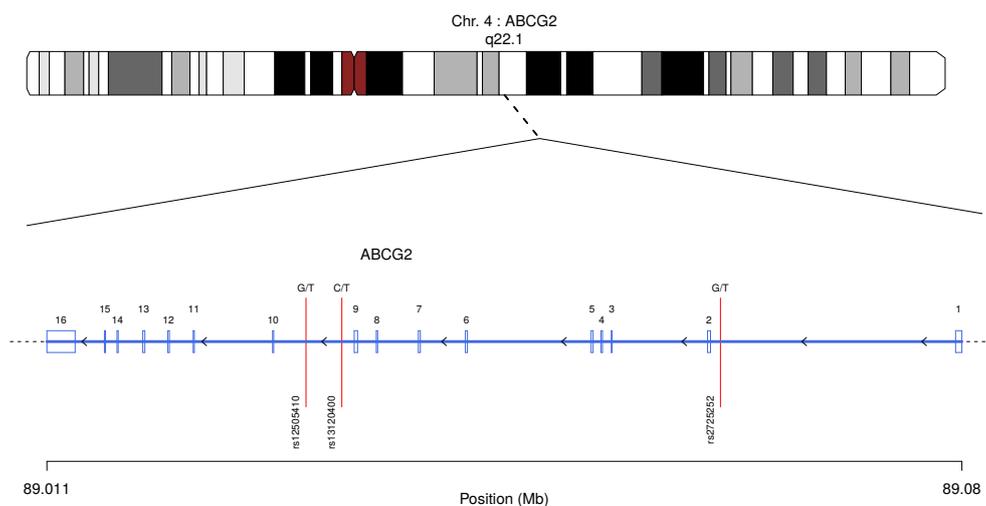


FIGURE 18 – Représentation schématique du locus *ABCG2*.

id	Haplotype	Populations		
		Saint Louis	SPIRIT	CEU
Hap.1	G-C-G	22,28	27,65	25,00
Hap.2	G-C-T	0,47	0,00	0,66
Hap.3	G-T-G	5,06	6,29	3,48
Hap.4	T-T-G	14,59	11,91	10,34
Hap.5	T-T-T	56,03	51,47	54,80
Hap.6	G-T-T	1,58	2,49	5,73
Hap.7	T-C-G	0,00	0,20	0,00

TABLE 13 – Fréquences haplotypiques calculées au locus *ABCG2* à l'aide des marqueurs *rs2725252*, *rs13120400*, et *rs12505410* sur la cohorte Saint Louis, la cohorte SPIRIT, et un groupe de 76 personnes non atteintes issues de la population CEU séquencée dans le cadre du 1000 genomes project.

jeure. Le risque de sous-répartition pour la réponse moléculaire majeure associé à G-G est de 1,87 (IC 95% : de 1,37 à 2,54). Les résultats du modèle complet sont rapportés table 15. La figure 19 illustre cette différence sur l'ensemble des patients ( $n=344$ ).

### 17.7 Analyse stratifiée sur la dose

L'analyse du taux d'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure a été réalisée en fonction de la dose journalière d'imatinib reçue et pour l'ensemble

id	Haplotype	Populations		
		Saint Louis	SPIRIT	CEU
Hap.1	G-G	28,04	34,62	28,95
Hap.2	G-T	1,87	2,28	5,92
Hap.3	T-G	13,55	11,53	9,87
Hap.4	T-T	56,54	51,56	55,26

TABLE 14 – Fréquences haplotypiques calculées au locus *ABCG2* à l'aide des marqueurs *rs2725252* et *rs12505410* sur la cohorte Saint Louis, la cohorte SPIRIT, et un groupe de 76 personnes non atteintes issues de la population CEU séquencée dans le cadre du 1000 genomes project.

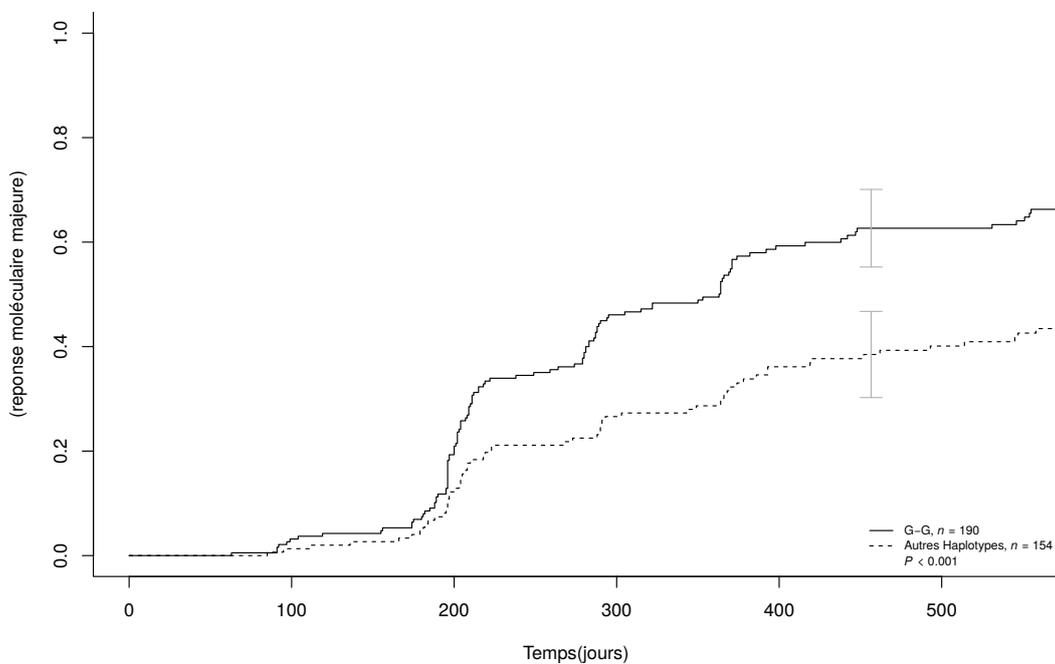


FIGURE 19 – Influence de l'haplotype G-G sur l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure estimée à l'aide des patients des cohortes Saint Louis et SPIRIT ( $n = 344$ ).

	Coefficient	Ecart type	Statistique de test (z)	P	Exp(coef.) [IC 95%]
Hap G-G	0,62	0,157	3,97	$\leq 0,001$	1,87 [1,37 ; 2,54]
Sokal score Int.	-0,38	0,16	-2,36	0,018	0,69 [0,50 ; 0,94]
Sokal score élevé	-0,92	0,23	-4,09	$\leq 0,001$	0,40 [0,26 ; 0,62]
Dose : 600 mg/j	0,39	0,15	2,53	0,011	1,48 [1,09 ; 2,00]

TABLE 15 – Analyse de l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure en fonction de l'haplotype G-G, ajustée sur la dose et le score de risque de Sokal ( $n = 312$ ).

des patients.

Chez les patients traités à 400 mg/j d'imatinib, l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure est significativement plus importante pour les patients porteurs de G-G par rapport aux non porteurs (60% (IC 95% : de 51% à 69%) *vs.* 34% (IC 95% : de 24% à 44%) respectivement).

Cette tendance existe aussi pour le groupe traité à 600 mg/j, cependant, ces résultats ne sont pas statistiquement significatifs.

Pour l'ensemble des patients en revanche, on observe une incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure significativement supérieure chez les patients porteurs : 64% (IC 95% : de 57% à 71%) *vs.* 43% (IC 95% : de 35% à 51%) pour les non porteurs.

Ces résultats ainsi que les coefficients de régression relatifs aux risques de sous-répartition associés à G-G sont présentés table 16. La figure 20 illustre la différence des niveaux d'incidences cumulées en fonction de l'haplotype G-G pour les patients traités à 400 ou 600 mg/j d'imatinib.

Haplotype	Dose = 400 mg/j, $n = 237$	Dose = 600 mg/j, $n = 107$	Ensemble, $n = 344$
Incidence cumulée [95% CI]			
G-G	<b>0,60 [0,51 ; 0,69]</b>	0,73 [ 0,61 ; 0,85]	0,64 [0,57 ; 0,71]
Autres haplotypes	0,34 [0,24 ; 0,44]	<b>0,61 [0,46 ; 0,76]</b>	0,43 [0,35 ; 0,51]
Exp(coef.)	2,38 [1,62 ; 3,50]	1,42 [0,86 ; 2,28]	1,96 [1,45 ; 2,65]
Niveau de signification	$P \leq 0,001$	$P = 0,150$	$P \leq 0,001$

TABLE 16 – Analyse stratifiée de l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure en fonction l'haplotype G-G pour les différentes doses d'imatinib reçues.

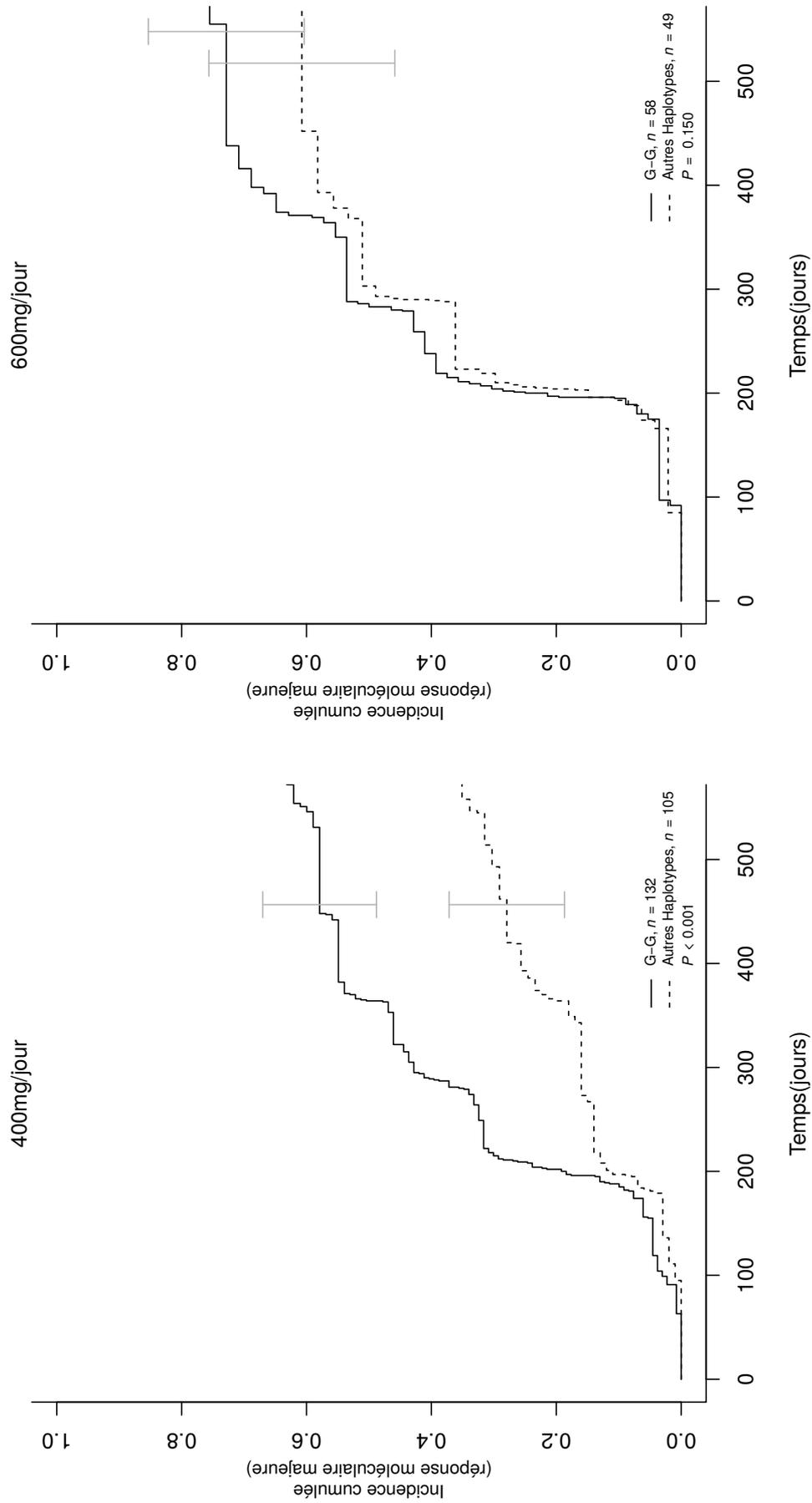


FIGURE 20 – Incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure en fonction de l'haplotype G-G d'ABCG2 pour les patients traités à 400 ou 600 mg/j.

Etude	Type	Ratio (hommes/femmes)
Saglio (2010) <i>et al.</i> [78]	Nilotinib <i>vs.</i> imatinib ( $n = 846$ )	1,38
O'Brien <i>et al.</i> (IRIS) (2003) [73]	Imatinib <i>vs.</i> interféron <i>alpha</i> ( $n = 1106$ )	1,43
Kantarjian <i>et al.</i> (2010) [77]	Dasatinib <i>vs.</i> imatinib ( $n = 519$ )	1,45
Savage (1997) <i>et al.</i> [41]	Registre ( $n = 430$ )	1,38

TABLE 17 – *Rapports hommes/femmes dans la leucémie myéloïde chronique observés dans différents essais cliniques et registres.*

## 18 Discussion

Cette étude a pour objectif de tester l'hypothèse d'une relation entre taux de réponses moléculaires majeures (RMM) et caractéristiques pharmacocinétiques dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) en phase chronique traitée par imatinib. Dans ce but, la réponse moléculaire de 344 patients a pu être évaluée et mise en relation avec 413 marqueurs génétiques situés à proximité de gènes codants pour 86 transporteurs.

### 18.1 Caractéristiques des patients

L'étude de la répartition des caractéristiques des patients (table 10) montre que cette répartition est homogène entre les différents groupes étudiés. Cette répartition est aussi comparable à celle observée dans la littérature :

- l'âge médian des patients au diagnostique est homogène entre les différents groupes de patients, il s'élève à 51,5 ans pour l'ensemble des patients. Si cette valeur est inférieure à celle obtenue dans les registres (âge médian de 64 à 68 ans), elle est conforme à celles observées dans d'autres études (les patients âgés étant sous représentés dans les essais cliniques) ; [52]
- le rapport homme/femme est homogène entre les différents groupes de patients. Il est de 1,49 pour l'ensemble des patients. Cette valeur est en accord avec les données épidémiologiques (rapport hommes/femmes de 1,3 à 1,8) [52] mais aussi celles d'essais cliniques cités plus haut (table 17) ;
- la répartition des patients selon les différentes classes de risques d'après Sokal *et al.* est homogène entre les différents groupes de patients. Elle est en outre comparable à celle observée dans Sokal *et al.* (1984) (table 5,  $P = 0,73$ ).

## 18.2 Déterminants de la réponse moléculaire majeure

### Score pronostique de Sokal

Bien que le score de risques de Sokal ait été élaboré avant l'apparition des inhibiteurs de tyrosine kinase pour le traitement de la LMC, il est intéressant de constater une concordance entre niveaux de réponse moléculaire majeure obtenus et niveaux de risques. A ce sujet, l'*European LeukemiaNet* (ELN) ne formule pas de recommandation sur le système de score pronostique à adopter. Par conséquent le score de Sokal peut être utilisé comme critère pronostique indépendamment de la nature du traitement. La recommandation principale au sujet des différents scores de risques est de considérer séparément scores élevés *vs.* scores faibles/intermédiaires. [56]

### Dose journalière

Tout comme les différents scores de risques, la dose journalière d'imatinib est considérée comme un déterminant majeur de la réponse moléculaire (table 4). L'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure à 12 mois observée chez les groupes des patients ayant reçu une dose de 400mg/jour est de 36% (IC 95% : de 30% à 42%). L'intervalle de confiance inclut toutes les valeurs des études mentionnées table 4 pour une dose journalière identique. Les 53% observés dans le groupe de patients du bras 600 mg/j sont significativement supérieurs aux 36% du groupe 400 mg/j ( $P = 0,002$ ). Cette valeur est cependant égale voir supérieure à celles obtenues avec la dose de 800 mg/j (table 4).

### Sexe et âge

La courbe d'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure des hommes accuse un léger retard par rapport à celle des femmes. Comme le suggère l'étude Noens *et al.*, [111] cette différence (statistiquement non significative) pourrait trouver son origine dans une moindre observance du traitement par les hommes comparée à celle des femmes (table 8).

L'âge n'a pas d'influence sur la réponse moléculaire majeure dans notre étude. Cette observation est conforme à celles réalisées suite à l'introduction des ITK et ayant conduit Hasford *et al.* (2011) à ne plus inclure l'âge comme facteur de mauvais pronostique dans le score EUTOS. [87]

## Dose + Risque de Sokal

Une analyse de l'effet de la dose en fonction des niveaux de risques de Sokal montre que l'effet de la dose n'est pas homogène entre les trois niveaux de risques et que le bénéfice obtenu en terme de réponse moléculaire majeure est *Sokal-risque dépendant* (figure 17, table 12 et 11).

En d'autres termes, l'augmentation de la dose ne profite pas aux patients à haut risque et elle est d'autant plus profitable que les patients ont un risque faible.

Par ailleurs, sur l'ensemble des 7 études répertoriées table 4, le taux de réponse moléculaire majeure associé à la dose de 800 mg/j est disponible pour 5 d'entre elles. Parmi ces dernières, 3 sont des essais contrôlés randomisés<sup>9</sup>, donc *a priori* peu sujettes à biais de sélection et 2 sont des études où seule la dose 800 mg a été testée et où les patients de risque Sokal faible sont sur-représentés (70% de patients de risque faible *vs.* 39% dans Sokal *et al.*,  $P \leq 0,001$ )<sup>10</sup>. Or, le taux de réponse moléculaire majeure pour ces deux études est significativement supérieur au taux observé dans les bras 800 mg/j des 3 ECR ( 58% *vs.* 47%,  $P = 0,002$ ). En d'autres termes, ces études suggèrent que l'augmentation de la dose d'imatinib est davantage profitable aux patients à risque faible.

Proetel *et al.* (2014) [88]<sup>11</sup> utilisent le même type de raisonnement pour montrer qu'une augmentation de la dose d'imatinib profite d'avantage aux patients de plus de 65 ans.

### 18.3 Association d'un haplotype d'ABCG2 avec la réponse moléculaire majeure

L'étude d'association a permis d'identifier un haplotype d'ABCG2 susceptible d'expliquer une partie de la variabilité de la réponse moléculaire majeure dans la LMC en phase chronique lorsque les patients sont traités par imatinib à 400 mg/j mais pas à 600 mg/j (table 16).

Il est intéressant de constater que les patients non porteurs de l'haplotype G-G mais traités à 600 mg/j ont une incidence cumulée de réponse moléculaire majeure comparable aux patients porteurs de l'haplotype G-G traités à 400mg/j. En d'autres termes il semblerait que l'insuffisance observée chez les patients non porteurs de l'haplotype G-G (seulement 20% de réponses moléculaires majeures à 12 mois comparé aux 38% de l'étude IRIS et aux 51% des porteurs de l'haplotype G-G) pourrait être compensée par une augmentation de la dose d'imatinib de 400 à 600 mg/j.

9. Cortes *et al.* (2010) [81], Hehlmann *et al.* (2011) [82] et Deininger *et al.* (2014) [83]

10. Kantarjian *et al.* (2004) [79] et Cortes *et al.* (2009) [80]

11. Older patients with chronic myeloid leukemia ( $\geq 65$  years) profit more from higher imatinib doses than younger patients

Cette observation est intéressante dans la mesure où les patients traités à 400 mg/j et non porteurs de l'haplotype G-G forment un groupe dont l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure est particulièrement faible (comparable aux patients de risque Sokal élevé). Les données suggèrent que pour ces patients, une augmentation de la dose de 400mg/j à 600 mg/j leur permettrait d'obtenir une incidence cumulée de réponse moléculaire majeure à 18 mois de l'ordre de 61% vs. 34% sinon.

## 18.4 Conclusion

Cette étude d'association montre qu'un haplotype lié au transporteur ABCG2 est associé au taux de réponse moléculaire majeure dans la LMC en phase chronique. Sur les 413 marqueurs disponibles, une sous liste de marqueurs candidats a été dressée à l'aide de la cohorte exploratoire Saint Louis. Cette cohorte inclut des patients suivis dans le cadre d'une pratique clinique ordinaire ou ayant participé à divers protocoles. Elle n'a donc pas été constituée dans le but de répondre à une question prédéterminée et la collecte des différents paramètres cliniques, bien que très standardisée dans le cadre de cette maladie, non plus. Le niveau de preuve auquel peuvent prétendre les résultats de cette analyse exploratoire est donc au mieux C sur l'échelle révisée de Simon *et al.* (2009) (§ 4.2). [34]

En revanche, la cohorte SPIRIT ou *cohorte de l'étude ancillaire de pharmacogénétique associée au protocole SPIRIT* est une cohorte issue de l'essai prospectif contrôlé randomisé SPIRIT. Bien que SPIRIT ne soit pas une étude de pharmacogénétique, l'étude ancillaire a été prévue pour tester des hypothèses de pharmacogénétique. Les échantillons biologiques ont été conservés et annotés à l'aide des données cliniques collectées lors de la conduite de l'étude mère afin de répondre à la question principale de l'essai mais aussi à l'étude de pharmacogénétique. Les résultats de cette étude sont donc d'un niveau de preuve B sur l'échelle révisée de Simon *et al.*.

Toujours d'après Simon *et al.*, ce type d'étude peut *mettre en évidence un effet lié au biomarqueur testé*. Cependant, une ou plusieurs études indépendantes seraient requises afin de démontrer de manière formelle un effet du biomarqueur étudié (table 2).

Par ailleurs, des arguments de type physiologique seraient aussi susceptibles d'être mis en relation avec l'association décrite dans cette étude : ABCG2 code la protéine appelée *breast cancer resistance protein* (BCRP). Cette protéine est un transporteur impliquée dans la résistance multiple aux traitements. ABCG2/BCRP a été impliqué premièrement dans la résistance multiple aux médicaments de la lignée MCF-7 [142] de cancer du sein puis dans d'autres types de cancers par son rôle dans l'efflux d'une grande variété de métabolites au travers

de la membrane plasmique des cellules<sup>12</sup>. Dès 2004, Ozvegy-Laczka *et al.* (2004) [143] montraient que l'imatinib présentait une grande affinité avec BCRP et soulignaient le rôle potentiel de cette protéine dans les phénomènes de résistance à l'imatinib.

BCRP est exprimé abondamment à la surface de cellules constitutives de tissus tels la paroi intestinale, le foie, mais aussi les cellules souches, notamment hématopoïétiques, [144] son niveau d'expression est donc susceptible de moduler concentration plasmique et concentration intracellulaire de l'imatinib, la première pouvant expliquer en partie la seconde. [145]

Burger *et al.* (2005) [146] ont rapporté les résultats suivants : *in vitro*, l'expression de ABCG2 est induite par l'imatinib. Réciproquement, cette sur-expression d'ABCG2 a pour résultat une diminution de 50% de la concentration intracellulaire d'imatinib en moyenne. Les auteurs de cette étude en ont conclu que des niveaux importants d'expression d'ABCG2/BCRP pouvaient conduire à des mécanismes pharmacocinétiques de résistance chez des patients traités par l'imatinib.

Récemment, de Lima *et al.* (2014) [147] sont parvenues à établir un lien entre taux de réponse moléculaire majeure et niveau d'expression d'ABCG2 dans la LMC traitée par imatinib. Cette étude montre une expression importante d'ABCG2 chez des patients n'ayant pas obtenu de réponse moléculaire majeure. Les auteurs de cette étude tirent de leurs observations des conclusions similaires à celles de Burger *et al.* : BCRP étant une pompe d'efflux, sa surexpression pourrait être à l'origine d'une moindre concentration intracellulaires d'imatinib et donc d'une moindre efficacité de ce médicament.

L'haplotype identifié (G-G) est composé de 2 polymorphismes non codants. L'hypothèse eQTL (*expression quantitative trait loci*), c'est-à-dire que ces marqueurs soient en lien avec l'expression d'ABCG2 n'est donc pas à exclure. Plus précisément le cas n°2 § 3.3 pourrait être retenu :

*le SNP se situe dans une région non codante (introns, 3'UTR ou 5'UTR, ou région intergénique) : le gène impliqué peut être le gène au sein duquel, ou au voisinage duquel, le variant est observé et, le variant observé n'est pas forcément le variant causal (il peut être en déséquilibre de liaison avec le variant causal.)*

Dans cette hypothèse, les modulations de l'expression d'ABCG2 en lien avec l'haplotype G-G serait susceptible d'expliquer la différence des taux de réponse moléculaire majeure observés.

---

12. Mitoxantrone, doxorubicin, daunorubicin et daunorubicin

---

## Cinquième partie

# Marqueurs pharmacodynamiques liés de la réponse moléculaire dans la LMC en phase chronique traitée par imatinib

## Sommaire

---

<b>19 Introduction</b>	<b>114</b>
19.1 Cellules NK . . . . .	114
19.2 Non reconnaissance du soi . . . . .	114
19.3 Reconnaissance du soi altéré . . . . .	115
19.4 Rôle des cellules NK dans les thérapies contre la LMC . . . . .	115
19.5 Rôle du couple NKG2D–MICA/B . . . . .	115
19.6 Surveillance immunitaire . . . . .	116
19.7 Résumé . . . . .	116
<b>20 Patients et Méthode</b>	<b>117</b>
20.1 Patients . . . . .	117
20.2 Méthode . . . . .	117
<b>21 Résultats</b>	<b>118</b>
21.1 Marqueurs . . . . .	118
21.2 Polymorphismes de gènes de la voie NK associés à la réponse moléculaire	118
21.3 Haplotypes associés à la réponse moléculaire majeure . . . . .	121
21.3.1 Complexe NK . . . . .	121
21.3.2 Locus MICB . . . . .	122
21.4 Analyse multivariée . . . . .	124
<b>22 Discussion</b>	<b>125</b>
22.1 Résumé . . . . .	125
22.2 Conclusion . . . . .	125

---

## 19 Introduction

Dans la partie précédente, les résultats de l'étude d'association entre marqueurs liés à des gènes de la pharmacocinétique et réponse moléculaire majeure (RMM) dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) en phase chronique ont été rapportés. Dans cette partie une approche similaire est adoptée pour étudier l'association entre marqueurs liés à des gènes de la pharmacodynamique. Plus précisément, les gènes impliqués dans la voie *Natural Killer* (NK).

### 19.1 Cellules NK

Les cellules NK sont des cellules effectrices du système immunitaire inné. Elles exercent une action cytotoxique à l'encontre des cellules infectées ou transformées sans activation préalable. [148] L'action cytotoxique des cellules NK est déterminée par un équilibre entre signaux transduits par des récepteurs activateurs et signaux transduits par des récepteurs inhibiteurs de ces cellules.

Les récepteurs inhibiteurs ont bien été caractérisés, notamment ceux de la famille KIR. En revanche, la plupart des récepteurs activateurs restent méconnus, à l'exception de NKG2D. [149] Ce récepteur est exprimé à la surface des cellules NK, mais aussi à la surface d'autres lymphocytes, principalement les lymphocytes T  $CD8\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$ . [150] Parmi les ligands de NKG2D, figurent les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I induite par stress (transformation maligne ou infection) MICA et MICB et les 4 membres des protéines de liaison à UL16 (ULBP1-4). [151, 152, 149]

### 19.2 Non reconnaissance du soi

Les récepteurs inhibiteurs des cellules NK se lient aux molécules du CMH de classe I normalement exprimées par les cellules saines, mais pas (ou peu) par les cellules transformées. Par conséquent les cellules transformées ne sont pas en mesure d'induire un signal d'inhibition lorsqu'elles sont en contact avec une cellule NK. Dans cette situation, l'équilibre entre signaux activateurs et inhibiteurs est susceptible d'être rompu, et une réponse cytotoxique déclenchée par la cellule NK à l'encontre des cellules en déficit de molécules inhibitrices à leurs surfaces. [153] Ce mécanisme, connu sous le nom de *non reconnaissance du soi* (*missing self recognition*), confère aux cellules NK un rôle de premier plan dans la surveillance immunitaire contre les cellules infectées ou transformées. [154]

### 19.3 Reconnaissance du soi altéré

Les cellules NK sont aussi capables de reconnaître les signaux du *soi altéré*, c'est-à-dire, l'expression de molécules induites par un stress et exprimées à la surface des cellules stressées. Lorsqu'une cellule stressée entre en contact avec une cellule NK, les récepteurs activateurs de la cellule NK sont activés et transduisent un signal activateur susceptible de déclencher une réponse cytotoxique à l'encontre de la cellule stressée.

Les mécanismes d'activation des cellules NK *via* activation de leurs récepteurs activateurs est appelé *reconnaissance du soi altéré*. A l'exception de NKG2D, peu d'activateurs des cellules NK sont connus. Par ailleurs, les ligands de NKG2D ont été bien caractérisés et leur rôle dans la surveillance immunitaire est établis, il s'agit principalement des récepteurs du CMH de classe I MICA et MICB. [155, 156]

### 19.4 Rôle des cellules NK dans les thérapies contre la LMC

Dans le contexte de la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques, l'effet greffe contre leucémie (*graft versus host* (GVL)), susceptible d'entraîner une rémission moléculaire durable a été attribué à l'action des cellules NK [62, 63] par le mécanisme de *non reconnaissance du soi*. Dans ce cas, les cellules NK se montrent alloréactives contre les cellules leucémiques mais sans pour autant déclencher de réactions contre l'hôte. [63] D'autres auteurs ont suggéré que ces rémissions durables étaient attribuables au mécanisme de *reconnaissance du soi altéré*. [157, 158]

Récemment, trois études ont eu pour objet de tester l'hypothèse d'une relation entre répertoire des récepteurs KIR et réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) dans la LMC en phase chronique. Marin *et al.* (2012) [106] avec l'imatinib et Kreutzman *et al.* (2012) [107] avec le dasatinib. Ces auteurs ont observé que la présence du récepteur activateur KIR2DS1 était associée avec un taux de réponse cytogénétique complète ou RMM. Nasa *et al.* (2013) [109] ont en plus montré que ce récepteur était aussi lié à la susceptibilité de la maladie. Par ailleurs, Nasa *et al.* (2013) et Kreutzman *et al.* (2012) ont aussi observé une réponse moléculaire plus profonde chez les patients ne possédant pas certains récepteurs inhibiteurs de la famille KIR

### 19.5 Rôle du couple NKG2D–MICA/B

Dans le cadre des rémissions moléculaires durables observées après transplantations allogéniques de cellules souches hématopoïétiques, Sconocchia *et al.* (2005)

[159] ont montré qu'un signal inhibiteur médié par les récepteurs KIR pouvait être bloqué par l'activation de NKG2D par MICA/B, entraînant une réponse cytotoxique à l'encontre de cellules souches leucémiques (CD34<sup>+</sup> Ph<sup>+</sup>) exprimant ces ligands à leurs surfaces *in vitro*. Par ailleurs, Boissel *et al.* (2006) [100] ont montré que l'expression de MICA était régulée post-transcriptionnellement par l'oncoprotéine BCR-ABL.

## 19.6 Surveillance immunitaire

Il existe donc un paradoxe : bien que MICA et MICB soient exprimés à la surface des cellules (souches) leucémiques, ces dernières parviennent, selon toute vraisemblance, à échapper à la surveillance immunitaire. Elles ne sont pas en mesure de déclencher à leur encontre de réponse cytotoxique de la part des cellules NK.

Sconocchia *et al.* (2005) et Boissel *et al.* (2006) ont attribué ce phénomène à la capacité des cellules leucémiques à diffuser des formes solubles de MICA/B dans le sérum. Ces études ont montré que cette diffusion avait pour conséquence de saturer les récepteurs activateurs des cellules NK et/ou T et de prémunir les cellules leucémiques contre une réponse cytotoxique des cellules NK.

Cette hypothèse selon laquelle certaines cellules transformées seraient capables de déjouer la surveillance immunitaire par diffusion de formes solubles de MICA/B dans le sérum expliquerait en partie la survenue et le maintien de la maladie. La question du contrôle de l'expression de MICA/B est donc une question difficile dans la mesure où ces ligands jouent un rôle ambivalent selon qu'ils sont exprimés à la surface des cellules stressées ou diffusés dans le sérum. [100, 160, 161, 105]

## 19.7 Résumé

Les cellules NK jouent un rôle de première importance dans la surveillance immunitaire. Elles sont aussi susceptibles d'influencer la réponse aux thérapies dans la LMC, aussi bien dans un contexte de transfusion allogénique de cellules souches hématopoïétiques que de traitement par ITK.

Ruggeri *et al.* (2002) ont montré le rôle des récepteurs KIR dans le contexte de la transplantation, Marin *et al.* (2010), Kreutzman *et al.* (2012) et Nasa *et al.* (2013) dans celui d'une thérapie par inhibiteurs de tyrosine kinase.

Sconocchia *et al.* (2005) ont montré le rôle de la *reconnaissance du soi altéré* par les cellules NK en décrivant l'activation des récepteurs activateurs tel que NKG2D par MICA et MICB *in vitro*.

Malgré l'intérêt que suscite le rôle des cellules NK dans le traitement de la LMC, peu de données sont disponibles ni sur le rôle de polymorphismes associés à des mécanismes d'activation des cellules NK *via* NKG2D et ses ligands ni sur des inhibiteurs autres que ceux de la famille KIR dans la LMC en phase chronique traitée par imatinib. Cette étude a pour but de formuler des hypothèses à ce sujet.

## 20 Patients et Méthode

### 20.1 Patients

Cette étude est réalisée à l'aide des patients étudiés pour la partie pharmacocinétique (partie IV). Il s'agit des 105 patients de la cohorte Saint Louis et des 239 patients de la cohorte SPIRIT. Les caractéristiques de ces patients sont décrites plus haut (§ 17.1 table 10). Les considérations d'ordre éthique, les critères d'éligibilité/exclusion, l'évaluation de la réponse moléculaire, les critères de jugement, les covariables ainsi que la méthode de génotypage sont décrits plus haut (§16).

### 20.2 Méthode

Pour cette partie, l'association entre réponse moléculaire majeure et polymorphismes a été estimée à l'aide de l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure obtenue à partir de l'ensemble des patients. L'association a été testée sous un mode récessif à l'aide du modèle de Fine & Gray sur les 18 premiers mois de thérapie. La dose quotidienne a été utilisée comme variable d'ajustement. Les risques concurrents sont les arrêts de traitement pour toxicité, manque d'efficacité ou mort toutes causes.

Les marqueurs ont été sélectionnés sur la base de leur appartenance à la voie métabolique KEEG pathway<sup>13</sup> *Natural killer cell mediated cytotoxicity*.

Afin d'obtenir des résultats pertinents d'un point de vue clinique, seuls les marqueurs pouvant rassembler 10% des patients en mode récessif ont été analysés.

Seuls les marqueurs dont le FDR est inférieur à 5% ont été considérés pour la suite de l'analyse.

---

13. <http://www.genome.jp/kegg/>

## 21 Résultats

Les caractéristiques des patients, l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure, ainsi que les déterminants de la réponse moléculaire majeure ont été présentés au §17.

### 21.1 Marqueurs

Sur les 137 gènes de la voie NK, 67 possèdent au moins un marqueur présent sur la puce. L'ensemble des marqueurs appartenant à la voie NK et présents sur la puce est de 533. Parmi ces 533 marqueurs, 347 ont au moins 10% des patients homozygotes pour l'allèle mineur.

### 21.2 Polymorphismes de gènes de la voie NK associés à la réponse moléculaire

L'étude d'association montre que 20 marqueurs sont associés avec l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure avec un niveau de signification nominale inférieur à 5%. Parmi tous les marqueurs testés, 5 ont un  $FDR \leq 5\%$  et sont retenus pour analyses complémentaires. Les 10 premiers résultats sont donnés table 18.

	Chr.	Position	Gene	$P$	FDR
rs4415856	12	10600668	NKG2A	0,00002	0,0080
rs2734414	12	10598802	NKG2A	0,00007	0,0095
rs6916394	6	31464050	MICB	0,00011	0,0095
rs3828903	6	31464739	MICB	0,00011	0,0095
rs1478309	12	10541745	NKG2D	0,00054	0,0375
rs12824474	12	10602925	NKG2D	0,00340	0,1966
rs1549854	15	66696735	MAP2K1	0,01100	0,5453
rs12681965	8	22963602	TNFRSF10C	0,01700	0,6835
rs11135693	8	22925154	TNFRSF10B	0,01800	0,6835
rs975195	6	30477947	HLA-E	0,02000	0,6835

TABLE 18 – Marqueurs phénotypiques de la voie NK associés avec la réponse moléculaire majeure dans la LMC en phase chronique chez 344 patients au cours des 18 premiers mois de traitement.

Parmi les 5 marqueurs retenus, 3 sont situés sur le bras court du chromosome 12 dans le complexe NK. Ces marqueurs sont en relation avec les gènes NKG2A

et NKG2D. 2 sont situés dans le bras court du chromosome 6 dans le complexe majeur d'histocompatibilité entre les exons 1 et 2 du gène MICB. Les positions de ces marqueurs sont illustrées figures 21 et 22.

Les fréquences alléliques de ces 5 SNP sont données table 19 pour la population des patients ainsi que pour la population CEU (76 personnes non apparentées). L'équilibre de Hardy-Weinberg ainsi que le niveau de signification du test d'homogénéité des fréquences alléliques entre ces deux populations sont aussi donnés.

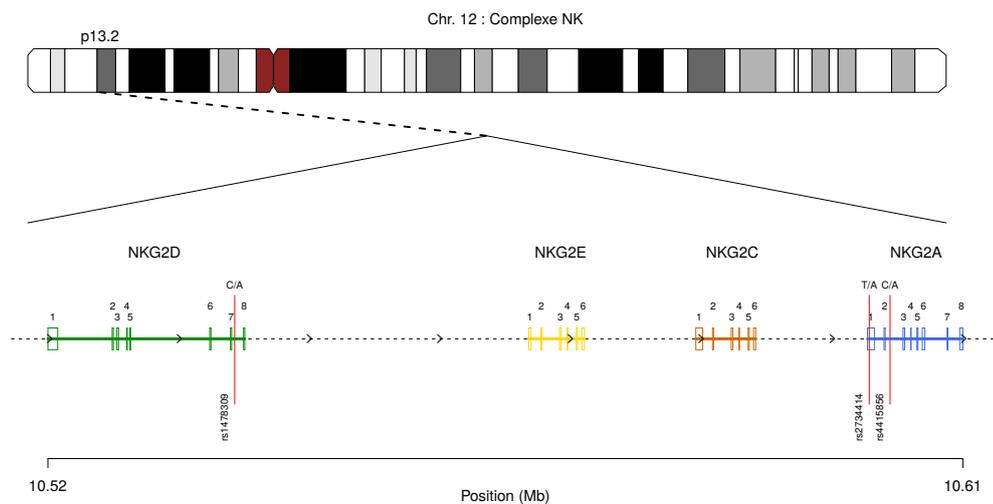


FIGURE 21 – Marqueurs associés à la réponse moléculaire majeure situés dans le complexe NK sur le bras court du chromosome 12. Le marqueur rs1478309 (C/A) se situe entre le 7<sup>e</sup> et le 8<sup>e</sup> exon de NKG2A. rs2734414 (T/A) et rs4415856 (C/A) sont situés dans la région 3' UTR et entre le 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> exon de NKG2A respectivement.

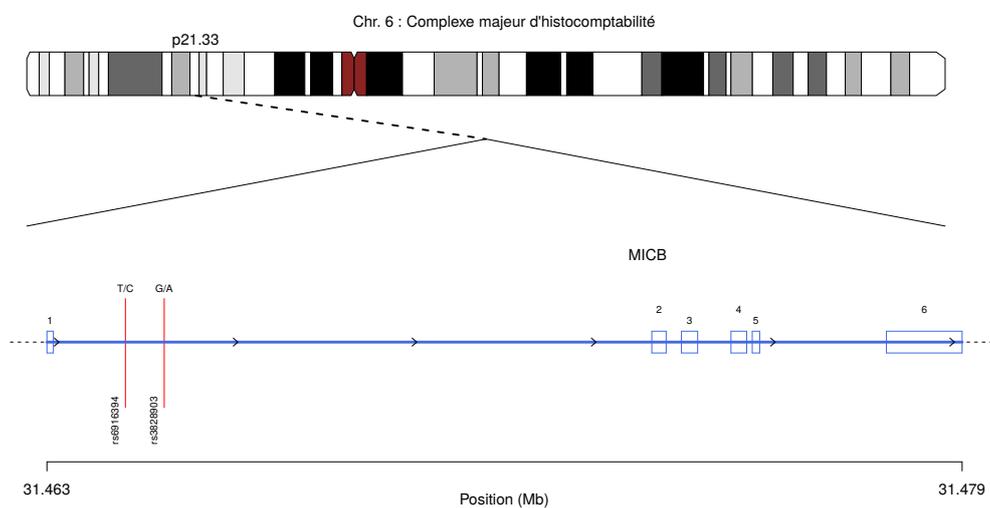


FIGURE 22 – Marqueurs associés à la réponse moléculaire majeure situés dans le complexe complexe majeur d'histocompatibilité sur le bras court du chromosome 6. Les marqueurs rs6916394 (T/C) et rs3828903 se situent entre le 1<sup>e</sup> et le 2<sup>e</sup> exon de MICB.

Marqueur	Gène	Chr.	Position	Allèles	Patients		CEU		$P^*$
					FAM <sup>†</sup>	EHW <sup>‡</sup>	FAM	EHW	
rs6916394	MICB	6	31464050	T/C	64,1	0,03	77,6	0,04	0,001
rs3828903	MICB	6	31464739	G/A	64,2	0,04	75,7	0,12	0,008
rs4415856	NKG2A	12	10541745	C/A	80,3	0,61	78,9	0,73	0,736
rs2734414	NKG2A	12	10598802	T/A	80,1	0,23	83,6	1,00	0,364
rs1478309	NKG2D	12	10600668	C/A	81,9	0,86	81,6	1,00	0,908

<sup>†</sup> Fréquence de l'allèle mineure; <sup>‡</sup> Equilibre de Hardy-Weinberg; \* Significativité du test d'homogénéité des fréquences alléliques entre les patients et la population CEU

TABLE 19 – Fréquences alléliques pour l'ensemble des patients ( $n = 344$ ) et pour 76 personnes non apparentées et a priori non atteint par la LMC issues de la population CEU génotypés dans le cadre du 1000 genomes project. La dernière colonne donne la significativité du test d'homogénéité des fréquences alléliques entre le groupe des patients et le groupe CEU.

## 21.3 Haplotypes associés à la réponse moléculaire majeure

### 21.3.1 Complexe NK

#### Calcul des fréquences haplotypiques

Les déséquilibres de liaison présents au voisinage des gènes NKG2D/NKG2A (table 20) ont permis de calculer les fréquences haplotypiques à l'aide des marqueurs *rs1478309* (C/A) pour NKG2D et *rs2734414* (T/A) et *rs4415856* (C/A) pour NKG2A.

	rs3828903	rs1478309	rs2734414	rs4415856
rs6916394	0,94	–	–	–
rs1478309	–	–	0,95	0,96
rs2734414	–	–	–	0,90

TABLE 20 – Déséquilibres de liaison au voisinage des gènes MICB, NKG2A et NKG2D.

Le calcul des fréquences haplotypiques montre que 2 haplotypes principaux sont présents : l'haplotype A-A-A qui possède l'allèle A aux positions *rs1478309*, *rs2734414* et *rs4415856*, a une fréquence de 18% et 111 patients (32%) en possèdent au moins une copie.

L'autre haplotype possède les bases C, T et C aux positions *rs1478309*, *rs2734414* et *rs4415856* respectivement. Sa fréquence est de 78,20%. Les 6 autres combinaisons représentent 3,80% des allèles observés dans cette région.

## Association de la RMM avec l'haplotype A-A-A

L'étude d'association entre incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure et haplotypes montre que les patients porteurs d'une copie de A-A-A sont meilleurs répondeurs que les autres : 65% (IC 95% : de 55% à 75%) *vs.* 49% (IC 95% : de 42% à 56%). La figure 23 illustre cette différence.

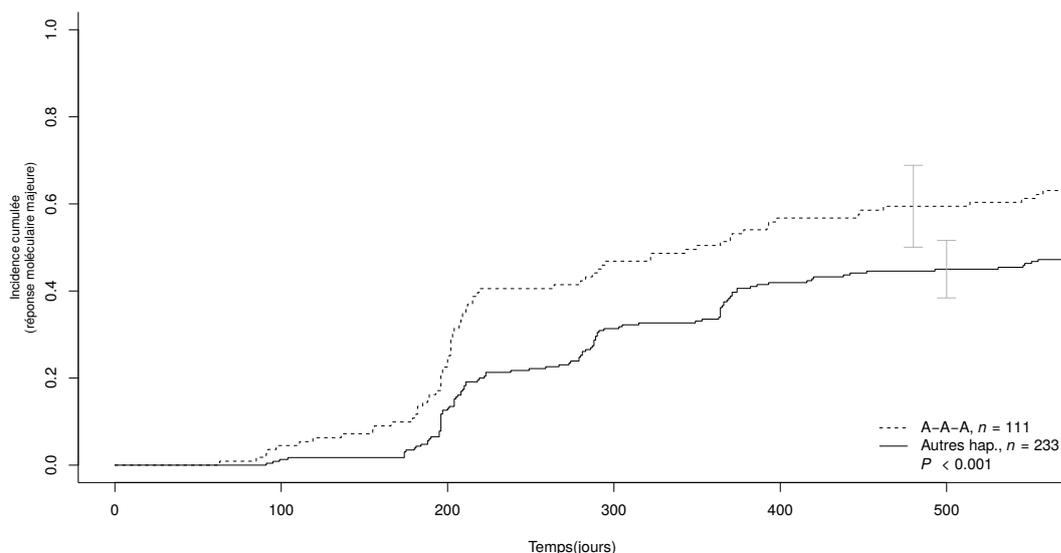


FIGURE 23 – Incidence cumulée de la RMM en fonction de l'haplotype A-A-A ( $n = 344$ ).

L'étude de l'association de A-A-A ajustée sur la dose journalière d'imatinib montre que le rapport des risques de sous-répartition pour la réponse moléculaire majeure est de 1,77 (IC 95% : de 1,32 à 2,39) en faveur des patients porteurs (table 21).

	Coefficient	Ecart type	Statistique de test (z)	$P$	Exp(coef.) [IC 95%]
Hap. A-A-A	0,57	0,15	3,85	$\leq 0,001$	1,77 [1,32 ; 2,39]
Dose : 600mg/j	0,60	0,55	3,92	$\leq 0,001$	1,82 [1,35 ; 2,46]

TABLE 21 – Analyse multivariée de l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure pour les porteurs d'au moins une copie l'haplotype A-A-A ajustée sur la dose quotidienne.

### 21.3.2 Locus MICB

#### Calcul des fréquences haplotypiques

Les déséquilibres de liaison présents au voisinage de MICB (table 20) ont permis de calculer les fréquences haplotypiques à l'aide des marqueurs associés

à MICB *rs6916394* (T/C) et *rs3828903* (G/A). 2 haplotypes principaux sont présents : l'haplotype C-A possède les allèles C et A aux positions *rs6916394* et *rs3828903* respectivement. Il a une fréquence de 36% et 195 patients (57%) en possèdent au moins une copie. L'haplotype T-G possède les allèles T et G aux positions *rs6916394* et *rs3828903* respectivement. Il a une fréquence de 64% et 149 patients (43%) sont homozygotes pour cet haplotype.

Le calcul des fréquences haplotypiques calculées chez les patients et chez la population CEU, fourni les mêmes conclusions : la proportion d'homozygotes pour l'haplotype T-G est significativement plus importante dans la population CEU que chez les patients (61 *vs.* 43%,  $P = 0,008$ ).

Par ailleurs, l'association entre haplotype et LMC montre qu'une personne non homozygote pour l'haplotype T-G à deux fois plus de chance de développer la maladie (OR = 2,00, IC 95% : de 1,17 à 3,46,  $P = 0,008$ ).

### Association de la RMM avec l'haplotype T-G

L'étude d'association entre incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure et haplotypes montre que les patients homozygotes pour T-G sont meilleurs répondeurs que les autres : 64% (IC 95% : de 56% à 72%) *vs.* 47% (IC 95% : de 39% à 55%) (figure 24).

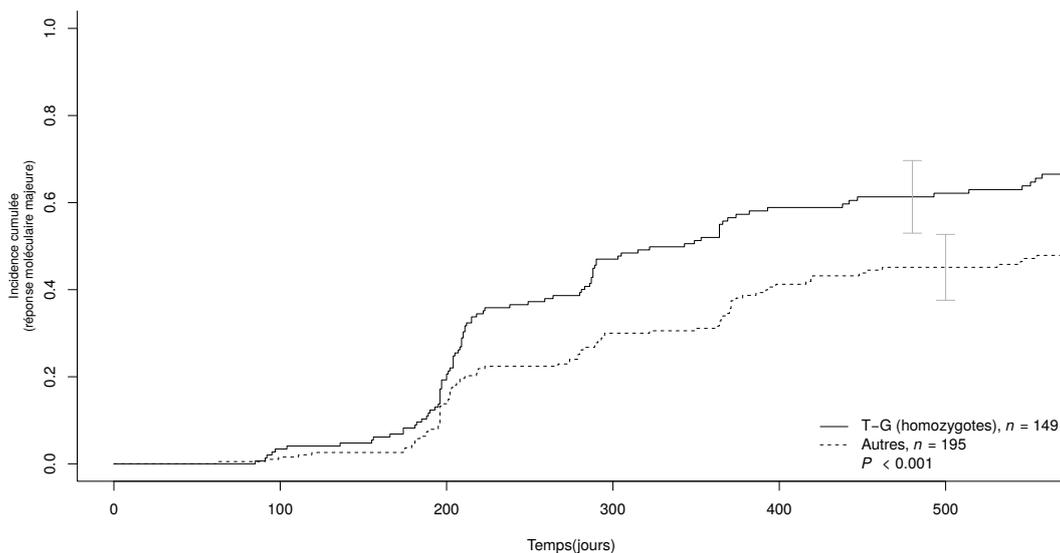


FIGURE 24 – Incidence cumulée de la RMM en fonction de l'haplotype T-G ( $n = 344$ ).

L'étude de l'association entre réponse moléculaire majeure et l'haplotype T-G ajustée sur la dose de traitement montre que le rapport des risques de sous-répartition pour la réponse moléculaire majeure est de 1,72 (IC 95% : de 1,29 à 2,29) en faveur des patients porteurs (table 22).

	Coefficient	Ecart type	Statistique de test (z)	P	Exp(coef.) [IC 95%]
Hap. T-G	0,54	0,15	3,69	$\leq 0,001$	1,72 [1,29 ; 2,29]
Dose : 600mg/j	0,51	0,16	3,26	$= 0,001$	1,66 [1,22 ; 2,26]

TABLE 22 – Analyse multivariée de l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure pour les porteurs T-G homozygotes ajustée sur la dose quotidienne.

## 21.4 Analyse multivariée

Deux modèles multivariés ont été réalisés : le premier (modèle 1) estime l'association entre réponse moléculaire majeure et haplotypes relatifs aux gènes NKG2A/NKG2D et MICB et la dose journalière. Ce modèle inclu tous les patients ( $n=344$ ). Le second reprend les variables du modèle 1 plus l'indicateur du risque de Sokal élevé ( $n=312$ ). Les résultats sont présentés table 23.

	Coefficient	Ecart type	Statistique de test (z)	P	Exp(coef.) [IC 95%]
Modèle 1 ( $n=344$ )					
NKG2A- NKG2D : Hap. A-A-A	0,64	0,15	4,21	$\leq 0,001$	1,89 [1,40 ; 2,54]
MICB : Hap. T-G	0,55	0,15	3,75	$\leq 0,001$	1,74 [1,30 ; 2,32]
Dose : 600mg/j	0,61	0,15	3,97	$\leq 0,001$	1,84 [1,36 ; 2,49]
Modèle 2 ( $n = 312$ )					
NKG2A- NKG2D : Hap. A-A-A	0,61	0,16	3,91	$\leq 0,001$	1,84 [1,35 ; 2,49]
MICB : Hap. T-G	0,47	0,15	3,13	0,002	1,61 [1,19 ; 2,16]
Dose : 600mg/j	0,49	0,16	3,12	0,002	1,62 [1,20 ; 2,20]
Sokal élevé	-0,58	0,21	-2,71	0,007	0,56 [0,37 ; 0,85]

TABLE 23 – Analyse multivariée des déterminants de la réponse moléculaire majeure. Le modèle 1 comprend l'haplotype A-A-A associé aux gènes NKG2A/NKG2D en mode dominant, l'haplotype associé au gène MICB en mode récessif et la dose journalière. Tous les patients sont présents pour cette analyse ( $n = 344$ ). Le modèle 2 comprend en plus des variables du modèle 1, l'indicateur du risque de Sokal élevé. L'analyse est restreinte aux patients annotés pour le risque de Sokal ( $n = 312$ ).

## 22 Discussion

### 22.1 Résumé

Dans cette partie relative aux polymorphismes de gènes de la voie NK associés à la réponse moléculaire majeure (RMM) dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) en phase chronique traitée par imatinib, 2 haplotypes ont été identifiés.

Le premier (A-A-A) se situe au sein du complexe NK dans le bras court du chromosome 12 (figure 21), et le second (T-G) se situe au sein du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) dans le bras court du chromosome 6 (figure 22).

L'haplotype A-A-A caractérise un groupe de patients obtenant une meilleure incidence cumulée de réponse moléculaire majeure (figure 23). Etant situé au sein du complexe NK, dans une région comprenant les gènes NKG2D, NKG2E, NKG2C et NKG2A, l'ensemble de ces gènes, ou n'importe quelle combinaison de ces gènes est susceptible d'être impliqué.

Cependant, *rs2734414* étant situé dans la partie 3'UTR de NKG2A, il est possible que cette variation soit à l'origine d'une modulation post-transcriptionnelle de l'expression de NKG2A, c'est-à-dire qu'il s'agit d'un eQTL. Cette possibilité n'empêchant pas que d'autres polymorphismes non identifiés ici, et en déséquilibre avec l'haplotype A-A-A, d'être à l'origine d'une modulation prè- ou post-transcriptionnelle d'un des gènes impliqué dans cette région (point 2 du §3.3 [162]).

Les porteurs homozygotes de l'haplotype T-G associé au gène MICB, ont une incidence cumulée de réponse moléculaire majeure significativement supérieure aux autres patients (figure 24). Il est intéressant de mettre en relation meilleure réponse moléculaire et effet protecteur que confère le statut homozygote de cet haplotype.

### 22.2 Conclusion

Les résultats obtenus dans cette partie suggèrent que des haplotypes liés à plusieurs gènes de la voie NK influencent la réponse moléculaire dans la LMC en phase chronique traitée par imatinib. L'analyse multivariée de ces haplotypes montre que les effets identifiés ne sont confondus ni entre eux, ni avec les autres déterminants de la réponse moléculaire majeure (score de risque de Sokal et dose journalière), les rapports de risques de sous-répartition ainsi que les niveaux de signification étant conservés dans l'analyse multivariée (§21.4).

Ces résultats soulignent le rôle joué par les cellules NK et/ou autres lymphocytes cytotoxiques dans la réponse à l'imatinib dans la LMC. Ils sont aussi en

accord avec l'hypothèse d'une surveillance immunitaire non spécifique, [163, 164] laquelle serait vraisemblablement déjouée chez une population atteinte, mais aussi potentiellement restaurée à l'aide d'une thérapie par inhibiteurs de tyrosine kinase.

L'haplotype identifié dans le complexe NK implique 4 gènes codant pour l'inhibiteur NKG2A et les activateurs NKG2C/E/D. L'autre gène impliqué est MICB. De même que MICA, MICB est une molécule du CMH de classe I et il est un ligand de NKG2D, connu pour être exprimé à la surface de cellules transformées, notamment les cellules souches CD34<sup>+</sup>-Ph<sup>+</sup> (cellules souche leucémiques à l'origine de la LMC). [160, 159, 100] deux remarques peuvent être formulées à ce sujet :

- parmi les ligands connus de NKG2A (principalement MICA et MICB), seul MICB semble être impliqué de manière significative dans cette étude, c'est-à-dire que des polymorphismes liés à MICA ne semblent pas influencer la réponse moléculaire à l'imatinib dans la LMC ;
- si un haplotype de MICB est impliqué dans la réponse moléculaire à l'imatinib, étant donné le rôle ambivalent joué par ce ligand sur l'activation des cellules NK, il est difficile de déterminer dans quelle mesure cette molécule exerce une influence sur la réponse ;
- si MICB joue un rôle dans un défaut de surveillance immunitaire, par diffusion de formes solubles de MICB par exemple, il est probable que ce gène joue aussi un rôle dans la résistance au traitement. Les résultats de notre étude vont dans le sens de cette hypothèse : les porteurs de l'haplotype T-G ont un risque deux fois moindre de développer la maladie ( $P = 0,008$ ). Ils ont aussi un risque de sous-répartition lié à une réponse moléculaire majeure dans les 18 premiers mois de traitement de l'ordre de 1,61 ( $P = 0,002$ ) par rapport aux autres patients.

Par ailleurs, bien que l'implication du couple NKG2D/MICB dans la réponse à l'imatinib dans la LMC en phase chronique soit un résultat très attrayant de cette étude, elle n'exclut pas la possibilité que les 2 autres activateurs compris physiquement dans l'haplotype A-A-A soient aussi impliqués, mais aussi NKG2A.

NKG2A est un récepteur inhibiteur des cellules NK et son rôle semble particulièrement important. En effet, les signaux d'inhibition des cellules NK sont transduits par certains récepteurs KIR et NKG2A. Or l'expression des récepteurs KIR à la surface des cellules NK est régulée par un processus aléatoire de sorte qu'en moyenne on ne dénombre que de 3 à 5 inhibiteurs KIR par cellule seulement, une sous-population de cellules NK n'en possédant aucun. Il en résulte que la fonction inhibitrice qui incombe au récepteur NKG2A est variable et dépend du nombre de récepteurs inhibiteurs KIR également présent. Dans les cas extrêmes, seul NKG2A supporte la fonction d'inhibition des cellules NK. [165, 166]

Cette caractéristique confère à ce récepteur un rôle de premier plan dans le processus de non reconnaissance du soi. [167] Dans un contexte où certaines cellules ont pu échapper à la surveillance immunitaire par un défaut d'activation des cellules NK (possiblement par l'expression de formes solubles de MICA/B), NKG2A est susceptible de jouer un rôle de premier ordre dans le cadre d'une thérapie par inhibiteur de tyrosine kinase.

Les résultats de cette étude suggèrent que l'hypothèse d'un défaut de surveillance immunitaire et/ou de sa restauration induite par inhibiteurs de tyrosine kinase dans le traitement de la LMC en phase chronique, pourrait être modulée par des facteurs propres aux patients, tels que des haplotypes relatifs aux gènes codant les récepteurs/ligands des cellules NK, notamment le récepteur activateur NKG2A et son ligand MICB, mais aussi le récepteur inhibiteur KNG2A.

Une étude sur des patients appartenant au bras imatinib + interféron du protocole SPIRIT permettra de déterminer si les effets observés avec l'imatinib seul sont modifiés par l'adjonction de l'interféron.



---

## Sixième partie

# Imputation multiple & données censurées par intervalles

## Sommaire

---

<b>23</b>	<b>Introduction</b>	<b>130</b>
23.1	Contexte . . . . .	130
23.2	Imputation multiple . . . . .	131
23.3	Algorithmes d'augmentation de données . . . . .	134
23.3.1	<i>Poor Man's Data Augmentation</i> . . . . .	134
23.3.2	<i>Asymptotic Normal Data Augmentation</i> . . . . .	135
<b>24</b>	<b>Augmentation des données censurées par intervalles</b>	<b>136</b>
24.1	<i>Poor man's Data Augmentation</i> pour la fonction d'incidence cumulée	136
24.1.1	Initialisation de l'algorithme . . . . .	137
24.1.2	1 <sup>er</sup> pas . . . . .	137
24.1.3	Généralisation . . . . .	138
24.1.4	Application . . . . .	138
<b>25</b>	<b>Augmentation des données censurées par intervalles pour l'esti- mation d'un coefficient de régression – Méthode de Pan</b>	<b>138</b>
25.1	<i>Poor Man's Data Augmentation</i> pour le modèle de Cox . . . . .	139
25.2	<i>Asymptotic Normal Data Augmentation</i> pour le modèle de Cox . . . . .	141
25.3	Interprétation . . . . .	142
<b>26</b>	<b>Extension au modèle de Fine et Gray</b>	<b>142</b>
26.1	<i>Poor Man's Data Augmentation</i> pour le modèle de Fine et Gray . . . . .	143
26.2	<i>Asymptotic Normal Data Augmentation</i> pour le modèle de Fine et Gray	145
26.3	Simulations . . . . .	145
26.4	Application . . . . .	150
<b>27</b>	<b>Conclusion</b>	<b>152</b>

---

## 23 Introduction

### 23.1 Contexte

Dans la LMC, le suivi des patients implique le dosage par RTQ-PCR du transcrit de fusion BCR-ABL dans un échantillon sanguin à intervalles réguliers. [56] Dans les études présentées aux parties IV et V, le critère de jugement est la réponse moléculaire majeure (RMM), c'est-à-dire une chute de 3 log du taux de transcrit BCR-ABL par rapport à la valeur théorique de 100% au diagnostique.

Afin de déterminer si un patient a obtenu une réponse moléculaire majeure, un examen est réalisé tous les 3 mois. Lorsque le test devient positif pour la première fois, on en déduit que la réponse d'intérêt a été obtenue dans l'intervalle couvrant la période depuis l'examen précédent. On a donc :

$$T_j \in ]L_j, R_j], j = 1 \dots n,$$

où  $T_j$  est le temps – non observé – où la réponse d'intérêt a eu lieu pour le patient  $j$ ,  $L_j$  est la date du dernier examen négatif et  $R_j$  est la date du premier examen positif. La figure 25 illustre les intervalles obtenus avec les données LMC.

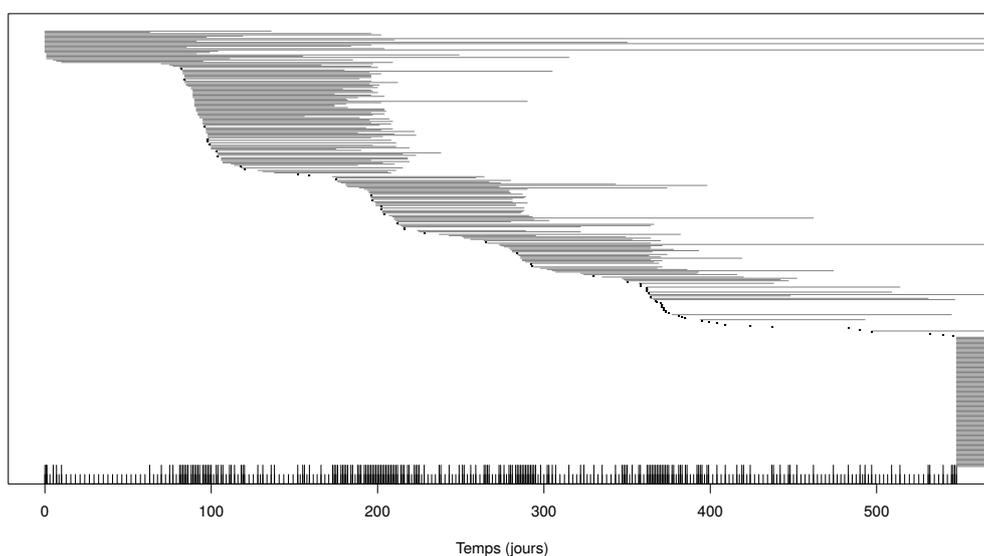


FIGURE 25 – Données brutes LMC : chaque patient est représenté par une ligne ou un point : si un patient a obtenu une réponse moléculaire majeure, il est représenté par un segment symbolisant l'intervalle de temps à l'intérieur duquel la réponse a été obtenue. Si un patient a expérimenté un évènement concurrent, il est symbolisé par un point au temps où l'évènement a été observé (à partir de la date de diagnostique). Les patients censurés à droite sont représentés par une demi-droite à droite dont le point de départ correspond au temps entre la date du diagnostique et la date du dernier examen négatif.

Dans les parties IV et V, la date de la réponse moléculaire majeure a été

obtenue en choisissant la date du premier examen positif, c'est-à-dire, la borne supérieure de l'intervalle  $]L_i, R_i]$ . Sur la base de ce parti pris, les estimations des incidences cumulées, et des coefficients de régression ainsi que leurs variances ont été obtenus. Cette méthode, consistant à choisir pour date de l'évènement d'intérêt la borne supérieure de l'intervalle dans lequel l'évènement a eu lieu est appelée *imputation simple*.

Différents auteurs recommandent de ne pas utiliser cette méthode susceptible, selon eux, de fournir une estimation biaisée des coefficients de régression et de sous-estimer la variabilité des données. [168, 169, 170]

Le problème posé ici est l'analyse des données censurées par intervalles en présence de compétition (*interval censored competing risks data*) [171]. Cette partie propose une extension de la méthode de Pan (2000) [172] pour l'analyse des données censurées par intervalles avec le modèle de Cox, au contexte où les données sont censurées par intervalles en présence de compétition. Brièvement, il s'agit d'une méthode itérative où à chaque pas, les données censurées par intervalles sont transformées en jeux de données potentiellement censurées à droite (imputation multiple). Il devient donc possible d'utiliser sur les jeux de données imputés les méthodes disponibles pour l'analyse des données censurées à droite, et d'en déduire une série d'estimations sachant les données imputées (estimations postérieures). Il convient ensuite à chaque pas d'assembler les résultats obtenus selon les règles de l'imputation multiple afin d'obtenir une estimation mise-à-jour des quantités d'intérêts et de celles nécessaires à l'initiation d'une nouvelle itération.

Cette section se propose d'aborder le contexte méthodologique de la méthode de Pan, c'est-à-dire, la notions d'imputation multiple appliquées au données censurées par intervalles.

## 23.2 Imputation multiple

L'imputation multiple est une méthode générale proposée par Rubin (1987) [173] dans le but d'appréhender le problème des données manquantes ou incomplètes rencontrées dans la plupart des études biomédicales. Cette démarche présente un intérêt dans la mesure où une méthode simple permettant d'étudier les données imputées (ou augmentées) est disponible.

L'imputation multiple est une alternative à l'imputation simple des données, consistant à remplacer une donnée manquante par une estimation plausible. Bien que l'imputation simple est susceptible de fournir une estimation du coefficient

de régression non biaisée,<sup>14</sup> l'estimation de la variance associée est susceptible de sous-estimer le paramètre dans la mesure où cette méthode ne prend pas en compte l'incertitude due aux données manquantes.

En revanche, l'imputation multiple des données est susceptible de fournir, sous certaines conditions, une estimation non biaisée d'un estimateur et de sa variance. L'idée simple de l'imputation multiple est d'utiliser la distribution des données observées et d'en déduire une série de valeurs probables pour les données manquantes. Les jeux de données ainsi reconstitués sont ensuite analysés séparément selon une procédure identique afin d'en déduire une série d'estimations des paramètres. Les estimations sont enfin combinées afin d'en déduire une estimation finale du paramètre d'intérêt et de sa variabilité. Cette méthode produit des estimations asymptotiquement sans biais avec une variance *correctement* estimée.<sup>15</sup>[174]

Tanner et Wong (1987) [175] ont présenté l'idée générale de cette approche dans un contexte bayésien : les données observées,  $y$ , sont augmentées par une quantité  $z$ , nommée données latentes. Si  $y$  et  $z$  sont connues, il est sous entendu que l'analyse de  $x = (y, z)$  (*i.e.* données augmentées) ne pose pas de difficultés. En d'autres termes, la densité à *posteriori*  $p(\theta|y, z)$ , où  $\theta$  est le paramètre d'intérêt, peut être calculée. Or, la quantité recherchée est la densité à *posteriori*  $p(\theta|y)$  et cette densité n'est pas accessible en raison de la présence d'observations incomplètes dans  $y$ . La définition d'une méthode permettant de générer  $z$  est donc un point important de la démarche.

Si par ailleurs, il est possible de générer plusieurs estimations de  $z$  à l'aide de  $p(z|y)$  c'est-à-dire, de procéder à une imputation multiple de  $z$  sachant les données observées  $y$ , alors  $p(\theta|y)$  peut être approximée par la moyenne de  $p(\theta|y, z)$  sur les différentes estimations de  $z$  :

$$p(\theta|y) = \int_Z p(\theta|z, y)p(z|y)dz. \quad (38)$$

Cependant,  $p(z|y)$  dépend à son tour de  $p(\theta|y)$ . Donc si  $p(\theta|y)$  est estimée, elle peut être utilisée pour calculer  $p(z|y)$ . Cette dépendance mutuelle peut être exploitée à l'aide d'un algorithme itératif permettant d'estimer  $p(\theta|y)$ .

Dans le cadre générales des règles de l'imputations multiples défini par Rubin [173], Wei et Tanner (1991) ont proposé deux algorithmes qu'ils nomment *augmentation de données* : les algorithmes *Poor Man's Data Augmentation* (PMDA) et *Asymptotic Normal Data Augmentation* (ANDA).

14. Si les données sont manquantes aléatoirement (*missing at random*)

15. Lorsque le paramètre est estimé à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance, l'imputation multiple fournit une variance asymptotiquement sans biais. [173]

A chaque pas, les trois moments de la méthode sont les suivants :

1. génération de  $m$  jeux de données :  $z_{(n)}$ ,  $n = 1 \dots m$ . Les données manquantes sont remplacées par une série de  $m$  valeurs estimées indépendamment à l'aide  $p(z|y)$ , distribution prédictive des données ;
2. analyse des jeux de données imputés : les jeux de données sont analysés séparément et les quantités d'intérêt (coefficients de régression par exemple) sont calculées ainsi que leur matrice de variance-covariance. Les résultats de ces  $m$  analyses indépendantes sont différents parce que les  $m$  jeux de données imputés sont différents ;
3. assemblage des estimations obtenues à l'étape 2 : les  $m$  estimations du coefficient sont combinées afin d'obtenir une estimation finale, et les  $m$  estimations de la matrice de variance-covariance associée sont aussi assemblées selon les règles de Rubin : [173] la matrice de variance-covariance finale inclue à la fois la variabilité observée au sein d'un jeux de données (variabilité intra-imputation) et la variabilité observée entre les différents jeux de données imputés (variabilité inter-imputation).

On obtient  $\hat{\theta}$ , une estimation *a posteriori* de  $p(\theta|y)$  par un mélange des densités conditionnelles :

$$\hat{\theta} = \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m p(\theta|z, y), \quad (39)$$

où  $p(\theta|z, y) = \hat{\theta}_n$  est l'estimation du coefficient obtenue à l'aide du  $n^e$  jeux imputé.

$\hat{\Sigma}^2$ , la matrice de variance-covariance associée à  $\hat{\theta}$  est constituée de la variance intra-imputation ( $\hat{W}^2$ ) :

$$\hat{W}^2 = \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m \hat{W}^2_{(n)}, \quad (40)$$

où  $\hat{W}^2_{(n)}$  est la matrice de variance-covariance associée à  $\hat{\theta}_{(n)}$ , et de la variance inter-imputation ( $\hat{B}^2$ ) :

$$\hat{B}^2 = \frac{1}{m-1} \sum_{n=1}^m (\hat{\theta}_n - \hat{\theta})^2. \quad (41)$$

Finalement, l'estimation de la variance de  $\hat{\theta}$  est une combinaison de  $\hat{W}$  et de  $\hat{B}$ , c'est-à-dire :

$$\hat{\Sigma}^2 = \hat{W}^2 + \left(1 + \frac{1}{m}\right) \hat{B}^2. \quad (42)$$

Cette expression fait apparaître  $\frac{1}{m}$ , appelé *facteur d'inflation*. Ce facteur, qui devient négligeable lorsque  $m$  est grand, permet de tenir compte du

nombre fini d'imputations. [173]

Contrairement au cas de l'imputation simple, la variance calculée à l'aide des règles de Rubin pour l'imputation multiple possède une composante inter-imputation ce qui permet de rendre une image plus réaliste de la variabilité des données en présence de données manquantes.

### 23.3 Algorithmes d'augmentation de données

L'augmentation des données est un algorithme itératif d'imputation multiple qui peut être présentée de la manière suivante :

supposons que  $g_i(\theta)$  est l'approximation de  $p(\theta|y)$  à la  $i^{\text{ième}}$  itération :

- (a) obtenir  $m$  estimations de  $z$ , données latentes, à l'aide de la distribution prédictive  $p(z|y) : z_{(1)} \dots z_{(m)}$  ;
- (b) mettre à jour l'approximation de  $p(\theta|y)$  en temps que mélange des distributions postérieures de  $\theta$  sachant les données augmentées obtenues en (a), c'est-à-dire :

$$g^{(i+1)}(\theta) = \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m p(\theta|z_{(n)}, y). \quad (43)$$

Pour le pas (a), Tanner et Wong (1987) ont proposé :

- (a1) obtenir  $\theta^*$  de  $g^{(i+1)}(\theta)$  ;
- (a2) obtenir  $z$  de  $p(z|\theta^*, y)$ , où  $\theta^*$  a été généré en (a1).

On reconnaît dans (a1) et (a2) la méthode d'imputation multiple de Rubin (1987). Deux versions de cet algorithme ont été proposées par Wei et Tanner (1991).

#### 23.3.1 *Poor Man's Data Augmentation*

Dans la version générale de l'algorithme, l'imputation multiple des données latentes ( $z$ ) est obtenue à l'aide de  $p(z|y)$ . Dans la version *Poor Man's*,  $z$  est obtenue à l'aide de  $p(z|y, \hat{\theta}^{(i)})$ , où  $\hat{\theta}^{(i)}$  est l'approximation courante de  $\theta$ . La version *Poor Man's* de l'algorithme d'augmentation de données est :

- (a) générer  $m$  échantillons  $z_{(1)} \dots z_{(m)}$  à l'aide de la distribution conditionnelle  $p(z|y, \hat{\theta}^{(i)})$  ;

(b) mettre à jour l'estimation courante de  $p(\theta|y)$  :

$$g^{(i+1)}(\theta) = \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m p(\theta|z_{(n)}, y). \quad (44)$$

L'estimation  $\hat{\theta}^{(i+1)}$  est alors obtenue en maximisant  $g^{(i+1)}(\theta)$ .

### 23.3.2 Asymptotic Normal Data Augmentation

Wei et Tanner (1991) [176] notent que si la taille de l'échantillon est suffisante, il devrait être possible d'approximer la distribution à *posteriori* augmentée de  $\theta$  par un mélange de lois Normales. L'algorithme d'augmentation de données devient :

- (a) générer  $m$  échantillons  $z_{(1)} \dots z_{(m)}$  à l'aide de la distribution  $p(z|y)$  ;  
 (b) mettre à jour l'estimation courante de  $p(\theta|y)$  par un mélange de distributions normales dont les paramètres sont obtenus en (a) à l'aide des données augmentées  $z_{(1)} \dots z_{(m)}$  :

$$g^{(i+1)}(\theta) = \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m N(\hat{\theta}_{(n)}^{(i)}, \hat{\Sigma}_{(n)}^{(i)}), \quad (45)$$

où  $\hat{\theta}_{(n)}^{(i)}$  est l'estimation de  $\theta$  pour le  $n^e$  jeux augmenté et  $\hat{\Sigma}_{(n)}^{(i)}$  est la matrice de variance-covariance associées.

**Remarque 4** Dans le premier pas, l'approximation conditionnelle  $p(z|y, \theta^{(i)})$  de la version Poor Man's est remplacée par  $p(z|y)$ . En d'autres termes, pour la version Poor Man's de l'algorithme,  $\theta$  est approximé une seule fois pour chaque itération. Dans la version Asymptotic Normal  $g^{(i)}(\theta)$  est approximé par une loi normale et peut être obtenue par tirage dans cette loi pour  $n = 1 \dots m$ . Wei et Tanner donnent la justification suivante pour le nom de la version Poor Man's : Elle est utilisée par ceux qui n'ont pas les moyens d'échantillonner dans  $p(z|y)$ . [177]

Afin de générer les données latentes à partir de  $p(z|y)$ , on utilise les étapes (a1) et (a2) du § 23.3 :

- la moyenne de  $g^{(i+1)}(\theta)$  est :  $\hat{\theta}^{(i+1)} = \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m \hat{\theta}_{(n)}^{(i)}$  ;
- la variance est :

$$\hat{\Sigma}^{(i+1)} = \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m \hat{\Sigma}_{(n)}^{(i)} + \left(1 + \frac{1}{m}\right) \frac{\sum_{n=1}^m \left(\hat{\theta}_{(n)}^{(i)} - \hat{\theta}^{(i+1)}\right) \left(\hat{\theta}_{(n)}^{(i)} - \hat{\theta}^{(i+1)}\right)^T}{m-1}. \quad (46)$$

Le premier terme de (46) est la variance intra-imputation et le second est la variance inter-imputations.

## 24 Augmentation des données censurées par intervalles

Peto [178] puis Turnbull [179] ont été les premiers auteurs à définir puis étudier les données censurées par intervalles. En 1973, Peto propose un estimateur non paramétrique du maximum de vraisemblance pour la fonction de survie des données censurées par intervalles. Turnbull en 1976 propose une généralisation de cet estimateur pour les données censurées par intervalles mais aussi tronquées à gauche. En 1986, Finkelstein [180] a proposé une méthode permettant d'appliquer un modèle de survie à risque proportionnels aux données censurées par intervalles. Plus récemment, Hudgens, Li et Fine (2014) [171] ont considéré une estimation paramétrique de la fonction d'incidence cumulée pour les données censurées par intervalles.

Pour l'estimation d'un coefficient de régression avec le modèle de Cox, Pan (2000) [172] a proposé une approche originale basée sur l'augmentation des données : les données censurées par intervalles pouvant être considérées comme des données manquantes, l'imputation multiple, une méthode permettant de prendre en compte les données manquantes, peut être utilisée pour étudier les données censurées par intervalles. L'un des avantages de cette approche est qu'il est simple à mettre en œuvre à l'aide des méthodes et des logiciels disponibles pour les données censurées à droite.

La suite de cette partie est destinée à montrer comment l'imputation multiple et l'augmentation des données peut être appliquée aux données à risques concurrents censurés par intervalles pour l'estimation de l'incidence cumulée d'un événement d'intérêt et pour l'estimation d'un coefficient de régression dans le cadre de la méthodologie de Fine et Gray. [133]

### 24.1 *Poor man's Data Augmentation* pour la fonction d'incidence cumulée

Ici, le but est d'utiliser l'algorithme PMDA afin de représenter l'incidence cumulée d'un événement d'intérêt censuré par intervalles en présence de risque concurrents. La méthode proposée est la suivante :

### 24.1.1 Initialisation de l'algorithme

A partir des données censurées par intervalles, on génère  $m$  jeux de données  $\{T_{(n)}, \kappa, \delta\}$ ,  $n = 1 \dots m$ , où  $T_{(n)}$  est un vecteur de temps,  $\kappa$  est le vecteur des causes de défaillance et  $\delta$  le vecteur indicateur de censure. La méthode est la suivante :

Pour l'imputation  $n$  ( $n = 1 \dots m$ ), pour chaque patient, c'est-à-dire, pour  $j = 1 \dots l$ ,

- si  $R_j = \infty$ , on pose  $T_j = L_j$  et  $\delta = 0$ ;
- sinon, on tire  $X_j$  dans la loi uniforme  $U[L_j, R_j]$ , on pose  $T_j = X_j$  et  $\delta_j = 1$ .

On obtient  $T_{(n)} = T_j$ ,  $j = 1 \dots l$ .

Avec  $\{T_{(n)}, \kappa, \delta\}$ ,  $n = 1 \dots m$ , on calcule les estimations  $\hat{I}_{k,(n)}^0$  en utilisant (22). L'estimation ponctuelle de l'incidence cumulée par imputation multiple est obtenue en utilisant (39) :

$$\hat{I}_k^0 = \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m \hat{I}_{k,(n)}^0. \quad (47)$$

### 24.1.2 1<sup>er</sup> pas

Au premier pas, à partir des données censurées par intervalles, on impute  $m$  jeux de données  $\{T_{(n)}, \kappa, \delta\}$ ,  $n = 1 \dots m$  de la manière suivante :

- (a) si  $R_j = \infty$ , on pose  $T_j = L_j$  et  $\delta = 0$ ;
- (b) sinon, on tire  $X_j$  dans  $\hat{I}_k^0$  sachant  $L_j < X_j \leq R_j$ , on pose  $T_j = X_j$  et  $\delta_j = 1$ .

On obtient alors  $T_{(n)} = T_j$ ,  $j = 1 \dots l$ .

**Remarque 5** Pour le point (b),  $\hat{I}_k^0$  étant discrète, on obtient  $\{t_{(j,1)} < \dots < t_{(j,q_j)}\}$  de sorte que  $L_j < t_{(j,1)} < \dots < t_{(j,q_j)} = R_j$ . On tire ensuite dans  $\{t_{(j,1)} < \dots < t_{(j,q_j)}\}$  avec des probabilités proportionnelles au risque instantané de sous-répartition obtenus à l'aide de  $\hat{I}_k^0$ .

Avec  $\{T_{(n)}, \kappa, \delta\}$ ,  $n = 1 \dots m$ , on calcule  $m$  estimations  $\hat{I}_{k,(n)}^1$ ,  $n = 1 \dots m$  en utilisant (22). L'estimation ponctuelle de l'incidence cumulée est obtenue en utilisant (39) :

$$\hat{I}_k^1 = \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m \hat{I}_{k,(n)}^1. \quad (48)$$

### 24.1.3 Généralisation

Plus généralement, au pas  $i + 1$ , les étapes sont les suivantes :

pour  $n = 1 \dots m$ ,

(a) imputation :

pour  $j = 1 \dots l$  :

(1) si  $R_j = \infty$ , on pose  $T_j = L_j$  et  $\delta = 0$ ,

(2) sinon, on tire  $X_j$  dans  $\hat{I}_k^i$  sachant  $L_j < X_j \leq R_j$ , on pose  $T_j = X_j$  et  $\delta_j = 1$  ;

(b) estimation :

avec  $\{T_{(n)}, \kappa, \delta\}$  on calcule l'estimation  $\hat{I}_{k,(n)}^i$ , en utilisant (22).

L'estimation ponctuelle *a posteriori* de l'incidence cumulée est obtenue en utilisant (39) :

$$\hat{I}_k^{i+1} = \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m \hat{I}_{k,(n)}^i. \quad (49)$$

### 24.1.4 Application

Avec 30 itération et  $m = 15$  à chaque itération, on obtient une estimation de l'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure. Cette estimation est illustrée par la figure 26.

## 25 Augmentation des données censurées par intervalles pour l'estimation d'un coefficient de régression – Méthode de Pan

Pan dans *A Multiple Imputation Approach to Cox Regression with Interval Censored Data* [172] a proposé une méthode semi-paramétrique générale basée sur l'imputation multiple afin d'analyser des données censurées par intervalles à l'aide d'un modèle de Cox.

L'idée de Pan est de considérer les données censurées par intervalles comme des données manquantes. [181] La méthode consiste alors à imputer des temps de défaillance exacts à partir des données censurées par intervalles tout en conservant les observations censurées à droite. Les méthodes standards d'analyse des données censurées à droite sont alors utilisées pour estimer les paramètres de régression à partir des données imputées.

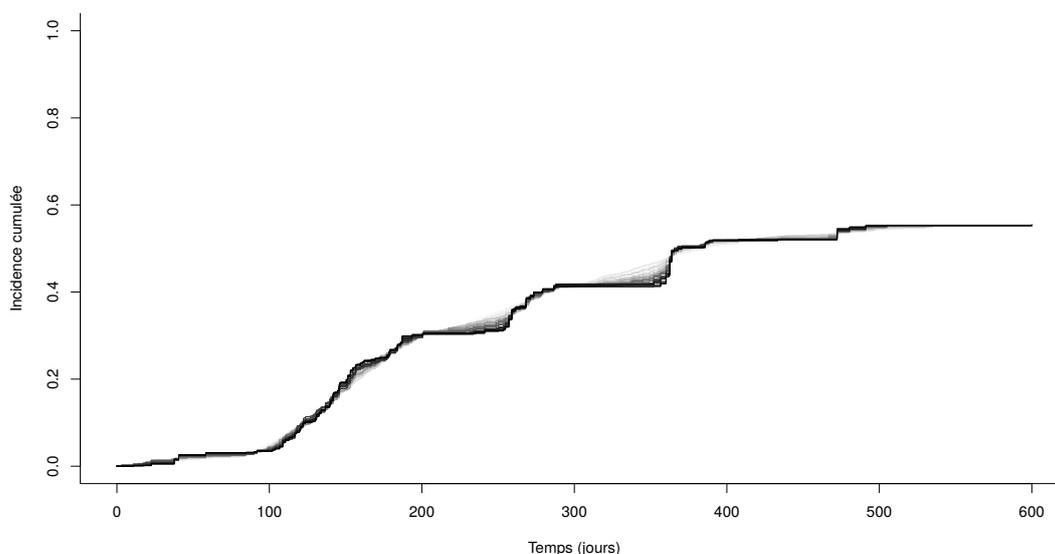


FIGURE 26 – Incidence cumulée de données censurées par intervalles par augmentation de données (réponse moléculaire majeure, données LMC). L'incidence cumulée a été estimée à l'aide de l'algorithme *Poor Mann's Data Augmentation* avec 30 itérations et  $m = 15$ . A chaque itération, l'estimation de l'incidence cumulée est représentée à l'aide d'une courbe grise. Le gradient de gris, du plus clair au plus foncé est proportionnel au numéro de l'itération. L'estimation à la 30<sup>e</sup> itération est représentée par la courbe noire.

Pan reprend la méthode générale d'augmentation de données de Tanner et Wong (1987) [175] et les règles d'imputation de Rubin. [173] Pan a implémenté les deux versions présentées dans Wei et Tanner, [176] la version *Poor Man's Data Augmentation* et la version *Asymptotic Normal Data Augmentation*. Ces deux méthodes sont présentées maintenant.

### 25.1 *Poor Man's Data Augmentation* pour le modèle de Cox

L'algorithme *Poor Man's Data Augmentation* pour l'estimation du coefficient de régression du modèle de Cox peut être implémenté selon les étapes suivantes.

L'estimation courante de la survie de base est  $\hat{S}_0^{(i)}(t)$  et le coefficient de régression est  $\hat{\beta}^{(i)}$ . A partir des données censurées par intervalles, on impute  $m$  jeux de données  $\{T_{(n)}, \delta, Z\}$ ,  $n = 1 \dots m$ , où  $T_{(n)}$  est un temps,  $\delta$  un indicateur de censure et  $Z$  une matrice de covariables, de la manière suivante :

(a) imputation :

— pour  $n = 1 \dots m$  :

— pour  $j = 1 \dots l$  :

(1) si  $R_j = \infty$ , on pose  $T_j = L_j$  et  $\delta = 0$ ,

(2) sinon, on tire  $X_j$  dans  $\left[ \hat{S}_0^{(i)}(t) \right]^{\exp(z_j \hat{\beta}^{(i)})}$  sachant  $L_j < X_j \leq R_j$ , on pose  $T_j = X_j$  et  $\delta_j = 1$  ;  
on obtient  $\{T_{(n)}, \delta, Z\}$ ,  $n = 1 \dots m$  ;

(b) estimation *a posteriori* :

— avec  $\{T_{(n)}, \delta, Z\}$ ,  $n = 1 \dots m$ , on estime :

- (1)  $\hat{\beta}_{(n)}^{(i)}$  et  $\hat{\Sigma}_{(n)}^{2(i)}$  à l'aide du modèle de Cox,
- (2)  $\hat{S}_{(n)}^{(i)}(t)$  à l'aide la méthode de Kaplan-Meiyer ou de Nelson-Aalen, puis on calcule :

$$\hat{S}_{0(n)}^{(i)}(t) = \left[ \hat{S}_{(n)}^{(i)}(t) \right]^{\exp(-Z^* \hat{\beta}_{(n)}^{(i)})}, \quad (50)$$

avec  $Z^* = \frac{1}{l} \sum_{j=1}^l Z_j$ , où  $Z_j$  est le vecteur de covariables du patient  $j$  ;

on obtient  $\hat{\beta}_{(n)}^{(i)}$ ,  $\hat{\Sigma}_{(n)}^{2(i)}$  et  $\hat{S}_{0(n)}^{(i)}(t)$ ,  $n = 1 \dots m$  ;

— assemblage :

- (1) avec  $\hat{\beta}_{(n)}^{(i)}$ ,  $n = 1 \dots m$ , on obtient l'estimation *a posteriori* de  $\hat{\beta}^{(i+1)}$  en utilisant (39) :

$$\hat{\beta}^{(i+1)} = \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m \hat{\beta}_{(n)}^{(i)}, \quad (51)$$

- (2) avec  $\hat{S}_{0(n)}^{(i)}(t)$ ,  $n = 1 \dots m$ , on obtient l'estimation *a posteriori* de  $\hat{S}_0^{(i+1)}(t)$  de manière analogue :

$$\hat{S}_0^{(i+1)}(t) = \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m \hat{S}_{0(n)}^{(i)}(t), \quad (52)$$

- (3) avec  $\hat{\Sigma}_{(n)}^{2(i)}$  et  $\hat{\beta}_{(n)}^{(i)}$ ,  $n = 1 \dots m$ , on obtient  $\hat{\Sigma}_{(n)}^{2(i+1)}$  en utilisant (42) :

$$\begin{aligned} \hat{\Sigma}^{2(i+1)} &= \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m \hat{\Sigma}_{(n)}^{2(i)} + \\ &\left(1 + \frac{1}{m}\right) \frac{\sum_{n=1}^m \left(\hat{\beta}_{(n)}^{(i)} - \hat{\beta}^{(i+1)}\right) \left(\hat{\beta}_{(n)}^{(i)} - \hat{\beta}^{(i+1)}\right)^T}{m - 1}. \end{aligned} \quad (53)$$

Afin d'initier l'algorithme, il est nécessaire de définir une valeur pour  $\hat{\beta}^{(0)}$  et une estimation de  $\hat{S}_0^{(0)}(t)$ . Pan propose pour  $\hat{\beta}^{(0)}$ , le vecteur nul et d'estimer

$\hat{S}_0^{(0)}(t)$  par imputation multiple : on impute  $m$  jeux de données  $\{T_{(n)}, \delta\}$ ,  $n = 1 \dots m$ , où  $T_{(n)}$  est un temps et  $\delta$  un indicateur de censure de la manière suivante :

(a) imputation :

— pour  $n = 1 \dots m$  :

— pour  $j = 1 \dots l$  :

(1) si  $R_j = \infty$ , on pose  $T_j = L_j$  et  $\delta = 0$ ,

(2) sinon, on tire  $X_j$  dans la loi uniforme  $[L_j, R_j]$ , on pose  $T_j = X_j$  et  $\delta_j = 1$  ;

on obtient  $\{T_{(n)}, \delta\}$ ,  $n = 1 \dots m$  ;

(b) estimation *a posteriori* :

— pour  $n = 1 \dots m$  :

(1) avec  $\{T_{(n)}, \delta, Z\}$ , on estime  $\hat{S}_{(n)}^{(0)}(t) = \hat{S}_{0(n)}^{(0)}(t)$ <sup>16</sup> en utilisant (5) on obtient  $\hat{S}_{0(n)}^{(0)}(t)$ ,  $n = 1 \dots m$ ,

(2) avec  $\hat{S}_{0(n)}^{(0)}(t)$ ,  $n = 1 \dots m$ , on estime  $\hat{S}_0^{(0)}(t)$  en utilisant (39) :

$$\hat{S}_0^{(0)}(t) = \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m \hat{S}_{0(n)}^{(0)}(t). \quad (54)$$

## 25.2 *Asymptotic Normal Data Augmentation pour le modèle de Cox*

Pour la version *Asymptotic Normal Data Augmentation*, pour la phase postérieure, on définit :

$$g^{(i+1)}(\beta) = \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m \mathbf{N} \left( \hat{\beta}_{(n)}^{(i+1)}, \hat{\Sigma}_{(n)}^{(i+1)} \right),$$

c'est-à-dire que l'on suppose que la loi de  $\beta$  est un mélange de lois normales multivariées.

Pour la phase d'imputation, on obtient  $\hat{\beta}_{(n)}^{(i)}$ ,  $n = 1 \dots m$ , en tirant  $m$  fois dans  $g^{(i)}(\beta)$ . Puis, on réalise les étapes suivantes :

(a) imputation :

— pour  $n = 1 \dots m$  :

— pour  $j = 1 \dots l$  :

---

16. En l'absence de covariables, ces deux quantités sont équivalentes.

- (1) si  $R_j = \infty$ , on pose  $T_j = L_j$  et  $\delta = 0$ ,
- (2) sinon, on tire  $X_j$  dans  $[\hat{S}_0^{(i)}(t)]^{\exp(z_j \hat{\beta}_{(n)}^{(i)})}$  sachant  $L_j < X_j \leq R_j$ , on pose  $T_j = X_j$  et  $\delta_j = 1$  ;

on obtient  $\{T_{(n)}, \delta, Z\}$ ,  $n = 1 \dots m$ .

Les autres points sont identiques à ceux de la version *Poor Man's*.

### 25.3 Interprétation

Ces algorithmes reprennent, en les adaptant aux données censurées par intervalles, le principe de l'augmentation des données :

- (a) dans la partie *imputation*, les données censurées à droite sont conservées et les données censurées par intervalles sont imputées. On obtient  $m$  jeux de données potentiellement censurées à droite. Ces jeux de données peuvent donc être analysés indépendamment à l'aide des outils disponibles pour l'analyse des données censurées à droite ;
- (b) dans la partie *estimation a posteriori*, on utilise le modèle de Cox pour analyser les  $m$  jeux de données. On en déduit une série d'estimations du coefficient de régression, de sa matrice de variance-covariance et de la survie de base ;
- (c) dans la partie *assemblage*, les estimations obtenues au pas précédant sont assemblées selon les règles d'imputation multiple de Rubin. [173] Elles fournissent des estimations mise à jour des paramètres d'intérêts et des grandeurs utiles pour initier une nouvelle itération ;
- (d) l'algorithme prend fin une fois que la précision souhaitée est obtenue.

## 26 Extension au modèle de Fine et Gray

La méthode de Pan peut être généralisée au cas où les données sont censurées par intervalles en présence de compétition. L'idée générale de la démarche est d'imputer à chaque pas  $m$  jeux de données censurées à droite, d'utiliser le modèle de Fine et Gray pour analyser les jeux de données puis d'utiliser les règles de Rubin pour mettre à jour les estimations. Les étapes suivantes peuvent être envisagées :

- (a) dans la partie *imputation*, les données censurées à droite sont conservées et les données censurées par intervalle sont imputées. On obtient  $m$  jeux de données potentiellement censurées à droite ;

- (b) dans la partie *estimation a posteriori*, on utilise le modèle de Fine et Gray pour analyser les  $m$  jeux de données. On en déduit une série d'estimations du coefficient de régression, de sa matrice de variance-covariance et de l'incidence cumulée de base ;
- (c) dans la partie *assemblage*, les estimations obtenues au pas précédant sont assemblées selon les règles de l'imputation multiple de Rubin. Elles fournissent des estimations mises à jour des paramètres d'intérêt et des grandeurs utiles pour initier une nouvelle itération ;
- (d) l'algorithme prend fin une fois obtenue la précision souhaitée.

### 26.1 *Poor Man's Data Augmentation* pour le modèle de Fine et Gray

L'algorithme *Poor Man's Data Augmentation* pour l'estimation du coefficient du modèle régression à risque de sous-répartition proportionnels de Fine et Gray et de sa matrice de variance covariance peut être implémenté selon les étapes suivantes :

- l'estimation courante de l'incidence cumulée de base de l'événement  $k$  est  $\hat{I}_k^{(i)}(t)$  et le coefficient de régression est  $\hat{\beta}^{(i)}$ . A partir des données censurées par intervalles, on impute  $m$  jeux de données  $\{T_{(n)}, \kappa, \delta, Z\}$ ,  $n = 1 \dots m$ , où  $T_{(n)}$  est un temps,  $\kappa$  est une cause de défaillance,  $\delta$  un indicateur de censure et  $Z$  une matrice de covariables, de la manière suivante :

(a) imputation :

— pour  $n = 1 \dots m$  :

— pour  $j = 1 \dots l$  :

(1) si  $R_j = \infty$ , on pose  $T_j = L_j$  et  $\delta = 0$ ,

(2) sinon, on tire  $X_j$  dans  $1 - \left[1 - \hat{I}_k^{(i)}(t)\right]^{\exp(z_j \hat{\beta}^{(i)})}$  sachant  $L_j < X_j \leq R_j$ , on pose  $T_j = X_j$  et  $\delta_j = 1$  ;

on obtient  $\{T_{(n)}, \kappa, \delta, Z\}$ ,  $n = 1 \dots m$  ;

(b) estimation *a posteriori* :

— avec  $\{T_{(n)}, \kappa, \delta, Z\}$ ,  $n = 1 \dots m$ , on estime :

(1)  $\hat{\beta}_{(n)}^{(i)}$  et  $\hat{\Sigma}_{(n)}^{(i)}$  à l'aide du modèle de Fine et Gray,

(2)  $\hat{I}_{k(n)}^{(i)}(t)$  en utilisant (21) et (22) par exemple, puis on calcule :

$$\hat{I}_{k(n)}^{(i)}(t) = 1 - \left[1 - \hat{I}_{k(n)}^{(i)}(t)\right]^{\exp\left(-Z^* \hat{\beta}_{(n)}^{(i)}\right)}, \quad (55)$$

avec  $Z^\star = \frac{1}{l} \sum_{j=1}^l Z_j$ , où  $Z_j$  est le vecteur de covariables du patient  $j$  ;

on obtient  $\hat{\beta}_{(n)}^{(i)}$ ,  $\hat{\Sigma}_{(n)}^2$  et  $\hat{I}_{k(n)}^{0(i)}(t)$ ,  $n = 1 \dots m$  ;

— assemblage :

(1) avec  $\hat{\beta}_{(n)}^{(i)}$ ,  $n = 1 \dots m$ , on obtient l'estimation *a posteriori* de  $\hat{\beta}^{(i+1)}$  en utilisant (39) :

$$\hat{\beta}^{(i+1)} = \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m \hat{\beta}_{(n)}^{(i)}, \quad (56)$$

(2) avec  $\hat{I}_{k(n)}^{0(i)}(t)$ ,  $n = 1 \dots m$ , on obtient l'estimation *a posteriori* de  $\hat{I}_k^{0(i+1)}(t)$  de manière analogue :

$$\hat{I}_k^{0(i+1)}(t) = \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m \hat{I}_{k(n)}^{0(i)}(t), \quad (57)$$

(3) avec  $\hat{\Sigma}_{(n)}^2$  et  $\hat{\beta}_{(n)}^{(i)}$ ,  $n = 1 \dots m$ , on obtient  $\hat{\Sigma}^{2(i+1)}$  en utilisant (42) :

$$\begin{aligned} \hat{\Sigma}^{2(i+1)} &= \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m \hat{\Sigma}_{(n)}^2 + \\ &\left(1 + \frac{1}{m}\right) \frac{\sum_{n=1}^m \left(\hat{\beta}_{(n)}^{(i)} - \hat{\beta}^{(i+1)}\right) \left(\hat{\beta}_{(n)}^{(i)} - \hat{\beta}^{(i+1)}\right)^T}{m-1}. \end{aligned} \quad (58)$$

Afin d'initier l'algorithme il est nécessaire de définir une valeur pour  $\hat{\beta}^{(0)}$  et une estimation de  $\hat{I}_k^{0(0)}(t)$ . Par analogie à la proposition de Pan dans le contexte du modèle de Cox, il est proposé d'initier l'algorithme avec le vecteur nul pour  $\hat{\beta}^{(0)}$  et d'estimer  $\hat{I}_k^{0(0)}(t)$  par imputation multiple : on impute  $m$  jeux de données  $\{T_{(n)}, \kappa, \delta\}$ ,  $n = 1 \dots m$ , où  $T_{(n)}$  est un temps et  $\delta$  un indicateur de censure, de la manière suivante :

(a) imputation :

— pour  $n = 1 \dots m$  :

— pour  $j = 1 \dots l$  :

(1) si  $R_j = \infty$ , on pose  $T_j = L_j$  et  $\delta = 0$ ,

(2) sinon, on tire  $X_j$  dans la loi uniforme  $[L_j, R_j]$ , on pose  $T_j = X_j$  et  $\delta_j = 1$  ;

on obtient  $\{T_{(n)}, \kappa, \delta\}$ ,  $n = 1 \dots m$  ;

(b) estimation *a posteriori* :

— pour  $n = 1 \dots m$  :

— avec  $\{T_{(n)}, \kappa, \delta\}$ , on estime  $\hat{I}_{k(n)}^{(0)}(t) = \hat{I}_{k(n)}^{(0)}(t)$ <sup>17</sup> en utilisant (22) on obtient  $\hat{I}_{k(n)}^{(0)}(t)$ ,  $n = 1 \dots m$  ;

— assemblage :

avec  $\hat{I}_{k(n)}^{(0)}(t)$ ,  $n = 1 \dots m$ , on estime  $\hat{I}_k^{(0)}(t)$  en utilisant (39) :

$$\hat{I}_k^{(0)}(t) = \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m \hat{I}_{k(n)}^{(0)}(t). \quad (59)$$

## 26.2 *Asymptotic Normal Data Augmentation* pour le modèle de Fine et Gray

La version *Asymptotic Normal* de l'algorithme d'augmentation des données pour le modèle de Fine et Gray se déduit sans difficulté de la version *Poor Man's* du § 26.1.

## 26.3 Simulations

Afin d'évaluer le comportement de la méthode proposée, différents scénarios ont été étudiés après simulation de données censurées par intervalles en présence de compétition. En accord avec la prescription 1 de Lawless et Babineau (2006), [182] les données à risques concurrents censurées par intervalles ont été générées en trois étapes indépendantes :

- (a) simulation de jeux de données à risques concurrents ;
- (b) génération indépendante des intervalles ;
- (c) pour chaque observation simulée, un intervalle est attribué en fonction du temps simulé en (a).

A l'étape (a), la simulation des jeux de données à risques concurrents a été réalisée à l'aide de la méthode décrite dans Haller *et al.* (2014). [183] Cette méthode permet de simuler des données à risques concurrents accompagnées d'une ou plusieurs covariables, dont il est possible de déterminer à la fois la nature et le risque de sous-répartition associé. Ici, les jeux de données simulés font apparaître les événements concurrent 1 et 2 et une seule covariable ( $Z$ ) associée à un risque de sous répartition prédéterminé ( $\beta$ ) pour l'évènement 1.

17. En l'absence de covariables, ces deux quantités sont équivalentes.

A l'étape (b), la simulation des intervalles est réalisée selon la procédure suivante :  $\nu = 0 \dots N$  étant le vecteur des  $N$  premiers entiers (numéro de la visite), et  $len$  un temps prédéterminé séparant deux visites consécutives. Les dates d'inspections théoriques sont alors pour le patient  $i$  :  $t_{i,\nu} = \nu \times len$ . Dans le but de simuler une disparité dans les temps de visites entre les patients, des séquences de nombres aléatoires ont été générées puis ajoutées aux dates théoriques des visites. Les *vrais* dates de visites sont alors obtenus en ajoutant cette séquence simulée aux dates théoriques. Pour le patient  $i$ , on obtient :  $\zeta_i = t_{i,\nu} + \epsilon_i$ , où  $\epsilon_i$  est une séquence de nombres aléatoires issus d'une distribution normale d'espérance  $\mu = \gamma \times \xi$  et de variance  $\sigma^2$ .

Enfin, à l'étape (c), pour chaque patient, on obtient  $(L_i, R_i]$  de sorte que  $L_i < T_i \leq R_i$  où  $T_i$  est une date d'évènement exacte pour le patient  $i$  déterminé en (a) et où  $L_i$  et  $R_i$  sont deux éléments consécutifs de  $\zeta_i$ .

Dans ce schéma,  $\gamma$  est un réel,  $\xi$  peut être en lien avec la covariable testée (traitement ou caractéristiques du patient) et  $\sigma$  est un réel. En d'autres termes,  $\sigma^2$  représente la variance des dates de visites par rapport aux dates théoriques et  $\mu$  induit un décalage systématique entre les temps théoriques et les temps réels de visites.

Ici,  $\xi = Z$ . Donc lorsque  $\gamma = 0$ ,  $\mu = 0$  et il n'y a pas de décalage. Lorsque  $\gamma \neq 0$  il existe une corrélation entre les décalages et la variable testée.

L'analyse des données est réalisée selon 4 procédures :

1. le modèle à risques de sous-répartitions proportionnels où les temps d'apparition d'évènements ont été déterminé en (a) (procédure FG) ;
2. le modèle à risques de sous-répartitions proportionnels où les temps d'apparition d'évènements sont imputés par la valeur de la borne supérieure des intervalles déterminés en (b) (méthode d'imputation simple (IS)) ;
3. la procédure PMDA pour données à risques concurrents censurées par intervalles (méthode PMDA) ;
4. la procédure ANDA pour données à risques concurrents censurées par intervalles (méthode ANDA).

Les paramètres des différents scénarios proposés sont présentés table 24. Pour chaque scénario, les procédures PMDA et ANDA ont été lancées avec 5 itérations (paramètre  $k$ ) et pour chaque itération, 10 imputations (paramètre  $m$ ). La table 25 présente les résultats numériques des simulations.

Par ailleurs, pour les scénarios 1 à 3, le taux d'erreur de type I observé a été calculé en faisant le rapport du nombre de statistiques de test dont le carré est

supérieur au 95<sup>e</sup> centile de la distribution du  $\chi^2$  à un degrés de liberté, sur le nombre total de test. Pour les scénarios 4 à 6, le taux d'erreur de type II observé a été calculé en faisant le rapport du nombre de statistiques de test dont le carré est inférieur au 95<sup>e</sup> centile de la distribution du  $\chi^2$  à un degrés de liberté, sur le nombre total de test. La figure 27 montre pour chaque scénario, la dispersion des statistiques de test obtenue par chaque procédure d'analyse, les taux d'erreur de type I observés ainsi que la puissance observée (1 - taux d'erreur de type II) sont aussi données.

#	$n$	$\gamma$	Evènement d'intérêt	Coef. ev. int. 1
1	300	0	1	$\log(1)$
2	300	3	1	$\log(1)$
3	300	3	2	$\log(1)$
4	900	0	1	$\log(1.3)$
5	900	3	1	$\log(1.3)$
6	900	-3	2	$\log(1.3)$

TABLE 24 - Paramètres de simulation : pour chaque scénario les jeux de données ont été générés et analysés suivant les paramètres présentés dans la table.  $n$  est le nombre d'observations simulées par jeux de données,  $\gamma$  est la moyenne de la distribution normale d'où ont été tirés les éléments de  $\epsilon_i$ , Coef. est la valeur du ratio des risques de sous-répartition associé à l'évènement d'intérêt 1.

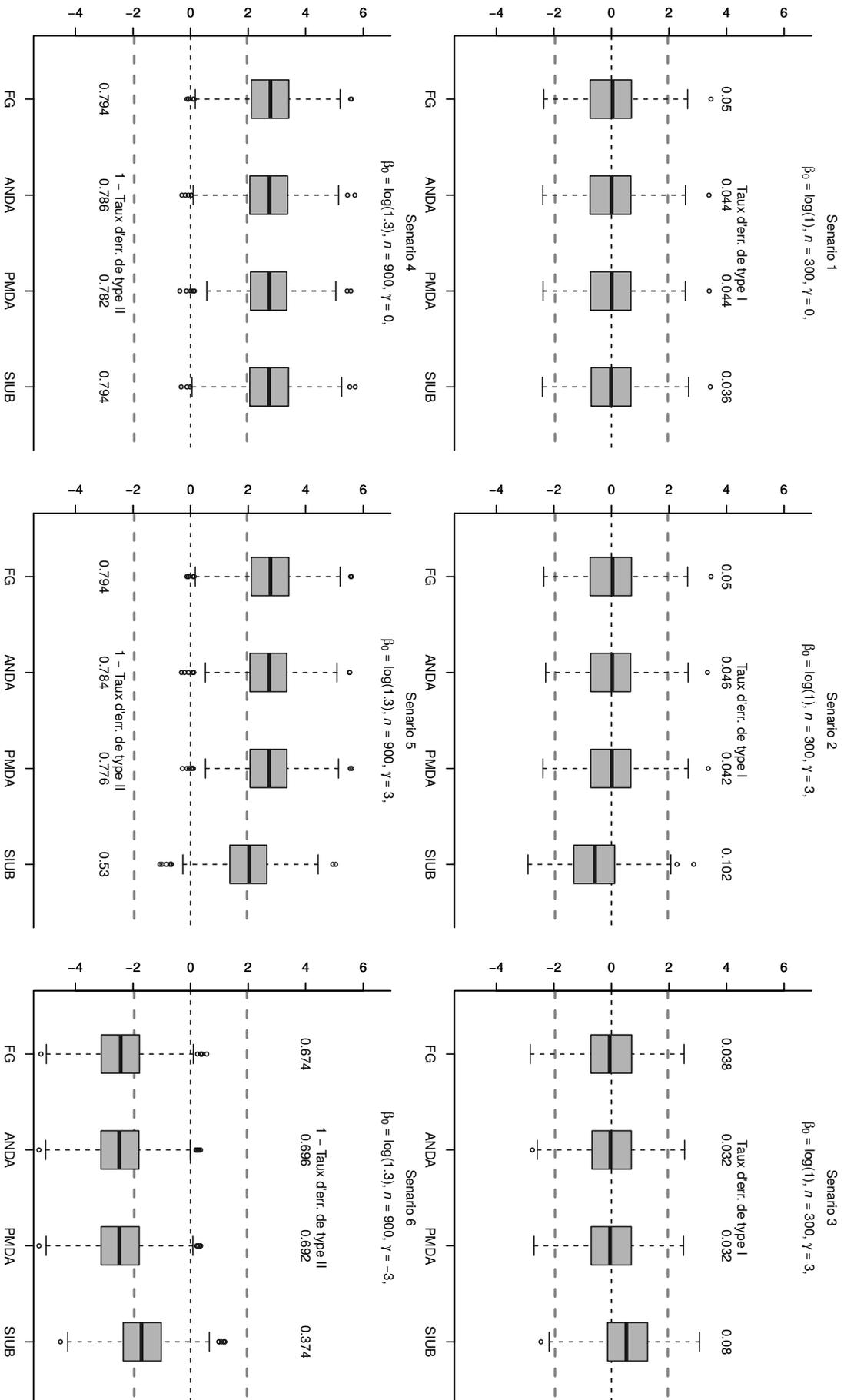


FIGURE 27 – Résultats des simulations : chaque cadran représente l'un des 6 scénarios testés. Pour chaque scénario, les statistiques de test obtenues à l'aide des procédures d'analyse FG, ANDA, PMDA et SIUB sont données. Les taux d'erreur de type I/II ont été calculés par le rapport du nombre de statistiques de test au carré supérieures au 95<sup>e</sup> centile de la variable du  $\chi^2$  à 1 degré de liberté sur le nombre total de statistiques de test (500).

#	FG			ANDA			PMDA			IS					
	$\hat{\beta}$	$\text{var}(\hat{\beta})$	MSE	$\hat{\beta}$	$\text{var}(\hat{\beta})$	MSE	PC	$\hat{\beta}$	$\text{var}(\hat{\beta})$	MSE	PC	$\hat{\beta}$	$\text{var}(\hat{\beta})$	MSE	PC
1	.003 (.164)	.026 (.002)	.027 (.036)	.002 (.163)	.026 (.002)	.026 (.036)	93.6 (93.8)	.002 (.163)	.026 (.002)	.026 (.036)	93.6 (94.6)	.001 (.163)	.026 (.002)	.026 (.035)	92.400 (95.0)
2	.003 (.164)	.026 (.002)	.027 (.036)	.002 (.162)	.026 (.002)	.026 (.035)	94.2 (95.2)	.001 (.162)	.026 (.002)	.026 (.035)	93.8 (92.8)	-.090 (.165)	.026 (.002)	.035 (.045)	91.200 (94.6)
3	-.004 (.165)	.028 (.002)	.027 (.035)	-.004 (.165)	.028 (.002)	.027 (.035)	95.2 (94.0)	-.004 (.165)	.028 (.002)	.027 (.035)	94.6 (94.4)	.088 (.166)	.028 (.002)	.035 (.044)	91.000 (95.2)
4	.258 (.094)	.009 (.000)	.009 (.013)	.256 (.094)	.009 (.000)	.009 (.013)	94.2 (95.4)	.256 (.094)	.009 (.000)	.009 (.013)	94.6 (95.4)	.257 (.094)	.009 (.000)	.009 (.013)	94.800 (96.2)
5	.258 (.094)	.009 (.000)	.009 (.013)	.256 (.094)	.009 (.000)	.009 (.013)	94.2 (97.8)	.256 (.094)	.009 (.000)	.009 (.013)	94.4 (95.4)	.189 (.096)	.009 (.000)	.014 (.020)	86.400 (97.8)
6	-.230 (.096)	.009 (.000)	.009 (.013)	-.233 (.095)	.009 (.000)	.009 (.013)	95.2 (96.4)	-.233 (.095)	.009 (.000)	.009 (.013)	95.2 (96.4)	-.159 (.096)	.009 (.000)	.014 (.019)	87.000 (95.8)

TABLE 25 – Résultats numériques des simulations : 500 jeux de données à risques concurrents censurés par intervalles et munis d'une covariable associée à un risque de sous répartition prédéterminé pour l'évènement d'intérêt ont été générés. Les 500 jeux de données ont été analysés selon les 4 procédures décrites plus haut (FG, ANDA, PMDA et IS). Les colonnes  $\hat{\beta}$  et  $\text{var}(\hat{\beta})$  donnent la moyenne des estimations du paramètre et de la moyenne des variances associées. Les écarts-types sont donnés entre parenthèses en dessous des paramètres. La colonne MSE, donne la moyenne du carré de l'erreur entre la valeur théorique du paramètre et les valeurs observées (sauf pour les scénarios 3 et 6 où la valeur de référence est la valeur moyenne obtenue par la procédure FG). Pour les modèles , PMDA et SI, la colonne PC indique le pourcentage de couverture de l'intervalle de confiance à 95% des estimations obtenues pour la procédure FG (la valeur entre parenthèse donne le pourcentage de couverture pour l'état-type).

## 26.4 Application

La méthode a été appliquée aux données LMC sur l'ensemble des 347 marqueurs phénotypiques de la voie NK analysés dans la partie V. La procédure ANDA a été lancée avec  $k = 5$  itérations, et  $m = 10$  jeux de données imputés à chaque itération. L'évènement d'intérêt est la réponse moléculaire majeure. Les résultats sont rapportés table 26.

SNP	Chr.	Pos.	Gène	ANDA			IBS			
				Coef	Ecart-type	P	Coef	Ecart-type	P	
rs4415856	12	10600668	NKG2A	-0.642	0.157	0.00004	-0.615	0.151	0.00005	4.20
rs2734414	12	10598802	NKG2A	-0.593	0.160	0.00022	-0.591	0.152	0.00010	0.30
rs6916394	6	31464050	MICB	0.544	0.153	0.00038	0.565	0.153	0.00022	3.88
rs3828903	6	31464739	MICB	0.544	0.154	0.00041	0.564	0.153	0.00022	3.56
rs1478309	12	10541745	NKG2D	-0.516	0.160	0.00127	-0.522	0.155	0.00076	1.22
rs12824474	12	10602925	NKG2A	-0.420	0.168	0.01222	-0.447	0.166	0.00700	6.49
rs2734441	12	10601633	NKG2A	-0.490	0.218	0.02462	-0.491	0.224	0.02900	0.09
rs1549854	15	66696735	MAP2K1	-0.369	0.166	0.02633	-0.366	0.164	0.02600	0.79
rs1059510	6	30457732	HLA-E	0.336	0.152	0.02743	0.325	0.152	0.03200	3.32
rs9658727	10	90761865	FAS	0.437	0.199	0.02779	0.402	0.196	0.04000	8.06
rs11053781	12	10537269	NKG2D	-0.422	0.195	0.03026	-0.415	0.199	0.03700	1.73
rs4845401	1	156395144	SHC1	0.390	0.186	0.03601	0.373	0.191	0.05100	4.46
rs8072920	17	64686048	PRKCA	0.379	0.185	0.04077	0.406	0.185	0.02800	7.18
rs975195	6	30477947	HLA-E	0.315	0.155	0.04189	0.306	0.155	0.04800	2.73
rs1327474	6	137541075	IFNGR1	0.392	0.194	0.04354	0.390	0.195	0.04500	0.56
rs1892846	22	22191925	MAPK1	-0.356	0.177	0.04450	-0.361	0.175	0.03900	1.50
rs1424855	9	21078815	IFNB1	0.434	0.218	0.04672	0.486	0.230	0.03500	12.06
rs1610678	6	29789190	HLA-G	0.324	0.171	0.05794	0.342	0.167	0.04000	5.46
rs4806585	19	55346424	KIR2DS4	0.315	0.175	0.07067	0.344	0.166	0.03800	8.91

TABLE 26 – Analyse des 347 marqueurs phénotypiques de la voie NK (partie V) avec la procédure ANDA. Pour chaque test, la procédure ANDA a été lancée avec  $k = 5$  itérations et  $m = 10$  jeux de données imputés à chaque itération. Les résultats de l'analyse effectuée avec la méthode de l'imputation simple sont aussi représentés (IBS). La différence en pourcentage entre les estimations obtenues avec la méthode IBS et celles obtenues avec la méthode ANDA est donnée ( $\Delta\%$ ). Les résultats sont ordonnés par niveau de signification décroissant pour la méthode ANDA (P). Tous les résultats significatifs au niveau nominal de 5% pour l'une ou l'autre méthode sont proposés.

## 27 Conclusion

Les résultats obtenus dans cette partie montrent que l'imputation multiple, sous la forme proposée par Pan (2000) pour le modèle de Cox, peut être appliquée dans un contexte où les observations sont censurées par intervalles en présence de compétition.

La section 24.1 propose une estimation non paramétrique de l'incidence cumulée d'un évènement d'intérêt censuré par intervalles en présence de compétition.

La section 25 propose, pour l'estimation d'un coefficient de régression, une extension de la méthode de Pan dans un contexte où les données sont censurées par intervalles en présence de compétition. L'idée de Pan, dans le contexte du modèle de Cox, est de transformer les données censurées par intervalles en une série de jeux de données censurées à droite. Il devient alors possible d'utiliser les méthodes et les bibliothèques d'analyse disponibles pour analyser ces données. Suivant cette idée, la méthode proposée, consiste à transformer un jeu de données à risques concurrents censuré par intervalles en données censurées à droite et d'utiliser la méthodologie développée par Fine et Gray pour les analyser. Suivant avec les règles de l'imputation multiple de Rubin (1987), [173] le paramètre d'intérêt est estimé par la moyenne empirique des estimations du paramètre obtenue à chaque imputation. L'estimation de la variance, quand à elle, est obtenue en prenant en compte la moyenne des variances obtenues à chaque imputation, dite *moyenne intra-imputation*, mais aussi une estimation de la variance *inter-imputation*, c'est-à-dire de la variabilité des différentes estimations obtenues à chaque imputation. La procédure est itérée et à chaque pas, le coefficient, sa matrice de variance-covariance, et l'incidence cumulée de base sont mis-à-jour à partir des estimations postérieures sachant les données imputées. Les deux versions de l'algorithme d'augmentation de données, proposées par Wei et Tanner ont été implémentées, la version *Poor Man's* et la version *Asymptotic Normal*.

Un des aspects les plus intéressants de l'imputation multiple est qu'elle ne nécessite pas l'hypothèse de censure par intervalles non-informative, contrairement aux méthodes proposées par Finkelstein (1986), [180] proposant de maximiser une vraisemblance définie dans un contexte de données censurées par intervalles. Cette caractéristique découle du fait que dans la méthode proposée, les données censurées par intervalles ne sont pas analysées en temps que telles mais augmentées en une série de jeux de données censurées à droite. Cette caractéristique est intéressante dans un contexte médical, où la censure informative est souvent présente [184] et où, en tout état de cause, il est difficile de tester cette hypothèse. [185]

Le comportement des procédures d'imputation multiple a été étudié à l'aide

d'une série de 6 simulations. Pour chaque scénario une covariable est testée et 2 évènements concurrents sont susceptible de se produire pour chaque patient. Les patients sont par ailleurs soumis à un programme de visites où des examens sont réalisés afin de déterminer si un évènement a eu lieu. Il est aussi possible de remettre en cause l'hypothèse d'une censure par intervalles non informative par l'intermédiaire du paramètre  $\gamma$ . Les résultats obtenus ont pu être comparés avec la méthode de l'imputation simple. Les conclusions de cette simulation sont résumées dans les 3 points suivants :

- (a) lorsque qu'il n'y a pas de lien entre la date de la visite et la covariable testée, le comportement des trois méthodes est satisfaisant (scénario 1 et 4) ;
- (b) lorsque la covariable testée n'a pas d'influence sur le risque de sous-répartition des deux évènements en concurrence mais qu'elle influence les temps de visite, les méthodes d'imputation multiple fournissent des résultats satisfaisants, mais pas la méthode d'imputation simple (scénarios 2 et 3) ;
- (c) lorsque la covariable testée à une influence sur le risque de sous-répartition des deux évènements, mais aussi sur la date des visites (scénario 5 et 6), les conclusions sont identiques à celles du point précédent.

Dans tous les cas, les méthodes d'imputation multiple donnent des estimations correctes du coefficient de régression alors que la méthode d'imputation simple fournit des résultats biaisés dès que les temps de visite sont liés à la covariable testée. Pour les scénario 2 et 3, c'est-à-dire, lorsque la covariable testée n'a d'influence ni sur le risque de sous-répartition de l'évènement d'intérêt ni sur celui de l'évènement 2, ce biais se traduit par une augmentation des taux d'erreurs de type I. Pour les scénarios 5 et 6, on observe une augmentation des taux d'erreurs de type II.

Les scénarios proposés peuvent être mis en relation avec un essai contrôlé où la pratique médicale testée est susceptible d'influencer les temps d'apparition d'un évènement d'intérêt mais aussi les dates des visites. Zhang *et al.* (2007) donnent l'exemple d'un patient pour lequel la survenue de l'évènement d'intérêt est concomitante avec l'apparition de symptômes précipitant une visite chez son clinicien.

Dans le cadre d'une étude médicale observationnelle il peut être intéressant de comparer des résultats obtenus dans 2 institutions qui n'auraient pas exactement le même protocole de visites. Dans le contexte d'une étude élaborée pour évaluer un marqueur pronostique, il est aussi possible que la caractéristique testée soit corrélée avec les temps de visite.

Dans ces situations, les résultats obtenus montrent qu'il est avantageux d'utiliser une méthode d'imputation multiple.

Intuitivement, la différence observée entre les résultats obtenus par la méthode de l'imputation simple et ceux obtenus par la méthode de l'imputation multiple peut être appréhendée de la manière suivante : la première méthode consiste à appliquer une procédure d'analyse de données censurées à droite sur des données où l'ordre des temps d'occurrence de l'évènement d'intérêt dépend directement de la covariable testée. Par la méthode de l'imputation multiple, en revanche, la probabilité d'un ordre particulier devient faible pour chaque jeu de données imputés alors qu'en moyenne, l'estimation du coefficient reste correct.

Dans un contexte de concurrence, il est important de rappeler l'observation de Gray (1988) selon laquelle, il est possible qu'une covariable ait un effet sur le risque cause-spécifique d'un évènement tout en ayant un effet différent sur l'incidence cumulée du même évènement. Un corollaire à cette observation est qu'il est possible qu'une exposition ait un effet positif sur l'incidence cumulée d'un évènement d'intérêt mais aussi, dans le même temps, que le risque cause spécifique de l'évènement en compétition soit supérieur parmi les patients exposés par rapport aux patients non exposés.

Il est possible d'illustrer cette situation à l'aide de la modélisation par temps latents (Latouche, thèse de doctorat page 10 (2004)). [186] On dispose d'un couple de temps latents  $(T_1, T_2)$  dont on observe  $T = \min(T_1, T_2)$ . Dans le groupe des patients exposés, on observe  $T^1 = \min(T_1^1, T_2^1)$ . On observe  $T^0 = \min(T_1^0, T_2^0)$  dans le groupe des patients non exposés. Si, on a  $T_1^1 < T_2^1$  le plus souvent, l'incidence cumulée de l'évènement 1 sera supérieure à celle de l'évènement 2 pour les patients exposés. Par ailleurs, il est possible que le risque cause spécifique de l'évènement 2 soit supérieur chez les patients exposés par rapport aux patients non exposés (c'est-à-dire, avoir  $T_2^1 < T_2^0$  en moyenne).

Ce type de situation peut se produire dans le cadre d'une étude en cancérologie où il s'agit de tester une augmentation de la dose de chimiothérapie. Les patients sous hautes doses, sont susceptibles d'obtenir un taux de réponse supérieur, tout en présentant un niveau d'effets indésirables plus important que celui observé chez les patients sous doses standards. Finalement, l'hypothèse d'une censure par intervalles non-informative pourrait être remise en cause si par ailleurs, le niveau important des effets indésirables se traduisait par une modification du calendrier des visites.

La méthode a été appliquée sur les données LMC. Les 347 marqueurs phénotypiques de la voie NK étudiés dans la partie V ont été analysés avec la procédures ANDA. Les nouveaux résultats ont été mis en regard avec ceux obtenus par la méthode de l'imputation simple. La différence en pourcentage entre les estimations obtenues par la méthode de l'imputation simple et celles obtenus avec la procédure ANDA est donnée. Ces calculs montrent que les estimations obtenues en appliquant l'une ou l'autre méthode sont comparables pour les marqueurs qui

ont une influence forte sur le risque de sous répartition de la réponse moléculaire majeure. Cependant, en prenant pour référence la procédure ANDA, la méthode de l'imputation simple produit 3 résultats discordants (avec un seuil nominal de 5% pour le risque de première espèce). Par ailleurs pour les 19 résultats présentés table 26, l'estimation des coefficients varie de 4% en moyenne avec un maximum de 12% pour *rs1424855* du gène IFNB1.

L'approche présentée dans cette partie a été implémentée dans la librairie d'analyse R, *Multiple Imputation for Interval Censored Data* (MIICD) librement accessible sur le site du *Comprehensive R Archive Network*. Les deux fonctions principales permettent d'appliquer la méthode de Pan (2000) aux données censurées par intervalle avec ou sans compétition. Cette librairie d'analyse a été référencée dans la *Task View Survival* aux sections *Standard Survival Analysis* et *Multistate Models*. Un papier méthodologique présentant en détail l'extension de la méthode de Pan dans un contexte de compétition à également été soumis.



# Conclusion

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude de la pharmacogénétique de l'imatinib dans la leucémie myéloïde chronique en phase chronique. Ce travail nous a permis de préciser le contexte scientifique et méthodologique de ce type d'étude à la croisée de nombreuses thématiques.

La leucémie myéloïde chronique est une maladie dont le diagnostic est établi par détection sur échantillon sanguin d'un *biomarqueur* : le transcrit de fusion BCR-ABL. Cette maladie est traitée efficacement à l'aide d'une thérapie dite *ciblée*, l'imatinib, dont le principe actif neutralise l'action oncogénique de la protéine de fusion associée à cette maladie. Le suivi des patients sous imatinib consiste à déterminer pour chaque patient une trajectoire de réponse moléculaire par dosage périodique du transcrit de fusion BCR-ABL sur échantillons sanguins.

Afin que l'imatinib puisse exercer son action ciblée, il est nécessaire qu'il puisse pénétrer au cœur des cellules transformées en quantité suffisante. Or, un grand nombre de paramètres sont susceptibles de moduler l'exposition de la cible, parmi lesquels, des facteurs environnementaux, le système de santé et/ou lié au patients (observance). Ici, nous avons testé l'hypothèse que des polymorphismes génétiques associés à des gènes de la pharmacogénétique étaient associés à la réponse moléculaire dans la leucémie myéloïde chronique en phase chronique. Il s'agit donc de mesurer des facteurs directement liés aux patients et d'établir une corrélation entre ces facteurs et le niveau de la réponse moléculaire.

L'intérêt scientifique que procure ce type d'analyse est multiple : les études d'associations à grande échelle permettent d'annoter, ou d'enrichir les annotations, relatives aux variations du génomes. Elles permettent par exemple de dresser une liste de gènes potentiellement impliqués dans les processus biochimiques associés au métabolisme d'un médicament. La démarche suivie dans notre travail est légèrement différente dans la mesure où les polymorphismes testés provenaient de zones du génome associées à des gènes de la pharmacogénétique, donc déjà annotées. Il s'est donc agit d'affiner une liste de gènes candidats dans un contexte particulier.

Les résultats obtenus partie IV montrent que les patients non porteurs de l'haplotype G-G d'ABCG2 ont une probabilité moindre d'obtenir une réponse moléculaire majeure dans les 18 premiers mois de traitement. Le fait que ABCG2 code une protéine impliquée dans les processus de détoxification au niveau cellulaire nous a conduit à proposer l'hypothèse qu'il existe un lien entre polymor-

phismes observés et niveau d'expression d'ABCG2, cette expression différentielle étant susceptible de moduler l'exposition de la cible au traitement.

Dans la partie V, nous nous sommes intéressés à l'association entre polymorphismes de récepteurs/ligands des cellules NK. Nous avons pu mettre en évidence que les patients homozygotes pour l'haplotype T-G de MICB, ont une probabilité plus importante d'obtenir une réponse moléculaire majeure, mais aussi, qu'ils auraient moins de risques de développer la maladie. Nous avons aussi montré qu'un haplotype relatif à des gènes du complexe NK était associé à une probabilité plus importante d'obtenir une réponse moléculaire majeure sans qu'il soit possible de déterminer quels seraient les gènes impliqués.

En toute rigueur, les associations mises en évidence entre certains polymorphismes et la réponse moléculaire ne nous permettent pas d'impliquer les gènes à proximité desquels ces marqueurs sont situés. Nous pouvons néanmoins faire l'hypothèse qu'il s'agit de *variations génétiques en lien fonctionnel avec l'expression d'un gène à proximité (cis-eQTL) ou à distance (trans-eQTL)* (point 2 page 36).

En outre, comme seuls des patients traités par imatinib ont été considérés dans notre étude, il est possible que les marqueurs identifiés soient simplement des marqueurs pronostiques. Cette question est pertinente notamment pour les polymorphismes associés à la voie NK dans la mesure où des variations génétiques associées aux gènes de cette voie ont déjà été mis en relation avec la réponse au traitement lorsque des patients ont été traités par d'autres ITK comme le dasatinib par exemple (Kreutzman *et al.* (2012)). Cependant, des arguments de type physiologiques permettent de penser que les variations associées au gène ABCG2 identifiés dans cette thèse sont bien associées à la réponse à l'imatinib dans la LMC en phase chronique et l'implication de BCRP (produit du gène ABCG2) dans le métabolisme de l'imatinib semble admise :

- l'imatinib présente une *grande* affinité avec BCRP (Ozvegy-Laczka *et al.* (2004)) ;
- *in vitro* l'expression d'ABCG2 est induite par l'imatinib et cette sur-expression a pour conséquence une diminution de 50% de la concentration intracellulaire en moyenne (Burger *et al.* (2005)) ;
- l'expression importante d'ABCG2 est observée chez des patients sous imatinib n'ayant pas obtenu de réponse moléculaire majeure (Lima *et al.* (2014)).

L'hypothèse sous-jacente à ces études est relative à la fonction de la protéine en question : BCRP étant une pompe d'efflux possédant une forte affinité avec l'imatinib, sa sur-expression pourrait induire des mécanismes pharmacocinétiques de résistance à l'imatinib.

Outre les aspects relatifs à l'interprétation des résultats, les études d'associa-

tions nourrissent l'espoir d'un progrès de la médecine vers une prise en charge personnalisée. Nous avons montré que la mise en évidence d'une association statistique n'était qu'une condition nécessaire à la mise en place d'un processus de personnalisation d'une pratique médicale. Parmi d'autres conditions nécessaires nous pouvons citer :

- la confirmation de l'association statistique entre haplotype et réponse thérapeutique à l'aide d'une ou plusieurs études de niveau de preuve B (table 2) c'est-à-dire basée sur un autre essai prospectif contrôlé randomisé ;
- la démonstration de la coût-efficacité d'une personnalisation du traitement. Une telle étude prendrait en compte des paramètres comme la force de l'association observée, le coût des tests génétiques et de leurs interprétations, le coût des différentes stratégies thérapeutiques, et les bénéfices attendus par la mise en place d'un programme de personnalisation.

Ces contraintes scientifiques et économiques permettent de comprendre pourquoi la médecine personnalisée demeure un objectif difficile à atteindre. Cependant, il semble que l'obstacle principal à la mise en place effective d'un processus de personnalisation d'une pratique médicale basée sur un test génétique est le progrès des thérapies lui même. La LMC est une maladie qui permet d'illustrer cette hypothèse : elle fournit l'exemple d'une maladie dont la prise en charge a évolué d'une pratique de type personnalisée, la greffe de cellules souches hématopoïétiques, vers un traitement ciblé.

Plus précisément, nous pouvons retenir les moments suivants :

- jusque vers les années 1970, les traitements de la LMC n'étaient que palliatifs, c'est-à-dire ni personnalisés ni ciblés ;
- dans les années 1970, l'introduction de la greffe de cellules souches hématopoïétiques dans le traitement de la LMC représente un exemple d'une prise en charge personnalisée, la décision de greffer se basant essentiellement sur des critères liés au patient, comme l'âge, la compatibilité HLA entre greffon et hôte (test génétique) ;
- dans les années 2000, l'apparition des thérapies ciblées par inhibiteurs de tyrosine kinase a révolutionné le traitement de la LMC et dans le même temps, la pratique de la greffe a été marginalisée.

Depuis, des études de pharmacogénétique ont été réalisées. Cependant il ne semble pas que leurs résultats puissent permettre de personnaliser un traitement par inhibiteur de tyrosine kinase. La raison principale réside, semble-t-il, dans le fait que de nouvelles générations de molécules possédant des spectres d'action variables ont fait leurs apparitions. Les recommandations des experts pour le traitement de la LMC par inhibiteur de tyrosine kinase est de réaliser un suivi de la réponse moléculaire majeure (figure 5) et de procéder à un ajustement de dose

voire un changement de molécule en cas de réponse non satisfaisante.

Comme pour la distinction que nous avons précisée au sujet des notions de pharmacogénomique et de pharmacogénétique, ces observations permettent de préciser les notions de thérapie ciblée et de thérapie personnalisée respectivement. Une thérapie ciblée en cancérologie va dépendre du génome somatique d'un ensemble de cellules transformées et de l'établissement d'un diagnostique. Une thérapie personnalisée dépendrait quant à elle des caractéristiques *normales* des patients, elles ne sont donc pas forcément liées à la maladie.

La confusion qui peut être faite entre thérapies ciblées et personnalisées en cancérologie provient, semble-t-il, du fait que les deux approches nécessitent de pratiquer un examen génétique sur un prélèvement biologique du patient. Cependant, dans le premier cas il s'agit d'affiner un diagnostique et dans le second cas, le but est de dresser le profil génétique d'un patient et non de sa tumeur.

A ce stade, il est aussi important de noter que les études d'association proposées ont été effectuées sur un ensemble de patients dont les caractéristiques sont comparables à celles des patients provenant d'études déjà publiées, en particulier, en terme de répartition homme–femme, de répartition entre les différents scores de risques de Sokal au diagnostique et d'âge au diagnostique (table 10). Ces observations sont de nature à donner du crédit à nos résultats.

Les autres caractéristiques en accord avec les données de la littérature sont les suivantes :

- la stratification des patients en fonction du score de risque de Sokal coïncide avec des niveaux d'incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure distincts conformément aux niveaux de risques (figure 14) ;
- les patients ayant reçu une dose de 600mg/j d'imatinib ont une incidence cumulée de la réponse moléculaire majeure supérieure aux patients traités avec 400mg/j (figure 15) ;
- il existe une relation affine inverse entre les bénéfices dus à une augmentation de la dose et le niveau de risque de Sokal (figure 17).

Finalement, une partie importante de cette thèse a été consacrée à présenter des aspects d'ordre méthodologiques. Dans la partie III nous avons exposé brièvement les outils statistiques utilisés pour les études d'associations. Nous avons présenté en particulier les formules permettant d'estimer la variance de l'incidence cumulée implémentée dans les différentes librairies d'analyse statistique (ce point est peu documenté dans les manuels d'utilisation).

Nous avons aussi adapté la formule proposée par Latouche, Porcher et Chevret permettant d'estimer le nombre de sujets nécessaires en présence de compétition, au contexte de notre étude où le nombre de patients n'est pas une variable d'ajus-

tement. Dans ce contexte, la seule variable disponible afin d'obtenir un niveau de puissance statistique souhaité est le taux d'exposition, c'est-à-dire, la fréquence allélique des marqueurs à tester. La prise en compte de cette contrainte indique qu'une fréquence allélique d'au moins 10% est souhaitable dans notre contexte (§ 14 et figure 11).

Dans la partie VI nous avons proposé une méthode basée sur l'imputation multiple afin de prendre en compte la censure par intervalles rencontrées dans notre étude. Cette caractéristique est relative à un suivi périodique des patients. Dans la LMC, cette caractéristique est présente tandis que les patients demeurent à risque de progression ou de toxicité pouvant être à l'origine d'un changement de stratégie thérapeutique. Par conséquent, les données produites sont censurées par intervalles en présence de compétition (*interval censored competing risks data*). Dans ce contexte, nous avons montré qu'il est possible d'adapter les méthodes d'imputation multiple proposées dans le cadre du modèle de Cox au modèle de régression à risques de sous répartitions proportionnels de Fine et Gray (§ 26). D'une part, cette méthode présente l'avantage de ne pas dépendre de l'hypothèse d'une censure par intervalle non informative et d'autre part, nous avons pu montrer au travers de simulations, que cette méthode permet d'obtenir une estimation du coefficient de régression plus précise qu'avec la méthode de l'imputation simple habituellement utilisée (table 25).



## Références

- [1] Garrod A.E.. *The Inborn Factors in Disease : An Essay*. Clarendon Press 1931.
- [2] Alving A. S., Carson P. E., Flanagan C. L., Ickes C. E.. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science*. 1956;124 :484–485.
- [3] Tarlov Alvin R, Brewer George J, Carson Paul E, Alving Alf S. Primaquine sensitivity : Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency : An inborn error of metabolism of medical and biological significance *Archives of internal medicine*. 1962;109 :209–234.
- [4] Mancinelli L., Cronin M., Sadè W.. Pharmacogenomics : the promise of personalized medicine. *AAPS PharmSci*. 2000;2 :E4.
- [5] Goldstein David B, Tate Sarah K, Sisodiya Sanjay M. Pharmacogenetics goes genomic. *Nat Rev Genet*. 2003;4 :937–947.
- [6] Kalow W.. Pharmacogenetics and pharmacogenomics : origin, status, and the hope for personalized medicine. *Pharmacogenomics J*. 2006;6 :162–165.
- [7] Maliepaard Marc, Nofziger Charity, Papaluca Marisa, Zineh Issam, Uyama Yoshiaki, Prasad Krishna, et al. Pharmacogenetics in the evaluation of new drugs : a multiregional regulatory perspective. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12 :103–115.
- [8] Walgren Richard A, Meucci Melissa A, McLeod Howard L. Pharmacogenomic discovery approaches : will the real genes please stand up? *J Clin Oncol*. 2005;23 :7342–7349.
- [9] Weinshilboum Richard M, Wang Liewei. Pharmacogenetics and pharmacogenomics : development, science, and translation. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2006;7 :223–245.
- [10] Coate Linda, Cuffe Sinead, Horgan Anne, Hung Rayjean J, Christiani David, Liu Geoffrey. Germline genetic variation, cancer outcome, and pharmacogenetics. *J Clin Oncol*. 2010;28 :4029–4037.
- [11] Need Anna C, Motulsky Arno G, Goldstein David B. Priorities and standards in pharmacogenetic research. *Nat Genet*. 2005;37 :671–681.
- [12] Hertz Daniel L, McLeod Howard L. Use of pharmacogenetics for predicting cancer prognosis and treatment exposure, response and toxicity. *J Hum Genet*. 2013;58 :346–352.
- [13] Spear B. B., Heath-Chiozzi M., Huff J.. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med*. 2001;7 :201–204.
- [14] Jordan V. Craig. Tamoxifen : catalyst for the change to targeted therapy. *Eur J Cancer*. 2008;44 :30–38.
- [15] Blay Jean-Yves, Mehren Margaret. Nilotinib : a novel, selective tyrosine kinase inhibitor. *Semin Oncol*. 2011;38 Suppl 1 :S3–S9.
- [16] Druker Brian J. Circumventing resistance to kinase-inhibitor therapy. *N Engl J Med*. 2006;354 :2594–2596.

- [17] McCormack Paul L, Keam Susan J. Dasatinib : a review of its use in the treatment of chronic myeloid leukaemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Drugs*. 2011 ;71 :1771–1795.
- [18] Meyer Urs A. Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev Genet*. 2004 ;5 :669–676.
- [19] Rieder Mark J, Reiner Alexander P, Gage Brian F, Nickerson Deborah A, Eby Charles S, McLeod Howard L, et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med*. 2005 ;352 :2285–2293.
- [20] DeLisi Charles. Meetings that changed the world : Santa Fe 1986 : Human genome baby-steps. *Nature*. 2008 ;455 :876–877.
- [21] Thorisson Gudmundur A, Stein Lincoln D. The SNP Consortium website : past, present and future. *Nucleic Acids Res*. 2003 ;31 :124–127.
- [22] Consortium International HapMap. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005 ;437 :1299–1320.
- [23] Consortium International HapMap, Frazer Kelly A, Ballinger Dennis G, Cox David R, Hinds David A, Stuve Laura L, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007 ;449 :851–861.
- [24] Consortium International HapMap 3, Altshuler David M, Gibbs Richard A, Peltonen Leena, Altshuler David M, Gibbs Richard A, et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*. 2010 ;467 :52–58.
- [25] Esteller Manel. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008 ;358 :1148–1159.
- [26] Dawson Mark A, Kouzarides Tony. Cancer epigenetics : from mechanism to therapy. *Cell*. 2012 ;150 :12–27.
- [27] Bady Pierre, Sciuscio Davide, Diserens Annie-Claire, Bloch Jocelyne, Bent Martin J, Marosi Christine, et al. MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status. *Acta Neuropathol*. 2012 ;124 :547–560.
- [28] Montgomery Stephen B, Dermitzakis Emmanouil T. From expression QTLs to personalized transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2011 ;12 :277–282.
- [29] Henry N. Lynn, Hayes Daniel F. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer. *Oncologist*. 2006 ;11 :541–552.
- [30] Tajik Parvin, Zwinderman Aleiko H., Mol Ben W., Bossuyt Patrick M.. Trial designs for personalizing cancer care : a systematic review and classification. *Clin Cancer Res*. 2013 ;19 :4578–4588.
- [31] Simon R., Wang S-J.. Use of genomic signatures in therapeutics development in oncology and other diseases. *Pharmacogenomics J*. 2006 ;6 :166–173.

- [32] Bogaerts Jan, Cardoso Fatima, Buyse Marc, Braga Sofia, Loi Sherene, Harrison Jillian A, et al. Gene signature evaluation as a prognostic tool : challenges in the design of the MINDACT trial. *Nat Clin Pract Oncol.* 2006 ;3 :540–551.
- [33] Sparano Joseph A. TAILORx : trial assigning individualized options for treatment (Rx). *Clin Breast Cancer.* 2006 ;7 :347–350.
- [34] Simon Richard M, Paik Soonmyung, Hayes Daniel F. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst.* 2009 ;101 :1446–1452.
- [35] Hayes D. F., Bast R. C., Desch C. E., Fritsche H., Kemeny N. E., Jessup J. M., et al. Tumor marker utility grading system : a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst.* 1996 ;88 :1456–1466.
- [36] Karapetis Christos S, Khambata-Ford Shirin, Jonker Derek J, O’Callaghan Chris J, Tu Dongsheng, Tebbutt Niall C, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2008 ;359 :1757–1765.
- [37] Hunter David J, Khoury Muin J, Drazen Jeffrey M. Letting the genome out of the bottle—will we get our wish? *N Engl J Med.* 2008 ;358 :105–107.
- [38] Amado Rafael G, Wolf Michael, Peeters Marc, Cutsem Eric Van, Siena Salvatore, Freeman Daniel J, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008 ;26 :1626–1634.
- [39] Allegra Carmen J, Jessup J. Milburn, Somerfield Mark R, Hamilton Stanley R, Hammond Elizabeth H, Hayes Daniel F, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion : testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol.* 2009 ;27 :2091–2096.
- [40] Sawyers C. L.. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999 ;340 :1330–1340.
- [41] Savage D. G., Szydlo R. M., Goldman J. M.. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br J Haematol.* 1997 ;96 :111–116.
- [42] Silver R. T., Woolf S. H., Hehlmann R., Appelbaum F. R., Anderson J., Bennett C., et al. An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia : developed for the American Society of Hematology. *Blood.* 1999 ;94 :1517–1536.
- [43] Kantarjian H. M., Dixon D., Keating M. J., Talpaz M., Walters R. S., McCredie K. B., et al. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer.* 1988 ;61 :1441–1446.
- [44] Nowell Peter C. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science.* 1960 ;132 :1497.
- [45] Geary C. G.. The story of chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2000 ;110 :2–11.

- [46] Rowley J. D.. Letter : A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243 :290–293.
- [47] Klein A., Kessel A. G., Grosveld G., Bartram C. R., Hagemeijer A., Bootsma D., et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1982;300 :765–767.
- [48] Shtivelman E., Lifshitz B., Gale R. P., Canaani E.. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*. 1985;315 :550–554.
- [49] Prakash O., Yunis J. J.. High resolution chromosomes of the t(9;22) positive leukemias. *Cancer Genet Cytogenet*. 1984;11 :361–367.
- [50] Pane F., Frigeri F., Sindona M., Luciano L., Ferrara F., Cimino R., et al. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia : a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction) *Blood*. 1996;88 :2410–2414.
- [51] Lugo T. G., Pendergast A. M., Muller A. J., Witte O. N.. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990;247 :1079–1082.
- [52] Rohrbacher Maren, Hasford Joerg. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009;22 :295–302.
- [53] Corm S, Micol J, Leroyer A, Daudignon A, Preudhomme C, Poulain S, et al. Kinetic of chronic myeloid leukaemia (CML) prevalence in Northern France since the introduction of imatinib *J Clin Oncol*. 2008;26 :7088.
- [54] Corm Selim, Roche Laurent, Micol Jean-Baptiste, Coiteux Valérie, Bossard Nadine, Nicolini Franck-Emmanuel, et al. Changes in the dynamics of the excess mortality rate in chronic phase-chronic myeloid leukemia over 1990-2007 : a population study. *Blood*. 2011;118 :4331–4337.
- [55] Cross N. C., Feng L., Chase A., Bungey J., Hughes T. P., Goldman J. M.. Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. *Blood*. 1993;82 :1929–1936.
- [56] Baccarani Michele, Deininger Michael W, Rosti Gianantonio, Hochhaus Andreas, Soverini Simona, Apperley Jane F, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia : 2013 *Blood*. 2013;122 :872–884.
- [57] Hughes Timothy P, Branford Susan. Monitoring disease response to tyrosine kinase inhibitor therapy in CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009 :477–487.
- [58] Hehlmann R., Heimpel H., Hasford J., Kolb H. J., Pralle H., Hossfeld D. K., et al. Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood*. 1994;84 :4064–4077.

- [59] Hehlmann R., Heimpel H., Hasford J., Kolb H. J., Pralle H., Hossfeld D. K., et al. Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia : prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group. *Blood*. 1993;82 :398–407.
- [60] Baccarani Michele, Saglio Giuseppe, Goldman John, Hochhaus Andreas, Simonsson Bengt, Appelbaum Frederick, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia : recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006;108 :1809–1820.
- [61] Thomas E. D., Clift R. A., Fefer A., Appelbaum F. R., Beatty P., Bensinger W. I., et al. Marrow transplantation for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Ann Intern Med*. 1986;104 :155–163.
- [62] Jiang Y. Z., Barrett A. J., Goldman J. M., Mavroudis D. A.. Association of natural killer cell immune recovery with a graft-versus-leukemia effect independent of graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Hematol*. 1997;74 :1–6.
- [63] Ruggeri Loredana, Capanni Marusca, Urbani Elena, Perruccio Katia, Shlomchik Warren D, Tosti Antonella, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295 :2097–2100.
- [64] Horowitz M. M., Rowlings P. A., Passweg J. R.. Allogeneic bone marrow transplantation for CML : a report from the International Bone Marrow Transplant Registry. *Bone Marrow Transplant*. 1996;17 Suppl 3 :S5–S6.
- [65] Delage R., Ritz J., Anderson K. C.. The evolving role of bone marrow transplantation in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1990;4 :369–388.
- [66] Visani G., Rosti G., Bandini G., Tosi P., Isidori A., Malagola M., et al. Second chronic phase before transplantation is crucial for improving survival of blastic phase chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2000;109 :722–728.
- [67] Hehlmann R., Berger U., Pfirrmann M., Hochhaus A., Metzgeroth G., Maywald O., et al. Randomized comparison of interferon alpha and hydroxyurea with hydroxyurea monotherapy in chronic myeloid leukemia (CML-study II) : prolongation of survival by the combination of interferon alpha and hydroxyurea. *Leukemia*. 2003;17 :1529–1537.
- [68] Baccarani Michele, Russo Domenico, Rosti Gianantonio, Martinelli Giovanni. Interferon-alfa for chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol*. 2003;40 :22–33.
- [69] Preudhomme Claude, Guilhot Joëlle, Nicolini Franck Emmanuel, Guerci-Bresler Agnès, Rigal-Huguet Françoise, Maloisel Frederic, et al. Imatinib plus peginterferon alfa-2a in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;363 :2511–2521.
- [70] Druker B. J., Tamura S., Buchdunger E., Ohno S., Segal G. M., Fanning S., et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996;2 :561–566.

- [71] Druker B. J., Talpaz M., Resta D. J., Peng B., Buchdunger E., Ford J. M., et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2001 ;344 :1031–1037.
- [72] Kantarjian Hagop, Sawyers Charles, Hochhaus Andreas, Guilhot François, Schiffer Charles, Gambacorti-Passerini Carlo, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med.* 2002 ;346 :645–652.
- [73] O'Brien Stephen G, Guilhot François, Larson Richard A, Gathmann Insa, Baccarani Michele, Cervantes Francisco, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2003 ;348 :994–1004.
- [74] Hughes Tim P, Kaeda Jaspal, Branford Susan, Rudzki Zbigniew, Hochhaus Andreas, Hensley Martee L, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2003 ;349 :1423–1432.
- [75] Cross N. C P, White H. E., Müller M. C., Saglio G., Hochhaus A.. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2012 ;26 :2172–2175.
- [76] Radich Jerald P. How I monitor residual disease in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2009 ;114 :3376–3381.
- [77] Kantarjian Hagop, Shah Neil P, Hochhaus Andreas, Cortes Jorge, Shah Sandip, Ayala Manuel, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010 ;362 :2260–2270.
- [78] Saglio Giuseppe, Kim Dong-Wook, Issaragrisil Surapol, Coutre Philipp, Etienne Gabriel, Lobo Clarisse, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010 ;362 :2251–2259.
- [79] Kantarjian Hagop, Talpaz Moshe, O'Brien Susan, Garcia-Manero Guillermo, Verstovsek Srdan, Giles Francis, et al. High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2004 ;103 :2873–2878.
- [80] Cortes Jorge E, Kantarjian Hagop M, Goldberg Stuart L, Powell Bayard L, Giles Francis J, Wetzler Meir, et al. High-dose imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia : high rates of rapid cytogenetic and molecular responses. *J Clin Oncol.* 2009 ;27 :4754–4759.
- [81] Cortes Jorge E, Baccarani Michele, Guilhot François, Druker Brian J, Branford Susan, Kim Dong-Wook, et al. Phase III, randomized, open-label study of daily imatinib mesylate 400 mg versus 800 mg in patients with newly diagnosed, previously untreated chronic myeloid leukemia in chronic phase using molecular end points : tyrosine kinase inhibitor optimization and selectivity study. *J Clin Oncol.* 2010 ;28 :424–430.

- [82] Hehlmann Rüdiger, Lauseker Michael, Jung-Munkwitz Susanne, Leitner Armin, Müller Martin C, Pletsch Nadine, et al. Tolerability-adapted imatinib 800 mg/d versus 400 mg/d versus 400 mg/d plus interferon-alpha in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2011;29 :1634–1642.
- [83] Deininger Michael W, Kopecky Kenneth J, Radich Jerald P, Kamel-Reid Suzanne, Stock Wendy, Paietta Elisabeth, et al. Imatinib 800 mg daily induces deeper molecular responses than imatinib 400 mg daily : results of SWOG S0325, an intergroup randomized PHASE II trial in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2014;164 :223–232.
- [84] Oken M. M., Creech R. H., Tormey D. C., Horton J., Davis T. E., McFadden E. T., et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982;5 :649–655.
- [85] Sokal J. E., Cox E. B., Baccarani M., Tura S., Gomez G. A., Robertson J. E., et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood.* 1984;63 :789–799.
- [86] Hasford J., Pffirmann M., Hehlmann R., Allan N. C., Baccarani M., Kluin-Nelemans J. C., et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90 :850–858.
- [87] Hasford Joerg, Baccarani Michele, Hoffmann Verena, Guilhot Joëlle, Saussele Susanne, Rosti Gianantonio, et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment : the EUTOS score. *Blood.* 2011;118 :686–692.
- [88] Proetel Ulrike, Pletsch Nadine, Lauseker Michael, Müller Martin C, Hanfstein Benjamin, Krause Stefan W, et al. Older patients with chronic myeloid leukemia ( $\geq 65$  years) profit more from higher imatinib doses than younger patients : a subanalysis of the randomized CML-Study IV. *Ann Hematol.* 2014;93 :1167–1176.
- [89] Baccarani Michele, Castagnetti Fausto, Gugliotta Gabriele, Rosti Gianantonio. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. *Ann Hematol.* 2015;94 Suppl 2 :S141–S147.
- [90] Apperley Jane F. Part I : mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* 2007;8 :1018–1029.
- [91] Dulucq Stéphanie, Krajcinovic Maja. The pharmacogenetics of imatinib. *Genome Med.* 2010;2 :85.
- [92] Deininger Michael. Resistance to imatinib : mechanisms and management. *J Natl Compr Canc Netw.* 2005;3 :757–768.
- [93] Peng Bin, Lloyd Peter, Schran Horst. Clinical pharmacokinetics of imatinib. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44 :879–894.

- [94] Dulucq Stéphanie, Bouchet Stéphane, Turcq Béatrice, Lippert Eric, Etienne Gabriel, Reiffers Josy, et al. Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2008 ;112 :2024–2027.
- [95] Deenik Wendy, Holt Bronno, Verhoef Gregor E G, Smit Willem M, Kersten Marie J, Kluin-Nelemans Hanneke C, et al. Dose-finding study of imatinib in combination with intravenous cytarabine : feasibility in newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2008 ;111 :2581–2588.
- [96] Bazeos A., Marin D., Reid A. G., Gerrard G., Milojkovic D., May P. C., et al. hOCT1 transcript levels and single nucleotide polymorphisms as predictive factors for response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010 ;24 :1243–1245.
- [97] Takahashi Naoto, Miura Masatomo, Scott Stuart A, Kagaya Hideaki, Kameoka Yoshihiro, Tagawa Hiroyuki, et al. Influence of CYP3A5 and drug transporter polymorphisms on imatinib trough concentration and clinical response among patients with chronic phase chronic myeloid leukemia. *J Hum Genet*. 2010 ;55 :731–737.
- [98] Hantschel Oliver, Rix Uwe, Superti-Furga Giulio. Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. *Leuk Lymphoma*. 2008 ;49 :615–619.
- [99] Blake Stephen J, Lyons A. Bruce, Fraser Cara K, Hayball John D, Hughes Timothy P. Dasatinib suppresses in vitro natural killer cell cytotoxicity. *Blood*. 2008 ;111 :4415–4416.
- [100] Boissel Nicolas, Rea Delphine, Tieng Vannary, Dulphy Nicolas, Brun Manuel, Cayuela Jean-Michel, et al. BCR/ABL oncogene directly controls MHC class I chain-related molecule A expression in chronic myelogenous leukemia. *J Immunol*. 2006 ;176 :5108–5116.
- [101] Mustjoki S., Ekblom M., Arstila T. P., Dybedal I., Epling-Burnette P. K., Guilhot F., et al. Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy. *Leukemia*. 2009 ;23 :1398–1405.
- [102] Rohon Peter, Porkka Kimmo, Mustjoki Satu. Immunoprofiling of patients with chronic myeloid leukemia at diagnosis and during tyrosine kinase inhibitor therapy. *Eur J Haematol*. 2010 ;85 :387–398.
- [103] Ohyashiki Kazuma, Katagiri Sei-ichiro, Tauchi Tetsuzo, Ohyashiki Junko H, Maeda Yasuhiro, Matsumura Itaru, et al. Increased natural killer cells and decreased CD3+ CD8+ CD62L+ T cells in CML patients who sustained complete molecular remission after discontinuation of imatinib *British journal of haematology*. 2012 ;157 :254–256.
- [104] Mizoguchi Izuru, Yoshimoto Takayuki, Katagiri Seiichiro, Mizuguchi Junichiro, Tauchi Tetsuzo, Kimura Yukihiko, et al. Sustained upregulation of effector natural

- killer cells in chronic myeloid leukemia after discontinuation of imatinib. *Cancer Sci.* 2013;104 :1146–1153.
- [105] Oppenheim David E, Roberts Scott J, Clarke Sarah L, Filler Renata, Lewis Julie M, Tigelaar Robert E, et al. Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol.* 2005;6 :928–937.
- [106] Marin D., Gabriel I. H., Ahmad S., Foroni L., Lavallade H., Clark R., et al. KIR2DS1 genotype predicts for complete cytogenetic response and survival in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Leukemia.* 2012;26 :296–302.
- [107] Kreutzman Anna, Jaatinen Taina, Greco Dario, Vakkila Emmi, Richter Johan, Ekblom Marja, et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptor gene profile predicts good molecular response to dasatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Exp Hematol.* 2012;40 :906–913.e1.
- [108] Ali Sara, Sergeant Ruhena, O’Brien Stephen G, Foroni Letizia, Hedgley Corinne, Gerrard Gareth, et al. Dasatinib may overcome the negative prognostic impact of KIR2DS1 in newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2012;120 :697–698.
- [109] Nasa Giorgio La, Caocci Giovanni, Littera Roberto, Atzeni Sandra, Vacca Adriana, Mulas Olga, et al. Homozygosity for killer immunoglobulin-like receptor haplotype A predicts complete molecular response to treatment with tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients. *Exp Hematol.* 2013;41 :424–431.
- [110] Sabaté Eduardo. *Adherence to long-term therapies : evidence for action.* World Health Organization 2003.
- [111] Noens Lucien, Lierde Marie-Anne, Bock Robrecht De, Verhoef Gregor, Zachée Pierre, Berneman Zwi, et al. Prevalence, determinants, and outcomes of nonadherence to imatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia : the ADA-GIO study. *Blood.* 2009;113 :5401–5411.
- [112] Rosti Gianantonio, Castagnetti Fausto, Gugliotta Gabriele, Palandri Francesca, Baccarani Michele. Physician’s guide to the clinical management of adverse events on nilotinib therapy for the treatment of CML. *Cancer Treat Rev.* 2012;38 :241–248.
- [113] Efficace F., Baccarani M., Breccia M., Cottone F., Alimena G., Deliliers G. L., et al. Chronic fatigue is the most important factor limiting health-related quality of life of chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Leukemia.* 2013;27 :1511–1519.
- [114] Baccarani Michele, Castagnetti Fausto, Gugliotta Gabriele, Palandri Francesca, Rosti Gianantonio. Treatment recommendations for chronic myeloid leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2014;6 :e2014005.

- [115] Skolnick Jeffrey, Gao Mu. Interplay of physics and evolution in the likely origin of protein biochemical function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110 :9344–9349.
- [116] Hanfstein B., Shlyakhto V., Lauseker M., Hehlmann R., Saussele S., Dietz C., et al. Velocity of early BCR-ABL transcript elimination as an optimized predictor of outcome in chronic myeloid leukemia (CML) patients in chronic phase on treatment with imatinib. *Leukemia.* 2014;28 :1988–1992.
- [117] Rousselot Philippe, Huguet Françoise, Réa Delphine, Legros Laurence, Cayuela Jean Michel, Maarek Odile, et al. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood.* 2007;109 :58–60.
- [118] Ross D. M., Branford S., Seymour J. F., Schwarzer A. P., Arthur C., Bartley P. A., et al. Patients with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response after stopping imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR. *Leukemia.* 2010;24 :1719–1724.
- [119] Mahon François-Xavier, Réa Delphine, Guilhot Joëlle, Guilhot François, Huguet Françoise, Nicolini Franck, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years : the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* 2010;11 :1029–1035.
- [120] Takahashi Naoto, Kyo Taiichi, Maeda Yasuhiro, Sugihara Takashi, Usuki Kensuke, Kawaguchi Tatsuya, et al. Discontinuation of imatinib in Japanese patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica.* 2012;97 :903–906.
- [121] Sobrinho-Simoes Manuel, Wilczek Vicki, Score Joannah, Cross Nicholas C P, Apperley Jane F, Melo Junia V. In search of the original leukemic clone in chronic myeloid leukemia patients in complete molecular remission after stem cell transplantation or imatinib. *Blood.* 2010;116 :1329–1335.
- [122] Biernaux C., Loos M., Sels A., Huez G., Stryckmans P.. Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. *Blood.* 1995;86 :3118–3122.
- [123] Bose S., Deininger M., Gora-Tybor J., Goldman J. M., Melo J. V.. The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals : biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood.* 1998;92 :3362–3367.
- [124] Larson R. A., Hochhaus A., Hughes T. P., Clark R. E., Etienne G., Kim D-W., et al. Nilotinib vs imatinib in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase : ENESTnd 3-year follow-up. *Leukemia.* 2012;26 :2197–2203.
- [125] Hazzouri Adina Zeki Al, Haan Mary N, Kalbfleisch John D, Galea Sandro, Lisabeth Lynda D, Aiello Allison E. Life-course socioeconomic position and incidence of dementia and cognitive impairment without dementia in older Mexican Ameri-

- cans : results from the Sacramento area Latino study on aging. *Am J Epidemiol.* 2011 ;173 :1148–1158.
- [126] Gooley T. A., Leisenring W., Crowley J., Storer B. E.. Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks : new representations of old estimators. *Stat Med.* 1999 ;18 :695–706.
- [127] Kaplan Edward L, Meier Paul. Nonparametric estimation from incomplete observations *Journal of the American statistical association.* 1958 ;53 :457–481.
- [128] Bernoulli Daniel. Essai d’une nouvelle analyse de la mortalité causée par la petite vérole et des avantages de l’inoculation pour la prévenir *Histoire de l’Acad. Roy. Sci.(Paris) avec Mém. des Math. et Phys. and Mém.* 1760 :1–45.
- [129] Marubini Ettore, Valsecchi Maria Grazia. *Analysing survival data from clinical trials and observational studies.* John Wiley & Sons 1995.
- [130] Hosmer DW, Lemeshow S, May S. *Applied Survival Analysis : Regression Modeling of Time-to-Event Data.* John Wiley & Sons 2008.
- [131] Lin Guixian, So Ying, Johnston Gordon. Analyzing Survival Data with Competing Risks Using SAS® Software. *SAS Global Forum 2012.* 2012.
- [132] Choudhury Jahar B. Non-parametric confidence interval estimation for competing risks analysis : application to contraceptive data. *Stat Med.* 2002 ;21 :1129–1144.
- [133] Fine Jason P, Gray Robert J. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk *Journal of the American Statistical Association.* 1999 ;94 :496–509.
- [134] Gray Robert J. A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk *The Annals of statistics.* 1988 :1141–1154.
- [135] Latouche Aurélien, Porcher Raphaël, Chevret Sylvie. Sample size formula for proportional hazards modelling of competing risks. *Stat Med.* 2004 ;23 :3263–3274.
- [136] Kalbfleisch JD, Prentice RL. The statistical analysis of failure time data *Wiley series in probability and mathematical statistics.* 1980.
- [137] Benjamini Yoav, Hochberg Yosef. Controlling the false discovery rate : a practical and powerful approach to multiple testing *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological).* 1995 :289–300.
- [138] Schaid Daniel J, Rowland Charles M, Tines David E, Jacobson Robert M, Poland Gregory A. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *Am J Hum Genet.* 2002 ;70 :425–434.
- [139] R Core Team . *R : A Language and Environment for Statistical Computing.* R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria 2014.
- [140] Gray Robert J. *cmprsk : Subdistribution Analysis of Competing Risks* 2013. R package version 2.2-6.
- [141] JP Sinnwell, DJ Schaid. *haplo.stats : Statistical Analysis of Haplotypes with Traits and Covariates when Linkage Phase is Ambiguous* 2013. R package version 1.6.8.

- [142] Doyle L. A., Yang W., Abruzzo L. V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A. K., et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95 :15665–15670.
- [143] Ozvegy-Laczka Csilla, Hegedus Tamàs, Vàrady György, Ujhelly Olga, Schuetz John D, Vàradi Andràs, et al. High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. *Mol Pharmacol.* 2004;65 :1485–1495.
- [144] Maliepaard M., Scheffer G. L., Faneyte I. F., Gastelen M. A., Pijnenborg A. C., Schinkel A. H., et al. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* 2001;61 :3458–3464.
- [145] Smith Kevin D, Paterson Sarah. Binding of alpha-1-acid glycoprotein to imatinib following increased dosage of drug. *Haematologica.* 2005;90 Suppl :ELT01.
- [146] Burger Herman, Tol Hans, Brok Mariël, Wiemer Erik A C, Bruijn Ernst A, Guetens Gunther, et al. Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. *Cancer Biol Ther.* 2005;4 :747–752.
- [147] Lima Luciene Terezina, Vivona Douglas, Bueno Carolina Tosin, Hirata Rosario D C, Hirata Mario H, Luchessi André D, et al. Reduced ABCG2 and increased SLC22A1 mRNA expression are associated with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Med Oncol.* 2014;31 :851.
- [148] Vivier Eric, Raulet David H, Moretta Alessandro, Caligiuri Michael A, Zitvogel Laurence, Lanier Lewis L, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science.* 2011;331 :44–49.
- [149] Lanier Lewis L. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005;23 :225–274.
- [150] Champsaur Marine, Lanier Lewis L. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol Rev.* 2010;235 :267–285.
- [151] Steinle A., Li P., Morris D. L., Groh V., Lanier L. L., Strong R. K., et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics.* 2001;53 :279–287.
- [152] Cosman D., Müllberg J., Sutherland C. L., Chin W., Armitage R., Fanslow W., et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity.* 2001;14 :123–133.
- [153] Garrido F., Ruiz-Cabello F., Cabrera T., Pérez-Villar J. J., López-Botet M., Duggan-Keen M., et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today.* 1997;18 :89–95.
- [154] Ljunggren H. G., Kärre K.. In search of the 'missing self' : MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today.* 1990;11 :237–244.

- [155] Girardi M., Oppenheim D. E., Steele C. R., Lewis J. M., Glusac E., Filler R., et al. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science*. 2001 ;294 :605–609.
- [156] Diefenbach A., Jensen E. R., Jamieson A. M., Raulet D. H.. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature*. 2001 ;413 :165–171.
- [157] Zinkernagel R. M., Doherty P. C.. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature*. 1974 ;251 :547–548.
- [158] Houghton A. N.. Cancer antigens : immune recognition of self and altered self. *J Exp Med*. 1994 ;180 :1–4.
- [159] Sconocchia Giuseppe, Lau Michelle, Provenzano Maurizio, Rezvani Katayoun, Wongsena Wachanan, Fujiwara Hiroshi, et al. The antileukemia effect of HLA-matched NK and NK-T cells in chronic myelogenous leukemia involves NKG2D-target-cell interactions. *Blood*. 2005 ;106 :3666–3672.
- [160] Salih Helmut R, Rammensee Hans-Georg, Steinle Alexander. Cutting edge : down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol*. 2002 ;169 :4098–4102.
- [161] Groh Veronika, Wu Jennifer, Yee Cassian, Spies Thomas. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002 ;419 :734–738.
- [162] Xie Xiaohui, Lu Jun, Kulbokas E. J., Golub Todd R, Mootha Vamsi, Lindblad-Toh Kerstin, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*. 2005 ;434 :338–345.
- [163] Pardoll D. M.. Immunology. Stress, NK receptors, and immune surveillance. *Science*. 2001 ;294 :534–536.
- [164] Waldhauer I., Steinle A.. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*. 2008 ;27 :5932–5943.
- [165] Raulet D. H., Held W., Correa I., Dorfman J. R., Wu M. F., Corral L.. Specificity, tolerance and developmental regulation of natural killer cells defined by expression of class I-specific Ly49 receptors. *Immunol Rev*. 1997 ;155 :41–52.
- [166] Raulet D. H., Vance R. E., McMahon C. W.. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol*. 2001 ;19 :291–330.
- [167] Ljunggren Hans-Gustaf, Malmberg Karl-Johan. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol*. 2007 ;7 :329–339.
- [168] Lindsey J. C., Ryan L. M.. Tutorial in biostatistics methods for interval-censored data. *Stat Med*. 1998 ;17 :219–238.
- [169] Heller Glenn. Proportional hazards regression with interval censored data using an inverse probability weight. *Lifetime Data Anal*. 2011 ;17 :373–385.
- [170] Sun Xing, Li Xiaoyun, Chen Cong, Song Yang. A review of statistical issues with progression-free survival as an interval-censored time-to-event endpoint. *J Biopharm Stat*. 2013 ;23 :986–1003.

- [171] Hudgens Michael G, Li Chenxi, Fine Jason P. Parametric likelihood inference for interval censored competing risks data. *Biometrics*. 2014 ;70 :1–9.
- [172] Pan W.. A multiple imputation approach to Cox regression with interval-censored data. *Biometrics*. 2000 ;56 :199–203.
- [173] Rubin Donald B. *Multiple imputation for nonresponse in surveys*. Wiley (New York) 1987.
- [174] Marti Helena, Chavance Michel. Multiple imputation analysis of case-cohort studies. *Stat Med*. 2011 ;30 :1595–1607.
- [175] Tanner Martin A, Wong Wing Hung. The calculation of posterior distributions by data augmentation *Journal of the American statistical Association*. 1987 ;82 :528–540.
- [176] Wei G. C., Tanner M. A.. Applications of multiple imputation to the analysis of censored regression data. *Biometrics*. 1991 ;47 :1297–1309.
- [177] Wei Greg CG, Tanner Martin A. A Monte Carlo implementation of the EM algorithm and the poor man’s data augmentation algorithms *Journal of the American statistical Association*. 1990 ;85 :699–704.
- [178] Peto Richard. Experimental survival curves for interval-censored data *Applied Statistics*. 1973 :86–91.
- [179] Turnbull Bruce W. The empirical distribution function with arbitrarily grouped, censored and truncated data *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. 1976 :290–295.
- [180] Finkelstein D. M.. A proportional hazards model for interval-censored failure time data. *Biometrics*. 1986 ;42 :845–854.
- [181] Heitjan D. F.. The NSABP trials. *N Engl J Med*. 1994 ;331 :809–810.
- [182] Lawless JF, Babineau Denise. Models for interval censoring and simulation-based inference for lifetime distributions *Biometrika*. 2006 ;93 :671–686.
- [183] Haller Bernhard, Ulm Kurt. Flexible simulation of competing risks data following prespecified subdistribution hazards *Journal of Statistical Computation and Simulation*. 2014 ;84 :2557–2576.
- [184] Jackson Dan, White Ian R, Seaman Shaun, Evans Hannah, Baisley Kathy, Carpenter James. Relaxing the independent censoring assumption in the Cox proportional hazards model using multiple imputation. *Stat Med*. 2014 ;33 :4681–4694.
- [185] Zhang Zhigang, Sun Liuquan, Sun Jianguo, Finkelstein Dianne M. Regression analysis of failure time data with informative interval censoring. *Stat Med*. 2007 ;26 :2533–2546.
- [186] Latouche Aurélien. *Modèle de régression en présence de compétition*. PhD thesis Université Paris 6 2004.

## Index

### A

ABCG2, 103  
     BCRP, 111  
 Action cytotoxiques, 116  
 Adhérence, *voir* Observance  
 Algorithme, 32  
 Allocation des ressources, 31  
 Alloréactif, 115  
 Alving, 28  
 ANDA, 149  
 Anti-EGFR, 42  
 Approximation, 132  
 Arrêt de traitement, 31  
 Arsenic, 49  
 Assemblage, 133, 142  
 Augmentation des données, 134, 142  
     *Asymptotic Normal Data Augmentation*, 132, 135, 141, 145, 146  
     *Poor Man's Data Augmentation*, 132, 134, 136, 143, 146

### B

Bayes, 132  
     Densité *a posteriori*, 132  
     Estimation *a posteriori*, 133, 142  
 Biomarqueur, 37, 38, 157  
     Moléculaire, 72  
 Busulfan, 49

### C

Calcule du nombre de sujet nécessaire, *voir*  
     Puissance statistique  
 Cellules NK, 64, 114  
     Action cytotoxique, 114  
     NKG2A, 115, 119, 125  
     NKG2C, 125  
     NKG2D, 114, 119, 125  
     NKG2E, 125  
 Cellules souches hématopoïétiques, 46  
 Censure non informative, 152, 154

Censure par intervalles en présence de  
     compétition, 131, 142, 152  
 Chimiothérapie, 49, 50  
 Chromosome Philadelphie, 46, 47  
 Coûts, 31, 33  
     Coûts-bénéfices, 33  
     Coûts-efficacité, 33  
 Complexe NK, 125  
 Consentement éclairé, 88

### D

Déséquilibre de liaison, 36  
 Date de visite, 145  
 Distribution prédictive des données, 133  
 Données incomplètes, 71, 131  
     Censure à droite, 71, 142  
     Censure à gauche, 71  
     Censure par intervalles, 72, 136, 142  
 Données latentes, 132, 134, 135  
 Données manquantes, 131

### E

Effets secondaires, 30–32, 50, 56, 65, 67, 154  
 Epigénétique, 35  
     Méthylation de l'ADN, 35  
 Epissage alternatif, 35  
 eQTL, 36, 112, 125  
 ERC, 37  
 Essai  
     Contrôlé randomisé, 30, 41  
     Prospectif-Rétrospectif, 39, 41  
 Etude  
     Biomédicale, 131, 152, 154  
     D'association, 36  
     Epidémiologique, 39  
     Expérimentale, 39  
     Observationnelle, 39, 153  
     Prospective, 39  
     Rétrospective, 38, 39  
 Exon, 36

- Exposition, 154
- Expression des gènes, 28, 36  
 Signatures moléculaire, 37, 38  
 Transcriptome, 35
- F**
- Facteur d'inflation, 134
- Finkelstein, 136, 152
- Fonction d'incidence cumulée, 77, 136, 137, 154  
 Incidence cumulée de base, 82  
 Intervalle de confiance, 79  
 Variance, 79
- Fonction de risque cause-spécifique, 76, 154  
 Cumulé, 77
- Fonction de risque cumulé cause-spécifique  
 Estimateur de Nelson-Aalen, 78
- Fonction de risque de sous-répartition, 145, 153
- Fonction de risque instantané, 72
- Fonction de survie, 73  
 Estimation non paramétrique, 74  
 Kaplan et Meier, 74  
 Survie de base, 142  
 Survie de base (Breslow), 75
- Fréquence allélique, 85
- G**
- Génome  
 Génome constitutionnel, 29  
 Génome somatique, 29  
 Génotypage, 28, 33  
 Gène candidat, 30  
 Gène de fusion, 47  
 Pangénomique, 28, 30, 36
- Gène transporteur, 103
- Garrod, 28
- Greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques, 49, 50, 115  
 Conditionnement, 51
- H**
- Hématopoïèse extra médullaire, 59
- Haplotype, 70
- Hayes, 38, 41
- Helsinki (déclaration), 89
- Hertz, 29
- HLA-compatibilité, 51
- Human Genome Project*, 33
- Hydroxyurée, 49
- I**
- Imputation multiple, 131, 132, 152
- Imputation simple, 131, 146
- Incidence cumulée, 70
- Index thérapeutique, 32
- Inhibiteurs de tyrosine kinase, 50, 51  
 Bosutinib, 52  
 Dasatinib, 52, 56  
 Imatinib, 31, 52, 56  
 concentration intracellulaire, 112  
 concentration plasmatique, 112  
 Nilotinib, 52, 56  
 Ponatinib, 52
- Interféron- $\alpha$ , 50, 51, 56
- Intron, 36
- J**
- Janet Rowley, 46
- K**
- KRAS, 38, 42
- L**
- LMC, 31, 46, 49, 130, 157  
 Age, 59  
 Arrêt de traitement, 67  
 Crise blastique, 46, 49  
 Epidémiologie, 47  
 Espérance de vie, 64, 66  
 Gène de fusion, 47  
 Incidence, 47  
 Maladie résiduelle, 49, 53, 54, 64, 67  
 Monitoring, 53  
 Phase chronique, 46  
 Phase d'accélération, 46, 49  
 Prévalence, 48

- Réponse aux traitements, 48, 52  
 Déterminants, 55  
 Rémission hématologique, 50  
 Réponse cytogénétique complète, 50  
 Réponse moléculaire majeure, 49, 53, 57, 64, 67, 90, 114, 130  
 Réponse moléculaire précoce, 67  
 Score pronostique, 57  
 Euro, 59  
 EUTOS, 59  
 Sokal, 57  
 Loi uniforme, 137
- M**
- Médecine personnalisée, 30, 33  
 Mélange de lois, 135, 141  
 Méthode itérative, 131, 132, 134, 142  
*Marker strategy design*, 37  
 MICA, 114, 115, 119  
 Soluble, 116  
 MICB, 114, 115, 119, 126  
 Soluble, 116  
 Micro-ARN, 35  
 Modèle de régression  
 Coefficient, 130, 131  
 Estimation, 133, 142  
 Estimation biaisée, 131  
 Cox, 74, 139  
 Vraisemblance partielle, 75  
 Fine et Gray, 70, 75, 80, 142  
 Modification de la pratique clinique, 32  
 Mutations somatiques, 61
- N**
- Niveau de preuve (*LOE*), 37–39, 41, 111  
 Correspondance, 42  
 NK, 125, 126  
 NKG2D, 115  
 Nowell et Hungerford, 46  
*NGS*, 34  
 Numération sanguine, 46, 48, 56
- O**
- Observance, 28, 64
- P**
- Pan, 131, 136, 138, 142, 152, 155  
 Phénotype, 35  
 Pharmacocinétique, 157  
 Pharmacogénétique, 23, 28–30, 62  
 Pharmacocinétique, 31, 32, 62  
 ADME, 31  
 Efflux, 62, 111  
 Influx, 62  
 Pharmacodynamique, 31, 32, 62, 114  
 Cible du médicament, 31  
 Effet immunosuppressif, 62  
 Immuno-génétique, 64  
 Pharmacogénomique, 28, 29  
 Porteur sains, 68  
 Prélèvement biologique, 72  
 Sanguin, 130  
 Prescription, 30  
 Progression, 50, 72  
 Protéome, 35  
 Puissance statistique, 83
- Q**
- Qualité de vie, 65, 66
- R**
- Randomized marker strategy trial design*, 38  
 Récepteur  
 Activateur, 114  
 Inhibiteurs, 114  
 Saturation, 116  
 Rémission, 49, 50  
 Réponse aux médicaments, 28, 32, 35, 36, 48  
 Résistance aux médicaments, 111  
 Radiothérapie, 49  
 Randomisation, 37  
 Rate, 59  
 Ressources biologiques, 37, 39  
 Annotation, 41  
 Collection, 37  
 Conservation, 41

CRB, 37  
 Rieder, 32  
 Risque compétitif, 130  
 Risque de sous-distribution cumulé, 83  
 Risque de sous-répartition, 80  
 Risques compétitifs, 70, 130  
 RTQ-PCR, 130  
 Rubin (règles), 142  
 Rubin (règles), 132, 134, 142

## S

Safe haven, 67  
 Scénarios, 146  
 Simon, 39, 41, 111  
 Simon et Wang, 37  
 Simulation, 145  
*SNP*, 33  
*SNP Consortium*, 33  
   *CNV*, 34  
   *HapMap*, 33  
   Populations, 33  
 Splénomégalie, 46  
 Stress, 114, 115  
 Surveillance immunitaire, 114, 116, 126  
   Non reconnaissance du soi, 114  
   Soi altéré, 115

## T

*1000 genomes project*, 34  
 Populations, 34  
   *CEU*, 34  
 Tamoxifène, 31  
 Tanner et Wong, 132  
 Taux d'erreur  
   Type I, 146  
   Type II, 146  
 Taux de fausses découvertes, 91  
 Temps latents, 154  
 Thérapie  
   Association, 50, 51  
   Ciblée, 50  
   Toxicité/Tolérance, 50  
 Tolérance, 50

Toxicité, 29, 130  
 Traitement palliatif, 50  
 Transformation, 29  
 Translocation, 46  
   Gène de fusion, 47  
   Protéine de fusion, 51, 61, 116  
   Protéines de fusion, 47  
   t(9;22), 47  
   Transcrit de fusion, 47, 49, 130  
 Turnbull, 136

## U

*5'UTR*, *3'UTR*, 36, 125

## V

Validation, 43  
 Variabilité génétique, 28, 32, 33  
   *Chemical individuality*, 28  
 Variance  
   Inter-imputation, 133, 136  
   Intra-imputation, 133, 136  
 Variations génétiques, 34, 36  
   Variant causal, 36  
 VKORC1, 32  
 Voie de signalisation, 30

## W

Warfarine, 32

## Acronymes

- Afssaps** Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. 52
- alloSCT** *allogenic stem cell transplantation*. 49
- AMM** autorisation de mise sur le marché. 52, 56
- ANDA** *Asymptotic Normal Data Augmentation*. 132, 146, 148, 149
- ASCO** *American Society of Clinical Oncology*. 38
- BCR** *breakpoint cluster region*. 47
- BCRP** *breast cancer resistance protein*. 111, 112
- CEU** *Northern Europeans from Utah*. 34
- CMH** complexe majeur d'histocompatibilité. 114, 115, 125
- CNV** *copy number variations*. 34, 35
- CRB** centres de ressources biologiques. 24, 37
- ECR** essai prospectif contrôlé randomisé. 24, 30, 37, 41, 57
- ELN** *European LeukemiaNet*. 50, 53, 54, 109
- EMA** *European Medicine Agency*. 29
- eQTL** *expression quantitative trait loci*. 37, 112, 125
- EURO-SKI** *European Stop Tyrosine Kinase Inhibitor Study*. 67
- FDA** *food and drug administration*. 29, 52
- FDR** *False discovery rate*. 91, 92, 103, 117, 118
- FISH** *fluorescence in situ hybridization*. 54
- GVH** *graft versus host*. 49, 51, 66
- GVL** *graft versus leukemia*. 50, 115
- IC 95%** intervalle de confiance à 95%. 92, 93, 96, 100, 101, 104–106, 109, 122–124
- ICH** *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*. 29
- IRIS** *International Randomized Study of Interferon and STI571*. 52, 56, 57
- IS** *international scale*. 53, 54
- ITK** inhibiteur de tyrosine kinase. 24, 49–51, 56, 59, 61, 62, 64–68, 109, 115, 116
- KIR** *Killer-cell immunoglobulin-like receptors*. 64, 114–116
- LAL** leucémies aiguës lymphoblastiques. 72
- LMC** leucémie myéloïde chronique. 23–25, 31, 46–53, 55, 56, 59, 62, 64–68, 70, 72, 76, 88, 108, 109, 111, 112, 114, 117, 118, 121, 123, 125, 126, 130, 150, 154, 158

- LMC-Ph+** leucémie myéloïde chronique Philadelphie positive. 46, 88, 89
- LOE** *Levels of Evidence*. 38, 41, 42
- LoF** *Loss-of-function*. 34
- MIICD** *Multiple Imputation for Interval Censored Data*. 155
- NCI** *national cancer institute*. 47
- NGS** *next generation sequencing*. 34
- NK** *Natural Killer*. 114–116, 118, 125, 126
- OMS** Organisation Mondiale de la Santé. 64
- Ph+** Philadelphie positif. 49
- PMDA** *Poor Man's Data Augmentation*. 132, 146, 148, 149
- RCyC** réponse cytogénétique complète. 49, 50
- rIFN $\alpha$**  interféron-alfa recombinant. 49–52, 56, 66
- RMM** réponse moléculaire majeure. 54, 56, 67, 70, 88, 90, 108, 114, 115, 125, 130
- RTQ-PCR** *reverse transcriptase quantitative-polymerase chain reaction*. 49, 53, 54, 70, 89, 130
- SEER** *Surveillance, Epidemiology, and End Results*. 47
- SNP** *single nucleotide polymorphisms*. 33–36, 112
- SPIRIT** *STI571 Prospective Randomized Trial*. 51, 56, 57, 89, 90, 92, 93, 96, 103–105, 111, 127
- TOPS** *Tyrosine Kinase Inhibitor Optimization and Selectivity*. 57

**Article 1 :**

**High imatinib dose overcomes insufficient response  
associated with ABCG2 haplotype  
in chronic myelogenous leukemia patients**

## High imatinib dose overcomes insufficient response associated with ABCG2 haplotype in chronic myelogenous leukemia patients

Marc Delord<sup>1</sup>, Philippe Rousselot<sup>2</sup>, Jean Michel Cayuela<sup>3,4</sup>, François Sigaux<sup>1,3</sup>, Joëlle Guilhot<sup>5</sup>, Claude Preudhomme<sup>6</sup>, François Guilhot<sup>5</sup>, Pascale Loiseau<sup>7</sup>, Emmanuel Raffoux<sup>8</sup>, Daniela Geromin<sup>9</sup>, Emmanuelle Génin<sup>10</sup>, Fabien Calvo<sup>11,12</sup> and Heriberto Bruzzoni-Giovanelli<sup>11,12</sup>

<sup>1</sup> Plateforme de Bioinformatique et Biostatistique, Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité

<sup>2</sup> Service d'Hématologie et d'Oncologie, Hôpital Mignot, Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

<sup>3</sup> Laboratoire Central d'Hématologie, Hôpital Saint Louis

<sup>4</sup> EA3518, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité

<sup>5</sup> Inserm CIC 0802, CHU de Poitiers, Poitiers

<sup>6</sup> Laboratoire d'Hématologie, Inserm, U837, CHRU et Université de Lille Nord, Institut de Recherche sur le Cancer de Lille

<sup>7</sup> Service d'Immunologie et Histocompatibilité et INSERM U940, Hôpital Saint Louis

<sup>8</sup> Service des Maladies du Sang, Hôpital Saint Louis

<sup>9</sup> Plateforme de Ressources Biologiques, Hôpital Saint Louis, Paris

<sup>10</sup> Inserm U1078, CHU Brest, Université Bretagne Occidentale, Brest

<sup>11</sup> Pharmacologie, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris

<sup>12</sup> Centre d'Investigations Cliniques 9504 INSERM-AP-HP, Hôpital Saint-Louis, Paris, France.

**Correspondence to:** Heriberto Bruzzoni-Giovanelli, **email:** heriberto.bruzzoni-giovanelli@univ-paris-diderot.fr

**Keywords:** CML, Imatinib, SNPs, ABCG2, Pharmacogenetic, molecular response, BCR-ABL

**Received:** June 6, 2013

**Accepted:** July 16, 2013

**Published:** July 18, 2013

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### ABSTRACT:

Pharmacogenetic studies in chronic myelogenous leukemia (CML) typically use a candidate gene approach. In an alternative strategy, we analyzed the impact of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in drug transporter genes on the molecular response to imatinib, using a DNA chip containing 857 SNPs covering 94 drug transporter genes. Two cohorts of CML patients treated with imatinib were evaluated: an exploratory cohort including 105 patients treated at 400 mg/d and a validation cohort including patients sampled from the 400 mg/d and 600 mg/d arms of the prospective SPIRIT trial (n=239). Twelve SNPs discriminating patients according to cumulative incidence of major molecular response (CI-MMR) were identified within the exploratory cohort. Three of them, all located within the ABCG2 gene, were validated in patients included in the 400 mg/d arm of the SPIRIT trial. We identified an ABCG2 haplotype (define as G-G, rs12505410 and rs2725252) as associated with significantly higher CI-MMR in patients treated at 400 mg/d. Interestingly, we found that patients carrying this ABCG2 "favorable" haplotype in the 400 mg arm reached similar CI-MMR rates that patients randomized in the imatinib 600 mg/d arm. Our results suggest that response to imatinib may be influenced by constitutive haplotypes in drug transporter genes. Lower response rates associated with "non- favorable" ABCG2 haplotypes may be overcome by increasing the imatinib daily dose up to 600 mg/d.

## INTRODUCTION

Imatinib (Glivec®, Novartis Pharmaceuticals Corporation), along with other tyrosine kinase inhibitors (TKIs), has revolutionized treatment of chronic myelogenous leukemia (CML). Long-term follow-up of the IRIS pivotal study revealed that overall survival for patients who received imatinib as initial therapy was as high as 88% at 6 years [1]. Two second generation TKIs, dasatinib (Sprycel®, Bristol-Myers Squib) and nilotinib (Tasigna®, Novartis Pharmaceuticals Corporation) are now registered as frontline therapy for chronic phase CML (CP-CML) patients. Recent studies reported faster and deeper responses assessed by cytogenetic or molecular analysis with these drugs [2-3], however data are yet too preliminary to determine whether these agents will offer a survival advantage over imatinib. Comorbidities, age, and co-medications tend to drive the choice of the TKI in first-line therapy. Emerging reports of adverse events with nilotinib (peripheral arterial occlusive disease) [4] and dasatinib (pulmonary hypertension) [5] along with the upcoming arrival of generic imatinib will move TKI therapy towards a personalized approach. Disease-related factors such as initial Sokal score have been shown to influence molecular responses [6-9], however, few patient-related parameters such as adherence to therapy or trough imatinib levels have been evaluated [10-12].

Association studies have suggested that single nucleotide polymorphisms (SNPs) may be related to a susceptibility to develop CML [13-16], CML progression [17-18] or intracellular accumulation of imatinib in leukocytes of CML patients [19]. Only a limited number of selected SNPs have been tested in relation to imatinib response [20-28], and results obtained with the most extensively studied gene ABCG1 (MDR1) are not consistent across published analyses [29-30]. Complete cytogenetic response (CCR) at 12 months remains the best surrogate marker for survival in CML patients. However, major molecular response (MMR, defined by  $BCR-ABL \leq 0.1\%$ ) was used as a primary end point of clinical trial (such as in the ENEST 1<sup>st</sup> study) [31] and MMR at 18 months is also part of the “optimal response” definition of the ELN2009 recommendation for CML patient management [32]. We thus selected cumulative incidence of major molecular response (CI-MMR) as a criteria to identify SNPs in drug transporter genes which are associated with a favorable outcome. We performed an association study using a custom-made DNA chip in an exploratory cohort. An ABCG2 haplotype associated with high CI-MMR was identified. We then validated this haplotype in an independent “prospective-retrospective” cohort [33], and evaluated its impact according to imatinib daily dose.

## RESULTS

Patient characteristics are presented in Table 1. Median age, sex ratio and Sokal score distribution were comparable between all cohorts ( $P > 0.05$  in all cases).

### Determinants of CI-MMR

CI-MMR were estimated according to Sokal score ( $n = 312$ ). Using the Fine and Gray model we confirmed that CI-MMR was strongly related to Sokal score levels (regression coefficient: 0.64, 95% confidence interval (CI), 0.53 to 0.78,  $P < 0.001$ ). Figure 1A illustrates the inverse relationship between Sokal score and CI-MMR.

CI-MMR was estimated in the SLEC ( $n = 105$ ), SVC ( $n = 239$ ), and in the two imatinib SVC treatment arms ( $n = 132$  at 400 mg/d;  $n = 107$  at 600 mg/d; Figure 1B). CI-MMR was comparable between the SLEC and the SVC 400 mg/d arm ( $P = 0.700$ ), but was significantly higher in the SVC 600 mg/d arm ( $P = 0.003$ ). The regression coefficient increased by more than 50% (1.53, 95% CI, 1.09 to 2.14) when the dose increased from 400 mg/d to 600 mg/d ( $P = 0.014$ ).

### SNP association study

Of the 857 selected SNPs, 413 (48.2%) from 86 drug transporters were well genotyped in all evaluated patients and passed quality control criteria. We identified 12 SNPs (located in eight transporter genes) in the SLEC group which were significantly associated with CI-MMR at 18 months on the basis of an FDR  $< 50\%$  (Table 2). Only one of these SNPs (rs12505410), located in the ABCG2 gene, was significantly associated with CI-MMR in the overall SVC cohort. Separate analysis of the two SVC cohorts revealed three SNPs (rs12505410, rs13120400 and rs2725252), all from the ABCG2 gene, which were significantly associated with response in the 400 mg/d arm while none were associated in the 600 mg/d arm. CI-MMR at 18 months in the two SVC groups for the three validated ABCG2 SNPs is shown in Supplementary Figure SF1.

### Haplotype frequency

As expected, pairwise linkage disequilibrium was found between the three SNPs at the ABCG2 locus in the SLEC. We therefore performed haplotyping at this locus. Estimated frequencies were 22% for haplotype 1 (G-C-G) having G, C and G bases at loci rs12505410, rs13120400 and rs2725252, respectively,  $< 1\%$  for haplotype 2 (G-C-T), 5% for haplotype 3 (G-T-G), 15% for haplotype 4 (T-T-G), 57% for haplotype 5 (T-T-T) and 2% for haplotype 6 (G-T-T) (Supplementary Table ST2).

Haplotype frequencies at the same loci were also

**Table 1: Patient characteristics**

		Saint-Louis Exploratory Cohort (SLEC)	SPIRIT Validation Cohort (SVC)			Total
		(400 mg) N=105	(400 mg) N=132	(600 mg) N=107	(SVC) N=239	N=344
Gender	Male	63 (60%)	88 (67%)	52 (49%)	143 (60%)	206 (60%)
	Female	42 (40%)	44 (33%)	55 (51%)	96 (40%)	138 (40%)
Sokal Score	Low	34 (32%)	52 (39%)	38 (36%)	90 (38%)	124 (36%)
	Int.	24 (23%)	54 (41%)	45 (42%)	99 (41%)	123 (36%)
	High	15 (14%)	26 (20%)	24 (22%)	50 (21%)	65 (19%)
	NA*	32	0	0	0	32
Median age (years)		50.5	51.8	51.5	51.5	51.5

All p values of differences among groups were not significant

\* Not available

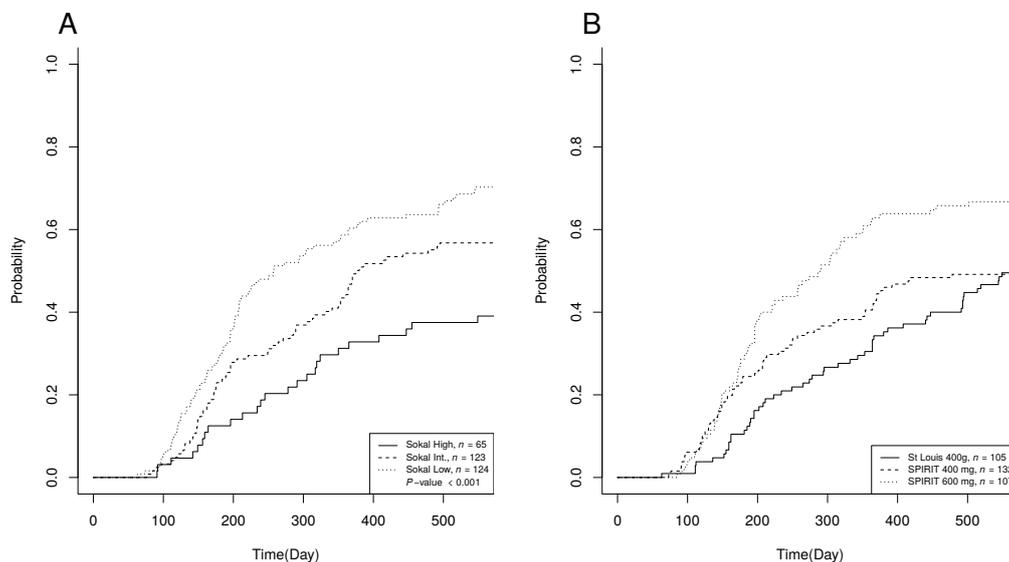
calculated in the independent set of unrelated individuals from the CEU population ( $n = 76$ ). Frequency of haplotype 1 plus 3 was 27% in the SLEC versus 28% in the CEU population, 56% versus 55% for haplotype 5 and 16% versus 17% for other haplotypes. Equal distribution of haplotypes between populations was confirmed ( $P = 0.70$ ; Figure 2A and Supplementary Table ST2).

### Haplotype association study

CI-MMR at 18 months was evaluated with respect to ABCG2 haplotype distribution in the exploratory

cohort. Multivariate analysis identified haplotypes 1 and 3 (G-C-G and G-T-G respectively) as linked to significantly higher CI-MMR rates. These two haplotypes share the same alleles at rs12505410 and rs2725252 and differ at rs13120400, suggesting that the association could be with the G-G haplotype at these two SNPs; carriers of the G-G haplotype at rs12505410 and rs2725252 had significantly higher CI-MMR than non-carriers (Figure 2B).

The validation cohort was analyzed using the same approach. Haplotype frequencies at ABCG2 locus were verified as being comparable to the SLEC and the CEU populations (Figure 2A). This confirmed the analysis in



**Figure 1: Cumulative incidence of MMR (CI-MMR) according to Sokal score and treatment arms.** A) 18 months CI-MMR was estimated with respect to Sokal score ( $n = 312$ ). A Fine and Gray model showed that time to MMR was related to Sokal status and that the coefficient of regression within the first 18 months decreased by 36% (95% confidence interval (CI), 47% to 22%) on average when Sokal increased ( $P < 0.001$ ). CI-MMR was 70% for the low Sokal score, 57% for the intermediate Sokal score and 39% for high Sokal score. B) CI-MMR was estimated in the exploratory cohort (SLEC) and compared to both treatment arms of the validation cohort (SVC). CI-MMR was comparable between the SLEC and the 400 mg/d arm of SVC ( $n = 237$ ,  $P = 0.700$ ), but significantly different between the SLEC and the 600 mg/d arm of SVC ( $n = 212$ ,  $P = 0.003$ ). HR was 1.71% (95% CI, 1.20% to 2.44%) in the latter ( $n = 212$ ,  $P = 0.003$ ). CI-MMR was 49% for the exploratory cohort, 49% and 67% for the 400 and the 600 mg/d arm of the SVC, respectively.

**Table 2: Drug transporter SNPs associated with CI-MMR at 18 months**

SNP	Chr.	Coordinate	Transporter gene symbol	SLEC		SVC (P-value)		
				P-value	FDR	All	400 mg/d	600 mg/d
rs609468	6	160498904	SLC22A1	<0.001	0.001	0.920	0.210	0.090
rs10841907	12	21942563	ABCC9	0.001	0.238	0.310	0.670	0.450
rs12505410	4	89249865	<b>ABCG2</b>	0.002	0.238	<b>0.045*</b>	<b>0.035*</b>	0.320
rs4149182	11	62524689	SLC22A8	0.002	0.238	0.750	0.640	0.820
rs1189451	13	94520087	ABCC4	0.005	0.430	0.260	0.360	0.330
rs17556915	14	69318111	SLC10A1	0.008	0.482	0.068	0.130	0.230
rs11024300	11	17452549	ABCC8	0.009	0.482	0.870	0.550	0.160
rs13120400	4	89252551	<b>ABCG2</b>	0.012	0.482	0.140	<b>0.046*</b>	0.740
rs2725252	4	89280934	<b>ABCG2</b>	0.012	0.482	0.086	<b>0.047*</b>	0.740
rs2665691	11	22327832	SLC17A6	0.012	0.482	0.075	0.110	0.360
rs1678405	13	94627682	ABCC4	0.014	0.482	0.710	0.850	0.370
rs1048099	11	17453092	ABCC8	0.014	0.482	0.950	0.220	0.150

Chr., chromosome; FDR, false discover rate; SNP, single nucleotide polymorphism

\* Significant association between CI-MMR and SNP ( $P < 0.05$ )

the SVC population was performed according to the same assumptions as for the exploratory cohort and was analyzed overall and by treatment arms (Figure 2 C, D, E and F and Table 3).

In the overall SVC, 18-month CI-MMR increased by 36% for patients with one copy of haplotype G-G ( $P = 0.005$ , Figure 2C). In patients included in the imatinib 400 mg/d arm, 18-month CI-MMR increased by 64% ( $P = 0.002$ , Figure 2D). Association of haplotype G-G with CI-MMR in patients included in the imatinib 600 mg/d arm was not significant ( $P = 0.180$ , Figure 2E). CI-MMR curves of patients with haplotype G-G included in the imatinib 400 mg/d arm were comparable to those of patients with other haplotypes in the imatinib 600 mg/d arm (Figure 2F,  $P = 0.480$ ). Of note, Sokal score remained an independent determinant of CI-MMR in all populations in a multivariate model (Table 3).

As expected from results of the Fine and Gray model in the validation cohort, early molecular responses (BCR-ABL<sup>IS</sup> at 3 months  $\leq 10\%$ ) as well as responses of interest (BCR-ABL<sup>IS</sup> at 12 months  $\leq 1\%$ , BCR-ABL<sup>IS</sup> at 18 months  $\leq 0.1\%$ ) were associated with the ABCG2 G-G haplotype in patients treated with imatinib 400 mg/d (Table 4).

Using the CEU population genotypes, we tested associations between haplotype G-G and 1772 SNPs near or within the ABCG2 gene (including rs2231135, rs2231137 and rs2231142). We identified 240 SNPs with alleles in linkage disequilibrium with the haplotype G-G. Interestingly rs2231135, located in the 5'UTR and potentially linked to ABCG2 differential expression, was significantly linked to haplotype G-G ( $P = 0.043$ ).

## DISCUSSION

We report here a haplotype/CI-MMR association study in two independent cohorts of CP-CML patients receiving imatinib, in which patients were genotyped

using a custom-made DNA chip [34] mainly containing tag SNPs. The exploratory SLEC cohort reflected real-life practice with patients treated at imatinib 400 mg/d, while the validation SVC cohort was composed of patients included in the SPIRIT clinical trial and randomized to imatinib 400 mg/d or imatinib 600 mg/d. We used the first cohort to perform an association study with a large number of drug transporter genes SNPs in CP-CML patients and the second cohort in order to validate these results.

Studies evaluating SNPs in CML patients have been performed on a small number of genes pre-selected for their potential relationship to response [20-28]. However, the clinical significance of these results is far from established, firstly because different genes were analyzed by different groups and secondly when the same gene was studied, the SNPs analyzed were not the same. Accordingly, only two genes have been tested in a validation cohort. One of them was confirmed (IFN- $\gamma$ ) [25] whereas results for ABCG1 were not reproducible or were contradictory [26-30].

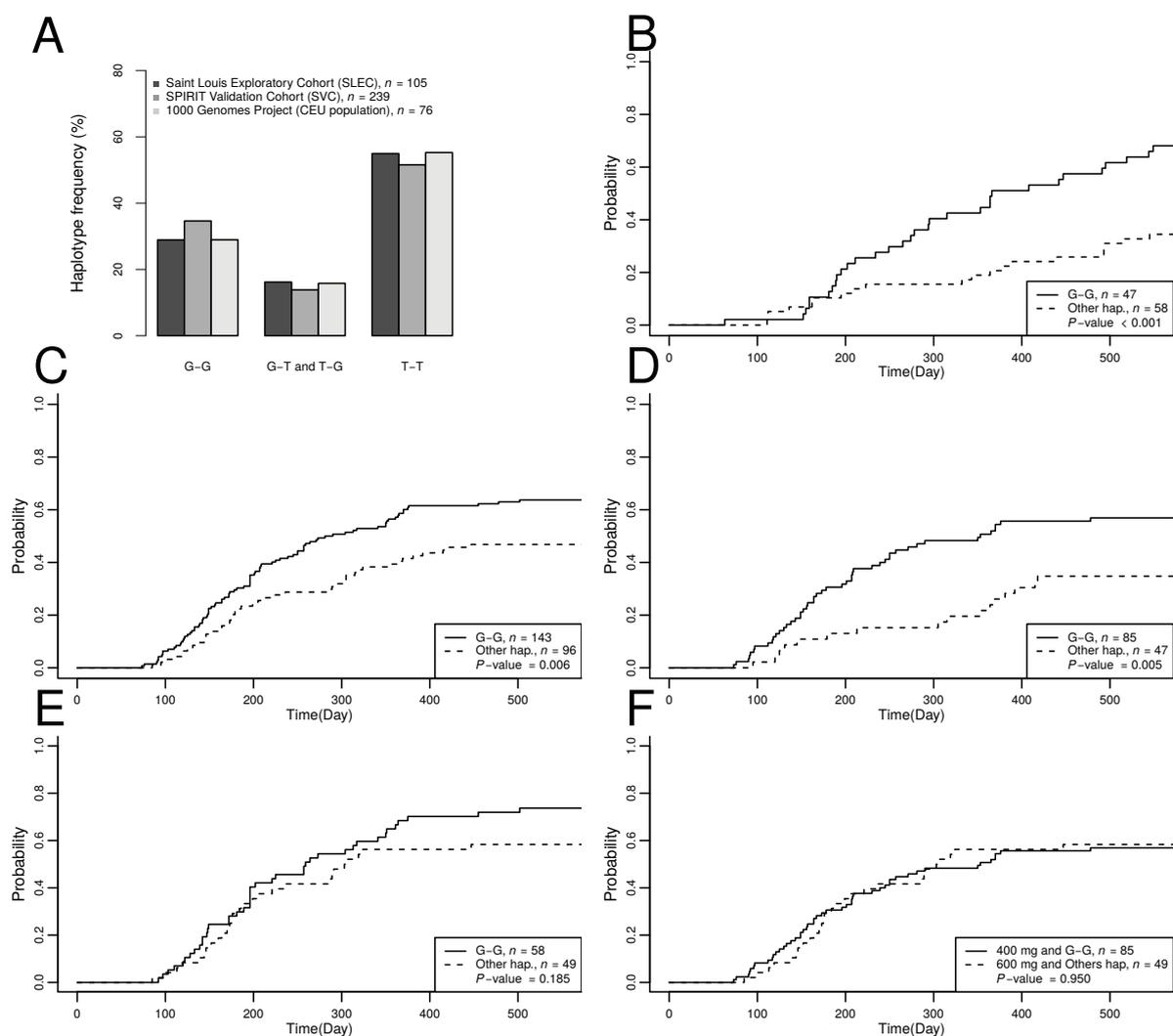
Our approach confirmed known key data: the inverse relationship between MMR rates and Sokal score and significantly higher MMR rates at 12 and 18 months with 600 mg imatinib compared to 400 mg [35-36]. We have extended these results with the identification of an ABCG2 haplotype associated with significantly higher CI-MMR in two patient groups receiving 400 mg/d imatinib (i.e. a real-life and a clinical setting). Patients with at least one copy of haplotype G-G (G at rs12505410 and G at rs2725252) were good responders at 400 mg. This "favorable" haplotype is widespread; about half of the population in our study carries at least one copy. Interestingly, patients in the validation cohort treated at 600 mg/d who did not carry this haplotype showed similar CI-MMR levels as haplotype carriers treated at 400 mg/d. Moreover, the clinical pertinence of these results is supported by the association of the G-G ABCG2 haplotype with the early

molecular response at 3 months and responses of interest at 12 and 18 months.

The ATP-binding cassette transporter ABCG2 (BCRP, MXR or ABCP) is highly expressed in the gastrointestinal tract and liver, and is involved in absorption, distribution and excretion of a wide variety of clinically relevant drugs, among them imatinib [37-38]. Germline polymorphisms in the ABCG2 gene have been described as affecting expression, cellular localization and/or substrate recognition of the encoded protein. More than 24 sequence variations have been reported. The most studied C421A (rs2231142) nucleotide change, results in a glutamine-to-lysine substitution in the translated

protein (pQ141K). Among the studies of SNPs in the ABCG2 gene, two included CML patients treated with imatinib [20, 26]. The first showed that the homozygous GG genotype of rs2231137 in ABCG2 in advanced stage CML patients was significantly associated with poor major or complete cytogenetic response[26], although this result was not subsequently validated in an independent cohort 20.

We were able to test the association between ABCG2 haplotype G-G and 1772 other ABCG2-related SNPs including rs2231137 and rs2231142 (not represented in our DNA chip) by means of an open-access database. We found that rs2231135, which is a 5'UTR



**Figure 2: Frequencies and cumulative incidence of MMR relative to ABCG2 haplotypes.** A) Distribution of haplotype frequencies in the SLEC, SVC and the CEU populations. Haplotypes were distributed homogeneously over the different populations. B) Cumulative incidence at 18-months of major molecular response (CI-MMR) was calculated in the SLEC according to ABCG2 haplotypes G-G. CI-MMR of patients with at least one copy of haplotype G-G was 69%. CI-MMR for other patients was 34%. C) CI-MMR at 18-months in all SVC patients with haplotype G-G was 63% and 47% for other patients ( $P = 0.006$ ). D) CI-MMR in SVC patients treated with 400 mg/d was 57% and 36% for G-G haplotype carriers and other haplotype carriers respectively ( $P = 0.005$ ). E) CI-MMR in SVC patients treated with 600 mg/d was 74% and 58% for G-G haplotype carriers and other patients respectively ( $P = 0.185$ ). F) CI-MMR was not significantly different between in SVC patients with haplotype G-G receiving 400 mg/d and those with other haplotypes receiving 600 mg/d (57% vs 58% respectively,  $P = 0.950$ ).

**Table 3: ABCG2 haplotype associated with CI-MMR at 18 months**

	SLEC		SVC					
	n = 105 (P-value)		All patients n = 239 (P-value)		400 mg/d n = 132 (P-value)		600 mg/d n = 107 (P-value)	
<b>Univariate</b>								
G-G	68.09	(<.001)	63.72	(.006)	56.90	(.005)	73.68	(.185)
Other haplotypes	34.48		46.81		34.78		58.33	
<b>Bivariate Fine and Gray model statistics</b>	n = 73		n = 239		n = 132		n = 107	
G-G	Reg. Coef.	2.27 (.006)	1.75 (.002)		2.41 (.002)		1.32 (.270)	
	95%CI	1.26 to 4.10	1.22 to 2.51		1.39 to 4.19		0.81 to 2.15	
Sokal score	Reg. Coef.	0.64 (.024)	0.62 (<.001)		0.68 (.034)		0.51 (.001)	
	95%CI	0.43 to 0.94	0.49 to 0.78		0.47 to 0.97		0.38 to 0.69	

and is potentially implicated in ABCG2 expression, was associated with haplotype G-G of ABCG2. However, the statistical association between ABCG2 polymorphisms and CI-MMR does not necessarily imply a causal relationship and eventual changes in ABCG2 expression linked to these polymorphisms will have to be addressed in further studies.

The SNP rs609468 from SLC22A1 (also known as OCTN1 or HOCT1 and involved in imatinib uptake) had the lowest p-value in our exploratory cohort (SLEC). SLC22A1 has previously been studied in relation to imatinib response. The SNP rs683369 and advanced disease stage correlated with a high rate of loss of cytogenetic response or treatment failure to imatinib [26], whereas a polymorphism in rs1050152 was significantly associated with MMR [20]. SLC22A1 activity was found predictive of MMR and correlated with overall and event-free survival, especially in patients receiving less than 600 mg/d of imatinib daily [39]. Although the hypothesis that changes in SLC22A1 sequence may result in changes of activity affecting imatinib bioavailability is particularly attractive, more recent studies have failed to demonstrate association between SLC22A1 SNPs and imatinib response [27, 40]. In the same way, SNP rs609468 identified in the SLEC, was not validated in the SVC in our study.

Finally, only 3 SNPs out of 12 were validated. This result is in accordance with the FDR level selected in our analysis. Interestingly no SNPs from our chip located in the ABCG1 gene were found to be associated with imatinib response in our analysis.

Pharmacological studies have suggested that imatinib trough levels may mediate molecular response [10, 12], and it is thus of interest to identify if this is the case for the observed effect of ABCG2 haplotype on molecular response (as is the dose effect). This question will be addressed in patients included in the OPTIM-imatinib clinical trial, an ongoing prospective clinical trial evaluating imatinib dose adjustment driven by imatinib trough levels (OPTIM-Imatinib, EudraCT number 2010-

019568-35).

In conclusion, our results demonstrate the influence of a constitutive ABCG2 haplotype on the response to imatinib in CP-CML patients and raise the possibility of personalizing imatinib daily doses in this population on the basis of constitutive genotyping.

## PATIENTS AND METHODS

### Study design

This study was approved by the Human Ethics Committee of the St Louis Hospital, Paris. Written informed consent was obtained from all patients prior to study participation.

Analyses were performed in two independent patient cohorts; the Saint Louis exploratory cohort (SLEC) treated at the Saint Louis hospital specialized clinical trial center (CIC), and the SPIRIT validation cohort (SVC) treated at participating centers in the SPIRIT trial [36] (clinicaltrials.gov: NCT00219739). Data were collected at participating institutions, analyzed using the sponsor's data management systems. Access to primary clinical data was available to all authors.

### Patients and assessments

The SLEC included 105 consecutively referred CP-CML patients enrolled at the CIC between 2006 and 2009 and treated with imatinib 400 mg/d. The SVC included 239 CP-CML patients from the prospective SPIRIT trial based on sample availability from patients recruited to the imatinib arms; 132 patients were treated with 400 mg/d and 107 with 600 mg/d. Patients receiving imatinib plus pegylated interferon-alpha2b or imatinib plus cytarabine were not analyzed.

Peripheral blood samples for DNA extraction were collected at the time of recruitment. BCR-ABL

**Table 4: Association between ABCG2 haplotype and molecular response in the SVC**

Imatinib dose	Response	BCR-ABLIS $\leq$ 10% at 3 months			BCR-ABLIS $\leq$ 1% at 12 months			BCR-ABLIS $\leq$ 0.1% at 18 months		
		Haplotype G-G	Others haplotypes	P-value	Haplotype G-G	Others haplotypes	P-value	Haplotype G-G	Others haplotypes	P-value
400mg	Yes	52	14	0.001*	53	19	0.025*	48	16	0.022*
	No	33	33		32	28		37	31	
600mg	Yes	41	28	0.209	43	31	0.316	41	28	0.209
	No	17	21		15	18		17	21	

\* Significant association between ABCG2 haplotype and molecular response ( $P < 0.05$ )

transcripts were quantified by RTQ-PCR every 3 months in accordance with international recommendations, and expressed according to the international scale (IS) as a BCR-ABL/ABL standardized ratio (BCR-ABL<sup>IS</sup>) [41]. MMR was defined as a BCR-ABL<sup>IS</sup> ratio  $\leq$ 0.1%.

Genotypes from 76 unrelated and unaffected individuals obtained from the CEU population (Utah residents with northern and western European ancestry) from the CEPH (“Centre d’Etudes du Polymorphisme Humain”) database were downloaded from the 1000 Genomes Project website [42].

### SNP selection and genotyping

A dedicated DNA chip[34] designed in 2006 by the French REPAC network (coordinated by Pierre Laurent-Puig and Fabien Calvo, Supplementary Table ST1) was used for patient genotyping. Among 16 561 SNPs on the chip, 857 covering 94 drug transporter genes were selected. Genotyping was performed by Integragen SA using the Illumina GoldenGate assay. A list of variations from the ABCG2 gene was downloaded from the 1000 Genomes Project website [34]. All 16 561 SNPs genotyped in the 105 SLEC patients and the 239 SVC patients were included in the quality control process. Individuals with a call rate below 90%, SNPs with minor allele frequency below 10%, and SNPs with a call rate below 90% were excluded.

### Statistical analysis

Patient characteristics were compared between cohorts using Chi-squared or Wilcoxon tests. Sample size simulations show that for conventional type 1 and 2 error rates, in a population of about one hundred with approximately 60% of patients expected to reach MMR within the first 18 months and with a regression coefficient of two between groups, SNPs differentiating more than one-third of patients are required [44]. This result led us to investigate those SNPs discriminating at least one third of the patients in a recessive mode.

CI-MMR at 18 months was analyzed in the various patient cohorts (SLEC/SVC, and by imatinib dose) using

the Fine and Gray regression model with multivariate and univariate analyses. Adverse events, toxicities or deaths not related to CML which led to loss of molecular follow-up were handled as competing events. An SNP association analysis for CI-MMR at 18 months was also performed using the Fine and Gray model. Markers with a false discovery rate (FDR)  $<$  50% in the SLEC population were investigated in the validation cohort (overall, 400 mg/d and 600 mg/d) using a significance cut-off of  $P = 0.05$ . The Benjamini and Hochberg method was used for multiple testing issues [45]. Haplotype frequencies were estimated in the SLEC, SVC (overall, 400 mg/d and 600 mg/d) and CEU populations using the classic EM algorithm on unrelated individuals implemented in the Haplo.stats R library [46-48]. Homogeneity in haplotypic distribution between populations was tested. An association analysis between haplotype or Sokal score with CI-MMR at 18-months was performed using a Fine and Gray model. The association between early molecular response (BCR-ABL<sup>IS</sup>  $\leq$  10% at 3 months) and responses of interest (BCR-ABL<sup>IS</sup>  $\leq$  1% at 12 months and BCR-ABL<sup>IS</sup>  $\leq$  0.1% at 18 months) and ABCG2 haplotypes were tested using the chi-squared test. Data were analyzed using R Project for Statistical Computing software (R version 2.15.2) [49].

Supplementary information is available on the Oncotarget website.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pr Pierre Laurent-Puig for REPAC network coordination, Dr Christophe Blondel for his contribution to SNP selection and validation, Magali Nacfer for logistical assistance, the FRENCH-CML Group (FI-LMC), Pr Jean Jacques Kiladjian, Dr Delphine Rea, Dr Odile Maarek, and all SPIRIT investigators for patient recruitment, Dr Maud Vanpeene and Dr Mélanie Letexier for technical assistance, Dr Anne Marfaing, Dr Eric Delabesse and Dr Marc Spentchian who contributed to DNA sample collection, Dr Sarah Zohar for assistance in ERB submission and Dr Sarah MacKenzie (funded by Intergroup pour la Léucémie Myeloïde Chronique) for manuscript correction. This work was supported by INSERM (Pharmacogenetic-REPAC Network), by the Grant U03S03 from the ECOS-Sud program (France-Uruguay), a Grant from the Association Jean Bernard,

France and a grant from the French Ministry of Health (Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC 2011, 11N28), SPIRIT ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00219739. PR received research grants from BMS and Novartis. JMC performs consultancy activity for Novartis.

## AUTHORSHIP

### Contributions:

HBG, PR, MD and FC designed the study. HBG coordinated the study. PR contributed the majority of patients and clinical expertise. HBG and PR performed patient inclusion procedures and clinical follow-up, and collected clinical and biological data. MD performed bioinformatics and statistical analysis. FC coordinated the DNA chip design. FG coordinated the French SPIRIT trial. JMC and DG performed molecular analyses. PL performed DNA extraction. FS and EG interpreted and discussed data. ER contributed patients and clinical data. CP, JG, FG contributed DNA samples, biological and clinical data from the validation cohort. JG and EG contributed with methodological expertise. HBG, MD and PR analyzed and interpreted data, participated in discussions and wrote the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

## REFERENCES

1. Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Foroni L, Goldman JM, Müller MC, Radich JP, Rudoltz M, Mone M, Gathmann I, Hughes TP, Larson RA. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Macmillan Publishers Limited*; 2009:1054–1061. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19282833>.
2. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, Moiraghi B, Shen Z, Mayer J, Pasquini R, Nakamae H, Huguet F, Boqué C, Chuah C, Bleickardt E, Bradley-Garelik MB, Zhu C, Szatrowski T, Shapiro D, Baccarani M. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 2010;362(24):2260–2270.
3. Saglio G, Kim D-W, Issaragrisil S, Le Coutre P, Etienne G, Lobo C, Pasquini R, Clark RE, Hochhaus A, Hughes TP, Gallagher N, Hoenekopp A, Dong M, Haque A, Larson RA, Kantarjian HM. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 2010;362(24):2251–2259.
4. Aichberger KJ, Herndlhofer S, Schernthaner G-H, Schillinger M, Mitterbauer-Hohendanner G, Sillaber C, Valent P. Progressive peripheral arterial occlusive disease and other vascular events during nilotinib therapy in CML. *American Journal of Hematology*. 2011;86(7):1–7.
5. Montani D, Bergot E, Gunther S, Savale L, Bergeron A, Bourdin A, Bouvaist H, Canuet M, Pison C, Macro M, Poubeau P, Girerd B, Natali D, Guignabert C, Perros F, O'Callaghan DS, Jais X, Tubert-Bitter P, Zalcman G, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Pulmonary Arterial Hypertension in Patients Treated by Dasatinib. *Circulation*. 2012;125(17):2128–37.
6. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, Giles FJ, Rios MB, Shan J, Faderl S, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Verstovsek S, Wierda W, Keating M, Talpaz M. Imatinib Mesylate Therapy Improves Survival in Patients with Newly Diagnosed Philadelphia Chromosome-Positive Chronic Myelogenous Leukemia in the Chronic Phase. *Cancer*. 2003;98:2636–2642.
7. Kantarjian HM, Hochhaus A, Saglio G, Souza C De, Flinn IW, Stenke L, Goh Y-T, Rosti G, Nakamae H, Gallagher NJ, Hoenekopp A, Blakesley RE, Larson RA, Hughes TP. Nilotinib versus imatinib for the treatment of patients with newly diagnosed chronic phase, Philadelphia chromosome-positive, chronic myeloid leukaemia: 24-month minimum follow-up of the phase 3 randomised ENESTnd trial. *The lancet oncology*. 2011;12(9):841–851.
8. Kantarjian HM, Shah NP, Cortes JE, Baccarani M, Agarwal MB, Undurraga MS, Wang J, Kassack Ipiña JJ, Kim D-W, Ogura M, Pavlovsky C, Junghanss C, Milone JH, Nicolini FE, Robak T, Van Droogenbroeck J, Vellenga E, Bradley-Garelik MB, Zhu C, Hochhaus A. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood*. 2012;119(5):1123–9.
9. Chomel J, Turhan AG. Chronic myeloid leukemia stem cells in the era of targeted therapies: resistance, persistence and long-term dormancy. *Oncotarget*. 2011;2(9):713–27.
10. Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Riviere GJ, Krahnke T, Gathmann I, Wang Y. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood*. 2008;111(8):4022–4028.
11. Marin D, Bazeos A, Mahon F-X, Eliasson L, Milojkovic D, Bua M, Apperley JF, Szydlo R, Desai R, Kozlowski K, Paliompeis C, Latham V, Foroni L, Molimard M, Reid A, Rezvani K, de Lavallade H, Guallar C, Goldman J, Khorashad JS. Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib. *Journal of clinical oncology*. 2010;28(14):2381–2388.
12. Picard S, Titier K, Etienne G, Teilhet E, Ducint D, Bernard M-A, Lassalle R, Marit G, Reiffers J, Begaud B, Moore N, Molimard M, Mahon F-X. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007;109(8):3496–3499.
13. Chen H-C, Hu W-X, Liu Q-X, Li W-K, Chen F-Z, Rao

- Z-Z, Liu X-F, Luo Y-P, Cao Y-F. Genetic polymorphisms of metabolic enzymes CYP1A1, CYP2D6, GSTM1 and GSTT1 and leukemia susceptibility. *European journal of cancer prevention*. 2008;17(3):251–258.
14. Kim DHD, Xu W, Ma C, Liu X, Siminovitch K, Messner HA, Lipton JH. Genetic variants in the candidate genes of the apoptosis pathway and susceptibility to chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009;113(11):2517–2525.
  15. Taspinar M, Aydos SE, Comez O, Elhan AH, Karabulut HG, Sunguroglu A. CYP1A1, GST gene polymorphisms and risk of chronic myeloid leukemia. *Swiss medical weekly*. 2008;138(1-2):12–17.
  16. Zhang Y, Wang B, Ye S, Liu S, Liu M, Shen C, Teng Y, Qi J. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene polymorphisms in patients with leukemia: possible association with susceptibility to the disease. *Leukemia research*. 2010;34(1):55–58.
  17. Boulwood J, Perry J, Zaman R, Fernandez-Santamaria C, Littlewood T, Kusec R, Pellagatti A, Wang L, Clark RE, Wainscoat JS. High-density single nucleotide polymorphism array analysis and ASXL1 gene mutation screening in chronic myeloid leukemia during disease progression. *Leukemia*. 2010;24(6):1139–1145.
  18. Zhang S-J, Shi J-Y, Li J-Y. GATA-2 L359 V mutation is exclusively associated with CML progression but not other hematological malignancies and GATA-2 P250A is a novel single nucleotide polymorphism. *Leukemia research*. 2009;33(8):1141–1143.
  19. Nambu T, Hamada A, Nakashima R, Yuki M, Kawaguchi T, Mitsuya H, Saito H. Association of SLCO1B3 polymorphism with intracellular accumulation of imatinib in leukocytes in patients with chronic myeloid leukemia. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2011;34(1):114–119.
  20. Angelini S, Soverini S, Ravegnini G, Barnett M, Turrini E, Thornquist M, Pane F, Hughes TP, White DL, Radich J, Kim D-W, Saglio G, Cilloni D, Iacobucci I, Perini G, Woodman R, Cantelli-Forti G, Baccarani M, Hrelia P, Martinelli G. Association between imatinib transporters and metabolizing enzymes genotype and response in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therapy. *Haematologica*. 2013;98(2):193–200.
  21. Crossman LC, O'Hare T, Lange T, Willis SG, Stoffregen EP, Corbin AS, O'Brien SG, Heinrich MC, Druker BJ, Middleton PG, Deininger MWN. A single nucleotide polymorphism in the coding region of ABL and its effects on sensitivity to imatinib. *Leukemia*. 2005;19(11):1859–1862.
  22. Dulucq S, Bouchet S, Turcq B, Lippert E, Etienne G, Reiffers J, Molimard M, Krajinovic M, Mahon F-X. Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2008;112(5):2024–2027.
  23. Guillem VM, Cervantes F, Martínez J, Alvarez-Larrán A, Collado M, Camós M, Sureda A, Maffioli M, Marugán I, Hernández-Boluda J-C. XPC genetic polymorphisms correlate with the response to imatinib treatment in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia. *American journal of hematology*. 2010;85(7):482–486.
  24. Kim DH, Xu W, Kamel-Reid S, Liu X, Jung CW, Kim S, Lipton JH. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor (VEGFA) and VEGF receptor (VEGFR2) gene polymorphism on the treatment outcome following imatinib therapy. *Annals of oncology*. 2010;21(6):1179–1188.
  25. Kim DHD, Kong JH, Byeun JY, Jung CW, Xu W, Liu X, Kamel-Reid S, Kim Y-K, Kim H-J, Lipton JH. The IFNG (IFN-gamma) genotype predicts cytogenetic and molecular response to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Clinical cancer research*. 2010;16(21):5339–5350.
  26. Kim DHD, Sriharsha L, Xu W, Kamel-Reid S, Liu X, Siminovitch K, Messner HA, Lipton JH. Clinical relevance of a pharmacogenetic approach using multiple candidate genes to predict response and resistance to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Clinical cancer research*. 2009;15(14):4750–4758.
  27. Maffioli M, Camós M, Gaya A, Hernández-Boluda J-C, Alvarez-Larrán A, Domingo A, Granell M, Guillem V, Vallansot R, Costa D, Bellosillo B, Colomer D, Cervantes F. Correlation between genetic polymorphisms of the hOCT1 and MDR1 genes and the response to imatinib in patients newly diagnosed with chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research*. 2011;35(8):1014–1019.
  28. Ni L-N, Li J-Y, Miao K-R, Qiao C, Zhang S-J, Qiu H-R, Qian S-X. Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms correlate with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Medical oncology*. 2011;28(1):265–269.
  29. Deenik W, van der Holt B, Janssen JJWM, Chu IWT, Valk PJM, Ossenkoppele GJ, van der Heiden IP, Sonneveld P, van Schaik RHN, Cornelissen JJ. Polymorphisms in the multidrug resistance gene MDR1 (ABCB1) predict for molecular resistance in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia receiving high-dose imatinib. *Blood*. 2010;116(26):6144–6146.
  30. Dulucq S, Preudhomme C, Guilhot F, Mahon F-X. Response: is there really a relationship between Multidrug Resistance Gene (MDR1) polymorphisms and major molecular response to imatinib in chronic myeloid leukemia? *Blood*. 2010;116(26):6145–6146.
  31. Giles FJ, Rosti G, Beris P, Clark RE, Le Coutre P, Mahon F-X, Steegmann J-L, Valent P, Saglio G. Nilotinib is superior to imatinib as first-line therapy of chronic myeloid leukemia: the ENESTnd study. *Expert review of hematology*. 2010;3(6):665–673.
  32. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, Cervantes F, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Hochhaus A, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Radich J, Simonsson B, Silver RT, Goldman J, Hehlmann R. Chronic myeloid leukemia: an update of

- concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(35):6041–6051.
33. Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(21):1446–52.
  34. Ahmed I, Tamouza R, Delord M, Krishnamoorthy R, Tzourio C, Mulot C, Nacfer M, Lambert J-C, Beaune P, Laurent-Puig P, Lorient M-A, Charron D, Elbaz A. Association between Parkinson's disease and the HLA-DRB1 locus. *Movement disorders*. 2012;27(9):1104–10.
  35. Hehlmann R, Lauseker M, Jung-Munkwitz S, Leitner A, Müller MC, Pletsch N, Proetel U, Haferlach C, Schlegelberger B, Balleisen L, Hänel M, Pfirrmann M, Krause SW, Nerl C, Pralle H, Gratwohl A, Hossfeld DK, Hasford J, Hochhaus A, Saussele S. Tolerability-adapted imatinib 800 mg/d versus 400 mg/d versus 400 mg/d plus interferon- $\alpha$  in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology*. 2011;29(12):1634–1642.
  36. Preudhomme C, Guilhot J, Nicolini FE, Guerci-Bresler A, Rigal-Huguet F, Maloisel F, Coiteux V, Gardembas M, Berthou C, Vekhoff A, Rea D, Jourdan E, Allard C, Delmer A, Rousselot P, Legros L, Berger M, Corm S, Etienne G, Roche-Lestienne C, Eclache V, Mahon F-X, Guilhot F. Imatinib plus peginterferon alfa-2a in chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2010;363(26):2511–2521.
  37. Ieiri I. Functional significance of genetic polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2). *Drug metabolism and pharmacokinetics*. *Int J Biochem Mol Biol*. 2012;27(1):85–105.
  38. Mo W, Zhang J-T. Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *International journal of biochemistry and molecular biology*. 2012;3(1):1–27.
  39. White DL, Dang P, Engler J, Frede A, Zrim S, Osborn M, Saunders VA, Manley PW, Hughes TP. Functional activity of the OCT-1 protein is predictive of long-term outcome in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *J Clin Oncol*. 2010; 28:2761–2767.
  40. White, D.L. Saunders, V.A. Dang, P. Engler, J. Hughes TP. OCT-1 activity measurement provides a superior imatinib response predictor than screening for single-nucleotide polymorphisms of OCT-1. *Leukemia*. 2010;24(11):1962–1965.
  41. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, Baccarani M, Cortes J, Cross NCP, Druker BJ, Gabert J, Grimwade D, Hehlmann R, Kamel-Reid S, Lipton JH, Longtine J, Martinelli G, Saglio G, Soverini S, Stock W, Goldman JM. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*. 2006;108(1):28–37.
  42. Site 1000 Genomes Project ftp. [Ftp://ftp.1000genomes.ebi.ac.uk/](ftp://ftp.1000genomes.ebi.ac.uk/). Available at: <ftp://ftp.1000genomes.ebi.ac.uk/>.
  43. <http://www.1000genomes.org/>.
  44. Latouche A, Porcher R, Chevret S. Sample size formula for proportional hazards modelling of competing risks. *Statistics in Medicine*. 2004;23(21):3263–3274.
  45. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B Methodological*. 1995;57(1):289–300.
  46. Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM, Poland GA. Score Tests for Association between Traits and Haplotypes when Linkage Phase Is Ambiguous. *American journal of human genetics*. 2002;70(2):425–434.
  47. Sinnwell JP SD. Haplo.stats: Statistical Analysis of Haplotypes with Traits and Covariates when Linkage Phase is Ambiguous. R package version 1.4.4.
  48. Site SG and GEMC. [http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/schaid\\_lab/](http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/schaid_lab/). Available at: [http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/schaid\\_lab/software.cfm](http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/schaid_lab/software.cfm).
  49. González, Juan R; Armengol, Lluís; Guinó, Elisabet; Solé, Xavier; Moreno V. <http://cran.r-project.org/web/packages/SNPassoc/index.html>.

**Article 2 :**  
**Multiple Imputation for Competing Risks Regression**  
**with Interval Censored Data**

# Multiple imputation for competing risks regression with interval-censored data

Marc Delord<sup>a</sup>  and Emmanuelle Génin<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Biostatistique, Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris Diderot, Paris Cité, France; <sup>b</sup>Inserm UMR-1078, CHU Morvan, Brest, France

## ABSTRACT

We present here an extension of Pan's multiple imputation approach to Cox regression in the setting of interval-censored competing risks data. The idea is to convert interval-censored data into multiple sets of complete or right-censored data and to use partial likelihood methods to analyse them. The process is iterated, and at each step, the coefficient of interest, its variance-covariance matrix, and the baseline cumulative incidence function are updated from multiple posterior estimates derived from the Fine and Gray sub-distribution hazards regression given augmented data. Through simulation of patients at risks of failure from two causes, and following a prescheduled programme allowing for informative interval-censoring mechanisms, we show that the proposed method results in more accurate coefficient estimates as compared to the simple imputation approach. We have implemented the method in the MIICD R package, available on the CRAN website.

## ARTICLE HISTORY

Received 13 April 2015

Accepted 6 October 2015

## KEYWORDS

Competing risks;  
interval-censored data;  
multiple imputation;  
baseline cumulative  
incidence function;  
proportional sub-distribution  
hazards regression;  
informative interval  
censoring

## AMS SUBJECT CLASSIFICATION

62N01; 62N02; 62N03

## 1. Introduction

In medical studies, the longitudinal follow-up of patients may consist of prescheduled visits where clinical or biological examinations are performed. Classical examples are AIDS cohort studies where patients are periodically assessed for seroconversion.[1] This type of follow-up is increasingly in practice in oncological studies as blood-based biomarkers are being widely used to assess disease progression or response to treatment. At the first positive record, one knows that the response of interest has occurred in the interval since the last visit. This type of follow-up produces interval-censored data.[2,3] At the same time, patients may also be at risk for competing events, that is, events that fundamentally modifies the probability of the event of interest such as death, drug toxicity, or treatment failure.[4] In many cases, clinicians may decide to adapt the dose of the treatment or to change the treatment itself if an alternative therapeutic option is available. Consequently, the event of interest is not observable in a given setting. A study where both interval censoring and competing risks are observed would produce interval-censored competing risks data.[5] This is notably a characteristic of studies of haematological malignancies where the response to a new treatment is of interest and where the monitoring of patients implies a periodical dosage of a given blood biomarker because patients remain at risk for disease progression or side effects. One example is response to treatment studies in chronic myeloid leukaemia in chronic phase where patients are treated with tyrosine kinase inhibitors as the residual level of the BCR-ABL transcript is periodically assessed.[6]

One common approach when analysing interval-censored data is to use the *single imputation approach*, that is to choose a single failure time within the observed interval (usually the time of the first positive examination). This approach considers interval-censored data as exact failure time data in order to use partial likelihood methods. However, many authors have pointed out that this method would produce misleading results, in particular a bias in regression coefficient estimates.[7,8] It may also overestimate the statistical power because it underestimates the true variability of the data.[9] Different alternative approaches have been proposed to handle time to event regression with interval-censored data. Among the most cited works are the semi-parametric approach (Cox) by Finkelstein [10] and the multiple imputation approach by Pan.[11] Some authors have also proposed methods allowing for the use of auxiliary variables to improve efficiency of estimates.[12] Recently, Hudgens and Fine proposed a parametric method to infer from a parametric estimation of the cumulative incidence function (CIF) in the context of interval-censored data for competing risks regression.[5] Despite this abounding literature on interval-censored data, there is still a great need for easy-to-use software implementation of methods allowing to regress on interval-censored data.[13]

One of the key assumptions allowing for the use of partial likelihood methods for handling interval-censored data is *noninformative interval censoring*. [14,15] This assumption implies an independence between failure times of interest and visit compliance, that may not hold in a clinical setting. Zhang et al. [16] give the example of a patient experiencing symptoms at the same time as an event of interest, therefore triggering a rapid visit to his physician. It is also acknowledged that symptoms accompanying a positive response to a treatment may modify visit compliance.

In this paper we propose an extension of Pan's [11] multiple imputation approach to Cox regression to handle interval-censored competing risks data. Pan's idea is to consider interval-censored data as missing event time,[17] and to use the Tanner and Wong [18] data augmentation schemes. Accordingly, the following two steps are iterated: (a) generate multiple sets of data by imputing from intervals censored but not right-censored data with respect to the current estimate of the coefficient and baseline survival and (b) using standard partial likelihood methods for right-censored data (Cox regression), derive multiple estimates from imputed data sets and combine them following multiple imputation rules described earlier [19,20] and update coefficient estimate and baseline survival.

In analogy to this approach, we propose to handle interval-censored competing risks data using a data augmentation approach combining the baseline CIF and Fine and Gray estimates of the regression coefficient and associated variance-covariance matrix.[21] We have implemented both the Poor Man's and the Asymptotic Normal Data Augmentation (PMDA and ANDA, respectively) algorithms.[11, 18,22]

The paper is organized as follows: Section 2 introduces competing risk analysis using the Fine and Gray regression model and data augmentation principles. Section 3 presents in detail the implementation of the proposed method using the Poor Man's and the ANDA. In Section 4, through different simulated scenarios, we analyse the behaviour of these approaches showing that they are robust to bias in case of informative interval censoring. Section 5 contains a short discussion.

## 2. Methodological background

### 2.1. Proportional hazards regression

#### 2.1.1. Single endpoint and Cox proportional hazards regression

In classical time to event analysis, the hazard ( $\lambda(t)$ ) completely describes the survival distribution. Its relation with the survival function ( $S(t)$ ) is

$$\lambda(t) = -\frac{d \log S(t)}{dt}. \quad (1)$$

The Cox proportional hazards model specifies that given covariates  $Z_i$ ,  $\lambda(t, Z_i) = \lambda_0(t) \exp(Z_i\beta)$  where  $\lambda_0(t)$  is the baseline hazard depending on time only. Without loss of generality, this expression can be written using the baseline survival function as

$$S(t|Z_i) = S_0(t)^{\exp(Z_i\beta)}, \tag{2}$$

where  $S_0(t)$  is the baseline survival function. In Cox survival model, the baseline hazard and the corresponding baseline survival are usually neglected as the model assume proportional hazards. However, it is interesting quantity for graphical or sampling purposes.

A simple way to appraise this quantity is to assume that  $\hat{S}(t)$  is an estimate of the survival functions for a patient, having covariates equal to the mean of all other patients, that is

$$\hat{S}(t) = \hat{S}(t|Z^*), \tag{3}$$

where  $Z^* = \sum_{i=1}^n Z_i$ ,  $Z_i$  being a vector of covariates for patient  $i$ .

Using Equation (2) we can write

$$\hat{S}(t|Z^*) = \hat{S}_0(t)^{\exp(Z^*\hat{\beta})}, \tag{4}$$

where  $\hat{\beta}$  is the vector maximizing the Cox partial likelihood. From Equations (3) and (4), it comes

$$\hat{S}_0(t) = \hat{S}(t)^{\exp(-Z^*\hat{\beta})}. \tag{5}$$

This quantity plays a central role in Pan's imputation schemes.

### 2.1.2. Competing risks and the Fine and Gray proportional sub-distribution hazards regression

In time to event analysis, competing risks describe a situation where more than one cause of failure is possible. In that setting, both the CIF and the cause specific hazard function are estimable from the data. However in clinical settings, the CIF may be preferable because it has an intuitive interpretation as an estimate of the probability of the failure of interest in the presence of competing events.

In analogy with Equation (1), Fine and Gray [21] have defined a quantity, called the sub-distribution hazard, allowing to regress directly on the CIF in the setting of competing risks

$$\bar{\lambda}(t) = -\frac{d \log(1 - I_k(t))}{dt}, \tag{6}$$

where  $I_k(t)$  represents the CIF for event of interest  $k$ .

In analogy with Equation (2), the Fine and Gray proportional sub-distribution hazards model states that the CIF for the event of interest  $k$ ,  $I_k(t|Z_i)$  with given covariates  $Z_i$  satisfies

$$\begin{aligned} 1 - I_k(t|Z_i) &= (1 - I_k^0(t))^{\exp(Z_i\beta)} \\ \Leftrightarrow I_k(t|Z_i) &= 1 - (1 - I_k^0(t))^{\exp(Z_i\beta)}, \end{aligned} \tag{7}$$

where  $I_k^0(t)$  is the corresponding unknown baseline CIF and  $\beta$  is a vector of regression coefficients.

The proposed method requires an estimate of the baseline CIF. In analogy with Equation (3), one may think of CIF as an estimate of the cumulative probability for an average patient to fail from the cause of interest, that is

$$\hat{I}_k(t) = \hat{I}_k(t|Z^*) = 1 - (1 - \hat{I}_k^0(t))^{\exp(Z^*\hat{\beta})}, \tag{8}$$

where  $Z^* = \sum_{i=1}^n Z_i$ ,  $Z_i$  being a vector of covariate for patient  $i$ , and  $\beta$  is the vector maximizing the Fine and Gray partial likelihood. From Equations (7) and (8), it comes

$$\hat{I}_k^0(t) = 1 - (1 - \hat{I}_k(t))^{\exp(-Z^*\hat{\beta})}. \tag{9}$$

An heuristic to compute the baseline CIF estimate would be  $Z_{(n \times p)}$  being a matrix of  $p$  covariates:

- (1) fit the Fine and Gray regression model and get  $\hat{\beta}_{(1 \times p)}$ ;
- (2) estimate  $\hat{I}_k$ , the non-parametric CIF for event  $k$  and derive the estimated cumulative sub-distribution hazard function  $\hat{\Lambda}_k(t) = -\log(1 - \hat{I}_k(t))$ ;
- (3) compute  $Z_{(p \times 1)}^*$  the vector of length  $p$  of the means of  $Z$ 's columns;
- (4) estimate the baseline cumulative sub-distribution hazard function  $\hat{\Lambda}_k^0(t) = \hat{\Lambda}_k(t) \exp(-Z^* \hat{\beta})$ ;
- (5) let  $\hat{I}_k^0(t) = 1 - \exp(-\hat{\Lambda}_k^0(t))$  be the baseline CIF.

$\hat{I}_k^0(t)$  is the competing risks analogue of the baseline survival function used in Pan scheme.

## 2.2. Data augmentation algorithms

Data augmentation algorithms are general iterative schemes proposed by Tanner and Wong [18] to handle general missing data problems. The idea is to augment the observed data in order to be able to analyse it. It then becomes possible to derive an estimate of the parameter of interest by estimating the posterior of its distribution given the augmented data. This therefore implies two steps, the data augmentation step and the posterior step. In the data augmentation step, also referred to as multiple imputation by Rubin, [19] observed data are completed in  $m$  round of imputation using the conditional distribution of the missing data given the observed data, and the current distribution of the parameter. In the posterior step, the distribution of the parameter is updated as a mixture of the  $m$  posterior distributions given the augmented data.

Wei and Tanner [22] have proposed two implementations of the data augmentation algorithms, the Poor Man's and the ANDA. In the Poor Man's version, the multiple imputation step is performed using the conditional distribution of the missing data given the observed data and the current approximation of the parameter, i.e. the average of the parameter over the previous imputations step; whereas in the Asymptotic Normal version, the posterior distribution of the parameter is approximated by a mixture of multivariate normal distributions and the multiple imputation step is performed after drawing in the current estimation of the parameter distribution.

## 3. Data augmentation schemes for interval-censored competing risks data

Interval censoring arises when the time to an event of interest ( $T_i$ ) is not observable directly but is known to lie in an interval  $(U_i, V_i]$  with  $V_i = \infty$  if  $T_i$  is right censored. Interval-censored competing risks data can be denoted as  $\{U, V, \kappa, Z\}$ , where  $\kappa$  is a vector indicating the cause of failures and  $Z$  is a matrix of covariates.

As interval-censored data can be regarded as missing data, Pan [11] proposed to use data augmentation as a general method for handling it in the framework of the Cox proportional hazard regression. The main feature of this method is to sample from the current estimates of the baseline survival function with respect to the current coefficient estimate, patient intervals and covariates values. Once imputed data sets have been generated, it is straightforward to estimate coefficient posteriors from augmented data set using the Cox regression model and finally to update the coefficient, associated variance-covariance matrix, and baseline survival function in order to initiate a new iteration.

For interval-censored competing risks data, we propose, in the augmentation step, to sample from the current estimate of the baseline CIF with respect to the current estimate of the regression coefficient, patient intervals, and covariate values. Posteriors of coefficient estimates are derived from multiple imputed data sets using the Fine and Gray sub-distribution hazards regression. Final parameter

estimate, associated variance–covariance matrix, and baseline cumulative incidence estimate are then performed using Rubin’s rules at each step.

### 3.1. PMDA for interval-censored competing risks data

Interval-censored competing risks data are incomplete data from which it is easy to impute. Imputation is done using the current estimate of the baseline CIF conditional on patient interval and covariates using the current estimate of the coefficient. The PMDA for interval-censored competing risks data is done as follows:

Let  $\hat{I}_k^{0(i)}$  and  $\hat{\beta}^{(i)}$  be the baseline CIF and coefficient estimates at step  $i$ , respectively. In the augmentation step we need to generate  $m$  sets of data  $\{T_{(l)}, \kappa, \delta, Z\}, l = 1 \dots m$ , where  $T$  is a vector of exact failure or censoring times,  $\kappa$  is a vector indicating causes of failure,  $I_{\delta=0}$  indicates right censoring, and  $Z$  is a matrix of covariate.

For  $l = 1 \dots m$ :

- if  $V_j = \infty$ , that is, if the observation is right censored, let  $T_{(lj)} = U_j$  and set  $\delta_{(lj)} = 0$ ;
- else, sample  $X_j$  from  $1 - [1 - \hat{I}_k^{0(i)}] \exp(Z_j \hat{\beta}^{(i)})$  in  $(U_j, V_j]$ , that is, in  $(U_j, V_j]$ , sample  $\{t_{(j,1)}, \dots, t_{(j,q_j)}\}$  with probability proportional to the baseline sub-distribution hazard weighted by  $\exp(Z_j \beta^{(i)})$ . Let  $T_{(lj)} = X_j$  and set  $\delta_{(lj)} = 1$ .

In the posterior step we used imputed data sets to compute  $m$  Fine and Gray proportional sub-distribution hazards regressions and derive  $\hat{\beta}_{(l)}^{(i)}, l = 1 \dots m$ , and  $\hat{\Sigma}_{(l)}^{2(i)}, l = 1 \dots m$ , posteriors of the coefficient and associated variance–covariance matrix, respectively.

We use each augmented data set and associated coefficient estimates to compute the baseline estimate of the CIF  $I_{k(l)}^{0(i)}, l = 1 \dots m$ .

The coefficient is updated by averaging its posterior values over augmented data sets

$$\hat{\beta}^{(i+1)} = \frac{1}{m} \sum_{l=1}^m \hat{\beta}_{(l)}^{(i)}. \tag{10}$$

The updated variance–covariance matrix is derived as the sum of two terms: the within-imputation and the between-imputation variances

$$\hat{\Sigma}^{2(i+1)} = \frac{1}{m} \sum_{l=1}^m \hat{\Sigma}_{(l)}^{2(i)} + \left(1 + \frac{1}{m}\right) \frac{\sum_{l=1}^m (\hat{\beta}_{(l)}^{(i)} - \hat{\beta}^{(i+1)})(\hat{\beta}_{(l)}^{(i)} - \hat{\beta}^{(i+1)})^T}{m - 1}. \tag{11}$$

The first term is the average of the variances over augmented data sets, and the second term is the variance of the coefficient posteriors over augmented data sets. It is inflated by  $1/m$  to take account of the finite number of imputations.[11,19,20]

Updated baseline CIFs is also obtained by computing the average of the baseline CIF over imputed data sets

$$\hat{I}_k^{0(i+1)} = \frac{1}{m} \sum_{l=1}^m I_{k(l)}^{0(i)}. \tag{12}$$

The procedure is iterated until the desired precision is reached.

In order to initiate the algorithm, one needs a starting value for the coefficient vector ( $\hat{\beta}^{(0)}$ ) as well as for the baseline CIF ( $\hat{I}_k^{0(0)}$ ). In the context of the Cox regression, Pan proposed to set  $\hat{\beta}^{(0)}$  to the null vector and to compute the initial baseline survival function as an average of the baseline survival obtained on  $m$  imputed data set where right-censored observations are kept and exact failure times

are drawn from a uniform distribution in patient intervals. In analogy with Pan's idea, we propose to set  $\hat{\beta}^{(0)}$  to the null vector and to initiate the baseline CIF ( $\hat{I}_k^{0(0)}$ ) as follows:

Generate  $m$  sets of possibly right-censored data  $\{T_{(l)}, \kappa, \delta, Z\}, l = 1 \dots m$ , such that

- if  $V_j = \infty$ , let  $T_{(l)j} = U_j$  and set  $\delta_{(l)j} = 0$ ;
- or else, sample  $X_j$  from the uniform in  $[U_j, V_j]$ , let  $T_{(l)j} = X_j$  and set  $\delta_{(l)j} = 1$ ;
- using each  $\{T_{(l)}, \kappa, \delta, Z\}, l = 1 \dots m$ , compute  $\hat{I}_{k(l)}^{0(0)}$ .

The initial baseline CIF is then

$$\hat{I}_k^{0(0)} = \frac{1}{m} \sum_{l=1}^m \hat{I}_{k(l)}^{0(0)}.$$

### 3.2. ANDA for interval-censored data

For the ANDA scheme, one would modify the PMDA algorithm as follows:

- in the posterior step, the distribution of the regression coefficient is approximated by a mixture of normal distributions

$$g^{(i+1)}(\beta) = \frac{1}{m} \sum_{l=1}^m N(\hat{\beta}_{(l)}^{(i)}, \hat{\Sigma}_{(l)}^{(i)}). \quad (13)$$

The mean and variance of  $g^{(i+1)}(\beta)$  is given by Equations (10) and (11), respectively;

- in the multiple imputation step, we draw  $m$  times in  $g^{(i)}(\beta)$  to obtain  $\beta_{(l)}^{(i)}, l = 1, \dots, m$ . Then,
  - if  $V_j = \infty$ , let  $T_{(l)j} = U_j$  and set  $\delta_{(l)j} = 0$ ,
  - else, sample  $X_j$  from  $1 - [1 - \hat{I}_k^{0,(i)}]^{\exp(Z_j \hat{\beta}_{(l)}^{(i)})}$  in  $(U_j, V_j]$ . That is, sample  $\{t_{(j,1)}, \dots, t_{(j,qj)}\}$  with probability proportional to the baseline sub-distribution hazard weighted by  $\exp(Z_j \beta_{(l)}^{(i)})$ . Let  $T_{(l)j} = X_j$  and set  $\delta_{(l)j} = 1$ .

## 4. Simulation

### 4.1. Global design

In order to assess the effect of interval censoring on competing risks data and the behaviour of the proposed multiple imputation approaches with and without informative interval censoring, we performed simulations with respect to multiple scenarios.

Following prescription 1 of Lawless and Babineau,[23] we have generated interval-censored competing risks data in two independent steps:

- (1) using the methodology proposed by Haller and Ulm,[24] we generated sets of competing risks data along with a covariate associated with prespecified sub-distribution hazard rates ( $\beta$ );
- (2) we then considered an independent inspection time process [25,26] to generate interval-censored competing risks data sets from the former simulated competing risks data.

More precisely, let  $v = 0 \dots N$  be the vector of the  $N$  first integers (visit number), and  $len$  a fixed amount of time between two consecutive visits. Theoretical inspection times are then, for patient  $i$ :  $t_{i,v} = v \times len$ . To simulate some variability in inspection times between patients, random numbers were added to these fixed inspection times. We considered that the true inspection times for patient  $i$  were  $t_{i,v} + \epsilon_i$  where  $\epsilon_i$  is a vector of length  $N$  of random numbers drawn from a normal distribution with mean  $\mu$  and variance  $\sigma^2$ . Whereas  $\sigma$  is set independently from covariates,  $\mu$  has the following

**Table 1.** Parameters used for simulations: for each scenario 500 data sets have been simulated with respect to the parameters displayed in the table.

#	$n$	$\gamma$	Transition	$\beta$ (tr. 1)
1	300	0	1	Log (1)
2	300	3	1	Log (1)
3	300	3	2	Log (1)
4	900	0	1	Log (1.3)
5	900	3	1	Log (1.3)
6	900	-3	2	Log (1.3)

expression:  $\mu = \gamma \times \xi$ , where  $\gamma$  is a real parameter and  $\xi$  is linked to the tested treatment or to the patient's characteristics. Finally, each patient interval  $((U_i, V_i])$  was derived such that,  $U_i < X_i \leq V_i$ , where  $X_i$  is the exact failure time simulated for patient  $i$ ,  $U_i$  and  $V_i$  being consecutive inspection times previously simulated for patient  $i$ .

In the proposed simulation, we have set  $\xi = Z$ ,  $Z$  being the indicator of the tested medical practice. As a result, when  $\gamma = 0$ , visit compliance is not linked to the tested covariate. This design aim to reflect situations where the evaluated medical practice may influence both visit compliance and time to an event of interest, i.e. where the tested covariate induces informative interval censoring. It can also reflect a situation where the tested covariate has an impact on visit compliance although it has no effect on either time to an event of interest or time to a competing event. Table 1 displays parameters used to generate data sets in six scenarios:  $n$  is the number of observation simulated in each data set,  $\gamma$  is the mean of the distribution from which elements of  $\epsilon_i$  were drawn, and  $\beta$  is the prespecified sub-distribution hazard ratio of the tested covariate on transition 1. The *Transition* column indicates which transition is of interest. For each scenario, 500 data sets were generated with a covariate drawn from a binomial distribution.

Each resulting data set was then analysed independently using four different processes:

- (1) the Fine and Gray proportional sub-distribution hazards regression with the *original* sequence of times:  $T_i = X_i, i = 1 \dots n$  (denoted as the fine and gray (FG) process);
- (2) the PMDA approach for interval-censored competing risks data (denoted as the PMDA process);
- (3) the ANDA approach for interval-censored competing risks data (denoted as the ANDA process);
- (4) the Fine and Gray proportional sub-distribution hazards regression using upper bounds of generated intervals as sequence of times:  $T_i = R_i, i = 1 \dots n$  (denoted as the *single imputation using upper bounds of intervals process* (SIUB)).

Data augmentation schemes were launched with  $k = 5$  iterations and  $m = 10$  imputation rounds at each iteration.

In scenarios where the theoretical value of  $\beta$  is (not) zero, the observed type I (II) error rates were assessed by making the ratio of the number of the squared test statistic above (below) the  $1 - \alpha$  quantile of a  $\chi^2$  with one degree of freedom over the total number of generated data sets for that scenario. Computation was performed using the statistical R environment [27] with packages survival [28] and mstate.[29]

## 4.2. Results

In this series of simulations, interval-censored competing risks data sets were generated with respect to four parameters and analysed using the four described procedures, the FG procedure was applied on original simulated data before attribution of proper intervals. For each data set, the proportion of competing events was approximately 50%. The number of simulated patients per data set was 300 for the three first scenarios in which the true value of  $\beta$  is 0. In simulations 4–6 the number of simulated

**Table 2.** Numerical results of simulations: the MSE of the estimated coefficient is given with respect to the corresponding theoretical values, except for scenarios 3 and 6 where it is estimated using the mean of the coefficient estimated by the FG procedure.

#	FG			ANDA				PMDA				SIUB			
	$\hat{\beta}$	$\text{var}(\hat{\beta})$	MSE	$\hat{\beta}$	$\text{var}(\hat{\beta})$	MSE	CP	$\hat{\beta}$	$\text{var}(\hat{\beta})$	MSE	CP	$\hat{\beta}$	$\text{var}(\hat{\beta})$	MSE	CP
1	.003 (.164)	.026 (.002)	.027 (.036)	.002 (.163)	.026 (.002)	.026 (.036)	93.6 (93.8)	.002 (.163)	.026 (.002)	.026 (.036)	93.6 (94.6)	.001 (.163)	.026 (.002)	.026 (.035)	92.4 (95.0)
2	.003 (.164)	.026 (.002)	.027 (.036)	.002 (.162)	.026 (.002)	.026 (.035)	94.2 (95.2)	.001 (.162)	.026 (.002)	.026 (.035)	93.8 (92.8)	-.090 (.165)	.026 (.002)	.035 (.045)	91.2 (94.6)
3	-.004 (.165)	.028 (.002)	.027 (.035)	-.004 (.165)	.028 (.002)	.027 (.035)	95.2 (94.0)	-.004 (.165)	.028 (.002)	.027 (.035)	94.6 (94.4)	.088 (.166)	.028 (.002)	.035 (.044)	91.0 (95.2)
4	.258 (.094)	.009 (.000)	.009 (.013)	.256 (.094)	.009 (.000)	.009 (.013)	94.2 (95.4)	.256 (.094)	.009 (.000)	.009 (.013)	94.6 (95.4)	.257 (.094)	.009 (.000)	.009 (.013)	94.8 (96.2)
5	.258 (.094)	.009 (.000)	.009 (.013)	.256 (.094)	.009 (.000)	.009 (.013)	94.2 (97.8)	.256 (.094)	.009 (.000)	.009 (.013)	94.4 (95.4)	.189 (.096)	.009 (.000)	.014 (.020)	86.4 (97.8)
6	-.230 (.096)	.009 (.000)	.009 (.013)	-.233 (.095)	.009 (.000)	.009 (.013)	95.2 (96.4)	-.233 (.095)	.009 (.000)	.009 (.013)	95.2 (96.4)	-.159 (.096)	.009 (.000)	.014 (.019)	87.0 (95.8)

Notes: Standard errors are given in parentheses. The CP of the FG coefficient estimate considered to be the true value of interest is also given for the ANDA, AMDA, and SIUB procedures. The CP of the FG coefficient variance estimate are given in parentheses.

**Table 3.** Observed error rates.

Error rate	#	FG	ANDA	PMDA	SIUB
Type I	1	0.050	0.044	0.044	0.036
	2	0.050	0.046	0.042	0.102
	3	0.038	0.032	0.032	0.080
1-Type II	4	0.794	0.786	0.782	0.794
	5	0.794	0.784	0.776	0.530
	6	0.674	0.696	0.692	0.374

Notes: The type I error rate is given for simulations 1, 2, and 3. The observed statistical power (1 – the type II error rate) is given for simulations 4, 5, and 6.

patients was chosen to yield a type II error rate of 20% (Latouche et al. relation, Equation (4)). [30] In scenarios 3 and 6 effect of the covariate on cause 2 is not specified.

Table 2 displays numerical results of the simulations.  $\hat{\beta}$  is the mean of the estimated regression coefficient and  $\text{var}(\hat{\beta})$  the mean of its estimated variance. MSE is the mean squared error of the estimated coefficient. These values are given with their standard error in parentheses and percentage coverage probabilities (CP) when appropriate.

Table 3 displays the observed type I error rates for scenarios 1–3 and the observed statistical power (1 – the type II error rates) for scenarios 4–6.

In scenario 1, the covariate tested had a null prespecified effect on sub-distribution hazard rate of transition 1. Parameters  $len$  and  $\gamma$  were set to 150 and 0, respectively. The three procedures tested (ANDA, PMDA, and SIUB) yielded approximately the same unbiased results as compared to the reference procedure (FG).

In scenario 2,  $\gamma$  was set to 3 while other parameters were left unchanged. If the two data augmentation procedures gave approximately the same results as for scenario 1, the SIUB yielded downward biased estimations ( $\Delta \approx -.09$ ), and since the associated standard error was left unchanged, this procedure gave an inflated type I error rate (from 3.6% in scenario 1 to 10.2%).

In scenario 3, whereas parameters remained the same as in scenario 2, the transition of interest becomes transition 2. Data augmentation procedures yielded comparable results as in scenarios 1 and 2 but procedure SIUB yielded upward bias coefficients and for the same reason as in scenario 2, an inflated type I error rate of 8% (vs.  $\approx 3.2\%$  for data augmentation procedures).

Scenarios 4–6 are replicates of former scenarios except for the prespecified effect of the covariate on the sub-distribution hazard rate of transition 1 which was set to  $\log(1.3)$ . In these scenarios the data augmentation procedure yielded comparable results to the FG procedure, although they show slightly downward bias. The SIUB procedure gave biased results when  $\gamma \neq 0$ . Absolute bias is approximately 27% and 30% corresponding to a loss of power of about 33% and 45% in scenarios 5 and 6, respectively.

## 5. Discussion

In this paper, we propose an extension of Pan's multiple imputation approach to Cox regression with interval-censored data to the setting of interval censored competing risks data using the Fine and Gray proportional sub-distribution hazards model. Accordingly, we consider sampling from the current estimation of the baseline CIF with respect to the current coefficient estimate, patients interval and covariate values. As Pan argued, this method is easy to implement and it can take advantage of existing statistical libraries to analyse imputed data sets. We have implemented both the PMDA and the ANDA schemes allowing for multiple covariates of different kind.

An interesting feature of this multiple imputation approach is that it does not require the assumption of noninformative interval censoring, as interval-censored data are not handled as such, but augmented in exact failure times or right-censored observations. This feature is particularly appealing in the setting of interval-censored competing risks data where informative interval-censoring is likely to exist, due not only to a correlation between the time to the event of interest but also to the

cause specific hazard rate of a competing event, if it is linked to the tested covariate. This may happen in the clinical trial setting or in a prognostic cohort study where patient-related characteristics are tested.

To test the behaviour of the proposed method, in presence or not of informative interval censoring, we have simulated interval-censored competing risks data with two possible transitions. Data were simulated along with a binary covariate having a prespecified effect on the sub-distribution hazard rate of transition 1. In the simulation design, this covariate could also induce informative interval-censoring through the  $\gamma$  parameter when both  $\gamma$  and the tested coefficient were not null.

Results are summarized in the three following points:

- (a) where the visit compliance is not linked to the tested covariate (scenarios 1 and 4), the three tested procedures behave well;
- (b) where the tested covariate does not affect the sub-distribution hazard rate of either events, but affects visit compliance (scenarios 2 and 3), the simple imputation approach gives biased estimates whereas the multiple imputation approaches are robust;
- (c) where the tested covariate affects both the sub-distribution hazard rate of events 1 and 2 but also visit compliance (scenarios 5 and 6), the simple imputation approach behaves poorly showing biased results, whereas the multiple imputation approaches give unbiased coefficient estimates.

As mentioned by Gray,[31] in the particular setting of competing risks, a factor may affect the cause specific hazard rate of an event although it has a different effect on the cumulative incidence of that event. As a corollary, the possibility exists that an exposition has a positive effect on the cumulative incidence of an event of interest while the cause specific hazard of the competing event remains higher in the exposed group than in the non-exposed group. If one assumes a link between the cause specific hazard of the competing event and visit compliance, this situation would produce misleading results when the effect of this exposition on the sub-distribution hazard of the event of interest is estimated using the simple imputation approach, as shown by simulation results.

For instance, in a clinical study this situation may arise when the objective is to evaluate the effect of high doses as compared to standard doses in cancer treatment. High doses may have an effect on both the response rate and the level of side effects, the latter being responsible for modified visit compliance in all exposed patients, irrespective of the rate of observed responses.

The intuition behind the difference observed when using the single vs. the multiple imputation approach may be expressed as follows: when single imputation procedures are used to estimate the effect of a covariate from interval-censored competing risks data with informative interval censoring, the modified compliance would imply a bias in the estimated coefficients because the order of times to a particular event would be modified with respect to the tested covariate. When using multiple imputation approaches, the probability of any particular order in event times of interest becomes small in each of the imputed data sets, while on average, coefficient estimations derived from the same imputed data sets remain correct.

In this article, we have shown that the multiple imputation approach to interval-censored data developed by Pan [11] in the setting of the Cox regression could be adapted to the setting of interval-censored competing risk data using the Fine and Gray regression model. The proposed approach can be useful in many situations, particularly when the assumption of noninformative interval censoring does not hold. As noted by Jackson [32], there are many reasons to question this hypothesis in the clinical setting. In clinical trial, it happens if the tested exposition affects both the time to an event of interest and the visit compliance [16] the latter being directly associated with the time of the event of interest or as mentioned earlier, via an effect on the cause specific hazard of a competing event.

In epidemiological studies or studies designed to evaluate prognostic factors, the multiple imputation approach would be useful to compare results from different institutions or if the tested covariate is suspected to have an effect on visit compliance. Visit compliance may also be linked to some patient-related characteristics such as age, sex or to sociocultural factors including education level, marital

status, use of psychoactive substances or be linked to the treatment compliance itself. Consequently, caution is needed when testing whether patient-related characteristics affect the cumulative incidence of a particular event. In these situations, multiple imputation approaches would be useful to relax the noninformative interval-censoring assumption.

We have implemented this approach in the MIICD R library through two main functions allowing to handle interval-censored data in the setting of competing risks using the Fine and Gray regression model but also in the setting of the classical Cox regression model as described in Pan's paper.

## Acknowledgements

Authors thank Didi Jasmin from the European School of Haematology for helpful comments and manuscript correction.

## Disclosure statement

Authors have no financial interest arising from the direct applications of their research.

## ORCID

Marc Delord  <http://orcid.org/0000-0002-0455-6749>

## References

- [1] Kaslow RA, Ostrow DG, Detels R, Phair JP, Polk BF, Rinaldo CR. The multicenter AIDS cohort study: rationale, organization, and selected characteristics of the participants. *Am J Epidemiol.* 1987;126(2):310–318.
- [2] Turnbull BW. The empirical distribution function with arbitrarily grouped, censored and truncated data. *J R Stat Soc Ser B (Methodol).* 1976;38(3):290–295.
- [3] Satten GA. Rank-based inference in the proportional hazards model for interval censored data. *Biometrika.* 1996;83(2):355–370.
- [4] Gooley TA, Leisenring W, Crowley J, Storer BE. Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks: new representations of old estimators. *Stat Med.* 1999;18(6):695–706.
- [5] Hudgens MG, Li C, Fine JP. Parametric likelihood inference for interval censored competing risks data. *Biometrics.* 2014;70(1):1–9.
- [6] Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, et al. Investigators ENEST. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010;362(24):2251–2259.
- [7] Lindsey JC, Ryan LM. Tutorial in biostatistics methods for interval-censored data. *Stat Med.* 1998;17(2):219–238.
- [8] Heller G. Proportional hazards regression with interval censored data using an inverse probability weight. *Lifetime Data Anal.* 2011;17(3):373–385.
- [9] Sun X, Li X, Chen C, Song Y. A review of statistical issues with progression-free survival as an interval-censored time-to-event endpoint. *J Biopharm Stat.* 2013;23(5):986–1003.
- [10] Finkelstein DM. A proportional hazards model for interval-censored failure time data. *Biometrics.* 1986;42(4):845–854.
- [11] Pan W. A multiple imputation approach to Cox regression with interval-censored data. *Biometrics.* 2000;56(1):199–203.
- [12] Hsu CH, Taylor JMG, Murray S, Commenges D. Multiple imputation for interval censored data with auxiliary variables. *Stat Med.* 2007;26(4):769–781.
- [13] Gómez G, Calle ML, Oller R, Langohr K. Tutorial on methods for interval-censored data and their implementation in R. *Stat Model.* 2009;9(4):259–297.
- [14] Oller R, Gómez G, Calle ML. Interval censoring: model characterizations for the validity of the simplified likelihood. *Can J Stat.* 2004;32(3):315–326.
- [15] Sun J. *The statistical analysis of interval-censored failure time data.* New York: Springer; 2006.
- [16] Zhang Z, Sun L, Sun J, Finkelstein DM. Regression analysis of failure time data with informative interval censoring. *Stat Med.* 2007;26(12):2533–2546.
- [17] Heitjan DF. The nsabp trials. *N Engl J Med.* 1994;331(12):809–810.
- [18] Tanner MA, Wong WH. The calculation of posterior distributions by data augmentation. *J Am Stat Assoc.* 1987;82(398):528–540.
- [19] Rubin DB. *Multiple imputation for nonresponse in surveys.* New York: Wiley; 1987.
- [20] Schenker N, Welsh A. Asymptotic results for multiple imputation. *Ann Stat.* 1988;16(4):1550–1566.

- [21] Fine JP, Gray RJ. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J Am Stat Assoc.* 1999;94(446):496–509.
- [22] Wei GC, Tanner MA. Applications of multiple imputation to the analysis of censored regression data. *Biometrics.* 1991;47(4):1297–1309.
- [23] Lawless J, Babineau D. Models for interval censoring and simulation-based inference for lifetime distributions. *Biometrika.* 2006;93(3):671–686.
- [24] Haller B, Ulm K. Flexible simulation of competing risks data following prespecified subdistribution hazards. *J Stat Comput Simul.* 2014;84(12):2557–2576.
- [25] Grüger J, Kay R, Schumacher M. The validity of inferences based on incomplete observations in disease state models. *Biometrics.* 1991;47(2):595–605.
- [26] Lawless JF. *Statistical models and methods for lifetime data*, Vol. 362. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons; 2003.
- [27] R Core Team. *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014.
- [28] Therneau TM. *Survival analysis*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014 [r package version 2.38-1].
- [29] dejjWreede LC, Fiocco M, Putter H, et al. mstate: an r package for the analysis of competing risks and multi-state models. *J Stat Softw.* 2011;38(7):1–30.
- [30] Latouche A, Porcher R, Chevret S. Sample size formula for proportional hazards modelling of competing risks. *Stat Med.* 2004;23(21):3263–3274.
- [31] Gray RJ. A class of k-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann Stat.* 1988;16(3):1141–1154.
- [32] Jackson D, White IR, Seaman S, Evans H, Baisley K, Carpenter J. Relaxing the independent censoring assumption in the Cox proportional hazards model using multiple imputation. *Stat Med.* 2014;33(27):4681–4694.



