



Chimiorésistance et implications pronostiques de l'expression et de l'épissage alternatif du transporteur ABCA3 dans les leucémies aiguës myéloïdes

Antony Marcel Ceraulo

► To cite this version:

Antony Marcel Ceraulo. Chimiorésistance et implications pronostiques de l'expression et de l'épissage alternatif du transporteur ABCA3 dans les leucémies aiguës myéloïdes. Cancer. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1209 . tel-03643154

HAL Id: tel-03643154

<https://theses.hal.science/tel-03643154>

Submitted on 15 Apr 2022

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.



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N°340
(Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire)

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Discipline : Biologie, médecine et santé

Soutenue publiquement le 25/10/2021, par :
M. Antony Marcel CERAULO

Chimiorésistance et implications pronostiques de l'expression et de l'épissage alternatif du transporteur ABCA3 dans les leucémies aiguës myéloïdes

Devant le jury composé de :

M. le Pr. Charles DUMONTET, PU-PH, UCBL	Président
M. le Pr. Eric DELABESSE, PU-PH, Université Toulouse III	Rapporteur
Mme le Dr. Béatrice EYMIN, CR, INSERM	Rapporteuse
Mme le Dr. Pascale FLANDRIN-GESTA, PH, CHU St-Etienne	Examinatrice
M. le Dr. Franck MORTREUX, DR, ENS	Directeur de thèse
M. le Pr. Eric WATTEL, PU-PH, UCBL	Co-Directeur de thèse
Mme le Dr Véronique MAGUER-SATTA, DR, INSERM	Invitée

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

RESUME

Malgré les progrès récents, le pronostic des leucémies aiguës myéloïdes reste sombre, quel que soit l'âge. L'une des pistes d'amélioration du pronostic de cette maladie est la rationalisation de l'intensité thérapeutique délivrée selon des facteurs pronostiques identifiés au diagnostic. L'épissage alternatif est décrit comme spécifiquement altéré dans les cellules cancéreuses. C'est donc une potentielle source de nouveaux biomarqueurs. En comparant les patrons d'épissage alternatif d'adultes atteints de cette pathologie avec différentes réponses aux traitements, notre équipe a identifié *ABCA3* et son exon 19 comme étant associés au pronostic. Or, *ABCA3* est suspecté d'être en partie responsable de la chimiorésistance des cellules souches leucémiques, à l'origine des rechutes, ce qui a motivé notre étude.

Chez l'adulte traité par chimiothérapie intensive, l'expression d'*ABCA3* n'était pas associée au pronostic tandis qu'un taux élevé d'exclusion de l'exon 19 impactait négativement la survie. Cependant, l'expression d'*ABCA3* s'est avérée être un facteur prédictif de la réponse au gemtuzumab-ozogamicine chez l'adulte. Chez l'enfant, nous avons démontré qu'une forte expression du gène *ABCA3* avait un impact pronostique péjoratif. Un taux élevé d'exclusion de son exon 19 était également associé à un pronostic défavorable. L'impact combiné de l'expression d'*ABCA3* et de l'exclusion de l'exon 19 a permis la mise au point d'un score pronostique. *In silico*, l'exclusion de l'exon 19 est prédite comme augmentant les capacités d'efflux d'*ABCA3*. *In vitro*, dans des lignées cellulaires une expression élevée d'*ABCA3* et un taux d'exclusion élevé de l'exon 19 favorise la résistance aux anthracyclines, drogue maîtresse dans le traitement des leucémies aiguës myéloïdes.

Ces résultats ouvrent la voie à une optimisation de la stratification pronostique dans les leucémies aiguës myéloïdes, à une rationalisation du traitement par gemtuzumab-ozogamicine et possiblement à un traitement ciblé de la résistance des cellules souches leucémiques.

Mots-clés : Leucémie aiguë myéloïde, *ABCA3*, épissage, pronostic, survie, gemtuzumab-ozogamicine

TITLE: ABCA3 transporter in Acute Myeloid Leukemia, gene expression and splicing impact sensitivity to treatment and prognosis.

ABSTRACT

Despite recent progress, acute myeloid leukemia outcomes are dismal in children and adults. One way of improving survival is through a rationale use of intensive therapy according to prognostic factors. Alternative splicing is deregulated in cancer cells and thus a potential source of new biomarkers. By comparing alternative exon usages between adult patients with different response to treatment, our team identified a prognostic impact *ABCA3* and its exon 19. Moreover, *ABCA3* is suspected to be partly responsible for the resistance to treatment of leukemic stem cells, hence its implication in relapse.

In adult patients treated with intensive chemotherapy, *ABCA3* expression was not prognostic but a high exon 19 skipping rate had an adverse impact on survival. However, we demonstrated that *ABCA3* expression in adults was a predictive factor for gemtuzumab-ozogamicin, patients with a high expression having worsened outcomes. In children, a high *ABCA3* expression was associated with dismal outcomes and a high exon 19 skipping rate also had a negative impact. We obtained a nice relapse risk stratification with the combination of *ABCA3* expression and exon 19 skipping. *In silico*, exon 19 skipping could enhance efflux capabilities of *ABCA3*. *In vitro*, cell lines with high *ABCA3* expression or high exon 19 skipping rates were resistant to anthracyclins, a cornerstone drug in acute myeloid leukemia treatment.

These results pave the way to a better risk stratification of patients at diagnostic, a rationale use of gemtuzumab-ozogamicin, and possibly offer a way to target intrinsic treatment-resistance in leukemic stem cells.

Keywords: Acute myeloid leukemia, *ABCA3*, splicing, prognostic, survival, gemtuzumab-ozogamicin

Laboratoire de rattachement :

Laboratoire de Biologie et de Modélisation de la Cellule (UMR 5239)

46, allée d'Italie – 69007 LYON, France

REMERCIEMENTS

Cette thèse est l'aboutissement de 5 années de dur labeur, de joies et de doutes, de craintes et d'espoir. J'aurai appris tant de choses, tant sur le plan scientifique et que sur le plan personnel, durant ces années. Je tiens donc à remercier toutes celles et ceux qui m'ont aidé à concrétiser ce travail :

- M. le Pr. Eric Wattel, pour avoir lancé et dirigé ces recherches ;
- M. le Pr. Yves Bertrand, pour son soutien sans faille durant ses longues années ;
- M. Franck Mortreux, pour son aide dans la finalisation du projet et de sa rédaction ;
- Mme Catherine Koering, pour m'avoir aidé à réapprivoiser l'environnement du laboratoire de recherche après de longues années en clinique ;
- Mme Sandrine Hayette, pour son aide dans la compréhension et l'application des techniques de biologie moléculaire ;
- Mme Aminetou Mint Mohamed, pour m'avoir lancé sur le sujet et m'avoir guidé lors de mes premiers pas au laboratoire ;
- Tous les membres du LBMC et ses 2 directeurs successifs avec qui j'ai pu échanger (M. Pierre Jalinot et M. Didier Auboeuf).
- Mesdames et Messieurs membres du jury, pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Et si j'ai tenu sur la longueur, c'est avant tout parce-que j'ai pu compter sur le soutien de ma famille et de mes amis, que je tiens également à remercier.

Je ne peux pas citer tous mes amis, ils se reconnaîtront !

A ma mère et ma sœur, merci d'avoir été compréhensives quand j'ai décidé de poursuivre les études au-delà de la thèse en Médecine.

A mes beaux-parents, au soutien toujours sans faille avec nous.

A Lyana, ma fille adorée, qui rend notre vie tellement plus belle et intéressante !

A Noémie, mon éternel amour, qui a été patiente et compréhensive avec moi, qui m'a soutenu quand j'en avais le plus besoin, et sans qui je n'aurais pas pu finir ce travail.

Table des matières

ABREVIATIONS.....	- 9 -
AVANT-PROPOS.....	- 10 -
INTRODUCTION	- 12 -
1. Les leucémies aiguës myéloïdes.....	- 13 -
1.1. Définitions et épidémiologie.....	- 13 -
1.2. Prise en charge diagnostique.....	- 21 -
1.3. Caractéristiques biologiques.....	- 23 -
1.3.1. Caractéristiques cytogénétiques.....	- 23 -
1.3.2. Caractéristiques génomiques.	- 26 -
1.3.3. Caractéristiques épigénétiques.	- 30 -
1.3.4. Caractéristiques transcriptomiques.....	- 30 -
1.3.5. LAM et microenvironnement.....	- 31 -
1.4. Traitement actuel des LAM.....	- 32 -
1.5. Perspectives thérapeutiques.	- 36 -
2. Epissage des ARN pré-messagers.	- 39 -
2.1. Le spliceosome.....	- 39 -
2.2. Epissage alternatif.....	- 42 -
2.3. Epissage et maladies humaines.	- 45 -
3. Epissage alternatif et cancer.	- 46 -
3.1. L'épissage alternatif pathologique comme une nouvelle caractéristique des cellules cancéreuses.	- 46 -
3.2. Apport théranostique de l'épissage alternatif dans les cancers.	- 50 -
3.3. Thérapies ciblant l'épissage en cancérologie.....	- 52 -
3.4. Epissage alternatif dans les LAM.....	- 58 -
4. Impact du gène ABCA3 dans les hémopathies malignes.....	- 60 -
4.1. La famille des ABC transporteurs.	- 60 -
4.2. ABCA3 : structure, fonction et pathogénie.	- 64 -
4.3. ABCA3 et résistance aux traitements du cancer, mécanismes et impacts pronostiques.	- 67 -
OBJECTIFS	- 77 -

RESULTATS	- 78 -
PARTIE 1 : IMPACT PRONOSTIQUE DE L'EXPRESSION D'ABCA3 DANS LES LAM DE L'ADULTE ET DE L'ENFANT.	- 80 -
ABSTRACT.....	- 83 -
INTRODUCTION.....	- 84 -
PATIENTS & METHODS	- 85 -
RESULTS	- 85 -
DISCUSSION	- 97 -
REFERENCES.....	- 99 -
SUPPLEMENTARY DATA	- 101 -
PARTIE 2 : L'EXCLUSION DE L'EXON 19 D'ABCA3 MODULE SON IMPACT PRONOSTIQUE DANS LES LAM.	- 112 -
1. Impact structurel de l'exclusion de l'exon 19 d'ABCA3.	- 113 -
2. L'exclusion de l'exon 19 confère un pronostic défavorable dans les LAM pédiatriques.....	- 115 -
PARTIE 3 : PROPOSITION D'UN NOUVEAU SCORE TRANSCRIPTIONNEL ET POST-TRANSCRIPTIONNEL DANS LES LAM PEDIATRIQUES.	- 118 -
INTRODUCTION.....	- 127 -
RESULTS	- 131 -
DISCUSSION	- 140 -
REFERENCES.....	- 142 -
SUPPLEMENTARY DATA	- 145 -
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	- 151 -
REFERENCES.....	- 156 -
ANNEXES.....	- 180 -
Annexe 1	- 181 -
Annexe 2	- 187 -
Annexe 3	- 195 -

ABREVIATIONS

ABCA3 : ATP-binding cassette A3

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ASO : anti-sense oligonucleotide

ATO : arsenic tri-oxide

ATP : adénosine triphosphate

ATRA : acide all-trans rétonoïque

CBF : core-binding factor

CHIP : clonal hematopoiesis of indeterminate significance

CNS : central nervous system

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CSM : cellules souches mésenchymateuses

CSL : cellules souches leucémiques

ELN : European LeukemiaNet

ESE : exon specific enhancer

ESS : exon specific silencer

FAB : French-American-British classification

FISH : Fluorescence in situ par Hybridation

GO : gemtuzumab-ozogamycin

InCa : Institut National du Cancer

ISE : intron specific enhancer

ISI : intron specific silencer

LAIP : leukemia aberrant immunophenotype

LAL : leucémie aiguë lymphoïde

LAM : leucémie aiguë myéloïde

LLC : leucémie lymphoïde chronique

LMC : leucémie myéloïde chronique

lncRNA : long non-coding RNA

MDR : multi-drug resistance

miR : micro-ARN

ML-DS : myeloid leukemia associated with Down syndrome

MPAL : mixed phenotype acute leukemia

MRD : molecular residual disease

NBD : nuclear binding domain

NMD : nonsense mediated decay

OMS : organization mondiale de la santé

OR : odds-ratio

RNAPII : ARN polymérase II

RR : Risque relatif

RT-qPCR : reverse transcription – quantitative polymerase chain reaction

SEER : Surveillance Epidemiology and End Results

SG : survie globale

SRE : splicing regulator sequence

snRNA : small nuclear RNA

snRNP : small nuclear ribonucleoprotein

SSE : survie sans événement

SSL : survie sans leucémie

TCSH : transplantation de CSH

TET2 : Ten-Eleven-Translocation 2

TMD : transmembrane domain

VAF : variant allele frequency

AVANT-PROPOS

Les leucémies aiguës sont des néoplasies touchant les précurseurs des leucocytes et pouvant apparaître à tout âge de la vie. Elles représentent la première cause de cancer chez l'enfant mais seulement 1% des cancers de l'adulte. Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont un ensemble hétérogène de néoplasies développées aux dépens de progéniteurs ou de précurseurs cellulaires engagés dans la lignée myéloïde de l'hématopoïèse. Les LAM représentent environ 75 à 80% des leucémies aiguës de l'adulte contre 15 à 20% des leucémies aiguës pédiatriques. Bien que les taux de rémission et de survie se soient progressivement améliorés sur les 30 dernières années, le défi thérapeutique reste encore énorme dans ces deux populations, avec une survie globale à 5 ans de l'ordre de 70 à 75% chez l'enfant et de 25 à 35% chez l'adulte. L'amélioration du pronostic de ces maladies est principalement liée à deux facteurs : l'amélioration des soins de support onco-hématologiques et une meilleure rationalisation des traitements basée sur des facteurs biologiques théranostiques, d'abord cytogénétiques puis plus récemment génomiques.

Cependant, il reste encore beaucoup de progrès à faire dans ce domaine de médecine prédictive et c'est dans ce contexte que ce travail se positionne. En effet, bien que plus implémentée dans d'autres domaines de la cancérologie, la transcriptomique en est encore à ses balbutiements dans les LAM. De plus, les apports actuels en clinique de la transcriptomique se résument essentiellement à des identifications de mutations ou de transcrits de fusion et moins à des niveaux d'expression génique et peu de travaux prennent en compte la possibilité d'un épissage alternatif propre à la cellule cancéreuse.

Dans le cadre d'une introduction bibliographique, nous ferons dans un premier temps une synthèse des connaissances actuelles dans les leucémies aiguës myéloïdes, en insistant notamment sur la biologie de cette affection. Nous aborderons ensuite l'intérêt d'étudier les mécanismes d'épissage alternatif en cancérologie et enfin nous développerons les connaissances actuelles d'un de nos gènes d'intérêt dans le domaine théranostique des LAM : *ABCA3*. Par la suite, nous présenterons les résultats de nos travaux sur l'apport pronostique de l'étude transcriptomique d'*ABCA3* dans les LAM et son lien avec la chimiorésistance. Enfin nous élargirons le spectre de nos découvertes, en présentant les résultats de travaux supplémentaires portant sur un autre gène d'intérêt : *TET2*.

INTRODUCTION

1. Les leucémies aiguës myéloïdes.

1.1. Définitions et épidémiologie.

1.1.1. Définitions.

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) représentent un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par la prolifération de cellules hématopoïétiques de la lignée myéloïde bloquées à un stade précoce de leur maturation. Ces cellules malignes sont communément appelées « blastes ».

Dans le modèle le plus répandu actuellement, le processus de transformation d'une cellule hématopoïétique normale en cellule tumorale requiert l'accumulation d'un ou plusieurs événement(s) génétique(s) qui conduisent à l'émergence d'un clone cellulaire anormal possédant un avantage prolifératif par rapport aux cellules médullaires saines. L'acquisition d'au moins 2 de ces événements a longtemps été considérée comme indispensable à cette transformation : association d'au moins un événement dans un gène dit de classe I (impliqué dans la prolifération, tel que *FLT3*) avec au moins un événement dans un gène dit de classe II (responsable d'un blocage de maturation, tel que le transcrit de fusion *PML-RARA*) (Kelly and Gilliland 2002). Des études moléculaires récentes ont démontré que le phénomène de transformation leucémique est en réalité plus complexe, et 8 groupes d'anomalies génétiques conductrices (H. Döhner, Weisdorf, and Bloomfield 2015) dans les LAM sont maintenant bien individualisés, parmi lesquelles figurent les altérations de la mécanique d'épissage (Figure 1). L'organisation mondiale pour la santé (OMS) a révisé en 2016 (Arber et al. 2016) sa classification des cancers pour les LAM (Tableaux 1 et 2), avec une prise en compte plus importante des anomalies moléculaires dans la hiérarchisation. Les LAM y sont définies comme la présence de « blastes » dans la moelle osseuse, ceux-ci devant représenter plus de 20% de la cellularité médullaire totale, excepté en cas d'identification de certaines anomalies génétiques récurrentes et spécifiques des LAM : les anomalies chromosomiques de type $t(15;17);PML-RARA$, $inv(16)$ ou $t(16;16);CBFB-MYH11$ et $t(8;21);RUNX1-RUNX1T1$.

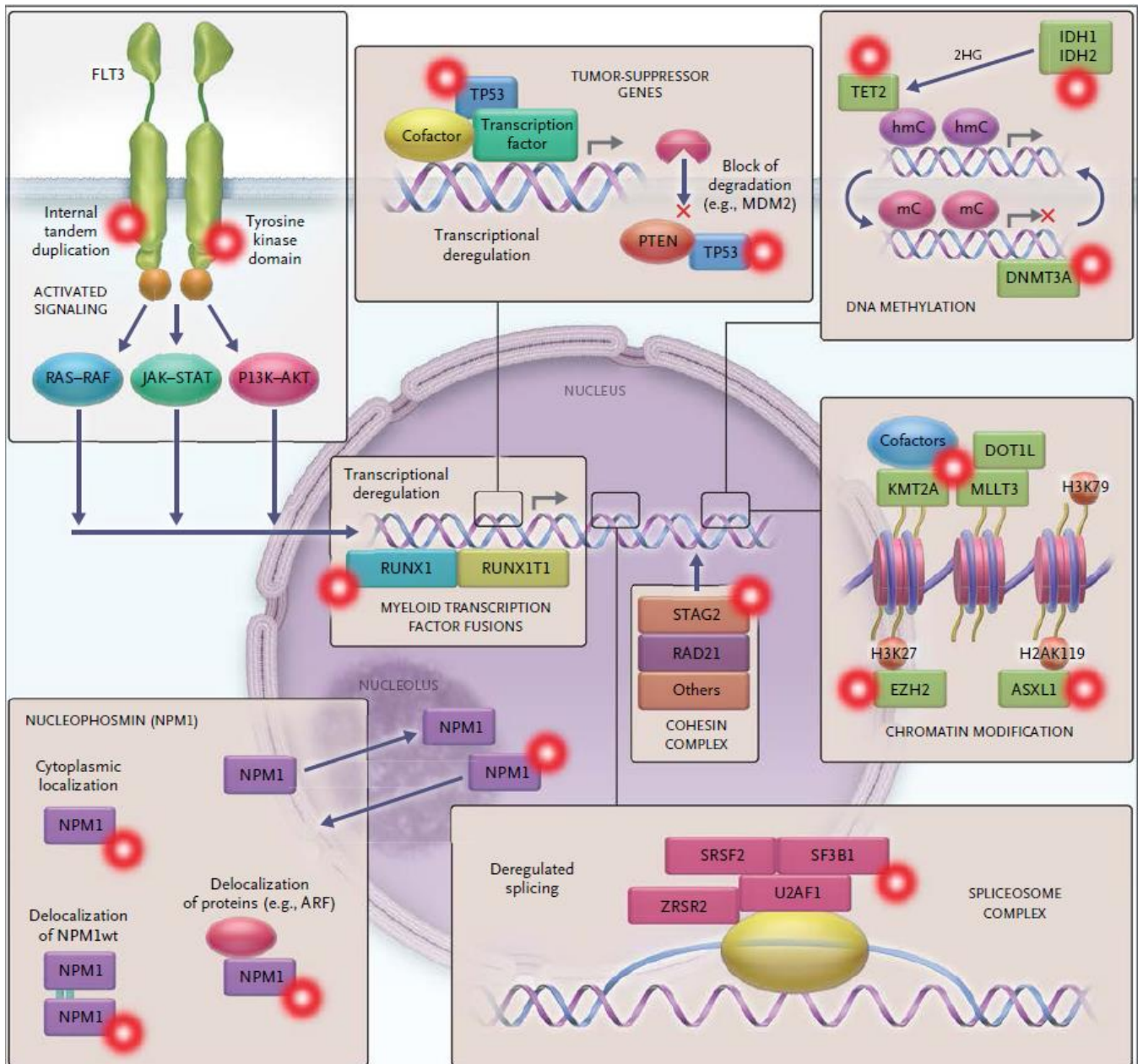


Figure 1. Les 8 catégories d'altérations génétiques conductrices de leucémogénèse. (figure extraite de (H. Döhner, Weisdorf, and Bloomfield 2015)). De la gauche vers la droite et du haut vers le bas : activation constitutionnelle de voies de signalisation cellulaire (*FLT3*, *NRAS*, *KRAS*...), inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (*TP53*,...), anomalie de méthylation de l'ADN (*IDH1*, *IDH2*, *TET2*, *DNMT3A*...), activité anormale de facteurs de transcription (*WT1*, transcrits de fusion *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*...), anomalie du complexe des cohésines (*STAG2*, *RAD21*...), anomalie de l'organisation de la chromatine (*KMT2A*, *EZH2*, *ASXL1*...) et anomalie de l'épissage (*U2AF1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *WT1*...). Constituant un groupe à part, la protéine NPM1 est impliquée dans la régulation de la synthèse ribosomale, l'assemblage des histones, la prolifération cellulaire et la régulation de p53.

Leucémie aiguë myéloïde (LAM) et néoplasies associées
LAM avec anomalie génétique récurrente : - avec t(8;21)(q22;q22.1);<i>RUNX1-RUNX1T1</i> - avec inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22);<i>CBFB-MYH11</i> - leucémie aiguë promyélocytaire avec transcrit <i>PML-RARA</i> - avec t(9;11)(p21.3;q23.3);<i>MLLT3-KMT2A</i> - avec t(6;9)(p23;q34.1);<i>DEK-NUP214</i> - avec inv(3)(q21.3;q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2);<i>GATA2,MECOM</i> - avec t(1;22)(p13.3;q13.3);<i>RBM15-MKL1</i> - avec mutation de <i>NPM1</i> - avec mutation bi-allélique de <i>CEBPA</i> - Entité provisoire : LAM avec mutation de <i>RUNX1</i> - Entité provisoire : LAM avec t(9;22)(q34.1;q11.2);<i>BCR-ABL1</i>
LAM de novo avec dysmyélopoïèse : caryotype complexe (≥ 3 anomalies) ou -7/del(7q), del(5q)/t(5q), i(17q)/t(17p), -13/del(13q), del(11q), del(12p)/t(12p), idic(X)(q13), t(11;16)(q23.3;p13.3), t(3;21)(q26.2;q22.1), t(1;3)(p36.3;q21.2), t(2;11)(p21;q23.3), t(5;12)(q32;p13.2), t(5;7)(q32;q11.2), t(5;17)(q32;p13.2), t(5;10)(q32;q21.2) et t(3;5)(q25.3;q35.1)
LAM secondaire
LAM, sans autre précision : - LAM avec différenciation minime (FAB M0) - LAM sans maturation (FAB M1) - LAM avec maturation (FAB M2) - LAM myélomonocytaire (FAB M4) - LAM monoblastique/monocytaire (FAB M5) - LAM érythroïde pure (FAB M6) - LAM mégacaryoblastique (FAB M7) - LAM à composante basophile - LA avec myélofibrose
Sarcome granulocytaire
Proliférations myéloïdes liées au syndrome de Down : - Reaction leucémoïde transitoire - Leucémie myéloïde associée au syndrome de Down (ML-DS)
Néoplasie à cellules dendritiques plasmacytoïdes blastiques
Leucémie aiguë de lignée ambiguë
Leucémie aiguë indifférenciée
Leucémie aiguë de phénotype mixte (MPAL) avec t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
MPAL avec t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> réarrangé
MPAL, B/myéloïde, sans autre précision
MPAL, T/myéloïde, sans autre précision

Tableau 1. Classification OMS 2016 des hémopathies myéloïdes, restreintes aux leucémies aiguës myéloïdes. Adapté d'(Arber et al. 2016). LAM (*leucémie aiguë myéloïde*), FAB (*French-American-British classification*), ML-DS (*myeloid leukemia associated with Down syndrome*), MPAL (*mixed phenotype acute leukemia*).

Néoplasie myéloïde avec prédisposition constitutionnelle sans anomalie préexistante ni dysfonction d'organe
LAM avec mutation constitutionnelle de <i>CEBPA</i>
Néoplasie myéloïde avec mutation constitutionnelle de <i>DDX41</i>
Néoplasie myéloïde avec prédisposition constitutionnelle et anomalie plaquettaire préexistante
Néoplasie myéloïde avec mutation constitutionnelle de <i>RUNX1</i>
Néoplasie myéloïde avec mutation constitutionnelle de <i>ANKRD26</i>
Néoplasie myéloïde avec mutation constitutionnelle de <i>ETV6</i>
Néoplasie myéloïde avec prédisposition constitutionnelle et autre dysfonction d'organe
Néoplasie myéloïde avec mutation constitutionnelle de <i>GATA2</i>
Néoplasie myéloïde associée aux syndromes d'insuffisance médullaire constitutionnelle
Néoplasie myéloïde associée avec les troubles de la biologie du télomère
Leucémie myélomonocytaire juvénile associée à la neurofibromatose, au syndrome de Noonan ou syndromes Noonan-like
Néoplasie myéloïde associée au syndrome de Down

Tableau 2. Classification OMS 2016 des hémopathies myéloïdes avec prédisposition constitutionnelle, adapté d'(Arber et al. 2016). *LAM (leucémie aiguë myéloïde)*.

1.1.2. Données épidémiologiques.

L'Institut National du Cancer (InCa) a estimé le nombre de cas de LAM en France en 2018 à 3428 (soit 62% de l'ensemble des leucémies), avec un âge médian à 69 ans pour les hommes et 72 ans pour les femmes, soit un taux d'incidence standardisée sur l'âge de 4,9 (femmes) à 5,7 (hommes) pour 100 000 habitants (Le Guyader-Peyrou et al. 2019), ce qui est comparable aux données de la base SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) aux Etats-Unis. Ce taux d'incidence est en légère augmentation depuis les années 1990, avec environ +1% entre 1990 et 2018.

A l'échelle individuelle, l'incidence augmente progressivement avec l'âge, avec une accélération notable à partir de 50 ans (Figure 2). Chez l'enfant (de 0 à 14 ans), durant la période 2004-2008 en France, 16% des leucémies avaient un phénotype myéloïde, avec un taux d'incidence de 6,2 par million d'habitant et par an (incidence standardisée sur l'âge, ASR, de 6,4/10⁶/an), stable sur les 3 dernières décennies et un sex-ratio de 1,1 (Lacour et al. 2010). La majorité (80%) des leucémies pédiatriques sont des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL).

Taux d'incidence selon la classe d'âge en France en 2018 - Leucémies aiguës myéloïdes

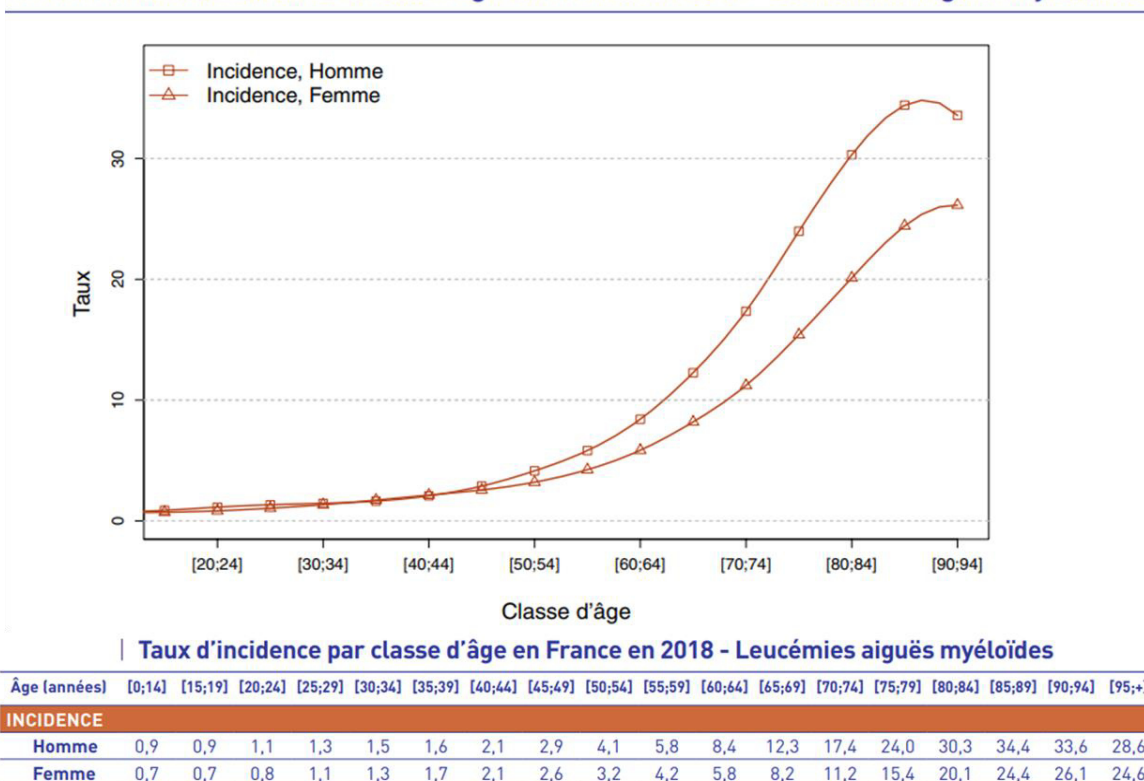


Figure 2. Taux d'incidence des LAM selon l'âge, adaptée de (Le Guyader-Peyrou et al. 2019).

Chez l'enfant comme chez l'adulte, il est difficile de dégager une cause unique au développement d'une LAM, mais certains facteurs de risque notables sont bien connus et favorisent le développement des LAM dites secondaires. Un traitement antérieur par radiothérapie et/ou chimiothérapie, notamment par agents alkylants ou inhibiteurs de topoisomérase II, entraîne un surrisque de développer une hémopathie maligne : on parle alors de LAM liée aux traitements (Belitsky et al. 2020). Une maladie médullaire chronique, telle qu'un syndrome myélodysplasique ou myéloprolifératif, peut également évoluer vers une LAM, le risque étant différent en fonction de la maladie, des anomalies génétiques sous-jacentes et du pourcentage de blastes (Tefferi and Vardiman 2009). De même, certaines mutations génétiques constitutionnelles (résumées dans le Tableau 3) prédisposent aux hémopathies malignes. Des mutations somatiques prédisposant aux hémopathies myéloïdes peuvent être acquises au cours de la vie sur une certaine proportion de cellules médullaires, phénomène dit d'hématopoïèse clonale de signification indéterminée (CHIP, clonal hematopoiesis of indeterminate significance) si la fréquence allélique (VAF, variant allele frequency) de cette mutation est supérieure ou égale à 2% (Steensma 2018), en l'absence de

cytopénies ou d'une hémopathie. Le risque de transformation est estimé entre 0,5 et 1% par an.

Anomalies chromosomiques	Trisomie 21 (syndrome de Down)
Syndromes d'instabilité chromosomique	Maladie de Fanconi Dyskératose congénitale Syndrome de Bloom
Syndromes d'anomalies de croissance et de survie cellulaire	Neurofibromatose de type 1 Syndromes de Noonan et Noonan-like Syndrome de Kostmann Syndrome de Schwachman-Diamond Syndrome de Bloom Anémie de Blackfan-Diamond Ataxie-télangiectasie Amégacaryocytose congénitale Syndrome de mutation constitutionnelle de <i>CBL</i> Syndrome de Li-Fraumeni Syndrome ataxie-pancytopénie (<i>SAMD9L</i>) et syndrome MIRAGE (<i>SAMD9</i>) Thrombopathie familiale avec prédisposition aux LAM (mutations constitutionnelles de <i>RUNX1</i>) Mutations constitutionnelles de <i>GATA2</i> Mutations constitutionnelles de <i>CEBPA</i> Mutations constitutionnelles de <i>ETV6</i> Mutations constitutionnelles de <i>DDX41</i> Mutations constitutionnelles de <i>ANKRD26</i>
Syndromes acquis	Hémoglobinurie paroxystique nocturne Amégacaryocytose acquise Aplasie médullaire acquise Monosomie 7 acquise

Tableau 3. Syndromes de prédisposition génétique aux hémopathies myéloïdes, d'après (West, Godley, and Churpek 2014).

Les facteurs de risque ci-dessus ne concernent qu'environ 10% des patients pédiatriques atteints de LAM, beaucoup moins chez l'adulte (Klco and Mullighan 2021). Pour les autres, le développement de la maladie est un processus multifactoriel, associant des facteurs de susceptibilité génétique et des facteurs environnementaux, dans un contexte d'échappement tumoral au système immunitaire. Les différents facteurs de faible risque relatif connus de ces LAM *de novo* sont présentés dans le Tableau 4.

Facteur		Données	Références
Liés à l'hôte	Susceptibilité génétique	Certains polymorphismes des gènes <i>ARIB5B</i> et <i>IKZF1</i> identifiés dans les LAL seraient associés à la LAM (<i>ARIB5B</i> à risque, <i>IKZF1</i> protecteur)	(Jérémie Rudant, Orsi, et al. 2015; J Rudant et al. 2013)
	Infections précoces	1 à 3 infections dans la première année de vie, OR = 0,4 [0,2 – 0,9] Contact régulier avec des animaux d'élevage, OR = 0,4 [0,2 – 1,0]	(Jérémie Rudant et al. 2010; Jérémie Rudant, Lightfoot, et al. 2015)
	Allaitement maternel	Si durée d'au moins 6 mois : OR = 0.8 [0.7-0.9] pour toute leucémie, idem pour les LAL mais pas d'impact détecté pour les LAM (manque de puissance ?)	(Amitay and Keinan-Boker 2015)
	Surpoids/Obésité	OR = 1,2 [1.1 – 1.4]	(Finn et al. 2015)
Liés à la gestation	Fertilité parentale	Absence d'impact : de l'infertilité, du recours à la procréation médicalement assistée ou à l'IVG, de la contraception durant grossesse, de la mortinatalité, de la supplémentation en folates Antécédents de fausse-couche spontanée : OR = 1,8 [1,1 – 2,8]	(Ajrouche et al. 2014)
	Vitamines et acide folique	Pas d'impact des vitamines prénatales Acide folique pendant la grossesse : OR = 0,5 [0,3 – 0,9]	(Metayer et al. 2014)
	Naissance par césarienne	Aucun impact, quelle qu'en soit l'indication	(Marcotte et al. 2016)
	Consommation d'alcool pendant la grossesse	Maternelle : OR = 1,6 [1,2 – 2,2] pour consommation maximale de 2 verres/semaine, OR = 2,4 [1,6 – 3,5] pour consommation supérieure à 2 verres/semaine, plutôt pour le vin Paternelle : pas d'impact	(Karalexi et al. 2017)
Environnementaux	Tabac	Aucun impact du tabagisme maternel, excepté dans la population hispanique : OR = 2,1 [1,2 – 3,6] Impact négatif du tabagisme paternel pendant : la période prénatale (OR = 1,2 [1,1 – 1,4]), la grossesse (OR = 1,2 [1,1 – 1,5]), et après la naissance (OR = 1,3 [1,1 – 1,5])	(Metayer et al. 2016)
		Aucun impact du tabagisme maternel Impact négatif du tabagisme paternel avant la conception (OR = 1,5 [1,0 – 2,3]) et durant la grossesse (OR = 1,7 [1,1 – 2,5]), surtout si consommation supérieure à 15 cigarettes/j (respectivement OR = 1,9 [1,1 – 3,2] et OR = 2,0 [1,2 – 3,4])	(Orsi et al. 2015)
		Au-delà d'un paquet par jour chez des fumeurs non sevrés OR = 1,4 [1,2 – 1,6], et sevrés OR = 1,25 [1,15 – 1,4]	(Fircanis et al. 2014)

	Consommation de thé ou café	Pas d'impact de la consommation paternelle ou maternelle durant la grossesse	(Orsi et al. 2015)
	Pesticides	Exposition domestique dans les 3 mois précédant la conception (OR = 1,5 [1,0 – 2,2]) et durant la grossesse (OR = 1,6 [1,2 – 2,0]) ; pas d'impact après la naissance	(Bailey et al. 2015)
		Exposition professionnelle maternelle en période prénatale : OR = 1,9 [1,2 – 3,2] ; pas d'impact de l'exposition professionnelle paternelle	(Bailey, Fritschi, Infante-Rivard, et al. 2014)
	Benzène	Exposition professionnelle élevée : OR = 5,6 [1,6 – 19.7]	(Linnet et al. 2019)
	Peintures domestiques	Pas d'impact de l'exposition paternelle ou maternelle durant la grossesse	(Bailey, Fritschi, Metayer, et al. 2014)
	Trafic routier	Trafic routier intense à moins de 150m de la résidence : OR = 1,2 [1,0 – 1,4] Concentration en benzène supérieure à 1.3 µg/m ³ : OR = 1,6 [1,0 – 2,4]	(Houot et al. 2015)
	Stations-services et garages automobiles	Pour toute leucémie pédiatrique, impact négatif de : la proximité d'une station-service (OR = 1,9 [1,2 – 3,0]) et de la proximité de station-service+garage automobile : OR = 1,6 [1,2 – 2,2], surtout si exposition intra-utérine (OR = 6,1 [1,9 -20])	(Brosselin et al. 2009)
	Radiations ionisantes	Irradiation diagnostique de la moelle osseuse hématopoïétique par tomодensitométrie : ERR = 0,04 [0,005 – 0,12], p=0,01 pour toute leucémie (n=74) mais ERR = 0,02 [-0,04 – 0,16], p=0,26 pour LAM (n=18) ; effet significatif à partir de 50 mGy de dose cumulée	(Pearce et al. 2012)
		Aucun impact de la radioactivité naturelle au radon ou aux rayonnements gamma	(Demoury et al. 2017)
		Centrales nucléaires : OR = 1,9 [1,0 – 3,3] si située à moins de 5 km pour tout âge, mais pas de corrélation avec le niveau de radioactivité mesurée dans l'air	(Claire Sermage-Faure et al. 2012)
	Ondes électromagnétiques	Lignes à hautes tensions : OR = 1,7 [0,9 – 3,6] si résidence à moins de 50 m d'une ligne aérienne à très haute tension (225 à 400 kV), surtout chez les 0-4 ans (OR = 2,6 [1,0 – 6,9])	(C. Sermage-Faure et al. 2013)

Tableau 4. Résumé des connaissances actuelles sur les potentiels facteurs de risque des LAM (OR ou RR avec IC95). EER (excès de risque relatif), IC95 (intervalle de confiance à 95%), LAL (leucémie aiguë lymphoblastique), LAM (leucémie aiguë myéloïde), OR (odds-ratio), RR (risque relatif).

1.2. Prise en charge diagnostique.

Les LAM peuvent se révéler cliniquement de diverses manières. Le plus fréquemment, elles sont suspectées devant l'association d'un syndrome d'insuffisance médullaire (anémie, thrombopénie et leucopénie) et d'un syndrome tumoral (hépatomégalie, splénomégalie, adénopathies). Certaines localisations tumorales sont assez typiques des LAM, notamment l'hypertrophie gingivale et les atteintes tissulaires (appelées chloromes), de localisation le plus souvent neuro-méningée, osseuse et cutanée (que l'on dénomme alors leucémides). Parfois, ces leucémies se révèlent d'emblée par leurs complications métaboliques : hémorragie profonde avec ou sans coagulopathie, syndrome de lyse tumorale ou leucostase. Devant de telles anomalies cliniques et/ou biologiques, la réalisation en urgence d'un hémogramme s'impose et oriente fortement le diagnostic : mise en évidence de cytopénies, éventuellement signes de dysmyélopoïèse ou blastose circulante. Une blastose sanguine circulante peut être présente mais ne reflète pas le degré d'envahissement médullaire.

Les dernières recommandations internationales de prise en charge diagnostique des LAM pédiatriques datent de 2012 (Creutzig et al. 2012) mais des recommandations plus récentes ont été émises pour les patients adultes par l'European LeukemiaNet (ELN) (H. Döhner et al. 2017) et devrait bientôt être actualisées au vu des progrès récents (Estey 2020). Une mise à jour pédiatrique sera prochainement disponible.

Une fois le diagnostic de LAM suspecté, la réalisation rapide d'une analyse de la moelle osseuse, recueillie lors d'un myélogramme, est indispensable en vue de la réalisation d'examens : cytologiques, cytochimiques, immunophénotypiques (appartenance de lignée, recherche d'un immunophénotype aberrant associé à la leucémie ou LAIP, leukemia-aberrant immunophenotype), cytogénétiques (caryotype métaphasique, fluorescence in situ par hybridation (FISH) interphasique) et moléculaires (recherche de transcrits de fusion, de mutations, de surexpressions géniques...). Par ailleurs, il est utile de prélever un excédent de sang médullaire en vue d'analyses ancillaires, à des fins de recherche comme de diagnostic. En cas d'aspiration pauvre ou de suspicion de syndrome myélodysplasique, la réalisation d'une biopsie ostéo-médullaire est recommandée. En cas de contre-indication à la réalisation immédiate d'un myélogramme, ces analyses peuvent être réalisées via un prélèvement sanguin veineux (la rentabilité étant d'autant meilleure que la blastose circulante est

importante). Les cellules, ADN et ARN extraits de ces prélèvements doivent être si possible conservés, avec accord du patient, au sein de bio-banques centralisées afin de faciliter la recherche sur ces maladies rares.

Le bilan d'extension de la maladie est essentiellement clinique : examens neurologique et dermatologique complets, état des lieux des atteintes tumorales et recherche de complications hémorragiques ou métaboliques (syndrome de lyse tumorale, coagulopathie, leucostase). Contrairement aux patients adultes, la recherche d'une atteinte neuro-méningée par analyse du liquide cérébro-spinal est systématique chez l'enfant et est réalisée le plus tôt possible. Elle peut cependant être décalée de quelques jours en cas de contre-indication à la ponction lombaire, notamment en raison de troubles de l'hémostase ou d'une hyperleucocytose majeure. Elle doit néanmoins être effectuée dans la première semaine de traitement, excepté pour les leucémies aiguës promyélocyaires. En cas d'atteinte neurologique clinique, une imagerie cérébrale, préférablement par résonance magnétique, est indispensable pour distinguer des manifestations hémorragiques de localisations tumorales.

Il conviendra bien entendu de réaliser également tous les autres examens nécessaires au bilan pré-thérapeutique du patient : évaluation des fonctions hépatique et rénale, échocardiographie, électrocardiogramme, groupages sanguins érythrocytaires, sérologies pré-transfusionnelles et typage HLA en vue d'une éventuelle transplantation de cellules souches hématopoïétiques (TCSH) allogénique.

1.3. Caractéristiques biologiques.

1.3.1. Caractéristiques cytogénétiques.

Les premières anomalies moléculaires mises en évidence dans les LAM l'ont été par analyse du caryotype leucémique, et plus récemment par FISH. Elles regroupent des translocations, parfois à l'origine de transcrits de fusion oncogènes, et des gains ou pertes de portion de chromosome ou de chromosomes entiers. Les principales anomalies connues sont rapportées dans le Tableau 5 avec leurs implications pronostiques.

La répartition de ces anomalies cytogénétiques varie très nettement selon l'âge (Bullinger and Konstanze 2017). La fréquence des leucémies aiguës promyélocytaires est sensiblement identique quel que soit l'âge, hormis chez les nourrissons et les adultes de plus de 60 ans où elles sont plus rares. Des anomalies cytogénétiques sont plus fréquemment identifiées chez l'enfant que chez l'adulte (environ 75% contre 55%). Les remaniements de type CBF (core-binding factor, c'est-à-dire avec t(8;21) et inv(16) ou t(16;16)) sont plus fréquents chez l'enfant (20-22% contre 13% chez l'adulte), tout comme les remaniements de *KMT2A*. Les partenaires des fusions impliquant *KMT2A*, multiples, varient également quelque peu en fonction de l'âge (J Rudant et al. 2013).

Une étude allemande récente (Creutzig et al. 2016) a compilé les données cytogénétiques de 5564 patients, adultes (n=4372) et pédiatriques (n=1192), traités pour une LAM entre 1998 et 2012. Les auteurs ont mis en évidence des différences importantes de répartition des principales anomalies moléculaires entre les nourrissons (< 2 ans), les enfants (2 - 12 ans), les adolescents - jeunes adultes (12 - 40 ans), et les adultes (> 40 ans). Ces données sont résumées dans la Figure 3.

t(15;17)(q22;q21); <i>PML-RARA</i> et autres transcrits impliquant <i>RARA</i> - t(11;17)(q23;q12); <i>ZBTB16-RARA</i> - t(11;17)(q13;q12); <i>NUMA1-RARA</i> - t(5;17)(q35;q12); <i>NPM1-RARA</i> - transcrit <i>STAT5B-RARA</i> (cryptique)	- Définit l'entité de leucémie aiguë promyélocytaire - Programme transcriptionnel spécifique dépendant de <i>RARA</i> - Actuellement de bon pronostic pour les transcrits <i>PML-RARA</i> avec une thérapie ciblée différenciante (acide all-trans rétinoïque, ATRA, et trioxyde d'arsenic, ATO)
t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	- LAM de type CBF (core-binding factor) - Associé à un bon pronostic excepté en présence de mutations de <i>KIT</i> (25%)
inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>	- LAM de type CBF (core-binding factor) - Associé à un bon pronostic
Réarrangements impliquant <i>KMT2A</i> : - t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>KMT2A-MLLT3</i> - t(6;11)(q27;q23.3); <i>KMT2A-MLLT4</i> - t(11;19)(q23.3;p13.3); <i>KMT2A-MLLT1</i> - t(11;19)(q23.3;p13.1); <i>KMT2A-ELL</i> - t(10;11)(p12;q23.3); <i>KMT2A-MLLT10</i>	- Associés à un mauvais pronostic (pronostic intermédiaire pour la t(9;11); <i>KMT2A-MLLT3</i>) - Dérégulation de <i>MECOM</i> - Souvent retrouvés dans les LAM secondaires aux traitements
t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>	- Associé à un mauvais pronostic
inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>	- Associé à -7 ou caryotype complexe, mauvais pronostic
t(9;22)(q34;q11); <i>BCR-ABL1</i>	- De mauvais pronostic mais nettement amélioré avec un traitement par inhibiteur de tyrosine kinase ciblant ABL
t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>	- Spécifique aux LAM à différenciation mégacaryoblastique
Caryotype complexe, -5/5q-, -7/7q-, -17/17p-, -12/12p-	- Souvent associé à des mutations de <i>TP53</i>, de mauvais pronostic
Anomalies rares :	
- t(1;3)(p36.32;q21); <i>PRDM16-RPN1</i>	Age médian 65 ans, association avec 5q- (25%) et -7/7q- (12%), mauvais pronostic
- t(2;3)(p21;q26.2); <i>THADA-MECOM</i>	Age médian 43 ans, association avec -7 (50%), mauvais pronostic
- t(3;5)(q25.1;q35.1); <i>NPM1-MLF1</i>	Age médian 45 ans, association avec +8 (30%), mauvais pronostic
- t(3;21)(q26.2;q22); <i>RUNX1-MECOM</i>	Age médian 53 ans, association avec -7 (40%), mauvais pronostic
- t(8;16)(p11.2;p13.3); <i>KAT6A-CREBBP</i>	Age médian 50 ans, érythrophagocytose, association avec caryotype complexe, mauvais pronostic
- t(10;11)(p12.3;q14.2); <i>PICALM-MLLT10</i>	Age médian 45 ans, association avec caryotypes complexes (25%), mauvais pronostic
- inv(16)(p13.3q24.3); <i>CBFA2T3-GLIS2</i>	Enfants jeunes (< 3 ans), rare (2-2.5%), mauvais pronostic (J. L. Smith et al. 2020)
- t(10;17)(p15;q21); <i>ZMYND11-MBDT1</i>	Rare, associé à un phénomène de « cannibalisme des blastes » (Plesa and Sujobert 2019)
- réarrangements de <i>ETV6</i> (12p13)	Age variable, multiples partenaires (MN1, PDGFRA...), association avec caryotypes complexes, mauvais pronostic
- réarrangements de <i>NUP98</i> (11p15.5)	Rare, patients jeunes ou LAM secondaires, multiples partenaires (NSD1, TOP1, KDM5A, HOXA9...), mauvais pronostic (Struski et al. 2017)

Tableau 5. Principales anomalies cytogénétiques identifiées dans les LAM, adapté de (Bullinger and Konstanze 2017).

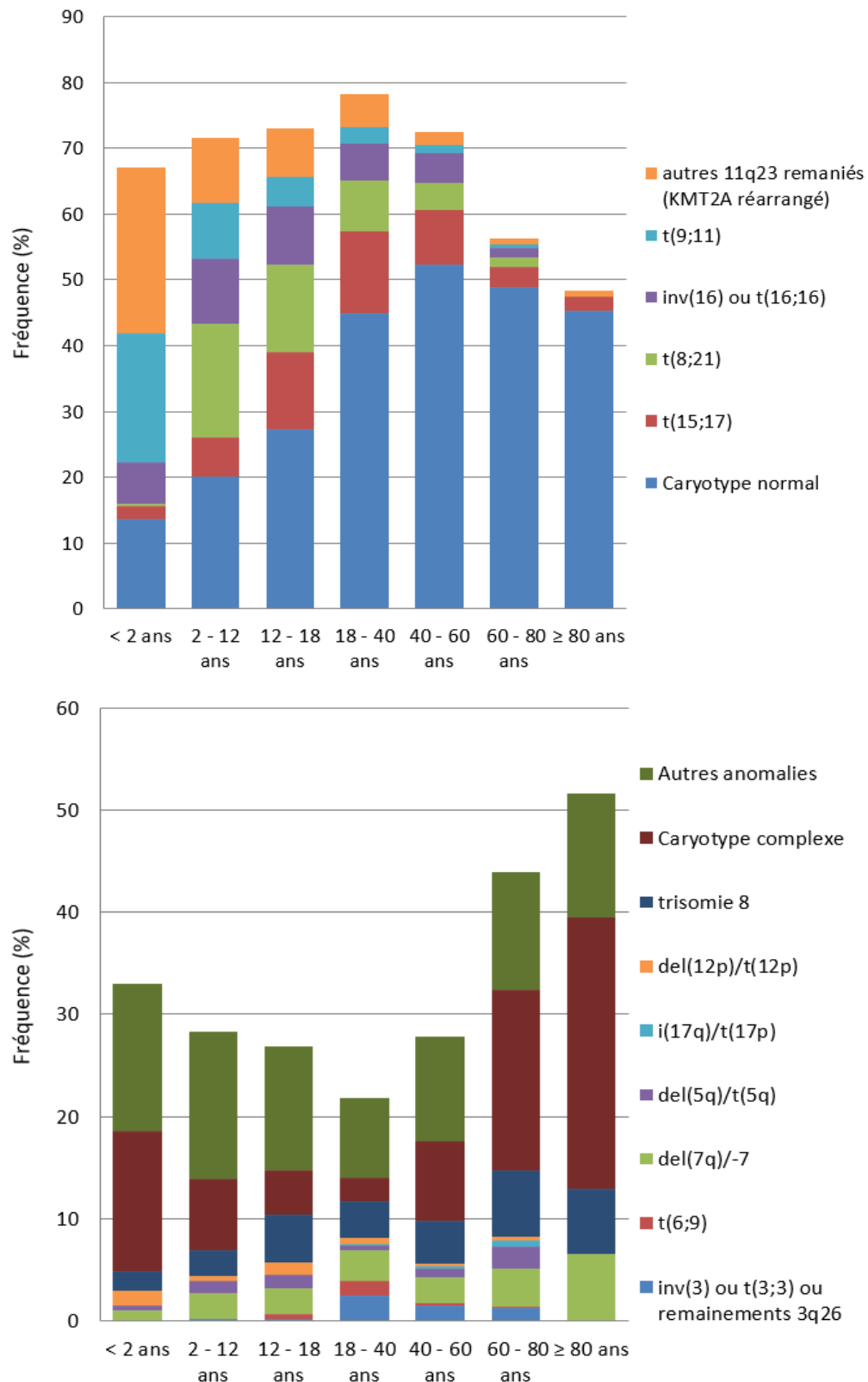


Figure 3. Evolution de la proportion des principales anomalies cytogénétiques dans les LAM en fonction de l'âge, adapté de (Creutzig et al. 2016). LAM (leucémie aiguë myéloïde).

1.3.2. Caractéristiques génomiques.

Le génome des LAM est le plus souvent stable, avec peu de variation de nombre de copies, excepté dans les formes à caryotype complexe (The Cancer Genome Atlas Research Network 2013) ou les formes secondaires.

Sur le plan mutationnel, les LAM de novo restent des néoplasies avec un nombre restreint de mutations conductrices (Figure 4A) et une faible charge mutationnelle (Martincorena and Campbell 2015), excepté dans le sous-groupe de patients présentant des altérations de *TP53* (Rücker et al. 2012). De nombreuses mutations récurrentes ont été identifiées dans les LAM et leurs implications pronostiques sont de mieux en mieux décryptées. Les principales mutations récurrentes des LAM sont rapportées en Annexe 1.

Les techniques de séquençage à haut débit ont identifié une architecture génomique complexe (The Cancer Genome Atlas Research Network 2013). Certaines mutations sont initiatrices de leucémogénèse (*NPM1*, *CEPBA*, et *RUNX1*) et sont mutuellement exclusives des transcrits de fusion. Des mutations affectant une même famille de gènes (cohésines, épissage, méthylation de l'ADN...) sont également mutuellement exclusives. La fréquence des mutations dans les LAM de l'adulte varie également en fonction de l'âge (Figure 4B), avec les mutations récurrentes de la CHIP (*DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*...) plus fréquentes chez les patients âgés (Bullinger and Konstanze 2017). La co-occurrence de transcrits de fusion et de mutations ponctuelles chez l'adulte est rapportée en Figure 4C sur 200 échantillons de LAM (The Cancer Genome Atlas Research Network 2013).

Enfin, la LAM est un cancer d'architecture souvent polyclonale, avec plusieurs sous-clones issus du clone dominant portant l'anomalie leucémogène initiale (Bullinger and Konstanze 2017). Chez l'adulte, des mutations de facteurs régulateurs épigénétiques (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*...) sont souvent de nature pré-leucémique, et favorisent l'émergence d'autres événements inducteurs de leucémie (Eriksson and Lennartsson 2015) avec par la suite une évolution possiblement clonale.

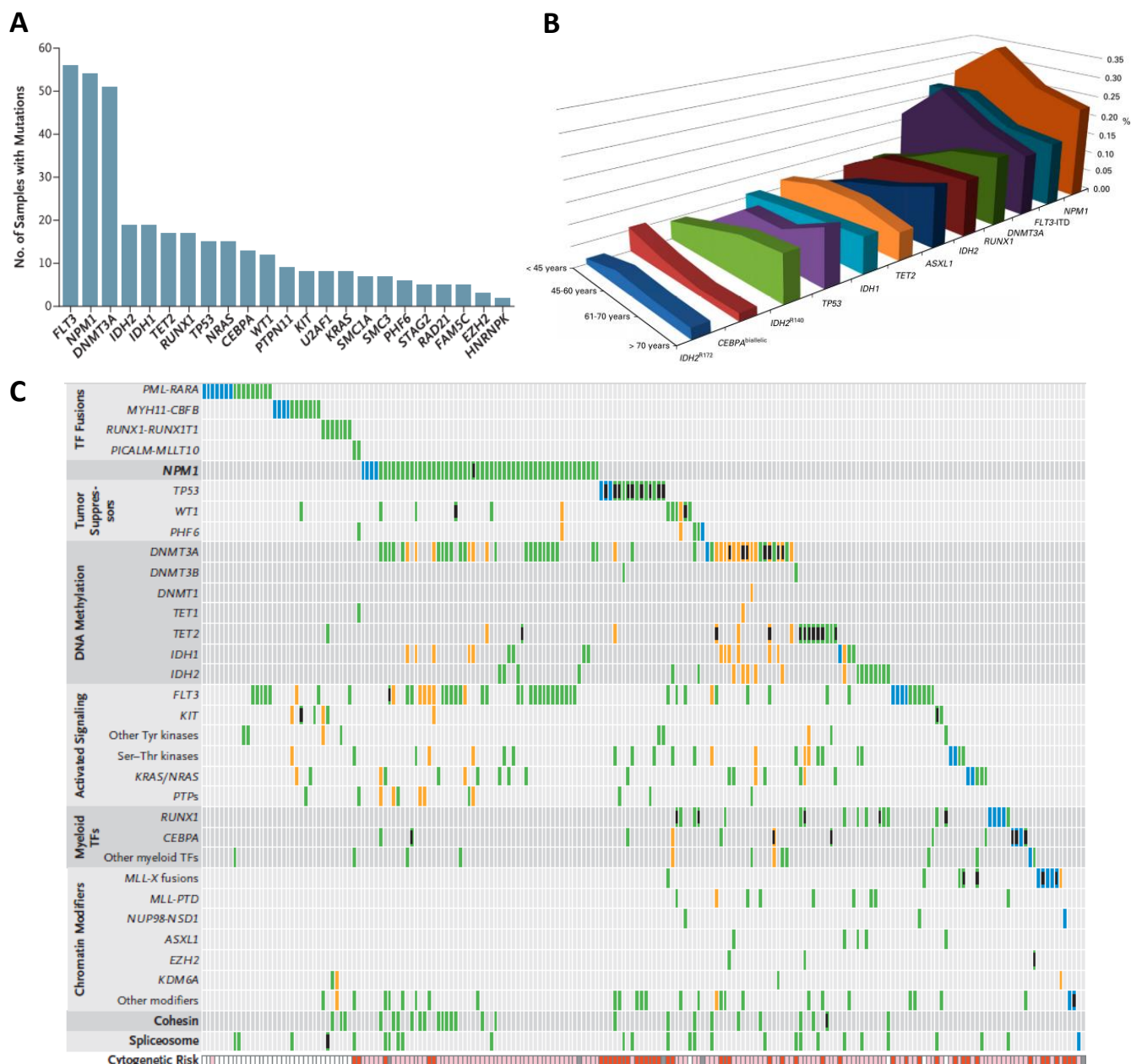


Figure 4. Mutations récurrentes et architecture génomique des LAM adultes. (A) Proportion de mutation identifiées dans les LAM de l'adulte, extraite de (The Cancer Genome Atlas Research Network 2013). (B) Variation de la proportion des principales mutations récurrentes en fonction de l'âge, extraite de (Bullinger and Konstanze 2017). (C) Co-occurrence des transcrits de fusion et des mutations récurrentes dans 200 échantillons de LAM, extraite de (The Cancer Genome Atlas Research Network 2013).

La plupart des mutations identifiées chez l'adulte ont été retrouvées chez l'enfant mais en des proportions différentes (Figure 5A) avec par exemple de rares mutations de *TET2*, *DNMT3A* et *TP53* et de plus fréquentes mutations sur *WT1*, *NRAS* et *KRAS* ainsi que des événements spécifiques sur *FLT3* (Bolouri et al. 2018; Marceau-Renaut et al. 2018; C. Michel Zwaan et al. 2015). Certaines altérations présentent une variation linéaire en fonction de l'âge du patient (Figure 5B). A l'échelle populationnelle, on retrouve une leucémogénèse plus souvent induite par des transcrits de fusion chez l'enfant tandis que les LAM de l'adulte résultent plus souvent d'une accumulation de mutations conductrices. Les co-occurrences d'événements génomiques sont similaires à ce qui est observé chez l'adulte (Figures 5C et D) mais certains événements sont spécifiques de la pédiatrie, comme les délétions de *ZEB2* et *MBNL1* (Bolouri et al. 2018).

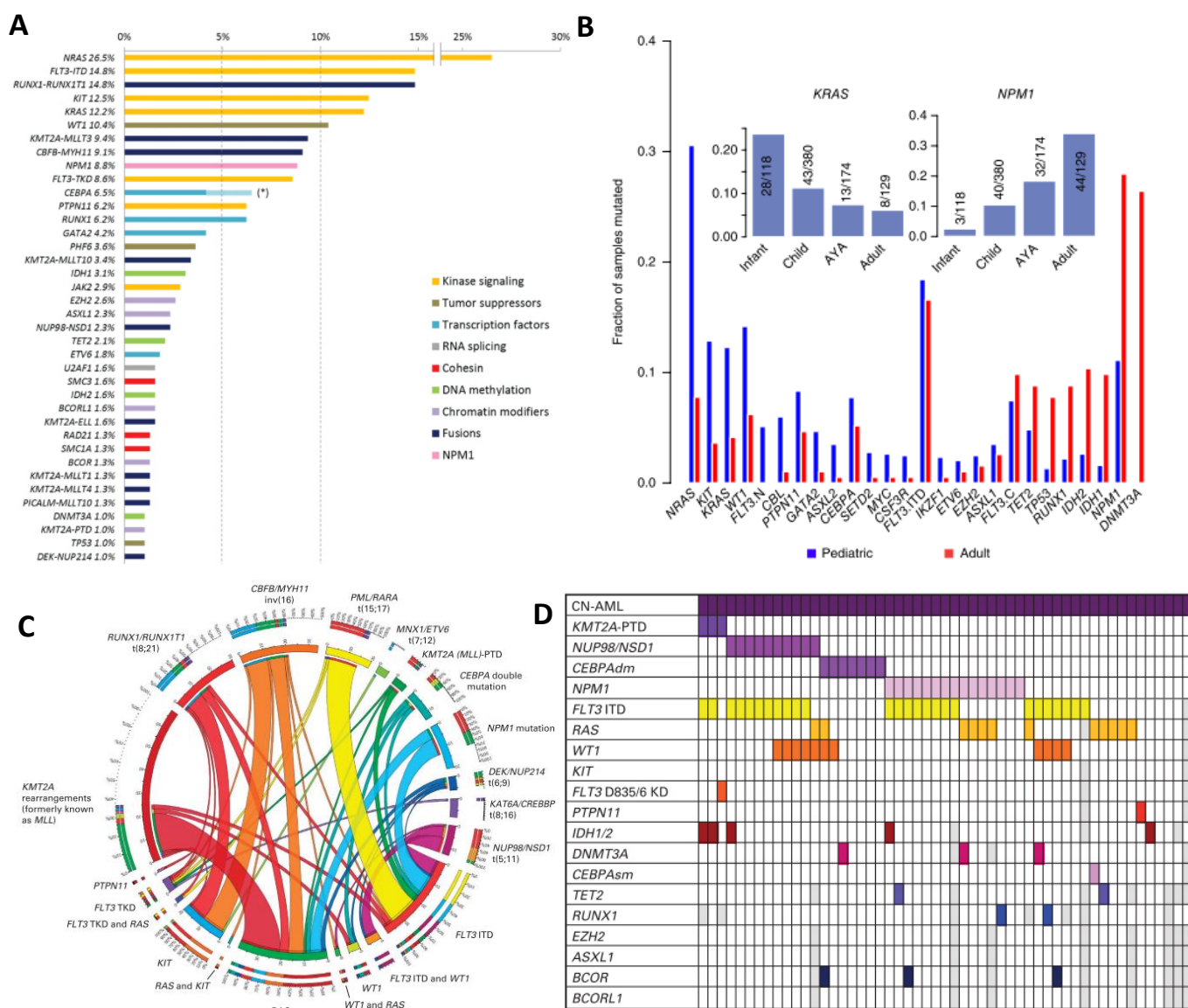


Figure 5. Architecture génomique des LAM pédiatriques. (A) Proportion d'événements génomiques identifiés dans les LAM pédiatriques. (B) Evolution des fréquences de mutations entre LAM pédiatriques (bleu) et adultes (rouge), avec variation des fréquences de mutations de *KRAS* et *NPM1* en fonction de l'âge. (C) Cercle-parcelles des anomalies génomiques et cytogénétiques dans les LAM pédiatriques : l'angle du cercle représente la fréquence de l'anomalie génétique et les rubans symbolisent la co-occurrence de 2 événements génétiques, avec une largeur proportionnelle à la fréquence de cette co-occurrence. (D) Table de co-occurrence de mutations au sein de 53 LAM pédiatriques à caryotype normal (CN-AML). A extraite de (Marceau-Renaut et al. 2018) ; B extraite de (Bolouri et al. 2018) ; C et D extraites de (C. Michel Zwaan et al. 2015).

1.3.3. Caractéristiques épigénétiques.

De nombreux facteurs de régulation épigénétique sont altérés dans les LAM. Les études à haut débit ont essentiellement porté sur le méthylome, qui est nettement altéré par rapport aux cellules hématopoïétiques normales (The Cancer Genome Atlas Research Network 2013). Aux extrêmes du spectre, on retrouve des profils très hyperméthylés associés aux mutations d'*IDH1/2* et des profils très hypométhylés associés aux mutations de *DNMT3A* et aux réarrangements impliquant *KMT2A*. Des analyses de hiérarchisation permettent de séparer des signatures de méthylation propres à certaines anomalies génomiques récurrentes.

Dans les LAM pédiatriques, un sous-groupe émerge, basé sur une hyperméthylation extensives de promoteurs de gènes, et fortement associé aux mutations de *WT1* (Bolouri et al. 2018). L'accessibilité à la chromatine a été étudié dans certains sous-types de LAM, et celle-ci est nettement modifiée par les altérations leucémogènes des modificateurs des histones, comme *KMT2A* (Milan et al. 2020), ou de l'architecture tridimensionnelle du génome, comme *STAG2* (J. S. Smith et al. 2020). L'impact thérapeutique de ces profils épigénétiques n'est pas encore bien défini.

1.3.4. Caractéristiques transcriptomiques.

Des analyses d'expression génique à haut débit sont également capable de hiérarchiser les LAM, et corréler avec certaines anomalies génomiques ou certains sous-groupes de la classification morphologie FAB (The Cancer Genome Atlas Research Network 2013). Des informations similaires sont obtenues par l'étude des microARNs (The Cancer Genome Atlas Research Network 2013; Bolouri et al. 2018) et certains pourraient servir de biomarqueurs thérapeutiques tels que let-7b, miR-10a et miR-330 (The Cancer Genome Atlas Research Network 2013; Bolouri et al. 2018). Certaines équipes ont proposé des signatures d'expression de gènes avec une implication thérapeutique, telle que la LSC17 (Ng et al. 2016) et le NEST (Liu Yang et al. 2021) pour les LAM adultes de caryotype normal.

A l'heure actuelle, peu d'équipe ont étudié l'épissage alternatif à haut débit dans les LAM (Rivera et al. 2021; Mohamed et al. 2015) mais ont mis en évidence des patrons d'épissage très altérés notamment dans les voies cellulaires impliquées dans la leucémogénèse.

1.3.5. LAM et microenvironnement.

L'étude des cellules souches hématopoïétiques a révélé que celles-ci, chez l'adulte, se localisent dans la moelle osseuse au sein de niches spécialisées. Une revue récente résume les connaissances actuelles dans ce domaine (Fröbel et al. 2021). Schématiquement, les CSH sont contenues dans 2 niches, la niche endostéale, où les cellules sont plutôt de nature quiescente, et la niche vasculaire, où les cellules sont plus actives et en division. Ces cellules interagissent avec les autres types cellulaires présents (cellules endothéliales, ostéoblastes, ostéoclastes, cellules souches mésenchymateuses (CSMs), adipocytes, chondrocytes, fibroblastes et myocytes) dans un dialogue complexe. Les cellules souches leucémiques (CSLs) sont capables de mettre à profit ce dialogue moléculaire à leur avantage, remodelant le microenvironnement en un compartiment qui leur est favorable et qui devient délétère à l'hématopoïèse normale. Une étude récente a mise en évidence les profondes modifications transcriptomiques et phénotypiques des CSMs de moelle leucémique, en comparaison avec des cellules de moelle saine (L. Zhang et al. 2021), notamment un effet d'augmentation de survie des blastes dépendant de la voie JAK-Stat. Elles peuvent également induire un microenvironnement qui favorise leur échappement immunitaire, qui a récemment été montrée comme prédictif de la survie des patients (Fu et al. 2021). Les voies de signalisation impliquées dans ce dialogue ont été initialement étudiées dans la LMC puis la LAM, les principales étant : Wnt/ β -caténine, Hedgehog, Notch, JAK/Stat et BMP. Toutes les interactions ne sont pas encore décryptées mais des molécules ciblant ce micro-environnement amorcent leur phase de développement clinique, comme les inhibiteurs de Notch1.

Par ailleurs, il a été suggéré qu'un microenvironnement médullaire pathologique pourrait également favoriser un processus de leucémogénèse, sans nécessité d'événement génomique initiateur (Kode et al. 2014).

1.4. Traitement actuel des LAM.

Avant 1970, le traitement des LAM reposait essentiellement sur des monothérapies, avec des taux de réponse modérés (20 à 30% pour la cytarabine, 40 à 50% pour la daunorubicine), ou des protocoles inspirés de ceux des leucémies aiguës lymphoblastiques, mais avec de faibles survies globales (<10%). A partir des années 1970, le traitement des LAM s'est progressivement intensifié, avec l'apparition de polychimiothérapies en cures séquentielles d'induction-consolidation, l'utilisation de la prophylaxie neuro-méningée et l'essor de la TCSH. Les survies des patients se sont dès lors considérablement améliorées et ce dans tous les pays investigateurs (Ceraulo 2018). Les principales évolutions dans le traitement des LAM de l'enfant ont suivi celles expérimentées chez l'adulte. A l'heure actuelle, le traitement des LAM non-promyélocyaires repose sur une à deux cures de chimiothérapie intensive, pour les patients capables de les supporter, couplant au minimum une anthracycline et de la cytarabine, afin d'obtenir une rémission complète. La consolidation de cette rémission complète est basée soit sur la chimiothérapie séquentielle, soit sur une TCSH. Le choix du régime de consolidation repose sur une stratification effectuée au diagnostic du risque de rechute basée sur des biomarqueurs (Tableau 6) et sur le suivi de la réponse au traitement. L'objectif de cette stratification est double : limiter la toxicité du traitement reçu (notamment éviter une TCSH) aux patients avec un pronostic « favorable », ou « standard », et intensifier le traitement de ceux possédant au moins un facteur de mauvais pronostic. Cette stratification varie en fonction des groupes investigateurs et est en perpétuel renouvellement. Pour les patients adultes ne pouvant supporter ce type de régime, car trop âgés ou avec trop de comorbidités, des traitements allégés permettent néanmoins une prolongation significative de la survie. Les agents hypométhylants (azacitidine, décitabine) sont centraux dans cette prise en charge, récemment rejoints par le vénétoclax (Estey 2020).

Les LAM promyélocyaires font l'objet de recommandations thérapeutiques à part depuis l'introduction d'agents différenciant (acide all-trans rétinoïque, ATRA, et trioxyde d'arsenic, ATO) qui ont révolutionné le pronostic de cette forme de LAM et sont désormais recommandés dès la première ligne thérapeutique (Sanz et al. 2019).

	LAM pédiatriques (Creutzig et al. 2012)	LAM de l'adulte (H. Döhner et al. 2017)
Risque standard	• t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> • inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> • t(1;11)(q21;q23); <i>KMT2A-MLLT11(AF1Q)</i> • caryotype normal et mutation de <i>NPM1</i> • caryotype normal et mutation bi-allélique de <i>CEBPA</i>	• t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> • inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> • mutation bi-allélique de <i>CEBPA</i> • mutation de <i>NPM1</i> sans FLT3-ITD ou avec FLT3-ITD^{low} (<0.5)
Risque intermédiaire	• caryotype normal isolé • toute autre anomalie caractérisée ni comme risque standard ou ni comme risque élevé • t(8;16)(p11;p13); <i>KAT6A-CREBBP</i>	• caryotype normal isolé • mutation de <i>NPM1</i> avec FLT3-ITD^{high} (≥0.5) • <i>NPM1</i> sauvage sans FLT3-ITD ou avec FLT3-ITD^{low} (<0.5) • t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>KMT2A-MLLT3</i> • toute autre anomalie caractérisée ni comme risque standard ou ni comme risque élevé
Risque élevé	• -7, -5, del(5q), del(12p) • inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2-MECOM</i> • inv(16)(p13.3q24.3); <i>CBFA2T3-GLIS2</i> • t(4;11)(q21;q23); <i>KMT2A-MLLT2(AF4)</i> • t(6;11)(q27;q23); <i>KMT2A-MLLT4(AF6)</i> • t(10;11)(p12;q23); <i>KMT2A-MLLT10(AF10)</i> • t(10;11)(p11.2;q23); <i>ABI1-KMT2A</i> • t(7;12)(q36;p13); <i>ETV6-HLXB9</i> • t(6;9)(p23;34); <i>DEK-NUP214</i> • t(5;11)(q35;p15.5); <i>NUP98-NSD1</i> • t(11;15)(p15;q35); <i>NUP98-JARID1A</i> • t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> • Caryotype complexe[†] • Présence d'une mutation <i>FLT3-ITD</i> (ratio muté/sauvage > 0.4)	• t(6;9)(p23;34); <i>DEK-NUP214</i> • t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> réarrangé • t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> • t(8;16)(p11;p13); <i>KAT6A-CREBBP</i> • inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2-MECOM</i> • -5 ou del(5q) • -7; -17/abn(17p) • caryotype complexe[†] • caryotype monosomal[‡] • <i>NPM1</i> sauvage avec FLT3-ITD^{high} (≥0.5) • Mutation de <i>RUNX1</i>* • Mutation de <i>ASXL1</i>* • Mutation de <i>TP53</i>

Tableau 6. Exemples de stratifications pronostiques validées dans les LAM pédiatriques en 2018 (Creutzig et al. 2012) **et dans les LAM de l'adulte en 2017** (H. Döhner et al. 2017). *Leucémie aiguë myéloïde (LAM), core-binding factor (CBF).*

[†] ≥3 anomalies en l'absence d'anomalie récurrente identifiées dans la classification OMS : t(8;21), inv(16) ou t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) ou t(3;3); t(9;21))

[‡] présence d'une seule monosomie (sauf perte de l'X ou de l'Y) associée à ≥ 1 monosomie ou anomalie de structure du chromosome (à l'exclusion des LAM CBF)

* en l'absence d'anomalie de risque standard

Bien que notée comme pronostique dans certaines études anciennes (Creutzig et al. 2004; Inaba et al. 2008), la leucocytose au diagnostic a un impact discuté en termes de survie et n'est plus implémentée dans les stratifications thérapeutiques actuelles. Certains protocoles récents ont cependant retrouvé un impact négatif de l'hyperleucocytose au diagnostic sur la survie globale (Marceau-Renaut et al. 2018). En cas de valeurs très élevées (> 100 G/L), la survie globale est impactée par les décès précoces induits par les complications de la leucostase. Cependant, ni la chimiothérapie à faible dose (cytarabine ou hydroxyurée) ni la leucaphérèse n'ont démontré de nette réduction de la mortalité précoce dans cette indication (Oberoi et al. 2014). La place de la dexaméthasone (Bertoli et al. 2018) et du cyclophosphamide à hautes doses (J. Zhao et al. 2021) restent à définir dans cette indication. Longtemps considéré comme un facteur de mauvais pronostic, l'envahissement neuro-méningé (statut CNS, central nervous system) n'a plus d'impact sur le pronostic en terme de survie globale ou sans rechute avec la chimiothérapie intrathécale triple (Creutzig et al. 2017; Felix et al. 2018). Dans les essais cliniques où ces patients ne bénéficiaient que d'une chimiothérapie intrathécale par cytarabine seule, l'envahissement neuro-méningé était associé à un taux de rechute et à une survie sans maladie moins élevés mais sans retentissement sur la survie globale (Johnston et al. 2017). La présence d'un envahissement neuro-méningé au diagnostic est significativement associée à un jeune âge, à une hyperleucocytose, à des morphotypes FAB M4-M5 et à l'inv(16) (Johnston et al. 2017; Creutzig et al. 2017; Felix et al. 2018). Les patients CNS+ au diagnostic gardent cependant une probabilité plus élevée de rechute neuro-méningée que les patients CNS- (Felix et al. 2018). La cytogénétique classique fournit encore de nouveaux facteurs pronostiques dans les LAM. Les réarrangements de *NUP98*, avec 31 partenaires décrits actuellement (*NSD1* étant le principal dans les LAM), représentent un sous-groupe d'hémopathie maligne récemment individualisé (Gough, Slape, and Aplan 2011). En pédiatrie, ces réarrangements sont de mauvais pronostic car associés à des taux élevés d'échec d'induction et de rechute (Struski et al. 2017). La translocation t(8;16)(p11;p13); *KAT6A-CREBBP* (Haferlach et al. 2009) a été suggérée comme étant de mauvais pronostic mais des cas de rémissions spontanées ont été rapportés chez des nourrissons (Coenen et al. 2013). Certaines anomalies ne sont identifiées que chez l'enfant et leur impact pronostique n'a été que récemment clarifié. Dans les LAM mégacaryoblastiques, la translocation t(11;15)(p15;q35); *NUP98-JARID1A* (De Rooij et al.

2013) et le réarrangement inv(16)(p13.3;q24.3); *CBFA2T3-GLIS2* (Masetti et al. 2013) ont ainsi été identifiés comme des facteurs de mauvais pronostic. Dans les LAM du nourrisson, la translocation t(7:12)(q36;p13); *MNX1-ETV6* a été également associée avec des rechutes plus fréquentes mais apparemment curables par allogreffe (von Bergh et al. 2006; Espersen et al. 2018). La rare délétion 12p est quant à elle associée à un mauvais pronostic dans les LAM pédiatriques (Von Neuhoff et al. 2010).

La cytométrie en flux multiparamétrique reste également utile à la stratification au diagnostic, avec l'identification de certains marqueurs associés à des pronostics défavorables : forte expression du CD56 (Raspadori et al. 2001), notamment en association avec une expression faible ou absente du CD45 et du CD38, absence d'expression d'HLA-DR (Brodersen et al. 2016), et proportion de cellules immatures CD34+/CD38- > 1% au diagnostic (Plesa et al. 2017).

Les progrès du séquençage à haut débit ont nettement amélioré la stratification pronostique, avec identification de nouvelles mutations pronostiques. Dans les LAM de type CBF, les mutations de l'exon 8 de *KIT* et la mutation D816V (exon 17) sont associées à un mauvais pronostic chez l'adulte (Boissel et al. 2006; Paschka et al. 2006; Cairoli et al. 2006). Les mutations de *PHF6*, *ASXL1*, *KMT2A-PTD* (Patel et al. 2012), *RUNX1* (Verena I. Gaidzik et al. 2011; Greif, Konstandin, et al. 2012; V. I. Gaidzik et al. 2016) et *IDH1/2* (Paschka et al. 2010; Marcucci et al. 2010) ont également été identifiées comme des facteurs pronostiques. Les proportions respectives de ces mutations sont très différentes chez l'enfant mais l'impact négatif de certaines est rapporté dans les LAM pédiatriques, par exemple : mutations de *RUNX1* et de *PHF6* (Marceau-Renaut et al. 2018), mutations de l'exon 17 mais pas de l'exon 8 de *KIT* (Tarlock et al. 2017).

La réponse au traitement initial reste sans doute le plus puissant des facteurs pronostiques. Sa mesure a évolué au fil des protocoles : initialement basée sur la réponse cytologique (de manière consensuelle < 5% de blastes identifiés sur un myélogramme réalisé en reconstitution hématologique), elle inclut désormais l'évolution de la décroissance du clone leucémique mesurée par cytométrie en flux ou par suivi moléculaire, ce que l'on appelle communément la maladie résiduelle minimale (MRD, minimal residual disease) (Estey 2020).

A l'heure actuelle, il est recommandé d'évaluer la réponse cytologique après 1 et 2 cures d'induction et de suivre la maladie résiduelle après obtention d'une rémission complète par

cytométrie en flux (suivi du phénotype aberrant associé à la leucémie, LAIP) (Lacombe et al. 2017) et si possible par biologie moléculaire (PCR quantitative si existence d'un marqueur fiable, comme *RUNX1-RUNX1T1*) (Willekens et al. 2016), *CBFB-MYH11*, *KMT2A-MLLT3*-, surexpression d'*EVI1*, mutations de *NPM1* (Ivey et al. 2016)). Divers essais cliniques ont montré l'impact pronostique négatif d'une MRD > 1% après la première cure et > 0.1% après la deuxième cure (Rubnitz et al. 2010; Hasle et al. 2012; Jourdan et al. 2013), seuils qui sont désormais adoptés pour classer un patient en risque de rechute élevé et donc intensifier son traitement.

Chez l'enfant, la cinétique moléculaire après l'induction est également pronostique dans les LAM avec t(8;21), le risque de rechute étant nettement réduit en cas de diminution d'une amplitude d'au moins 3 logs (Pigazzi et al. 2015). Récemment, une équipe a démontré chez des patients adultes l'intérêt de suivre également l'évolution de la population CD34+/CD38-, où se localisent les CSLs (Terwijn et al. 2014; Zeijlemaker et al. 2019). Avec ce suivi, les patients présentant une MRD négative sans persistance de CSL avaient une évolution nettement favorable comparée à ceux où les CSLs étaient encore détectables. Des résultats similaires ont été rapportés dans les LAM pédiatriques, mais sur des effectifs moindres (Plesa et al., 2018; Boyer et al. 2018).

1.5. Perspectives thérapeutiques.

A terme, la prédiction pronostique va devenir d'une telle complexité qu'elle requerra des algorithmes ou des scores de plus en plus lourds afin de prendre en compte tous les facteurs présents au diagnostic, qu'ils soient cliniques ou biologiques, et issus de la génomique, mais également bientôt de la transcriptomique, de l'épigénétique ou de la protéomique. De tels modèles prédictifs ont déjà été proposés.

Dans le domaine de la génomique, une vaste étude menée sur 1540 patients adultes (Papaemmanuil et al. 2016) a démontré une amélioration significative de la prédiction de la survie globale (concordance de 71% contre 64%) par rapport à la classification ELN 2010, avec un modèle prédictif incluant : 58 mutations ponctuelles, 8 gènes de fusion, 18 anomalies de nombre de copie génique, 18 anomalies de nombre de chromosomes, 11 variables cliniques, 2 paramètres démographiques et 3 paramètres liés au traitement. Un article récent de la

même équipe a démontré l'apport décisionnel d'un algorithme prédictif de décès d'un patient en fonction des caractéristiques clinico-biologiques de sa maladie et du traitement effectué (Gerstung et al. 2017), amorçant l'émergence d'une médecine réellement personnalisée en onco-hématologie. Des résultats similaires ont également été démontrés dans la leucémie promyélocytaire (Hecht et al. 2016).

En transcriptomique, les progrès sont aussi importants dans le domaine de la médecine prédictive. Le plus notable d'entre eux est l'identification par séquençage ARN de l'impact pronostique d'une signature transcriptomique de type « cellule souche » (Ng et al. 2016) qui rendrait compte de la présence importante de cellules initiatrices de leucémie, responsables des rechutes. Ce score, incluant l'expression de 17 gènes spécifiques (nommé LSC17), est un fort facteur pronostique indépendant de la survie globale en analyse multivariée dans les LAM de l'adulte. Des résultats préliminaires chez l'enfant semblent conforter l'impact pronostique d'une telle signature transcriptomique (J. L. Smith et al. 2017) bien qu'une formule simplifiée (LSC6) semble avoir des performances tout à fait comparable (Elsayed et al. 2020).

Outre la rationalisation de l'utilisation des thérapies classiques, des nouvelles thérapeutiques voient le jour dans le domaine des LAM, avec des promesses d'amélioration des taux de survie. Le Gemtuzumab-Ozogamicin (GO), un anticorps monoclonal couplé à un dérivé des anthracyclines (la calichéamycine), a démontré des résultats prometteurs dans les LAM réfractaires ou en rechute (Christian M Zwaan et al. 2003). Les effets indésirables du GO (myélosuppression et maladie veino-occlusive hépatique essentiellement) semblent par ailleurs moins fréquents chez l'enfant (Christian M. Zwaan et al. 2010). Chez l'adulte, son bénéfice est établi dès la première ligne de traitement (Castaigne et al. 2012). En première ligne chez l'enfant, son apport thérapeutique est encore à l'étude. Si les essais COG-AAML03P1 (Cooper et al. 2012) et AML-02 (Rubnitz et al. 2010) ont démontré la bonne tolérance du GO en induction (administré 1 fois à la dose de 3 mg/m²), l'essai NOPHO-AML-2004 (Hasle et al. 2012) n'a pas démontré d'intérêt à l'ajout de GO en consolidation (2 cures randomisées avec GO à 5 mg/m²) et l'essai AAML0531 (Gamis et al. 2014) n'a démontré qu'une amélioration de la survie sans événement (SSE) mais pas de la survie globale (SG) après randomisation de deux doses de GO (3 mg/m² en induction et consolidation). Chez les adultes, l'étude MRC-AML15 a démontré un bénéfice du GO chez les patients de pronostic favorable

(Burnett et al. 2011). L'essai MyeChild01 (NCT02724163) randomise actuellement le GO en induction, une dose ou deux à trois doses à 3 mg/m². D'autres molécules sont en cours de développement dans les LAM, certaines désormais avec des indications validées (midostaurine, vénétoclax...) et sont présentées dans l'Annexe 2.

A l'heure actuelle, peu de d'étude sur l'épissage alternatif dans les LAM ont été publiées. Pourtant, la LAM est un cancer dans lequel les altérations de la mécanique de l'épissage semblent importantes. En effet, près d'un tiers des gènes de LAM font l'objet d'un épissage alternatif (Adamia, Haibe-kains, and Pilarski 2014) alors que les mutations de facteur d'épissage ne concernent qu'environ 10% des patients. Le transcrit de fusion *RUNX1-RUNX1T1* est connu pour avoir un variant d'épissage (variant 9a, avec perte des domaines NHR 3 et 4) induisant un phénotype leucémique plus immature mais sans qu'un impact pronostic n'ait pu être authentifié (Agrawal et al. 2020). Cela étant, les conséquences transcriptomiques du transcrit de fusion *RUNX1-RUNX1T1* comprennent un large remaniement du transcriptome par épissage alternatif, soit car le transcrit augmente l'expression de gènes de facteur d'épissage, soit car le transcrit de fusion régule directement la sélection du site d'initiation de la transcription (Grinev et al. 2021). Cela suggère une forme de vulnérabilité de cette leucémie aux inhibiteurs du spliceosome. En dehors de ce contexte oncogénique spécifique, les LAM semblent vulnérables à l'inhibition de PRMT5, par effet indirect de répression du facteur d'épissage SRSF1 (Radziskeuskaya et al. 2019). Or, les inhibiteurs de PRMT5 sont en cours de développement clinique dans les hémopathies lymphoïdes (voir Introduction, partie 3). Le complexe KMT2A induit un programme génomique spécifique de par son activité trans-activatrice. Cette activité est en partie sous la dépendance de la Menin, dont l'activité peut être limitée par le facteur d'épissage SON (Kim et al. 2016). SON est lui-même soumis à un épissage alternatif dont l'isoforme raccourcie, surexprimée dans les LAM, perd sa capacité de liaison à la Menin, augmentant ainsi l'activité du complexe KMT2A. L'épissage alternatif semble être également une source prometteuse de biomarqueurs pronostics tels que TET2 (Mohamed et al. 2017) ou prédictifs de la réponse aux agents thérapeutiques, tels que le GO avec l'épissage de CD33 (Lamba et al. 2017). Une étude récente suggère même qu'il est possible d'affiner les stratifications actuelles en intégrant des signatures d'épissage alternatif (B. Zhang et al. 2021). Les auteurs de cette étude proposent une signature comprenant 10 événements d'épissage alternatif aux excellentes performances prédictives (AROC = 0.917).

2. Epissage des ARN pré-messagers.

2.1. Le spliceosome.

Dans les cellules eucaryotes, le complexe ARN polymérase II (RNAPII) catalyse la formation de l'ARN pré-messager (pré-ARNm) comprenant l'ensemble des exons et des introns du gène. Les introns sont ensuite retirés afin de ne conserver que tout ou partie des exons, reliés entre eux, pour constituer un ARN messager qui, exporté du noyau, peut être traduit dans le cytoplasme. Cette étape dite d'épissage de l'ARN est réalisée par le spliceosome, un large complexe ribonucléoprotéique composé de snRNPs (pour small nuclear ribonucleoproteins) comportant des snRNAs non-polyadénylés (Will and Lührmann 2011). Les snRNAs sont exportés du noyau pour subir des étapes de maturation et d'association protéique, impliquant notamment les protéines SMN (survival motor neuron) avant de rejoindre le noyau pour former le spliceosome. Les corps de Cajal joueraient un rôle central dans la maturation nucléaire des snRNPs (Matera and Wang 2014). Certains snRNPs matures sont chargés sur le domaine C-terminal de la RNAPII puis transférés séquentiellement sur un ARN pré-messager en cours d'élongation (Matera and Wang 2014).

Bien que de structure et de fonctionnement similaires, il existe des spécificités de spliceosome en fonction des espèces. Chez les Mammifères, 9 snRNPs et plus de 300 protéines sont connues à ce jour (Matera and Wang 2014). La majorité de l'épissage est effectuée par le spliceosome majeur, constitué des snRNPs U1-U2-U4-U5-U6, mais un spliceosome mineur a été récemment identifié, représentant moins de 1% de l'ensemble des complexes d'épissage, et constitué des snRNPs U5-U4atac-U6atac-U11-U12 (Younis et al. 2013).

La formation du spliceosome et son activité dépendent d'un ensemble de réactions biochimiques entraînées par des activités ARN-hélicases dépendantes de l'ATP et conduisant à l'excision d'un intron et la mise bout-à-bout de deux exons via deux réactions successives de transestérification (Figure 6A) (Matera and Wang 2014). Ces réactions sont catalysées par le complexe U2-U6 et se déroulent aux frontières exon-intron, reconnues comme les sites d'épissage 5' (en amont de l'intron) et 3' (en aval de l'intron).

Ces sites d'épissage sont des séquences conservées, incluant une paire GU à l'extrémité 5' de l'intron et une paire AG à l'extrémité 3', présentées en Figure 6B.

La première étape de l'assemblage est le recrutement de U1 sur le site d'épissage 5', stabilisé par des protéines SR (riches en Sérine et Arginine), puis la reconnaissance du site d'épissage 3' par U2, stabilisé par SF1 et les U2AFs (U2 associated factors). U2 interagit ensuite avec U1 en reconnaissant une séquence proche du site 3' portant un résidu adénosine, nommée adénosine du point de branchement, et induit un changement de conformation de la structure qui indique désormais la position de l'exon à conserver : c'est le complexe de définition de l'exon (Sterner, Carlo, and Berget 1996). Des remaniements ultérieurs de U1 et U2 conduisent à rapprocher les sites d'épissage et le site de branchement, formant le complexe de définition de l'intron (De Conti, Baralle, and Buratti 2013). Le trimère U4-U5-U6 est ensuite recruté sur le complexe de définition d'intron. Grâce à plusieurs hélicases, U1 et U4 sont retirés et U2 et U6 interagissent pour former le noyau catalytique du spliceosome (Sun and Manley 1995). La catalyse débute ensuite, avec clivage du site 5' et constitution du lasso intron(n)-exon(n+1), puis clivage du site 3' avec connexion exon(n)-exon(n+1) et enfin élimination des snRNPs et de l'intron excisé sous forme d'un lariat. L'adénosine de branchement est le substrat nucléophile des deux réactions de transestérifications et qui requièrent des ions Mg^{2+} .

Mécanisme clé dans la diversité d'expression du génome, l'épissage est finement régulé (K. Gao et al. 2008) et ce à différents niveaux de l'assemblage du spliceosome (Figure 6C). Ainsi des exons présentant des sites d'épissage de forte affinité pour U1 et U2, dits sites d'épissage forts, sont constitutivement reconnus par le spliceosome et inclus dans l'ARNm. Les exons comportant des sites de plus faible affinité pour ces snRNA sont retrouvés engagés dans des processus d'épissage alternatifs qui peuvent aboutir à l'exclusion de l'exon de l'ARNm. La nature du tissu, le type de cellule, le stade de développement et des facteurs environnementaux influencent la reconnaissance des sites d'épissage et, en conséquence, la diversité des ARNm exprimés.

2.2. Epissage alternatif.

L'épissage alternatif est un mécanisme co-transcriptionnel qui permet l'expression de différents ARNm à partir d'un même gène. A l'échelle de l'ARN, l'épissage alternatif est régulé par des séquences (splicing regulatory elements, SREs) portées sur les exons et les introns, recrutant des protéines aux fonctions soit d'activateurs, soit de répresseurs (respectivement, exonic splicing enhancers, ESE, ou silencers, ESS, et intronic splicing enhancers, ISE, ou silencers, ISS) (Matlin, Clark, and Smith 2005; Z. Wang and Burge 2008). L'épissage est également directement lié à la transcription puisque les deux réactions se déroulent en parallèle (A. Ameur et al. 2011).

Le phénomène d'épissage alternatif est physiologique, ubiquitaire, et joue un rôle capital dans : le développement embryonnaire et fœtal, la différenciation cellulaire, la transition épithélio-mésenchymateuse et dans certains organes adultes (cerveau, cœur, foie, rein, système immunitaire...). La présence ou l'absence de facteurs régulateurs de l'épissage selon le tissu, le type cellulaire ou l'environnement, définissent la diversité du transcriptome et le phénotype cellulaire (Ule and Blencowe 2019). Schématiquement, pour un même exon, 6 événements d'épissage sont théoriquement possibles (représentés en Figure 7). Tous n'aboutissent pas à la production de protéines fonctionnelles mais peuvent influencer le niveau de l'expression du gène notamment via la dégradation de certaines isoformes d'ARN messagers par le système nonsense-mediated decay (NMD) (Lloyd 2018). Les événements d'épissage avec conséquences protéiques sont de mieux en mieux décrits, et une partie a été recensée par Stamm et collègues (Stamm et al. 2005). Parfois, certains isoformes protéiques issus d'un même ARNm ont des effets opposés, par exemple BCL-X, une protéine anti-apoptotique sous sa forme longue (BCL-XL) native, mais pro-apoptotique dans sa forme courte (XS) (Bonnal, Vigevani, and Valcárcel 2012).

les interactions entre épigénétique et épissage est sont nombreuses (J. Zhang et al. 2020). Le modèle proposé est que, plus la RNAPII travaille lentement, plus le taux d'inclusion d'exon du gène transcrit est élevé. Les exons étant principalement situés en regard d'un nucléosome, toute modification post-traductionnelle des histones aura un impact sur la transcription du gène et donc sur son épissage : une acétylation de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9) favorisera par exemple l'inclusion d'exon tandis qu'une triméthylation en H3K36 entrainera son

exclusion (comme décrit dans l'exemple de FGFR2 (Luco et al. 2010) sous la dépendance du facteur d'épissage PTB). Ce sont de véritables signatures épigénétiques que l'on peut désormais relier à la régulation de l'épissage alternatif (Agirre et al. 2021).

La méthylation de l'ADN a également un impact sur l'épissage, un excès de méthylation pouvant limiter la reconnaissance par des facteurs d'épissage et induire l'exclusion d'exon ou des rétentions d'intron (Shukla et al. 2011). L'ensemble des connaissances des liens connus entre transcription et épissage ont été repris dans une revue récente (Giono and Kornblihtt 2020). Enfin, les longs ARN non-codants (lncRNA) sont également impliqués dans la régulation de l'épissage, soit en modulant directement le recrutement de facteur d'épissage, soit en altérant les signatures épigénétiques, soit en liant directement à l'ARN ou à l'ADN dans la boucle de réplication (Pisignano and Ladomery 2021).

La complexité de régulation co-transcriptionnelle de l'épissage alternatif fait qu'à l'heure actuelle il est encore difficile de prédire, à partir d'une séquence génique, quelles seront les isoformes d'ARN effectivement produites et dans quelles proportions. Plusieurs approches basées sur l'intelligence artificielle, rapportées dans (Wai, Douglas, and Baralle 2019), permettent de prédire les conséquences sur l'épissage de variants génomiques et plus récemment, des modèles émergent pour intégrer les signatures épigénétique dans la prédiction de variant d'épissage (D. Lee et al. 2020).

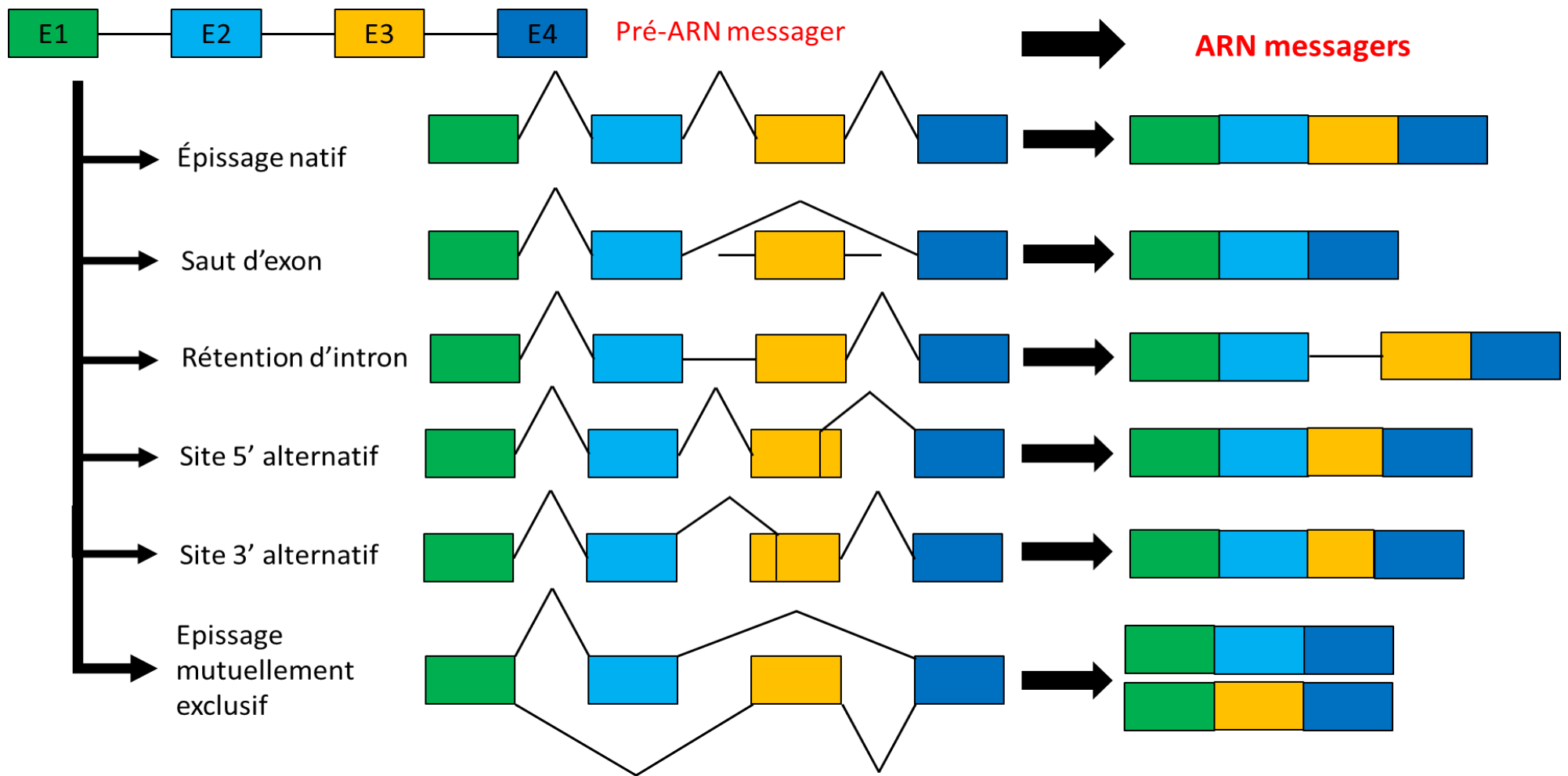


Figure 7. Représentation schématiquement des 6 possibles épissage concernant un exon en particulier, ici l'exon 3.

2.3. Epissage et maladies humaines.

L'implication d'anomalies du spliceosome est désormais bien documentée dans certaines pathologies humaines.

L'atrophie spinale musculaire est l'archétype de ces pathologies où, entre autres, des mutations conduisant à l'exclusion de l'exon 7 de *SMN2* sont vectrices de la maladie (Finkel et al. 2016). Des mutations d'autres protéines impliquées dans l'épissage ont été rapportées à des formes de rétinopathie pigmentaire (PRP3, PRP8, PRP31) ou de nanisme (U4atac) (Singh and Cooper 2012). Plus récemment, de nombreuses mutations considérées comme des variants de signification indéterminée, ont été reclassées comme pathogènes car modifiant le profil d'épissage du gène (Ganakammal and Alexov 2020) ce qui a été fait par exemple dans des maladies rétinienues héréditaires (Mauro-Herrera et al. 2021). Ce champ va très certainement s'élargir avec l'essor du séquençage du génome entier de patients, avec mise en évidence de potentielles mutations introniques perturbant l'épissage : par exemple, des mutations introniques en dehors d'un site canonique d'épissage de *TP53* pouvant conduire à son inactivation par épissage alternatif de son exon 4 (Chui et al. 2021).

La meilleure compréhension des mécanismes de l'épissage permet désormais d'envisager de l'utiliser comme cible thérapeutique. Un ciblage fin de séquence d'épissage est possible grâce à des oligonucléotides antisens (ASO), dont le reste de la séquence peut être écrit afin de diriger un événement d'épissage dans le sens désiré (Bennett 2019). L'exemple-type de succès d'une telle thérapie est le nusinersen (Finkel et al. 2016), un ASO redirigeant l'épissage vers une conservation de l'exon 7 de *SMN2*, excisé dans certaines formes d'amyotrophie spinale. Des ASO sont également approuvés dans le traitement de certaines formes de myopathie de Duchenne (Matsuo 2021). Dans le domaine de l'oncologie, des molécules inhibitrices du spliceosome sont à l'étude (Eymin 2020) et seront abordées par après. Enfin, la technologie CRISPR-Cas9 laisse entrevoir la possibilité d'édition *in vivo* de site d'épissage sur l'ADN, avec déjà des succès dans des modèles murins d'amaurose de Leber (Ruan et al. 2017).

3. Epissage alternatif et cancer.

3.1. L'épissage alternatif pathologique comme une nouvelle caractéristique des cellules cancéreuses.

Plus de 90% des gènes humains font l'objet d'un épissage alternatif (Q. Pan et al. 2008). Il est bien démontré aujourd'hui que les altérations de la régulation de l'épissage sont communes dans les cellules cancéreuses, et peuvent être impliquées dans chacune des caractéristiques du cancer (hallmarks of cancer (Urbanski, Leclair, and Anczuków 2018), Figure 8), soit en diminuant l'expression d'un gène, soit en modulant les ratios de variants d'épissage natifs, soit encore en créant de nouveaux variants pathogènes. Un épissage alternatif spécifique de la cellule cancéreuse peut affecter : l'angiogenèse (Vorlova et al. 2011), la prolifération cellulaire et la quiescence (Clemente-Periván et al. 2020), l'invasion (Yanagisawa et al. 2008), la dissémination métastatique (Lu et al. 2015), l'échappement à l'apoptose (Karni et al. 2007)... Ce processus est dynamique et des patrons d'épissage spécifiques ont pu être identifiés dans certaines tumeurs selon leur stade ou leur histologie, ces signatures étaient par exemple très différentes entre des cancers du sein positifs pour les récepteurs aux œstrogènes (ER+) par rapport à des cancers ER- de même stade (Trincado et al. 2016).

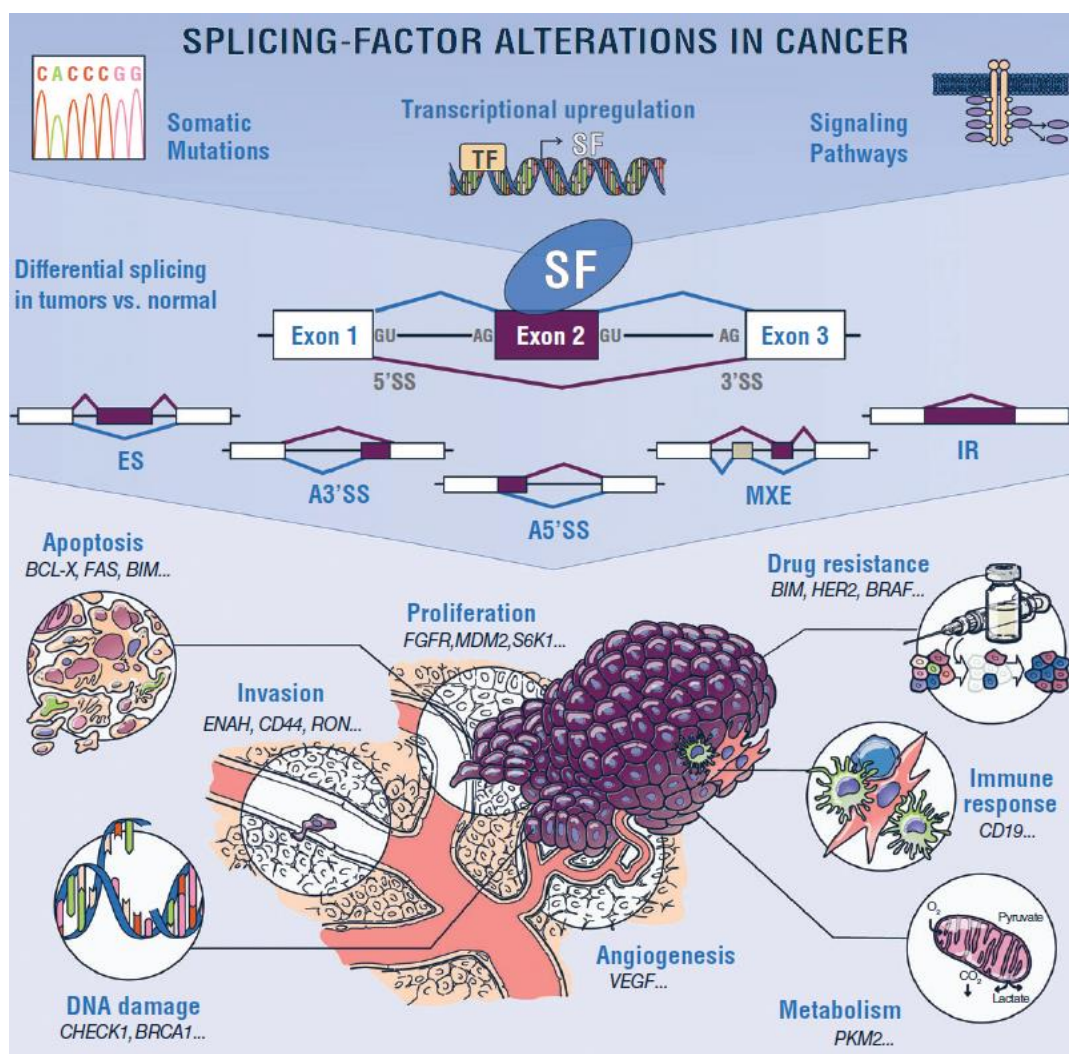


Figure 8. La modulation de l'épissage est utilisée dans les cellules cancéreuses, et documentée sur chacune des spécificités du cancer, extraite de (Urbanski, Leclair, and Anczuków 2018).

L'épissage dans les cellules tumorales peut être dérégulé de diverses manières.

Tout d'abord, il peut être altéré par des mutations génétiques. Par exemple, de nombreux variants somatiques de signification indéterminée des gènes *BRCA1/2* ont été associés à des altérations d'épissage conduisant à une perte de fonction de la protéine (Mucaki, Ainsworth, and Rogan 2011; Whiley et al. 2011). Le plus souvent, l'épissage est altéré sur le plan génomique par des mutations de facteurs régulateurs, tels que *SF3B1* et *U2AF1*, fréquemment mutés dans les hémopathies myéloïdes. Les cellules tumorales ainsi mutées ont des patrons d'épissage très spécifiques mais dont l'impact pronostique de la mutation peut varier selon le contexte cellulaire : les mutations de *SF3B1* dans la LLC sont de mauvais pronostic tandis qu'elles confèrent plutôt un bon pronostic dans les syndromes myélodysplasiques (Cazzola,

Rossi, and Malcovati 2013). On notera que ces mutations sont hétérozygotes et mutuellement exclusives, ce qui indique qu'une dérégulation trop importante du spliceosome n'est pas viable (Dvinge et al. 2016).

Le ratio d'expression d'isoformes protéiques peut également être modulé par épissage alternatif dans les cellules cancéreuses, certains isoformes ayant des fonctions opposées (Figure 9). Le gène *TP53* en est un bon exemple : 12 isoformes produits par épissage alternatif sont connus, avec des ratios pouvant avoir des conséquences différentes (Wei, Zaika, and Zaika 2012). P53 β par exemple est un fort inducteur de sénescence p53-médiée, sous le contrôle post-transcriptionnel de SRSF3, et dont les effets sont variables selon les types de cancer : stades peu avancés et bon pronostic dans les carcinomes à cellules rénales (H. Zhang et al. 2018) mais aucun impact pronostic dans les carcinomes ovariens (Bischof et al. 2019).

L'épissage est également connecté aux voies de signalisation cellulaire, souvent dérégulées dans les cellules cancéreuses. Le facteur SPF45 est par exemple phosphorylé par plusieurs MAP-Kinases (telles que ERK1/2s et JUNKs), ce qui entraîne une augmentation de l'expression de *ErbB2* et un épissage alternatif du gène de la fibronectine *FN1* (Al-Ayoubi et al. 2012). Un travail au laboratoire a récemment démontré que l'activation de la voie NF- κ B, fréquemment retrouvée dans les cancers, confère une spécificité de cible d'épissage d'exons par le recrutement à leur proximité du facteur d'épissage DDX17 via le facteur de transcription NF- κ B RELA (L. Ben Ameur et al. 2020).

Certains facteurs d'épissage ont également des propriétés oncogène ou suppresseur de tumeur qui leur sont propres (Biamonti et al. 2014). SRSF1 est par exemple hyperexprimé ou amplifié dans de nombreux cancers et cette anomalie suffit à elle-seule à initier un processus de tumorigenèse, en lien avec MYC (Figure 10). Une autre façon de moduler l'épissage passe par le microenvironnement tumoral. L'hypoxie notamment induit des programmes de transition épithélio-mésenchymateuse, sous la dépendance de régulateurs d'épissage tels que RBFOX2 (Al-Ayoubi et al. 2012). Enfin, le spliceosome étant en lien étroit avec la transcription, des modifications épigénétiques tumorales ont également un impact sur l'épissage. Le marqueur H3K36me3 est par exemple hautement enrichi en regard des exons conservés. Cette modification post-traductionnelle de H3 induit le recrutement du facteur d'épissage PTB, qui peut induire des sélections d'exons selon le type cellulaire, comme par exemple pour FGFR2 (Luco et al. 2010).

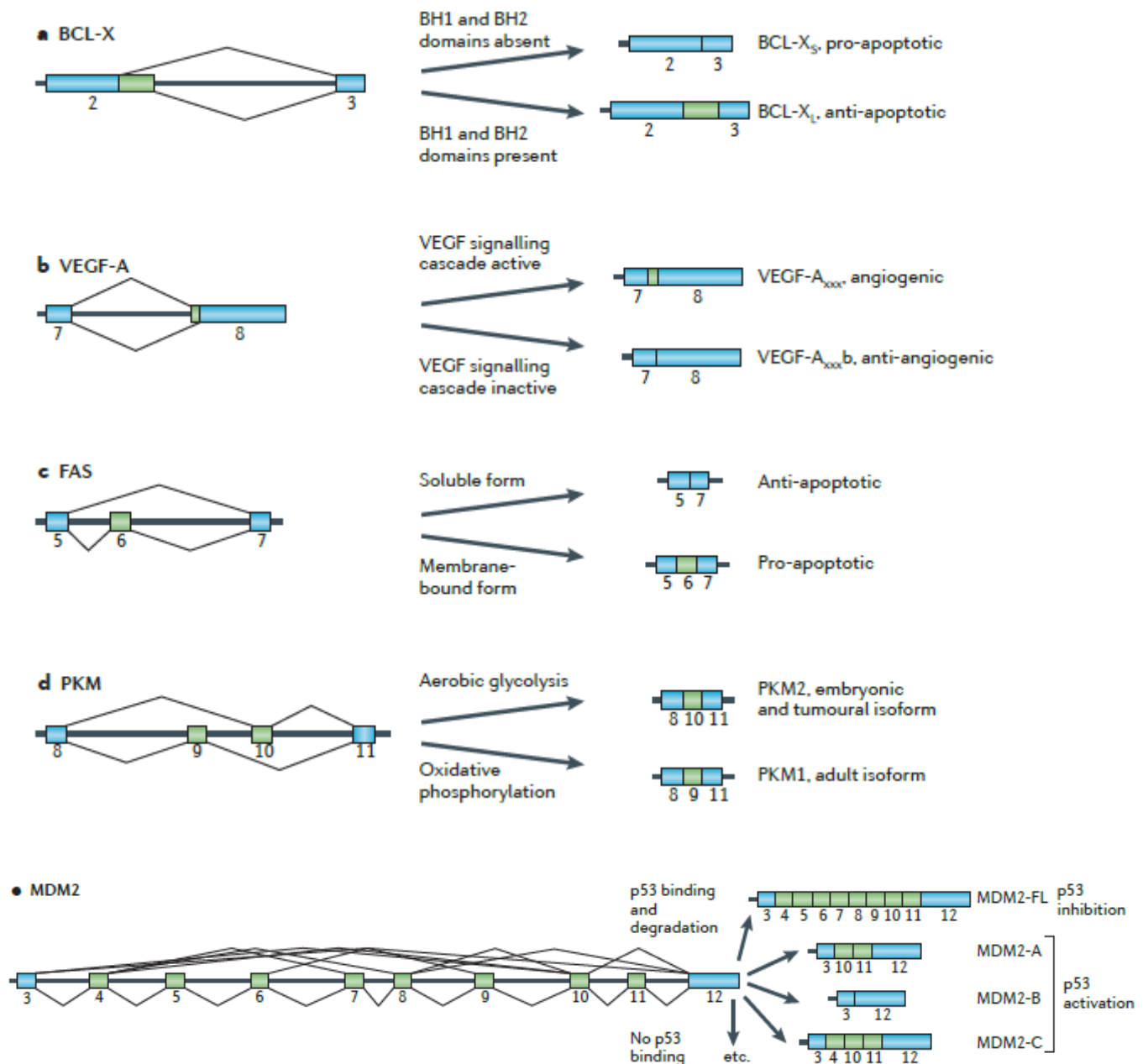


Figure 9. Exemples de changement de fonction de protéines selon l'isoforme majoritaire issu de l'épissage alternatif, extraite de (Bonnal, Vigevani, and Valcárcel 2012).

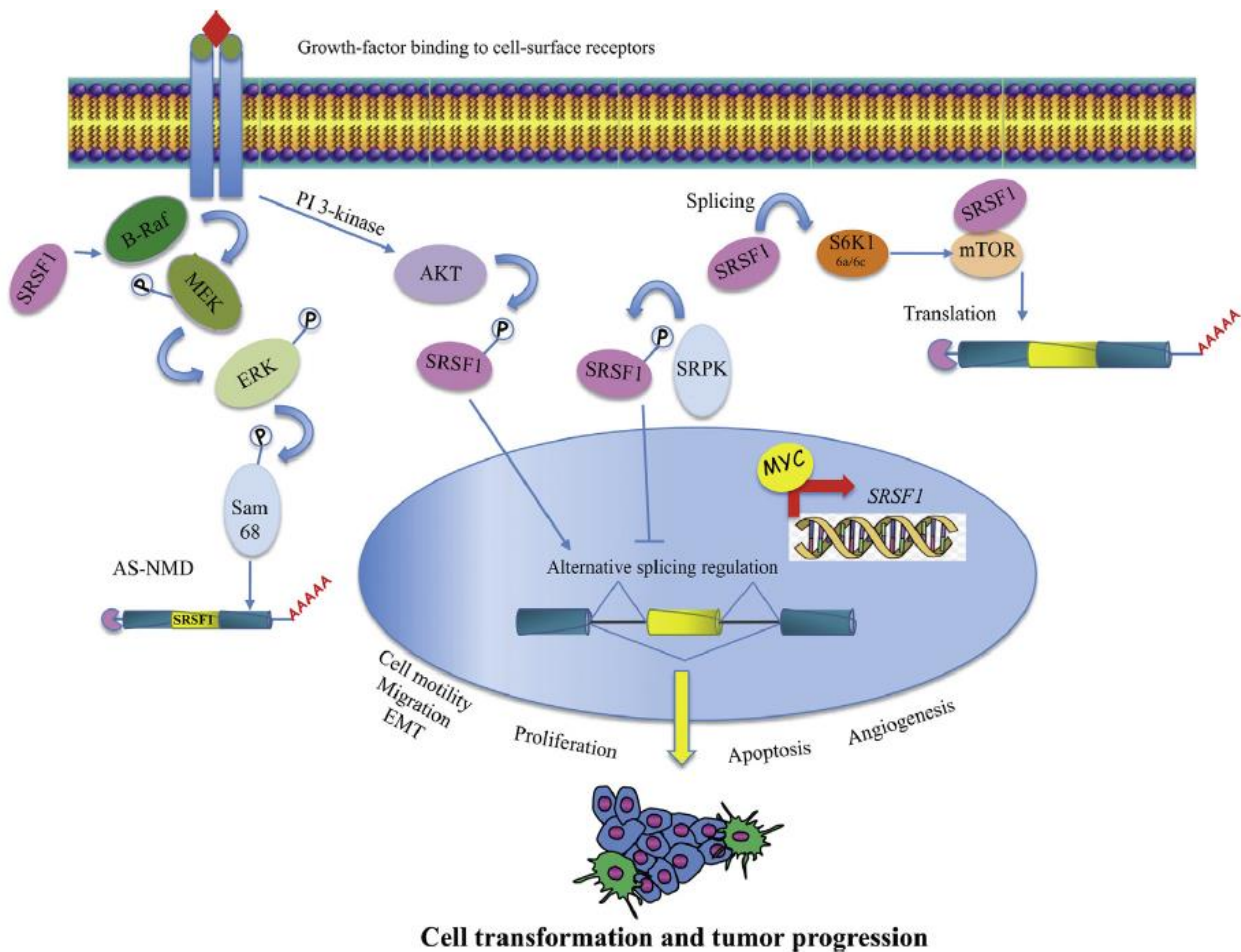


Figure 10. Voie oncogénique conduite par SRSF1, extraite de (Biamonti et al. 2014).

3.2. Apport théranostique de l'épissage alternatif dans les cancers.

A part quelques exceptions, dont certaines citées ci-dessus, il n'est souvent pas possible de rattacher des modifications d'épissage à une ou plusieurs altérations génétiques ou épigénétiques : les interconnexions entre génétique-épigénétique-microenvironnement sont trop complexes pour être totalement déchiffrées à l'heure actuelle. Cependant, une étude globale de l'épissage alternatif (soit l'identification de signature) est possible et peut être riche en informations.

Dans certaines histologies tumorales, des mutations conductrices cardinales ne sont pas retrouvées. L'oncogenèse peut alors être liée à des modifications d'épissage impliquant des domaines protéiques fréquemment mutés dans le type de cancer incriminé. Climente-Gonzalez *et al.* ont bien démontré ce mécanisme, avec des isoformes oncogènes souvent plus courts et associés à une perte de fonction protéique, ou à des gains de domaines pour les oncogènes (Climente-González et al. 2017), les deux concourant le plus souvent à des altérations d'interaction protéique pour les isoformes exprimés. Les gènes les plus fréquemment affectés sont *RAC1*, *TP53* et *ERBB2*. Ces switch d'isoformes impliquent le plus fréquemment des domaines fonctionnels de ces gènes et conduisent à leur inactivation ; une exclusivité entre mutation et événement d'épissage a d'ailleurs été mise en évidence. De plus, Supek et collègues (Supek et al. 2014) ont pu démontrer que des mutations silencieuses dans des oncogènes peuvent également conduire à moduler l'expression du gène si elles surviennent des séquences de régulation de l'épissage, un processus qui pourrait concerner de 20 à 50% des mutations silencieuses.

Les signatures d'épissage peuvent être également source de biomarqueurs du cancer, pouvant servir au diagnostic (Y. Zhang et al. 2019), au pronostic (Y. Li et al. 2017), ou à la prédiction de la réponse au traitement (récemment synthétisé dans (Deng et al. 2021)) : l'exclusion de l'exon 14 de *MET* est une anomalie oncogène récurrente, essentiellement dans les cancers pulmonaires, et est accessible à un traitement par inhibiteurs de MET (Frampton et al. 2015). Sous la pression thérapeutique, des variants d'épissage conférant une résistance peuvent apparaître en réponse à certaines thérapies ciblées (inhibiteur de la mutation *BRAF* V600E dans les mélanome (Poulikakos et al. 2011)) ou à certaines immunothérapies (CD19 dans les LAL B (Sotillo et al. 2015)). Dans ce dernier exemple, des variants d'épissage dépourvus de l'exon 2 peuvent mimer l'effet de mutations sur cet exon et concourir à l'expression d'une protéine qui n'est plus reconnue par les CAR-T cells anti-CD19. La répression de *SRSF3*, qui est centrale dans la rétention de l'exon 2 de CD19, serait à l'origine de cet épissage alternatif.

Dans les LAM, deux papiers récents se sont basés sur l'analyse de l'épissage alternatif pour bâtir des signatures pronostiques aux performances supérieures à celles actuellement utilisées. L'équipe d'Anande et collègues (Anande et al. 2020) a comparé les patrons d'épissage entre LAM de bon et de mauvais pronostic (sur la base de la classification ELN) et

a mis en évidence une surexpression de gènes de l'inflammation chez les patients de haut risque. Ils ont ensuite bâti une signature sur 4 gènes (*MOY9D*, *GAS5*, *GIGYF2*, *RPS9*) qui apparaît plus performante que la classification ELN et la signature LSC17. L'équipe de Jin (Jin et al. 2020) a identifié 7033 événements d'épissage associés à la survie dans les LAM et a construit une signature pronostique avec les 15 plus significatifs. Cette signature était indépendante de l'âge et de la cytogénétique et présentait de meilleures performances pronostiques comparées aux classifications actuelles et à des signatures plus récentes (Gene-7, Gene-24 et LSC17). Ces signatures d'épissage méritent d'être éprouvées dans d'autres contextes thérapeutiques.

3.3. Thérapies ciblant l'épissage en cancérologie.

Le fonctionnement global du spliceosome peut être modulé par diverses molécules, le plus souvent d'origine bactérienne (S. C. W. Lee and Abdel-Wahab 2016). Ces molécules sont des inhibiteurs de cofacteurs du spliceosome (Tableau 7).

Toute tumeur peut théoriquement bénéficier d'une modulation de l'épissage mais certaines semblent particulièrement propices à ce type de thérapie : tumeurs avec mutations de *SF3B1* (hémopathies myéloïdes, cancers du sein...), cancer de la prostate résistant à la castration (essentiellement lié à un variant d'épissage du récepteur aux androgène, AR-V7), tumeur avec addiction à *MYC* (Figure 9 et (S. C. W. Lee and Abdel-Wahab 2016)) qui nécessitent une surexpression induite par *MYC* de certains cofacteurs afin de maintenir un épissage fidèle : *PRMT5* (Koh et al. 2015), *PHF5A* (Hubert et al. 2013) et *BUD31* (Hsu et al. 2015) par exemple. Enfin, moduler le ratio d'isoformes d'une protéine peut permettre d'altérer des fonctions clés de la cellules cancéreuses, (Bonnal, Vigevani, and Valcárcel 2012) comme : la résistance à la mort cellulaire, par modulation du ratio d'isoformes de Mcl-1, de BCL-X ou de Fas ; l'anaérobiose, via PKM ; l'angiogenèse, via VEGF-A ; ou la régulation de p53, directe ou indirecte, via mdm-2.

Les inhibiteurs de SF3B1 ont été les plus étudiés. Ils sont issus de molécules bactériennes et ont pour conséquence une mauvaise reconnaissance du site d'épissage 3' par U2AF45. Les anomalies d'épissage générées sont diverses : rétention d'intron, exclusion d'exon, sites 3' et 5' alternatifs (S. C. W. Lee et al. 2016). Le transcriptome qui en résulte est variable, probablement en fonction du contexte cellulaire, avec des profils d'accumulation de longs ARN messagers mal épissés (Yoshimoto et al. 2017), dont certains peuvent être traduits en protéines aberrantes (Fan et al. 2011), ou un excès d'exon sautés (Wu et al. 2018).

Les cellules présentant des mutations d'un des gènes du spliceosome, a fortiori *SF3B1*, y sont particulièrement vulnérables. La mutation p.R1074G de *SF3B1* confère cependant une résistance à ces molécules (Yokoi et al. 2011).

Plus récemment, des criblages à grande échelle de composés chimiques ont permis d'identifier d'autres molécules d'intérêt. Les inhibiteurs de PRMT5 (EPZ015666, EPZ007345 et EPZ019896) limitent la maturation de certains snRNPs mais également les autres fonctions de PRMT5 non liées à l'épissage (transcription, différenciation, régulation du cycle cellulaire). Or, PRMT5 est up-réglée par MYC, ce qui de fait de son inhibition une cible de choix dans les cancers avec surexpression de MYC. Les inhibiteurs de protéines SR (régulatrices de l'épissage) se positionnent plus récemment désormais dans l'arsenal thérapeutique potentiel, essentiellement des inhibiteurs des kinases activatrices des protéines SR (telles que les Cdc2-like kinases (CLKs) ou les SR protein kinases (SRPKs)). Le TG-003 notamment est un inhibiteur des CLK1, 2 et 4 et a un impact sur le fonctionnement de SRSF2 (Muraki et al. 2004).

Un article récent a démontré la supériorité d'une double-inhibition de l'épissage (PRMT5 et PRMT1 ou SF3B1) dans les LAM, un modèle de tumeur très sensible à ces traitements (Fong et al. 2019). Les CSLs seraient d'ailleurs particulièrement vulnérables à la modulation de l'épissage (Crews et al. 2016).

Cible	Famille	Molécule	Phase de développement
SF3B1	Spliceostatines (<i>Pseudomonas sp.</i>)	Spliceostatin A (SSA)	- pré-clinique (stabilité insuffisante pour le développement clinique) - efficacité dans des lignées de cancers du pancréas et de l'endomètre (Maguire et al. 2015; Satoh and Kaida 2016) - efficacité dans des cellules de neuroblastome (Laetsch et al. 2014) et de LLC (Larrayoz et al. 2016) par switch d'isoforme de Mcl-1 ; effet anti-angiogénique par baisse d'expression de VEGF (Furumai et al. 2010)
		Analogues de la SSA (en cours de développement)	- spliceostatine E (Ghosh et al. 2014) - 1,2-Deoxy-pyranose SSA (Yoshikawa et al. 2020) - spliceostatines J et K (H. Zhao et al. 2019)
		Meayamycin B	- pré-clinique - efficacité <i>in vitro</i> dans des lignées de LAL et LAM (Wojtuszkiewicz et al. 2014)
	Thailanstatines (<i>Burkholderia thailandensis</i>)	TST-A à D	- pré-clinique - efficacité de TST-D dans des lignées de cancer de prostate résistant à la castration (B. Wang et al. 2017)
	Pladienolides (<i>Streptomyces platensis</i>)	A à G	- activité plus élevée pour le B mais faible stabilité pour tous
		E7107 (dérivé du pladienolide D)	- clinique, 2 essais de phase I (Hong et al. 2014; Eskens et al. 2013), DMT atteinte - développement suspendu en raison d'effets indésirables graves non prévisibles (névrites optiques bilatérales 3/66 patients)
		H3B-8800	- clinique - phase 1 terminée dans les hémopathies myéloïdes et favorable (Steensma et al. 2021)
	SudémYCines (analogues de synthèse)	C1, D1, D6, E, F	- pré-clinique - efficacité essentiellement démontrée pour Sudemycin C (Fan et al. 2011; Xargay-Torrent et al. 2015) et D1 (Xargay-Torrent et al. 2015), notamment dans des modèles de PDX de LLC
		K	- Pré-clinique, stabilité et affinité améliorées (Makowski et al. 2017)

	Herboxydiènes (<i>Streptomyces chromofuscus</i>)	Herboxydiene (GEX1A) et dérivés	- Pré-clinique - dans les cellules HeLa, accumulation de p27 (<i>CDKN1B</i>) tronquée (résistante à l'ubiquitinylation), inhibant Cdk2-cyclinE (Hasegawa et al. 2011) - effet anti-angiogénique par répression de VEGFR2 et HIF-1 α (Jung et al. 2015)
PRMT5	EPZ015666 (GSK3235025)		- pré-clinique, efficacité dans des xénogreffes de lymphome du manteau (Chan-Penebre et al. 2015)
	GSK3326595		- clinique - en cours de phases 1/2 dans les cancers du sein (NCT04676516), les SMD/LAM (NCT03614728), les lymphomes non-hodgkiniens et tumeurs solides (NCT02783300)
	GSK3368715		- clinique, efficacité dans des nombreux modèles de cancer (Fedoriw et al. 2019) - phase 1 terminée (NCT03666988), en attente des résultats
	JNJ64619178		- clinique - en cours de phase 1 (NCT03573310)
	PF06939999		- clinique - en cours de phase 1 (NCT03854227)
Inhibiteurs des protéines SR	Inhibiteurs de CLKs	TG-003	- inhibiteur de CLK1, 2 et 4 - pré-clinique, efficacité inconnue (Muraki et al. 2004)
		SM08502	- clinique, efficacité dans des modèles de cancers digestifs et sur la voie Wnt (Tam et al. 2020) - phase 1 toutes tumeurs en cours (NCT03355066)
	Inhibiteurs de SRPK	SRPIN340	- pré-clinique, preuve de concept établie mais stabilité médiocre (Fukuhara et al. 2006)
		SCO-101 (Endovion)	- clinique, inhibiteur d'ABC transporteurs et de SRPK1, traitement pour la drépanocytose au développement interrompu - phases 1 anciennes récemment publiées (Araki et al. 2015) - phase 2 en cours dans le cancer colorectal résistant au FOLFIRI (NCT04247256)
	Inhibiteurs mixtes SRPK-CLK	Cpd-1,-2,-3	- pré-clinique, induction d'apoptose dans des lignées de cancers du sein (Araki et al. 2015)

Tableau 7. Modulation pharmacologique de l'épissage en oncologie. (adapté de (S. C. W. Lee and Abdel-Wahab 2016)). *DMT* (dose maximale tolérée), *LLC* (leucémie lymphoïde chronique), *PDX* (patient-derived xenograft)

Par ailleurs, un événement unique d'épissage peut être modulé par des oligonucléotides : soit par inhibition de la traduction ou destruction de l'ARN messager (ARN interférent, oligonucléotides antisens), soit par inhibition de la transcription (oligonucléotide bloqueur de transcription), soit encore en modifiant la sélection des sites d'épissage au niveau du pré-ARNm (oligonucléotides modulateurs d'épissage). Cette méthode semble plus appropriée pour des événements d'épissage pathogènes isolés car elle évite l'altération globale du transcriptome induite par les inhibiteurs du spliceosome ou des protéines cofacteurs. Bien que les cibles soient nombreuses dans le cancer, ces thérapies sont plus avancées dans les maladies génétiques constitutionnelles, avec des résultats cliniques. Elle nécessite néanmoins un vecteur de transmission aux cellules cibles. Une excellente revue assez récente (Kole, Krainer, and Altman 2012) synthétise l'ensemble des modalités de traitements par les ARN.

Le meilleur exemple de développement de ce type de technologie dans le cancer est sans doute le custirsén (OGX-011) est un oligonucléotide antisens ciblant la clusterine, une protéine chaperonne anti-apoptotique connue pour être surexprimée dans de nombreux cancers.

La phase 2 avait suggéré une prolongation de survie dans le cancer de la prostate métastatique résistant à la castration, en association au docétaxel (Chi et al. 2010), mais les phases 3 randomisées de la chimiothérapie de référence, prednisone plus cabazitaxel (Beer et al. 2017) ou docétaxel (Chi et al. 2017) n'ont pas démontré de supériorité de l'ajout du custirsén. Le développement du traitement est suspendu depuis ces résultats, malgré des données encourageantes dans le cancer du poumon non à petites cellules (Laskin et al. 2012).

Dans le domaine des ARN interférents, l'essai de phase 1 CALAA-01 a surtout permis de démontrer que la méthode de délivrance de ce type de traitement est capitale, à la fois dans l'efficacité mais également dans le profil de toxicité (Zuckerman et al. 2014). La phase 1 de l'ALN-VSP02, un mélange de 2 ARN interférents (ciblant le VEGF et le complexe des kinésines) dans des tumeurs solides avec métastases hépatiques (NCT00882180) est terminée et les résultats sont en attente.

Le domaine des oligonucléotides antisens est en plein essor en oncologie, avec des essais de phase 1/2 d'oligonucléotides ciblant : BCL-2 (BP1001 dans les LAM, NCT02781883, BP1002 dans les lymphomes, NCT04072458), c-Myb (UPCC 04701, dans les hémopathies, NCT00780052), TGF- β (TASO-001, dans les tumeurs solides, NCT04862767), HIF-1 α (EZN-2968, dans les tumeurs solides et les lymphomes, NCT00466583), STAT3 (ISIS 481464, dans les tumeurs solides et les lymphomes, NCT01563302). Bien que les phases précoces aient été encourageantes, les résultats en phase d'extension sont contrastés. La phase 2 de l'apatorsen (OGX-427) n'a pas démontré sa supériorité en combinaison avec la chimiothérapie dans les cancers du poumon non à petites cellules (Spigel et al. 2019) mais cette approche semble plus prometteuse dans les cancers urothéliaux (Rosenberg et al. 2018) et pancréatiques (Ko et al. 2017). Les résultats de l'oblimersen (anti-BCL-2) sont également décevants dans le mélanome (Bedikian et al. 2014).

Tous ces oligonucléotides ont cependant été constitués pour réprimer des gènes et il n'existe pas encore de design pour moduler un ou plusieurs événements d'épissage en développement clinique.

Enfin, l'immunothérapie anti-checkpoint est en plein essor en cancérologie mais toutes les histologies n'y répondent pas et des échappements thérapeutiques sont fréquents. En effet, les cellules cancéreuses peuvent moduler leur transcriptome par polyadénylation alternative, édition des ARN messagers et épissage alternatif pour échapper à ces traitements (Frankiw, Baltimore, and Li 2019). Dans une étude sur la base du TCGA, 68% des tumeurs ovariennes et mammaires étudiées contenaient au moins 1 néo-épitope issu d'un épissage alternatif (Kahles et al. 2018). Cela ouvre la voie à l'utilisation d'inhibiteurs du spliceosome, afin d'élargir le répertoire de néo-épitopes présentés par les cellules cancéreuses, et ainsi rendre les tumeurs plus sensibles aux immunothérapies. Une étude récente a démontré la faisabilité de cette approche, renforcée par une vaccination peptique, dans un modèle murin (Darrigrand et al. 2021) en utilisant l'isoginkgentin sur une lignée de fibrosarcome.

3.4. Epissage alternatif dans les LAM.

Du fait de fréquentes mutations de facteurs d'épissage, les hémopathies myéloïdes font partie des premiers cancers à avoir été étudiés sur ce plan. Par exemple, les mutations de *U2AF1* ont pour conséquence une élévation de la proportion de rétention d'intron, conduisant à un excès d'ARN éliminés par le NMD et donc à une sous-expression des gènes concernés (K. Yoshida et al. 2011). Une étude globale réalisée dans les LAM de l'adulte (Adamia, Haibe-kains, and Pilarski 2014) a mis en évidence qu'environ 30% des gènes exprimés faisait l'objet d'un épissage alternatif, en comparaison avec des cellules souches hématopoïétiques CD34+ saines. Ces événements d'épissage concernent des fonctions cellulaires variées : gènes suppresseurs de tumeur, oncogènes, apoptose, prolifération, facteurs d'épissage et assemblage du spliceosome. La proportion de mutations de gènes impliqués dans l'épissage étant inférieure à 10% dans les LAM (principalement *SF3B1*, *U2AF1* et *SRSF2*) (Visconte et al. 2012), d'autres mécanismes interviennent pour déréguler l'épissage dans cette pathologie. Une revue de notre équipe a repris l'ensemble des mécanismes actuellement décrits comme pouvant moduler l'épissage dans les LAM (Mohamed et al. 2014).

Tout d'abord, les mutations de facteurs impliqués dans la régulation épigénétique (concernant la méthylation de l'ADN comme *DNMT3A* et *TET2* ou la régulation des histones comme *ASXL1* et *EZH2*) sont plus fréquentes que celles des facteurs d'épissage, de l'ordre de 10 à 30% dans les LAM de l'adulte. De plus, certains oncogènes drivers de leucémogénèse, comme *WT1* et *DEK*, ont un impact direct sur l'épissage. *WT1* est un facteur transcriptionnel à structure en doigt-de-Zinc, souvent surexprimé, parfois muté, dans les LAM et capable de se lier à l'ADN et à l'ARN (Morrison, Viney, and Lodomery 2008). Les mutations et la surexpression de *WT1* ont été démontrés comme perturbant le ratio d'épissage de VEGF entre isoformes pro et anti-angiogéniques, le plus souvent en faveur de l'isoforme pro-angiogénique, favorisant la production hématopoïétique (Amin et al. 2011; Cunningham et al. 2013). *DEK* code pour une protéine avec un domaine SAP impliquée dans la genèse de superhélices positives dans l'ADN double-brin et la reconnaissance des sites d'épissage.

Un travail de notre équipe a identifié, dans des lignées de LAM, des patrons d'épissage très spécifiques associés à des surexpressions de *WT1* ou de *DEK* (Mohamed et al. 2015). Ces patrons d'épissage ne se recoupaient que sur peu d'événements, avec des profils d'expression

d'exons spécifiques pour les transcrits engagés dans la voie des MAPK pour *DEK* et dans la signalisation PPAR et les transporteurs ABC pour *WT1*.

Dans cette même étude, il a été démontré que les patrons d'épissage dans les LAM peuvent avoir des conséquences sur la réponse au traitement. En effet, des patrons spécifiques ont été décrits dans les cellules résistantes aux anthracyclines, à la cytarabine ou à l'azacitidine. Les voies de signalisation altérées en commun concernaient : la signalisation du récepteur des lymphocytes T, l'adhésion focale, la guidance axonale, la régulation du cytosquelette et l'interaction avec la matrice extra-cellulaire. En comparant des échantillons de patients chimiorésistants et chimiosensibles, des patrons d'épissage spécifiques ont été mis en évidence, et la voie des transporteurs ABC était de nouveau le siège de nombreux événements d'épissage dans les échantillons chimiosensibles. Parmi les événements identifiés dans cette voie figurait l'exclusion de l'exon 19 du gène *ABCA3*, sur lequel nous avons décidé de nous focaliser.

4. Impact du gène ABCA3 dans les hémopathies malignes.

4.1. La famille des ABC transporteurs.

Les protéines ATP-Binding Cassette (ABC) font parties de la superfamille des nucléotides-tri-phosphatases avec boucle P. Leur fonction principale est le transport actif de substances contre leur gradient chimique au travers des membranes cellulaires. (Hopfner 2016). La caractéristique structurelle commune à ces protéines est le domaine NBD (Nucleotide Binding Domain) avec boucle P (phosphate-binding) ATPase, où sera catalysée l'hydroxylation de l'ATP en ADP, fournissant l'énergie nécessaire au fonctionnement de ces moteurs moléculaires. Ce domaine contient la « signature ABC » spécifique de cette famille de protéines : séquence d'acides aminés LSGGQ. Les protéines ABC transportent essentiellement des molécules lipidiques ou amphiphiles, des peptides, et des toxines (Vasiliou, Vasiliou, and Nebert 2009). Physiologiquement, beaucoup d'entre-elles sont impliquées dans la détoxification cellulaire, et deviennent de plus en plus connues dans la résistance multidroque (MDR) dans le traitement du cancer, les mieux décrites étant la P-glycoprotéine (P-gp, ABCB1) et la BCRP (breast-cancer related-protein, ABCG2). D'autres sont connues de par leur implication dans des pathologies humaines (Tableau 8), telles qu'ABCB2 et B3 (protéines TAP, transporter associated with antigen presentation) dans des déficits immunitaires primitifs, ou ABCC7 (CFTR), dont la perte de fonction est causale dans la mucoviscidose.

Le cycle de fonctionnement se déroule schématiquement ainsi (Figure 11) : fixation du substrat en trans, induisant un changement conformationnel permettant à l'ATP de se fixer dans le NBD. L'hydrolyse de l'ATP induit ensuite le dernier changement conformationnel permettant au substrat de passer côté cis de la membrane.

Chaque protéine ABC comprend 2 domaines transmembranaires et 2 NBDs, à l'exception des ABC E et F qui ne possèdent pas de domaine transmembranaire.

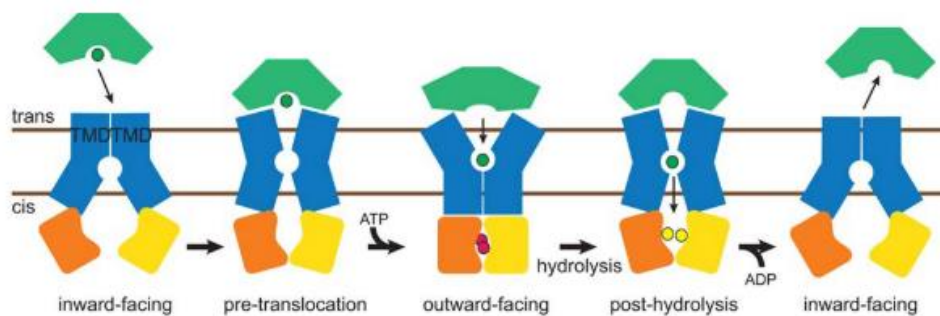


Figure 11. Schéma de fonctionnement des ABC transporteurs. (issue de (Hopfner 2016)).
TMD (trans-membrane domain)

ABCB7 semble être la protéine la plus exprimée dans les cellules souches hématopoïétiques et sa perte induit une hypoplasie médullaire sévère, contrairement à ABCB1 et ABCG2 (Raaijmakers 2007). Par ailleurs, les protéines ABC sont en partie responsables de la résistance des cellules leucémiques aux cytotoxiques.

Une étude a retrouvé des expressions élevées, outre des principales MDR protéines connues (ABCB1, ABCC1 et ABCG2), d'ABCA4, ABCA7, ABCB2, ABCB6, ABCB8, ABCB9 et ABCG1 dans des lignées de cellules cancéreuses résistantes aux chimiothérapies (Gillet et al. 2004), ce qui renforce l'idée que la résistance multidrogue dans le cancer peut impliquer différentes protéines ABC en fonction du contexte cellulaire, d'autant plus que la modulation pharmacologique de ABCB1 et ABCG2 n'a pas d'impact sur la survie de ces cellules (Raaijmakers 2007). Dans les LAM, les protéines ABCA5, ABCB1, ABCB6, ABCC1, ABCC3 semblent être les plus exprimées (Varatharajan et al. 2017), notamment dans les CSLs (Ho, Hogge, and Ling 2008). Des essais cliniques ont tenté de moduler l'expression des ABC transporteurs, avec une certaine efficacité pour la cyclosporine A (List et al. 2001) et une absence d'effet pour les inhibiteurs sélecteurs de ABCB1 (Raaijmakers 2007), renforçant l'idée que la résistance multidrogue n'est pas le fait d'une seule protéine.

L'expression des gènes ABC peut néanmoins servir de biomarqueur pour les LAM. L'expression élevée d'*ABCB1* est bien connue comme étant associée à un pronostic défavorable, mais limité aux patients âgés (D Steinbach and Legrand 2007) ; l'impact pronostique d'*ABCG2* et d'*ABCC1* semble par contre indépendant de l'âge.

Famille	Membre	Séquence gène	Fonctions
ABC A	A1	NM005502	Transport de cholestérol – maladie de Tangier
	A2	NM001606	Transport de lipides, régulation de la production de β -amyloïde, MDR (estramustine)
	A3	NM001089	Production du surfactant pulmonaire, MDR – déficits en surfactant
	A4	NM000350	Efflux de phosphatidyléthanolamine, rôle dans les photorécepteurs – maladie de Stargardt
	A5	NM018672	Efflux cholestérol sur les HDL
	A6	NM080284	MDR, homéostasie lipidique dans les macrophages
	A7	NM019112	Transport de lipides
	A8	NM007168	Transport de lipides et d'anions organiques, MDR
	A9	NM080283	Homéostasie lipidique dans les macrophages
	A10	NM080282	Homéostasie lipidique dans les macrophages
	A12	NM173076	Transport de glucosylcéramides, homéostasie cutanée – ichtyose arlequin
	A13	NM152701	Transport de cholestérol et de gangliosides
ABC B	B1 (P-gp)	NM000927	Flop de phospholipides membranaires, MDR (anthracyclines, étoposide, imatinib, taxanes, vinca-alcaloïdes)
	B2 (TAP1)	NM000593	Transport de peptide, lien avec le CMH I
	B3 (TAP2)	NM000544	Transport de peptide, lien avec le CMH I
	B4	NM000443	Flop de phosphatidylcholine, production des sels biliaires, MDR (paclitaxel, vinblastine)
	B5	NM178559	MDR (doxorubicine), marqueur de cellules souches cancéreuses
	B6	NM005689	Transport de porphyrines, mélanogénèse
	B7	NM004299	Transport de cluster Fer-Soufre-Glutathion – Anémie sidéroblastique avec ataxie
	B8 (MITOS)	NM007188	Canal K ⁺ de la membrane mitochondriale interne
	B9	NM019625	Transport de peptides, MDR
	B10	NM012089	Transport de porphyrines, métabolisme du Fer
	B11	NM003742	MDR (paclitaxel), transport de sels biliaires – cholestase intra-hépatique familiale
ABC C	C1 (MRP1)	NM004996	MDR (anthracyclines, étoposide, méthotrexate)
	C2 (MRP2)	NM000392	MDR (cisplatine, doxorubicine, mitoxantrone, étoposide, méthotrexate, vinca-alcaloïdes) – syndrome de Dubin-Johnson
	C3 (MRP3)	NM003786	MDR (cisplatine, doxorubicine, étoposide, méthotrexate, vinca-alcaloïdes, thiopurines)
	C4 (MRP4)	NM005845	Transport de nucléosides, MDR (méthotrexate, thiopurines)
	C5 (MRP5)	NM005688	Transport de nucléosides et d'hème, MDR (thiopurines)
	C6 (MRP6)	NM001171	MDR (anthracyclines, étoposide) – pseudoxanthoma elasticum
	C7 (CFTR)	NM000492	Transport d'ions chlorure – mucoviscidose
	C8	NM000352	Sous-unité du canal K ⁺ des cellules β du pancréas
	C9	NM005691	Sous-unité SUR2A du canal K ⁺ cardiaque

	C10 (MRP7)	NM033450	MDR (docétaxel, paclitaxel, vinca-alcaloïdes)
	C11 (MRP8)	NM033151	MDR (thiopurines, méthotrexate), transport d'anions lipophiles, rôle dans la production de bile
	C12 (MRP9)	NM033226	inconnu
ABC D	D1	NM000033	Transfert d'acides gras à très longue chaîne ou d'acyls-CoA vers le peroxysome – adrénoleucodystrophie liée à l'X
	D2	NM005164	Inconnu – adrénoleucodystrophie liée à l'X
	D3	NM002858	Transfert d'acides gras ou d'acyls-CoA vers le péroxysome –certaines formes du syndrome de Zellweger
	D4	NM005050	Transport de la vitamine B12
ABC E	E1	NM002940	Fonction ribosomale, rôle dans la réponse interféron
ABC F	F1	NM001025091	Initiation de la traduction, rôle dans l'inflammation
	F2	NM005692	inconnu
	F3	NM018358	inconnu
ABC G	G1	NM004915	Transport de lipides
	G2 (BCRP)	NM004827	MDR (mitoxantrone, méthotrexate, topotécane/irinotécane, anthracyclines)
	G4	NM022169	Homéostasie lipidique dans les macrophages
	G5	NM022436	Transport des stérols - sitostérolémie
	G8	NM022437	Transport des stérols - sitostérolémie

Tableau 8. Les membres de la famille des protéines ABC chez l'Homme, nomenclature, rôles et numéro de séquence génique. (d'après (Vasiliou, Vasiliou, and Nebert 2009; Quazi and Molday 2011; Raaijmakers 2007)). En gras dans la partie fonction sont indiquées les maladies pour lesquelles des mutations constitutionnelles du gène sont rapportées. *HDL (high density lipoparticle), MDR (multidrug resistance), TAP (transporter associated with antigen presentation).*

4.2. ABCA3 : structure, fonction et pathogénie.

ABCA3 fait partie de la sous-famille A des transporteurs ABC, dont les gènes des membres sont dispersés sur le génome, à l'exception du cluster ABCA5-6-8-9-10 en 17q (Figure 12A). Il y a 12 protéines ABCA (ABCA11 a été attribué à tort à un pseudogène). La structure protéique des ABCA transporteurs est conservée et comprend 2 domaines transmembranaires et 2 NBDs, associés 2 par 2 et séparés par une boucle hydrophobe (HH1) caractéristique de cette sous-famille (Figure 12B).

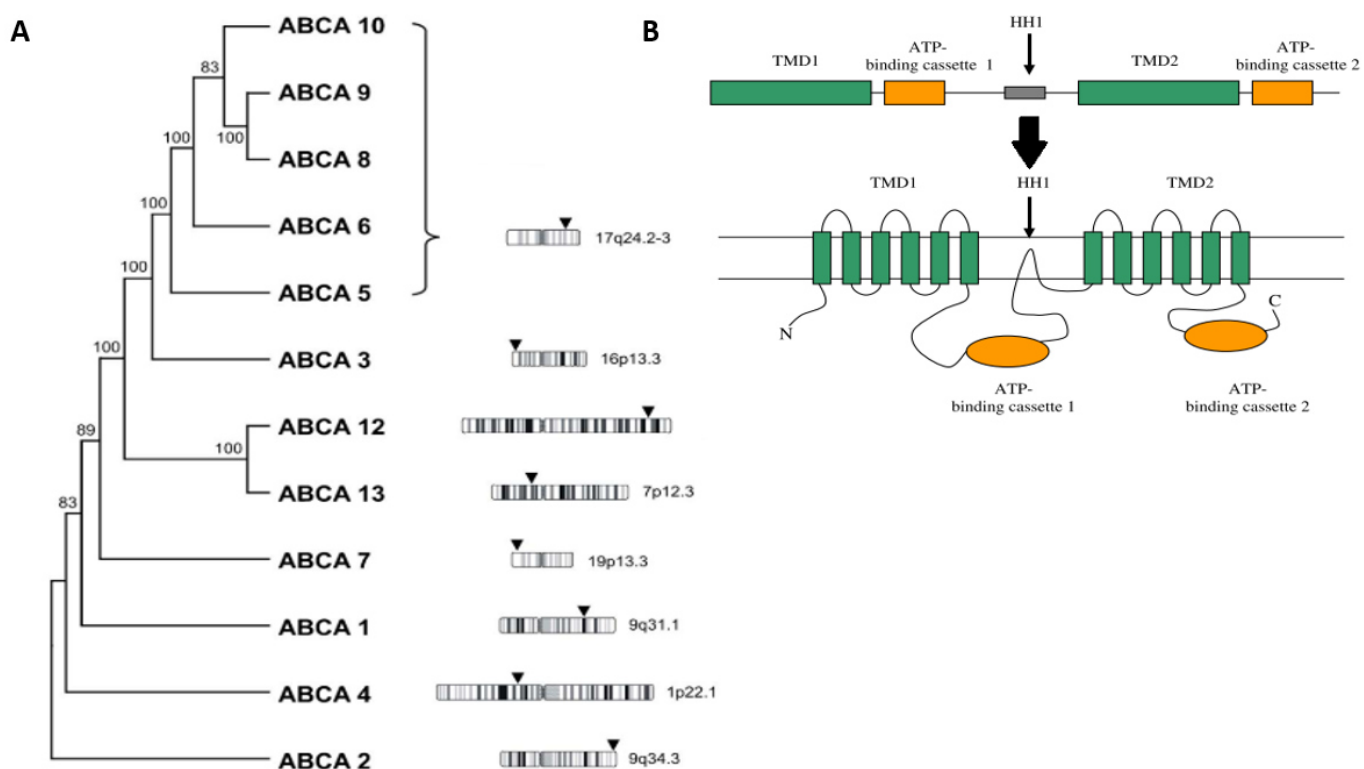


Figure 12. Phylogénie de séquence d'acides aminés (A) et structure protéique (B) de la sous-famille A des ABC transporteurs. Figure A extraite de (Kaminski, Piehler, and Wenzel 2006) et B extraite de (Albrecht and Viturro 2007).

Le gène *ABCA3* (NM_001089) est situé en 16p13, a une taille approximative de 65 000 bases nucléotidiques, et comprend 33 exons. Dans la base Ensembl (Figure 13A), 12 transcrits sont rapportés, certains en lien avec un promoteur alternatif situé en amont de l'exon 4 et des séquences de polyadénylations alternatives sur les exons 7 et 20. L'expression d'*ABCA3* est finement régulée lors du développement fœtal et est inductible par les glucocorticoïdes (I. Yoshida, Ban, and Inagaki 2004) et par STAT3 en réponse à une inflammation médiée par l'IL6 (Matsuzaki et al. 2008). Le promoteur d'*ABCA3* chez la souris est également soumis à une transactivation par les facteurs de transcription FOXA2, CEBPA, GATA-6, TTF-1, NFATc3 et les SREBPs (sterol-response element binding proteins) (Besnard, Xu, and Whitsett 2007). L'expression physiologique d'*ABCA3* est élevée dans le poumon mais également présente dans le pancréas, le foie, les reins, le cerveau et le cœur.

La protéine native *ABCA3* (UniProtKB - Q99758) comporte 1704 acides aminés pour un poids moléculaire élevé (191 kDa). Sa structure tertiaire et sa modélisation tridimensionnelle sont présentées en Figures 13B et C. Au niveau cellulaire, *ABCA3* se localise sur les lysosomes et les endosomes ; dans les pneumocytes de type II, son expression est restreinte aux corps multilamellaires, lieux de production du surfactant pulmonaire. *ABCA3* subit de nombreuses glycosylations, notamment sur sa partie N-terminale, avec un impact significatif sur sa structure définitive (M. F. Beers et al. 2013) et dont l'absence entraîne une dégradation de la protéine via le protéasome. Bien que théoriquement fonctionnelle en monomère, une étude récente a démontré que les monomères d'*ABCA3* ne représentent que 45% des formes exprimées sur les membranes lysosomales, avec 30% de tétramères, 20% de dimères et 5% de trimères (Frixel et al. 2016). La dégradation d'*ABCA3* est lysosomale par effet de la Cathepsine L sur la Lysine 174, située sur la première boucle intraluminaire (Hofmann et al. 2016).

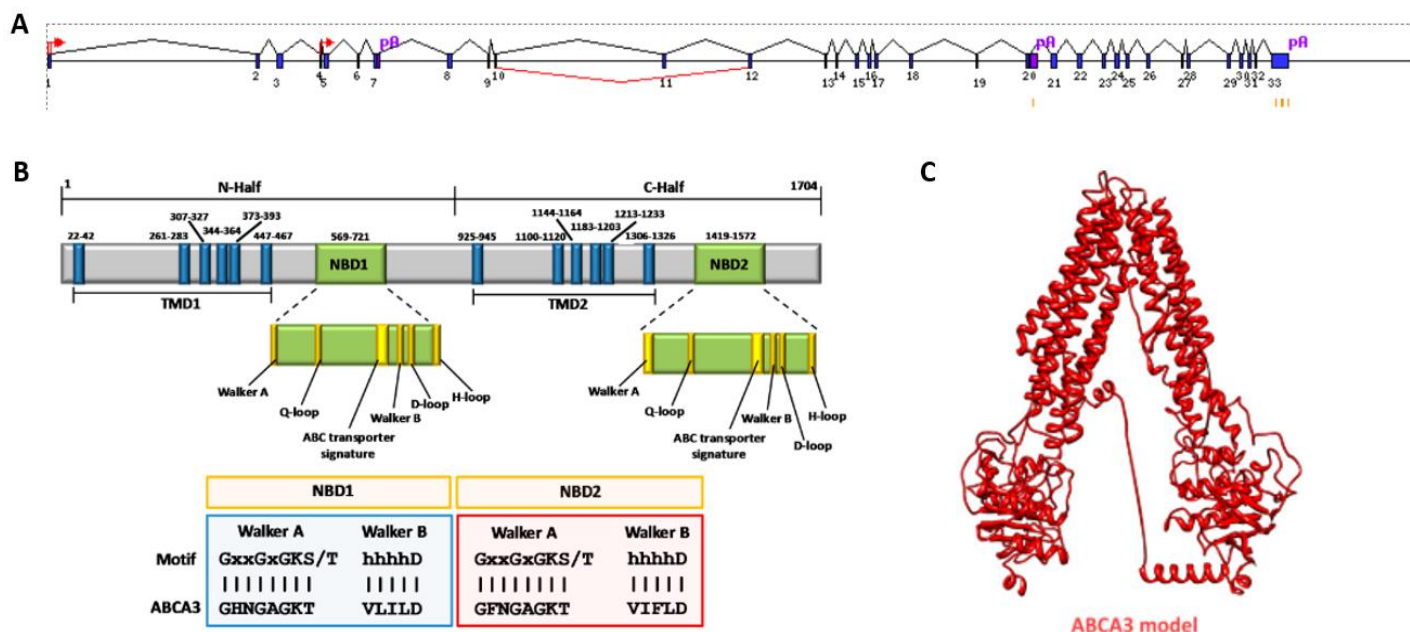


Figure 13. Gène et protéine ABCA3. Séquence génétique d'*ABCA3* avec représentations des exons en rectangles de taille proportionnelles à leur longueur de nucléotides (A, extraite de FastedB), structure protéique tertiaire (B) et modélisation 3D (C). Figures B et C extraites de (Paolini et al. 2015). *pA* (site de polyadénylation), *TMD* (trans-membrane domain), *NBD* (nucleotide-binding domain).

ABCA3 est un transporteur de molécules hydrophobes, physiologiquement de lipides (cholestérol, phosphatidylcholine, phosphatidylglycérol, sphingomyéline, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine). Son expression préférentielle dans les corps multi-lamellaires des pneumocytes en font un élément incontournable dans la maturation du surfactant pulmonaire (Michael F. Beers and Mulugeta 2017). Son cycle de fonctionnement et d'auto-renouvellement est bien décrit dans ces cellules (Figure 14A). Dans un modèle murin avec inactivation complète d'*ABCA3*, les jeunes souris meurent en quelques heures d'insuffisance respiratoire. Des mutations constitutionnelles avec perte de fonction d'*ABCA3* sont désormais bien décrites comme pouvant induire des pathologies pulmonaires, allant de la détresse néonatale aiguë par déficit en surfactant aux pneumopathies interstitielles diffuses de révélation tardive (Michael F. Beers and Mulugeta 2017).

Cette expression élevée d'*ABCA3* a également été documentée dans des échantillons de patients adultes et pédiatriques, avec une tendance vers l'association d'une expression élevée avec un mauvais pronostic, sans corrélation avec la classification FAB de la leucémie (Wulf et al. 2004). Dans toutes ces études, l'expression d'*ABCA3* était relativement faible dans les cellules hématopoïétiques normales.

En dehors des hémopathies myéloïdes, l'expression d'*ABCA3* a pu être documentée dans de nombreux cancers, notamment dans des lymphomes non-hodgkiniens (B Chapuy et al. 2008) et dans les LAL (Efferth et al. 2006). Dans les cancers du poumon, *ABCA3* est fortement exprimé dans les adénocarcinomes (Overbeck et al. 2013) et faiblement exprimé dans les cellules de cancer non à petites cellules (D. Zhao et al. 2020), avec un impact pronostique défavorable en cas de forte expression (Overbeck et al. 2017). L'inhibition d'*ABCA3* dans des lignées cellulaires restaure une sensibilité aux chimiothérapies conventionnelles de ce type de cancer (cisplatine et paclitaxel) (Overbeck et al. 2013). Dans les cancers de l'ovaire (Januchowski et al. 2014) et du côlon (Long et al. 2016), *ABCA3* apparaît cependant sous-exprimé dans les formes chimiorésistantes, possiblement car d'autres ABC transporteurs sont sur-exprimés (Januchowski et al. 2014). Un impact pronostique défavorable d'une forte expression d'*ABCA3* est suggérée dans les cancers du poumon, du testicule et de la thyroïde (Lin et al. 2004). *ABCA3* est également exprimé dans les cancers du sein, en réponse aux œstrogènes, sans impact pronostic documenté à l'heure actuelle (Lin et al. 2004). Par ailleurs, très peu de mutations d'*ABCA3* sont rapportées dans les cancers (données cBioPortal).

D'un point de vue mécanistique (Wulf et al. 2004; B Chapuy et al. 2008), *ABCA3* induit un avantage de survie des cellules exposées à diverses chimiothérapies (étoposide, cytarabine, vincristine, daunorubicine et mitoxantrone) par séquestration lysosomale de ces molécules. Dans des cellules HEK293T transfectées avec un plasmide *ABCA3*, les auteurs ont bien démontré une augmentation de l'accumulation cellulaire mais une réduction de l'accumulation nucléaire de la drogue (B Chapuy et al. 2008). Un mécanisme similaire a été démontré par la même équipe concernant la résistance à l'imatinib dans des cellules de LMC (Bjoern Chapuy et al. 2009). Ces drogues ainsi captées sont ensuite éliminées de la cellule via des exosomes (Koch et al. 2016) ce qui éviterait leur rediffusion vers la cellule. *ABCA3* ayant un rôle dans la constitution des corps multivésiculaires d'où sont originaires les exosomes, la

même équipe a démontré que l'inhibition d'ABCA3 (pharmacologique ou génétique) limite la production d'exosomes (Aung et al. 2011). Dans cette même étude, *ABCA3* était sur-exprimé dans des lignées de lymphomes B résistants au Rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20), et cette résistance était médiée par la production d'exosomes riches en CD20, qui captent le médicament en extra-cellulaire, avec re-sensibilisation au Rituximab via inhibition d'ABCA3.

Dans les LAM, *ABCA3* est exprimé dans le compartiment souche sous la dépendance de *SALL4* (*Drosophila* spalt-like protein 4), un facteur de transcription en doigt-de-zinc. Ma et collègues ont rapporté une expression constitutionnelle de *SALL4* dans des lignées primaires de LAM et un effet leucémogène de la surexpression de ce gène dans un modèle murin via interaction directe avec la β -caténine (Y. Ma et al. 2006). La même équipe a démontré ultérieurement que *SALL4* est indispensable au maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires et à leurs destins cellulaires et, de manière analogue, à l'expansion des CSH (Aguila et al. 2011). L'inactivation de *SALL4* dans des cellules leucémiques induit leur apoptose (J. Yang et al. 2008), des gènes comme *Bmi-1* et *Bcl2/2* étant sous la dépendance de ce facteur de transcription (F. Wang et al. 2016). *SALL4* est également plus fortement exprimé dans les CSLs et sa perte neutralise leur chimiorésistance, en lien avec une baisse d'expression d'*ABCA3* et *ABCG2* (Jeong et al. 2011). *SALL4* se lie directement au promoteur d'*ABCA3* et induit sa transcription (Jeong et al. 2011). De manière analogue, *SALL4* est également exprimé dans les cellules de LMC (Shen et al. 2012) et est connu pour médier la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase imatinib, dasatinib et nilotinib (Hupfeld et al. 2013). De plus, une surexpression de *SALL4* induit un certain degré d'instabilité génomique, par répression de *FancL* (F. Wang et al. 2016), et favorise le développement de LAM avec caryotype défavorable (J. C. Ma et al. 2013). D'un point de vue mécanistique, *SALL4* interagit avec des modulateurs épigénétiques, tels que DNMT3A, KMT2A, DOT1L et LSD1 (L. Liu et al. 2013), et sa participation est cruciale à la leucémogénèse médiée par les transcrits de fusions de *KMT2A* via activation d'*HOXA9* et de *Meis1* (A. Li et al. 2013; Lina Yang et al. 2017).

Un lien entre la voie de signalisation Hedgehog et ABCA3 a également été rapporté dans la LAL (Sheybani, Rahgozar, and Ghodousi 2019; Ghodousi and Rahgozar 2018). Schématiquement, une surexpression de *Smo* est corrélée à des taux élevés d'ABCA3, probablement car le programme transcriptionnel de *Gli1* inclut le facteur de transcription *Nanog* qui est ensuite capable d'induire l'expression de *SALL4* ou de réprimer les miRs connus pour réprimer *ABCA3* : miR-326, miR-324-3p et miR-508-5p (Ghodousi and Rahgozar 2018; Zamani et al. 2021).

Bien que prédite délétère *in vitro*, l'expression élevée d'ABCA3 n'est pas aujourd'hui consensuellement reconnue comme un facteur de mauvais pronostic dans les LAM (Tableau 9). Steinbach et collègues (Daniel Steinbach et al. 2006) ont été les premiers à identifier un impact pronostique d'ABCA3 dans les LAM : la quantification simultanée de l'expression de 38 gènes ABC a permis d'identifier *ABCA2*, *ABCA3*, *ABCB2* et *ABCC10* comme fortement exprimés dans les échantillons de LAM pédiatriques, avec une expression significativement plus élevée chez les patients réfractaires à l'induction. Dans l'étude de Chapuy et collègues (B Chapuy et al. 2008), un impact péjoratif de l'expression d'ABCA3 sur la SG et la survie sans leucémie (SSL) a été observé. Varatharajan et collègues ont également retrouvé cet impact négatif d'ABCA3 sur la SG bien que moins significatif que pour *ABCB6* et *ABCC3* (Varatharajan et al. 2017). Dans cette étude, il a été noté une expression plus faible d'ABCA3 dans le sous-groupe des patients avec LAM de type CBF. De plus, deux études ont retrouvé une association entre expression élevée de *SALL4* et mauvais pronostic : échec d'induction (Swelem, Elneely, and Shehata 2021) et rechute (Swelem, Elneely, and Shehata 2021; Farawela et al. 2019).

Cependant, trois autres études n'ont pas retrouvé d'impact pronostique d'ABCA3 dans les LAM (Marzac et al. 2011; Bartholomae et al. 2016; (Mohamed et al. 2015). Des différences dans la population étudiée ou dans les techniques peuvent être à l'origine de cette disparité, notamment beaucoup d'étude ont utilisé des sondes TaqMan commerciales ciblant la jonction entre les exons 19 et 20, connue désormais pour être l'objet d'un épissage alternatif dans les LAM (Mohamed et al. 2015).

Etude	Age (nombre de patients)	Résultats	Techniques
(Daniel Steinbach et al. 2006)	Pédiatrie (n=42)	21 patients chimiosensibles et 21 chimiorésistants Expression élevée d' <i>ABCA3</i> chez les patients réfractaires	inconnu
(B Chapuy et al. 2008)	Pédiatrie + adulte (n=119)	Expression élevée d' <i>ABCA3</i> associée à une SG et une SSL réduite	SYBRgreen – amplicon à la jonction exon 11-12
(Marzac et al. 2011)	Adulte (n=51)	31 patients chimiosensibles et 20 chimiorésistants Aucun impact sur le taux d'obtention de RC	TaqMan™ Array Human ABC Transporters – sonde ciblant la jonction exon 19-20
(Bartholomae et al. 2016)	Pédiatrie (n=112)	Aucun impact sur le taux d'obtention de RC ou la SG	TaqMan™ RTqPCR – sonde ciblant la jonction exon 19-20
(Varatharajan et al. 2017)	Adulte + pédiatrie > 16 ans (n=233)	Expression élevée d' <i>ABCA3</i> associée à une SG réduite	TaqMan™ RTqPCR – sonde ciblant la jonction exon 19-20
(Mohamed et al. 2015)	Adulte > 50 ans (n=17)	Pas de différence significative de niveaux d'expression d' <i>ABCA3</i> entre rechute et RC prolongée	Affymetrix-GeneChip Human Exon HTA2

Tableau 9. Impact pronostique de l'expression d'*ABCA3* dans les LAM. RC (rémission complète), RTqPCR (PCR quantitative après reverse transcription), SG (survie globale), SSL (survie sans leucémie).

Dans les LAL, les résultats concordent plus pour confirmer l'impact négatif d'une expression élevée d'*ABCA3*, soit directement (Rahgozar et al. 2014; Aberuyi et al. 2017), soit via une expression élevée de *SALL4* (Ohadi, Rahgozar, and Ghodousi 2020).

L'épissage alternatif d'*ABCA3* n'a cependant été que très peu étudié. Notre équipe a mis en évidence l'exclusion de l'exon 19 comme un événement d'épissage spécifique aux LAM (Mohamed et al. 2015). Cet événement a été identifié en comparant des lignées cellulaires où l'expression de *WT1* était modulée par ARN-interférence : la répression de *WT1* induisant une augmentation du taux d'exclusion de l'exon 19 (Figure 15A). Une tendance identique entre exclusion de l'exon 19 d'*ABCA3* et expression de *WT1* a également été mise en évidence dans des échantillons de patients atteints de LAM (Figure 15B). Cette inactivation de *WT1* ne semble pas avoir d'incidence sur l'expression d'*ABCA3* ni sur la quantité de protéine produite, et n'interfère pas non plus avec les quantités des autres principaux ABC transporteurs (Figure 15C). Exposées à la doxorubicine ou à l'étoposide (Figure 15D), les cellules de la lignée KG1 avec expression de *WT1* diminuée (sh*WT1*), donc avec exclusion plus forte de l'exon 19, présentent un avantage de survie par rapport aux cellules transfectées avec le vecteur vide (PLKO). *In vitro*, des résultats préliminaires nous orientent vers une augmentation des capacités d'efflux d'*ABCA3* en cas de perte de l'exon 19 (Figure 16A et B), possiblement en lien avec une altération de la localisation cellulaire de la protéine (Figure 16C).

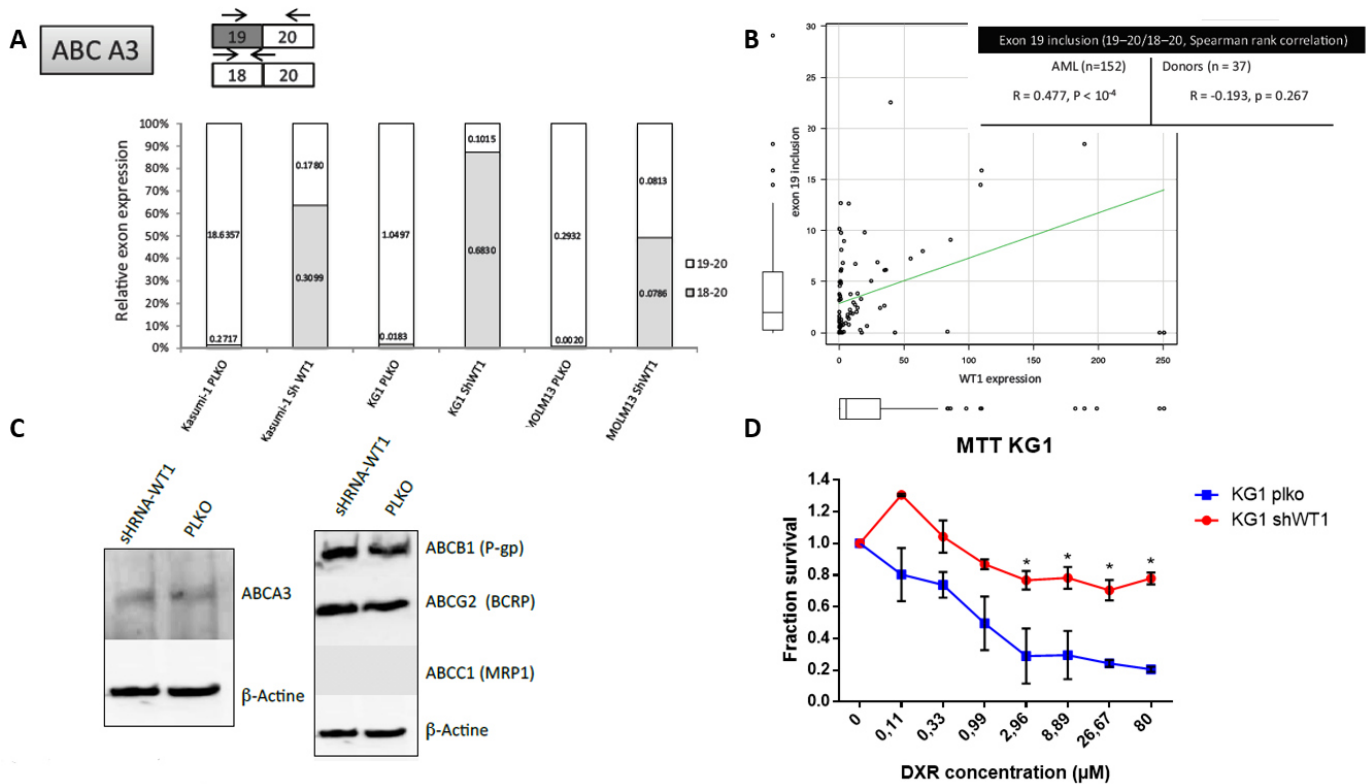


Figure 15. L'exclusion de l'exon 19 est modulable par l'expression de WT1 et induit une résistance à la Doxorubicine. (A) qPCR spécifique de l'exon 19, ratios d'expression des ARN messagers natifs (exon 19 inclus, 19-20) et dépourvus d'exon 19 (18-20) dans 3 lignées cellulaires de LAM (KG1, Kasumi et MOLM13) transfectées par un lentivirus contenant un plasmide avec un shRNA de WT1 (shWT1) ou vide (PLKO). (B) qPCR spécifique de l'exon 19 et de WT1 dans des échantillons de patients atteints de LAM et des donneurs sains. Figures A et B extraites de (Mohamed et al. 2015). Les caractéristiques techniques de la qPCR E19S sont présentées en Annexe 3. (C) Western-blots de lysats cellules KG1 (50 μg de protéines) transfectées avec le plasmide vide (pLKO) ou avec shWT1, avec marquage des protéines ABCA3 (référence ab24751, Abcam, souris), ABCB1, ABCC1 et ABCG2, et β-actine (référence 8H10D10, Cell Signaling, souris) comme référence. Révélation avec anticorps secondaires anti-souris couplé HRP. (D) Tests de survie cellulaires MTT des cellules transfectées en présence de concentrations croissantes de Doxorubicine (DXR), moyenne +/- SEM. Figures C et D extraites de (Mohamed 2015).

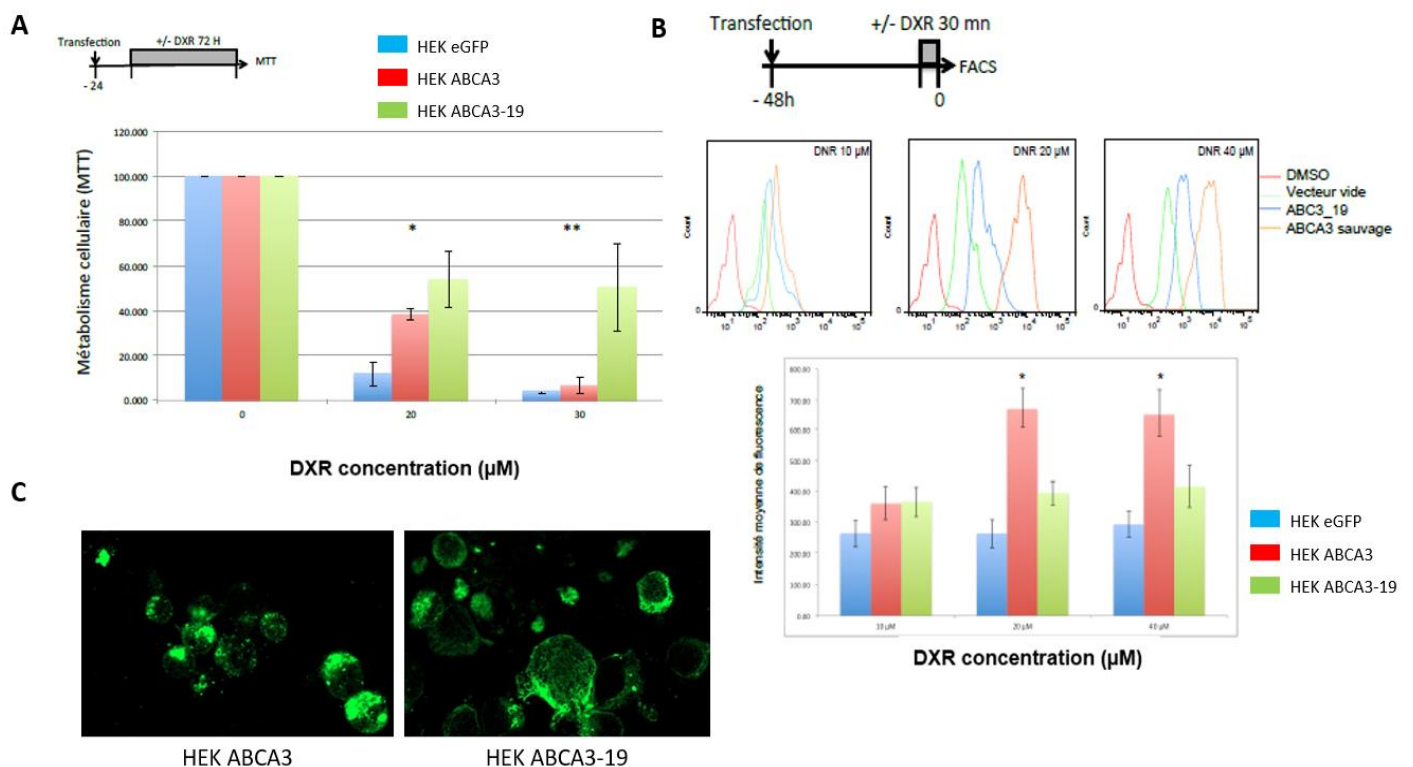


Figure 16. L'exclusion de l'exon 19 augmente les capacités d'efflux de la protéine ABCA3. (A) Survie cellulaire (test MTT) de cellules HEK293T transfectées (cf Article 1) après exposition continue de 72 heures à la doxorubicine (DXR). (B) Exposition brève à la DXR et analyse en cytométrie de flux de la présence intra-cellulaire de DXR. Figures A et B extraites de (Mohamed 2015). (C) Microscopie confocale laser de cellules HEK transfectées, révélation de l'eGFP (Mohamed, non publiée).

Suite à l'identification de l'exclusion de l'exon 19 comme événement associé à la chimiorésistance dans les LAM, notre équipe a étudié l'impact pronostique de cet événement dans deux séries de patients adultes. La première cohorte (discovery) comportait 106 patients avec tout type de LAM non-promyélocytaire et traités par chimiothérapie intensive. Un ratio élevé de transcrit *ABCA3* dépourvu de l'exon 19 était associé à un pronostic défavorable, avec plus de patients réfractaires (70% contre 87%, $p = 0,03$), une tendance à plus de rechutes (73% contre 59%, $p = 0,13$) et des SG et SSE plus faibles (Figure 17A et B). Des résultats similaires ont été obtenus dans la seconde cohorte (validation), comportant 86 patients atteints de LAM à caryotype normal (Figures 17C-D). Les analyses multivariées ont montré que l'exclusion de l'exon 19 d'*ABCA3* était un facteur pronostique indépendant de l'âge, du caryotype et de la présence de mutations de *NPM1* ou *FLT3-ITD*.

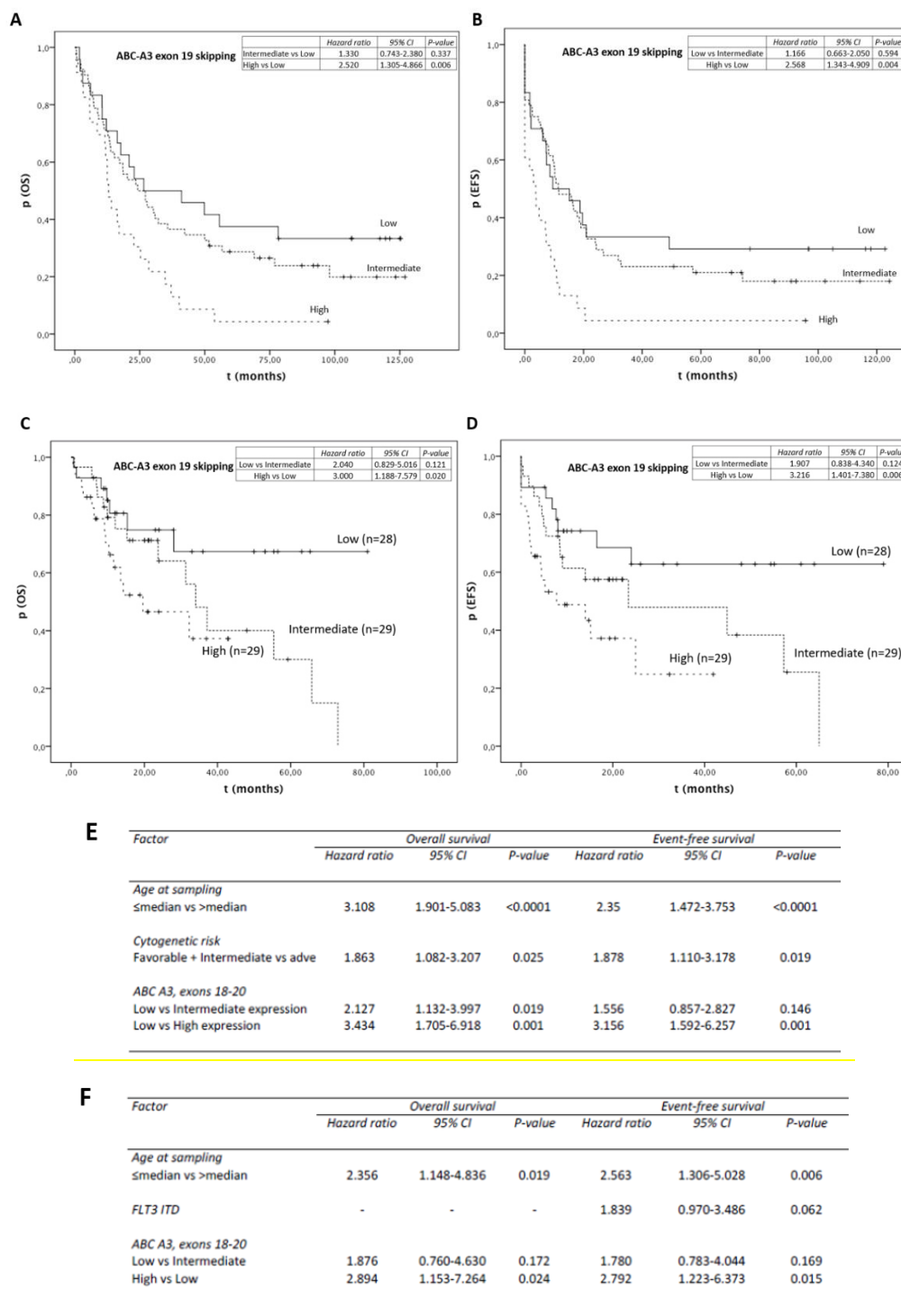


Figure 17. L'exclusion de l'exon 19 est associé à un pronostic défavorable dans les LAM de l'adulte. (A) Survie globale (OS) et (B) survie sans événement (EFS) des patients de la cohorte discovery (n=106) répartis en 3 groupes selon le niveau du ratio de saut de l'exon 19. (C) Survie globale (OS) et (D) survie sans événement (EFS) des patients de la cohorte validation (n=86) répartis en 3 groupes selon le niveau du ratio de saut de l'exon 19. Analyses multivariées réalisées dans la cohorte d'exploration (E) et de validation (F). Figures extraites de (Mohamed 2015).

ABCA3 apparait également comme une cible thérapeutique, dans l'optique de lever la chimiorésistance des CSLs. L'indométhacine est un anti-inflammatoire non-stéroïdien capable d'inhibition allostérique d'ABCA3 (J. H. Song et al. 2008). Une majoration de la cytotoxicité de la cytarabine et des anthracyclines a ainsi pu être démontré *in vitro* dans des lignées de lymphomes B (Koch et al. 2016), de LMC (Hupfeld et al. 2013) et de LAM (J. H. Song et al. 2008). De plus, par son effet pharmacodynamique principal (inhibition des cyclo-oxygénases), l'indométhacine aurait également un intérêt pour limiter l'effet protecteur du micro-environnement médullaire (J. H. Song et al. 2008).

Une autre possibilité serait de limiter les effets de SALL4. Cela est possible en interférant avec des complexes épigénétiques recrutés par SALL4 : l'inhibition de LSD1 dans des cellules de LA promyélocyaires rétablis la sensibilité à l'ATRA en cas de surexpression de *SALL4* (L. Liu et al. 2015) ; un peptide compétitif de l'interaction SALL4-HDAC est capable de lever la répression de PTEN et ainsi de réprimer la voie Akt nécessaire à la survie dans un modèle de LAM (C. Gao et al. 2013). Hormis les inhibiteurs de LSD1, aucun des traitements cités ci-dessus ne fait l'objet actuellement de développement clinique dans les LAM.

OBJECTIFS

Au vu de l'analyse de la littérature, il apparaît que la stratification pronostique dans les LAM, pédiatriques comme adultes, reste à améliorer. Il convient également d'identifier des biomarqueurs prédictifs de réponse aux nouvelles thérapies dans cette pathologie. L'une des pistes de travail est celle des transporteurs ABC parmi lesquels ABCA3 semble être une piste prometteuse car impliquée dans le phénotype de chimiorésistance des cellules souches leucémiques. Cependant, l'impact pronostique de l'expression d'*ABCA3* dans les LAM est débattu. Par ailleurs, notre équipe a mis en évidence dans ce gène un événement d'épissage (exclusion de l'exon 19) associé à une résistance de la cellule leucémique aux chimiothérapies.

Les objectifs de ce travail sont donc :

- D'étudier de manière homogène l'impact pronostique de l'expression d'*ABCA3* dans les LAM adultes et pédiatriques.
- D'étudier l'impact pronostique de l'exclusion de l'exon 19 d'*ABCA3* dans les LAM pédiatriques et de décrypter les mécanismes cellulaires qui sous-tendent l'impact défavorable conféré par le saut de l'exon 19 d'*ABCA3*.
- D'intégrer les données transcriptomiques d'*ABCA3* afin de raffiner la stratification pronostique des LAM.

RESULTATS

PREAMBULE :

Pour répondre à nos objectifs, nous présenterons les résultats de nos travaux en 3 parties :

- Partie 1 : Impact pronostique de l'expression d'ABCA3 dans les LAM de l'adulte et de l'enfant. Cette partie est présentée sous la forme d'un article scientifique en cours de soumission à *Blood Advances*.
- Partie 2 : L'exclusion de l'exon 19 d'ABCA3 module son impact pronostique dans les LAM. Cette partie rapporte les résultats que nous avons obtenu en travaillant sur l'exon 19 d'ABCA3. Une fois le premier article publié, elle fera l'objet d'une soumission d'un article scientifique, combinée aux données obtenues précédemment par notre équipe.
- Partie 3 : Proposition d'un nouveau score transcriptionnel et post-transcriptionnel dans les LAM pédiatriques. Cette partie est présentée sous la forme d'un article scientifique prêt à soumission à *Pediatric Blood and Cancer* et qui sera soumis dès que les 2 précédents articles auront été publiés.

**PARTIE 1 : IMPACT PRONOSTIQUE DE
L'EXPRESSION D'ABCA3 DANS LES LAM
DE L'ADULTE ET DE L'ENFANT.
(ARTICLE 1)**

Dans cet article, accepté pour publication à *Blood Advances* (ADV-2021-006040R1, doi : 10.1182/bloodadvances.2021006040), nous présentons nos résultats de l'étude de l'expression d'*ABCA3* dans 2 cohortes de LAM adultes (213 patients issus de l'essai clinique ALFA0701) et pédiatriques (270 patients issus de l'essai clinique ELAM02). La spécificité de notre approche est d'avoir utilisé un design d'amorces de qPCR prenant en compte les variants d'épissages d'*ABCA3* ainsi qu'une méthode automatisée de choix de valeur-seuil d'expression. Nous avons pu démontrer chez l'enfant un fort impact pronostique défavorable indépendant conféré par une expression élevée d'*ABCA3* au diagnostic de la leucémie. Cet impact semble plus net chez les patients âgés de plus de 2 ans ou de risque pronostique standard. *In vitro*, nous avons montré qu'une expression élevée d'*ABCA3* était corrélée à une moindre sensibilité à la doxorubicine. Chez l'adulte, dans l'ensemble de la cohorte, nous avons observé une tendance à des résultats similaires mais l'analyse stratifiée sur le groupe de traitement randomisé a révélé que cet impact pronostique défavorable conféré par l'expression élevée était limité aux patients ayant reçu le gemtuzumab-ozogamicin.

Prognostic impact of ATP-binding cassette transporter A3 (ABCA3) expression in adult and pediatric Acute Myeloid Leukemia, an ALFA-ELAM02 joint study. [SUBMITTED]

Antony Ceraulo¹, Hélène Lapillone², Claude Preudhomme³, Hervé Dombret⁴, Christine Terré⁵, Juliette Lambert⁶, Guy Leverger⁷, Yves Bertrand¹, Franck Mortreux^{8*} and Eric Wattel^{9*}

¹ Department of Pediatric Oncology and Hematology, Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique (IHOPe), Lyon-France, and University Lyon I, Lyon-France

² Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA and Laboratory of Hematology, AP-HP, Trousseau Hospital, F-75012, Paris, France

³ Department of Biology, Hematology Department, Centre Hospitalier Universitaire de Lille, Lille, France

⁴ Department of Hematology, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Paris, France

⁵ Cytogenetic lab, Centre Hospitalier de Versailles, France

⁶ Department of Hematology, Centre Hospitalier de Versailles, France

⁷ Department of Pediatric Hematology and Oncology, APHP, Trousseau Hospital, GH HUEP, Paris, France

⁸ Laboratory of Biology and Modelling of the Cell, Univ Lyon, ENS de Lyon, Univ Claude Bernard, CNRS UMR 5239, INSERM U1210, Lyon, France.

⁹ Hospices Civils de Lyon, Department of Hematology, Lyon-Sud Hospital, Pierre Bénite, France.

* these authors equally contributed to this work.

Corresponding author: A.C. (antony.ceraulo@lyon.unicancer.fr), F.M. (franck.mortreux@ens-lyon.fr), and E.W. (eric.wattel@chu-lyon.fr)

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) outcomes are poor in both adult and pediatric patients mainly due to high relapse rates. ATP-binding cassette transporter A3 (ABCA3) is a multidrug resistance protein expressed in myeloid progenitors that potentially acts on AML relapse. However, the prognostic impact of *ABCA3* gene expression in adult and pediatric AML is still debated. Here, *ABCA3* expression levels were uniformly investigated in 270 pediatric and 213 adult AML patients at diagnosis using a quantitative real-time-polymerase chain reaction approach that considers all *ABCA3* splice isoforms. Automated gene expression cutoff was used to distinguish high from low *ABCA3* expressers. Pediatric AML patients highly expressing *ABCA3* exhibited reduced complete remission rates (87% versus 98%, Fisher's exact test $P = 0.001$) and worsened outcomes: 5-year overall survival, $65\% \pm 5\%$ versus $81\% \pm 3\%$, and 5-year leukemia-free survival, $50\% \pm 6\%$ versus $67\% \pm 4\%$ (log-rank test, $P = 0.003$ and 0.006 , respectively). In contrast, high *ABCA3* expression had no significant impact on adult AML patients treated with intensive chemotherapy but was associated with adverse prognosis in patients receiving gemtuzumab-ozogamycin: 4-year overall survival, $31\% \pm 5\%$ versus $70\% \pm 9\%$, and 4-year leukemia-free survival, $28\% \pm 6\%$ versus $68\% \pm 9\%$ (log-rank test, $P = 0.004$ and 0.005 , respectively). These data coincided with a negative correlation between *ABCA3* expression and the frequency of CD33+ AML cells. Furthermore, *in vitro* analyses showed that *ABCA3* expression negatively correlates with DNA damage and cell death upon doxorubicin exposure. Overall, these data define *ABCA3* expression as an additional prognostic biomarker to consider for refining risk stratification in pediatric AML and predicting gemtuzumab-ozogamycin sensitivity in adult AML.

INTRODUCTION

Acute myeloid leukemia (AML) is a rare but severe hematological malignancy. Despite improvements in the last decades, the prognosis of AML remains poor, with only 65% of adult AML patients responding to intensive chemotherapy and a 5-year overall survival (OS) rate barely exceeding 35–45%^{1,2}. In contrast, over 90% of children with AML achieve complete remission (CR)^{1–3} and have 5-year OS rates at 70–75% with 50–55% leukemia-free survival (LFS) rates³. Relapse of AML frequently arises from residual leukemic cells with stem cell features⁴, including self-renewal capacity and increased resistance to treatment. Cellular drug resistance partly relies on active transport across cellular membranes undertaken by ATP-binding cassette (ABC) transporter proteins. Of those, the ABCA3 transporter has been found particularly overexpressed in AML cells⁵, especially leukemic progenitors⁶. *ABCA3* expression has been previously shown to counteract the cytotoxicity of anthracyclines, mitoxantrone, etoposide, cytarabine, vincristine, and rituximab^{7–9} by strengthening drug efflux from leukemic cells or sequestering cytostatic drugs to endosomal organelles¹⁰. However, studies having investigated the prognostic impact of *ABCA3* expression in AML have yielded conflicting results. *ABCA3* mRNA levels have been reported to exert unfavorable or neutral effects on outcomes in either adult or pediatric patients^{7,11–13}. The discrepancy in these data may result from methodological differences between studies. Indeed, some real time-quantitative polymerase chain reaction (RTqPCR)-based studies of *ABCA3* transcripts have used oligonucleotides that recognize constitutively expressed exons while others used TaqMan probes spanning exon junction 19–20^{12,13}, which was recently demonstrated as a target for aberrant alternative splicing in AML¹⁴. Furthermore, the gene expression cutoff value used to discriminate high to low *ABCA3* expressing patients has more often been empirically estimated, and the sample size of patient groups is frequently small, thereby precluding the use of multivariate analyses. Altogether, these results prompted us to design a new RT-qPCR approach to uniformly investigate the prognostic impact of *ABCA3* expression at diagnosis in large cohorts of adult and pediatric AML patients.

PATIENTS & METHODS

Patients

The ELAM02 trial¹⁵ (NCT00149162) included 438 patients under 18 years with *de novo* non-promyelocytic AML and without Down syndrome; 270 diagnostic samples were obtained. RT-qPCR experiments were initially performed on a randomly selected group of 120 samples (exploratory set), and the 150 additional samples were used as an internal confirmatory set. Regarding adult AML, 213 diagnostic samples were obtained from patients enrolled in the French clinical trial ALFA0701¹⁶ (NCT00927498) which included 280 patients with *de novo* AML between the ages of 50 and 70 treated with intensive chemotherapy (3+7 backbone) and randomized (1:1) for receiving gemtuzumab-ozogamycin (GO) during induction and two consolidation courses. For each sample, total RNA was extracted using TRIzol[®] LS Reagent (Ambion[®] by Life Technologies[™]) and underwent reverse transcription using the iScript[™] cDNA Synthesis kit (Bio-Rad[®]) according to the manufacturer's instructions. Diagnostic and survival data were extracted from trial databases. All parents and patients included in the study gave signed informed consent for ancillary studies, according to the declaration of Helsinki. This research was approved by an independent ethics committee. All authors had access to the primary clinical and biological data.

RT-qPCR

Gene sequences were extracted from the FasterDB[®] database (<https://fasterdb.lyon.unicancer.fr/faster/home.pl>). Known splice variants were considered for primer design (Supplementary Figure 1) using Primer3web 4.0.0 software (www.bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/). Primers were manufactured by Eurogentec[®] and delivered as 100-μM water solutions. iQ[™] SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad) was used for real-time quantification of amplicons according to the manufacturer's instructions. Cycling reactions were performed with a C1000 Touch[™] Thermal Cycler (Bio-Rad) and fluorescence signals measured with a CFX96[®] Real-Time System (Bio-Rad). Data were processed with CFX Manager[™] software v3.1 (Bio-Rad). Relative quantification of each target was performed according to the method described by Pfaffl¹⁷, using *GUS* and *ABL1* as references¹⁸. RT-qPCR data were expressed in arbitrary units (a.u.) and compared to that derived from the cell line

KG1¹⁹. Data were then processed for statistical analyses. Primers sequences and PCR cycling conditions are available in Supplemental Table 1.

Cell lines

Both HEK293T and near-haploid leukemic HAP1 cells were used for assessing the relationship between *ABCA3* expression and the cellular response to drug exposure. Knockout of *ABCA3* expression was carried out by CRISPR-Cas9-induced indels in HAP1 cells (product ID HZGHC006065c005, validated with PCR and Sanger sequencing by Horizon DiscoveryTM; Supplementary Figure 2). HAP1 wild-type (HAP1wt) and HAP1 with knockout of *ABCA3* (HAP1ko) cells were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Gibco[®] by Life TechnologiesTM) containing 10% heat-inactivated bovine fetal serum (Sigma-Aldrich). HEK293T cells used in transient transfection assays were cultured in 1X Dulbecco's Modified Eagle's high glucose Medium (Gibco[®] by Life TechnologiesTM) containing 10% bovine fetal serum. Both HAP1 and HEK293T cell cultures were supplemented with 100 UI/mL penicillin, 100 UI/mL streptomycin, 0.125 µg/mL amphotericin B, and 2 mM L-glutamine (Gibco[®] by Life TechnologiesTM). Cell dissociation was performed using 0.05% trypsin in EDTA (Gibco[®] by Life TechnologiesTM).

Transient transfection

HEK293T cells were transfected with the plasmids pEGFP-N3 (pEGFP, green fluorescent protein) and pEGFP-N3-ABCA3 full length (pABCA3-EGFP). Briefly, the coding sequence of human *ABCA3* (NM_001089.2) was synthesized by Genewiz[®] and inserted into the pEGFP-N3 vector digested by the restriction enzymes *EcoRI* and *XhoI* (Supplementary Figure 3). Both plasmids were amplified in *Escherichia coli* and extracted using the Plasmid Maxi prep kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The JetPrimeTM kit (Polypus-Transfection[®]) was used as a transfecting agent according to the manufacturer's instructions. Briefly, 3×10^5 cells/well were plated in a 6-well plate with 2 mL of culture medium. The transfection was performed 24-hafter plating, with 1 µg of plasmid per mL of medium, twice that volume of JetPrimeTM reagent, and 200 µL of JetPrimeTM buffer per well. Transfection efficiency was estimated at 70–80% using GFP as a reporter gene.

Cell viability

The viability of HAP1 and HEK293T cells was assessed using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) based Cell Growth Determination kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Cells were harvested after 48-h exposure to various concentrations of doxorubicin (DXR; Sigma-Aldrich) or phosphate-buffered saline as a negative control. Optical densities at 570 nm (formazan) and 690 nm (background) were measured on a Multiskan Spectrum™ (Thermo Scientific, Electron Corporation). Data were processed with SkanIT MSS v2.2 software (Thermo Scientific). Background absorbance was subtracted from the 570 nm absorbance, and the resulting value for each sample was divided by the respective value of the untreated sample, yielding an estimated percentage of living cells. All experiments were performed twice in triplicate.

Cellular uptake of DXR and DNA damage

HAP1wt and HAP1ko cells were incubated for 6-h with DXR for cell uptake and DNA damage assessment using fluorescence activated cell sorting. Cells were harvested, fixed, and permeabilized (BD Cytofix/Cytoperm™ kit, BD Biosciences) after 48-h exposure to DXR or phosphate-buffered saline and incubated overnight with primary anti-phospho-gammaH2AX antibody (Ser139; Cell Signaling Technology). Cells were next incubated with a secondary anti-rabbit APC-linked antibody (Cell Signaling Technology) and finally with DAPI (ThermoFisher). Fluorescence was acquired on a LSRII cytometer (BD Biosciences) piloted with FACSDiva v.6.1.2 (BD Biosciences). Data were analyzed using FlowJo vX.0.7 (BD Biosciences).

Statistics

OS was defined as the time period from diagnosis to death from any cause. Event-free survival (EFS) was defined as the time period from diagnosis to treatment failure, relapse, or death. LFS was defined as the time period from achievement of CR to the date of relapse or death. Patients who remained alive were censored at the last follow-up visit. Patients receiving hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) were not censored at the time of transplantation. Associations between categorical variables were analyzed using Fisher's exact test. Central tendency differences between groups were compared using a two-sample Student's *t*-test or Mann–Whitney test if the distribution of values was not normal. For categorical and survival analyses,

RT-qPCR values were dichotomized using the best cutoff value determined using the free software Cutoff Finder (<http://molpath.charite.de/cutoff/>)²⁰. Survival rates were calculated using the Kaplan–Meier method. Log-rank tests were used to compare survival rates between groups. To identify independent prognostic factors, multivariate analyses were performed using a Cox proportional hazards model. A stepwise backward procedure was used with a threshold significance level of $P \leq 0.10$ to select factors in the model. All tests were two-sided. The final type I error rate was fixed at 0.05 to identify factors associated with “time-to-event” outcomes. All statistical analyses were performed using SPSS for Windows version 27.0 (IBM Corp.) and GraphPad Prism for Windows version 6.00 (GraphPad Software).

RESULTS

Prognostic impact of ABCA3 expression at diagnosis in pediatric AML

Diagnostic RNA samples from 270 patients were referenced here as the entire pediatric dataset, which was representative of the entire trial cohort (Supplemental Table 2). A total of 120 patients were randomly selected to create an exploratory set, and the remaining 150 were used for internal validation. The two cohorts were similar in criteria except for an excess of core binding factor-AML in the validation set (Supplemental Table 3). Quantification of *ABCA3* expression was carried out by RT-qPCR targeting constitutive exons 6 and 7, which are shared by all *ABCA3* alternative splice isoforms (Supplementary Figure 1). Cutoff Finder software was used to distinguish high and low *ABCA3* expressers. In the exploratory set, a cutoff value of 1.20 a.u. defined a group of patients ($n = 44/120$) with high *ABCA3* expression that displayed worse outcomes in terms of OS, LFS (Figures 1A and B), and EFS (Supplemental Figure 4). Similar results were obtained with the validation cohort (Figures 1C and D) but with no statistical significance. This may derive from a lower number of standard-risk patients (Supplemental Table 3) in the exploratory set (29 [24%]) than in the validation set (64 [44%]). Nevertheless, patients with high *ABCA3* expression ($n = 98/270$, 36%, mean = 3.21 a.u., median = 2.19 a.u., standard deviation = 2.62 a.u.) displayed significantly reduced OS (Figure 1E) and LFS (Figure 1F). Multivariate analyses of pediatric samples (Table 1) revealed a prognostic impact of *ABCA3* expression, along with risk stratification, age, and white blood cells at diagnosis.

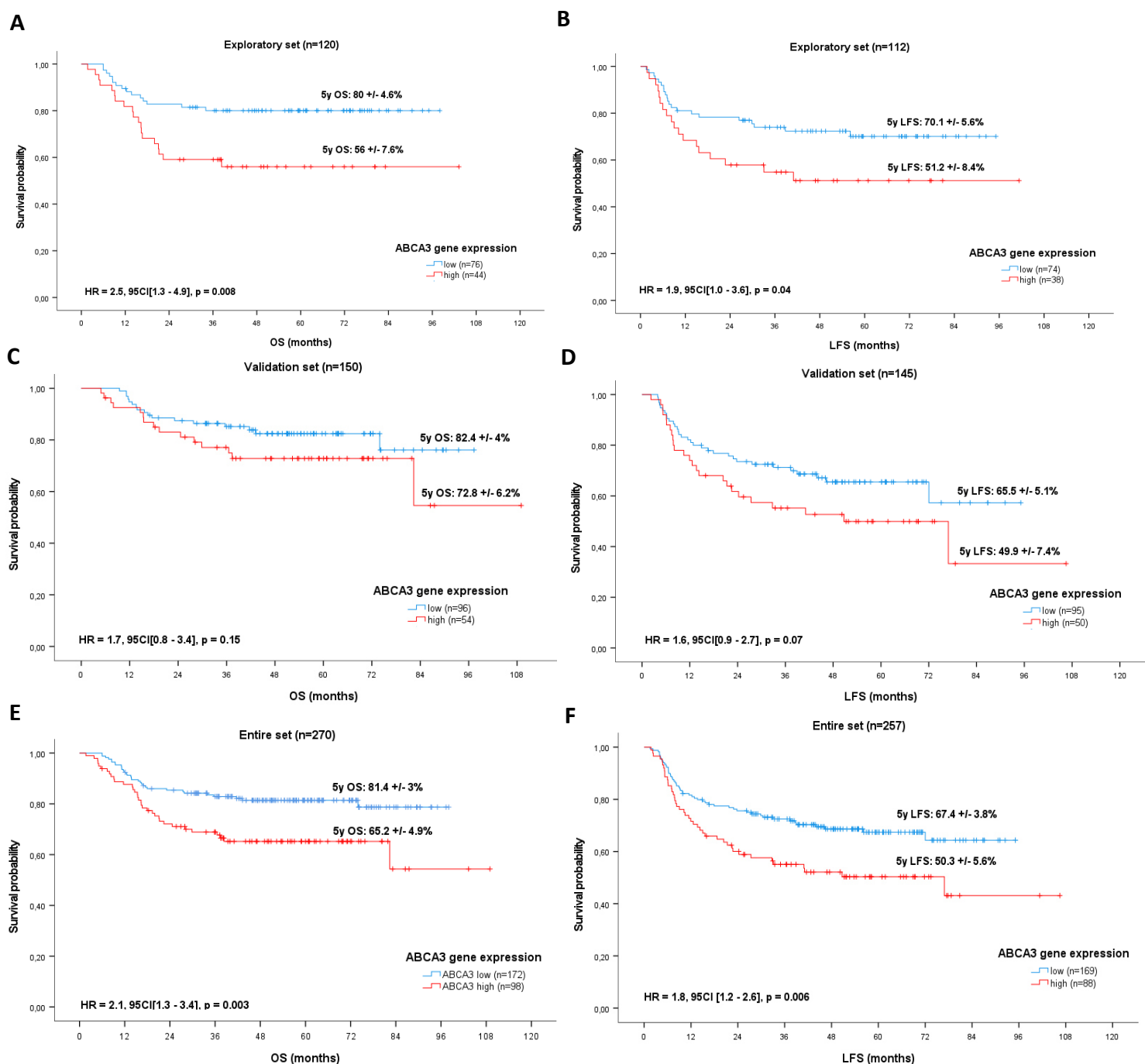


Figure 1. Survival impact of *ABCA3* expression in pediatric AML. Kaplan-Meier curves of overall survival [OS] (a, c, e) and leukemia-free survival [LFS] (b, d, f) in exploratory (a–b), validation (c–d), and overall sets of patients (e–f). Patients with high (red curves) and low (blue curves) *ABCA3* expression were separated with the best determined cutoff value of 1.20 a.u. Hazard ratios (HR) were computed with 95% confidence intervals (95CI).

	Overall Survival			Event-Free Survival			Leukemia-Free Survival		
	HR	95CI	p	HR	95CI	p	HR	95CI	p
ABCA3 gene expression (> 1.20 au)	1.93	1.18 - 3.14	0.009	1.92	1.31 - 2.82	<0.001	1.81	1.21 - 2.71	0.004
Riskgroup	1.62	1.12 - 2.36	0.011	1.32	0.98 - 1.76	0.06	-	-	NS
Age (> 6 yo)	2.27	1.25 - 4.13	0.007	2.04	1.30 - 3.22	0.002	1.99	1.24 - 3.22	0.005
Leukocytes (> 30 G/L)	2.02	1.24 - 3.29	0.005	1.78	1.22 - 2.60	0.003	1.53	1.02 - 2.29	0.041

Table 1. Multivariate analyses in the pediatric dataset. Cox proportional hazard models factoring variables with a $P \leq 0.10$ in univariate analyses. *a.u.* (arbitrary units), *HR* (hazard ratio), *CI95* (95% confidence interval).

No differences were noticed between high and low *ABCA3* expressers in main clinical and biological characteristics. In contrast, significantly worsened outcomes (lower CR rates, higher relapse rates, and lower survival) were evidenced in the high expresser group (Table 2) that could not be attributed to differences in HSCT rates, a potentially confounding factor. Subgroup analysis based on age at diagnosis uncovered that *ABCA3* expression had a negative impact on OS rate in patients older than 2 years-old. This was not the case for the youngest patients (<2 years) who globally displayed better outcomes (Supplementary Figure 5). According to the risk stratification used in the ELAM02 trial, *ABCA3* expression had a negative impact in standard-, intermediate-, and high-risk patients, reaching statistical significance in standard-risk patients (Supplementary Figure 6). Similar results were noticed when censoring patients receiving HSCT at the date of transplantation (Supplementary Figure 7).

ELAM02	High <i>ABCA3</i> expression (N=98)	Low <i>ABCA3</i> expression (N=172)	p-value
Clinical features			
Median age (years), range	10 [0.16 - 17.2]	9.65 [0.24 - 17.9]	0.56
M/F ratio	1.33	1.23	0.80
Median WBC (G/L), range	15 [1.8 - 514]	17 [1.2 - 575]	0.90
Median medullar blast percentage	74% [1 - 99]	65% [9 - 98]	0.20
CNS involvement	15 (15%)	29 (17%)	0.86
Cytogenetics			
Normal karyotype	28 (29%)	48 (28%)	1.00
CBF-AML	21 (21%)	53 (31%)	0.12
<i>KMT2A</i> rearranged-AML	23 (23%)	30 (17%)	0.27
Anomalies moléculaires			
<i>FLT3</i> -ITD	11 (11%)	19 (11%)	1.00
<i>NPM1</i> muté	6 (6%)	16 (9%)	0.49
<i>CEBPA</i> double-mutation	1 (1%)	5 (3%)	0.42
Risk stratification			
Standard risk	23 (24%)	55 (32%)	0.10
Intermediate risk	55 (56%)	88 (51%)	0.05
High risk	20 (20%)	29 (17%)	0.45
Results			
CR	85 (87%)	168 (98%)	0.001
Relapse	42/85 (49%)	50/168 (30%)	0.004
HSCT	27 (28%)	52 (30%)	0.68
5-years OS $\pm$ SE	65.2% $\pm$ 4.9%	84.3% $\pm$ 3%	0.003
5-years LFS $\pm$ SE	50.3% $\pm$ 5.6%	67.4% $\pm$ 3.8%	0.005

Table 2. Main clinical and biological features between patients with high ($n = 98$) and low ($n = 172$) *ABCA3* expression in the entire patient set. Fisher's exact tests were used for comparing categorical variables, Mann-Whitney tests for numerical variables, and log-rank tests for survival variables. *M* (male), *F* (female), *WBC* (white blood cells), *Min* (minimum), *Max* (maximum), *CNS* (central nervous system), *AML* (acute myeloid leukemia), *CBF* (core binding factor), *ITD* (internal-tandem duplication), *CR* (complete remission rate), *HSCT* (hematopoietic stem cell transplant), *OS* (overall survival), *LFS* (leukemia-free survival), *SE* (standard error).

Prognostic impact of ABCA3 expression at diagnosis in adult AML

ABCA3 expression was assessed as described above with total RNA derived from 213 samples of adult AML patients at diagnosis. The cutoff value of *ABCA3* expression was similar to that of pediatric AML (1.20 a.u.). However, the frequency of AML with high *ABCA3* expression was higher ($n = 173$, 81%) in adult than in pediatric cohorts ($n = 98$, 36%) and had an adverse prognostic impact on OS and LFS of all tested adult patients (Figures 2A and B). Such prognostic impact did not pertain to the chemotherapy group (Figures 2C and D) but was exclusive to patients receiving GO (Figures 2E and F). Results were similar for EFS (Supplementary Figure 8). CR rates were not affected by the *ABCA3* expression level. In multivariate analyses of all samples, high *ABCA3* expression retained its prognostic impact on EFS and LFS but not for OS (Table 3). Subgroup analyses based on risk stratification revealed that high *ABCA3* expression had a negative impact on LFS in standard-risk and GO-treated patients. However, in the latter case, this correlation did not reach statistical significance likely due to the limited number of patients (Supplemental Figure 9). Similar results were obtained when censoring patients receiving HSCT at the date of transplantation (Supplementary Figure 10).

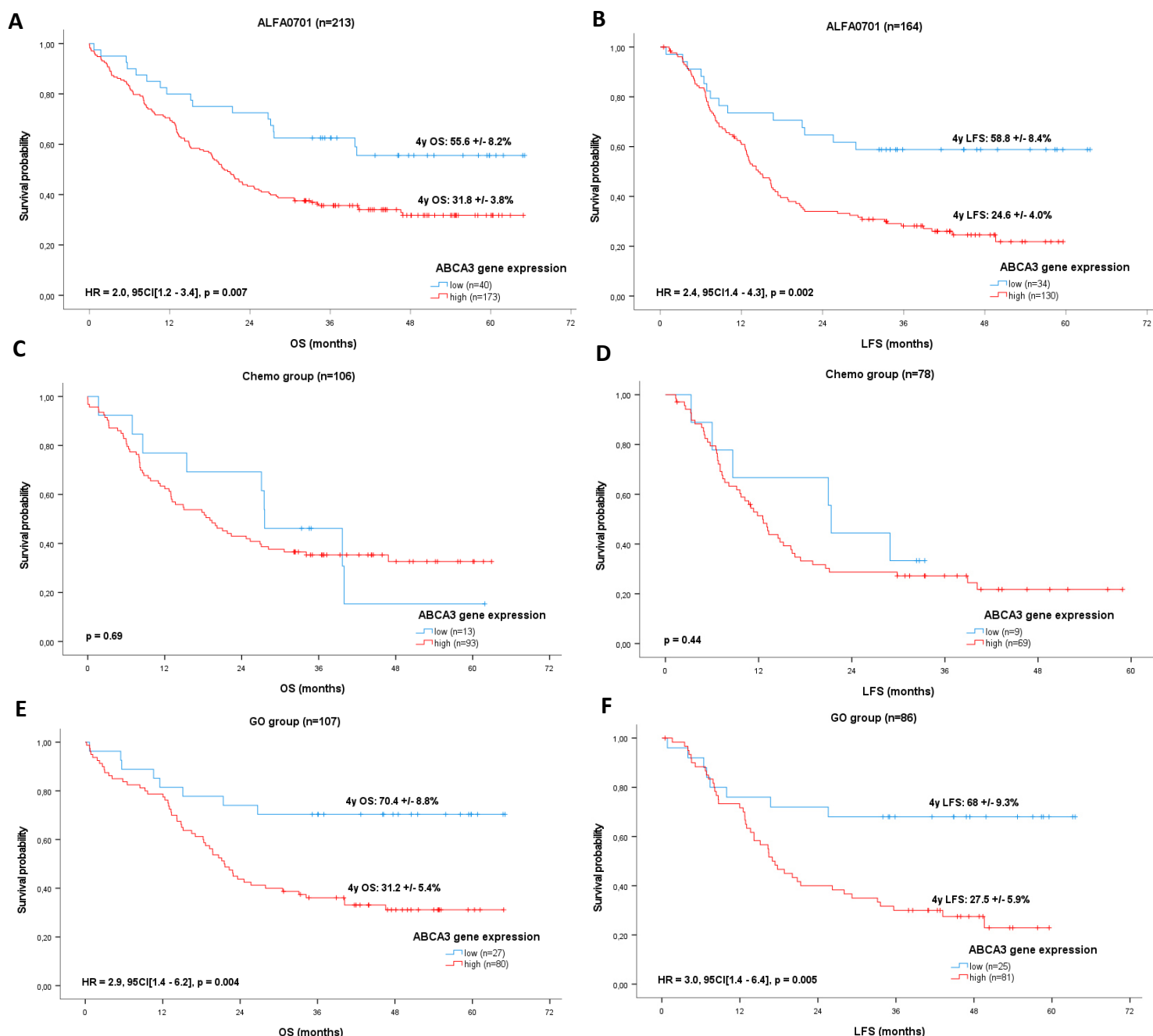


Figure 2. Survival impact of *ABCA3* expression in adult AML. Kaplan-Meier curves of overall survival [OS] (a, c, e) and leukemia-free survival [LFS] (b, d, f) in the entire ALFA0701 cohort (a–b), chemotherapy only group (c–d), and gemtuzumab-ozogamycin (GO) group (e–f). Patients with high (red curves) and low (blue curves) *ABCA3* expression were separated with the best determined cutoff value of 1.20 a.u. Hazard ratios (HR) were computed with 95% confidence intervals (95CI).

	Overall Survival				Event-Free Survival				Leukemia-Free Survival		
	HR	95CI	p		HR	95CI	p		HR	95CI	p
ABCA3 gene expression (> 1.20 au)	1.7	0.7 - 4.0	0.20		2.6	1.3 - 6.5	0.01		2.6	1.1 - 5.9	0.03
CD33 expression (>90% blasts +)	0.5	0.3 - 1.0	0.04		0.6	0.3 - 0.9	0.03		0.5	0.3 - 1.0	0.05
Normal karyotype	-	-	NS		0.6	0.4 - 1.0	0.06		-	-	NS
ELN risk stratification	2.2	1.3 - 3.5	0.002		-	-	NS		-	-	NS

Table 3. Multivariate analyses in the adult dataset. Cox proportional hazard models factoring variables with a $P \leq 0.10$ in univariate analyses. *a.u.* (arbitrary units), *HR* (hazard ratio), *CC95* (95% confidence interval).

ABCA3 leads to resistance to anthracyclines and GO

To assess the impact of *ABCA3* expression on cell viability upon anthracycline exposure, MTT assays with HEK293T cells overexpressing or not an ectopic *ABCA3* and exposed to increasing concentrations of DXR were carried out. Figure 3A shows that *ABCA3* overexpressing cells were less sensitive to DXR-induced cell death than control cells receiving an empty vector or a vector expressing eGFP. To eliminate nonspecific effects that could arise from the protein overexpression system and HEK293 phenotype, MTT experiments were repeated with HAP1wt and HAP1ko cells, which were knocked out for *ABCA3* by a CRISPR-Cas9 approach. No change in cell viability was noticed between parental and HAP1ko cells under normal growth conditions (data not shown). In contrast, DXR-exposed parental cells displayed a survival advantage compared to their counterpart HAP1ko cells (Figure 3B). This coincided with a lower cellular uptake of DXR (Figure 3C) as well as a lower number of phospho-H2AX positive cells than that exhibited by HAP1ko cells (Figure 3D). Due to the lack of CD33 expression in both HAP1 and HEK293T cells, the impact of GO exposure was not investigated *in vitro*. However, while no correlation was found between the expression levels of *ABCA3* and *CD33* in ALFA0701 samples (Figure 3E), the frequency of AML cells expressing CD33 at the cell membrane level was negatively correlated with *ABCA3* expression, suggesting that *ABCA3* might affect cell response to GO (Figure 3F).

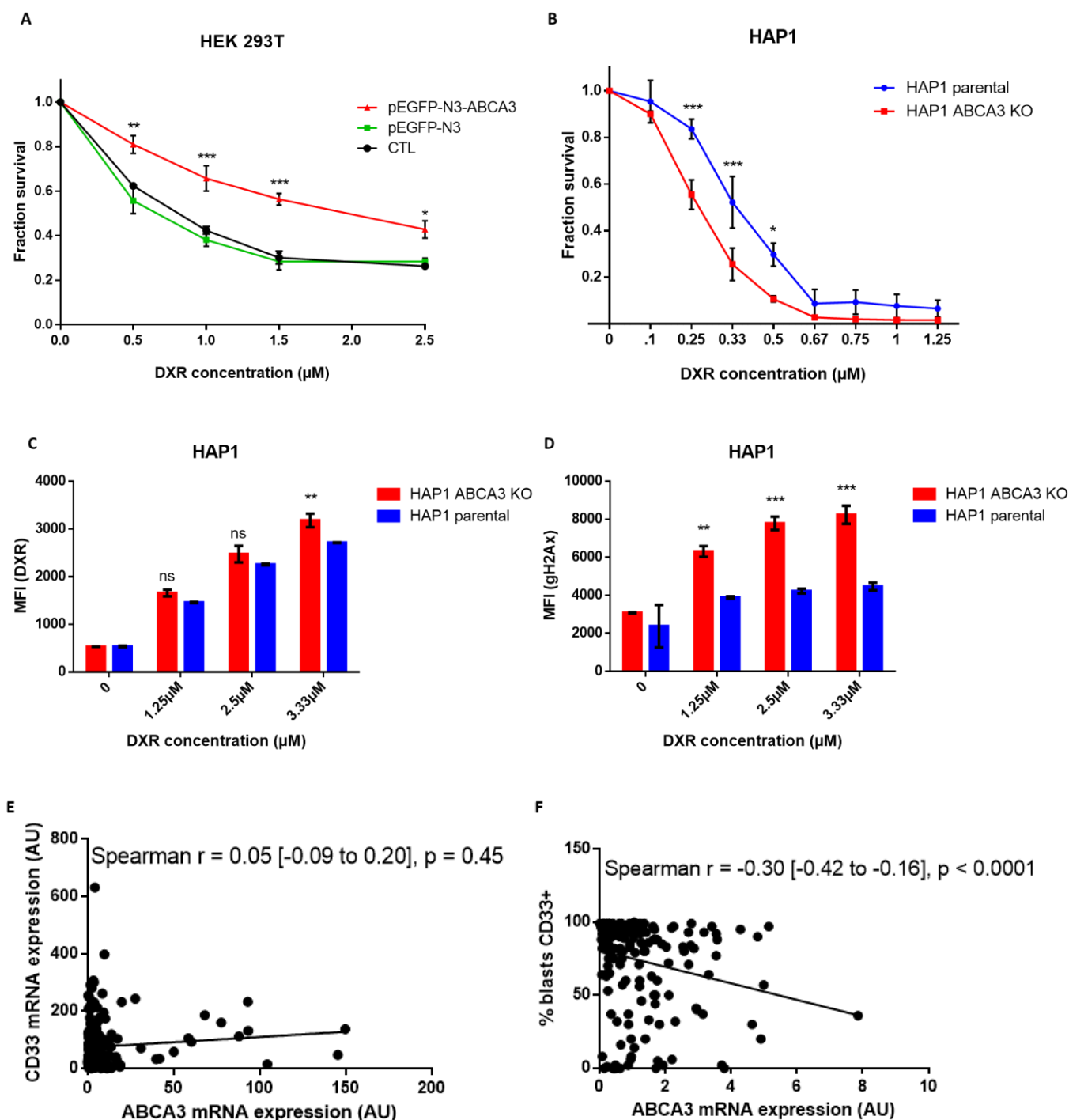


Figure 3. ABCA3 leads to resistance to doxorubicin (DXR) and gemtuzumab-ozogamycin (GO) in myeloid cells. MTT assays determining survival proportions of HAP1 (a) and HEK293T (b) cells after a 48-h incubation with increasing DXR concentrations. Flow cytometry analyses (MFI, mean fluorescence intensity) measured 6 h after incubation with increasing DXR concentrations and evaluating DXR uptake (c) and DNA double-strand break amounts with gammaH2Ax staining (d). In ALFA0701 patients treated with GO, comparisons between *ABCA3* mRNA expression with CD33 expression on blasts surface (e) and *CD33* mRNA expression (f).

DISCUSSION

The present study examined the prognostic impact of *ABCA3* expression in two large cohorts of adult ($n = 213$) and pediatric ($n = 270$) AML patients at diagnosis using a unique RT-qPCR approach that targets constitutive exons 6 and 7, which are shared by all *ABCA3* transcripts, coupled with an automated gene expression cutoff that distinguished high from low *ABCA3* expressers. The results show that pediatric but not adult AML with high *ABCA3* expression levels correlate with worsened outcomes upon intensive chemotherapy, impacting mainly standard-risk patients. However, adult AML with high *ABCA3* expression levels showed a worsened response to GO. These results are consistent with *in vitro* experiments showing that *ABCA3* expression confers reduced rates of drug uptake, genomic instability, and cell death of myeloid cells exposed to anthracyclines.

In pediatric AML, the current results show that *ABCA3* expression may improve risk stratification at diagnosis. We identified that patients highly expressing *ABCA3* had reduced CR rates, which is consistent with previous studies in smaller patient cohorts^{11,21}. High *ABCA3* expressers also displayed reduced survival rates and more relapses, which is consistent with published data by Chapuy *et al.*⁷ in a cohort of 119 patients comprised of 81 children. In contrast, *ABCC3* and *ABCG2* but not *ABCA3* expression was linked to prognosis of AML in a study by Bartholomae and colleagues in a 112 pediatric AML cohort¹². This discrepancy may stem from different designs of primers used in RT-qPCR assays, some targeting alternative exons, such as E12 and E19, that could be alternatively spliced in AML samples^{7,12,14} and may underestimate the whole gene expression level of *ABCA3*. The prognostic impact of *ABCA3* expression in pediatric AML did not reach statistical significance in the validation set. However, this is likely due to the higher number of standard-risk patients (with a better survival rate) in the validation set than in the exploration cohort. Additional patients are needed to confirm these results. Furthermore, subgroup analyses indicate that prognostic use of *ABCA3* is particularly relevant in older and standard-risk patients. Taken together, the current data suggest that *ABCA3* expression at diagnosis could be added to current pediatric risk stratification strategies to better assign treatment.

In contrast, no prognostic impact of *ABCA3* expression was evidenced in adult AML treated with intensive chemotherapy. These results are in line with previous studies published by our team¹⁴ and others¹³. However, *ABCA3* expression appears to be predictive of GO response. To

our knowledge, this is the first data reporting a role of *ABCA3* in GO resistance. These results deserve confirmation in larger cohorts of adult and pediatric patients treated with GO.

At the molecular level, the transport protein *ABCA3* has been involved in resistance to anthracyclines through lysosomal sequestration and enhanced cellular efflux of drugs⁷. In line with this, the present data shows that Cas9-mediated knockout of *ABCA3* expression leads to decreased DXR output, increased DNA damage, and reduced survival, thereby explaining why low *ABCA3* expressers display improved responses to treatment. In addition, we evidenced a negative correlation between *ABCA3* expression and the frequency of blast expressing CD33, the target of the immunotoxin GO. As already described for rituximab resistance in B-cell lymphoma¹⁰, the role of *ABCA3* in the humoral evasion of AML cells through extravesicular sequestration of the CD33 antibody remains to be investigated.

In summary, the current data show that *ABCA3* expression has a prognostic impact on pediatric AML and helps to predict response to GO in adult AML. This prognostic impact may improve current risk stratification of AML patients and help predict which patients could benefit from GO therapy. Moreover, if *ABCA3* is indeed overexpressed in leukemic stem cells⁶, correlation of its expression with “stemness signatures,” such as LSC17²², would be critical in determining if it only recaps the negative prognostic impact of a high “stemness burden” at diagnosis or if *ABCA3* could be an independent stemness prognostic factor and that targeting *ABCA3* might be a strategy to sensitize leukemic stem cells to treatment.

Acknowledgments: The authors gratefully thank patient and family associations (APPEL, ARCHE) for funding PCR supplies; the patients and their families who participated in the ELAM02 and the ALFA0701 trials. We also thank Pr. Raphael Itzykson, MD, PhD, for reviewing the manuscript. A.C was supported by ARC (Association de Lutte pour la Recherche Contre le Cancer); F.M. was supported by INSERM. E.W. was supported by Hospices Civils de Lyon and Lyon I University (France).

Conflict of interest: Authors declare there are no conflicts of interest.

Authorship statement: Conceptualization, A.C., F.M., and E.W.; Resources, H.L., C.P., C.T., G.L., H.D., Y.B., and E.W.; Experiments, A.C. and H.L.; Supervision, F.M. and E.W.; Writing – Original Draft, A.C and F.M; Writing – Review and Editing, A.C., H.L., C.P., H.D, C.T, J.L., G.L., Y.B., F.M., and E.W.

REFERENCES:

1. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2015;373(12):1136–52.
2. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2021 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2020;95(11):1368–1398.
3. Creutzig U, Kutny MA, Barr R, Schlenk RF, Ribeiro RC. Acute myelogenous leukemia in adolescents and young adults. *Pediatr Blood Cancer*;65(9).
4. Shlush LI, Mitchell A, Heisler L, et al. Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature* 2017;547(7661):104–108.
5. Wulf GG, Modlich S, Inagaki N, et al. ABC transporter ABCA3 is expressed in acute myeloid leukemia blast cells and participates in vesicular transport. *Haematologica* 2004;89(11):1395–1397.
6. Norwood K, Wang RY, Hirschmann-Jax C, et al. An in vivo propagated human acute myeloid leukemia expressing ABCA3. *Leuk Res* 2004;28(3):295–299.
7. Chapuy B, Koch R, Radunski U, et al. Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration. *Leukemia*, UK 2008;22(May):1576–1586.
8. Chapuy B, Panse M, Radunski U, et al. ABC transporter A3 facilitates lysosomal sequestration of imatinib and modulates susceptibility of chronic myeloid leukemia cell lines to this drug. *Haematologica* 2009;94(11):1528–1536.
9. Hupfeld T, Chapuy B, Schrader V, et al. Tyrosinekinase inhibition facilitates cooperation of transcription factor SALL4 and ABC transporter A3 towards intrinsic CML cell drug resistance. *Br J Haematol* 2013;161(2):204–213.
10. Aung T, Chapuy B, Vogel D, et al. Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(37):15336–15341.
11. Steinbach D, Gillet J, Sauerbrey A, et al. Cancer Therapy: Preclinical ABCA3 as a Possible Cause of Drug Resistance in Childhood Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 2006;12(14):4357–4364.
12. Bartholomae S, Gruhn B, Debatin K-M, et al. Coexpression of Multiple ABC-Transporters is Strongly Associated with Treatment Response in Childhood Acute Myeloid Leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2016;63:242–247.
13. Marzac C, Garrido E, Tang R, et al. ATP Binding Cassette transporters associated with chemoresistance: Transcriptional profiling in extreme cohorts and their prognostic impact in a cohort of 281 acute myeloid leukemia patients. *Haematologica* 2011;96(9):1293–1301.
14. Mohamed AM, Balsat M, Thenoz M, et al. Oncogene- and drug resistance-associated alternative exon usage in acute myeloid leukemia (AML). *Oncotarget* 2015;7(3):2889–2909.

15. A. P, S. D, T. L, et al. Relevance of a one-year maintenance therapy with interleukin-2 in the treatment of childhood acute myeloid leukemia: Results from the French multicenter, phase III, randomized controlled SFCE trial, ELAM02. *Blood* 2014;124(21):1–6.
16. Lambert J, Pautas C, Terré C, et al. Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia: Final efficacy and safety updates from the open-label, phase III ALFA-0701 trial. *Haematologica* 2019;104(1):113–119.
17. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29(9):16–21.
18. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* 2009;55(4):611–622.
19. Koefler HP, Golde DW. Acute myelogenous leukemia: A human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science* (80-) 1978;200(4346):1153–1154.
20. Budczies J, Klauschen F, Sinn B V., et al. Cutoff Finder: A Comprehensive and Straightforward Web Application Enabling Rapid Biomarker Cutoff Optimization. *PLoS One* 2012;7(12):1–7.
21. Shen Q, Liu S, Hu J, et al. The differential expression pattern of the BMI-1, SALL4 and ABCA3 genes in myeloid leukemia. *Cancer Cell Int* 2012;121–9.
22. Ng SWK, Mitchell A, Kennedy JA, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature* 2016;540(7633):433–437.

SUPPLEMENTARY DATA:

Gene (Ensembl reference)	Forward primer sequence (5' to 3')	Forward primer T _m	Reverse primer sequence (5' to 3')	Reverse primer T _m	Amplicon (length, T _m)	Elongation temperature	Regression curve equation	R ² coefficient	Efficiency
<i>GUSb</i> ENSG00000169919	GCCTGGGTTTTGTGGTCATCT ATTC	52.6°C	CAGTAGCCACTTTCATGCCA ACTC	52.3°C	101 bp, 77°C	52°C	y = -3.609x + 23.007	0.991	89.3%
<i>ABL1</i> ENSG00000097007	TGGTAGGGGAGAACCACTTG	62°C	GGTAGCAATTTCCCAAAGCA	58°C	194 bp, 85.5°C	61°C	y = -3.288x + 22.567	0.985	101.4%
<i>ABCA3</i> ENSG00000167972	CCTTCAACCACAGCAAGGAG	58.8°C	TTGGGAAAAGCGGGAAAAG G	59°C	156 bp, 83.5°C	62°C	y = -3.322x + 27.924	0.992	103.2%

Supplementary Table 1. qPCR experiments characteristics. *T_m*, melting temperature

	ELAM02 cohort (N=438)	Overall study cohort (N=270)	p-value
Clinical features			
Median age in years [Min-Max]	8.2 [0 – 18.6]	9.8 [0.16 – 17.9]	0.09
M/F ratio	1.19	1.27	0.70
Median WBC [Min-Max] (G/L)	15.4 [0.40 - 575]	16.1 [1.2 - 575]	0.74
Median medullar blast percentages [Min-Max]	66% [0 - 99]	67.5% [1 - 99]	0.46
CNS involvement	70 (16%)	44 (16.3%)	0.92
Cytogenetics			
Normal karyotype	112 (26.6%)	76 (25.1%)	0.48
CBF-AML	95 (21.7%)	74 (21.5%)	1.00
KMT2A rearranged-AML	94 (21.5%)	53 (19.6%)	0.63
Mutations			
FLT3-ITD	41 (9.4%)	30 (11.1%)	0.40
NPM1	32 (7.3%)	22 (8.1%)	0.67
CEBPA double-mutation	9 (2.1%)	6 (2.2%)	1.00
Risk stratification			
Standard risk	97 (22.2%)	75 (27.8%)	0.10
Intermediate risk	235 (53.7%)	144 (53.3%)	0.94
High risk	106 (24.2%)	51 (18.9%)	0.10
Results			
CR rate	405 (92.5%)	253 (93.7%)	0.65
Relapse rate	160 (36.5%)	92 (34.1%)	0.52
HSCT	119 (27.2%)	79 (29.3%)	0.55
5-years OS $\pm$ SE	70.2% $\pm$ 2.6%	74.4% $\pm$ 3.2%	0.31
5-years LFS $\pm$ SE	54.1% $\pm$ 3.1%	58.8% $\pm$ 3.9%	0.24

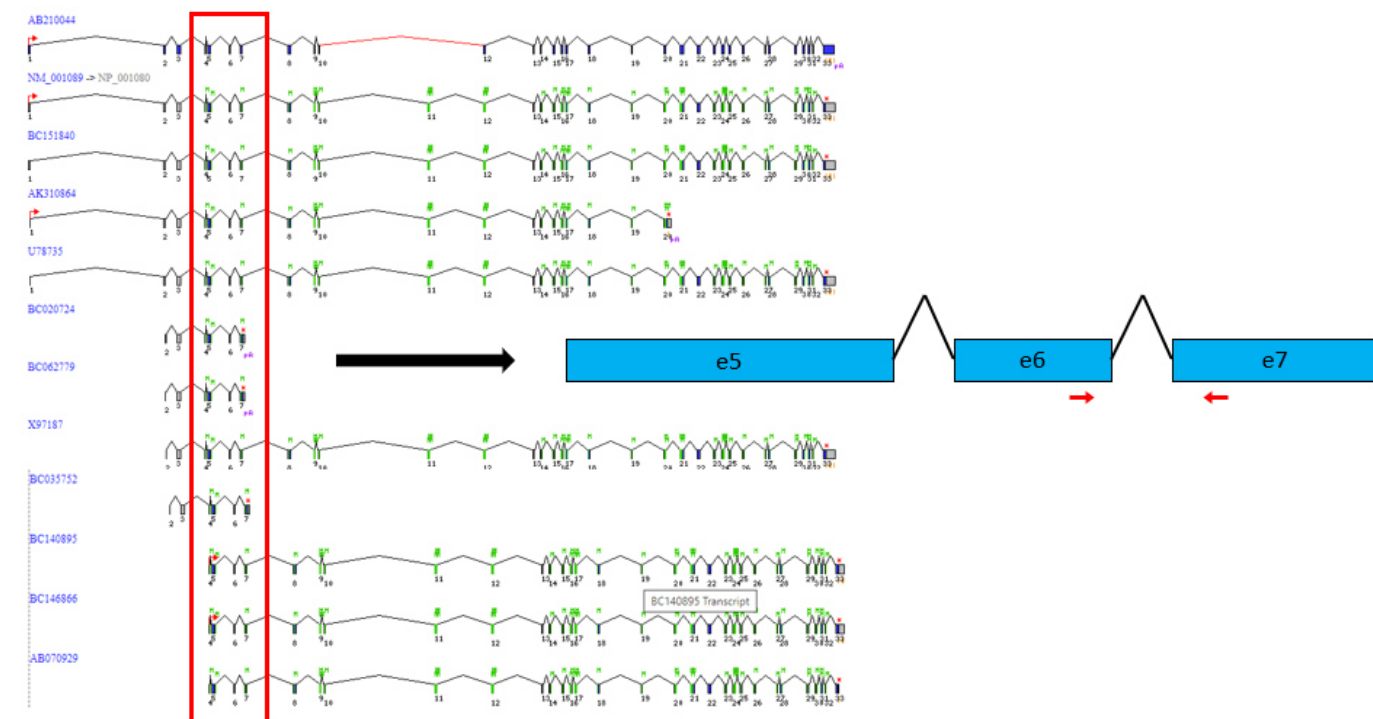
Supplementary Table 2. Main clinical and biological features of the ELAM02 trial (N=438) and the entire patient set (N=270). Fisher's exact tests were used for comparing categorical variables, Mann-Whitney's tests for numerical variables and log-rank tests for survival variables. *M* (male), *F* (female), *WBC* (white blood cells), *Min* (minimum), *Max* (maximum), *CNS* (central nervous system), *AML* (acute myeloid leukemia), *CBF* (core-binding factor), *ITD* (internal-tandem duplication), *CR* (complete remission), *HSCT* (hematopoietic stem cell transplant), *OS* (overall survival), *LFS* (leukemia-free survival), *SE* (standard-error).

	Exploratory set (N=120)	Validation set (N=150)
Clinical features		
Median age (years), range	9.4 [0.2 - 17.2]	10 [0.4 - 17.9]
M/F ratio	1.26	1.27
Median WBC (G/L), range	19.3 [1.2 - 575]	13.6 [1.3 - 514]
Median medullar blast percentage	73.5% [1 - 98]	65% [1 - 99]
CNS involvement	22 (18%)	22 (15%)
Cytogenetics		
Normal karyotype	39 (32%)	37 (25%)
CBF-AML	20 (16.7%)	54 (36%)
<i>KMT2A</i> rearranged-AML	20 (16.7%)	33 (22%)
Anomalies moléculaires		
<i>FLT3</i> -ITD	12 (10%)	18 (12%)
<i>NPM1</i> muté	14 (12%)	8 (5%)
<i>CEBPA</i> double-mutation	2 (2%)	4 (3%)
Risk stratification		
Standard risk	20 (17%)	55 (36%)
Intermediate risk	77 (64%)	67 (45%)
High risk	23 (19%)	28 (19%)
Results		
CR	108 (90%)	145 (97%)
Relapse	33/108 (31%)	54/145 (37%)
HSCT	38 (32%)	41 (27%)
5-years OS $\pm$ SE	70.8% $\pm$ 5.1%	77.2% $\pm$ 4.1%
5-years LFS $\pm$ SE	62.0% $\pm$ 5.9%	56.7% $\pm$ 5.1%

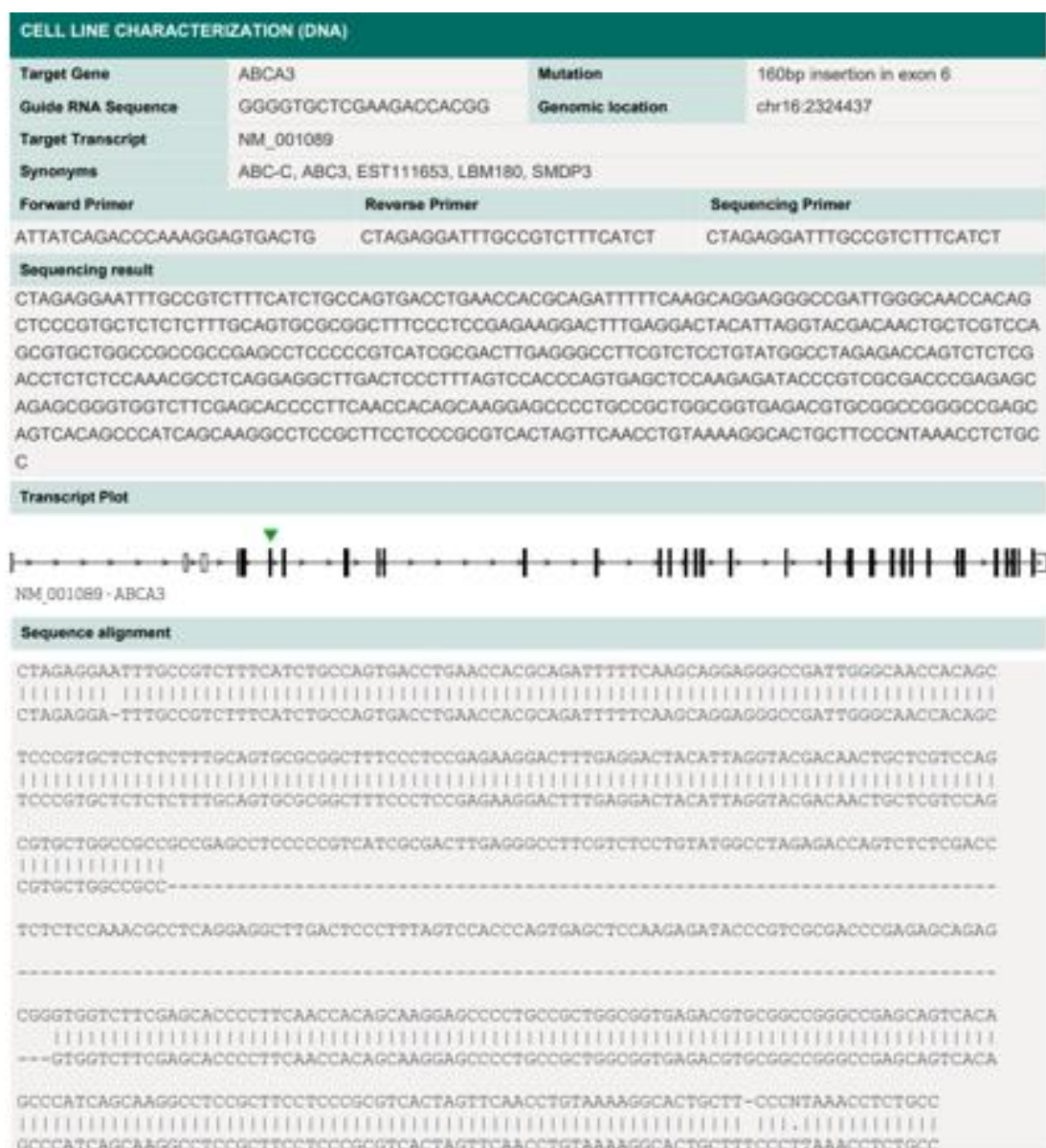
Supplementary Table 3. Main clinical and biological features of the exploratory (N=120) and the validation (N=150) sets. Fisher's exact tests were used for comparing categorical variables, Mann-Whitney's tests for numerical variables and log-rank tests for survival variables. *M* (male), *F* (female), *WBC* (white blood cells), *Min* (minimum), *Max* (maximum), *CNS* (central nervous system), *AML* (acute myeloid leukemia), *CBF* (core-binding factor), *ITD* (internal-tandem duplication), *CR* (complete remission rate), *HSCT* (hematopoietic stem cell transplant), *OS* (overall survival), *LFS* (leukemia-free survival), *SE* (standard-error).

	ELAM02 protocol	ELN risk stratification for adult AML
Standard risk	· t(8;21)(q22;q22.1);<i>RUNX1-RUNX1T1</i> or inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22);<i>CBFB-MYH11</i> WITH MRD log reduction > 3-fold after course 2 · t(1;11)(q21;q23);<i>MLL-MLLT11(AF1Q)</i> · Normal karyotype and <i>NPM1</i> mutation with no <i>FLT3-ITD</i> mutation · Normal karyotype and <i>CEBPA</i> bi-allelic mutation with no <i>FLT3-ITD</i> mutation · t(9;11)(p21-22;q23) isolated AND WBC < 50 G/L AND CNS1	· t(8;21)(q22;q22.1);<i>RUNX1-RUNX1T1</i> · inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22);<i>CBFB-MYH11</i> · <i>CEBPA</i> bi-allelic mutation · <i>NPM1</i> mutation with no <i>FLT3-ITD</i> mutation or <i>FLT3-ITD</i>^{low}(<0.5)
Intermediate risk	· every anomaly not categorized as SR or HR	· isolated normal karyotype · <i>NPM1</i> mutation with <i>FLT3-ITD</i>^{high}(≥0.5) · <i>NPM1</i> wild-type with no <i>FLT3-ITD</i> or <i>FLT3-ITD</i>^{low}(<0.5) · t(9;11)(p21.3;q23.3)/<i>MLLT3-KMT2A</i> · every anomaly not categorized as SR or HR
High risk	· -7, -5, abn(5q) · inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2);<i>GATA2-MECOM</i> · t(10;11)(p12;q23);<i>MLL-MLLT10(AF10)</i> · t(10;11)(p11.2;q23);<i>ABI1-KMT2A</i> · t(6;11)(q27;q23);<i>MLL-MLLT4(AF6)</i> · t(6;9)(p23;q34);<i>DEK-NUP214</i> · Complex karyotype · treatment-related leukemia · secondary leukemia · no CR after course 2 · <i>FLT3-ITD</i> mutation AND mutated/wild-type ratio > 0.40	· t(6;9)(p23;q34);<i>DEK-NUP214</i> · t(v;11q23.3);<i>KMT2A</i> rearranged · t(9;22)(q34;q11.2);<i>BCR-ABL1</i> · inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2);<i>GATA2-MECOM</i> · -5 ou del(5q) · -7; -17/abn(17p) · Complex karyotype · Monosomal karyotype · Wild-type <i>NPM1</i> with <i>FLT3-ITD</i>^{high}(≥0.5) · <i>RUNX1</i> mutation · <i>ASXL1</i> mutation · <i>TP53</i> mutation

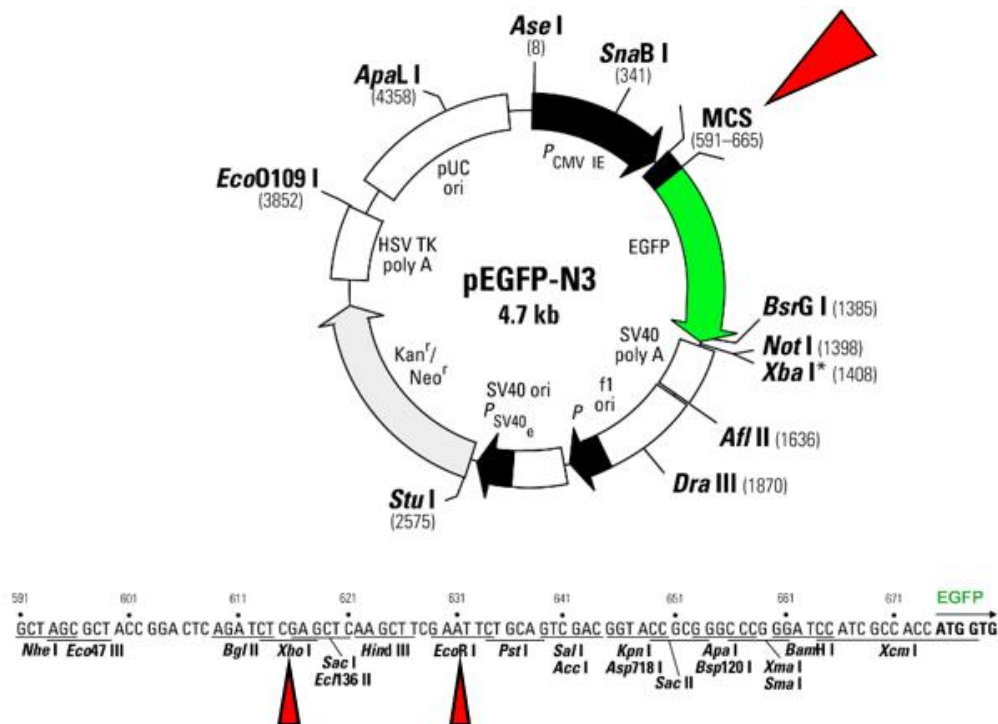
Supplementary Table 4. Risk group stratification strategies applied to AML patients. *SR* (standard risk), *IR* (intermediate risk), *HR* (high risk), *CR* (complete remission), *WBC* (white blood cells), *CNS* (central nervous system).



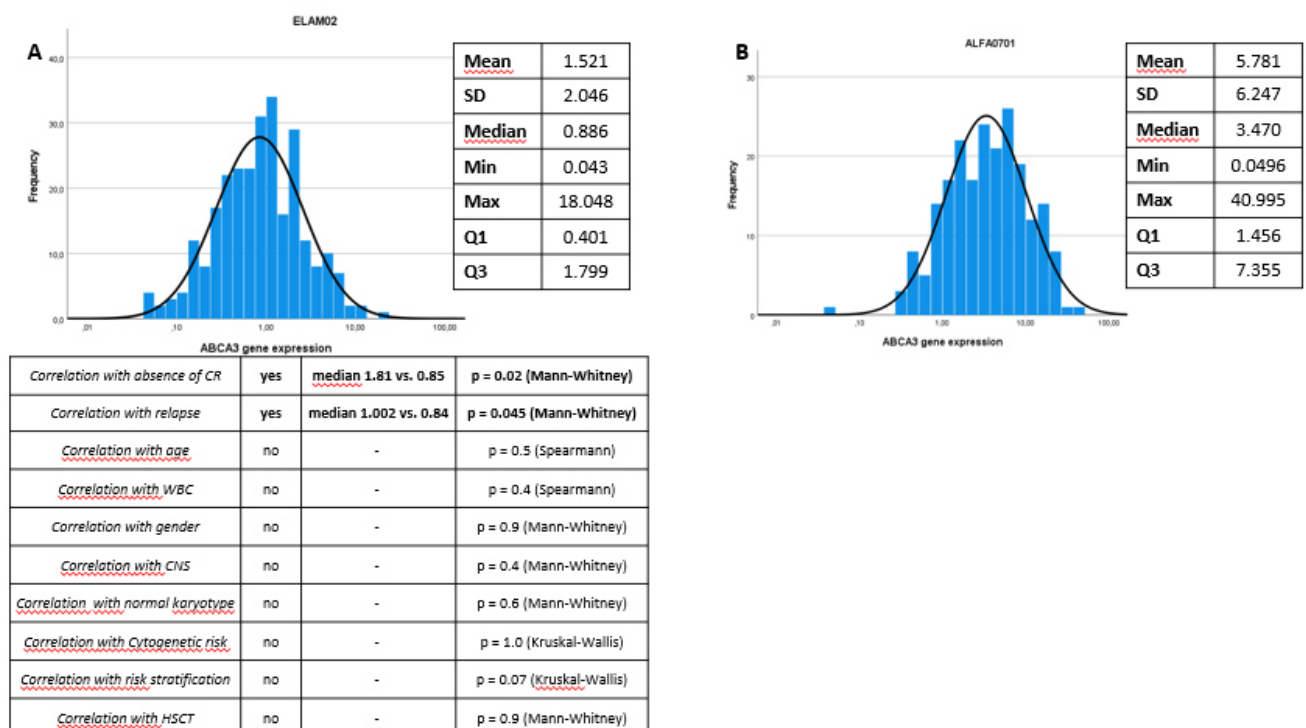
Supplementary Figure 1. qPCR primers design. FasterDB capture of all *ABCA3* reported transcripts, with the conserved region of exons 4 to 7 in the red rectangle. Primers positions (red arrows) on the *ABCA3* sequence (scale: 1 bp = 30 mm)



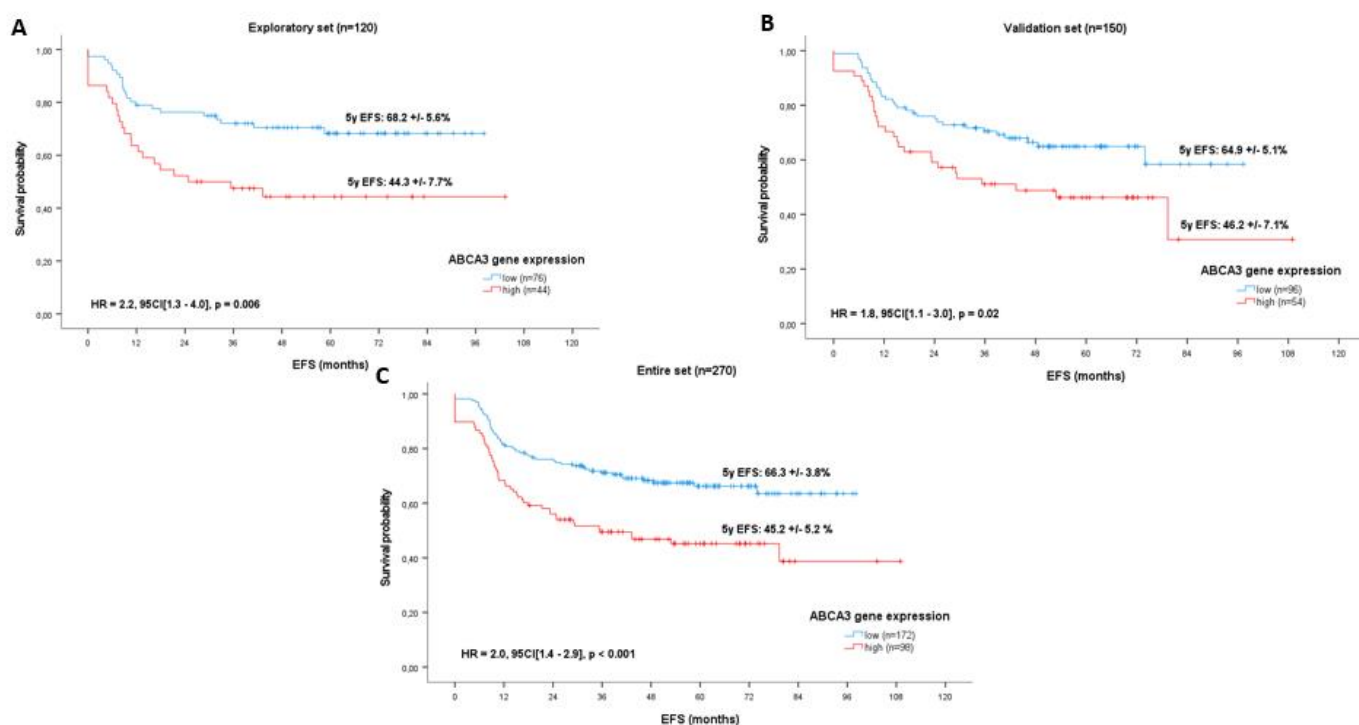
Supplementary Figure 2. CRISPR-Cas9 induces knockout of *ABCA3*. Characteristics of the CRISPR-engineered HAP1 cell line (data proprietary of Horizon Discovery™, https://horizondiscovery.com/media/Files/Horizon/resources/Data%20Sheets/78/HZGHC006065c005_DataSheet.pdf)



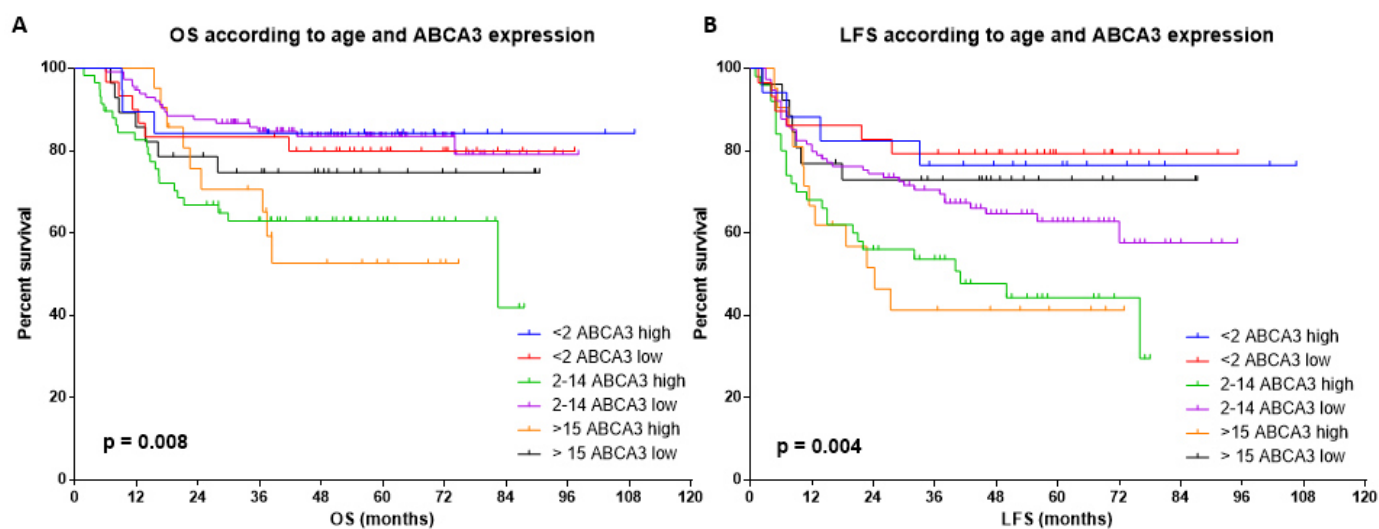
Supplementary Figure 3. Plasmid structure. Structure of the eGFP-N3 plasmid used for transfection experiments on HEK 293T cells, the red arrow pointing at insertion site of the *ABCA3* coding sequence.



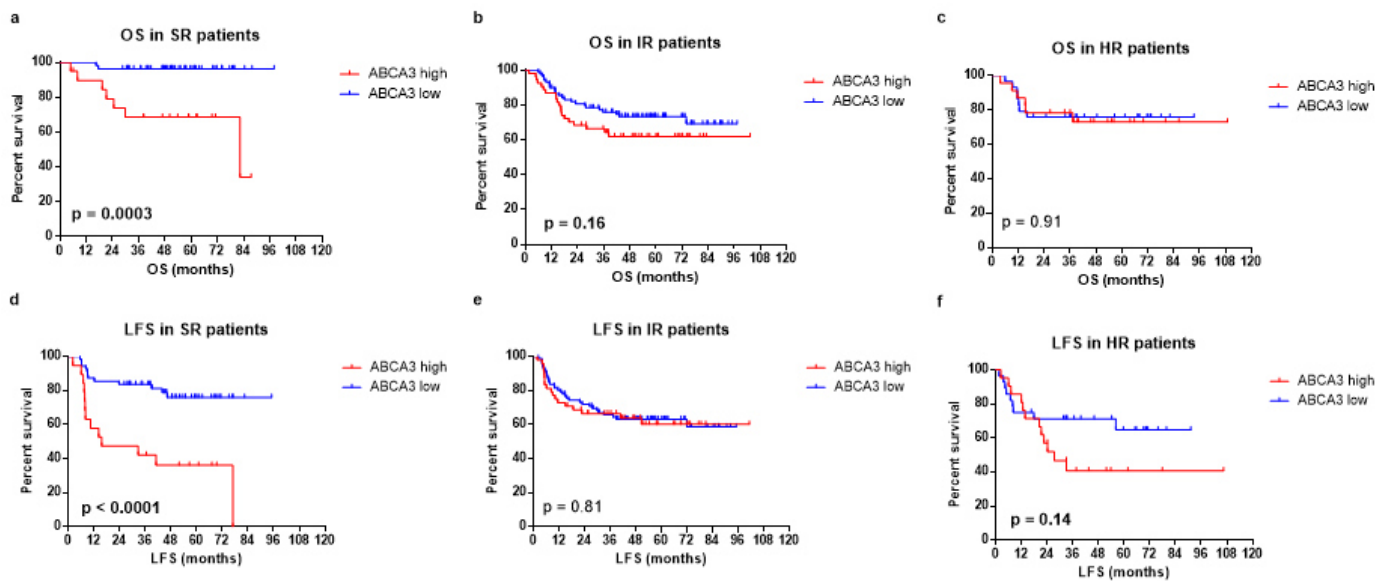
Supplementary Figure 4. ABCA3 variable. Distribution of the *ABCA3* gene expression variable across the pediatric set (A) and the adult set (B) with main position and dispersion indicators. Correlation with the main clinical and biological characteristics of the AML are reported in the table for pediatric patients.



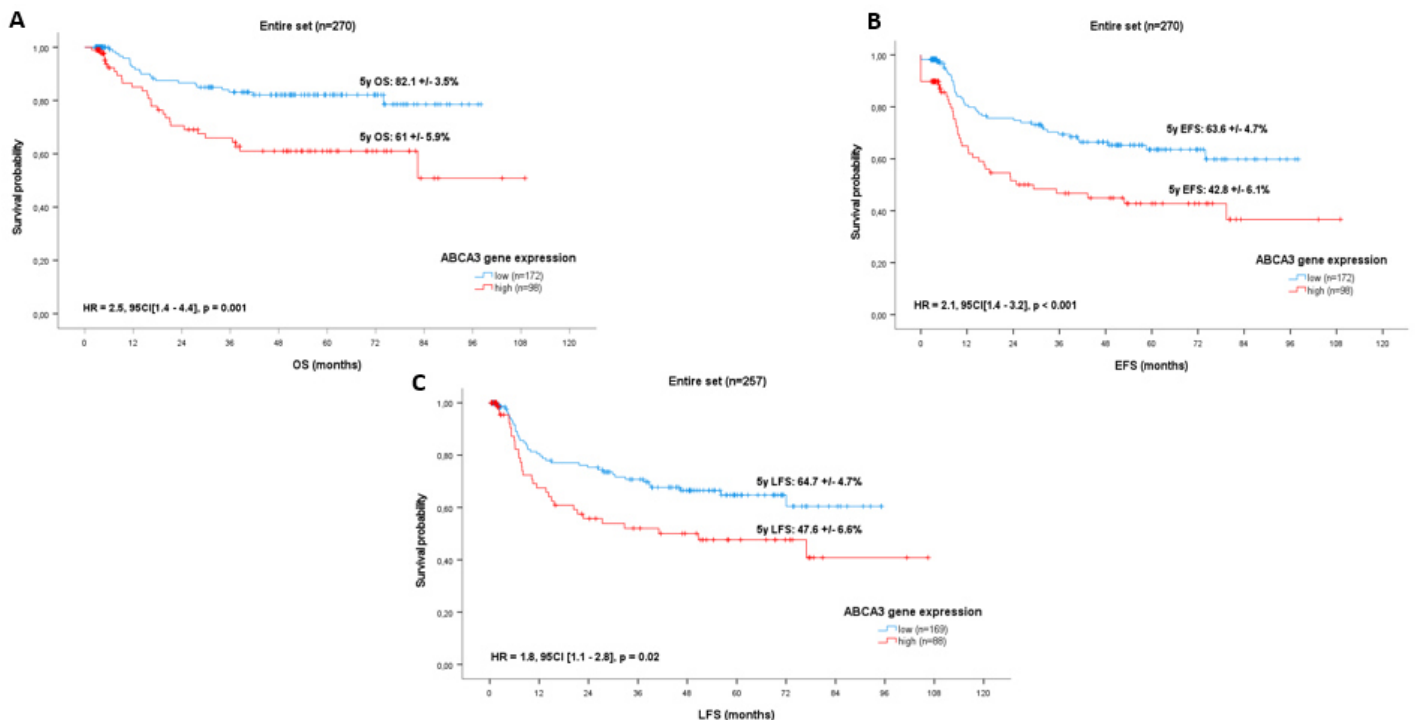
Supplementary Figure 5. Event-Free Survival (EFS) according to *ABCA3* expression in pediatric AML patients. Kaplan-Meier curves in the exploratory (a), validation (b) and overall dataset (c).



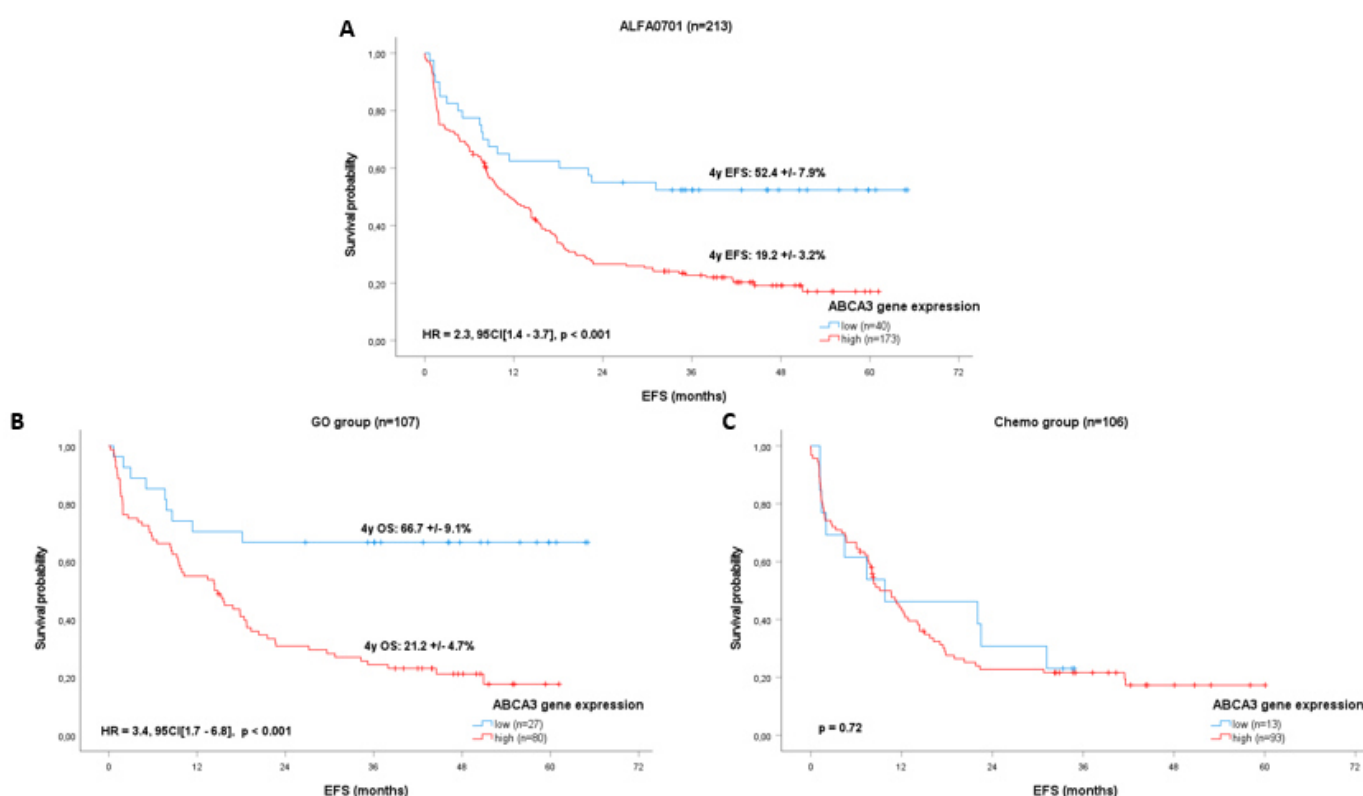
Supplementary Figure 6. Prognostic impact of *ABCA3* expression according to age in pediatric AML patients. OS (a) and LFS (b) Kaplan-Meier curves and log-rank test values among three age groups: less or equal to 2 yo, 3 to 14 yo and equal or more than 15 yo.



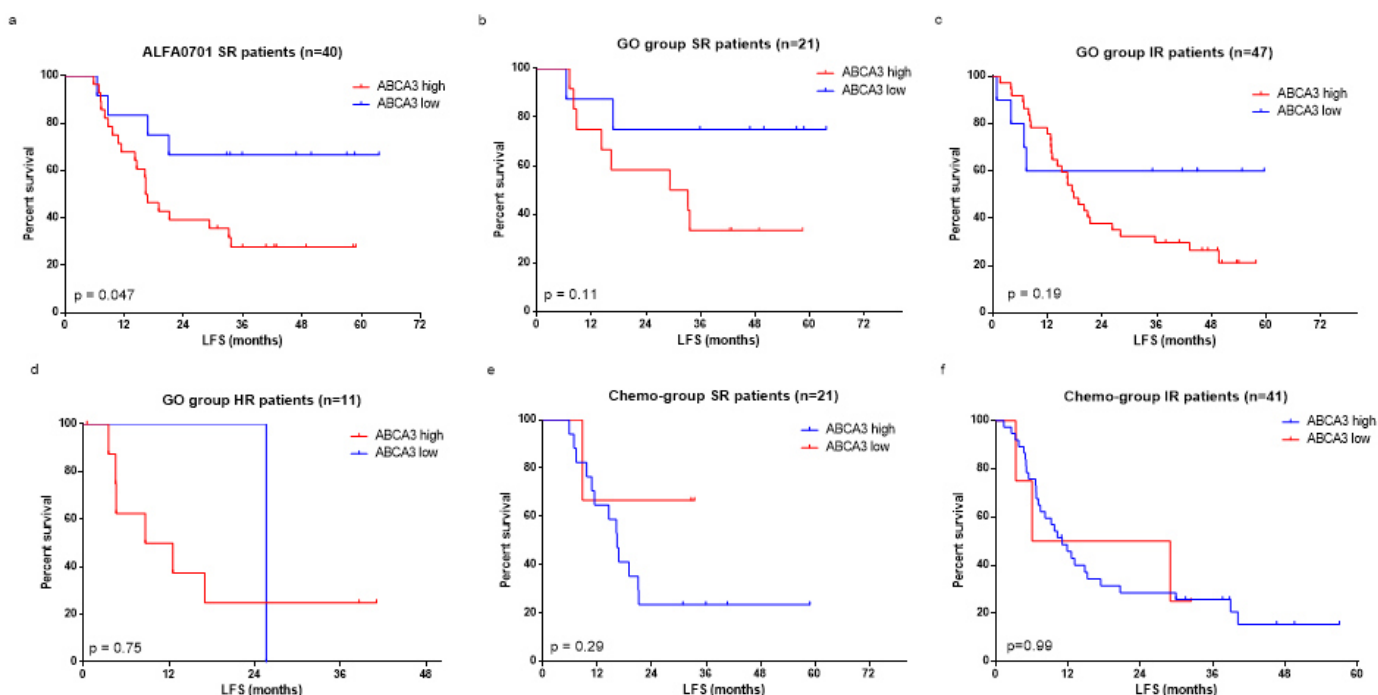
Supplementary Figure 7. Prognostic impact of *ABCA3* expression according to risk stratification in the ELAM02 trial. OS (a-b-c) and LFS (d-e-f) Kaplan-Meier curves and log-rank test values among patients with standard (SR), intermediate (IR) and high-risk (HR) patients.



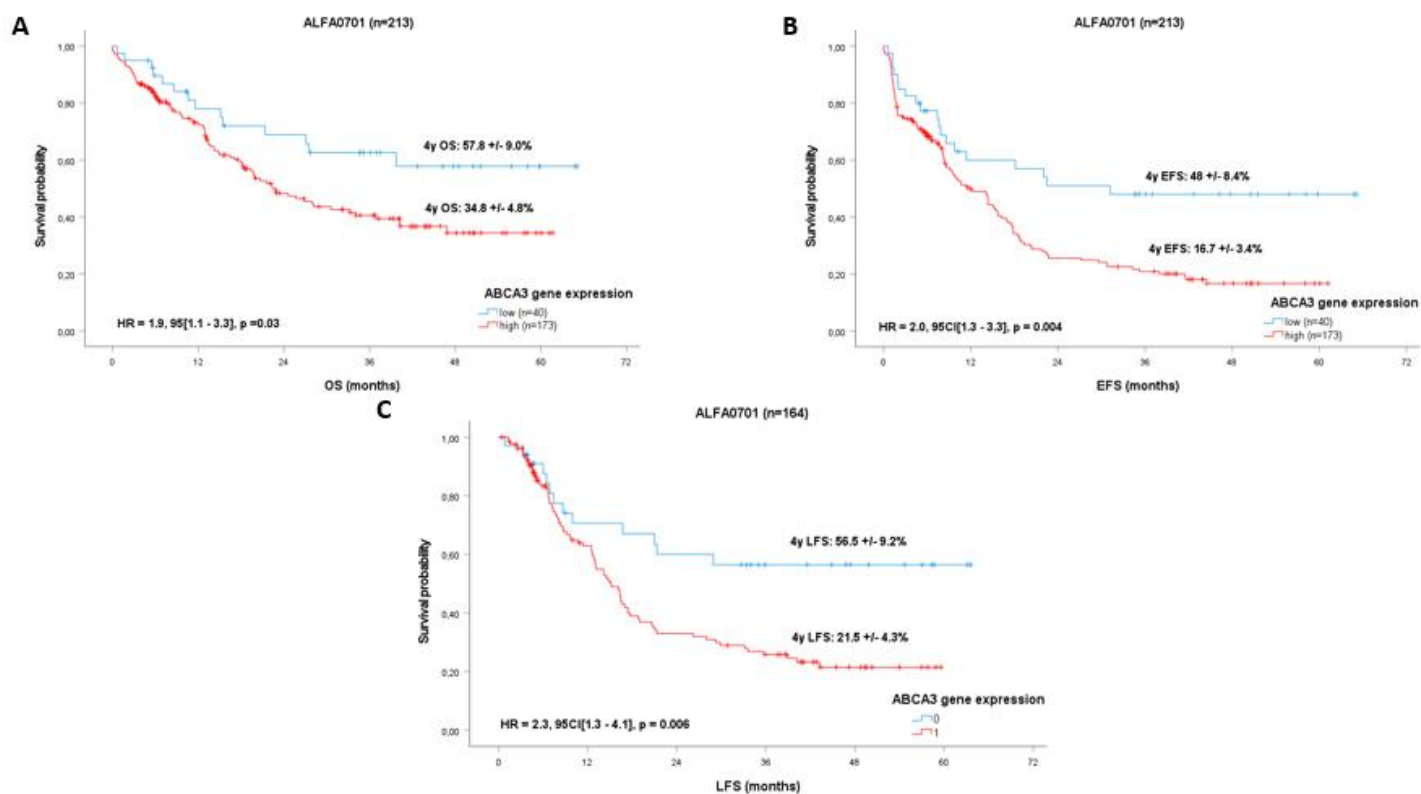
Supplementary Figure 8. Prognostic impact of *ABCA3* expression in the entire pediatric dataset, with censoring at the time of HSCT. Kaplan-Meier curves for OS (a), EFS (b), LFS (c).



Supplementary Figure 9. Event-Free Survival (EFS) according to *ABCA3* expression in adult AML patients. Kaplan-Meier curves in the entire set (a), in patients receiving gemtuzumab-ozogamycin (b) and in chemotherapy-treated patients (c).



Supplementary Figure 10. Prognostic impact of *ABCA3* expression according to risk stratification in the ALFA0701 trial. LFS Kaplan-Meier curves and log-rank test values among patients with standard (SR), intermediate (IR) and high-risk (HR) patients in the entire ALFA0701 trial (SR patients, a), in the GO-treated group (b-c-d) and in the chemo-group (e-f).



Supplementary Figure 11. Prognostic impact of *ABCA3* expression in the adult dataset, with censoring to HSCT. Kaplan-Meier curves for OS (a), EFS (b), LFS (c)

**PARTIE 2 : L'EXCLUSION DE L'EXON 19
D'*ABCA3* MODULE SON IMPACT
PRONOSTIQUE DANS LES LAM.**

(article en cours de rédaction)

1. Impact structurel de l'exclusion de l'exon 19 d'*ABCA3*.

L'exon 19 d'*ABCA3* comprend 99 paires de bases et encode une partie du linker situé entre le domaine NBD1 et le domaine TMD2 (Figure 1A). Il code pour la séquence d'acides aminés 804 à 837 : FEGLFAKLEKKQKELGASFGASITTMEEVFLR. L'analyse des bases de données COSMIC, cBioPortal et VarSome a révélé que de rares mutations sont connues dans le cancer, mais aucune avec effet pathogène certain ou suspect. Dans ClinVar, 3 variants de signification indéterminée ont été identifiés sur cette séquence chez des patients avec des anomalies du surfactant. De plus, les comparaisons de séquences via pBlast ont montré une forte homologie avec les protéines humaines *ABCA1*, *A4*, *A5*, et *A9*. Enfin, la séquence nucléotidique humaine de cet exon comporte une forte homologie avec de nombreux homologues chez les Mammifères, avec plus de 94% d'homologie de séquence chez de nombreux Mammifères. Cette séquence apparaît donc essentielle à la fonction de cette protéine. On note que cette séquence contient un signal de localisation nucléaire (EKKQKE), théoriquement prédite pour diriger une importation de la protéine vers le noyau, ce qui est assez étonnant car la protéine mature n'est pas à localisation nucléaire.

La délétion de l'exon 19 n'induit pas de décalage du cadre de lecture et donc l'ARN messager ne doit pas être soumis aux mécanismes de dégradation NMD. La production d'une isoforme protéique dépourvue de la séquence de l'exon est donc possible. La modélisation bio-informatique de la perte de l'exon 19 d'*ABCA3* prédit un changement conformationnel par rapport à la protéine native (Figure 1B) vers une isoforme avec flexibilité accrue et activité d'efflux augmentée (*ABCA3* -19, Figure 1C).

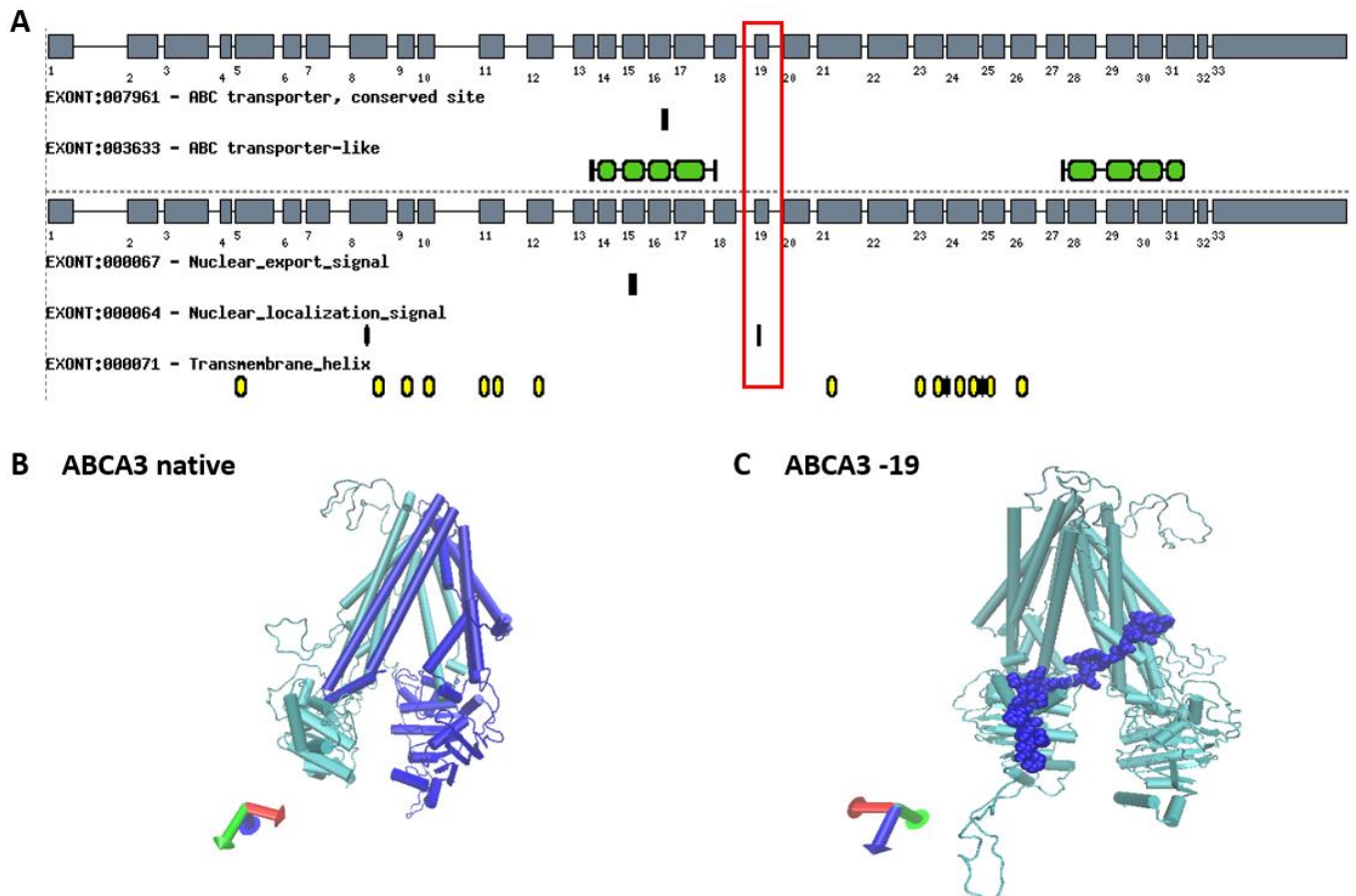


Figure 1. Impact structurel de l'exclusion de l'exon 19 d'ABCA3. Structure exon-intron d'ABCA3 (A), fichier de sortie de l'interrogation de la base FasterDB), avec figurations des feuillets β des domaines NBDs (vert) et des hélices α des domaines TMDs (jaunes) ; modélisations tridimensionnelles de la protéine ABCA3 native (B) et de l'isoforme dépourvu d'exon 19 (C). Modélisations courtoises du Dr Lé Payen-Gay. *TMDs* (*trans-membrane domains*), *NBDs* (*nucleotide-binding domains*).

2. L'exclusion de l'exon 19 d'ABCA3 confère un pronostic défavorable dans les LAM pédiatriques.

Concernant les LAM adultes, dans notre cohorte ALFA0701, nous n'avons pas retrouvé d'impact pronostique de taux d'exclusion de l'exon 19 d'ABCA3 chez les patients traités par GO.

Dans les LAM pédiatriques, aux seuils précédemment décrits chez l'adulte, nous n'avons pas retrouvé d'impact pronostique de l'exclusion de l'exon 19. En appliquant la méthodologie décrite pour l'expression d'ABCA3 (Article 1), nous suggérons un possible effet pronostique défavorable sur l'ensemble des patients, (Figure 1A). Les analyses en sous-groupes ont cependant révélé un impact significatif chez les patients de risque standard (Figure 1B). Etant donné le fort impact pronostique de l'expression du gène ABCA3 et l'absence de corrélation statistique entre les deux variables (R^2 de Pearson=0,005, $p=0,23$), nous avons analysé l'impact pronostique de l'exclusion de l'exon 19 selon l'expression d'ABCA3 et avons mis en évidence une modulation de cet impact selon le ratio d'inclusion de l'exon, à des niveaux différents de ceux identifiés chez l'adulte. Cette analyse a montré une dégressivité du pronostic lié à l'expression élevée d'ABCA3 selon le niveau d'exclusion de l'exon 19. En combinant les groupes de pronostics similaires (Figure 1C), les patients avec expression faible d'ABCA3 et faible taux d'exclusion de l'exon 19 s'avèrent avoir un excellent pronostic (groupe 1) tandis que ceux avec expression élevée d'ABCA3 et taux d'exclusion de l'exon 19 élevé présentaient un mauvais pronostic (groupe 3). Dans le groupe de patients de pronostic intermédiaire (groupe 2), un taux d'exclusion élevé d'ABCA3 effaçait l'impact pronostic favorable conféré par une faible expression du gène, et inversement les patients avec expression élevée d'ABCA3 avaient un meilleur pronostic en cas de ratio d'exclusion de l'exon 19 faible. Les seules différences notables entre les 3 groupes issus de ce score de risque ABCA3 était un excès significatif de patients avec caryotype normal et une tendance à plus d'envahissement neuroméningé dans le groupe 1 (Table 1). Il y avait également une tendance à taux de RC dégressifs entre les groupes et des taux de rechute croissants entre les groupes. Enfin, bien qu'indépendant de la stratification pronostique du protocole ELAM02, cet impact pronostique du score de risque ABCA3 était très parlant dans le sous-groupe des patients de risque standard (Figure 1D), et non significatif dans les autres groupes.

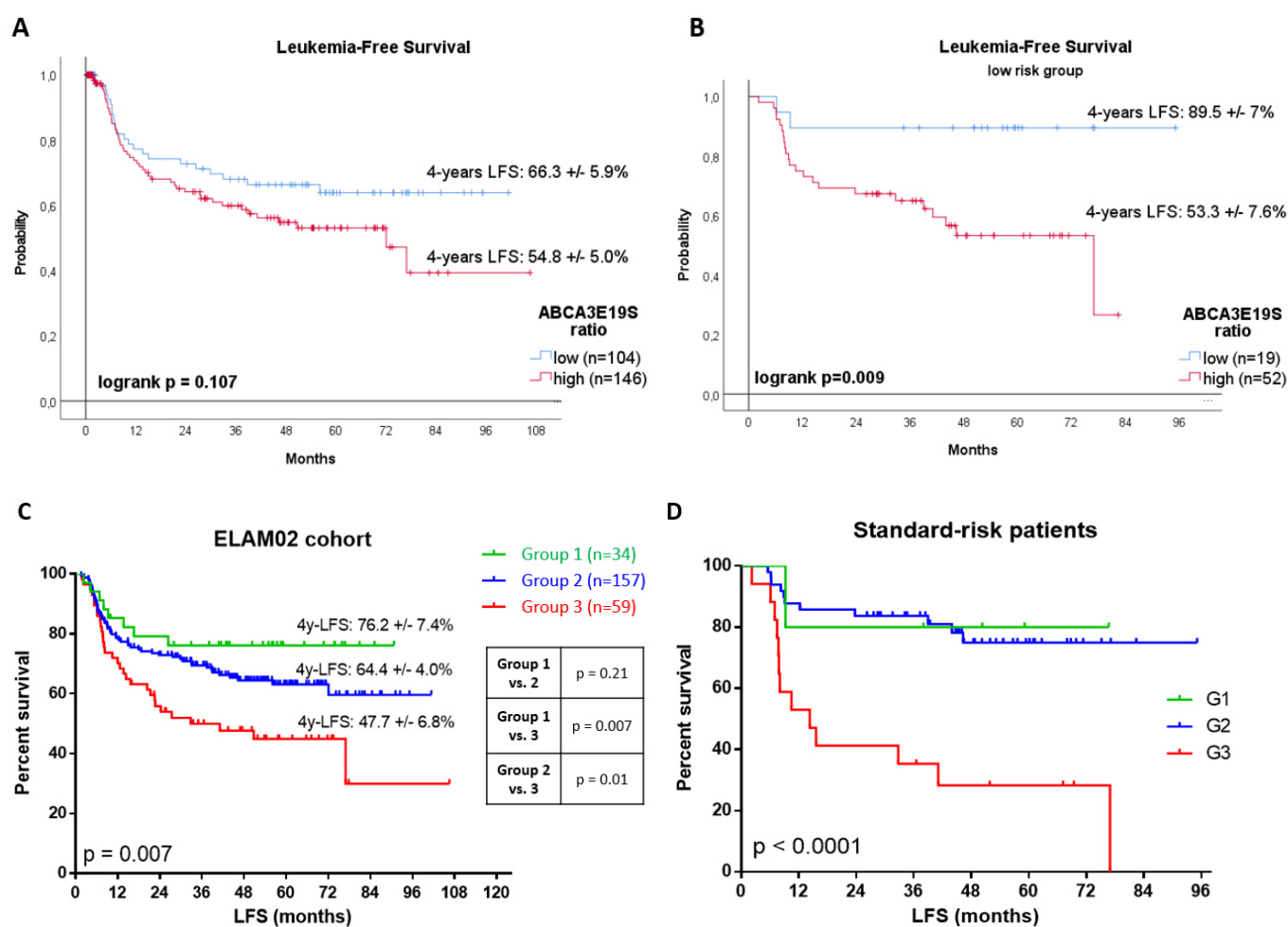


Figure 1. L'exclusion de l'exon 19 est associé à un pronostic défavorable dans les LAM de l'enfant, principalement de risque pronostique standard. (A) Survie sans leucémie (LFS) avec censure à la greffe dans la cohorte ELAM02 (n=249). (B) LFS des patients de risque standard (low-risk) de la cohorte ELAM02 selon le niveau d'exclusion de l'exon 19 de ABCA3. (C) LFS des patients pédiatriques de la cohorte ELAM02 selon le score de risque combiné expression d'ABCA3-taux d'inclusion de l'exon 19. (D) LFS des patients de risque standard de la cohorte ELAM02 selon le score de risque combiné. Groupe 1 : patients avec expression faible d'ABCA3 et faible taux d'exclusion de l'exon 19 ; groupe 3 : patients avec expression élevée d'ABCA3 et taux d'exclusion de l'exon 19 élevé ; groupe 2 : autres patients.

	Group 1 (n=35)	Group 2 (n=156)	Group 3 (n=72)	p-value
Clinical features				
Median age in years [Min-Max]	7.2 [0.25-17.2]	9.8 [0.2-16.7]	10.2 [0.7-15.1]	0.50
M/F ratio	63%	52%	61%	0.29
Median WBC [Min-Max] (G/L)	18.3 [2.8-575]	17.9 [1.2-445]	14.0 [1.8-514]	0.90
Median medullar blast percentages [Min-Max]	77.5% [20-97]	66% [9-98]	73.5% [1-99]	0.71
CNS involvement	28.6%	16.7%	11.1%	0.08
Cytogenetics				
Normal karyotype	48.6%	27.1%	19.1%	0.004
CBF-AML	14.3%	30.1%	26.4%	0.16
KMT2A rearranged-AML	11.4%	18.6%	26.4%	0.16
Mutations				
FLT3-ITD	8.6%	10.9%	13.9%	0.68
NPM1	11.4%	9.0%	5.6%	0.54
CEBPA double-mutation	2.9%	2.5%	1.4%	0.84
Risk stratification				
Standard risk	14.3%	30.1%	26.4%	0.13
Intermediate risk	68.6%	51.6%	48.6%	0.13
High risk	17.1%	17.4%	25%	0.38
Results				
CR rate	97.1%	94.9%	88.9%	0.15
Relapse rate	23.5% (8/34)	33.1% (49/148)	45.3% (29/64)	0.07
HSCT	34.3%	30.8%	25%	0.55
5-years OS $\pm$ SE	91.6 $\pm$ 3.9%	73.8 $\pm$ 4.3%	65.3 $\pm$ 6.7%	0.06
5-years LFS $\pm$ SE	76.2 $\pm$ 7.4%	62 $\pm$ 4.2%	50 $\pm$ 6.5%	0.04

Table 1. Principales caractéristiques cliniques et biologiques dans la cohorte ELAM02 selon le score de risque combiné ABCA3 expression-inclusion de l'exon 19. Comparaisons des variables quantitatives par tests de Kruskal-Wallis, des variables catégorielles par tests de Chi2 et des survies par tests de logrank. *M (male), F (female), WBC (white blood cells), Min (minimum), Max (maximum), CNS (central nervous system), AML (acute myeloid leukemia), CBF (core-binding factor), ITD (internal-tandem duplication), CR (complete remission rate), HSCT (hematopoietic stem cell transplant), OS (overall survival), LFS (leukemia-free survival), SE (standard-error).*

**PARTIE 3 : PROPOSITION D'UN
NOUVEAU SCORE TRANSCRIPTIONNEL
ET POST-TRANSCRIPTIONNEL DANS
LES LAM PEDIATRIQUES (ARTICLE 2)**
(article en cours de rédaction)

Nos travaux sur ABCA3 dans les LAM pédiatriques ont montré que la prise en compte de l'épissage alternatif d'un gène est capitale pour établir son impact pronostique. Avec un seul gène, nous avons pu stratifier les patients pédiatriques avec de bonnes prédictions des résultats. Cela conforte l'importance progressive que les signatures d'expression génique vont prendre en clinique, avec d'ores-et-déjà des propositions diverses dans les LAM (Fu et al. 2021; Liu Yang et al. 2021; Ran Li et al. 2021; Docking et al. 2021; Mosquera Orgueira et al. 2021; Walker et al. 2021), mais aucune à l'heure actuelle dans les LAM pédiatriques ni aucune ne prenant en compte les événements d'épissage. Notre équipe ayant travaillé sur un autre gène d'intérêt (*TET2*) dans les liens entre expression, épissage et chimiorésistance, nous avons décidé d'étudier l'impact pronostique de l'expression et de l'épissage de *TET2* dans les LAM pédiatriques et de combiner cet impact avec celui de la signature ABCA3.

TET2 est le deuxième membre de la famille des enzymes à activité dioxygénase TET (ten-eleven translocation), impliquées dans la déméthylation de l'ADN. Le gène *TET2* est situé sur le bras long du chromosome 4 (position 4q24). Il comprend 12 exons répartis sur 13.3 kbp. Il dispose de deux promoteurs, permettant un début de transcription à partir de l'exon 1 ou de l'exon 2 (nomenclature selon la base de données FasterDB, qui prend en compte ces deux promoteurs). Il est à noter que la traduction débute sur l'exon 4. *TET2* est un gène assez ubiquitaire mais particulièrement exprimé dans les tissus hématopoïétiques (moelle osseuse, sang, foie et rate), le système nerveux ainsi que de nombreuses glandes endocrines (hypophyse, testicules, ovaires, surrénales, thyroïde) (Lorsback et al. 2003). La protéine *TET2* est constituée de 2002 acides aminés pour une masse de 223.8 kDa (référence UniProt KB Q6N021-1). Elle s'organise en un domaine d'interaction et un domaine catalytique C-terminal où va se dérouler la réaction de dioxygénation (Hu et al. 2013). Contrairement aux protéines *TET1* et *TET3*, *TET2* ne possède pas de motif de liaison à l'ADN en doigt de zinc. Elle peut interagir seule avec l'ADN et la chromatine via son domaine catalytique (Yamagata and Kobayashi 2017), mais son recrutement sur des gènes spécifiques est également permis par diverses protéines telles que WT1 (Y. Wang et al. 2015).

La fonction principale des protéines TETs est la catalyse des réactions de déméthylation progressive de l'ADN. La méthylation de l'ADN joue un rôle majeur dans la régulation de

l'expression génique : un profil très méthylé est souvent associé à une répression génique (Sharma, Kelly, and Jones 2009). Les enzymes TETs catalysent la transformation de la 5-méthylcytosine en 5-hydroxyméthylcytosine (Ito et al. 2011) aboutissant à la création d'un site abasique où une cytosine sera régénérée via le système de réparation des bases nucléotidiques (Cortellino et al. 2011). L'activité catalytique des enzymes TETs est augmentée par l'acide ascorbique (Yin et al. 2013) et il a été démontré que cette vitamine est capitale pour la régulation de l'hématopoïèse (Agathocleous et al. 2017). TET2 a également un rôle de modulateur épigénétique, notamment via son interaction avec la protéine OGT (O-linked β -D-N-acétylglucosamine (O-GlcNAc)-transférase), qu'elle recrute sur la chromatine (Hanover, Krause, and Love 2012). Les activités ADN-déméthylase, O-GlcNAcylation des histones et la triméthylation H3K4 confèrent aux protéines TETs un rôle majeur dans la régulation épigénétique (Chen et al. 2013), avec une fonction essentiellement trans-activatrice.

TET2 est exprimé dans tous les lignages hématopoïétiques, dans les formes différenciées comme dans les précurseurs et progéniteurs, avec une baisse progressive d'expression au fil de la différenciation cellulaire. L'inhibition de son expression dans un modèle murin transgénique a pour conséquence d'augmenter les capacités de renouvellement des CSH et des progéniteurs (Moran-Crusio et al. 2011). La restauration de TET2 dans ce type de modèle induit une déméthylation de l'ADN, la différenciation et la mort cellulaire (Cimmino et al. 2017), effet qui est également obtenu avec un traitement par acide ascorbique.

Ses fonctions biologiques font de *TET2* un gène suppresseur de tumeur dans les hémopathies myéloïdes et lymphoïdes. Il s'agit en effet d'un des gènes les plus fréquemment mutés dans les syndromes myélodysplasiques et myéloprolifératifs (Francois Delhommeau et al. 2009). Tous les modèles murins d'inactivation de *TET2* ont conduit au développement d'hémopathies chez les souris mais avec des types et des délais d'apparition différents (Moran-Crusio et al. 2011; S. J. Song et al. 2013), ce qui est en faveur de l'hypothèse que TET2 n'est pas un driver de leucémogénèse mais induit un terreau favorable à la transformation cellulaire au décours d'événements génétiques secondaires (Solary et al. 2014). Confortant cette hypothèse, dans la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC), les mutations de *TET2* ont été identifiées comme étant des événements précoces dans le processus de leucémogénèse (Itzykson et al. 2013).

De plus, il a récemment été démontré que les mutations de *TET2* favorisent une hypermutagénicité dans l'ADN des CSH (F. Pan et al. 2017). Il semble par ailleurs que la perte d'expression de *TET2* dans les cellules stromales mésenchymateuses médullaires conduise à une dérégulation de leurs fonctions et favorise le développement d'hémopathies myéloïdes associées à une perte de *TET2* (Rong Li et al. 2018).

Les mutations perte de fonction de *TET2* sont des événements récurrents dans les hémopathies myéloïdes (François Delhommeau, Dupont, Della Valle, et al. 2009), le plus souvent à l'état hétérozygote. La prévalence des mutations de *TET2* dans les LAM est variable et augmente avec l'âge. Dans les LAM de novo, la fréquence de patients avec mutation de *TET2* est de 1 à 4% chez l'enfant (Marceau-Renaut et al. 2018) et de 6 à 28% chez l'adulte (Ceraulo 2018). Dans les LAM secondaires, la prévalence de ces mutations est plus élevée, de l'ordre de 20 à 45%. L'impact pronostique des mutations de *TET2* dans les LAM a fait l'objet de nombreuses études, avec des résultats parfois contradictoires. Une méta-analyse récente (W.-J. Liu et al. 2014) a démontré un impact pronostique défavorable des mutations de *TET2*, plus marqué chez les patients avec caryotype normal ou de risque favorable ou intermédiaire- I selon la classification ELN 2010.

Les études transcriptomiques concernant *TET2* ont montré une réduction significative de son expression chez les patients atteints de SMD et de LAM (Scopim-Ribeiro et al. 2015). Cette baisse de l'expression est corrélée à une réduction du niveau de 5-hydroxyméthylcytosine cellulaire (Kroeze et al. 2014) et à une hyperméthylation de l'ADN. L'impact pronostique de l'expression de *TET2* n'a à ce jour été étudié que dans quelques cohortes de patients atteints de LAM. Scopim-Ribeiro et collègues n'ont pas retrouvé d'impact pronostic de l'expression de *TET2* (Scopim-Ribeiro et al. 2016). Dans une étude transcriptomique à grande échelle, notre équipe n'a pas non plus mis en évidence d'impact pronostic de l'expression de *TET2* dans les LAM de l'adulte (Mohamed et al. 2017). Cependant, dans une cohorte de patients âgés de moins de 60 ans, Aslanyan et collègues (Aslanyan et al. 2014) ont observé une tendance à une SG diminuée chez les patients présentant une faible expression de *TET2*.

En ce qui concerne l'épissage de *TET2*, celui-ci n'a que peu été étudié. Si l'expression des principales isoformes traduites d'ARNm de *TET2* a été rapportée en 2009 (Langemeijer et al. 2009), une seule étude à notre connaissance a étudié l'impact de l'expression relative des 3 principaux isoformes, et retrouvé un impact pronostic défavorable associé à une faible expression de l'isoforme 1 mais pas de l'isoforme 2 (Aslanyan et al. 2014). Notre équipe a récemment rapporté que les profils d'épissages sont très altérés au sein des LAM (Mohamed et al. 2015) et identifié l'exclusion de l'exon 2 de *TET2* comme un facteur pronostique indépendant dans les LAM de l'adulte (Mohamed et al. 2017), un haut niveau d'exclusion étant associé à de meilleures survies.

Pour plus de détails concernant *TET2* dans les hémopathies myéloïdes, nous renvoyons à une revue de la littérature que nous avons récemment effectuée (Ceraulo 2018).

L'importance de *TET2* dans l'hématopoïèse normale et la précocité de son altération dans les processus de leucémogénèse, essentiellement myéloïde, en font une cible d'intérêt majeur pour la théranostique actuelle. Dans ce domaine, les données pédiatriques sont rares et, quand bien même les mutations de *TET2* sont peu fréquentes dans les hémopathies myéloïdes de l'enfant, les études de son expression génique et de son épissage alternatif sont inexistantes. C'est devant ce constat que nous avons décidé d'entreprendre le travail présenté dans l'Article 2, en attente de soumission.

Independent prognostic impact of *TET2* and *ABCA3* transcriptional and post-transcriptional profiles in pediatric acute myeloid leukemia.

Antony Ceraulo¹, Hélène Lapillone², Claude Preudhomme³, Guy Leverger⁴, Yves Bertrand¹, Franck Mortreux^{5*} and Eric Wattel^{6*}

¹ Department of Pediatric Oncology and Hematology, Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique (IHOpe), Lyon-France, and University Lyon I, Lyon-France

² Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA and Laboratory of Hematology, AP-HP, Trousseau Hospital, F-75012, Paris, France

³ Department of Biology, Hematology Department, Centre Hospitalier Universitaire de Lille, Lille, France

⁴ Department of Pediatric Hematology and Oncology, APHP, Trousseau Hospital, GH HUEP, Paris, France

⁵ Laboratory of Biology and Modelling of the Cell, Univ Lyon, ENS de Lyon, Univ Claude Bernard, CNRS UMR 5239, INSERM U1210, Lyon, France.

⁶ Hospices Civils de Lyon, Department of Hematology, Lyon-Sud Hospital, Pierre Bénite, France.

* these authors equally contributed to this work.

Corresponding author: A.C. (antony.ceraulo@lyon.unicancer.fr), F.M. (franck.mortreux@ens-lyon.fr), and E.W. (eric.wattel@chu-lyon.fr)

Short Title: TET2 and ABCA3 in pediatric AML.

Keywords: acute myeloid leukemia, children, ABCA3, TET2, splicing, prognosis

Abbreviation key:

ABCA3	ATP Binding Cassette transporter A3
AML	Acute Myeloid Leukemia
CBF	Core-Binding Factor
EFS	Event-Free Survival
LFS	Leukemia-Free Survival
OS	Overall Survival
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT	Reverse Transcription
TET2	Ten-Eleven Translocation 2
TPS	Transcriptional and Post-transcriptional Score

This article was presented as an abstract (FP068 SIOP19-0564, *Independent prognostic impact of TET2 and ABCA3 transcriptional and post-transcriptional profiles in pediatric acute myeloid leukemia*) at the 2019 SIOP congress (Lyon, October 25th); doi.org/10.1002/pbc.27989

ABSTRACT

Background: The relapse rate of pediatric non-promyelocytic acute myeloid leukemia (AML) is consistently high at around 50%. Transcriptional and post-transcriptional anomalies in cancer cells seem a promising source for new biomarkers. *TET2* and *ABCA3* are two genes with prognostic impact in adult AML, in which they are involved in hematopoietic stemness and resistance to chemotherapy, respectively. Here we assessed their transcriptional profiles and prognostic impact in pediatric AML.

Procedure: Through exon-specific quantitative RT-PCR, we explored two sets of pediatric AML patients from the ELAM02 trial (exploratory set, 120 patients, and validation set, 150 patients) for *TET2* and *ABCA3* gene expressions, *TET2* exon 2 skipping and *ABCA3* exon 19 skipping. Cutoff values were determined using CutOff Finder in the exploratory set. A transcriptional and post-transcriptional prognostic score (TPS) was defined as the weighed sum of the prognostic impact of each variable significantly associated with event-free survival (EFS).

Results: We identified in the entire cohort: high *TET2* gene expression (HR=0.34, 95CI[0.17 to 0.68], $p<0.0001$), high levels of exon 2 skipping of *TET2* (HR=2.63 [1.30 to 5.32], $p=0.007$) and high *ABCA3* gene expression (HR=2.15 [1.13 to 4.47], $p=0.04$) as independent prognostic factors for EFS. The TPS identified 4 groups of patients with significantly different outcomes and allowed a better prediction of survival than the current risk stratification (concordance index, $c=0.71$ versus 0.56).

Conclusions: The transcriptional profiles of *ABCA3* and *TET2* seem to better predict outcomes in pediatric AML.

INTRODUCTION

Acute myeloid leukemia (AML) is a rare hematological malignancy in children. Despite improvements in the last decades, its prognosis remains poor. Relapse is the main issue, with over 90% of children achieving complete remission (CR) but 50 to 55% 5-years leukemia-free survival (LFS) rates^{1,2}. Relapse of AML frequently arises from residual leukemic cells with stem cell features³, including self-renewal capacity and increased resistance to treatment. Current treatment strategies in pediatric AML rely on stratification of patients according to their relapse risk. Such strategies are effective but some patient escape accurate risk prediction, hence the need for new prognostic biomarkers.

Alternative splicing is a hallmark of cancer cell⁴ that has been poorly assessed in pediatric cancer. However, it can yield some interesting prognostic and predictive factors, such as CD33 splice variants in resistance to gemtuzumab-ozogamicin⁵. Comparing alternative exon usages between remitted and non-remitted patients, we previously identified *TET2* exon 2 skipping and *ABCA3* exon 19 skipping⁶ as prognostic events in adult AML, while both *TET2* and *ABCA3* gene expression levels had no impacts, and confirmed an independent prognostic impact of *TET2* exon 2 skipping⁷. *TET2* is a DNA demethylase⁸ with associated epigenetic modulation roles⁹. *TET2* is particularly expressed during hematopoiesis, with a progressive silencing along the differentiation process¹⁰. *TET2* mutations are frequent events in adult myeloid malignancies¹¹, but far less frequent in children¹². *ABCA3* is a multidrug resistance protein overexpressed in AML cells¹³, especially in leukemic progenitors¹⁴. *ABCA3* expression has been previously shown to counteract the cytotoxicity of anthracyclines, mitoxantrone, etoposide, cytarabine, vincristine, and rituximab^{15–17} by strengthening

drug efflux from leukemic cells or sequestering cytostatic drugs to endosomal organelles¹⁸. In pediatric AML, we previously identified a negative prognostic impact conferred by a high *ABCA3* gene expression level (Ceraulo et al. submitted to *Blood Advances*) and a high exon 19 skipping rate (Ceraulo et al., in redaction). Altogether, these data prompt us to evaluate the prognostic impact of the transcriptomic and post-transcriptomic profiles of *TET2* and *ABCA3* in pediatric AML.

METHODS

Patients

The ELAM02 trial¹⁹ (NCT00149162) included 438 patients under 18 years with *de novo* non-promyelocytic AML and without Down syndrome and treated with intensive chemotherapy without gemtuzumab-ozogamicin (GO). 270 diagnostic samples were obtained, based on the availability of RNA at diagnosis. RT-qPCR experiments were initially performed on a randomly selected group of 120 samples (exploratory set), and the 150 additional samples were used as an internal confirmatory set. For each sample, total RNA was extracted using miRNeasy MiniKit (Qiagen®) and underwent reverse transcription using the high-capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystem®) according to the manufacturer's instructions. Diagnostic and survival data were extracted from the trial database. All parents and patients included in the study gave signed informed consent for ancillary studies, according to the declaration of Helsinki. This research was approved by an independent ethics committee. All authors had access to the primary clinical and biological data.

RT-qPCR

Gene sequences were extracted from the FasterDB® database (<https://fasterdb.lyon.unicancer.fr/faster/home.pl>). Known splice variants were

considered for primer design (Supplementary Figure 1) using Primer3web 4.0.0 software (www.bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/). Primers were manufactured by Eurogentec® and delivered as 100-μM water solutions. iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) was used for real-time quantification of amplicons according to the manufacturer's instructions. Cycling reactions were performed with a C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad) and fluorescence signals measured with a CFX96® Real-Time System (Bio-Rad). Data were processed with CFX Manager™ software v3.1 (Bio-Rad). Relative quantification of each target was performed according to the method described by Pfaffl²⁰, using *GUS* and *ABL1* as references²¹. RT-qPCR data were expressed in arbitrary units (a.u.) and compared to that derived from the cell line KG1²². Data were then processed for statistical analyses. Primers sequences and PCR cycling conditions are available in Supplemental Table 1.

Statistics

OS was defined as the time period from diagnosis to death from any cause. Event-free survival (EFS) was defined as the time period from diagnosis to treatment failure, relapse, or death. LFS was defined as the time period from achievement of CR to the date of relapse or death. Patients who remained alive were censored at the last follow-up visit. Patients receiving hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) were not censored at the time of transplantation. Associations between categorical variables were analyzed using Fisher's exact test. Central tendency differences between groups were compared using a two-sample Student's *t*-test or Mann–Whitney test if the distribution of values was not normal. For categorical and survival analyses, RT-qPCR values were dichotomized using the best cutoff value determined using the free software Cutoff Finder (<http://molpath.charite.de/cutoff/>)²³, which optimizes the correlation of the dichotomization with respect to an outcome or survival variable.

Survival rates were calculated using the Kaplan–Meier method. Log-rank tests were used to compare survival rates between groups. To identify independent prognostic factors, multivariate analyses were performed using a Cox proportional hazards model. A stepwise backward procedure was used with a threshold significance level of $P \leq 0.10$ to select factors in the model. All tests were two-sided. The final type I error rate was fixed at 0.05 to identify factors associated with “time-to-event” outcomes. Our transcriptional and post-transcriptional prognostic score (TPS) value was the weighed sum of the prognostic impact (1 for adverse and 0 for good prognosis) of each variable significantly associated with LFS in the combined multivariate analysis. TPS prediction performances were finally compared to that of the current risk stratification with the concordance index (Harrell c). All statistical analyses were performed using SPSS for Windows version 27.0 (IBM Corp.) and GraphPad Prism for Windows version 6.00 (GraphPad Software). The Sankey diagram was build using the Sankey Diagram Generator (www.sankey-diagram-generator.acquireprocure.com).

RESULTS

Prognostic impact of TET2 expression at diagnosis.

Diagnostic RNA samples from 270 patients were referenced as the entire pediatric dataset, which was representative of the entire trial cohort (Supplemental Table 2). A total of 120 patients were randomly selected to create an exploratory set, and the remaining 150 were used for internal validation. The two cohorts were similar in criteria except for an excess of core binding factor (CBF)-AML in the validation set (Supplemental Table 3). Quantification of *TET2* expression was carried out by RT-qPCR targeting constitutive exon 4, shared by all *TET2* alternative splice isoforms. In the exploratory set, a cutoff value of 6.70 a.u. defined a group of patients ($n = 18/120$, 15%) with low *TET2* expression that displayed worse outcomes in terms of LFS (Figure 1A), and OS (Supplemental Figure 1A). Similar results were obtained with the validation cohort (Figures 1B and Supplemental Figure 1B) with fewer patients ($n=17/148$, 11.5%) with low *TET2* expression and 2 additional patient samples displayed PCR failure. This may stem from a lower number of standard-risk patients (Supplemental Table 3) in the exploratory set (29 [24%]) than in the validation set (64 [44%]). Overall, patients with low *TET2* expression ($n = 35/268$, 13%) displayed significantly worsened OS (Figure 1C), LFS (Figure 1D) and EFS (Supplementary Figure 1C). Multivariate analyses (Table 1) revealed an independent prognostic impact of *TET2* expression, along with risk stratification and age.

The comparisons of clinical and biological characteristics between high and low *TET2* expressers revealed significantly less standard-risk group patients with low *TET2* expression, mainly CBF-AML and less *CEBPA* double-mutation, and significantly more high-risk patients (Table 2). According to the risk stratification used in the ELAM02 trial

(described in Supplemental Table 4), *TET2* expression had a negative impact in standard-, intermediate-, and high-risk patients, reaching statistical significance in intermediate patients (Supplementary Figures 1D-E-F).

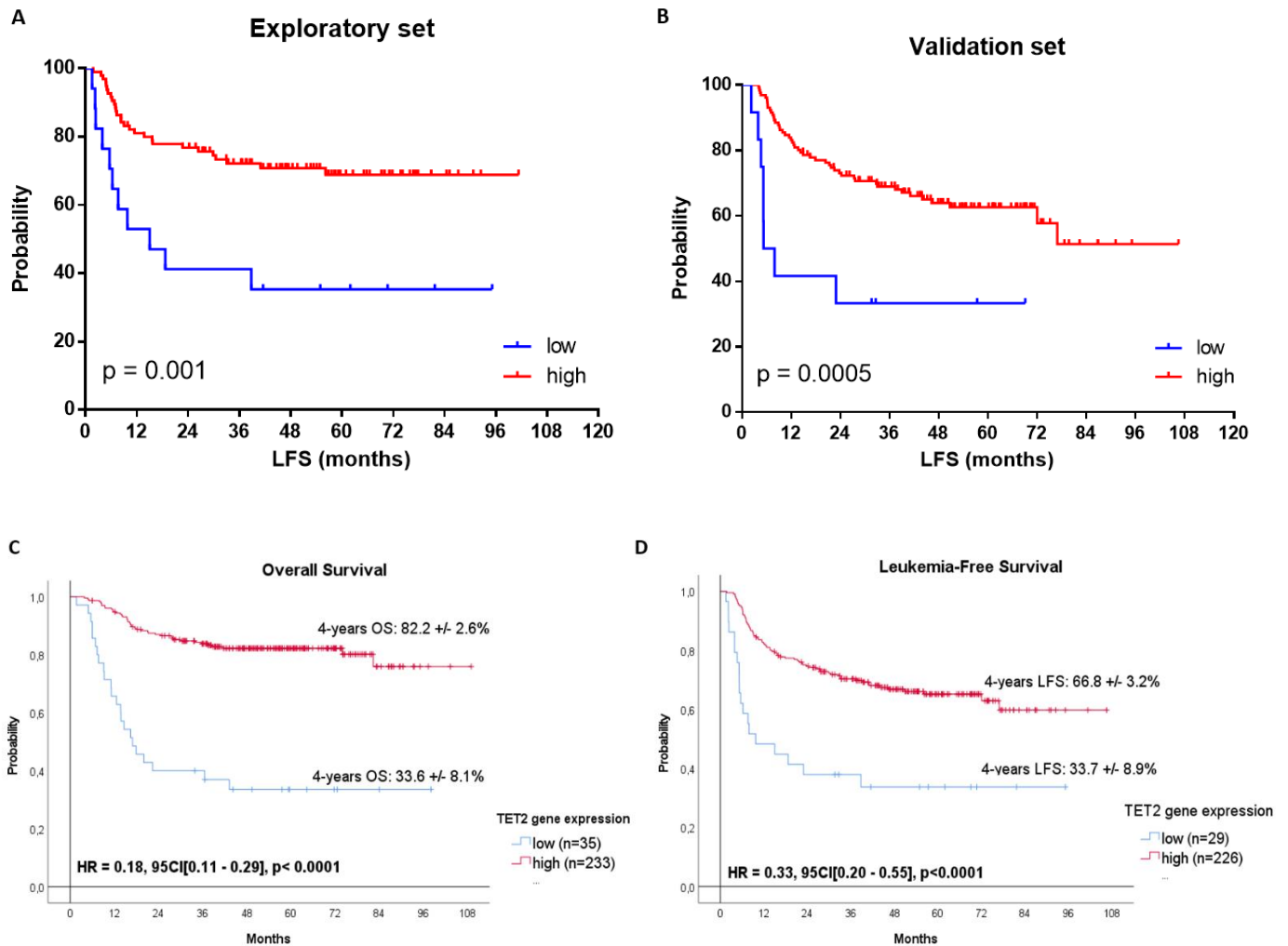


Figure 1. Survival impact of *TET2* expression in pediatric AML. Kaplan-Meier curves of leukemia-free survival (LFS) in the exploratory (A) and validation (B) sets. Overall survival (OS) and LFS in the entire set (C and D). Patients with high (red curves) and low (blue curves) *TET2* expression were separated with the best determined cutoff value of 6.70 a.u. *Hazard ratios (HR)* were computed with 95% confidence intervals (95CI).

	Overall Survival			Leukemia-Free Survival		
	HR	95CI	p	HR	95CI	p
TET2 gene expression (> 6.7 au)	0.17	0.10 - 0.29	<0.0001	0.28	0.17 - 0.46	<0.0001
Riskgroup	1.58	1.07 - 2.33	0.022	-	-	NS
Age (> 6 yo)	2.32	1.28 - 4.21	0.006	2.18	1.34 - 2.53	0.002
Leukocytes (> 30 G/L)	1.96	1.20 - 3.22	0.007	1.54	1.02 - 2.33	0.038

	Overall Survival			Leukemia-Free Survival		
	HR	95CI	p	HR	95CI	p
TET2ES ratio (> 1.12 au)	1.77	1.00 - 3.13	0.05	1.89	1.19 - 3.00	0.007
Riskgroup	1.63	1.14 - 2.34	0.008	-	-	NS
Age (> 6 yo)	2.29	1.26 - 4.14	0.006	2.21	1.35 - 3.61	0.002
Leukocytes (> 30 G/L)	2.02	1.24 - 3.14	0.005	1.61	1.07 - 2.42	0.023

Table 1. Multivariate analyses for *TET2* gene expression and exon 2 skipping. Cox proportional hazard models factoring variables with a $P \leq 0.10$ in univariate analyses. *a.u.* (arbitrary units), *HR* (hazard ratio), *CI95* (95% confidence interval).

	High <i>TET2</i> expressers (n=233)	Low <i>TET2</i> expressers (n=35)	<i>P</i> -value
<i>Clinical features</i>			
Median age in years [Min-Max]	9.2 [0.16-17.33]	12.4 [0.25-17.9]	0.38
M/F ratio	1.2	1.8	0.31
Median WBC [Min-Max] (G/L)	16.4 [1.3-575]	14.1 [1.2-250]	0.96
Median medullar blast percentages [Min-Max]	65% [1-99]	83% [21-97]	0.02
CNS involvement	40 (17.6%)	4 (9.5%)	0.26
<i>Cytogenetics</i>			
Normal karyotype	66 (29.2%)	10 (23.8%)	0.58
CBF-AML	71 (31.4%)	3 (7.1%)	0.0006
<i>KMT2A</i> rearranged-AML	41 (18.1%)	12 (28.6%)	0.14
<i>Mutations</i>			
<i>FLT3</i> -ITD	24 (10.6%)	6 (14.3%)	0.43
<i>NPM1</i>	20 (8.8%)	2 (4.8%)	0.55
<i>CEBPA</i> double-mutation	5 (18.5%)	1 (2.4%)	0.03
<i>Risk stratification</i>			
Standard risk	89 (39.4%)	4 (9.5%)	0.0001
Intermediate risk	75 (33.2%)	19 (45.25%)	0.160
High risk	62 (27.4%)	19 (45.25%)	0.03
<i>Results</i>			
CR rate	217 (95.6%)	35 (83.3%)	0.008
Relapse rate	69 (31.8%)	17 (48.6%)	0.06
HSCT	64 (28.2%)	15 (35.7%)	0.36
5-year OS $\pm$ SE	82.2 $\pm$ 2.6%	33.6 $\pm$ 8.1%	< 0.001
5-year LFS $\pm$ SE	65.2 $\pm$ 3.4%	33.7 $\pm$ 8.9%	< 0.001

Table 2. Main clinical and biological features between patients with high ($n = 233$) and low ($n = 35$) *TET2* expression in the entire patient set. Fisher's exact tests were used for comparing categorical variables, Mann-Whitney tests for numerical variables, and log-rank tests for survival variables. *M* (male), *F* (female), *WBC* (white blood cells), *Min* (minimum), *Max* (maximum), *CNS* (central nervous system), *AML* (acute myeloid leukemia), *CBF* (core binding factor), *ITD* (internal-tandem duplication), *CR* (complete remission rate), *HSCT* (hematopoietic stem cell transplant), *OS* (overall survival), *LFS* (leukemia-free survival), *SE* (standard error).

Prognostic impact of TET2 exon 2 skipping at diagnosis.

The quantification of *TET2* exon 2 inclusion rate was assessed as previously described⁷. In the exploratory set, a cutoff value of 1.12 defined a group of patients ($n=61/120$) with high *TET2* exon 2 skipping, which while not reaching statistical significance, showed a trend toward worse outcomes in terms of LFS (Figure 2A) and OS (Supplementary Figure 2A). Accordingly, this prognostic effect on LFS was statistically significant in the validation cohort (Figure 2B and Supplementary Figure 2B). Overall, patients with low *TET2* exon 2 skipping ($n = 175/270$, 65%) displayed significantly worsened OS (Figure 2C) and LFS (Figure 2D). Multivariate analyses (Table 1) revealed an independent prognostic impact of *TET2* exon 2 skipping, along with risk stratification, white blood cell counts at diagnosis, and age.

The comparisons of clinical and biological characteristics between patients with high and low *TET2* exon 2 skipping ratio revealed significantly more high-risk group patients with high *TET2* exon 2 skipping. However, our subgroup analyses revealed a limited prognostic impact of *TET2* exon 2 skipping according to the risk stratification used in the ELAM02 trial (Supplemental Table 4), intermediate-risk patients faring less favorably in case of a high *TET2* exon 2 skipping ratio. There was no correlation between *TET2* gene expression and its exon 2 skipping ratio (Spearman $\rho=-0.023$, $p = 0.71$). Hence, we analyzed the prognostic impact of *TET2* exon 2 skipping according to gene expression and revealed that the negative prognostic impact conferred by a high *TET2* exon 2 skipping ratio, was limited to patients exhibiting high *TET2* gene expression levels (Figure 2E-F).

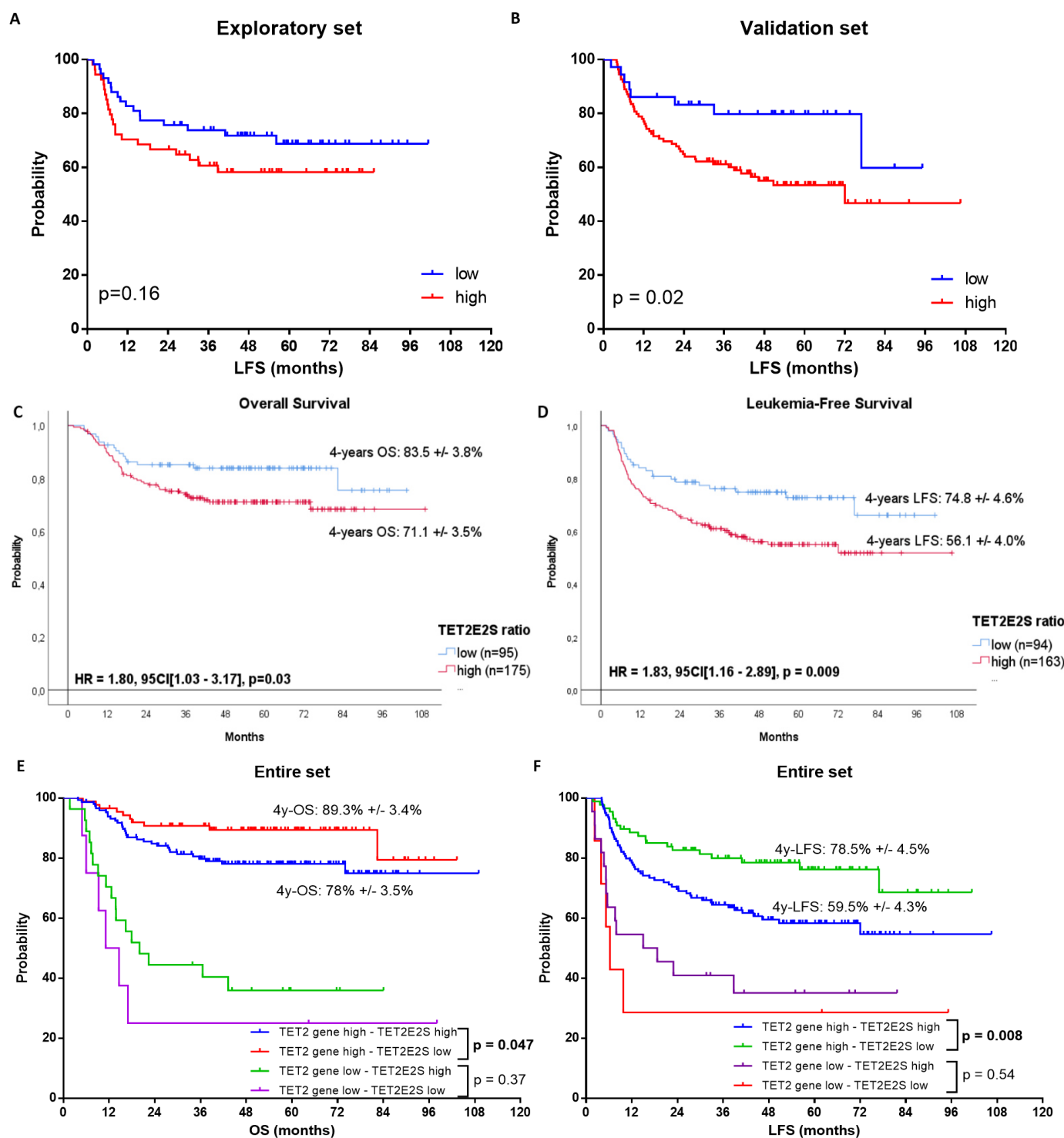


Figure 2. Survival impact of *TET2* exon 2 skipping in pediatric AML. Kaplan-Meier curves of leukemia-free survival (LFS) in the exploratory (A) and validation (B) sets. Overall survival (OS) and LFS in the entire set (C and D). Patients with high (red curves) and low (blue curves) *TET2* exon 2 skipping ratio were separated with the best determined cutoff value of 1.12 a.u. *TET2E2S* ratio kept a prognostic value only in patients with high *TET2* gene expression, for OS (E) and LFS (F). Hazard ratios (HR) were computed with 95% confidence intervals (95CI).

	Low <i>TET2E2S</i> (n=175)	High <i>TET2E2S</i> (n=175)	<i>P</i> -value
<i>Clinical features</i>			
Median age in years [Min-Max]	9.2 [0.16-16.39]	10.3 [0.25 – 10.91]	0.81
M/F ratio	1.38	1.22	0.70
Median WBC [Min-Max] (G/L)	21.9 [1.3 - 445]	13 [1.2 - 575]	0.22
Median medullar blast percentages [Min-Max]	70.5% [15 - 97]	68.5% [1 - 99]	0.65
CNS involvement	21 (22.1%)	23 (13.1%)	0.06
<i>Cytogenetics</i>			
Normal karyotype	33 (34.7%)	43 (24.7%)	0.09
CBF-AML	30 (31.6%)	44 (25.1%)	0.26
<i>KMT2A</i> rearranged-AML	18 (18.9%)	35 (20%)	0.87
<i>Mutations</i>			
<i>FLT3</i> -ITD	9 (9.5%)	21 (12%)	0.69
<i>NPM1</i>	13 (13.7%)	9 (5.1%)	0.02
<i>CEBPA</i> double-mutation	2 (2.1%)	4 (2.3%)	1.00
<i>Risk stratification</i>			
Standard risk	39 (41%)	54 (31%)	0.15
Intermediate risk	39 (41%)	55 (31.6%)	0.18
High risk	17 (18%)	65 (37.4%)	0.0009
<i>Results</i>			
CR rate	92 (96.8%)	161 (92%)	0.19
Relapse rate	20/92 (21.7%)	67/161 (41.6%)	0.0015
HSCT	28.4%	29.7%	0.89
5-year OS $\pm$ SE	83.9 $\pm$ 3.8%	71.1 $\pm$ 3.5%	0.037
5-year LFS $\pm$ SE	72.7 $\pm$ 4.9%	55.1 $\pm$ 4.1%	0.008

Table 3. Main clinical and biological features between patients with high ($n = 175$) and low ($n = 95$) *TET2* exon 2 skipping in the entire patient set. Fisher's exact tests were used for comparing categorical variables, Mann-Whitney tests for numerical variables, and log-rank tests for survival variables. *M* (male), *F* (female), *WBC* (white blood cells), *Min* (minimum), *Max* (maximum), *CNS* (central nervous system), *AML* (acute myeloid leukemia), *CBF* (core binding factor), *ITD* (internal-tandem duplication), *CR* (complete remission rate), *HSCT* (hematopoietic stem cell transplant), *OS* (overall survival), *LFS* (leukemia-free survival), *SE* (standard error).

A transcriptional and post-transcriptional prognostic score (TPS) based on ABCA3 and TET2 transcriptomic profiles.

Using a Cox proportional hazard ratio that included all variables associated with LFS with a p-value ≤ 0.10 , we identified *TET2* gene expression, *TET2* exon 2 skipping, *ABCA3* expression and age (cutoff at 6 years-old) as significant variables. The TPS formula was built as the sum of the weighed prognostic values (1 for good, 0 for adverse) of the β coefficient of the Cox model: $-1.207 \times (\text{TET2 gene expression}) + 0.5 \times (\text{TET2E2S}) + 0.768 \times (\text{ABCA3 gene expression}) + 0.555 \times (\text{Age})$. The TPS identified 3 groups of patients with distinct significant prognosis and improved the prediction of OS (Figure 3A) and LFS (Figure 3B). The prediction inferred by the TPS was superior to the current risk stratification: concordance index for OS, $c=0.70 \pm 0.03$ versus 0.60 ± 0.03 , and for LFS $c=0.66 \pm 0.03$ versus 0.54 ± 0.03 . The Sankey diagram (Figure 3C) shows widespread risk requalification between the ELAM02 risk stratification and the TPS. We manually combined the risk stratification and the TPS and defined new risk categories of patients (Figure 3D): standard-risk (SR+) being patients with low TPS and SR or IR characteristics, intermediate-risk 1 (IR1+) being patients with TPS low and HR features or TPS intermediate with SR features, intermediate-risk 2 (IR2+) being patients with intermediate TPS and IR or HR features and TPS high with IR features, and high-risk (HR+) being patients with high TPS and SR or HR features.

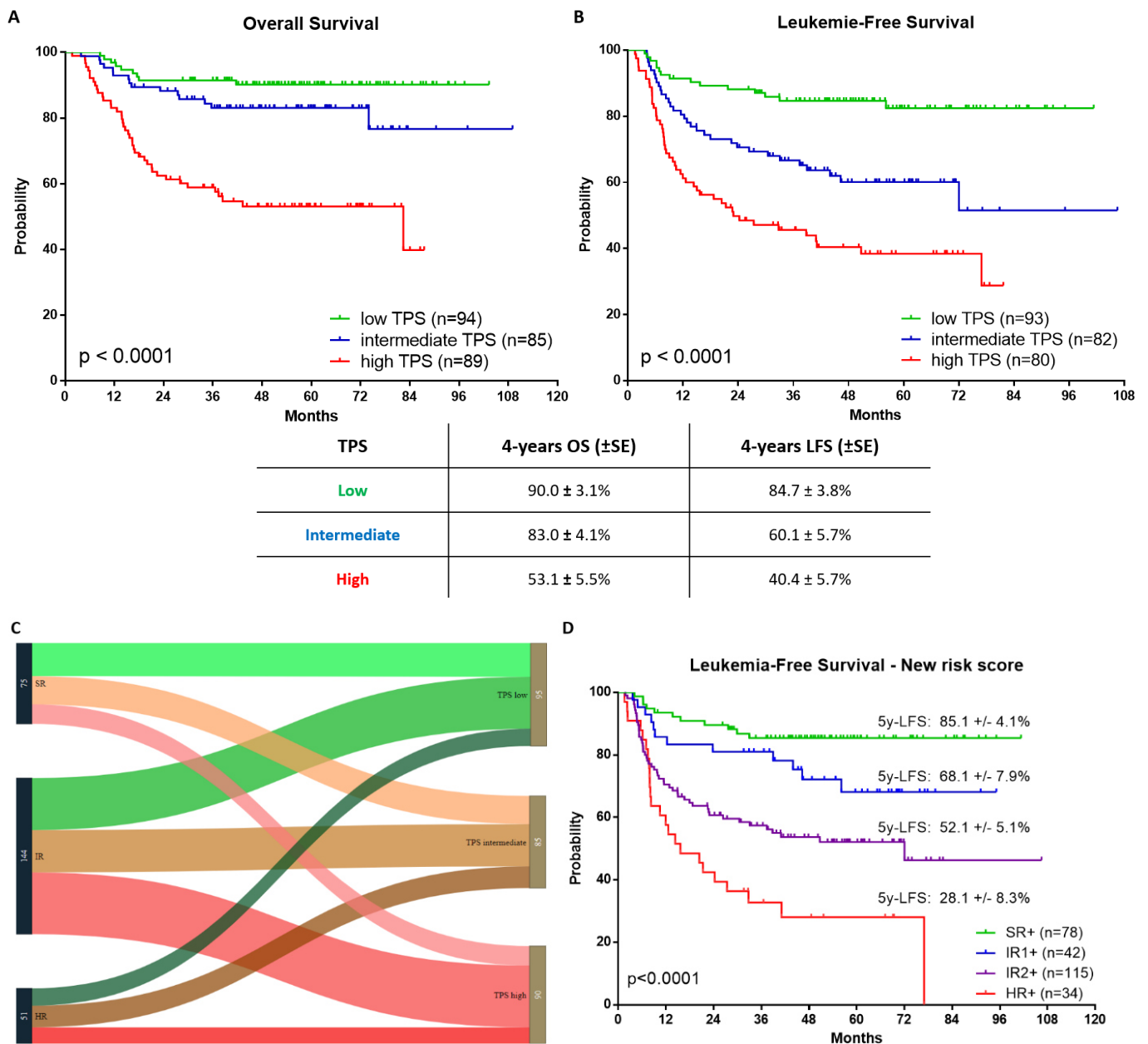


Figure 3. Risk stratification according to the TET2/ABCA3 TPS in pediatric AML. Kaplan-Meier curves overall survival (OS, A) and leukemia-free survival (LFS, B) in the entire set, stratified according to TPS values: low-risk (< -0.4 , green curves), intermediate risk (-0.4 to 0.1 , blue curves) and high risk (> 0.1 , red curves). (C) Sankey diagram representing patients' distribution according to the ELAM02 risk stratification (left panel) and the TPS (right panel). (D) Kaplan-Meier LFS curves according to the new risk score in the ELAM02 cohort: SR+ (green), IR1+ (blue), IR2+ (violet), HR+ (red).

DISCUSSION

The present study examined the combined prognostic impact of *ABCA3* expression and skipping of its exon 19, and *TET2* expression and skipping of its exon 2, in a large cohort of pediatric AML patients at diagnosis. To this end, we used a unique RT-qPCR approach coupled with an automated cutoff selection method. Our results show that pediatric AML with high *TET2* expression or low exon 2 skipping ratio levels correlate with worsened outcomes upon intensive chemotherapy. As *ABCA3* expression and splicing were previously described as adverse prognostic factors (Ceraulo et al. in redaction), we combined the transcriptomic analysis of both *TET2* and *ABCA3* in pediatric AML. The results showed that *TET2* expression, *TET2* exon 2 skipping and *ABCA3* expression but not exon 19 skipping were independently associated with prognosis, along with age at diagnosis. Based on these results, we were able to build a dedicated prognostic score (TPS) which outperformed the current risk stratification based on cytogenetic and molecular features of the disease. With a widespread repartition of patients among risk groups between the two classifiers, we were able to combine them to further improve risk stratification in pediatric AML. Further studies would be needed to confirm the prognostic impact of these biomarkers in pediatric AML and to compare them to refined molecular stratifications¹² or to other prognostic integrated risk scores^{24,25}. The functional impact of *TET2* expression and exon 2 skipping remains to be elucidated, particularly their effects on the DNA methylome and overall epigenetics features of AML cells. Since leukemic stem cells frequently express both *ABCA3* and *TET2*, the TPS might reflect the resistant phenotype of these cells. Future studies considering “stemness signatures,” such as LSC17²⁶, should determine if the TPS only recaps the negative prognostic impact of a high “stemness burden” at diagnosis or if it could be an independent stemness prognostic factor in pediatric AML.

COI statement: The authors declare no conflict-of-interest with the presented data.

Acknowledgments: The authors gratefully thank patient and family associations (APPEL, ARCHE) for funding PCR supplies and the patients and their families who participated in the ELAM02 trial. A.C was supported by ARC (Association de Lutte pour la Recherche Contre le Cancer); F.M. was supported by INSERM. E.W. was supported by Hospices Civils de Lyon and Lyon I University (France).

REFERENCES:

1. Zwaan CM, Kolb EA, Reinhardt D, et al. Collaborative efforts driving progress in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2015;33(27):2949-2962. doi:10.1200/JCO.2015.62.8289
2. Creutzig U, Heuvel-Eibrink MM van den, Gibson B, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2012;120(16):3187-3205. doi:10.1182/blood-2012-03-362608
3. Shlush LI, Mitchell A, Heisler L, et al. Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature.* 2017;547(7661):104-108. doi:10.1038/nature22993
4. Urbanski LM, Leclair N, Anczuków O. Alternative-splicing defects in cancer: Splicing regulators and their downstream targets, guiding the way to novel cancer therapeutics. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2018;9(4):1-36. doi:10.1002/wrna.1476
5. Lamba JK, Chauhan L, Shin M, et al. CD33 Splicing Polymorphism Determines Gemtuzumab Ozogamicin Response in De Novo Acute Myeloid Leukemia : Report From Randomized Phase III Children ' s Oncology Group Trial AAML0531. *J Clin Oncol.* 2017;35. doi:10.1200/JCO.2016.71.2513
6. Mohamed AM, Balsat M, Thenoz M, et al. Oncogene- and drug resistance-associated alternative exon usage in acute myeloid leukemia (AML). *Oncotarget.* 2015. doi:10.18632/oncotarget.3898
7. Mohamed AM, Balsat M, Koering C, et al. TET2 exon 2 skipping is an independent favorable prognostic factor for cytogenetically normal acute myelogenous leukemia (AML). *Leuk Res.* 2017;56:21-28. doi:10.1016/j.leukres.2017.01.012
8. Iyer LM, Tahiliani M, Rao A, Aravind L. Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell Cycle.* 2009;8(11):1698-1710. doi:10.4161/cc.8.11.8580
9. Chen Q, Chen Y, Bian C, Fujiki R, Yu X. TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature.* 2013;493(7433):561-564. doi:10.1038/nature11742
10. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, et al. Tet2 Loss Leads to Increased Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Myeloid Transformation. *Cancer Cell.* 2011;20(1):11-24. doi:10.1016/j.ccr.2011.06.001
11. Delhommeau F, Dupont S, Valle V Della, et al. Mutation in TET2 in Myeloid Cancers.

- N Engl J Med. 2009;360(22):2289-2301. doi:10.1056/NEJMoa0810069
12. Marceau-Renaut A, Duployez N, Ducourneau B, et al. Molecular Profiling Defines Distinct Prognostic Subgroups in Childhood AML: A Report from the French ELAM02 Study Group. *HemaSphere*. 2018;2(1). doi:10.1097/HS9.0000000000000031
 13. Wulf GG, Modlich S, Inagaki N, et al. ABC transporter ABCA3 is expressed in acute myeloid leukemia blast cells and participates in vesicular transport. *Haematologica*. 2004;89(11):1395-1397.
 14. Norwood K, Wang RY, Hirschmann-Jax C, et al. An in vivo propagated human acute myeloid leukemia expressing ABCA3. *Leuk Res*. 2004;28(3):295-299. doi:10.1016/j.leukres.2003.08.006
 15. Chapuy B, Koch R, Radunski U, et al. Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration. *Leukemia*. 2008;22(May):1576-1586. doi:10.1038/leu.2008.103
 16. Chapuy B, Panse M, Radunski U, et al. ABC transporter A3 facilitates lysosomal sequestration of imatinib and modulates susceptibility of chronic myeloid leukemia cell lines to this drug. *Haematologica*. 2009;94(11):1528-1536. doi:10.3324/haematol.2009.008631
 17. Hupfeld T, Chapuy B, Schrader V, et al. Tyrosinekinase inhibition facilitates cooperation of transcription factor SALL4 and ABC transporter A3 towards intrinsic CML cell drug resistance. *Br J Haematol*. 2013;161(2):204-213. doi:10.1111/bjh.12246
 18. Aung T, Chapuy B, Vogel D, et al. Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(37):15336-15341. doi:10.1073/pnas.1102855108
 19. Petit A, Ducassou S, Leblanc T, et al. Maintenance Therapy With Interleukin-2 for Childhood AML. *HemaSphere*. 2018;6(September):1. doi:10.1097/hs9.0000000000000159
 20. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):16-21. doi:10.1093/nar/29.9.e45
 21. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
 22. Koefler HP, Golde DW. Acute myelogenous leukemia: A human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science* (80-). 1978;200(4346):1153-1154.

doi:10.1126/science.306682

23. Budczies J, Klauschen F, Sinn B V., et al. Cutoff Finder: A Comprehensive and Straightforward Web Application Enabling Rapid Biomarker Cutoff Optimization. PLoS One. 2012;7(12):1-7. doi:10.1371/journal.pone.0051862
24. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2016;374(23):2209-2221. doi:10.1056/nejmoa1516192
25. Hecht A, Doll S, Schaarschmidt H, et al. Validation of a Molecular Risk Score for Prognosis of Patients with Acute Promyelocytic Leukemia. Blood. 2016;128(22):1668 LP - 1668. <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/1668.abstract>.
26. Ng SWK, Mitchell A, Kennedy JA, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. Nature. 2016;540(7633):433-437. doi:10.1038/nature20598

SUPPLEMENTARY DATA :

Gene (Ensembl)		Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')	Amplicon (length, T _m)	Elongation T°C	Standard- curve R ²	PCR efficiency
GUS ENSG00000169919		TGGTAGGGGAGAACCACTTG	GGTAGCAATTTCCCAAAGCA	101 bp 77°C	52°C	0.997	90.7%
ABL1 ENSG00000097007		TGGTAGGGGAGAACCACTTG	GGTAGCAATTTCCCAAAGCA	194 bp 85,5°C	61°C	0.993	100.2%
TET2 ENSG000 00168769	Gene	ACCTCAAGCATAACCCACCA	TTCCGCTTGGTGAAAACGAG	197 bp 83,5°C	59°C	0.998	100%
	Exon 2 – Exon 3	CGACTGCAACTGCTGGATT	TGCTTCCAAGCGTTGTAAGT	126 bp 84°C	60°C	0.997	100%
	Exon 1 – Exon 3	TCTGAGGGCTGGCAAACATT	TCATGTCCTATTGGCTGCTG	121 bp 83°C	60°C	0.998	97.5%
ABCA3 ENSG000 00167972	Gene	CCTTCAACCACAGCAAGGAG	TTGGGAAAAGCGGGAAAAGG	156 bp 83.5°C	62°C	0.992	103%
	Exon 19 - 20	CACCACCATGGAGGAAGTCT	CTCGATGAGGGCTCCAATG	181 bp 88.8°C	61°C	0.997	100%
	Exon 18 - 20	ATCACATGACGCTGGTGAAG	CTTCCCGACCCTGTGCGTGC	152 bp 58°C	61°C	0.995	101%

Supplementary Table 1. qPCR experiments characteristics. *bp* (base pair), *T_m* (melting temperature)

	ELAM02 cohort (N=438)	Overall study cohort (N=270)	p-value
Clinical features			
Median age in years [Min-Max]	8.2 [0 – 18.6]	9.8 [0.16 – 17.9]	0.09
M/F ratio	1.19	1.27	0.70
Median WBC [Min-Max] (G/L)	15.4 [0.40 - 575]	16.1 [1.2 - 575]	0.74
Median medullar blast percentages [Min-Max]	66% [0 - 99]	67.5% [1 - 99]	0.46
CNS involvement	70 (16%)	44 (16.3%)	0.92
Cytogenetics			
Normal karyotype	112 (26.6%)	76 (25.1%)	0.48
CBF-AML	95 (21.7%)	74 (21.5%)	1.00
KMT2A rearranged-AML	94 (21.5%)	53 (19.6%)	0.63
Mutations			
FLT3-ITD	41 (9.4%)	30 (11.1%)	0.40
NPM1	32 (7.3%)	22 (8.1%)	0.67
CEBPA double-mutation	9 (2.1%)	6 (2.2%)	1.00
Risk stratification			
Standard risk	97 (22.2%)	75 (27.8%)	0.10
Intermediate risk	235 (53.7%)	144 (53.3%)	0.94
High risk	108 (24.7%)	51 (18.9%)	0.08
Results			
CR rate	405 (92.5%)	253 (93.7%)	0.65
Relapse rate	160 (36.5%)	92 (34.1%)	0.52
HSCT	119 (27.2%)	79 (29.3%)	0.55
5-years OS $\pm$ SE	70.2% $\pm$ 2.6%	74.4% $\pm$ 3.2%	0.31
5-years LFS $\pm$ SE	54.1% $\pm$ 3.1%	58.8% $\pm$ 3.9%	0.24

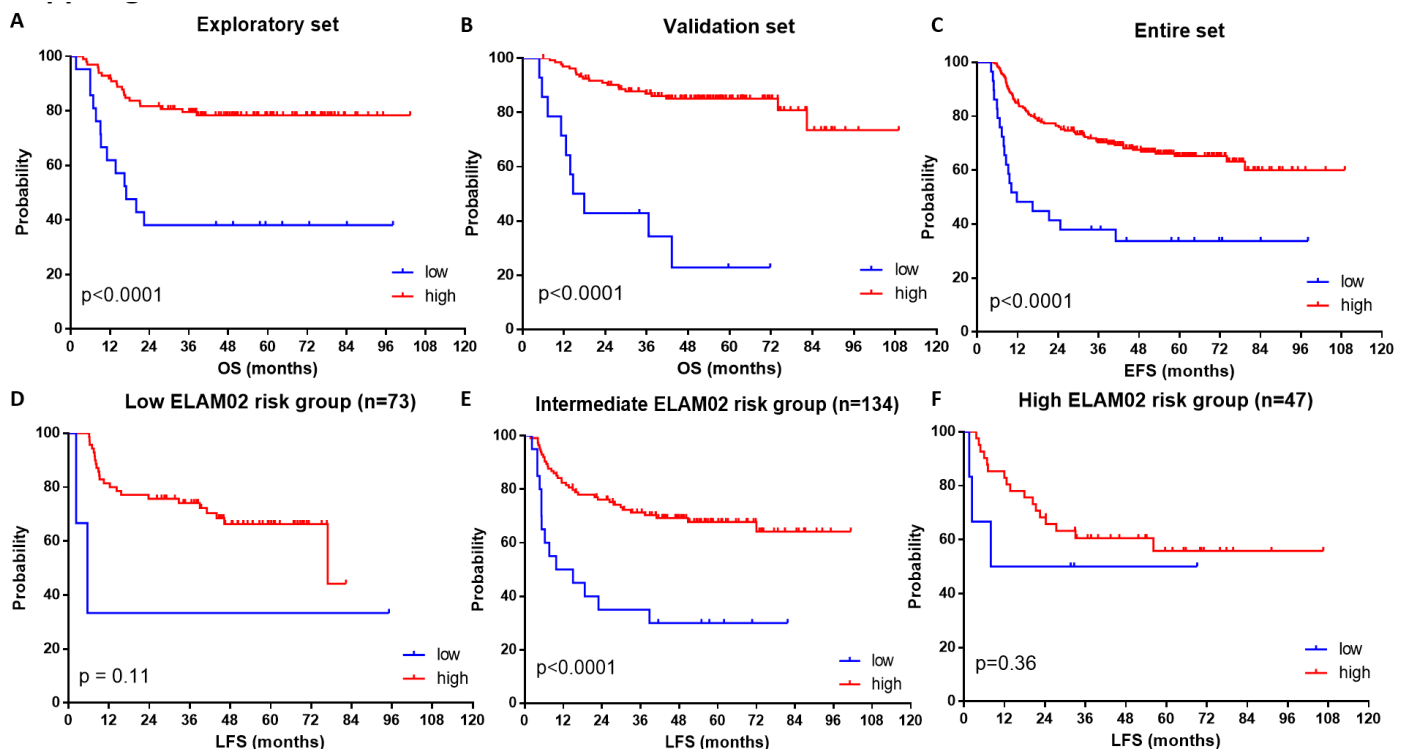
Supplementary Table 2. Main clinical and biological features of the ELAM02 trial (N=438) and the entire patient set (N=270). Fisher's exact tests were used for comparing categorical variables, Mann-Whitney's tests for numerical variables and log-rank tests for survival variables. *M* (male), *F* (female), *WBC* (white blood cells), *Min* (minimum), *Max* (maximum), *CNS* (central nervous system), *AML* (acute myeloid leukemia), *CBF* (core-binding factor), *ITD* (internal-tandem duplication), *CR* (complete remission), *HSCT* (hematopoietic stem cell transplant), *OS* (overall survival), *LFS* (leukemia-free survival), *SE* (standard-error).

	Exploratory set (N=120)	Validation set (N=150)	p-value
Clinical features			
Median age (years), range	9.4 [0.2 - 17.2]	10 [0.4 - 17.9]	0.97
M/F ratio	1.26	1.27	1.00
Median WBC (G/L), range	19.3 [1.2 - 575]	13.6 [1.3 - 514]	0.10
Median medullar blast percentage	73.5% [1 - 98]	65% [1 - 99]	0.23
CNS involvement	22 (18%)	22 (15%)	0.51
Cytogenetics			
Normal karyotype	39 (32%)	37 (25%)	0.18
CBF-AML	20 (16.7%)	54 (36%)	0.001
<i>KMT2A</i> rearranged-AML	20 (16.7%)	33 (22%)	0.29
Anomalies moléculaires			
<i>FLT3</i> -ITD	12 (10%)	18 (12%)	0.70
<i>NPM1</i> muté	14 (12%)	8 (5%)	0.07
<i>CEBPA</i> double-mutation	2 (2%)	4 (3%)	0.70
Risk stratification			0.003
Standard risk	29 (24%)	64 (44%)	0.002
Intermediate risk	53 (44%)	42 (28%)	0.007
High risk	38 (32%)	44 (29%)	0.70
Results			
CR	108 (90%)	145 (97%)	0.04
Relapse	33/108 (31%)	54/145 (37%)	0.29
HSCT	38 (32%)	41 (27%)	0.50
5-years OS $\pm$ SE	70.8% $\pm$ 5.1%	77.2% $\pm$ 4.1%	0.33
5-years LFS $\pm$ SE	62.0% $\pm$ 5.9%	56.7% $\pm$ 5.1%	0.44

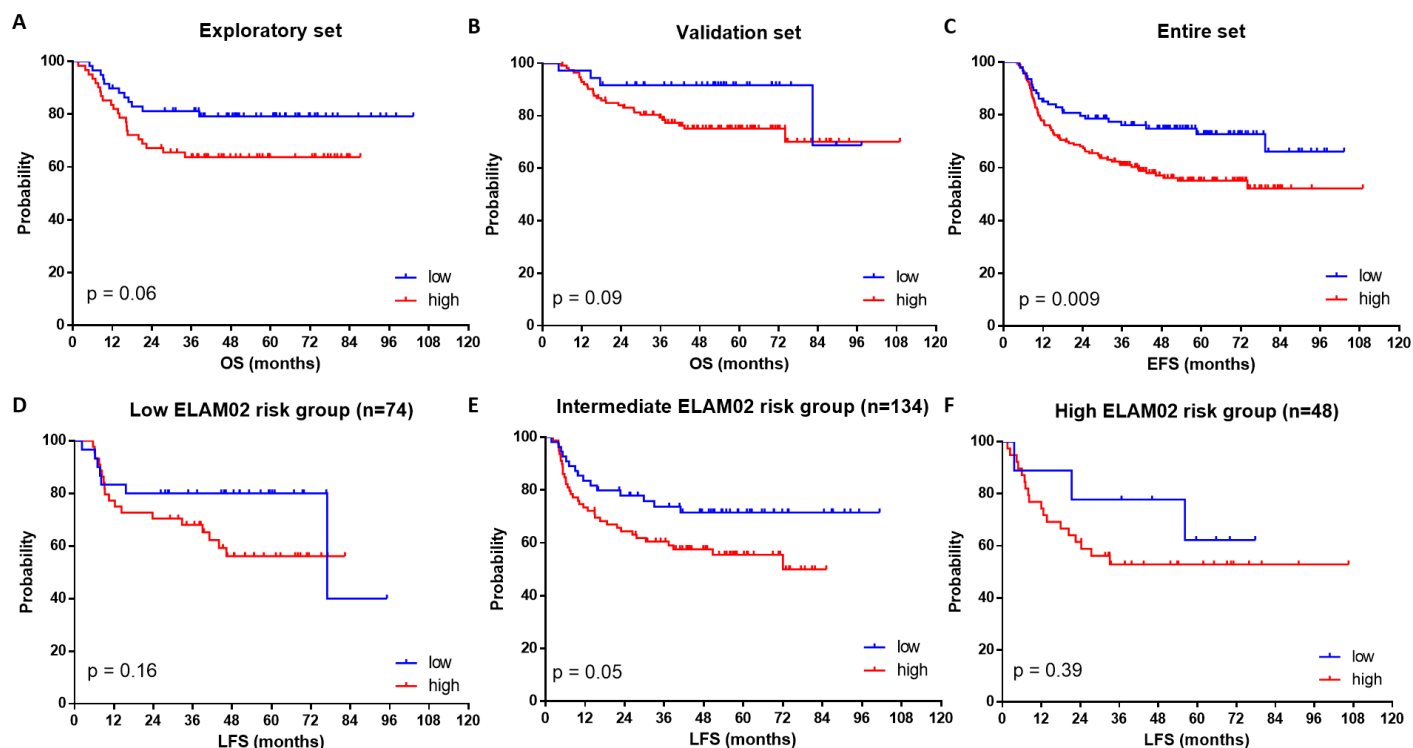
Supplementary Table 3. Main clinical and biological features of the exploratory (N=120) and the validation (N=150) sets. Fisher's exact tests were used for comparing categorical variables, Mann-Whitney's tests for numerical variables and log-rank tests for survival variables. *M* (male), *F* (female), *WBC* (white blood cells), *Min* (minimum), *Max* (maximum), *CNS* (central nervous system), *AML* (acute myeloid leukemia), *CBF* (core-binding factor), *ITD* (internal-tandem duplication), *CR* (complete remission rate), *HSCT* (hematopoietic stem cell transplant), *OS* (overall survival), *LFS* (leukemia-free survival), *SE* (standard-error).

	ELAM02 protocol
Standard risk	. t(8;21)(q22;q22.1);<i>RUNX1-RUNX1T1</i> or inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11 WITH MRD log reduction > 3-fold after course 2 . t(1;11)(q21;q23);<i>MLL-MLLT11(AF1Q)</i> . Normal karyotype and <i>NPM1</i> mutation with no <i>FLT3-ITD</i> mutation . Normal karyotype and <i>CEBPA</i> bi-allelic mutation with no <i>FLT3-ITD</i> mutation . t(9;11)(p21-22;q23) isolated AND WBC < 50 G/L AND CNS1
Intermediate risk	Every anomaly not categorized as SR or HR
High risk	. -7, -5, abn(5q) . inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2);<i>GATA2-MECOM</i> . t(10;11)(p12;q23);<i>MLL-MLLT10(AF10)</i> . t(10;11)(p11.2;q23);<i>ABI1-KMT2A</i> . t(6;11)(q27;q23);<i>MLL-MLLT4(AF6)</i> . t(6;9)(p23;q34);<i>DEK-NUP214</i> . Complex karyotype . treatment-related leukemia . secondary leukemia . no CR after course 2 . <i>FLT3-ITD</i> mutation AND mutated/wild-type ratio > 0.40

Supplementary Table 4. Risk group stratification strategies applied to AML patients. *SR* (standard risk), *IR* (intermediate risk), *HR* (high risk), *CR* (complete remission), *WBC* (white blood cells), *CNS* (central nervous system).



Supplementary Figure 1. Survival impact of *TET2* expression in pediatric AML. Kaplan-Meier curves of overall survival (OS) in the exploratory (A) and validation (B) sets. Event-free survival (EFS) in the entire set (C). Subgroup analyses of leukemia-free survival (LFS) in the entire set in patients stratified as low (D), intermediate (E) and high-risk (F). Patients with high (red curves) and low (blue curves) *TET2* expression were separated with the best determined cutoff value of 6.70 a.u.



Supplementary Figure 2. Survival impact of *TET2* exon 2 skipping in pediatric AML. Kaplan-Meier curves of overall survival (OS) in the exploratory (A) and validation (B) sets. Event-free survival (EFS) in the entire set (C). Subgroup analyses of leukemia-free survival (LFS) in the entire set in patients stratified as low (D), intermediate (E) and high-risk (F). Patients with high (red curves) and low (blue curves) *TET2E2S* were separated with the best determined cutoff value of 1.12 a.u

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'analyse de la littérature actuelle a montré que, bien que de nets progrès aient été obtenus dans le traitement des LAM, leur pronostic reste sombre, tant chez l'enfant que chez l'adulte. Les traitements les plus intensifs, notamment la TCSH, étant grevé de lourdes toxicités, la rationalisation du traitement selon des facteurs pronostiques de réponses identifiés au diagnostic a toute sa place dans la prise en charge des LAM. Actuellement, les axes d'amélioration du pronostic reposent sur : les thérapies innovantes, le suivi de la réponse de la maladie au traitement et l'optimisation de la stratification pronostique au diagnostic. Par ailleurs, des modifications des profils d'épissage alternatif accompagnent le développement des LAM. L'étude des patrons d'épissage peut être la source de nouveaux facteurs pronostiques ou de nouvelles vulnérabilités des cellules cancéreuses.

Dans cette optique, notre équipe a travaillé sur les LAM et, dans la comparaison des événements d'épissage associés à la résistance au traitement, nous avons identifié ABCA3, une protéine de la famille des ABC transporteurs. ABCA3 est physiologiquement impliquée dans la production du surfactant pulmonaire mais de nombreuses études ont identifié un rôle pour cette protéine dans les hémopathies malignes. Elle est notamment exprimée dans les CSLs, contingent de cellules quiescentes dont sont issues la plus grande partie des rechutes de LAM. Si l'impact pronostique de son expression est bien établi dans les LMC et les LAL, il reste débattu dans les LAM, certaines études identifiant un impact pronostique négatif conféré par une forte expression d'ABCA3, d'autres ne trouvant aucun impact.

Par analyse PCR quantitative avec sélection automatisée de valeur-seuil sur deux grandes séries de patients adultes et pédiatriques, nous avons pu étudier l'impact pronostique de l'expression d'ABCA3 dans les LAM. Chez l'adulte, nous avons identifié une tendance à des survies inférieures chez les patients avec forte expression d'ABCA3. Néanmoins, aucun impact pronostique n'a été identifié chez les patients traités par chimiothérapie intensive, ce qui conforte les données précédemment publiées (Mohamed et al. 2015). Cependant, les patients traités par GO dans cet essai avaient des survies significativement diminuées en cas de forte expression d'ABCA3. Il s'agit de la première identification d'ABCA3 comme un facteur prédictif de la réponse au GO. De plus, les analyses en sous-groupes suggèrent un impact plus prononcé chez les patients de risque standard, qui par ailleurs sont ceux qui bénéficient le plus du traitement par GO.

Chez l'enfant, nous avons également identifié un fort impact pronostique défavorable indépendant conféré par une expression élevée d'*ABCA3*, avec des taux plus faibles de rémission complète, plus de rechute, et des survies globales et sans leucémie diminuées. Cet impact pronostique semble restreint aux patients âgés de plus de 2 ans et aux patients de risque standard. La proportion de patients avec expression élevée d'*ABCA3* était plus importante chez l'adulte que chez l'enfant.

In vitro, dans des lignées cellulaires HAP1 invalidées pour l'expression d'*ABCA3* et HEK293T surexprimant transitoirement *ABCA3*, nous avons mise en évidence une corrélation positive entre l'expression d'*ABCA3* et la résistance à la doxorubicine. Contrairement aux études de l'équipe de Chapuy (B Chapuy et al. 2008; Koch et al. 2016), nous avons plutôt identifié une diminution de la doxorubicine intra-cellulaire en cas d'expression d'*ABCA3*. Cette différence peut s'expliquer par les temps d'incubation et types d'incubation (continue ou pulsée) différents et le modèle cellulaire plus sensible que nous avons utilisé. *In fine*, la doxorubicine apparaît bien captée dans le compartiment lysosomal puis expulsée de la cellule par exocytose. Nos modèles cellulaires n'exprimant pas le CD33, il n'a pas été possible d'étudier les mécanismes qui sous-tendent la résistance au GO. Cependant, nous avons mis en évidence une corrélation inverse entre expression d'*ABCA3* et l'expression de CD33 sur la membrane plasmique des myéloblastes, cela sans affecter les niveaux d'expression du gène *CD33*. De manière analogue à ce qui a été publié pour le rituximab (Aung et al. 2011), on peut donc émettre l'hypothèse d'une augmentation des capacités de production d'exosomes en cas d'expression élevée d'*ABCA3*, avec piégeage extra-cellulaire du GO. Pour explorer cette hypothèse, il conviendrait de réprimer *ABCA3* dans des lignées myéloïdes exprimant le CD33 et d'explorer leur résistance à cet agent thérapeutique : tests de survie cellulaire, microscopie confocale pour localiser le GO, production d'exosomes et dosage de GO dans les exosomes.

Concernant l'épissage alternatif d'*ABCA3*, notre équipe avait identifié l'exclusion de l'exon 19 comme associée à la chimiorésistance. *In silico*, la séquence de cet exon est très conservée avec peu de mutations rapportées et l'exclusion de l'exon 19 augmenterait l'activité de la protéine. *In vitro*, la perte de l'exon 19 majore le potentiel de résistance aux anthracyclines conféré par *ABCA3*. Chez les patients adultes avec traitement intensif de LAM, un taux d'exclusion élevé de l'exon 19 était associé à un pronostic défavorable.

Chez l'enfant, nous avons également retrouvé un impact pronostique défavorable conféré par un taux d'exclusion élevé de l'exon 19. Cependant, cet effet semble plus modeste que chez l'adulte. L'une des explications de cette différence réside sans doute dans les niveaux d'expression d'*ABCA3*, plus élevés dans les LAM adultes que pédiatriques, ce qui réduit le nombre de patients nécessaires pour obtenir un résultat significatif. De plus, nous avons pu montrer que l'exclusion de l'exon 19 module l'impact pronostique conféré par l'expression du gène, principalement en cas de forte expression. Cet impact est une fois encore plus net pour les patients de risque standard et nous avons pu mettre au point un score pronostique dans les LAM pédiatriques basé sur l'expression et l'exclusion de l'exon 19, indépendant de la stratification actuelle. Du fait des mêmes limites dans les modèles cellulaires, nous n'avons pas pu étudier l'impact de l'exclusion de l'exon 19 sur la résistance au GO et le nombre de patients traités était trop faible pour en tirer des conclusions. Il conviendrait d'étudier le profil transcriptomique d'*ABCA3* dans de plus grandes cohortes de patients adultes et pédiatriques traités par GO.

Nos travaux suggèrent enfin que l'intégration de la signature transcriptomique d'*ABCA3* pourrait aider à la stratification des patients au diagnostic de LAM, principalement pour les formes dites de risque standard. Cependant, il serait intéressant d'étudier l'expression d'*ABCA3* dans la tranche d'âge des 18-50 ans qui n'était pas couverte par nos séries de patients. D'après les données de la littérature, *ABCB1* et *ABCG2* seraient plus impactantes dans le phénotype de résistance multidrogue des LAM adultes. Nous posons l'hypothèse qu'il existe une augmentation progressive de l'expression moyenne d'*ABCA3* avec l'âge et une réduction progressive de son impact pronostique. Nous suggérons également que l'expression d'*ABCA3* pourrait servir à guider le choix d'un traitement par GO. Une étude chez l'enfant et chez les adultes jeunes serait intéressante pour confirmer l'impact prédictif de l'expression d'*ABCA3* sur la résistance au GO, intégrée avec les autres facteurs prédictifs connus de réponse à ce traitement : expression de CD33 en surface cellulaire (Pollard et al. 2016; Khan et al. 2017), potentiellement en lien avec l'expression d'*ABCA3* ; forte expression de CD33 dans le sang périphérique (van der Velden et al. 2004), variants d'épissage de *CD33* (Lamba et al. 2017), expression d'*ABCB1* (Walter et al. 2007) et défaut dans la signalisation des dommages à l'ADN (van der Velden et al. 2004).

Il reste néanmoins à décrire complètement les mécanismes qui sous-tendent la chimiorésistance supplémentaire conférée par l'exclusion de l'exon 19, notamment son impact sur la localisation cellulaire de la protéine et sur la production d'exosomes. Nous proposons que notre système de transfection de protéine ABCA3-eGFP soit utilisé et les cellules analysées en microscopie confocale laser afin de repérer précisément un changement de localisation intra-cellulaire de la protéine, et que les exosomes produits soient quantifiés.

Enfin, si l'expression d'*ABCA3* est un reflet de la capacité souche des myéloblastes, une réversion de la résistance des cellules est théoriquement possible en ciblant ce gène, soit de manière pharmacologique, par exemple avec l'indométacine (Song et al. 2008), soit par ARN interférence, comme dans l'exemple du nusinersen (Finkel et al. 2016). Il reste à démontrer les effets de l'exclusion de l'exon 19 d'*ABCA3* dans le compartiment souche des myéloblastes et, si tel est le cas, une thérapie ciblée des cellules souches leucémiques par oligonucléotides antisens révertants de l'épissage serait une méthode pour sensibiliser ces cellules aux chimiothérapies conventionnelles et au GO.

REFERENCES

- Aberuyi, Narges, Soheila Rahgozar, Zohreh Khosravi Dehaghi, Alireza Moafi, Andrea Masotti, and Alessandro Paolini. 2017. "The Translational Expression of ABCA2 and ABCA3 Is a Strong Prognostic Biomarker for Multidrug Resistance in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia." *OncoTargets and Therapy* 10: 3373–80. <https://doi.org/10.2147/OTT.S140488>.
- Adamia, Sophia, Benjamin Haibe-kains, and Patrick M Pilarski. 2014. "A Genome-Wide Aberrant RNA Splicing in Patients with Acute Myeloid Leukemia Identifies Novel Potential Disease Markers and Therapeutic Targets A Genome-Wide Aberrant RNA Splicing in Patients with Acute Myeloid Leukemia Identifies Novel Potential Disease." *Clinical Cancer Research* 20 (5): 1135–46. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0956>.
- Agathocleous, Michalis, Corbin E. Meacham, Rebecca J. Burgess, Elena Piskounova, Zhiyu Zhao, Genevieve M. Crane, Brianna L. Cowin, et al. 2017. "Ascorbate Regulates Haematopoietic Stem Cell Function and Leukaemogenesis." *Nature* 549 (7673): 476–81. <https://doi.org/10.1038/nature23876>.
- Agirre, E., A. J. Oldfield, N. Bellora, A. Segelle, and R. F. Luco. 2021. "Splicing-Associated Chromatin Signatures: A Combinatorial and Position-Dependent Role for Histone Marks in Splicing Definition." *Nature Communications* 12 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20979-x>.
- Agrawal, Mridul, Peggy Schwarz, Benedetto Daniele Giaimo, Ivan Bedzhov, Andrea Corbacioglu, Daniela Weber, Verena I. Gaidzik, et al. 2020. "Functional and Clinical Characterization of the Alternatively Spliced Isoform AML1-ETO9a in Adult Patients with Translocation t(8;21)(Q22;Q22.1) Acute Myeloid Leukemia (AML)." *Leukemia* 34 (2): 630–34. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0551-4>.
- Aguila, Jerrell R., Wenbin Liao, Jianchang Yang, Cecilia Avila, Nabil Hagag, Lisa Senzel, and Yupo Ma. 2011. "SALL4 Is a Robust Stimulator for the Expansion of Hematopoietic Stem Cells." *Blood* 118 (3): 576–85. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-333641>.
- Ajrouché, Roula, Jérémie Rudant, Laurent Orsi, Arnaud Petit, André Baruchel, Brigitte Nelken, Marlène Pasquet, et al. 2014. "Maternal Reproductive History, Fertility Treatments and Folic Acid Supplementation in the Risk of Childhood Acute Leukemia: The ESTELLE Study." *Cancer Causes and Control* 25 (10): 1283–93. <https://doi.org/10.1007/s10552-014-0429-8>.
- Al-Ayoubi, A. M., H. Zheng, Y. Liu, T. Bai, and S. T. Eblen. 2012. "Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation of Splicing Factor 45 (SPF45) Regulates SPF45 Alternative Splicing Site Utilization, Proliferation, and Cell Adhesion." *Molecular and Cellular Biology* 32 (14): 2880–93. <https://doi.org/10.1128/mcb.06327-11>.
- Albrecht, Christiane, and Enrique Viturro. 2007. "The ABCA Subfamily - Gene and Protein Structures, Functions and Associated Hereditary Diseases." *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 453 (5): 581–89. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0047-8>.
- Ameur, Adam, Ammar Zaghlool, Jonatan Halvardson, Anna Wetterbom, Ulf Gyllensten, Lucia Cavelier, and Lars Feuk. 2011. "Total RNA Sequencing Reveals Nascent Transcription and Widespread Co-Transcriptional Splicing in the Human Brain." *Nature Structural and Molecular Biology* 18 (12): 1435–40. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2143>.
- Ameur, Lamy Ben, Paul Marie, Morgan Thenoz, Guillaume Giraud, Emmanuel Combe, Jean Baptiste Claude, Sebastien Lemaire, et al. 2020. "Intragenic Recruitment of NF- κ B Drives Splicing Modifications upon Activation by the Oncogene Tax of HTLV-1." *Nature Communications* 11 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16853-x>.
- Amin, Elianna M., Sebastian Oltean, Jing Hua, Melissa V.R. Gammons, Maryam Hamdollah-Zadeh, Gavin I. Welsh, Man Kim Cheung, et al. 2011. "WT1 Mutants Reveal SRPK1 to Be a Downstream Angiogenesis Target by Altering VEGF Splicing." *Cancer Cell* 20 (6): 768–80. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.10.016>.
- Amitay, Efrat L., and Lital Keinan-Boker. 2015. "Breastfeeding and Childhood Leukemia Incidence: A Meta-Analysis and Systematic Review." *JAMA Pediatrics* 169 (6): 1–9. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2015.1025>.
- Anande, Govardhan, Nandan P. Deshpande, Sylvain Mareschal, Aarif M.N. Batcha, Henry R. Hampton, Tobias Herold, Soren Lehmann, et al. 2020. "RNA Splicing Alterations Induce a Cellular Stress Response Associated with Poor Prognosis in Acute Myeloid Leukemia." *Clinical Cancer Research* 26 (14): 3597–3607. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0184>.
- Araki, Shinsuke, Ryo Dairiki, Yusuke Nakayama, Aiko Murai, Risa Miyashita, Misa Iwatani, Toshiyuki Nomura, and Osamu Nakanishi. 2015. "Inhibitors of CLK Protein Kinases Suppress Cell Growth and Induce Apoptosis by Modulating Pre-mRNA Splicing." *PLoS ONE* 10 (1): 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116929>.

- Arber, Daniel A, Attilio Orazi, Robert Hasserjian, Michael J Borowitz, Michelle M Le Beau, Clara D Bloomfield, Mario Cazzola, and James W Vardiman. 2016. "The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia." *Blood* 127 (20): 2391–2406. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>.The.
- Aslanyan, Mariam G., Leonie I. Kroeze, Saskia M C Langemeijer, Theresia N. Koorenhof-Scheele, Marion Massop, Patricia Van Hoogen, Ellen Stevens-Linders, et al. 2014. "Clinical and Biological Impact of TET2 Mutations and Expression in Younger Adult AML Patients Treated within the EORTC/GIMEMA AML-12 Clinical Trial." *Annals of Hematology* 93 (8): 1401–12. <https://doi.org/10.1007/s00277-014-2055-7>.
- Aung, Thiha, Bjoern Chapuy, Daniel Vogel, Dirk Wenzel, Martin Oppermann, Marlen Lahmann, Toni Weinlage, et al. 2011. "Exosomal Evasion of Humoral Immunotherapy in Aggressive B-Cell Lymphoma Modulated by ATP-Binding Cassette Transporter A3." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (37): 15336–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102855108>.
- Bailey, Helen D, Lin Fritsch, Claire Infante-Rivard, Deborah C Glass, Lucia Miligi, John D Dockerty, Tracy Lightfoot, et al. 2014. "Parental Occupational Pesticide Exposure and the Risk of Childhood Leukemia in the Offspring: Findings from the Childhood Leukemia International Consortium Helen." *Internal Journal of Cancer* 135 (9): 2157–72. <https://doi.org/10.1002/ijc.28854>.
- Bailey, Helen D, Lin Fritsch, Catherine Metayer, Claire Infante-Rivard, Corrado Magnani, Eleni Petridou, Eve Roman, et al. 2014. "Parental Occupational Paint Exposure and Risk of Childhood Leukemia in the Offspring: Findings from the Childhood Leukemia International Consortium." *Cancer Causes Control* 25 (10): 1351–67. <https://doi.org/10.1007/s10552-014-0441-z>.
- Bailey, Helen D, Claire Infante-Rivard, Catherine Metayer, Jacqueline Clavel, Tracy Lightfoot, Peter Kaatsch, Eve Roman, et al. 2015. "Home Pesticide Exposures and Risk of Childhood Leukemia: Findings from the Childhood Leukemia International Consortium." *Internal Journal of Cancer* 137 (11): 2644–63. <https://doi.org/10.1002/ijc.29631>.
- Bartholomae, Stephan, Bernd Gruhn, Klaus-Michael Debatin, Martin Zimmermann, Ursula Creutzig, Dirk Reinhardt, and Daniel Steinbach. 2016. "Coexpression of Multiple ABC-Transporters Is Strongly Associated with Treatment Response in Childhood Acute Myeloid Leukemia." *Pediatr Blood Cancer* 63: 242–47. <https://doi.org/10.1002/pbc.25785>.
- Bedikian, Agop Y., Claus Garbe, Robert Conry, Celeste Lebbe, and Jean J. Grob. 2014. "Dacarbazine with or without Oblimersen (a Bcl-2 Antisense Oligonucleotide) in Chemotherapy-Naïve Patients with Advanced Melanoma and Low-Normal Serum Lactate Dehydrogenase: 'The AGENDA Trial.'" *Melanoma Research* 24 (3): 237–43. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000056>.
- Beer, Tomasz M., Sebastien J. Hotte, Fred Saad, Boris Alekseev, Vsevolod Matveev, Aude Fléchon, Gwenaëlle Gravis, et al. 2017. "Custirsen (OGX-011) Combined with Cabazitaxel and Prednisone versus Cabazitaxel and Prednisone Alone in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Previously Treated with Docetaxel (AFFINITY): A Randomised, Open-Label, International, Ph." *The Lancet Oncology* 18 (11): 1532–42. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30605-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30605-8).
- Beers, M. F., M. Zhao, Y. Tomer, S. J. Russo, P. Zhang, L. W. Gonzales, S. H. Guttentag, and S. Mulugeta. 2013. "Disruption of N-Linked Glycosylation Promotes Proteasomal Degradation of the Human ATP-Binding Cassette Transporter ABCA3." *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 305 (12): L970–80. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00184.2013>.
- Beers, Michael F., and Surafel Mulugeta. 2017. "The Biology of the ABCA3 Lipid Transporter in Lung Health and Disease." *Cell and Tissue Research* 367 (3): 481–93. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2554-z>.
- Bejar, Rafael, Kristen Stevenson, Omar Abdel-Wahab, Naomi Galili, Björn Nilsson, Guillermo Garcia-Manero, Hagop Kantarjian, et al. 2011. "Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes." *New England Journal of Medicine* 364 (26): 2496–2506. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1013343>.
- Belitsky, Gennady, Timur Fetisov, Kirill Kirsanov, Ekaterina Lesovaya, Olga Vlasova, and Marianna Yakubovskaya. 2020. "Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia and Its Prevention." *American Journal of Blood Research* 10 (6): 416–33.
- Bennett, C. Frank. 2019. "Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age." *Annual Review of Medicine* 70: 307–21. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-041217-010829>.
- Bergh, Anne R M von, Ellen van Drunen, Elisabeth R van Wering, Laura J C M van Zutven, Ina Hainmann, Gudmar Lönnerholm, Jules P Meijerink, Rob Pieters, and H Berna Beverloo. 2006. "High Incidence of t(7;12)(Q36;P13) in Infant AML but Not in Infant ALL, with a Dismal Outcome and Ectopic Expression of HLXB9." *Genes, Chromosomes and Cancer* 45 (8): 731–39. <https://doi.org/10.1002/gcc.20335>.

- Bertoli, Sarah, Muriel Picard, Emilie Bérard, Emmanuel Griessinger, Clément Larrue, Pierre Luc Mouchel, François Vergez, et al. 2018. "Dexamethasone in Hyperleukocytic Acute Myeloid Leukemia." *Haematologica* 103 (6): 988–98. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.184267>.
- Besnard, Valérie, Yan Xu, and Jeffrey A. Whitsett. 2007. "Sterol Response Element Binding Protein and Thyroid Transcription Factor-1 (Nkx2.1) Regulate Abca3 Gene Expression." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 293 (6): 1395–1405. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00275.2007>.
- Biamonti, Giuseppe, Morena Catillo, Daniela Pignataro, Alessandra Montecucco, and Claudia Ghigna. 2014. "The Alternative Splicing Side of Cancer." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 32: 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.016>.
- Bischof, Katharina, Stian Knappskog, Sigrun M. Hjelle, Ingunn Stefansson, Kathrine Woie, Helga B. Salvesen, Bjorn T. Gjertsen, and Line Bjorge. 2019. "Influence of P53 Isoform Expression on Survival in High-Grade Serous Ovarian Cancers." *Scientific Reports* 9 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41706-z>.
- Boissel, N., H. Leroy, B. Brethon, N. Philippe, S. de Botton, A. Auvrignon, E. Raffoux, et al. 2006. "Incidence and Prognostic Impact of C-Kit, FLT3, and Ras Gene Mutations in Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia (CBF-AML)." *Leukemia* 20 (6): 965–70. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404188>.
- Bolouri, Hamid, Jason E Farrar, Timothy Triche Jr, Rhonda E Ries, Emilia L Lim, Todd A Alonzo, Yussanne Ma, et al. 2018. "The Molecular Landscape of Pediatric Acute Myeloid Leukemia Reveals Recurrent Structural Alterations and Age-Specific Mutational Interactions." *Nature Medicine* 24 (1): 103–12. <https://doi.org/10.1038/nm.4439>.
- Bonnal, Sophie, Luisa Vigevani, and Juan Valcárcel. 2012. "The Spliceosome as a Target of Novel Antitumour Drugs." *Nature Reviews Drug Discovery* 11 (11): 847–59. <https://doi.org/10.1038/nrd3823>.
- Boyer, Thomas, Fanny Gonzales, Adriana Plesa, Pauline Peyrouze, Adeline Barthelemy, Soizic Guihard, Bruno Quesnel, Christophe Roumier, Claude Preudhomme, and Meyling Cheok. 2018. "Flow Cytometry to Estimate Leukemia Stem Cells in Primary Acute Myeloid Leukemia and in Patient-Derived-Xenografts, at Diagnosis and Follow Up." *Journal of Visualized Experiments* Mar 26 (133): e56976. <https://doi.org/doi:10.3791/56976>.
- Brodersen, L. Eidenschink, T. A. Alonzo, A. J. Menssen, R. B. Gerbing, L. Pardo, A. P. Voigt, S. B. Kahwash, et al. 2016. "A Recurrent Immunophenotype at Diagnosis Independently Identifies High-Risk Pediatric Acute Myeloid Leukemia: A Report from Children's Oncology Group." *Leukemia* 30 (10): 2077–80. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.119>.
- Brosselin, P., J. Rudant, L. Orsi, G. Leverger, A. Baruchel, Y. Bertrand, B. Nelken, et al. 2009. "Acute Childhood Leukaemia and Residence next to Petrol Stations and Automotive Repair Garages: The ESCALE Study (SFCE)." *Occupational and Environmental Medicine* 66 (9): 598–606. <https://doi.org/10.1136/oem.2008.042432>.
- Budczies, Jan, Frederick Klauschen, Bruno V. Sinn, Balazs Gyorffy, Wolfgang D. Schmitt, Silvia Darb-Esfahani, and Carsten Denkert. 2012. "Cutoff Finder: A Comprehensive and Straightforward Web Application Enabling Rapid Biomarker Cutoff Optimization." *PLoS ONE* 7 (12): 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051862>.
- Bullinger, Lars, and D Konstanze. 2017. "Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways." *Journal of Clinical Nursing* 35 (9): 934–46. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.2208>.
- Burnett, Alan K, Robert K Hills, Donald Milligan, Lars Kjeldsen, Jonathan Kell, Nigel H Russell, John A L Yin, Ann Hunter, Anthony H Goldstone, and Keith Wheatley. 2011. "Identification of Patients With Acute Myeloblastic Leukemia Who Benefit From the Addition of Gemtuzumab Ozogamicin: Results of the MRC AML15 Trial." *Journal of Clinical Oncology* 29 (4): 369–77. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.4310>.
- Bustin, Stephen A., Vladimir Benes, Jeremy A. Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, et al. 2009. "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–22. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Cairolì, Roberto, Alessandro Beghini, Giovanni Grillo, Gianpaolo Nadali, Francesca Elice, Carla Barbara Ripamonti, Patrizia Colapietro, et al. 2006. "Prognostic Impact of C-KIT Mutations in Core Binding Factor Leukemias: An Italian Retrospective Study." *Blood* 107 (9): 3463–68. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3640>.
- Castaigne, Sylvie, Cécile Pautas, Christine Terré, Emmanuel Raffoux, Dominique Bordessoule, Jean Noel Bastie, Ollivier Legrand, et al. 2012. "Effect of Gemtuzumab Ozogamicin on Survival of Adult Patients with De-Novo Acute Myeloid Leukaemia (ALFA-0701): A Randomised, Open-Label, Phase 3 Study." *The Lancet* 379 (9825): 1508–16. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60485-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60485-1).

- Cazzola, Mario, Marianna Rossi, and Luca Malcovati. 2013. "Biologic and Clinical Significance of Somatic Mutations of SF3B1 in Myeloid and Lymphoid Neoplasms." *Blood* 121 (2): 260–69. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-399725>.
- Ceraulo, Antony. 2018. "Impact Pronostique de TET2 Dans Les Leucémies Aiguës Myéloblastiques de l'enfant : Études Génomiques et Transcriptomiques de La Cohorte Nationale Française ELAM02 - THESE D'EXERCICE EN MEDECINE." LYON I.
- Chan-Penebre, Elayne, Kristy G. Kuplast, Christina R. Majer, P. Ann Boriack-Sjodin, Tim J. Wigle, L. Danielle Johnston, Nathalie Rioux, et al. 2015. "A Selective Inhibitor of PRMT5 with in Vivo and in Vitro Potency in MCL Models." *Nature Chemical Biology* 11 (6): 432–37. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1810>.
- Chapuy, B, R Koch, U Radunski, S Corsham, N Cheong, N Inagaki, N Ban, et al. 2008. "Intracellular ABC Transporter A3 Confers Multidrug Resistance in Leukemia Cells by Lysosomal Drug Sequestration." *Leukemia* 22 (May): 1576–86. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.103>.
- Chapuy, Bjoern, Melanie Panse, Ulf Radunski, Raphael Koch, Dirk Wenzel, Nobuya Inagaki, Detlef Haase, Lorenz Truemper, and Gerald G. Wulf. 2009. "ABC Transporter A3 Facilitates Lysosomal Sequestration of Imatinib and Modulates Susceptibility of Chronic Myeloid Leukemia Cell Lines to This Drug." *Haematologica* 94 (11): 1528–36. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.008631>.
- Chen, Qiang, Yibin Chen, Chunjing Bian, Ryoji Fujiki, and Xiaochun Yu. 2013. "TET2 Promotes Histone O-GlcNAcylation during Gene Transcription." *Nature* 493 (7433): 561–64. <https://doi.org/10.1038/nature11742>.
- Chi, Kim N., Celestia S. Higano, Brent Blumenstein, Jean Marc Ferrero, James Reeves, Susan Feyerabend, Gwenaëlle Gravis, et al. 2017. "Custirsén in Combination with Docetaxel and Prednisone for Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (SYNERGY Trial): A Phase 3, Multicentre, Open-Label, Randomised Trial." *The Lancet Oncology* 18 (4): 473–85. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30168-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30168-7).
- Chi, Kim N., Sebastien J. Hotte, Evan Y. Yu, Dongsheng Tu, Bernhard J. Eigel, Ian Tannock, Fred Saad, et al. 2010. "Randomized Phase II Study of Docetaxel and Prednisone with or without OGX-011 in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 28 (27): 4247–54. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.8771>.
- Chui, M Herman, Ciyu Yang, Nikita Mehta, Vikas Rai, Ahmet Zehir, Amir Momeni Boroujeni, Marc Ladanyi, and Diana Mandelker. 2021. "Somatic Intronic TP53 c.375+ 5G Mutations Are a Recurrent but Under-recognized Mode of TP53 Inactivation ." *The Journal of Pathology: Clinical Research*, 1–5. <https://doi.org/10.1002/cjp2.242>.
- Cimmino, Luisa, Igor Dolgalev, Yubao Wang, Akihide Yoshimi, Gaëlle H. Martin, Jingjing Wang, Victor Ng, et al. 2017. "Restoration of TET2 Function Blocks Aberrant Self-Renewal and Leukemia Progression." *Cell* 170 (6): 1079–1095.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.032>.
- Clemente-Periván, Sayuri Itzel, Yazmín Gómez-Gómez, Marco Antonio Leyva-Vázquez, Alfredo Lagunas-Martínez, Jorge Organista-Nava, and Berenice Illades-Aguar. 2020. "Role of Oct3/4 in Cervical Cancer Tumorigenesis." *Frontiers in Oncology* 10 (March): 1–6. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00247>.
- Climente-González, Héctor, Eduard Porta-Pardo, Adam Godzik, and Eduardo Eyra. 2017. "The Functional Impact of Alternative Splicing in Cancer." *Cell Reports* 20 (9): 2215–26. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.012>.
- Coenen, E A, C M Zwaan, C J Harrison, O A Haas, V De Haas, V Mihal, B De Moerloose, et al. 2013. "Pediatric Acute Myeloid Leukemia with T(8;16)(P11;P13): A Distinct Clinical and Biological Entity. Results of a Collaborative Study by the International Berlin-Frankfurt-Münster AML Study Group." *Blood* 122 (15): 2704–13. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-485524>.
- Conti, Laura De, Marco Baralle, and Emanuele Buratti. 2013. "Exon and Intron Definition in Pre-mRNA Splicing." *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 4 (1): 49–60. <https://doi.org/10.1002/wrna.1140>.
- Cooper, Todd M., Janet Franklin, Robert B. Gerbing, Todd A. Alonzo, Craig Hurwitz, Susana C. Raimondi, Betsy Hirsch, et al. 2012. "AAML03P1, a Pilot Study of the Safety of Gemtuzumab Ozogamicin in Combination with Chemotherapy for Newly Diagnosed Childhood Acute Myeloid Leukemia: A Report from the Children's Oncology Group." *Cancer* 118 (3): 761–69. <https://doi.org/10.1002/cncr.26190>.
- Cortellino, Salvatore, Jinfei Xu, Mara Sannai, Robert Moore, Elena Caretti, Antonio Cigliano, Madeleine Le Coz, et al. 2011. "Thymine DNA Glycosylase Is Essential for Active DNA Demethylation by Linked Deamination-Base Excision Repair." *Cell* 146 (1): 67–79. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.020>.

- Creutzig, Ursula, Michael N. Dworzak, Martin Zimmermann, Dirk Reinhardt, Lucie Sramkova, Jan Pierre Bourquin, Henrik Hasle, et al. 2017. "Characteristics and Outcome in Patients with Central Nervous System Involvement Treated in European Pediatric Acute Myeloid Leukemia Study Groups." *Pediatric Blood & Cancer* 64 (12): e26664. <https://doi.org/10.1002/pbc.26664>.
- Creutzig, Ursula, Marry M. van den Heuvel-Eibrink, Brenda Gibson, Michael N. Dworzak, Souichi Adachi, Eveline de Bont, Jochen Harbott, et al. 2012. "Diagnosis and Management of Acute Myeloid Leukemia in Children and Adolescents: Recommendations from an International Expert Panel." *Blood* 120 (16): 3187–3205. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-362608>.
- Creutzig, Ursula, Matthew A. Kutny, Ronald Barr, Richard F. Schlenk, and Raul C. Ribeiro. 2018. "Acute Myelogenous Leukemia in Adolescents and Young Adults." *Pediatric Blood and Cancer* 65 (9). <https://doi.org/10.1002/pbc.27089>.
- Creutzig, Ursula, Martin Zimmermann, Dirk Reinhardt, Michael Dworzak, Jan Stary, and Thomas Lehrnbecher. 2004. "Early Deaths and Treatment-Related Mortality in Children Undergoing Therapy for Acute Myeloid Leukemia: Analysis of the Multicenter Clinical Trials AML-BFM 93 and AML-BFM 98." *Journal of Clinical Oncology* 22 (21): 4384–93. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.01.191>.
- Creutzig, Ursula, Martin Zimmermann, Dirk Reinhardt, Mareike Rasche, Christine von Neuhoff, Tamara Alpermann, Michael Dworzak, et al. 2016. "Changes in Cytogenetics and Molecular Genetics in Acute Myeloid Leukemia from Childhood to Adult Age Groups." *Cancer* 122 (24): 3821–30. <https://doi.org/10.1002/cncr.30220>.
- Crews, Leslie A., Larisa Balaian, Nathaniel P. Delos Santos, Heather S. Leu, Angela C. Court, Elisa Lazzari, Anil Sadarangani, et al. 2016. "RNA Splicing Modulation Selectively Impairs Leukemia Stem Cell Maintenance in Secondary Human AML." *Cell Stem Cell* 19 (5): 599–612. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.08.003>.
- Cunningham, Thomas J., Ilaria Palumbo, Michela Grosso, Nicholas Slater, and Colin G. Miles. 2013. "WT1 Regulates Murine Hematopoiesis via Maintenance of VEGF Isoform Ratio." *Blood* 122 (2): 188–92. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-466086>.
- Darrigrand, Romain, Alison Pierson, Marine Rouillon, Dolor Renko, Mathilde Boulpicante, David Bouyssié, Emmanuelle Mouton-Barbosa, et al. 2021. "Isoginkgetin Derivative IP2 Enhances the Adaptive Immune Response against Tumor Antigens." *Communications Biology* 4 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01801-2>.
- Delhommeau, Francois, Sabrina Dupont, Véronique Della Valle, Chloe James, Severine Trannoy, Aline Masse, Olivier Kosmider, et al. 2009. "Mutation in TET2 in Myeloid Cancers." *The New England Journal of Medicine* 360 (22): 2289–2301. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810069>.
- Delhommeau, François, Sabrina Dupont, Véronique Della Valle, Chloé James, Severine Trannoy, Aline Massé, Olivier Kosmider, et al. 2009. "Mutation in TET2 in Myeloid Cancers." *The New England Journal of Medicine* 360 (22): 2289–2301. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810069>.
- Delhommeau, François, Sabrina Dupont, Véronique Della Valle, Chloé James, Severine Trannoy, Aline Massé, Olivier Kosmider, et al. 2009. "Mutation in TET2 in Myeloid Cancers." *New England Journal of Medicine* 360 (22): 2289–2301. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810069>.
- Demoury, Claire, Fabienne Marquant, Géraldine Ielsch, Stéphanie Goujon, Christophe Debayle, Laure Faure, Astrid Coste, et al. 2017. "Residential Exposure to Natural Background Radiation and Risk of Childhood Acute Leukemia in France, 1990–2009." *Environmental Health Perspectives* 125 (4): 714–20. <https://doi.org/10.1289/EHP296>.
- Deng, Kun, Jingwei Yao, Jialu Huang, Yubo Ding, and Jianhong Zuo. 2021. "Abnormal Alternative Splicing Promotes Tumor Resistance in Targeted Therapy and Immunotherapy." *Translational Oncology* 14 (6): 101077. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101077>.
- Docking, T. Roderick, Jeremy D.K. Parker, Martin Jädersten, Gerben Duns, Linda Chang, Jihong Jiang, Jessica A. Pilsworth, et al. 2021. "A Clinical Transcriptome Approach to Patient Stratification and Therapy Selection in Acute Myeloid Leukemia." *Nature Communications* 12 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22625-y>.
- Döhner, Hartmut, Elihu Estey, David Grimwade, Sergio Amadori, Frederick R. Appelbaum, Thomas Büchner, Hervé Dombret, et al. 2017. "Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel." *Blood* 129 (4): 424–47. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>.
- Döhner, Hartmut, Daniel J. Weisdorf, and Clara D. Bloomfield. 2015. "Acute Myeloid Leukemia." *New England Journal of Medicine* 373 (12): 1136–52. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406184>.

- Döhner, Konstanze, Karen Tobis, Regina Ulrich, Stefan Fröhling, Axel Benner, Richard F Schlenk, and Hartmut Döhner. 2002. "Prognostic Significance of Partial Tandem Duplications of the MLL Gene in Adult Patients 16 to 60 Years Old With Acute Myeloid Leukemia and Normal Cytogenetics: A Study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm." *Journal of Clinical Oncology* 20 (15): 3254–61. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.09.088>.
- Dvinge, Heidi, Eunhee Kim, Omar Abdel-Wahab, and Robert K. Bradley. 2016. "RNA Splicing Factors as Oncoproteins and Tumour Suppressors." *Nature Reviews Cancer* 16 (7): 413–30. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.51>.
- Efferth, Thomas, Jean-Pierre Gillet, Axel Sauerbrey, Felix Zintl, Vincent Bertholet, Françoise de Longueville, Jose Remacle, and Daniel Steinbach. 2006. "Expression Profiling of ATP-Binding Cassette Transporters in Childhood T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Molecular Cancer Therapeutics* 5 (8): 1986–94. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0086>.
- Elsayed, Abdelrahman H., Roya Rafiee, Xueyuan Cao, Susana Raimondi, James R. Downing, Raul Ribeiro, Yiping Fan, et al. 2020. "A Six-Gene Leukemic Stem Cell Score Identifies High Risk Pediatric Acute Myeloid Leukemia." *Leukemia* 34 (3): 735–45. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0604-8>.
- Eriksson, Anna, and Andreas Lennartsson. 2015. "Epigenetic Aberrations in Acute Myeloid Leukemia : Early Key Events during Leukemogenesis." *Experimental Hematology*, no. 43: 609–24. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.05.009>.
- Eskens, Ferry A.L.M., Francisco J. Ramos, Herman Burger, James P. O'Brien, Adelaida Piera, Maja J.A. De Jonge, Yoshiharu Mizui, et al. 2013. "Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of the First-in-Class Spliceosome Inhibitor E7107 in Patients with Advanced Solid Tumors." *Clinical Cancer Research* 19 (22): 6296–6304. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0485>.
- Espersen, Anne Dorte Lerche, Ulrika Noren-Nyström, Jonas Abrahamsson, Shau Yin Ha, Cornelis Jan Pronk, Kirsi Jahnukainen, Ólafur G. Jónsson, et al. 2018. "Acute Myeloid Leukemia (AML) with t(7;12)(Q36;P13) Is Associated with Infancy and Trisomy 19: Data from Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO-AML) and Review of the Literature." *Genes Chromosomes and Cancer* 57 (7): 359–65. <https://doi.org/10.1002/gcc.22538>.
- Estey, Elihu H. 2020. "Acute Myeloid Leukemia: 2021 Update on Risk-Stratification and Management." *American Journal of Hematology* 95 (11): 1368–98. <https://doi.org/10.1002/ajh.25975>.
- Eymin, Beatrice. 2020. "Targeting the Spliceosome Machinery: A New Therapeutic Axis in Cancer?" *Biochemical Pharmacology*, no. May: 114039. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114039>.
- Fan, Liying, Chandraiah Lagiseti, Carol C. Edwards, Thomas R. Webb, and Philip M. Potter. 2011. "Sudemycins, Novel Small Molecule Analogues of FR901464, Induce Alternative Gene Splicing." *ACS Chemical Biology* 6 (6): 582–89. <https://doi.org/10.1021/cb100356k>.
- Farawela, Hala M., Hamdy M. Zawam, Hanan A. Al-Wakeel, Mona H. El-Nagdy, Fatma A. El-Refaey, and Hala A. Abdel-Rahman. 2019. "Expression Pattern and Prognostic Implication of SALL4 Gene in Myeloid Leukemias: A Case-Control Study." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 79 (1–2): 65–70. <https://doi.org/10.1080/00365513.2018.1555854>.
- Fedoriw, Andrew, Satyajit R. Rajapurkar, Shane O'Brien, Sarah V. Gerhart, Lorna H. Mitchell, Nicholas D. Adams, Nathalie Rioux, et al. 2019. "Anti-Tumor Activity of the Type I PRMT Inhibitor, GSK3368715, Synergizes with PRMT5 Inhibition through MTAP Loss." *Cancer Cell* 36 (1): 100–114.e25. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.05.014>.
- Felix, Arthur, Thierry Leblanc, Arnaud Petit, Brigitte Nelkem, Yves Bertrand, Virginie Gandemer, Anne Sirvent, et al. 2018. "Acute Myeloid Leukemia With Central Nervous System Involvement in Children: Experience From the French Protocol Analysis ELAM02." *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 40 (1). https://journals.lww.com/jpho-online/Fulltext/2018/01000/Acute_Myeloid_Leukemia_With_Central_Nervous_System.8.aspx.
- Finkel, Richard S., Claudia A. Chiriboga, Jiri Vajsar, John W. Day, Jacqueline Montes, Darryl C. De Vivo, Mason Yamashita, et al. 2016. "Treatment of Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy with Nusinersen: A Phase 2, Open-Label, Dose-Escalation Study." *The Lancet* 388 (10063): 3017–26. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31408-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31408-8).
- Finn, Laura, Lisa Sproat, Michael G Heckman, Liuyan Jiang, Nancy N Diehl, Rhett Ketterling, Raoul Tibes, Ricardo Valdez, and James Foran. 2015. "Epidemiology of Adult Acute Myeloid Leukemia : Impact of Exposures on Clinical Phenotypes and Outcomes after Therapy." *Cancer Epidemiology* 39 (6): 1084–92. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2015.09.003>.

- Fircanis, Sophia, Priscilla Merriam, Naushaba Khan, and Jorge J. Castillo. 2014. "The Relation between Cigarette Smoking and Risk of Acute Myeloid Leukemia: An Updated Meta-Analysis of Epidemiological Studies." *American Journal of Hematology* 89 (8): 125–32. <https://doi.org/10.1002/ajh.23744>.
- Fong, Jia Yi, Luca Pignata, Pierre Alexis Goy, Kimihito Cojin Kawabata, Stanley Chun Wei Lee, Cheryl M. Koh, Daniele Musiani, et al. 2019. "Therapeutic Targeting of RNA Splicing Catalysis through Inhibition of Protein Arginine Methylation." *Cancer Cell* 36 (2): 194–209.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.07.003>.
- Frampton, Garrett M., Siraj M. Ali, Mark Rosenzweig, Juliann Chmielecki, Xinyuan Lu, Todd M. Bauer, Mikhail Akimov, et al. 2015. "Activation of MET via Diverse Exon 14 Splicing Alterations Occurs in Multiple Tumor Types and Confers Clinical Sensitivity to MET Inhibitors." *Cancer Discovery* 5 (8): 850–60. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0285>.
- Frankiw, Luke, David Baltimore, and Guideng Li. 2019. "Alternative mRNA Splicing in Cancer Immunotherapy." *Nature Reviews Immunology* 19 (11): 675–87. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0195-7>.
- Frixel, Sabrina, Amelie S. Lotz-Havla, Sunana Kern, Eva Kaltenborn, Thomas Wittmann, Søren W. Gersting, Ania C. Muntau, Ralf Zarbock, and Matthias Griesse. 2016. "Homooligomerization of ABCA3 and Its Functional Significance." *International Journal of Molecular Medicine* 38 (2): 558–66. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2650>.
- Fröbel, Julia, Theresa Landspersky, Gülce Percin, Christina Schreck, Susann Rahmig, Alessandro Ori, Daniel Nowak, Marieke Essers, Claudia Waskow, and Robert A.J. Oostendorp. 2021. "The Hematopoietic Bone Marrow Niche Ecosystem." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (July): 1–19. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.705410>.
- Fu, Denggang, Biyu Zhang, Shiyong Wu, Yinghua Zhang, Jingwu Xie, Wangbin Ning, and Hua Jiang. 2021. "Prognosis and Characterization of Immune Microenvironment in Acute Myeloid Leukemia Through Identification of an Autophagy-Related Signature." *Frontiers in Immunology* 12 (May): 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.695865>.
- Fukuhara, Takeshi, Takamitsu Hosoya, Saki Shimizu, Kengo Sumi, Takako Oshiro, Yoshiyuki Yoshinaka, Masaaki Suzuki, et al. 2006. "Utilization of Host SR Protein Kinases and RNA-Splicing Machinery during Viral Replication." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (30): 11329–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604616103>.
- Furumai, Ryohei, Kazuyo Uchida, Yusuke Komi, Misao Yoneyama, Ken Ishigami, Hidenori Watanabe, Soichi Kojima, and Minoru Yoshida. 2010. "Spliceostatin A Blocks Angiogenesis by Inhibiting Global Gene Expression Including VEGF." *Cancer Science* 101 (11): 2483–89. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01686.x>.
- Gaidzik, V. I., V. Teleanu, E. Papaemmanuil, D. Weber, P. Paschka, J. Hahn, T. Wallrabenstein, et al. 2016. "RUNX1 Mutations in Acute Myeloid Leukemia Are Associated with Distinct Clinico-Pathologic and Genetic Features." *Leukemia* 30 (11): 2160–68. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.126>.
- Gaidzik, Verena I., Lars Bullinger, Richard F. Schlenk, Andreas S. Zimmermann, Jürgen Rock, Peter Paschka, Andrea Corbacioglu, et al. 2011. "RUNX1 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Results from a Comprehensive Genetic and Clinical Analysis from the AML Study Group." *Journal of Clinical Oncology* 29 (10): 1364–72. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.7926>.
- Gamis, Alan S., Todd A. Alonzo, Soheil Meshinchi, Lillian Sung, Robert B. Gerbing, Susana C. Raimondi, Betsy A. Hirsch, et al. 2014. "Gemtuzumab Ozogamicin in Children and Adolescents with de Novo Acute Myeloid Leukemia Improves Event-Free Survival by Reducing Relapse Risk: Results from the Randomized Phase III Children's Oncology Group Trial AAML0531." *Journal of Clinical Oncology* 32 (27): 3021–32. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.55.3628>.
- Ganakammal, Satishkumar Ranganathan, and Emil Alexov. 2020. "An Ensemble Approach to Predict the Pathogenicity of Synonymous Variants." *Genes* 11 (9): 1–10. <https://doi.org/10.3390/genes11091102>.
- Gao, Chong, Todor Dimitrov, Kol Jia Yong, Hiro Tatetsu, Ha Won Jeong, Hongbo R. Luo, James E. Bradner, Daniel G. Tenen, and Li Chai. 2013. "Targeting Transcription Factor SALL4 in Acute Myeloid Leukemia by Interrupting Its Interaction with an Epigenetic Complex." *Blood* 121 (8): 1413–21. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-424275>.
- Gao, Kaiping, Akio Masuda, Tohru Matsuura, and Kinji Ohno. 2008. "Human Branch Point Consensus Sequence Is YUnAy." *Nucleic Acids Research* 36 (7): 2257–67. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn073>.
- Gerstung, Moritz, Elli Papaemmanuil, Inigo Martincorena, Lars Bullinger, Verena I. Gaidzik, Peter Paschka, Michael Heuser, et al. 2017. "Precision Oncology for Acute Myeloid Leukemia Using a Knowledge Bank Approach." *Nature Genetics* 49 (3): 332–40. <https://doi.org/10.1038/ng.3756>.

- Ghodousi, Elaheh S., and Soheila Rahgozar. 2018. "MicroRNA-326 and MicroRNA-200c: Two Novel Biomarkers for Diagnosis and Prognosis of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia." *Journal of Cellular Biochemistry* 119 (7): 6024–32. <https://doi.org/10.1002/jcb.26800>.
- Ghosh, Arun K., Anne M. Veitschegger, Venkata Reddy Sheri, Kerstin A. Effenberger, Beth E. Prichard, and Melissa S. Jurica. 2014. "Enantioselective Synthesis of Spliceostatin e and Evaluation of Biological Activity." *Organic Letters* 16 (23): 6200–6203. <https://doi.org/10.1021/ol503127r>.
- Gillet, Jean Pierre, Thomas Efferth, Daniel Steinbach, Jacques Hamels, Françoise De Longueville, Vincent Bertholet, and José Remacle. 2004. "Microarray-Based Detection of Multidrug Resistance in Human Tumor Cells by Expression Profiling of ATP-Binding Cassette Transporter Genes." *Cancer Research* 64 (24): 8987–93. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1978>.
- Giono, Luciana E., and Alberto R. Kornblihtt. 2020. "Linking Transcription, RNA Polymerase II Elongation and Alternative Splicing." *Biochemical Journal* 477 (16): 3091–3104. <https://doi.org/10.1042/bcj20200475>.
- Gough, Sheryl M., Christopher I. Slape, and Peter D. Aplan. 2011. "NUP98 Gene Fusions and Hematopoietic Malignancies: Common Themes and New Biologic Insights." *Blood* 118 (24): 6247–57. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-328880>.
- Greif, Philipp A., Annika Dufour, Nikola P. Konstandin, Bianka Ksienzyk, Evelyn Zellmeier, Belay Tizazu, Jutta Sturm, et al. 2012. "GATA2 Zinc Finger 1 Mutations Associated with Biallelic CEBPA Mutations Define a Unique Genetic Entity of Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 120 (2): 395–403. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-403220>.
- Greif, Philipp A., Nikola P. Konstandin, Klaus H. Metzeler, Tobias Herold, Zlatana Pasalic, Bianka Ksienzyk, Annika Dufour, et al. 2012. "RUNX1 Mutations in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia Are Associated with a Poor Prognosis and Up-Regulation of Lymphoid Genes." *Haematologica* 97 (12): 1909–15. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.064667>.
- Grinev, Vasily V., Farnaz Barneh, Ilya M. Ilyushonak, Sirintra Nakjang, Job Smink, Anita van Oort, Richard Clough, et al. 2021. "RUNX1/RUNX1T1 Mediates Alternative Splicing and Reorganises the Transcriptional Landscape in Leukemia." *Nature Communications* 12 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20848-z>.
- Grossmann, Vera, Claudia Haferlach, Niroshan Nadarajah, Annette Fasan, Sandra Weissmann, Andreas Roller, Christiane Eder, et al. 2013. "CEBPA Double-Mutated Acute Myeloid Leukaemia Harbours Concomitant Molecular Mutations in 76.8% of Cases with TET2 and GATA2 Alterations Impacting Prognosis." *British Journal of Haematology* 161 (5): 649–58. <https://doi.org/10.1111/bjh.12297>.
- Guyader-Peyrou, Sandra Le, Gautier Defosse, Emmanuelle Dantony, Morgane Mounier, Edouard Cornet, Zoé Uhry, Anne Cowppli-Bony, et al. 2019. "Estimations Nationales de l'incidence et de La Mortalité Par Cancer En France Métropolitaine Entre 1990 et 2018 - Etude à Partir Des Registres Des Cancers Du Réseau Francim." *Institut de Veille Sanitaire*. Vol. 2-Hémopa.
- Haferlach, T., A. Kohlmann, H. U. Klein, C. Ruckert, M. Dugas, P. M. Williams, W. Kern, et al. 2009. "AML with Translocation t(8;16)(P11;P13) Demonstrates Unique Cytomorphological, Cytogenetic, Molecular and Prognostic Features." *Leukemia* 23 (5): 934–43. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.388>.
- Hanover, John A., Michael W. Krause, and Dona C. Love. 2012. "Bittersweet Memories: Linking Metabolism to Epigenetics through O-GlcNAcylation." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (5): 312–21. <https://doi.org/10.1038/nrm3334>.
- Hasegawa, Makoto, Tatsuhiko Miura, Kouji Kuzuya, Ayu Inoue, Se Won Ki, Sueharu Horinouchi, Tetsuo Yoshida, et al. 2011. "Identification of SAP155 as the Target of GEX1A (Herboxidiene), an Antitumor Natural Product." *ACS Chemical Biology* 6 (3): 229–33. <https://doi.org/10.1021/cb100248e>.
- Hasle, Henrik, Jonas Abrahamsson, Erik Forestier, Shau Yin Ha, Jesper Helderup, Kirsi Jahnukainen, Ólafur Gísli Jónsson, Birgitte Lausen, Josefine Palle, and Bernward Zeller. 2012. "Gemtuzumab Ozogamicin as Postconsolidation Therapy Does Not Prevent Relapse in Children with AML: Results from NOPHO-AML 2004." *Blood* 120 (5): 978–84. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-416701>.
- Hecht, Anna, Seraphina Doll, Heidi Schaarschmidt, Daniel Nowak, Verena Nowak, Julia Obländer, Christina Xanthopoulos, et al. 2016. "Validation of a Molecular Risk Score for Prognosis of Patients with Acute Promyelocytic Leukemia." *Blood* 128 (22): 1668 LP – 1668.
- Hirschmann-Jax, C., A. E. Foster, G. G. Wulf, J. G. Nuchtern, T. W. Jax, U. Gobel, M. A. Goodell, and M. K. Brenner. 2004. "A Distinct 'Side Population' of Cells with High Drug Efflux Capacity in Human Tumor Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (39): 14228–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400067101>.

- Ho, Maria M., Donna E. Hogge, and Victor Ling. 2008. "MDR1 and BCRP1 Expression in Leukemic Progenitors Correlates with Chemotherapy Response in Acute Myeloid Leukemia." *Experimental Hematology* 36 (4): 433–42. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.11.014>.
- Hofmann, Nicole, Dmitry Galetskiy, Daniela Rauch, Thomas Wittmann, Andreas Marquardt, Matthias Gries, and Ralf Zarbock. 2016. "Analysis of the Proteolytic Processing of ABCA3: Identification of Cleavage Site and Involved Proteases." *PLoS ONE* 11 (3): 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152594>.
- Hong, D. S., R. Kurzrock, A. Naing, J. J. Wheler, G. S. Falchook, J. S. Schiffman, N. Faulkner, M. J. Pilat, J. O'Brien, and P. LoRusso. 2014. "A Phase I, Open-Label, Single-Arm, Dose-Escalation Study of E7107, a Precursor Messenger Ribonucleic Acid (Pre-mRNA) Spliceosome Inhibitor Administered Intravenously on Days 1 and 8 Every 21 Days to Patients with Solid Tumors." *Investigational New Drugs* 32 (3): 436–44. <https://doi.org/10.1007/s10637-013-0046-5>.
- Hopfner, Karl Peter. 2016. "Invited Review: Architectures and Mechanisms of ATP Binding Cassette Proteins." *Biopolymers* 105 (8): 492–504. <https://doi.org/10.1002/bip.22843>.
- Hou, H.-A., C.-Y. Liu, Y.-Y. Kuo, W.-C. Chou, C.-H. Tsai, C.-C. Lin, L.-I. Lin, et al. 2016. "Splicing Factor Mutations Predict Poor Prognosis in Patients with de Novo Acute Myeloid Leukemia." *Oncotarget* 7 (8): 8–11. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7000>.
- Houot, Jennifer, Fabienne Marquant, Stephanie Goujon, Laure Faure, Cecile Honore, Marie Helène Roth, Denis Hemon, and Jacqueline Clavel. 2015. "Residential Proximity to Heavy-Traffic Roads, Benzene Exposure, and Childhood Leukemia-The GEOCAP Study, 2002-2007." *American Journal of Epidemiology* 182 (8): 685–93. <https://doi.org/10.1093/aje/kwv111>.
- Hsu, Tiffany Y.T., Lukas M. Simon, Nicholas J. Neill, Richard Marcotte, Azin Sayad, Christopher S. Bland, Gloria V. Echeverria, et al. 2015. "The Spliceosome Is a Therapeutic Vulnerability in MYC-Driven Cancer." *Nature* 525 (7569): 384–88. <https://doi.org/10.1038/nature14985>.
- Hu, Lulu, Ze Li, Jingdong Cheng, Qinhuai Rao, Wei Gong, Mengjie Liu, Yujiang Geno Shi, Jiayu Zhu, Ping Wang, and Yanhui Xu. 2013. "Crystal Structure of TET2-DNA Complex: Insight into TET-Mediated 5mC Oxidation." *Cell* 155 (7): 1545–55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.020>.
- Hubert, Christopher G., Robert K. Bradley, Yu Ding, Chad M. Toledo, Jacob Herman, Kyobi Skutt-Kakaria, Emily J. Girard, et al. 2013. "Genome-Wide RNAi Screens in Human Brain Tumor Isolates Reveal a Novel Viability Requirement for PHF5A." *Genes and Development* 27 (9): 1032–45. <https://doi.org/10.1101/gad.212548.112>.
- Hupfeld, Timo, Bjoern Chapuy, Verena Schrader, Markus Beutler, Christian Veltkamp, Raphael Koch, Silke Cameron, et al. 2013. "Tyrosinekinase Inhibition Facilitates Cooperation of Transcription Factor SALL4 and ABC Transporter A3 towards Intrinsic CML Cell Drug Resistance." *British Journal of Haematology* 161 (2): 204–13. <https://doi.org/10.1111/bjh.12246>.
- Inaba, Hiroto, Ying Fan, Stanley Pounds, Terrence L. Geiger, Jeffrey E. Rubnitz, Raul C. Ribeiro, Ching Hon Pui, and Bassem I. Razzouk. 2008. "Clinical and Biologic Features and Treatment Outcome of Children with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia and Hyperleukocytosis." *Cancer* 113 (3): 522–29. <https://doi.org/10.1002/cncr.23581>.
- Isidori, Alessandro, Claudio Cerchione, Naval Daver, Courtney DiNardo, Guillermo Garcia-Manero, Marina Konopleva, Elias Jabbour, et al. 2021. "Immunotherapy in Acute Myeloid Leukemia: Where We Stand." *Frontiers in Oncology* 11 (May). <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.656218>.
- Ito, Shinsuke, Li Shen, Qing Dai, Susan C. Wu, Leonard B. Collins, James A. Swenberg, Chuan He, and Yi Zhang. 2011. "Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine." *Science* 333 (6047): 1300–1303. <https://doi.org/10.1126/science.1210597>.
- Itzykson, Raphaël, Olivier Kosmider, Aline Renneville, Margot Morabito, Claude Preudhomme, Lionel Adès, Pierre Fenaux, et al. 2013. "Clonal Architecture of Chronic Myelomonocytic Leukemias." *Blood* 121 (12): 2186–98. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-440347>.
- Ivey, Adam, Robert K. Hills, Michael A. Simpson, Jelena V. Jovanovic, Amanda Gilkes, Angela Grech, Yashma Patel, et al. 2016. "Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML." *New England Journal of Medicine* 374 (5): 422–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507471>.
- Iyer, Lakshminarayan M., Mamta Tahiliani, Anjana Rao, and L. Aravind. 2009. "Prediction of Novel Families of Enzymes Involved in Oxidative and Other Complex Modifications of Bases in Nucleic Acids." *Cell Cycle* 8 (11): 1698–1710. <https://doi.org/10.4161/cc.8.11.8580>.

- Januchowski, Radosław, Piotr Zawierucha, Marcin Ruciński, Małgorzata Andrzejewska, Karolina Wojtowicz, Michał Nowicki, and Maciej Zabel. 2014. "Drug Transporter Expression Profiling in Chemoresistant Variants of the A2780 Ovarian Cancer Cell Line." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 68 (4): 447–53. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.02.002>.
- Jeong, Ha Won, Wei Cui, Youyang Yang, Jiayun Lu, Jie He, Ailing Li, David Song, Ye Guo, Bee H. Liu, and Li Chai. 2011. "Sall4, a Stem Cell Factor, Affects the Side Population by Regulation of the Atp-Binding Cassette Drug Transport Genes." *PLoS ONE* 6 (4): 20–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018372>.
- Jin, Peng, Yun Tan, Wei Zhang, Junmin Li, and Kankan Wang. 2020. "Prognostic Alternative MRNA Splicing Signatures and Associated Splicing Factors in Acute Myeloid Leukemia." *Neoplasia (United States)* 22 (9): 447–57. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.06.004>.
- Johnston, Donna L., Todd A. Alonzo, Robert B. Gerbing, Richard Aplenc, William G. Woods, Soheil Meshinchi, and Alan S. Gamis. 2017. "Central Nervous System Disease in Pediatric Acute Myeloid Leukemia: A Report from the Children's Oncology Group." *Pediatric Blood & Cancer* 64 (January): e26612. <https://doi.org/10.1002/pbc.26612>.
- Jourdan, Eric, Nicolas Boissel, Sylvie Chevret, Eric Delabesse, Aline Renneville, Pascale Cornillet, Odile Blanchet, et al. 2013. "Prospective Evaluation of Gene Mutations and Minimal Residual Disease in Patients with Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 121 (12): 2213–23. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-462879>.
- Jung, Hye Jin, Yonghyo Kim, Ju Yong Shin, Jae Kyung Sohng, and Ho Jeong Kwon. 2015. "Antiangiogenic Activity of Herboxidiene via Downregulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 and Hypoxia-Inducible Factor-1 α ." *Archives of Pharmacal Research* 38 (9): 1728–35. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0625-4>.
- Kahles, André, Kjong Van Lehmann, Nora C. Toussaint, Matthias Hüser, Stefan G. Stark, Timo Sachsenberg, Oliver Stegle, et al. 2018. "Comprehensive Analysis of Alternative Splicing Across Tumors from 8,705 Patients." *Cancer Cell* 34 (2): 211–224.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.07.001>.
- Kaminski, Wolfgang E., Armin Piehler, and Jürgen J. Wenzel. 2006. "ABC A-Subfamily Transporters: Structure, Function and Disease." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1762 (5): 510–24. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.01.011>.
- Karalexi, Maria A., Nick Dessypris, Thomas P. Thomopoulos, Evangelos Ntouvelis, Maria Kantzanou, Andreas Antonios Diamantaras, Maria Moschovi, et al. 2017. "Parental Alcohol Consumption and Risk of Leukemia in the Offspring: A Systematic Review and Meta-Analysis." *European Journal of Cancer Prevention* 26 (5): 433–41. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000350>.
- Karni, Rotem, Elisa De Stanchina, Scott W. Lowe, Rahul Sinha, David Mu, and Adrian R. Krainer. 2007. "The Gene Encoding the Splicing Factor SF2/ASF Is a Proto-Oncogene." *Nature Structural and Molecular Biology* 14 (3): 185–93. <https://doi.org/10.1038/nsmb1209>.
- Kelly, Louise M., and D. Gary Gilliland. 2002. "Genetics of Myeloid Leukemias." *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 3 (1): 179–98. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.3.032802.115046>.
- Khan, N., R. K. Hills, P. Virgo, S. Couzens, N. Clark, A. Gilkes, P. Richardson, et al. 2017. "Expression of CD33 Is a Predictive Factor for Effect of Gemtuzumab Ozogamicin at Different Doses in Adult Acute Myeloid Leukaemia." *Leukemia* 31 (5): 1059–68. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.309>.
- Kim, Jung Hyun, Melody C. Baddoo, Eun Young Park, Joshua K. Stone, Hyeonsoo Park, Thomas W. Butler, Gang Huang, et al. 2016. "SON and Its Alternatively Spliced Isoforms Control MLL Complex-Mediated H3K4me3 and Transcription of Leukemia-Associated Genes." *Molecular Cell* 61 (6): 859–73. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.024>.
- Klco, Jeffery M., and Charles G. Mullighan. 2021. "Advances in Germline Predisposition to Acute Leukaemias and Myeloid Neoplasms." *Nature Reviews Cancer* 21 (2): 122–37. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00315-z>.
- Ko, Andrew H., Patrick B. Murphy, James D. Peyton, Dianna L. Shipley, Ahmed Al-Hazzouri, Francisco A. Rodriguez, Mark S. Womack, et al. 2017. "A Randomized, Double-Blinded, Phase II Trial of Gemcitabine and Nab-Paclitaxel Plus Apatorsen or Placebo in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer: The RAINIER Trial." *The Oncologist* 22 (12): 1427. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0066>.
- Koch, Raphael, Thiha Aung, Daniel Vogel, Bjoern Chapuy, Dirk Wenzel, Sabrina Becker, Ursula Sinzig, et al. 2016. "Nuclear Trapping through Inhibition of Exosomal Export by Indomethacin Increases Cytostatic Efficacy of Doxorubicin and Pixantrone." *Clinical Cancer Research* 22 (2): 395–404. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0577>.

- Kode, Aruna, John S. Manavalan, Ioanna Mosialou, Govind Bhagat, Chozha V. Rathinam, Na Luo, Hossein Khiabani, et al. 2014. "Leukaemogenesis Induced by an Activating β -Catenin Mutation in Osteoblasts." *Nature* 506 (7487): 240–44. <https://doi.org/10.1038/nature12883>.
- Koeffler, H. Phillip, and David W. Golde. 1978. "Acute Myelogenous Leukemia: A Human Cell Line Responsive to Colony-Stimulating Activity." *Science* 200 (4346): 1153–54. <https://doi.org/10.1126/science.306682>.
- Koh, Cheryl M., Marco Bezzi, Diana H.P. Low, Wei Xia Ang, Shun Xie Teo, Florence P.H. Gay, Muthafar Al-Haddawi, et al. 2015. "MYC Regulates the Core Pre-mRNA Splicing Machinery as an Essential Step in Lymphomagenesis." *Nature* 523 (7558): 96–100. <https://doi.org/10.1038/nature14351>.
- Kole, Ryszard, Adrian R. Krainer, and Sidney Altman. 2012. "RNA Therapeutics: Beyond RNA Interference and Antisense Oligonucleotides." *Nature Reviews Drug Discovery* 11 (2): 125–40. <https://doi.org/10.1038/nrd3625>.
- Krauth, M. T., C. Eder, T. Alpermann, U. Bacher, N. Nadarajah, W. Kern, C. Haferlach, T. Haferlach, and S. Schnittger. 2014. "High Number of Additional Genetic Lesions in Acute Myeloid Leukemia with t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1: Frequency and Impact on Clinical Outcome." *Leukemia* 28 (7): 1449–58. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.4>.
- Kroeze, Leonie I., Mariam G. Aslanyan, Arno Van Rooij, Theresia N. Koorenhof-Scheele, Marion Massop, Thomas Carell, Jan B. Boezeman, et al. 2014. "Characterization of Acute Myeloid Leukemia Based on Levels of Global Hydroxymethylation." *Blood* 124 (7): 1110–18. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-518514>.
- Lacombe, Francis, Lydia Campos, Kaoutar Allou, Christine Arnoulet, Adrienne Delabarthe, Florent Dumezy, Jean Feuillard, et al. 2017. "Prognostic Value of Multicenter Flow Cytometry Harmonized Assessment of Minimal Residual Disease in Acute Myeloblastic Leukemia." *Hematological Oncology*, no. October 2017: 422–28. <https://doi.org/10.1002/hon.2488>.
- Lacour, Brigitte, Aurélie Guyot-Goubin, Sandra Guissou, Stéphanie Bellec, Emmanuel Désandes, and Jacqueline Clavel. 2010. "Incidence of Childhood Cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000–2004." *European Journal of Cancer Prevention* 19 (3): 173–81. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e32833876c0>.
- Laetsch, T. W., X. Liu, A. Vu, M. Sliozberg, M. Vido, O. U. Elci, K. C. Goldsmith, and M. D. Hogarty. 2014. "Multiple Components of the Spliceosome Regulate Mcl1 Activity in Neuroblastoma." *Cell Death and Disease* 5 (2): 1–12. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.40>.
- Lamba, Jatinder K, Lata Chauhan, Miyoung Shin, Michael R Loken, Jessica A Pollard, Yi-cheng Wang, E Ries, et al. 2017. "CD33 Splicing Polymorphism Determines Gemtuzumab Ozogamicin Response in De Novo Acute Myeloid Leukemia: Report From Randomized Phase III Children's Oncology Group Trial AAML0531." *Journal of Clinical Oncology* 35 (23): 1–10. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.2513>.
- Lambert, Juliette, Cécile Pautas, Christine Terré, Emmanuel Raffoux, Pascal Turlure, Denis Caillot, Ollivier Legrand, et al. 2019. "Gemtuzumab Ozogamicin for de Novo Acute Myeloid Leukemia: Final Efficacy and Safety Updates from the Open-Label, Phase III ALFA-0701 Trial." *Haematologica* 104 (1): 113–19. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.188888>.
- Langemeijer, S., R. Kuiper, M. Berends, R. Knops, M. Aslanyan, M. Massop, P. van Hoogen, et al. 2009. "Acquired Mutations in TET2 Are Common in Myelodysplastic Syndromes." *Nature Genetics* 41 (7): 838–42. <https://doi.org/10.1038/ng.391>.
- Larrayoz, M., S. J. Blakemore, R. C. Dobson, M. D. Blunt, M. J.J. Rose-Zerilli, R. Walewska, A. Duncombe, et al. 2016. "The SF3B1 Inhibitor Spliceostatin A (SSA) Elicits Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukaemia Cells through Downregulation of Mcl-1." *Leukemia* 30 (2): 351–60. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.286>.
- Laskin, Janessa J., Garth Nicholas, Christopher Lee, Barbara Gitlitz, Mark Vincent, Yvon Cormier, Joe Stephenson, et al. 2012. "Phase I/II Trial of Custirsén (OGX-011), an Inhibitor of Clusterin, in Combination with a Gemcitabine and Platinum Regimen in Patients with Previously Untreated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer." *Journal of Thoracic Oncology* 7 (3): 579–86. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31823f459c>.
- Lee, Donghoon, Jing Zhang, Jason Liu, and Mark Gerstein. 2020. "Epigenome-Based Splicing Prediction Using a Recurrent Neural Network." *PLoS Computational Biology* 16 (6): 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008006>.
- Lee, Stanley Chun Wei, and Omar Abdel-Wahab. 2016. "Therapeutic Targeting of Splicing in Cancer." *Nature Medicine* 22 (9): 976–86. <https://doi.org/10.1038/nm.4165>.
- Lee, Stanley Chun Wei, Heidi Dvinge, Eunhee Kim, Hana Cho, Jean Baptiste Micol, Young Rock Chung, Benjamin H. Durham, et al. 2016. "Modulation of Splicing Catalysis for Therapeutic Targeting of Leukemia with Mutations in Genes Encoding Spliceosomal Proteins." *Nature Medicine* 22 (6): 672–78. <https://doi.org/10.1038/nm.4097>.

- Li, Ailing, Youyang Yang, Chong Gao, Jiayun Lu, Ha Won Jeong, Bee H. Liu, Ping Tang, et al. 2013. "A SALL4/MLL/HOXA9 Pathway in Murine and Human Myeloid Leukemogenesis." *Journal of Clinical Investigation* 123 (10): 4195–4207. <https://doi.org/10.1172/JCI62891>.
- Li, Ran, Zuoyou Ding, Peng Jin, Shishuang Wu, Ge Jiang, Rufang Xiang, Wenfang Wang, et al. 2021. "Development and Validation of a Novel Prognostic Model for Acute Myeloid Leukemia Based on Immune-Related Genes." *Frontiers in Immunology* 12 (May): 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.639634>.
- Li, Rong, Yuan Zhou, Zeng Cao, Lin Liu, Jinhuan Wang, Zizhen Chen, Wen Xing, et al. 2018. "TET2 Loss Dysregulates the Behavior of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells and Accelerates Tet2^{-/-}-Driven Myeloid Malignancy Progression." *Stem Cell Reports* 10 (1): 166–79. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.11.019>.
- Li, Yuan, Nan Sun, Zhiliang Lu, Shouguo Sun, Jianbing Huang, Zhaoli Chen, and Jie He. 2017. "Prognostic Alternative MRNA Splicing Signature in Non-Small Cell Lung Cancer." *Cancer Letters* 393: 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.02.016>.
- Lin, Chin Yo, Anders Ström, Vinsensius Berlian Vega, Say Li Kong, A. L. Yeo, Jane S. Thomsen, Wan Ching Chan, et al. 2004. "Discovery of Estrogen Receptor Alpha Target Genes and Response Elements in Breast Tumor Cells." *Genome Biology* 5 (9). <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-9-r66>.
- Linnet, Martha S, Ethel S Gilbert, Roel Vermeulen, M Dores, Song-nian Yin, Richard B Hayes, Bu-tian Ji, Qing Lan, Gui-lan Li, and Nathaniel Rothman. 2019. "Benzene Exposure Response and Risk of Myeloid Neoplasms in Chinese Workers : A Multicenter Case – Cohort Study." *Journal of the National Cancer Institute* 111 (5): 465–74. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy143>.
- List, Alan F., Kenneth J. Kopecky, Cheryl L. Willman, David R. Head, Diane L. Persons, Marilyn L. Slovak, Robert Dorr, et al. 2001. "Benefit of Cyclosporine Modulation of Drug Resistance in Patients with Poor-Risk Acute Myeloid Leukemia: A Southwest Oncology Group Study." *Blood* 98 (12): 3212–20. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.12.3212>.
- Liu, Li, Liang Liu, Lai Han Leung, Austin J. Cooney, Changyi Chen, Todd K. Rosengart, Yupo Ma, and Jianchang Yang. 2015. "Knockdown of SALL4 Protein Enhances All-Trans Retinoic Acid-Induced Cellular Differentiation in Acute Myeloid Leukemia Cells." *Journal of Biological Chemistry* 290 (17): 10599–609. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.634790>.
- Liu, Li, Joseph Souto, Wenbin Liao, Yongping Jiang, Yangqiu Li, Ryuichi Nishinakamura, Suming Huang, et al. 2013. "Histone Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1) Protein Is Involved in Sal-like Protein 4 (SALL4)-Mediated Transcriptional Repression in Hematopoietic Stem Cells." *Journal of Biological Chemistry* 288 (48): 34719–28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.506568>.
- Liu, Wen-Jian, Xiao-Hong Tan, Xiu-Ping Luo, Bao-Ping Guo, Zhou-Ji Wei, Qing Ke, Sha He, and Hong Cen. 2014. "Prognostic Significance of Tet Methylcytosine Dioxygenase 2 (TET2) Gene Mutations in Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Meta-Analysis." *Leukemia & Lymphoma* 8194 (71): 1–8. <https://doi.org/10.3109/10428194.2014.893308>.
- Lloyd, James P. B. 2018. "The Evolution and Diversity of the Nonsense-Mediated MRNA Decay Pathway." *F1000Research* 7 (Aug 15;1299): 1–28. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15872.1>.
- Long, Nguyen Phuoc, Wun Jun Lee, Nguyen Truong Huy, Seul Ji Lee, Jeong Hill Park, and Sung Won Kwon. 2016. "Novel Biomarker Candidates for Colorectal Cancer Metastasis: A Meta-Analysis of in Vitro Studies." *Cancer Informatics* 15: 11–17. <https://doi.org/10.4137/CIN.S40301>.
- Lorsback, R. B., J. Moore, S. Mathew, S. C. Raimondi, S. T. Mukatira, and J. R. Downing. 2003. "TET1, a Member of a Novel Protein Family, Is Fused to MLL in Acute Myeloid Leukemia Containing the t(10;11)(Q22;23)." *Leukemia* 17 (3): 637–41. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402834>.
- Lu, Zhi Xiang, Qin Huang, Juw Won Park, Shihao Shen, Lan Lin, Collin J. Tokheim, Michael D. Henry, and Yi Xing. 2015. "Transcriptome-Wide Landscape of Pre-mRNA Alternative Splicing Associated with Metastatic Colonization." *Molecular Cancer Research* 13 (2): 305–18. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0366>.
- Luco, Reini F., Qun Pan, Kaoru Tominaga, Benjamin J. Blencowe, Olivia M. Pereira-Smith, and Tom Misteli. 2010. "Regulation of Alternative Splicing by Histone Modifications." *Science* 327 (5968): 996–1000. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1184208>.
- Ma, Ji Chun, Jun Qian, Jiang Lin, Wei Qian, Jing Yang, Cui Zhu Wang, Hai Yan Chai, Yun Li, Qin Chen, and Zhen Qian. 2013. "Aberrant Hypomethylation of SALL4 Gene Is Associated with Intermediate and Poor Karyotypes in Acute Myeloid Leukemia." *Clinical Biochemistry* 46 (4–5): 304–7. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.11.018>.

- Ma, Yupo, Wei Cui, Jianchang Yang, Jun Qu, Chunhui Di, Hesham M. Amin, Raymond Lai, Jerome Ritz, Diane S. Krause, and Li Chai. 2006. "SALL4, a Novel Oncogene, Is Constitutively Expressed in Human Acute Myeloid Leukemia (AML) and Induces AML in Transgenic Mice." *Blood* 108 (8): 2726–35. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-001594>.
- Maguire, Sarah L., Andri Leonidou, Patty Wai, Caterina Marchiò, Charlotte K.Y. Ng, Anna Sapino, Anne Vincent Salomon, Jorge S. Reis-Filho, Britta Weigelt, and Rachael C. Natrajan. 2015. "SF3B1 Mutations Constitute a Novel Therapeutic Target in Breast Cancer." *Journal of Pathology* 235 (4): 571–80. <https://doi.org/10.1002/path.4483>.
- Makowski, Kamil, Luisa Vigevani, Fernando Albericio, Juan Valcarcel, and Mercedes Alvarez. 2017. "Sudemycin k: A Synthetic Antitumor Splicing Inhibitor Variant with Improved Activity and Versatile Chemistry." *ACS Chemical Biology* 12 (1): 163–73. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00562>.
- Marceau-Renaut, Alice, Nicolas Duployez, Benoît Ducourneau, Myriam Labopin, Arnaud Petit, Alexandra Rousseau, Sandrine Geffroy, et al. 2018. "Molecular Profiling Defines Distinct Prognostic Subgroups in Childhood AML: A Report from the French ELAM02 Study Group." *HemaSphere* 2 (1). <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000031>.
- Marcotte, Erin L, Thomas P Thomopoulos, Claire Infante-Rivard, Jacqueline Clavel, Eleni Th Petridou, Joachim Schütz, Sameera Ezzat, et al. 2016. "Caesarean Delivery and Risk of Childhood Leukaemia: A Pooled Analysis from the Childhood Leukemia International Consortium (CLIC)." *Lancet Hematology* 3 (4): e176–85. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(16\)00002-8](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(16)00002-8).
- Marcucci, Guido, Kati Maharry, Yue Zhong Wu, Michael D. Radmacher, Krzysztof Mrózek, Dean Margeson, Kelsi B. Holland, et al. 2010. "IDH1 and IDH2 Gene Mutations Identify Novel Molecular Subsets within de Novo Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study." *Journal of Clinical Oncology* 28 (14): 2348–55. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.3730>.
- Martincorena, Iñigo, and Peter J Campbell. 2015. "Somatic Mutation in Cancer and Normal Cells." *Science* 349 (6255): 1483–89. <https://doi.org/10.1126/science.aab4082>.
- Marzac, Christophe, Edith Garrido, Ruoping Tang, Fanny Fava, Pierre Hirsch, Cinzia de Benedictis, Elise Corre, et al. 2011. "ATP Binding Cassette Transporters Associated with Chemoresistance: Transcriptional Profiling in Extreme Cohorts and Their Prognostic Impact in a Cohort of 281 Acute Myeloid Leukemia Patients." *Haematologica* 96 (9): 1293–1301. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.031823>.
- Masetti, Riccardo, Martina Pigazzi, Marco Togni, Annalisa Astolfi, Valentina Indio, Elena Manara, Rita Casadio, Andrea Pession, Giuseppe Basso, and Franco Locatelli. 2013. "CBFA2T3-GLIS2 Fusion Transcript Is a Novel Common Feature in Pediatric, Cytogenetically Normal AML, Not Restricted to FAB M7 Subtype." *Blood* 121 (17): 3469–72. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-469825>.
- Matera, A. Gregory, and Zefeng Wang. 2014. "A Day in the Life of the Spliceosome." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (2): 108–21. <https://doi.org/10.1038/nrm3742>.
- Matlin, Arianne J., Francis Clark, and Christopher W.J. Smith. 2005. "Understanding Alternative Splicing: Towards a Cellular Code." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (5): 386–98. <https://doi.org/10.1038/nrm1645>.
- Matsuo, Masafumi. 2021. "Antisense Oligonucleotide-Mediated Exon-Skipping Therapies: Precision Medicine Spreading from Duchenne Muscular Dystrophy." *JMA Journal* 4 (3): 232–40. <https://doi.org/10.31662/jmaj.2021-0019>.
- Matsuzaki, Yohei, Valérie Besnard, Jean C. Clark, Yan Xu, Susan E. Wert, Machiko Ikegami, and Jeffrey A. Whitsett. 2008. "STAT3 Regulates ABCA3 Expression and Influences Lamellar Body Formation in Alveolar Type II Cells." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 38 (5): 551–58. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0311OC>.
- Mauro-Herrera, Margarita, John Chiang, Bojana Radojevic, and Lea D. Bennett. 2021. "Functional Evaluation of Splicing for Variants of Uncertain Significance in Patients with Inherited Retinal Diseases." *Genes* 12 (7). <https://doi.org/10.3390/genes12070993>.
- Maxson, Julia E., Jason Gotlib, Daniel A. Pollyea, Angela G. Fleischman, Anupriya Agarwal, Christopher A. Eide, Daniel Bottomly, et al. 2013. "Oncogenic CSF3R Mutations in Chronic Neutrophilic Leukemia and Atypical CML." *New England Journal of Medicine* 368 (19): 1781–90. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1214514>.
- Mead, Adam J., Rosemary E. Gale, Robert K. Hills, Manu Gupta, Bryan D. Young, Alan K. Burnett, and David C. Linch. 2008. "Conflicting Data on the Prognostic Significance of FLT3/TKD Mutations in Acute Myeloid Leukemia Might Be Related to the Incidence of Biallelic Disease." *Blood* 112 (2): 444–45. <https://doi.org/10.1002/qcc.20573>.Response.

- Metayer, Catherine, Elizabeth Milne, John D. Dockerty, Jacqueline Clavel, Maria S. Pombo-De-Oliveira, Catharina Wesseling, Logan G. Spector, et al. 2014. "Maternal Supplementation with Folic Acid and Other Vitamins and Risk of Leukemia in Offspring: A Childhood Leukemia International Consortium Study." *Epidemiology* 25 (6): 811–22. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000141>.
- Metayer, Catherine, Eleni Petridou, Juan Manuel Mejía Aranguré, Eve Roman, Joachim Schüz, Corrado Magnani, Ana Maria Mora, et al. 2016. "Parental Tobacco Smoking and Acute Myeloid Leukemia: The Childhood Leukemia International Consortium." *American Journal of Epidemiology* 184 (4): 261–73. <https://doi.org/10.1093/aje/kww018>.
- Michaud, Joëlle, Feng Wu, Motomi Osato, Gregory M. Cottles, Masatoshi Yanagida, Norio Asou, Katsuya Shigesada, et al. 2002. "In Vitro Analyses of Known and Novel RUNX1/AML1 Mutations in Dominant Familial Platelet Disorder with Predisposition to Acute Myelogenous Leukemia: Implications for Mechanisms of Pathogenesis." *Blood* 99 (4): 1364–72. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.4.1364>.
- Milan, Thomas, Magalie Celton, Karine Lagacé, Élodie Roques, Safia Safa-Tahar-Henni, Eva Bresson, Anne Bergeron, et al. 2020. "Epigenetic Changes in Human Model KMT2A Leukemias Highlight Early Events during Leukemogenesis." *Haematologica* Early view (December). <https://doi.org/doi.org/10.3324/haematol.2020.271619>.
- Mohamed, Aminetou Mint. 2015. "Anomalies d'épissage Dans Les Leucémies Aiguës Myéloïdes : Rôle de WT1 et DEK et Impact Clinique." UCBL.
- Mohamed, Aminetou Mint, Marie Balsat, Catherine Koering, Delphine Maucourt-Boulch, Nicolas Boissel, Lea Payen-Gay, Meyling Cheok, et al. 2017. "TET2 Exon 2 Skipping Is an Independent Favorable Prognostic Factor for Cytogenetically Normal Acute Myelogenous Leukemia (AML): TET2 Exon 2 Skipping in AML." *Leukemia Research* 56: 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2017.01.012>.
- Mohamed, Aminetou Mint, Marie Balsat, Morgan Thenoz, Catherine Koering, Lea Payen-Gay, Meyling Cheok, Hussein Mortada, et al. 2015. "Oncogene- and Drug Resistance-Associated Alternative Exon Usage in Acute Myeloid Leukemia (AML)." *Oncotarget* 7 (3): 2889–2909. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3898>.
- Mohamed, Aminetou Mint, Morgan Thénnoz, Françoise Solly, Marie Balsat, Franck Mortreux, and Eric Wattel. 2014. "How MRNA Is Misspliced in Acute Myelogenous Leukemia (AML)?" *Oncotarget* 5 (20): 9534–45. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4259418&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Moran-Crusio, Kelly, Linsey Reavie, Alan Shih, Omar Abdel-Wahab, Delphine Ndiaye-Lobry, Camille Lobry, Maria E. Figueroa, et al. 2011. "Tet2 Loss Leads to Increased Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Myeloid Transformation." *Cancer Cell* 20 (1): 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.001>.
- Morrison, Avril a., Rebecca L. Viney, and Michael R. Ladomery. 2008. "The Post-Transcriptional Roles of WT1, a Multifunctional Zinc-Finger Protein." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1785: 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.10.002>.
- Mosquera Orgueira, Adrián, Andrés Peleteiro Raíndo, Miguel Cid López, José Ángel Díaz Arias, Marta Sonia González Pérez, Beatriz Antelo Rodríguez, Natalia Alonso Vence, et al. 2021. "Personalized Survival Prediction of Patients With Acute Myeloblastic Leukemia Using Gene Expression Profiling." *Frontiers in Oncology* 11 (March): 1–6. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.657191>.
- Mucaki, Eliseos J., Peter Ainsworth, and Peter K. Rogan. 2011. "Comprehensive Prediction of MRNA Splicing Effects of BRCA1 and BRCA2 Variants." *Human Mutation* 32 (7): 735–42. <https://doi.org/10.1002/humu.21513>.
- Muraki, Michiko, Bisei Ohkawara, Takamitsu Hosoya, Hiroshi Onogi, Jun Koizumi, Tomonobu Koizumi, Kengo Sumi, et al. 2004. "Manipulation of Alternative Splicing by a Newly Developed Inhibitor of Clks." *Journal of Biological Chemistry* 279 (23): 24246–54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314298200>.
- Nazha, A., A. Zarzour, K. Al-Issa, T. Radivoyevitch, H. E. Carraway, C. M. Hirsch, B. Przychodzen, et al. 2016. "The Complexity of Interpreting Genomic Data in Patients with Acute Myeloid Leukemia." *Blood Cancer Journal* 6 (12): e510. <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.115>.
- Neuhoff, Christine Von, Dirk Reinhardt, Annette Sander, Martin Zimmermann, Jutta Bradtke, David R. Betts, Zuzana Zemanova, et al. 2010. "Prognostic Impact of Specific Chromosomal Aberrations in a Large Group of Pediatric Patients with Acute Myeloid Leukemia Treated Uniformly According to Trial AML-BFM 98." *Journal of Clinical Oncology* 28 (16): 2682–89. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.6321>.
- Ng, Stanley W.K., Amanda Mitchell, James A. Kennedy, Weihsu C. Chen, Jessica McLeod, Narmin Ibrahimova, Andrea Arruda, et al. 2016. "A 17-Gene Stemness Score for Rapid Determination of Risk in Acute Leukaemia." *Nature* 540 (7633): 433–37. <https://doi.org/10.1038/nature20598>.

- Norwood, Kevin, Rui Yu Wang, Charlotte Hirschmann-Jax, Michael Andreeff, Malcolm K. Brenner, Margaret A. Goodell, and Gerald G. Wulf. 2004. "An in Vivo Propagated Human Acute Myeloid Leukemia Expressing ABCA3." *Leukemia Research* 28 (3): 295–99. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2003.08.006>.
- Obero, Sapna, Thomas Lehrnbecher, Bob Phillips, Johann Hitzler, Marie Chantal Ethier, Joseph Beyene, and Lillian Sung. 2014. "Leukapheresis and Low-Dose Chemotherapy Do Not Reduce Early Mortality in Acute Myeloid Leukemia Hyperleukocytosis: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Leukemia Research* 38 (4): 460–68. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2014.01.004>.
- Ohadi, Farzaneh, Soheila Rahgozar, and Elaheh Sadat Ghodousi. 2020. "Sal-like Protein 4 Transcription Factor: A Significant Diagnostic Biomarker Involved in Childhood ALL Resistance and Relapse." *Cancer Management and Research* 12: 1611–19. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S240469>.
- Orsi, L., J. Rudant, R. Ajrouche, G. Leverger, A. Baruchel, B. Nelken, M. Pasquet, et al. 2015. "Parental Smoking, Maternal Alcohol, Coffee and Tea Consumption during Pregnancy, and Childhood Acute Leukemia: The ESTELLE Study." *Cancer Causes and Control* 26 (7): 1003–17. <https://doi.org/10.1007/s10552-015-0593-5>.
- Overbeck, Tobias R., Johanna Arnemann, Regina Waldmann-Beushausen, Lorenz Trümper, Friedrich A. Schöndube, Kirsten Reuter-Jessen, and Bernhard C. Danner. 2017. "ABCA3 Phenotype in Non-Small Cell Lung Cancer Indicates Poor Outcome." *Oncology (Switzerland)* 93 (4): 270–78. <https://doi.org/10.1159/000477619>.
- Overbeck, Tobias R., Timo Hupfeld, Doris Krause, Regina Waldmann-Beushausen, Bjoern Chapuy, Bjoern Gündenzoph, Thiha Aung, et al. 2013. "Intracellular ATP-Binding Cassette Transporter A3 Is Expressed in Lung Cancer Cells and Modulates Susceptibility to Cisplatin and Paclitaxel." *Oncology (Switzerland)* 84 (6): 362–70. <https://doi.org/10.1159/000348884>.
- Pan, Feng, Thomas S. Wingo, Zhigang Zhao, Rui Gao, Hideki Makishima, Guangbo Qu, Li Lin, et al. 2017. "Tet2 Loss Leads to Hypermutagenicity in Haematopoietic Stem/Progenitor Cells." *Nature Communications* 8: 15102. <https://doi.org/10.1038/ncomms15102>.
- Pan, Qun, Ofer Shai, Leo J. Lee, Brendan J. Frey, and Benjamin J. Blencowe. 2008. "Deep Surveying of Alternative Splicing Complexity in the Human Transcriptome by High-Throughput Sequencing." *Nature Genetics* 40 (12): 1413–15. <https://doi.org/10.1038/ng.259>.
- Paolini, Alessandro, Antonella Baldassarre, Ilaria Del Gaudio, and Andrea Masotti. 2015. "Structural Features of the ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter ABCA3." *International Journal of Molecular Sciences* 16 (8): 19631–44. <https://doi.org/10.3390/ijms160819631>.
- Papaemmanuil, Elli, Moritz Gerstung, Lars Bullinger, Verena I. Gaidzik, Peter Paschka, Nicola D. Roberts, Nicola E. Potter, et al. 2016. "Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia." *New England Journal of Medicine* 374 (23): 2209–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516192>.
- Paschka, Peter, Guido Marcucci, Amy S. Ruppert, Krzysztof Mrózek, Hankui Chen, Rick A. Kittles, Tamara Vukosavljevic, et al. 2006. "Adverse Prognostic Significance of KIT Mutations in Adult Acute Myeloid Leukemia with Inv(16) and t(8;21): A Cancer and Leukemia Group B Study." *Journal of Clinical Oncology* 24 (24): 3904–11. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.9500>.
- Paschka, Peter, Richard F. Schlenk, Verena I. Gaidzik, Marianne Habdank, Jan Krönke, Lars Bullinger, Daniela Späth, et al. 2010. "IDH1 and IDH2 Mutations Are Frequent Genetic Alterations in Acute Myeloid Leukemia and Confer Adverse Prognosis in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia with NPM1 Mutation without FLT3 Internal Tandem Duplication." *Journal of Clinical Oncology* 28 (22): 3636–43. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.3762>.
- Paschka, Peter, Richard F. Schlenk, Verena I. Gaidzik, Julia K. Herzig, Teresa Aulitzky, Lars Bullinger, Daniela Späth, et al. 2015. "ASXL1 Mutations in Younger Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group." *Haematologica* 100 (3): 324–30. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.114157>.
- Patel, Jay P., Mithat Gönen, Maria E. Figueroa, Hugo Fernandez, Zhuoxin Sun, Janis Racevskis, Pieter Van Vlierberghe, et al. 2012. "Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia." *N Engl J Med* 366 (12): 1079–89. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1112304>.
- Pearce, Mark S., Jane A. Salotti, Mark P. Little, Kieran McHugh, Choonsik Lee, Kwang Pyo Kim, Nicola L. Howe, et al. 2012. "Radiation Exposure from CT Scans in Childhood and Subsequent Risk of Leukaemia and Brain Tumours: A Retrospective Cohort Study." *The Lancet* 380 (9840): 499–505. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60815-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60815-0).
- Petit, Arnaud, Stéphane Ducassou, Thierry Leblanc, Marlène Pasquet, Alexandra Rousseau, Christine Ragu, Marine Cachanado, et al. 2018. "Maintenance Therapy With Interleukin-2 for Childhood AML." *HemaSphere* 6 (September): 1. <https://doi.org/10.1097/hs9.0000000000000159>.

- Pfaffl, Michael W. 2001. "A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR." *Nucleic Acids Research* 29 (9): 16–21. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Pigazzi, Martina, Elena Manara, Barbara Buldini, Valzerda Beqiri, Valeria Bisio, Claudia Tregnago, Roberto Rondelli, et al. 2015. "Minimal Residual Disease Monitored after Induction Therapy by Rq-Pcr Can Contribute to Tailor Treatment of Patients with t(8;21) Runx1-Runx1t1 Rearrangement." *Haematologica* 100 (3): e99–101. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.114579>.
- Pisignano, Giuseppina, and Michael Ladomery. 2021. "Epigenetic Regulation of Alternative Splicing: How Lncrnas Tailor the Message." *Non-Coding RNA* 7 (1). <https://doi.org/10.3390/ncrna7010021>.
- Plesa, Adriana, Charles Dumontet, Eve Mattei, Ines Tagoug, Sandrine Hayette, Pierre Sujobert, Isabelle Tigaud, et al. 2017. "High Frequency of CD34+CD38-/Low Immature Leukemia Cells Is Correlated with Unfavorable Prognosis in Acute Myeloid Leukemia." *World J Stem Cells* 9 (12): 227–34. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v9.i12.227>.
- Plesa, Adriana, Christophe Roumier, Nathalie Bleyzac, Cecile Renard, Aline Renneville, Florent Dumezy, Delphine Manzoni, et al. n.d. "Leukemic Stem Cell (LSC) Quantification by Multiparameter Flow Cytometry: A Tool to Evaluate Pediatric AML Patients with Greater Benefit from Allogenic HSCT?" <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.11482.24004>.
- Plesa, Adriana, and Pierre Sujobert. 2019. "Cannibalistic Acute Myeloid Leukemia with ZMYND11-MBTD1 Fusion." *Blood* 133 (16): 1789. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-01-898619>.
- Pollard, Jessica A., Michael Loken, Robert B. Gerbing, Susana C. Raimondi, Betsy A. Hirsch, Richard Aplenc, Irwin D. Bernstein, Alan S. Gamis, Todd A. Alonzo, and Soheil Meshinchi. 2016. "CD33 Expression and Its Association with Gemtuzumab Ozogamicin Response: Results from the Randomized Phase III Children's Oncology Group Trial AAML0531." *Journal of Clinical Oncology* 34 (7): 747–55. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.6846>.
- Polprasert, Chantana, Isabell Schulze, Mikkael A. Sekeres, Hideki Makishima, Bartłomiej Przychodzen, Naoko Hosono, Jarnail Singh, et al. 2015. "Inherited and Somatic Defects in DDX41 in Myeloid Neoplasms." *Cancer Cell* 27 (5): 658–70. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.017>.
- Poulikakos, Poulikos I., Yogindra Persaud, Manickam Janakiraman, Xiangju Kong, Charles Ng, Gatien Moriceau, Hubing Shi, et al. 2011. "RAF Inhibitor Resistance Is Mediated by Dimerization of Aberrantly Spliced BRAF(V600E)." *Nature* 480 (7377): 387–90. <https://doi.org/10.1038/nature10662>.
- Quazi, Faraz, and Robert S. Molday. 2011. "Lipid Transport by Mammalian ABC Proteins." *Essays In Biochemistry* 50: 265–90. <https://doi.org/10.1042/bse0500265>.
- Raaijmakers, M. H.G.P. 2007. "ATP-Binding-Cassette Transporters in Hematopoietic Stem Cells and Their Utility as Therapeutical Targets in Acute and Chronic Myeloid Leukemia." *Leukemia* 21 (10): 2094–2102. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404859>.
- Radzisheuskaya, Aliaksandra, Pavel V. Shliaha, Vasily Grinev, Eugenia Lorenzini, Sergey Kovalchuk, Daria Shlyueva, Vladimir Gorshkov, Ronald C. Hendrickson, Ole N. Jensen, and Kristian Helin. 2019. "PRMT5 Methylome Profiling Uncovers a Direct Link to Splicing Regulation in Acute Myeloid Leukemia." *Nature Structural and Molecular Biology* 26 (11): 999–1012. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0313-z>.
- Rahgozar, Soheila, Alireza Moafi, Marjan Abedi, Mansureh Entezar-E-Ghaem, Jamal Moshtaghian, Kamran Ghaedi, Abolghasem Esmaeili, and Fatemeh Montazeri. 2014. "MRNA Expression Profile of Multidrug-Resistant Genes in Acute Lymphoblastic Leukemia of Children, a Prognostic Value for ABCA3 and ABCA2." *Cancer Biology and Therapy* 15 (1): 35–41. <https://doi.org/10.4161/cbt.26603>.
- Raspadori, D, D Damiani, M Lenoci, D Rondelli, N Testoni, G Nardi, C Sestigiani, et al. 2001. "CD56 Antigenic Expression in Acute Myeloid Leukemia Identifies Patients with Poor Clinical Prognosis." *Leukemia* 15 (8): 1161–64. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402174>.
- Rivera, Osvaldo D., Michael J. Mallory, Mathieu Quesnel-Vallières, Rakesh Chatrikhi, David C. Schultz, Martin Carroll, Yoseph Barash, Sara Cherry, and Kristen W. Lynch. 2021. "Alternative Splicing Redefines Landscape of Commonly Mutated Genes in Acute Myeloid Leukemia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (15): 1–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.2014967118>.
- Rooij, J. D.E. De, I. H.I.M. Hollink, S. T.C.J.M. Arentsen-Peters, J. F. Van Galen, H. Berna Beverloo, A. Baruchel, J. Trka, et al. 2013. "NUP98/JARID1A Is a Novel Recurrent Abnormality in Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia with a Distinct HOX Gene Expression Pattern." *Leukemia* 27 (12): 2280–88. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.87>.

- Rosenberg, Jonathan E., Noah M. Hahn, Meredith M. Regan, Lillian Werner, Ajai Alva, Saby George, Joel Picus, et al. 2018. "Apatorsen plus Docetaxel versus Docetaxel Alone in Platinum-Resistant Metastatic Urothelial Carcinoma (Borealis-2)." *British Journal of Cancer* 118 (11): 1434–41. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0087-9>.
- Ruan, Guo Xiang, Elizabeth Barry, Dan Yu, Michael Lukason, Seng H. Cheng, and Abraham Scaria. 2017. "CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing as a Therapeutic Approach for Leber Congenital Amaurosis 10." *Molecular Therapy* 25 (2): 331–41. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.12.006>.
- Rubnitz, Jeffrey E., Hiroto Inaba, Gary Dahl, Raul C. Ribeiro, W. Paul Bowman, Jeffrey Taub, Stanley Pounds, et al. 2010. "Minimal Residual Disease-Directed Therapy for Childhood Acute Myeloid Leukaemia: Results of the AML02 Multicentre Trial." *The Lancet Oncology* 11 (6): 543–52. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70090-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70090-5).
- Rücker, Frank G., Richard F. Schlenk, Lars Bullinger, Sabine Kayser, Veronica Teleanu, Helena Kett, Marianne Haddank, et al. 2012. "TP53 Alterations in Acute Myeloid Leukemia with Complex Karyotype Correlate with Specific Copy Number Alterations, Monosomal Karyotype, and Dismal Outcome." *Blood* 119 (9): 2114–21. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-375758>.
- Rudant, J, L Orsi, A Bonaventure, S Goujon-Bellec, E Corda, A Baruchel, Y Bertrand, et al. 2013. "Are ARID5B and IKZF1 Polymorphisms Also Associated with Childhood Acute Myeloblastic Leukemia : The ESCALE Study (SFCE)?" *Leukemia* 27: 746–48. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.244>.
- Rudant, Jérémie, Tracy Lightfoot, Kevin Y. Urayama, Eleni Petridou, John D. Dockerty, Corrado Magnani, Elizabeth Milne, et al. 2015. "Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Indicators of Early Immune Stimulation: A Childhood Leukemia International Consortium Study." *American Journal of Epidemiology* 181 (8): 549–62. <https://doi.org/10.1093/aje/kwu298>.
- Rudant, Jérémie, Laurent Orsi, Audrey Bonaventure, Stéphanie Goujon-Bellec, André Baruchel, Arnaud Petit, Yves Bertrand, et al. 2015. "ARID5B, IKZF1 and Non-Genetic Factors in the Etiology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: The ESCALE Study." *PLoS ONE* 10 (3): 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121348>.
- Rudant, Jérémie, Laurent Orsi, Florence Menegaux, Arnaud Petit, André Baruchel, Yves Bertrand, Anne Lambilliotte, et al. 2010. "Childhood Acute Leukemia, Early Common Infections, and Allergy: The ESCALE Study." *American Journal of Epidemiology* 172 (9): 1015–27. <https://doi.org/10.1093/aje/kwq233>.
- Sanz, Miguel A., Pierre Fenaux, Martin S. Tallman, Elihu H. Estey, Bob Löwenberg, Tomoki Naoe, Eva Lengfelder, et al. 2019. "Management of Acute Promyelocytic Leukemia: Updated Recommendations from an Expert Panel of the European LeukemiaNet." *Blood* 133 (15): 1630–43. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-01-894980>.
- Satoh, Takayuki, and Daisuke Kaida. 2016. "Upregulation of P27 Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor and a C-Terminus Truncated Form of P27 Contributes to G1 Phase Arrest." *Scientific Reports* 6 (May): 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep27829>.
- Schlenk, Richard F, Sabine Kayser, Lars Bullinger, Guido Kobbe, Jochen Casper, Mark Ringhoffer, Gerhard Held, et al. 2015. "Differential Impact of Allelic Ratio and Insertion Site in FLT3 -ITD – Positive AML with Respect to Allogeneic Transplantation." *Blood* 124 (23): 3441–50. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-578070>.R.F.S.
- Scopim-Ribeiro, Renata, João Agostinho Machado-Neto, Paula de Melo Campos, Cleide Aparecida Moreira Silva, Patricia Favaro, Irene Lorand-Metze, Fernando Ferreira Costa, Sara Teresinha Olalla Saad, and Fabiola Traina. 2015. "Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) Is Downregulated in Myelodysplastic Syndromes." *European Journal of Haematology* 94 (5): 413–18. <https://doi.org/10.1111/ejh.12445>.
- Scopim-Ribeiro, Renata, João Agostinho Machado-Neto, Paula de Melo Campos, Fernanda Soares Niemann, Irene Lorand-Metze, Fernando Ferreira Costa, Sara Teresinha Olalla Saad, and Fabiola Traina. 2016. "Low Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) Transcript Level Is Independent of TET2 Mutation in Patients with Myeloid Neoplasms." *Diagnostic Pathology* 11 (1): 28. <https://doi.org/10.1186/s13000-016-0476-4>.
- Sehgal, Alison R., Phyllis A. Gimotty, Jianhua Zhao, Jing Mei Hsu, Robert Daber, Jennifer D. Morrisette, Selina Luger, Alison W. Loren, and Martin Carroll. 2015. "DNMT3A Mutational Status Affects the Results of Dose-Escalated Induction Therapy in Acute Myelogenous Leukemia." *Clinical Cancer Research* 21 (7): 1614–20. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0327>.
- Sermage-Faure, C., C. Demoury, J. Rudant, S. Goujon-Bellec, A. Guyot-Goubin, F. Deschamps, D. Hemon, and J. Clavel. 2013. "Childhood Leukaemia Close to High-Voltage Power Lines - The Geocap Study, 2002-2007." *British Journal of Cancer* 108 (9): 1899–1906. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.128>.

- Sermage-Faure, Claire, Dominique Laurier, Stéphanie Goujon-Bellec, Michel Chartier, Aurélie Guyot-Goubin, Jérémie Rudant, Denis Hémon, and Jacqueline Clavel. 2012. "Childhood Leukemia around French Nuclear Power Plants-The Geocap Study, 2002-2007." *International Journal of Cancer* 131 (5): E769–80. <https://doi.org/10.1002/ijc.27425>.
- Sharma, Shikhar, Theresa K. Kelly, and Peter A. Jones. 2009. "Epigenetics in Cancer." *Carcinogenesis* 31 (1): 27–36. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp220>.
- Shen, Qi, Sichu Liu, Junyan Hu, Shaohua Chen, Lijian Yang, Bo Li, Xiuli Wu, et al. 2012. "The Differential Expression Pattern of the BMI-1, SALL4 and ABCA3 Genes in Myeloid Leukemia." *Cancer Cell International* 12 (1): 42. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-12-42>.
- Sheybani, Zahra, Soheila Rahgozar, and Elaheh Sadat Ghodousi. 2019. "The Hedgehog Signal Transducer Smoothened and MicroRNA-326: Pathogenesis and Regulation of Drug Resistance in Pediatric B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Cancer Management and Research* 11: 7621–30. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S214405>.
- Shlush, Liran I., Amanda Mitchell, Lawrence Heisler, Sagi Abelson, Stanley W.K. Ng, Aaron Trotman-Grant, Jessie J.F. Medeiros, et al. 2017. "Tracing the Origins of Relapse in Acute Myeloid Leukaemia to Stem Cells." *Nature* 547 (7661): 104–8. <https://doi.org/10.1038/nature22993>.
- Shukla, Sanjeev, Ersen Kavak, Melissa Gregory, Masahiko Imashimizu, Bojan Shutinoski, Mikhail Kashlev, Philipp Oberdoerffer, Rickard Sandberg, and Shalini Oberdoerffer. 2011. "CTCF-Promoted RNA Polymerase II Pausing Links DNA Methylation to Splicing." *Nature* 479 (7371): 74–79. <https://doi.org/10.1038/nature10442>.
- Singh, Ravi K., and Thomas A. Cooper. 2012. "Pre-mRNA Splicing in Disease and Therapeutics." *Trends in Molecular Medicine* 18 (8): 472–82. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.06.006>.
- Smith, James S., Katrina M. Lappin, Stephanie G. Craig, Fabio G. Liberante, Clare M. Crean, Simon S. McDade, Alexander Thompson, Ken I. Mills, and Kienan I. Savage. 2020. "Chronic Loss of STAG2 Leads to Altered Chromatin Structure Contributing to De-Regulated Transcription in AML." *Journal of Translational Medicine* 18 (1): 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02500-y>.
- Smith, Jenny L., Rhonda E. Ries, Tiffany Hylkema, Todd A. Alonzo, Robert B. Gerbing, Marianne T. Santaguida, Lisa Eidenschink Brodersen, et al. 2020. "Comprehensive Transcriptome Profiling of Cryptic CBFA2T3–GLIS2 Fusion–Positive AML Defines Novel Therapeutic Options: A COG and Target Pediatric AML Study." *Clinical Cancer Research* 26 (3): 726–37. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1800>.
- Smith, Jenny L., Rhonda E. Ries, Anders Kolb, Todd A. Alonzo, Robert B. Gerbing, Yussanne Ma, Marco A. Marra, Hamid Bolouri, and Soheil Meshinchi. 2017. "The LSC17 Leukemic Stem Cell Signature Predicts Outcome in Pediatric Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 130 (Suppl 1): 24 LP – 24. http://www.bloodjournal.org/content/130/Suppl_1/24.abstract.
- Solary, E., O. Bernard, A. Tefferi, F. Fuks, and W. Vainchenker. 2014. "The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) Gene in Hematopoiesis and Hematopoietic Diseases." *Leukemia* 28 (3): 485–96. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.337>.
- Song, Ju Han, Seung Hyun Kim, Hyeoung Joon Kim, Seung Yong Hwang, and Tae Sung Kim. 2008. "Alleviation of the Drug-Resistant Phenotype in Idarubicin and Cytosine Arabinoside Double-Resistant Acute Myeloid Leukemia Cells by Indomethacin." *International Journal of Oncology* 32 (4): 931–36. <https://doi.org/10.3892/ijo.32.4.931>.
- Song, Su Jung, Keisuke Ito, Ugo Ala, Lev Kats, Kaitlyn Webster, Su Ming Sun, Mojca Jongen-Lavrencic, et al. 2013. "The Oncogenic MicroRNA MiR-22 Targets the TET2 Tumor Suppressor to Promote Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Transformation." *Cell Stem Cell* 13 (1): 87–101. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.06.003>.
- Sotillo, Elena, David M. Barrett, Kathryn L. Black, Asen Bagashev, Derek Oldridge, Glendon Wu, Robyn Sussman, et al. 2015. "Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy." *Cancer Discovery* 5 (12): 1282–95. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1020>.
- Spigel, David R., Dianna L. Shipley, David M. Waterhouse, Suzanne F. Jones, Patrick J. Ward, Kent C. Shih, Brian Hemphill, et al. 2019. "A Randomized, Double-Blinded, Phase II Trial of Carboplatin and Pemetrexed with or without Apatorsen (OGX-427) in Patients with Previously Untreated Stage IV Non-Squamous-Non-Small-Cell Lung Cancer: The SPRUCE Trial." *The Oncologist* 24 (12). <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0518>.

- Stamm, Stefan, Shani Ben-Ari, Ilona Rafalska, Yesheng Tang, Zhaiyi Zhang, Debra Toiber, T. A. Thanaraj, and Hermona Soreq. 2005. "Function of Alternative Splicing." *Gene* 344: 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.10.022>.
- Steensma, David P., Martin Wermke, Virginia M. Klimek, Peter L. Greenberg, Patricia Font, Rami S. Komrokji, Jay Yang, et al. 2021. "Phase I First-in-Human Dose Escalation Study of the Oral SF3B1 Modulator H3B-8800 in Myeloid Neoplasms." *Leukemia*, no. June. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01328-9>.
- Steensma, David P. 2018. "Clinical Consequences of Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential." *Blood Advances* 2 (22): 264–69. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018020222>.
- Steinbach, D, and O Legrand. 2007. "ABC Transporters and Drug Resistance in Leukemia: Was P-Gp Nothing but the First Head of the Hydra?" *Leukemia* 21 (6): 1172–76. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404692>.
- Steinbach, Daniel, Jean-pierre Gillet, Axel Sauerbrey, Bernd Gruhn, Kristin Dawczynski, Vincent Bertholet, De Longueville, Felix Zintl, Jose Remacle, and Thomas Efferth. 2006. "Cancer Therapy : Preclinical ABCA3 as a Possible Cause of Drug Resistance in Childhood Acute Myeloid Leukemia." *Clinical Cancer Research* 12 (14): 4357–64. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2587>.
- Sterner, Deborah A., Troy Carlo, and Susan M. Berget. 1996. "Architectural Limits on Split Genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (26): 15081–85. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15081>.
- Struski, S., S. Lagarde, P. Bories, C. Puisieux, N. Prade, W. Cuccuini, M. P. Pages, et al. 2017. "NUP98 Is Rearranged in 3.8% of Pediatric AML Forming a Clinical and Molecular Homogenous Group with a Poor Prognosis." *Leukemia* 31 (3): 565–72. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.267>.
- Sun, Jing Song, and James L. Manley. 1995. "A Novel U2-U6 SnRNA Structure Is Necessary for Mammalian MRNA Splicing." *Genes and Development* 9 (7): 843–54. <https://doi.org/10.1101/gad.9.7.843>.
- Supek, Fran, Belén Miñana, Juan Valcárcel, Toni Gabaldón, and Ben Lehner. 2014. "Synonymous Mutations Frequently Act as Driver Mutations in Human Cancers." *Cell* 156 (6): 1324–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.051>.
- Swelem, Rania Shafik, Dalia Abdel Moety Elneely, and Ahmed Abdel Rahman Shehata. 2021. "The Study of SALL4 Gene and BMI-1 Gene Expression in Acute Myeloid Leukemia Patients." *Lab Medicine* 51 (3): 265–70. <https://doi.org/10.1093/LABMED/LMZ056>.
- Tam, Betty Y., Kevin Chiu, Heekyung Chung, Carine Bossard, John Duc Nguyen, Emily Creger, Brian W. Eastman, et al. 2020. "The CLK Inhibitor SM08502 Induces Anti-Tumor Activity and Reduces Wnt Pathway Gene Expression in Gastrointestinal Cancer Models." *Cancer Letters* 473 (September 2019): 186–97. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.09.009>.
- Tarlock, Katherine, Todd A Alonzo, Robert B Gerbing, Yi-Cheng Wang, Rhonda E Ries, Tiffany Hylkema, Jason Joaquin, et al. 2017. "Functional Properties of Exon 17 KIT Mutations in Pediatric CBF AML Predict for Inferior Outcome and Enhanced Response to Tyrosine Kinase Inhibition: A Report from the Children's Oncology Group." *Blood* 130 (Suppl 1): 25 LP – 25. http://www.bloodjournal.org/content/130/Suppl_1/25.abstract.
- Taskesen, Erdogan, Lars Bullinger, Andrea Corbacioglu, Mathijs A. Sanders, Claudia A. J. Erpelinck, Bas J. Wouters, Sonja C. van der Poel-van de Luytgaarde, et al. 2011. "Prognostic Impact, Concurrent Genetic Mutations, and Gene Expression Features of AML with CEBPA Mutations in a Cohort of 1182 Cytogenetically Normal AML Patients: Further Evidence for CEBPA Double Mutant AML as a Distinctive Disease Entity." *Blood* 117 (8): 2469–75. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-307280>.
- Tawana, Kiran, Jun Wang, Aline Renneville, Csaba Bödör, Robert Hills, Chey Loveday, Aleksandar Savic, et al. 2015. "Disease Evolution and Outcomes in Familial AML with Germline CEBPA Mutations." *Blood* 126 (10): 1214–24. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-05-647172>.
- Tefferi, Ayalew, and James W Vardiman. 2009. "Myelodysplastic Syndromes." *The New England Journal of Medicine* 361 (19): 1872–85.
- Terwijn, Monique, Wendelien Zeijlemaker, Angèle Kelder, Arjo P. Rutten, Alexander N. Snel, Willemijn J. Scholten, Thomas Pabst, et al. 2014. "Leukemic Stem Cell Frequency: A Strong Biomarker for Clinical Outcome in Acute Myeloid Leukemia." *PLoS ONE* 9 (9): 7–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107587>.
- The Cancer Genome Atlas Research Network. 2013. "Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia." *New England Journal of Medicine* 368 (22): 2059–74. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1301689>.
- Thol, Felicitas, Robin Bollin, and Marten Gehlhaar. 2014. "Mutations in the Cohesin Complex in Acute Myeloid Leukemia: Clinical and Prognostic Implications." *Blood* 123 (6): 914–20. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-518746>.

- Thol, Felicitas, and Michael Heuser. 2021. "Treatment for Relapsed / Refractory Acute Myeloid Leukemia." *HemaSphere* 5 (6(e572)): 1–7. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000572>.
- Thota, Swapna, Aaron D Viny, Hideki Makishima, Barbara Spitzer, Tomas Radivoyevitch, Mikkael A Sekeres, Ross L Levine, et al. 2014. "Genetic Alterations of the Cohesin Complex Genes in Myeloid Malignancies." *Blood* 124 (11): 1790–98. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-567057>.
- Trincado, Juan L., E. Sebestyén, A. Pagés, and E. Eyra. 2016. "The Prognostic Potential of Alternative Transcript Isoforms across Human Tumors." *Genome Medicine* 8 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0339-3>.
- Ule, Jernej, and Benjamin J. Blencowe. 2019. "Alternative Splicing Regulatory Networks: Functions, Mechanisms, and Evolution." *Molecular Cell* 76 (2): 329–45. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.017>.
- Urbanski, Laura M., Nathan Leclair, and Olga Anczuków. 2018. "Alternative-Splicing Defects in Cancer: Splicing Regulators and Their Downstream Targets, Guiding the Way to Novel Cancer Therapeutics." *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 9 (4): 1–36. <https://doi.org/10.1002/wrna.1476>.
- Varatharajan, Savitha, Ajay Abraham, Sreeja Karathedath, Sukanya Ganesan, Kavitha M Lakshmi, Nancy Arthur, Vivi M Srivastava, et al. 2017. "ATP-Binding Cassette Transporter Expression in Acute Myeloid Leukemia: Association with in Vitro Cytotoxicity and Prognostic Markers." *Pharmacogenomics* 18 (3): 235–44.
- Vasiliou, Vasilis, Konstandinos Vasiliou, and Daniel W Nebert. 2009. "Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Family." *Human Genomics* 3 (3): 281–90. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-3-281>.
- Velden, V. H.J. van der, N. Boeckx, I. Jedema, J. G. te Marvelde, P. G. Hoogeveen, M. Boogaerts, and J. J.M. van Dongen. 2004. "High CD33-Antigen Loads in Peripheral Blood Limit the Efficacy of Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg®) Treatment in Acute Myeloid Leukemia Patients." *Leukemia* 18 (5): 983–88. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403350>.
- Visconte, V, H Makishima, J P Maciejewski, and R V Tiu. 2012. "Emerging Roles of the Spliceosomal Machinery in Myelodysplastic Syndromes and Other Hematological Disorders." *Leukemia* 26 (12): 2447–54. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.130>.
- Vorlova, Sandra, Gina Rocco, Clare V. LeFave, Francine M. Jodelka, Ken Hess, Michelle L. Hastings, Erik Henke, and Luca Cartegni. 2011. "Induction of Antagonistic Soluble Decoy Receptor Tyrosine Kinases by Intronic PolyA Activation." *Molecular Cell* 43: 927–39. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.009>.
- Wai, Htoo, Andrew G.L. Douglas, and Diana Baralle. 2019. "RNA Splicing Analysis in Genomic Medicine." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 108 (December 2018): 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.12.009>.
- Walker, Christopher J., Krzysztof Mrózek, Hatice Gulcin Ozer, Deedra Nicolet, Jessica Kohlschmidt, Dimitrios Papaioannou, Luke K. Genutis, et al. 2021. "Gene Expression Signature Predicts Relapse in Adult Patients with Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia." *Blood Advances* 5 (5): 1474–82. <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2020003727>.
- Walter, Roland B., Ted A. Gooley, Vincent H.J. Van Der Velden, Michael R. Loken, Jacques J.M. Van Dongen, David A. Flowers, Irwin D. Bernstein, and Frederick R. Appelbaum. 2007. "CD33 Expression and P-Glycoprotein-Mediated Drug Efflux Inversely Correlate and Predict Clinical Outcome in Patients with Acute Myeloid Leukemia Treated with Gemtuzumab Ozogamicin Monotherapy." *Blood* 109 (10): 4168–70. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-09-047399>.
- Wang, Bin, U. Ging Lo, Kaijie Wu, Payal Kapur, Xiangyang Liu, Jun Huang, Wei Chen, et al. 2017. "Developing New Targeting Strategy for Androgen Receptor Variants in Castration Resistant Prostate Cancer." *International Journal of Cancer* 141 (10): 2121–30. <https://doi.org/10.1002/ijc.30893>.
- Wang, F., C. Gao, J. Lu, H. Tatetsu, D. A. Williams, L. U. Müller, W. Cui, and L. Chai. 2016. "Leukemic Survival Factor SALL4 Contributes to Defective DNA Damage Repair." *Oncogene* 35 (47): 6087–95. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.146>.
- Wang, Yiping, Mengtao Xiao, Xiufei Chen, Leilei Chen, Yanping Xu, Lei Lv, Pu Wang, Hui Yang, and Shenghong Ma. 2015. "WT1 Recruits TET2 to Regulate Its Target Gene Expression and Suppress Leukemia Cell Article WT1 Recruits TET2 to Regulate Its Target Gene Expression and Suppress Leukemia Cell Proliferation." *Molecular Cell* 57 (4): 662–73. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.023>.
- Wang, Zefeng, and Christopher B. Burge. 2008. "Splicing Regulation: From a Parts List of Regulatory Elements to an Integrated Splicing Code." *Rna* 14 (5): 802–13. <https://doi.org/10.1261/rna.876308>.
- Wei, Jinxiong, Elena Zaika, and Alexander Zaika. 2012. "P53 Family: Role of Protein Isoforms in Human Cancer." *Journal of Nucleic Acids* 2012:68735. <https://doi.org/10.1155/2012/687359>.

- West, Allison H., Lucy A. Godley, and Jane E. Churpek. 2014. "Familial Myelodysplastic Syndrome/Acute Leukemia Syndromes: A Review and Utility for Translational Investigations." *Ann N Y Acad Sci.* 1310 (1): 111–118. <https://doi.org/doi:10.1111/nyas.12346>.
- Whiley, Phillip J., Lucia Guidugli, Logan C. Walker, Sue Healey, Bryony A. Thompson, Sunil R. Lakhani, Leonard M. Da Silva, et al. 2011. "Splicing and Multifactorial Analysis of Intronic BRCA1 and BRCA2 Sequence Variants Identifies Clinically Significant Splicing Aberrations up to 12 Nucleotides from the Intron/Exon Boundary." *Human Mutation* 32 (6): 678–87. <https://doi.org/10.1002/humu.21495>.
- Whitman, Susan P, Amy S Ruppert, Michael D Radmacher, Krzysztof Mrózek, Peter Paschka, Christian Langer, Claudia D Baldus, et al. 2008. "Internal Tandem Duplications FLT3 D835 / I836 Mutations Are Associated with Poor Disease-Free Survival and a Distinct Gene-Expression Signature among Younger Adults with de Novo Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia Lacking FLT3 Internal Tandem Du." *Blood* 111 (3): 1552–59. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-107946>.
- Will, Cindy L., and Reinhard Lührmann. 2011. "Spliceosome Structure and Function." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (a003707): 1–23. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003707>.
- Willekens, Christophe, Odile Blanchet, Aline Renneville, Pascale Cornillet-Lefebvre, Cécile Pautas, Romain Guieze, Norbert Ifrah, et al. 2016. "Prospective Long-Term Minimal Residual Disease Monitoring Using RQ-PCR in RUNX1-RUNX1T1-Positive Acute Myeloid Leukemia: Results of the French CBF-2006 Trial." *Haematologica* 101 (3): 328–35. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.131946>.
- Wojtuszkiewicz, Anna, Yehuda G Assaraf, Gerrit Jansen, Kazunori Koide, Robert K. Bressin, Upamanyu Basu, Edwin Sonneveld, Elisa Giovannetti, Gertjan Kaspers, and Jacqueline Cloos. 2014. "Spliceosome Inhibitor Meayamycin B As a Novel Potential Chemotherapeutic Agent in ALL and AML." *Blood* 124 (21): 924–924. <https://doi.org/10.1182/blood.v124.21.924.924>.
- Wu, Gang, Liying Fan, Michael N. Edmonson, Timothy Shaw, Kristy Boggs, John Easton, Michael C. Rusch, Thomas R. Webb, Jinghui Zhang, and Philip M. Potter. 2018. "Inhibition of SF3B1 by Molecules Targeting the Spliceosome Results in Massive Aberrant Exon Skipping." *Rna* 24 (8): 1056–66. <https://doi.org/10.1261/rna.065383.117>.
- Wulf, Gerald G., Simon Modlich, Nobuya Inagaki, Dirk Reinhardt, Roland Schroers, Frank Griesinger, and Lorenz Trümper. 2004. "ABC Transporter ABCA3 Is Expressed in Acute Myeloid Leukemia Blast Cells and Participates in Vesicular Transport." *Haematologica* 89 (11): 1395–97.
- Xargay-Torrent, Sílvia, Mónica López-Guerra, Laia Rosich, Arnau Montraveta, Jocabed Roldán, Vanina Rodríguez, Neus Villamor, et al. 2015. "The Splicing Modulator Sudemycin Induces a Specific Antitumor Response and Cooperates with Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia." *Oncotarget* 6 (26): 22734–49. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4212>.
- Yamagata, Kazuyuki, and Akira Kobayashi. 2017. "The Cysteine-Rich Domain of TET2 Binds Preferentially to Mono- and Dimethylated Histone H3K36." *Journal of Biochemistry* 161 (4): 327–30. <https://doi.org/10.1093/jb/mvx004>.
- Yanagisawa, Masahiro, Deborah Huvelde, Pamela Kreinest, Christine M. Lohse, John C. Cheville, Alexander S. Parker, John A. Copland, and Panos Z. Anastasiadis. 2008. "A P120 Catenin Isoform Switch Affects Rho Activity, Induces Tumor Cell Invasion, and Predicts Metastatic Disease." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (26): 18344–54. <https://doi.org/doi.org/10.1074/jbc.M801192200>.
- Yang, Jianchang, Li Chai, Chong Gao, Taylor C. Fowles, Zaida Alipio, Hien Dang, Dan Xu, Louis M. Fink, David C. Ward, and Yupo Ma. 2008. "SALL4 Is a Key Regulator of Survival and Apoptosis in Human Leukemic Cells." *Blood* 112 (3): 805–13. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-126326>.
- Yang, Lina, Li Liu, Hong Gao, Jaya Pratap Pinnamaneni, Deepthi Sanagasetti, Vivek P. Singh, Kai Wang, et al. 2017. "The Stem Cell Factor SALL4 Is an Essential Transcriptional Regulator in Mixed Lineage Leukemia-Rearranged Leukemogenesis." *Journal of Hematology and Oncology* 10 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0531-y>.
- Yang, Liu, Houyu Zhang, Xue Yang, Ting Lu, Shihui Ma, Hui Cheng, Kuangyu Yen, and Tao Cheng. 2021. "Prognostic Prediction of Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia Based on a Gene Expression Model." *Frontiers in Oncology* 11 (May): 1–17. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.659201>.
- Yasui, Kohichiroh, Saori Mihara, Chen Zhao, Hiroyuki Okamoto, Fumiko Saito-Ohara, Akihiro Tomida, Tadao Funato, et al. 2004. "Alteration in Copy Numbers of Genes as a Mechanism for Acquired Drug Resistance." *Cancer Research* 64 (4): 1403–10. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-3263-2>.

- Yin, Ruichuan, Shi Qing Mao, Bailin Zhao, Zechen Chong, Ying Yang, Chao Zhao, Dapeng Zhang, et al. 2013. "Ascorbic Acid Enhances Tet-Mediated 5-Methylcytosine Oxidation and Promotes DNA Demethylation in Mammals." *Journal of the American Chemical Society* 135 (28): 10396–403. <https://doi.org/10.1021/ja4028346>.
- Yokoi, Akira, Yoshihiko Kotake, Kentaro Takahashi, Tadashi Kadowaki, Yoshiko Matsumoto, Yukinori Minoshima, Naoko H. Sugi, et al. 2011. "Biological Validation That SF3b Is a Target of the Antitumor Macrolide Pladienolide." *FEBS Journal* 278 (24): 4870–80. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08387.x>.
- Yoshida, Ichiro, Nobuhiro Ban, and Nobuya Inagaki. 2004. "Expression of ABCA3, a Causative Gene for Fatal Surfactant Deficiency, Is up-Regulated by Glucocorticoids in Lung Alveolar Type II Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323 (2): 547–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.133>.
- Yoshida, Kenichi, Masashi Sanada, Yuichi Shiraishi, Daniel Nowak, Yasunobu Nagata, Ryo Yamamoto, Yusuke Sato, et al. 2011. "Frequent Pathway Mutations of Splicing Machinery in Myelodysplasia." *Nature* 478 (7367): 64–69. <https://doi.org/10.1038/nature10496>.
- Yoshikawa, Yusuke, Airi Ishibashi, Tsunayoshi Takehara, Takeyuki Suzuki, Kenichi Murai, Yasufumi Kaneda, Keisuke Nimura, and Mitsuhiro Arisawa. 2020. "Design and Synthesis of 1,2-Deoxy-Pyranose Derivatives of Spliceostatin A toward Prostate Cancer Treatment." *ACS Medicinal Chemistry Letters* 11 (6): 1310–15. <https://doi.org/10.1021/acsmmedchemlett.0c00153>.
- Yoshimoto, Rei, Daisuke Kaida, Masaaki Furuno, A. Maxwell Burroughs, Shohei Noma, Harukazu Suzuki, Yumi Kawamura, Yoshihide Hayashizaki, Akila Mayeda, and Minoru Yoshida. 2017. "Global Analysis of Pre-mRNA Subcellular Localization Following Splicing Inhibition by Spliceostatin A." *Rna* 23 (1): 47–57. <https://doi.org/10.1261/rna.058065.116>.
- Younis, Ihab, Kimberly Dittmar, Wei Wang, Shawn W Foley, Michael G Berg, Karen Y Hu, Zhi Wei, Lili Wan, and Gideon Dreyfuss. 2013. "Minor Introns Are Embedded Molecular Switches Regulated by Highly Unstable U6atac SnRNA." *ELife* 2 (e00780): 1–14. <https://doi.org/10.7554/eLife.00780.001>.
- Yu, Jifeng, Peter Y.Z. Jiang, Hao Sun, Xia Zhang, Zhongxing Jiang, Yingmei Li, and Yongping Song. 2020. "Advances in Targeted Therapy for Acute Myeloid Leukemia." *Biomarker Research* 8 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00196-2>.
- Zamani, Atefeh, Nasrin Fattahi Dolatabadi, Massoud Houshmand, and Nasrinsadat Nabavizadeh. 2021. "MiR-324-3p and MiR-508-5p Expression Levels Could Serve as Potential Diagnostic and Multidrug-Resistant Biomarkers in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia." *Leukemia Research* 109 (June): 106643. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2021.106643>.
- Zeijlemaker, Wendelien, Tim Grob, Rosa Meijer, Diana Hanekamp, Angèle Kelder, Jannemieke C. Carbaat-Ham, Yvonne J.M. Oussoren-Brockhoff, et al. 2019. "CD34+CD38– Leukemic Stem Cell Frequency to Predict Outcome in Acute Myeloid Leukemia." *Leukemia* 33 (5): 1102–12. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0326-3>.
- Zhang, Biyu, Lei Yang, Xin Wang, and Denggang Fu. 2021. "Identification of Survival-Related Alternative Splicing Signatures in Acute Myeloid Leukemia." *Bioscience Reports* 41 (7): 1–17. <https://doi.org/10.1042/bsr20204037>.
- Zhang, Haiyang, Yong Zhao, Peng Sun, Miaoqing Zhao, Zhenhui Su, Xunbo Jin, and Wei Song. 2018. "P53β: A New Prognostic Marker for Patients with Clear-Cell Renal Cell Carcinoma from 5.3 Years of Median Follow-Up." *Carcinogenesis* 39 (3): 368–74. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy001>.
- Zhang, Jian, Yi Zhe Zhang, Jing Jiang, and Cheng Guo Duan. 2020. "The Crosstalk Between Epigenetic Mechanisms and Alternative RNA Processing Regulation." *Frontiers in Genetics* 11 (August): 1–10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00998>.
- Zhang, Leisheng, Ying Chi, Yimeng Wei, Wenxia Zhang, Fuxu Wang, Lei Zhang, and Linglin Zou. 2021. "Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem / Stromal Cells in Patients with Acute Myeloid Leukemia Reveal Transcriptome Alterations and Deficiency in Cellular Vitality." *Stem Cell Research & Therapy* 12 (365): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02444-0> (2021).
- Zhang, Michael Y., Jane E. Churpek, Siobán B. Keel, Tom Walsh, Ming K. Lee, Keith R. Loeb, Suleyman Gulsuner, et al. 2015. "Germline ETV6 Mutations in Familial Thrombocytopenia and Hematologic Malignancy." *Nature Genetics* 47 (2): 180–85. <https://doi.org/10.1038/ng.3177>.
- Zhang, Yangjun, Libin Yan, Jin Zeng, Hui Zhou, Haoran Liu, Gan Yu, Weimin Yao, Ke Chen, Zhangqun Ye, and Hua Xu. 2019. "Pan-Cancer Analysis of Clinical Relevance of Alternative Splicing Events in 31 Human Cancers." *Oncogene* 38 (40): 6678–95. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0910-7>.

- Zhao, Dunmei, Honggang Liu, Huachao Liu, Xueqing Zhang, Meng Zhang, Vijay Kumar Kolluri, Xulong Feng, et al. 2020. "Downregulated Expression of Hsa_circ_0037515 and Hsa_circ_0037516 as Novel Biomarkers for Non-Small Cell Lung Cancer." *American Journal of Translational Research* 12 (1): 162–70.
- Zhao, Hong, Bei Zhang, Lie Feng Ma, Lin Mei Shi, and Zha Jun Zhan. 2019. "Cytotoxic Spliceostatin Analogs from *Pseudomonas* Sp." *Chemistry and Biodiversity* 16 (9): 4–9. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900266>.
- Zhao, Jennifer, Jan Philipp Bewersdorf, Sara Jaszczur, Andrew Kowalski, Sarah Perreault, Molly Schiffer, Steven Gore, et al. 2021. "High Dose Cyclophosphamide for Cyto-reduction in Patients with Acute Myeloid Leukemia with Hyperleukocytosis or Leukostasis." *Leukemia and Lymphoma* 62 (5): 1195–1202. <https://doi.org/10.1080/10428194.2020.1856835>.
- Zuckerman, Jonathan E., Ismael Gritli, Anthony Tolcher, Jeremy D. Heidel, Dean Lim, Robert Morgan, Bartosz Chmielowski, Antoni Ribas, Mark E. Davis, and Yun Yen. 2014. "Correlating Animal and Human Phase Ia/Ib Clinical Data with CALAA-01, a Targeted, Polymer-Based Nanoparticle Containing siRNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (31): 11449–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411393111>.
- Zwaan, C. Michel, Edward A. Kolb, Dirk Reinhardt, Jonas Abrahamsson, Souichi Adachi, Richard Aplenc, Eveline S.J.M. De Bont, et al. 2015. "Collaborative Efforts Driving Progress in Pediatric Acute Myeloid Leukemia." *Journal of Clinical Oncology* 33 (27): 2949–62. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.8289>.
- Zwaan, Christian M., Dirk Reinhardt, Martin Zimmerman, Henrik Hasle, Jan Stary, Batia Stark, Michael Dworzak, Ursula Creutzig, and Gertjan J.L. Kaspers. 2010. "Salvage Treatment for Children with Refractory First or Second Relapse of Acute Myeloid Leukaemia with Gemtuzumab Ozogamicin: Results of a Phase II Study." *British Journal of Haematology* 148 (5): 768–76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.08011.x>.
- Zwaan, Christian M, Dirk Reinhardt, Selim Corbacioglu, Elisabeth R Van Wering, Jos P M Bo, Wim J E Tissing, Ulf Samuelsson, Jay Feingold, Ursula Creutzig, and Gertjan J L Kaspers. 2003. "Gemtuzumab Ozogamicin : First Clinical Experiences in Children with Relapsed / Refractory Acute Myeloid Leukemia Treated on Compassionate-Use Basis." *Blood* 101 (10): 3868–71. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-1947.J.F>.

ANNEXES

Annexe 1

Principales mutations identifiées dans les LAM de l'adulte et impact pronostique.

Légende :

- ADN : acide désoxyribonucléique
- ATP : adénosine triphosphate
- CHIP : clonal hematopoiesis of indeterminate prognosis
- dm : double-mutation
- ELN : European LeukemiaNet
- G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor
- ITD : internal-tandem duplication
- RC : rémission complète
- LAL : leucémie aiguë lymphoblastique
- LAM : leucémie aiguë myéloblastique
- LAM-CBF : LAM avec altération du core-binding factor
- LAM-CN : LAM à caryotype normal
- LCN : leucémie chronique à neutrophile
- LMMJ : leucémie myélomonocytaire juvénile
- PTD : partial-tandem duplication
- RC : rémission complète
- SG : survie globale
- SMD : syndrome myélodysplasique
- SMP : syndrome myéloprolifératif
- SSE : survie sans événement
- SSL : survie sans leucémie
- TKD : tyrosine-kinase domain

Gène	Fonctions	Mutations	Impact pronostique
<i>ANKRD26 (10p12.1)</i>	Régulateur de l'adipogénèse et de la satiété et fonction pro-apoptotique	Exceptionnelles mutations somatiques 5'UTR dans <i>THC2</i> (thrombopénie constitutionnelle autosomale dominante)	Inconnu Evolution néoplasique (SMD/LAL/LAM) d'un <i>THC2</i>
<i>ASXL1 (20q11.21)</i>	Membre du complexe polycomb PRC2	5 - 18%, fréquence augmente avec l'âge	Défavorable (Patel et al. 2012) surtout si association avec mutation de <i>RUNX1</i> (Paschka et al. 2015)
<i>BCOR (Xp11.4)</i>	Répresseur transcriptionnel direct ou indirect (activité histone désacétylase)	1,5 - 7%	Défavorable, notamment dans les LAM secondaires (Nazha et al. 2016)
<i>BCORL1 (Xq26.1)</i>	Répresseur transcriptionnel direct ou indirect (activité histone désacétylase)	1 - 4%	Inconnu (mais probablement défavorable)
<i>CALR (19p13.13)</i>	Protéine chaperonne du réticulum endoplasmique	1 - 5%, délétions de type 1 et 2 décrites dans les SMP	Neutre
<i>CBL (11q23.3)</i>	E3-ubiquitine ligase, régulateur négatif de nombreuses voies de signalisation issues de récepteur membranaires	1 - 5%, mutations décrites dans les SMP	Neutre
<i>CEBPA (19q13.11)</i>	Facteur de transcription, arrêt de prolifération et différenciation entre autres des progéniteurs myéloïdes	5 - 10% AML, 10 - 20% des LAM-CN Constitutionnelle (5-10% patients avec mutations), mutations N-terminales essentiellement, âge médian LAM = 24,5 ans / Mal <i>CEBPAdm</i> (avec mutation somatique C-terminale) (Tawana et al. 2015)	Neutre si simple mutation Favorable si double-mutation (Taskesen et al. 2011) Rechutes fréquentes mais bonnes survies (meilleures que dm sporadiques) si mutation constitutionnelle (Tawana et al. 2015)

<i>CSF3R (1p34.3)</i>	Récepteur au G-CSF	1 - 3%	Neutre, utilité du ruxolitinib ou du dasatinib en analogie avec la LCN (Maxson et al. 2013)
<i>DDX41 (5q35.3)</i>	ARN-hélicase ATP-dépendante / impact sur épissage ++	0 - 1% hot-spot (D140fs et R525H) ; somatique ou germinale (syndrome de prédisposition aux néoplasies myéloïdes, âge médian de 62 ans)	Défavorable sur la SG (SMD et LAM) mais meilleure réponse au lénalidomide (Polprasert et al. 2015)
<i>DNMT3A (2p23.3)</i>	Méthylation de l'ADN	15 - 30% (30 - 35% des LAM-CN), hot-spot R882 Fréquence augmente avec l'âge (1 ^{er} gène retrouvé muté en cas de CHIP)	Défavorable en l'absence de traitement intensif (Sehgal et al. 2015; Patel et al. 2012)
<i>ETV6 (12p13.2)</i>	Facteur de transcription	THC5 (thrombopénie constitutionnelle autosomale dominante) ; exceptionnelles mutations somatiques mais nombreux réarrangements chromosomiques (M. Y. Zhang et al. 2015)	Inconnu dans les LAM mais mauvais pronostic dans les SMD (Bejar et al. 2011) Délétion 12p = défavorable dans les LAM pédiatriques (Von Neuhoff et al. 2010)
<i>EZH2 (7q36.1)</i>	Histone-méthyl-transférase, catalytique du complexe PRC2 sous-unité	1 - 5%	Défavorable, notamment dans les LAM secondaires (Nazha et al. 2016)
<i>FLT3 (13q12.2)</i>	RTK classe III (voies RAS, MAPK et STAT5)	ITD = 15 - 20% (28 - 34% des LAM-CN) TKD = 6 - 8% (11 - 14% des LAM-CN) Mutations juxta-membranaires ou TKD, annulant l'auto-inhibition du récepteur	ITD : défavorable, sauf si ratio < 0.5 et <i>NPM1</i> muté (Schlenk et al. 2015) TKD : controversé, défavorable (Whitman et al. 2008) ou neutre (Mead et al. 2008)

GATA2 (3q21.3)	Facteur de transcription	< 1% (20 - 25% si <i>CEBPAdm</i>), domaine N-terminal	Favorable si associée à <i>CEBPAdm</i> (Greif, Dufour, et al. 2012; Grossmann et al. 2013)
IDH1 (2q34)	Catalyse la transformation de l'isocitrate en α -cétooglutarate dans le cytosol (IDH1) ou la mitochondrie (IDH2)	5 - 10% (10 - 16% des LAM-CN) hot-spot R132, production de R-2-hydroxyglutarate, inhibiteur des enzymes α -cétooglutarate-dépendantes	Défavorable si <i>NPM1</i> muté ou sauvage et <i>FLT3-ITD</i> (Paschka et al. 2010) Favorable si <i>NPM1</i> muté isolé (Patel et al. 2012)
IDH2 (15q26.1)		5 - 10% (10 - 20% des LAM-CN) hot-spots R140 et R172, production de R-2-hydroxyglutarate, inhibiteur des enzymes α -cétooglutarate-dépendantes	Favorable si <i>NPM1</i> muté isolé (Patel et al. 2012) Profil transcriptomique spécifique de la R172, avec peu de mutations associées (Marcucci et al. 2010)
JAK2 (9p24.1)	Tyrosine-kinase, activatrice des facteurs de transcription STAT	1 - 5%	Neutre
KIT (4q12)	Récepteur du SCF, rôle dans survie et différenciation cellulaires, hématopoïèse Voies PI3K-Akt, MAPK ; JAK/Stat	1 - 5% (25 - 30% dans les LAM-CBF), hot-spot D816	Défavorable dans LAM-CBF, surtout t(8;21) (Paschka et al. 2006)
KMT2A (11q23.3)	Histone-méthyl-transférase (H3K4me3 et H4K16ac)	PTD = 1-5% (5 - 10% des LAM-CN) Duplication région exons 5-11/12 et insertion dans l'intron 4	Défavorable mais débattu, uniquement pour la RC et la SSL (K. Döhner et al. 2002) ou pour la SG (Patel et al. 2012)
KRAS (12p12.1)	GTPase, voie des MAPK	15% des LAM-CN	Neutre (Krauth et al. 2014)
MPL (1p34.2)	Récepteur à la TPO	1 - 3%, mutations décrites dans les SMP	Neutre

NF1 (17q11.2)	Neurofibromine, régulateur de la voie RAS-MAPK	2 - 5%	Neutre
NPM1 (5q35.1)	Multiples fonctions : synthèse ribosomes, chaperonnes des histones, réparation de l'ADN et régulation de l'apoptose	25 - 30% (40 - 60% des LAM-CN) Domaine N-terminal, induisent séquestration cytosolique	Favorable, sauf si association avec <i>FLT3-ITD</i> (ratio > 0.5) Accessible à un suivi de la maladie en RT-qPCR
NRAS (1p13.2)	GTPase, voie des MAPK	15% (25% CN-AML)	Neutre (Krauth et al. 2014)
PHF6 (Xq26.2)	Régulateur transcriptionnel négatif dans la synthèse des ARN ribosomiaux	3 - 5%	Défavorable (Patel et al. 2012)
PTPN11 (12q24.13)	Tyrosine-phosphatase, régulation voie MPAK et PI3K	3 - 5%	Inconnu en dehors de la LMMJ acutisée
RAD21 (8q24.11)	Membre du complexe des cohésines	1 - 2%	Neutre ((Thota et al. 2014), (Thol, Bollin, and Gehlhaar 2014)) pour la présence d'une mutation du complexe des cohésines, défavorable dans les SMD (Thota et al. 2014)
RUNX1 (21q22.12)	Facteur de transcription, sous-unité du CBF	Constitutionnel (Michaud et al. 2002): Familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy (FPD) Somatique : mutations (3 - 33%, fréquence plus élevée dans FAB-M0 LAM-CN, >60 ans et LAM secondaires), nombreux réarrangements chromosomiques	Défavorable (V. I. Gaidzik et al. 2016), résistance à l'induction
SF3B1 (2q33.1)	Sous-unité du spliceosome	1 - 6%	Défavorable pour l'ensemble des mutations du splicing (Hou et al. 2016)

			Défavorable individuellement (Nazha et al. 2016)
SETBP1 (18q12.3)	Interaction avec SET1 (complexe histone-méthyl-transférase)	1 - 3%	Neutre
SRSF2 (17q25.1)	Sous-unité du spliceosome	5,4%	Défavorable pour l'ensemble des mutations du splicing (Hou et al. 2016)
STAG2 (Xq25)	Membre du complexe des cohésines	1 - 5%	Neutre ((Thota et al. 2014), (Thol, Bollin, and Gehlhaar 2014)) pour la présence d'une mutation du complexe des cohésines, défavorable dans les SMD (Thota et al. 2014)
TET2 (4q24)	Déméthylation de l'ADN et régulation épigénétique	5 - 25% (10% des LAM-CN), fréquence augmente avec l'âge (2 ^e gène retrouvé muté en cas de CHIP)	Plutôt défavorable, surtout pour les LAM-CN et ELN risque intermédiaire
TP53 (17p13.1)	Régulation apoptose et cycle cellulaire	5 - 20% des LAM-CN	Défavorable, y compris en cas d'anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic (Rücker et al. 2012)
U2AF1 (21Q22.3)	Sous-unité du spliceosome	2 - 5%	Défavorable pour l'ensemble des mutations du splicing (Hou et al. 2016)
WT1 (11p13)	Facteur de transcription et régulateur de l'épissage	2 - 5%	Neutre
ZRSR2 (Xp22.2)	Sous-unité du spliceosome	1 - 3%	Défavorable pour l'ensemble des mutations du splicing (Hou et al. 2016)

Annexe 2

Thérapies innovantes en phase de développement clinique dans les
LAM.

*Adapté de (Isidori et al. 2021), (Yu et al. 2020) et (Thol and Heuser
2021) et données personnelles*

Légende :

- ATRA : acide all-trans rétinoïque
- BiTE : bispecific T-cell engager
- COG : Children's Oncology Group
- DART : dual-affinity retargeting antibody
- EI : effet indésirable
- EMA : European Medicine Agency
- FDA : Food and Drug Administration
- FLA : fludarabine-cytarabine
- FLT3 : Fms-like Tyrosine kinase 3
- FLT3-ITD : mutation FLT3 type Internal Tandem Duplication
- LAM : leucémie aiguë myéloblastique
- R/R : réchute/réfractaire
- TandAb : tandem antibody

Cible	Molécule	Développement adulte	Développement pédiatrique
Inhibiteurs de FLT3	Midostaurin	Approuvée 1 ^{ère} ligne combinée à un régime 3+7 (essai RATIFY)	Phases I/II en cours en monothérapie (R/R) et en combinaison avec la chimiothérapie intensive (1 ^{ère} ligne)
	Quizartinib	Phase III monothérapie terminée (essai Quantum-R) et concluante	Phase I/II pédiatrique en cours (protocole AC220-U-A202) en combinaison avec chimiothérapie intensive
	Gilteritinib	Approuvé monothérapie pour les LAM R/R (essai ADMiRAL)	Phase I/II R/R en cours en combinaison avec chimiothérapie intensive
		En cours de phase I/II en combinaison avec le vénétoclax	Phase III 1 ^{ère} ligne en cours (COG)
	Crenolanib	Résultats encourageants en phase I/II R/R	Phase I terminée, phase II retirée
		En cours de phase III randomisée vs. Midostaurin en 1 ^{ère} ligne	
	Luxepitinib	Phase I en cours	-
	Lestaurtinib	Phase III non concluante	Phase I terminée
	Ponatinib	En cours de phase I/II	En cours de phase I/II
	Sorafénib	Intérêt en maintenance post-allogreffe (essai SORAMAIN)	En cours de phase I R/R en association avec la clofarabine
			Phase II 1 ^{ère} ligne encourageante en combinaison avec la chimiothérapie pour les patients FLT3-ITD ratio > 0.4
	Sunitinib	Phase II encourageante en combinaison avec l'omacetaxine mepesuccinate (SOME)	-
		Résultats encourageants en phase I/II mais nombreux EI	

Pro-apoptotiques	Vénétoclax	Recommandé pour les patients unfit en combinaison avec les agents hypométhylants En cours d'investigation en combinaison avec les régimes de chimiothérapie intensive ou d'autre thérapies ciblées dans les LAM R/R et 1ere ligne, ou en maintenance après traitement de 1 ^{ère} ligne	Phase II pédiatrique terminée (étude M13-833), résultats de la combinaison avec cytarabine doses intermédiaires > agents hypométhylants dans les LAM R/R Phase I/II en cours pour une maintenance post-allogreffe combinée avec l'azacitidine
Inhibiteur de MDM2	Idasanutlin	Développement adulte stoppé car phase II décevante	Phase I/II pédiatrique en cours (étude GO40871)
	RG7112	Phase I terminée	-
Réactivateur de TP53	APR-246 (PRIMA-1 ^{Met})	Résultats encourageants en phase II R/R en combinaison avec les agents hypométhylants (orphan drug designation)	-
Inhibiteurs d'AURK	Alisertib (AurA)	Phase II 1ere ligne encourageante	Phase II R/R décevante
	Barasertib (AurB)	Phase I terminée	-
Inhibiteur de PLK1	Volasertib	Phase III 1 ^{re} ligne unfit concluante en combinaison avec cytarabine à faible dose	Phase I terminée
Inhibiteurs d'IDHs	Ivosidenib (IDH1)	Approuvé (FDA, pas EMA) en situation R/R ou 1ere ligne unfit, phase III 1ere ligne en cours en préparation	-
	Olutasidenib (IDH1)	Phase II R/R en cours, en monothérapie ou combinaison avec agents hypométhylants	-
	Enasidenib (IDH2)	Approuvé (FDA, pas EMA) en situation R/R, phase III 1ere ligne en cours en préparation	Phase I pédiatrique en cours (essai AcSé-eSMART)
Inhibiteurs de SMO	Glasdegib	Approuvé 1ere ligne unfit en combinaison avec cytarabine faible dose	-

		Pas de supériorité en 1ere ligne combiné à l'azacitidine ou un régime 3+7	
	Vismodegib	Phase II terminée, non concluante en monothérapie	-
	Sonidegib	Phase II terminée, non concluante en monothérapie	-
Inhibiteurs de Menin	SNDX-5613	En cours de phase I/II	En cours de phase I/II
	KO-539	En cours de phase I/II	
Inhibiteurs de DOT1L	Pinometostat	En cours de phase II 1ere ligne en combinaison à la chimiothérapie intensive	Phase I terminée
Inhibiteurs de NEDD8	Pevonedistat	Résultats encourageants en phase II avec chimiothérapie En cours de phase I/II avec de multiples combinaisons, dont le vénétoclax	Phase I terminée en combinaison avec un régime FLA-azacitidine
Inhibiteurs de BET	OTX015	Phase I terminée	-
	ABBV-744	Phase I terminée	-
Inhibiteurs de LSD1	Tranlycypromine	Essais en cours en combinaison avec l'ATRA	-
	Iadademstat	Phase I terminée	-
	Bomedemstat	Phase I terminée	-
	GSK2879552	Phase I terminée	-
Inhibiteurs d'HDAC	Panobinostat	Résultats décevant des phases II R/R en monothérapie ou en combinaison avec la chimiothérapie Possible place en maintenance post-allogreffe (essai PANOBEST)	Phase I terminée monothérapie, en cours en association avec une régime FLA

	Vorinostat	Résultats décevants en monothérapie R/R et en combinaison avec la chimiothérapie intensive en 1ere ligne ; résultats encourageants en combinaison avec les agents hypométhylants	Phase I terminée monothérapie
	Entinostat	Résultats décevants en monothérapie et en combinaison avec l'azacitidine	-
	Belinostat	Résultats décevants en monothérapie, encourageants en combinaison avec le bortezomib	-
	Romidepsin	Phase I terminée	Phase I terminée
Anticorps monoclonal	Anti-CD33 :		
	- lintuzumab	Résultats décevants en combinaison avec la chimiothérapie intensive et l'azacitidine	
	Anti-CD38 :		
	- Isatuximab	-	Phase I/II pédiatrique en cours (essai ACT15378)
	- Daratumumab	En cours de phase II R/R En cours de phase I en combinaison avec le FT538	-
	Anti-CD123 :		
	- Talacotuzumab	Résultats décevants en monothérapie et en combinaison avec la décitabine	-
Anticorps couplé à un radionucléide	Anti-CD33 :	Résultats encourageants en combinaison avec la chimiothérapie intensive, en cours d'investigation avec le	-
	- Lintuzumab Ac225	vénétoclax	

Anticorps conjugué à une toxine	Anti-CD33 :		
	- gemtuzumab-ozogamycin	Approuvé en 1ere ligne des LAM adulte CD33+, bénéfice supérieur dans les groupes de risque standard	Phase III randomisée en cours (essai MyeChild01)
	- SGN-CD33A (vadastuximab talirine)	Développement stoppé en raison du profil de toxicité	-
	Anti-CD123 :		
	- tagraxofusp	Phases I monothérapie R/R et consolidation si unfit pour allogreffe terminées, en cours d'investigation en combinaison avec l'azacitidine	-
	- IMG632	En cours de phase I/II monothérapie et en combinaison avec le vénétoclax ou l'azacitidine	-
Anticorps bispécifiques	-SGN-CD123A	Phase I terminée	
	CD33-CD3 :		
	- AMG330 (BiTE)	Résultats décevants en phase I monothérapie	-
	- AMG673 (BiTE)	Phase I en cours	-
	- GEM333 (BiTE)	Phase I en cours	-
	- AMV564 (TandAb)		-
CD123-CD3 :			
			Phase I en cours

	- Flotetuzumab (DART)	Résultats encourageants en phase I, notamment chez les patients en échec d'induction ou en rechute précoce	-
	- Vibecotamab (BiTe)	Phase I en cours	
Anticorps trispécifiques	SPM-2 (CD33-123-16)	Pré-clinique	-
	Ipilimumab	Résultats encourageants dans les rechutes post-allogreffe, essais en cours avec les agents hypométhylants et le nivolumab	-
	Pembrolizumab	Phases II randomisées en cours en 1ere ligne combinée à la chimiothérapie intensive ou à une association azacitidine-vénétoclax	-
Inhibiteurs du checkpoint immunitaire	Nivolumab	Phase II en cours en maintenance post-consolidation chez les patients unfit pour l'allogreffe, phases I/II en cours en combinaison avec les agents hypométhylants, l'ipilimumab et le relatlimab	Phase I/II en cours en combinaison avec l'azacitidine
	Sabatolimab (TIM3)	Phases II en cours en combinaison à azacitidine-vénétoclax ou en maintenance post-allogreffe	-
	Anti-CD47 : Magrolumab	Résultats encourageants en phase I/II R/R en combinaison avec l'azacitidine (orphan drug designation)	-
CAR T cells	CD33	Phase I à venir CD33 CAR T suivi d'une allogreffe avec CSH CD33KO via CRISPR-Cas9 editing	Phase I en cours
	CD123	Plusieurs construits en cours de phases I	-

NK cells therapy	CD44v6	En cours de phase I	-
	FLT3	Phase I à venir	-
	CLL1/CLEC12A	Plusieurs construits en cours de phases I	-
	NK	Phase I en cours en consolidation en 1ere ligne	-
	haploidentiques	Plusieurs protocoles d'infusion et de priming en cours de phase I	
	FT538 (iPSC-CRISPR edited)	En cours de phase I en combinaison avec le daratumumab	-

Annexe 3

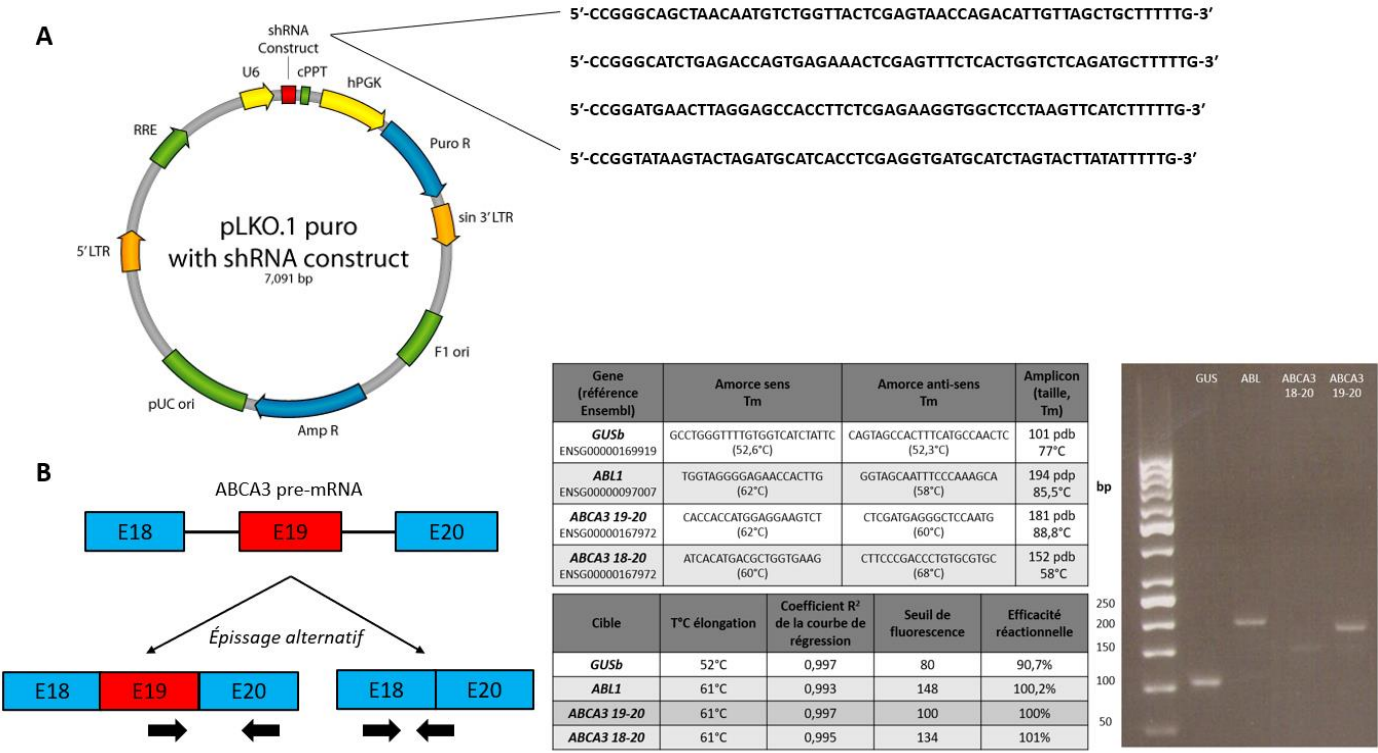


Figure supplémentaire 1. (A) Interférence ARN de WT1 par méthode shRNA, 4 séquences validées de shARN ciblant la région 3'-UTR de WT1 ont été insérées (MISSION® TRC shRNA library, Sigma-Aldrich®) dans un vecteur lentiviral pLKO.1-puro (cellules HEK 293T transfectées par Lipofectamine 2000, culture en présence de puromycine, surnageant récupéré à 48-72 heures de la transfection). Le vecteur vide pLKO.1 a été utilisé comme contrôle négatif. Les cellules KG1 ont été incubées en présence des lentivirus, 2x10⁵ cellules KG1 par puits sur une plaque 6 puits, MOI 1.0, concentrations virales de 5.87 x 10¹⁵ (pLKO) et 2.5 x 10⁸ (shWT1) UI/mL, 48 heures d'incubation avec les lentivirus en milieu classique puis 48-72 heures en présence de puromycine (B) qPCR SYBRgreen spécifique de l'exon 19 d'ABCA3, position des amorces et conditions d'amplification.