

Un regard critique sur le problème des polymorphismes génétiques associés à l'activité des agents anti-angiogènes

Jacques Robert
Institut Bergonié, Bordeaux
<Robert@bergonie.org>

Un peu de génétique et de statistique

Les experts et les éditeurs sont devenus très vigilants en ce qui concerne les données issues des analyses d'expression des gènes : nomenclature rigoureuse, dépôt des données dans une base, etc. Malgré toutes les qualités du travail de Schneider *et al.* [1], on reste sur sa faim et reproduire un travail analogue pourrait se révéler difficile !

Il y a tout d'abord un problème de nomenclature : les désignations de polymorphismes par une position sur l'ADN (-2578, -1154 par exemple) sont ambiguës : ces positions renvoient-elles à l'origine de la traduction ? À l'origine de la transcription (il y en a de multiples...) ? Il existe pour tous les polymorphismes génétiques une nomenclature précise et universelle : le code *rs*. Pour ceux qui s'intéressent à la pharmacogénétique en général et plus particulièrement aux polymorphismes des gènes liés à l'angiogénèse, le *tableau 1* indique la correspondance des nomenclatures des SNP étudiés dans le travail de Schneider *et al.*

Il y a ensuite un problème de technique. Pour retrouver les techniques utilisées pour le génotypage, il faut suivre un jeu de piste : retrouver un autre article de Schneider *et al.* [2] dont la référence n'est que partiellement fournie, puis chercher sur le site de Springer le *Supplementary material* où sont détaillées les amorces utilisées pour le génotypage. Et

là, on s'aperçoit que certaines des séquences utilisées sont très courtes et très peu spécifiques. Il existe un risque non négligeable d'amplifier des séquences qui n'ont rien à voir avec le gène étudié... Ce serait plutôt ennuyeux !

Nous admettons bien sûr que la technique a été validée afin de poursuivre la lecture. Sur les cinq SNP recherchés dans le gène *VEGF-A*, deux sont significativement associés à la survie des patients. Oui, c'est un résultat important. Mais ces deux SNP ne sont pas indépendants : ils sont en fort déséquilibre de liaison (c'est-à-dire qu'ils varient ensemble). Cela avait été montré antérieurement [3] et a été redémontré lors d'un reséquençage récent [4]. Il est donc indispensable de faire une analyse cherchant à associer haplotypes (et non SNP) et survie ! En outre se pose la question des autres SNP, localisés précisément pour deux d'entre eux dans cette même zone, en 5'UTR, et qui sont aussi en déséquilibre de liaison avec les deux premiers. Comment se fait-il que le SNP -1498 (rs833061), qui est en *total* déséquilibre de liaison avec le SNP -2578 (rs699947) ne soit pas également associé à la survie ? Enfin, les statistiques de ce papier me paraissent un peu légères... Il est bien de *dire* que l'on a fait une correction de Bonferroni pour tenir compte des comparaisons multiples effectuées ; encore faudrait-il le faire ! Ne diviser que par 3 la valeur cible de *p* pour conserver un risque à 5 % quand on fait quelques dizai-

Tableau 1. Quelques polymorphismes génétiques du VEGF-A.

Code rs	Position	Autres nomenclatures	Fréquence allélique
rs699947	-2,578 A>C		0,40
rs833061	-1,498 C>T	-460	0,40
rs13207351	-1,190 G>A		0,30
rs1570360	-1,154 G>A		0,20
rs2010963	-634 G>C	+405, +398	0,30
rs25648	-7 C>T	Ser178Ser	0,20
rs3025039	+936 C>T	+1967	0,20

Ce tableau ne présente que les polymorphismes les plus fréquemment recherchés. Ce sont 32 polymorphismes au total auxquels ont été consacrés au moins une étude publiée. La fréquence allélique est une valeur moyenne extraite des bases de données du NCBI pour ce qui concerne les sujets caucasiens.

nes de comparaisons statistiques est tout à fait insuffisant (il faudrait diviser « p » par le nombre de comparaisons... Le risque d'avoir une valeur de *p* inférieure à 0,05 (ou même à 0,017) par le seul fait du hasard n'est pas négligeable. C'est actuellement le problème le plus important qui se pose pour l'interprétation des analyses à haut débit ; même en dehors du haut débit (comme c'est le cas ici), il faut rester rigoureux quant aux méthodes utilisées.

Les polymorphismes des gènes VEGF-A et VEGF-R2

Le gène *VEGF-A* présente une séquence très conservée ; il n'existe pratiquement pas de polymorphismes dans la séquence codante, seule une variation synonyme en 178 de la séquence protéique. Il existe en revanche des polymorphismes dans la région 5'UTR, en particulier, et pas seulement ceux qui ont été recherchés par Schneider *et al.* (tableau 1). Leur rôle fonctionnel est probable en raison de l'importance des régions promotrices dans l'expression des gènes. Il en existe aussi dans la région 3'UTR comme le « 936 C/T » (rs 3025039). Il s'agit également d'une région fortement impliquée dans la régulation de l'expression des gènes car c'est là que se trouvent les sites de reconnaissance par les micro-ARN. Bien sûr, on ne peut exclure que les poly-

morphismes introniques aient également un rôle fonctionnel, mais ce rôle éventuel est plus difficile à démontrer !

Les gènes des récepteurs des VEGF constituent également des pistes intéressantes pour rechercher des associations pharmacogénétiques avec l'efficacité et la toxicité des agents anti-angiogènes. En ce qui concerne le gène *KDR*, plus souvent appelé *VEGF-R2*, deux polymorphismes assez fréquents de la région codante, non synonymes, sont régulièrement recherchés, comme dans l'étude de Schneider : le V297I (rs2305948) et le Q472H (rs1870377). Cela n'exclut pas, bien évidemment, l'intérêt potentiel de SNP des régions 5'UTR, 3'UTR et introniques. Le gène *FLT1* ou *VEGF-R1* présente également des polymorphismes non synonymes de fréquence suffisante pour attirer le regard des pharmacogénéticiens. Pourtant, c'est sur les polymorphismes introniques que les rares études disponibles se sont focalisées. Je n'en citerai qu'une seule, non encore publiée mais présentée à la réunion de l'ESMO à Berlin en 2009 [5] : elle a porté sur 154 patients de l'étude AVITA qui visait à étudier l'apport du bevacizumab à la chimiothérapie associant gemcitabine et erlotinib dans les cancers du pancréas. Elle fait état d'une association significative entre quatre SNP du gène *FLT1*, (dont le seul mentionné est le rs 9582036 (un SNP intronique) et la survie des patients (survie sans progres-

sion et survie globale), et ce seulement dans le bras contenant le bevacizumab. Notons une présentation biaisée des résultats : nulle part il n'est dit dans le résumé (seul document disponible) que ce polymorphisme est intronique. Par un élégant tour de passe-passe, il est mentionné que les quatre SNP sont « dans la région du génome qui contient les exons 25 à 28, où se trouve le domaine tyrosine kinase ». Espérons que les reviewers de ce papier, lorsqu'il sera soumis, seront vigilants quant aux abus de langage...

Le nombre des publications présentant des associations entre polymorphismes et risque de cancer (épidémiologie moléculaire) et entre polymorphismes et effets des médicaments (pharmacogénétique) croît de façon exponentielle. Il est difficile de distinguer les études rigoureuses, qui apportent des résultats définitifs, des études trop préliminaires pour être validées ultérieurement. Certes, le nombre des patients inclus dans une étude donnée est souvent un critère de sérieux ; cependant, l'homogénéité de la population étudiée décroît au fur et à mesure que cette population augmente, et cela peut donner des résultats faussement négatifs. Le nombre d'analyses simultanées réalisées sur la population étudiée est également un critère à prendre en compte (plus les polymorphismes recherchés sont nombreux, plus grand est le risque d'associations faussement positives). Si l'on veut faire de la bonne science, il est nécessaire d'imposer des standards de publication rigoureux et de s'y tenir !

Références

- Schneider BP, *et al.* *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 4672-8.
- Schneider BP, *et al.* *Breast Cancer Res Treat* 2008 ; 111 : 157-63.
- Brogan IJ, *et al.* *Hum Immunol* 1999 ; 60 : 1245-9.
- Radovich M, *et al.* *Angiogenesis* 2010 ; sous presse.
- Lambrechts D, *et al.* *Eur J Cancer Suppl* 2009 ; 7 : 10.

Directeur de la publication : Gilles Cahn • **Rédacteurs en chef :** Bernard Lévy, Jacques Robert

• **Comité de rédaction :** Gaël Deplanque, Joseph Gligorov, David Malka, Emmanuel Mitry

• **John Libbey Eurotext** 127, avenue de la République, 92120 Montrouge, France - Tél. : 01 46 73 06 60

• **Secrétaire de rédaction :** Fanny Biancale

Impression : Corlet Imprimeur SA - 14110 Condé-sur-Noireau

Revue trimestrielle (4 numéros par an). Ne peut être vendu séparément. ISSN : 1951-2252 - ISSN (en ligne) : 2105-2336. Dépôt légal : à parution.

© **John Libbey Eurotext**