

# Impact de la Maladie Résiduelle (MRD) sur la survie des leucémies myéloïdes aiguës et bénéfice des agents déméthylants donnés dans l'attente d'une allogreffe

## **Etudiant**

Nathalie Guédon

## **Tuteur**

Prof. Olivier Spertini  
Service d'Hématologie, CHUV

## **Expert**

Prof. Jacqueline Schoumans Pouw  
Unité de Cytogénétique du Cancer, Service de Génétique, CHUV

Lausanne, Mai 2016

## TABLE DES MATIERES

Résumé .....	3
Introduction.....	4
Matériel et Méthodes .....	8
Résultats.....	11
Analyse globale .....	11
MRD en fonction des classes de risque .....	14
MRD selon les rechutes.....	18
Comparaison des patients avec et sans rechute.....	20
MRD avant et après les agents déméthylants .....	25
Patients à haut risque: chimiothérapie seule vs chimiothérapie suivie d'agents déméthylants .....	26
Patients à risque intermédiaire: chimiothérapie seule vs chimiothérapie suivie d'agents déméthylants .....	28
Discussion et conclusion .....	31
Remerciements .....	33
Bibliographie.....	33

## RÉSUMÉ

Actuellement, les patients atteints de leucémie myéloïde aiguë peuvent bénéficier de traitements de chimiothérapie intensive si leur état général le permet. Ils sont traités au CHUV après inclusion dans les protocoles HOVON en cours d'étude ou selon le bras standard de ce protocole. La limite d'âge de 65 ans est déterminante dans le choix du traitement.

Dans tous les cas, l'étude propose deux cycles de chimiothérapie d'induction. Les patients âgés de moins de 70 ans peuvent bénéficier par la suite d'un cycle supplémentaire dit de consolidation (chimiothérapie, autogreffe ou allogreffe).

En fonction de plusieurs critères, dont l'âge et le type de leucémie, le patient a une certaine probabilité de répondre de manière favorable au traitement. Il présente également une probabilité de rechute attribuable à sa catégorie de risque, pouvant être de type favorable, intermédiaire ou haut selon la classification ELN ou des protocoles HOVON 102, 103 ou 132.

Bien que la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques soit l'option présentant le plus d'espoirs de guérison, cette technique est dotée de nombreux risques et effets secondaires, considérés comme supérieurs aux bénéfices pour les patients atteints de leucémie de pronostic favorable. En effet, ces derniers peuvent obtenir une rémission complète à long terme uniquement avec des traitements de chimiothérapie, sans subir les conséquences d'une allogreffe. Les autres catégories de risque ont une probabilité plus faible d'obtenir une rémission prolongée à plus de 2-5 ans. Les patients de ces catégories répondent moins bien à la chimiothérapie standard et sont plus à risque de récidiver. Le bénéfice d'une allogreffe pour ces patients est donc supérieur aux risques encourus, par rapport à la catégorie de risques favorables. Toutefois, le délai d'attente avant d'y recourir est souvent long, le patient est à risque de réactiver sa maladie pendant cette période.

Selon certains auteurs, un taux bas de maladie résiduelle avant la greffe induirait une meilleure réponse et moins de rechute post allogreffe. Bien qu'une autre publication mette en doute cette hypothèse (10), les directives actuelles tentent de maintenir un taux de maladie résiduelle le plus bas possible avant la greffe, à l'aide d'agents déméthylants par exemple.

Dans cette étude rétrospective nous nous sommes intéressés à la valeur prédictive de récurrence de la maladie résiduelle après un (MRD1), deux (MRD2) et parfois trois (MRD3) cycles de chimiothérapie, ainsi qu'au bénéfice apporté par les agents déméthylants prescrits dans l'attente d'une allogreffe. Nous nous sommes posé la question si ces traitements permettaient de contrôler la maladie pendant cette période d'attente.

Cette étude analyse le suivi des maladies résiduelles par cytométrie de flux chez des patients adultes atteints de leucémie myéloïde aiguë.

Elle montre que les agents déméthylants (5-azacitidine ou décitabine), utilisés chez des patients atteints de LMA de risque intermédiaire ou défavorable, permettent globalement de maintenir un taux de maladie résiduelle suffisamment bas pour éviter une rechute avant l'allogreffe; la recherche d'un donneur HLA compatible dans le registre international étant souvent longue, pouvant prendre plusieurs mois.

Mots clés: leucémie myéloïde aiguë, maladie résiduelle, cytométrie de flux, agents déméthylants, allogreffe

## INTRODUCTION

Les leucémies sont un groupe de maladies rares que l'on peut classer en deux grandes catégories: leucémies aiguës ou chroniques. Les leucémies aiguës peuvent être d'origine lymphoïde, myéloïde, voire de lignée ambiguë. Une leucémie aiguë est le résultat d'une prolifération incontrôlée d'une cellule immature au niveau de la moelle osseuse.

Dans cette étude nous nous sommes limités aux leucémies aiguës myéloïdes (LMA), qui elles-mêmes constituent un groupe très hétérogène de maladies (3), (8), (9) (17). Elles touchent majoritairement les personnes âgées de plus de 60 ans (15).

Leur présentation clinique se caractérise par des symptômes résultant d'un envahissement de la moelle osseuse hématopoïétique par des cellules blastiques. Il en résulte des manifestations de type fatigue, saignements ou infections. Dans certains cas il peut également y avoir un envahissement des tissus par ces mêmes cellules.

Le diagnostic peut être suspecté d'après la clinique et par une analyse de l'hémogramme. Toutefois, pour poser le diagnostic de leucémie, une ponction biopsie de moelle est nécessaire. L'analyse de la cytologie médullaire permet une estimation quantitative et qualitative des cellules malignes, diverses colorations pouvant aider à l'identification de ces blastes.

Une analyse de cytométrie de flux est en général également effectuée sur ce prélèvement, ainsi que des analyses de cytogénétique et biologie moléculaire.

L'analyse de l'immunophénotype par cytométrie de flux, "marqueurs immunologiques", permet de mettre en évidence des antigènes à la surface de ces cellules malignes. La cytogénétique permet d'analyser le caryotype et met par exemple en évidence les translocations, monosomies ou trisomies au niveau chromosomique. La biologie moléculaire quant à elle permet d'aller plus précisément au niveau des gènes et détecte d'éventuels gènes de fusion pouvant résulter de modification du caryotype. Néanmoins il n'est pas rare qu'aucune anomalie ne soit perçue au niveau chromosomique mais qu'il y ait quand-même une anomalie au niveau moléculaire.

Le pronostic des LMA est actuellement basé sur les classifications du risque selon HOVON et ELN. Elles tiennent compte de plusieurs critères tels que la présence ou l'absence d'aberrations chromosomiques particulières, de mutations spécifiques au niveau moléculaire ainsi que de la numération leucocytaire au diagnostic (voir annexes).

Certaines translocations chromosomiques peuvent apparaître comme un élément favorable pour le patient, l'amenant dans une catégorie de bon pronostic, par exemple s'il présente une t(8;21). D'autres aberrations chromosomiques telles qu'une anomalie au niveau du chromosome 17 (abn17p) ou une délétion du chromosome 5 (del5q) vont au contraire l'amener à être classé dans la catégorie de mauvais pronostic ou "high risk" (12).

Pour évaluer le pronostic, d'autres éléments pourraient être intégrés à la classification, comme une mesure de la maladie résiduelle par cytométrie de flux.

Dans cette étude rétrospective nous nous sommes intéressés à évaluer la relation entre la mesure de la maladie résiduelle (MRD) par cytométrie de flux et l'obtention d'une rémission prolongée.

Une valeur élevée de MRD après une chimiothérapie d'induction traduit une mauvaise réponse à ce traitement et fait donc suspecter une leucémie de risque défavorable. Autrement dit, les patients appartenant aux classes de risques favorables devraient présenter une cytométrie de flux « négative » (< 0.1 %) après le premier ou le deuxième cycle de chimiothérapie, ceux de risque défavorable, une

cytométrie de flux positive ( $> 0.1\%$ ). Selon l'étude HOVON/SAKK 42, le seuil de positivité de la MRD en cytométrie de flux devrait être fixé à  $0.1\%$ , ce qui traduit qu'un échantillon présentant  $>0.1\%$  de blastes de phénotype similaire à ceux du diagnostic est considéré comme représentatif d'une mauvaise réponse à la chimiothérapie, donc d'un mauvais pronostic pour le patient (14).

L'article de Michael R. Loken (9) a comparé les résultats de maladies résiduelles post induction et les taux de récurrence. Les résultats sont impressionnants:  $60\%$  de récurrence chez les patients présentant une maladie résiduelle positive après l'induction, comparé à  $30\%$  pour les patients sans MRD (MRD-). De la même façon, les patients catégorisés en « high risk » avaient tendance à avoir une MRD+ après l'induction contrairement aux risques favorables. Des exceptions sont toutefois possibles. Par exemple, les leucémies présentant une mutation homozygote du gène CEBPA sont généralement de bon pronostic, c'est-à-dire sans rechute, mais présentent régulièrement des résultats positifs de maladies résiduelles après l'induction (9).

Dans les catégories de risque intermédiaire, la réponse à la chimiothérapie pourrait être un critère très utile pour orienter les patients dans une catégorie de risque plutôt favorable ou défavorable, afin d'adapter au mieux leur traitement. Dans cette optique, les publications (2) (9) et (14) ont analysé l'évolution des patients sur le long terme et l'ont comparé aux résultats de maladie résiduelle. Tous admettent qu'il faudrait ajouter les analyses de MRD en cours de traitement aux analyses de cytogénétique et biologie moléculaire du diagnostic pour prédire le pronostic. Ceci permettrait d'avoir des thérapies mieux personnalisées.

Nous avons pu remarquer dans notre étude que les patients classés dans la catégorie haut risque ont des valeurs de maladies résiduelles plus élevées après l'induction ("MRD1", voir graphiques plus loin) que ceux à risque intermédiaire ou bas, ce qui confirmerait cette théorie.

Toutefois, une bonne réponse à la chimiothérapie d'induction avec une rémission dite complète n'empêche en rien la rechute. En effet,  $50$  à  $80\%$  des patients adultes atteints de leucémie myéloïde aiguë obtiennent une rémission complète après la chimiothérapie d'induction, mais environ  $40\%$  des jeunes vont rechuter. Le pronostic est d'autant plus sombre chez les patients âgés (1), (2).

Ceci nous amène au deuxième objectif de notre étude qui est d'évaluer l'effet sur la MRD des agents déméthylants (5-azacytidine ou décitabine) administrés aux patients présentant une leucémie de pronostic intermédiaire ou défavorable dans l'attente d'une allogreffe après chimiothérapie intensive. Ces derniers ont souvent une leucémie dont la réponse à la chimiothérapie est moins bonne que celle des LMA de risque favorable, quelques-unes étant parfois réfractaires à la chimiothérapie. Ces patients espèrent avoir recours à une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques pour obtenir une rémission prolongée et éviter une rechute précoce. L'identification d'un donneur HLA compatible est parfois difficile, l'attente est souvent longue et le patient est à risque de récidiver. Des traitements ont été mis en place afin d'améliorer au mieux leur qualité de vie et éviter la rechute dans l'attente de la greffe.

Plusieurs études se sont intéressées à l'efficacité des agents déméthylants chez les patients atteints de syndrome myélodysplasique (SMD) mais peu ont investigué leur effet chez les patients atteints de leucémie myéloïde aiguë. Les résultats sont toutefois controversés: Si pour certains les agents déméthylants prolongeraient la survie des patients atteints de SMD (1), (4), (5), (15), pour d'autres ces substances retardent la rechute sans en allonger la survie (7). Certains auteurs parlent de retard dans la progression de la maladie en attendant la greffe (4) ou d'une diminution des besoins transfusionnels pour les patients atteints de SMD high risk (5).

Certains auteurs parlent même d'un effet immunomodulateur du 5-azacytidine (7), (10).

Dans notre étude nous évaluons l'impact d'un traitement déméthylant comme traitement de maintenance dans l'attente d'une allogreffe chez les patients atteints de leucémie aiguë myéloïde.

Les substances utilisées étaient la 5-azacitidine ou la décitabine. Ces 2 substances ont été utilisées de manière identique, à savoir qu'aucune étude n'a à ce jour pu établir une différence d'efficacité entre ces deux substances (5). Leur mécanisme d'action semblerait se jouer essentiellement dans l'inhibition des DNA méthyltransférases (DNMT) (13). L'inhibition de ces enzymes permettrait de revenir à une méthylation adéquate du DNA dans les cellules malignes.

Les inhibiteurs de la DNMT n'ont toutefois pas une action ciblée sur les protéines régulatrices de l'épigénome, elles sont donc susceptibles d'intervenir sur d'autres protéines de l'organisme, ce qui pourrait être à l'origine d'effets secondaires (13).

Pour expliquer le développement d'une leucémie, pendant de nombreuses années la théorie du "2 hits" prédominait: une cellule saine subit une première mutation la rendant au stade "pré-leucémique", puis c'était l'acquisition d'au moins une 2<sup>ème</sup> mutation qui allait la transformer en cellule maligne. Les mutations étaient catégorisées en deux classes (3). Cette théorie est simpliste comme l'a montré récemment le séquençage du génome de LMA, de SMD et NMP.

Les mutations de classe 1 mènent à un avantage de prolifération qui peut conduire à une prolifération cellulaire incontrôlée, associée à un avantage de survie cellulaire (3), (8). Comme exemples on peut citer l'acquisition d'une activation constitutive de la tyrosine kinase BCR-ABL, FLT3-ITD, c-kit ou RAS (3). Lorsqu'une mutation de classe 1 survient de façon isolée ou associée à une autre mutation, il peut y avoir l'acquisition d'un avantage de prolifération par la cellule souche hématopoïétique concernée, pouvant conduire au développement d'une néoplasie myéloproliférative (NMP) (3), qui peut se transformer plus tard en LMA. Cet avantage de prolifération peut aussi conduire d'emblée, lorsqu'associé à d'autres mutations, à une transformation leucémique en LMA.

Les mutations de classe 2 induisent un bloc de différenciation empêchant la cellule de se différencier le long des lignées hématopoïétiques (3), (8). Il y a comme exemples les translocations associées au core-binding factor (CBF), au gène RAR-alpha ou MLL (3). Une ou plusieurs mutations de type 2 peuvent être à l'origine d'un syndrome myélodysplasique (SMD) (3). Tout comme la NMP, le SMD peut acutiser en LMA.

Plus généralement, les mutations de type 1 et 2 ou encore d'autres types de mutations (8) sont acquises successivement au cours de la vie. Elles sont associées généralement à des anomalies de l'épigénétique et peuvent induire le développement d'une LMA sans que celle-ci soit secondaire à un SMD, un SMD/NMP ou une NMP. Le séquençage du génome a permis de déceler plusieurs mutations acquises successivement chez les patients étudiés et a montré la présence de plusieurs clones de génétique parfois différente chez un même patient, indiquant que la prolifération leucémique n'est généralement pas monoclonale mais plutôt oligoclonale.

Le traitement des leucémies dépend du groupe de risque dans lequel est affilié le patient. Cette stratification du risque est basée essentiellement sur les analyses cytogénétiques et moléculaires effectuées sur les cellules leucémiques (14). Les patients adultes atteints de LMA présentent des aberrations chromosomiques dans plus de 50% des cas (2). Ces dernières peuvent être considérées comme de bon ou de mauvais pronostic. Les patients ne présentant pas d'aberration chromosomique dans leurs cellules blastiques sont attribués au groupe de risque intermédiaire pour autant qu'il n'ait pas d'anomalie moléculaire de bon (mutation NPM1 ou CEBPa) ou de mauvais pronostic (FLT3-ITD, anomalies MLL, hyperexpression d'EVI1 etc.) (3), (14). Ce groupe de pronostic intermédiaire correspond en réalité à un groupe très hétérogène dont la survie des patients est comparable parfois à ceux du groupe favorable ou au contraire de haut risque (3), (8).

Le séquençage du génome entier a permis récemment d'approfondir la recherche de mutations dans le cadre des leucémies: Les LMA ont été, en 2009, les premiers cancers dont le génome a été complètement séquencé (6).

Il a été découvert que des mutations dans les gènes impliqués dans la régulation épigénétique étaient régulièrement présentes chez les patients porteurs de pathologies myéloïdes telles que les syndromes myélodysplasiques, néoplasies myéloprolifératives et les leucémies aiguës myéloïdes (11). L'ADN des cellules blastiques est souvent méthylé de façon aberrante (11).

La régulation épigénétique peut être définie comme une modulation de la transcription et de l'expression des gènes ne modifiant pas le code génétique. Les modifications épigénétiques peuvent être transitoires ou irréversibles (3), (11).

La méthylation du DNA par des protéines spécifiques s'effectue au niveau de l'hélice double brin ainsi qu'au niveau des histones (13). Il s'agit d'une modification covalente (13).

Les DNA méthyltransférases 1 et 3A (DNMT1/DNMT3A) sont responsables de la méthylation des cytosines, notamment au niveau des îlots CpG (3) (5). L'enzyme TET (Ten Eleven Translocation) a un effet opposé, soit la déméthylation du DNA. Cette déméthylation se fait en plusieurs étapes dont une d'hydroxylation. Le fonctionnement de la TET dépend en partie des IDH (isocitrate déshydrogénases) et peut donc être déficiente en cas de mutation dans un de ces gènes. On retrouve également des mutations des IDH dans les LMA et les SMD (3), (11).

Dans les pathologies myéloïdes on retrouve fréquemment des mutations dans les DNMT. Ces dernières génèrent une méthylation aberrante au niveau du DNA: La méthylation globale du génome devient ainsi hypométhylée et certaines portions de DNA, comme les îlots CpG, deviennent hyperméthylés (5). Une hypométhylation mène à une instabilité génétique (5) et ceci mène au cancer (13). L'hyperméthylation du DNA induit une mise sous silence des gènes situés à proximité. Souvent, les îlots CpG se trouvent à proximité de promoteurs de gènes (3) (5). Si cela concerne un gène suppresseur de tumeur, ce dernier ne sera plus transcrit ce qui peut amener au développement d'une néoplasie.

Les agents hypométhylants tels que la 5-azacitidine et la 5-aza-2-déoxycytidine (=décitabine ou DAC) vont s'insérer dans l'ARN et/ou ADN pendant la réplication et ainsi dégrader les enzymes méthylantes telles que les DNMT (11).

La décitabine s'insère dans l'ADN uniquement alors que l'azacitidine le fait dans l'ARN et l'ADN. Cette dernière peut donc interférer avec la synthèse des protéines (11), (13).

Le mécanisme d'action des agents déméthylants n'est pas encore totalement clair en ce qui concerne la façon dont se fait cette déméthylation (5), (11). Toutefois, les premiers inhibiteurs de la méthylation du DNA étaient des analogues des nucléosides qui se liaient de façon covalente au site d'attachement du cofacteur des DNMT, inhibant donc de façon irréversible ces enzymes (13).

D'autres gènes impliqués dans la régulation épigénétique concernent les modificateurs d'histones tels que les histones déacétylases (HDAC).

L'acétylation des histones permet, selon le type d'histones, de bloquer la méthylation à cet endroit permettant ainsi une meilleure expression des gènes et de rendre la chromatine active pour permettre la transcription génique (13).

L'acétylation des histones est également un phénomène important de régulation épigénétique pour le développement des cellules hématopoïétiques. Si un dérèglement dans un gène induit une déacétylation exagérée des histones, cela mène à une méthylation augmentée et ceci a les mêmes conséquences qu'une méthylation excessive par la DNMT.

Un autre type de médicament a été développé dans le but de diminuer cette déacétylation des histones: l'inhibiteur de la HDAC. Toutefois, ce médicament utilisé seul n'a pas montré de résultats satisfaisants pour les patients atteints de SMD ou LMA (13).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons inclus dans cette étude rétrospective tous les patients de plus de 18 ans ayant bénéficié d'une recherche de maladie résiduelle au diagnostic et au suivi, dans le cadre d'une leucémie aiguë myéloïde ou d'un syndrome myélodysplasique de type AREB-2 traité par chimiothérapie intensive.

Nous avons pris en compte tous les patients traités dès 2007.

Sur un total de 106 patients inclus dans notre étude, 74 ont pu être analysés.

Nous nous sommes limités à l'analyse de la maladie résiduelle par cytométrie de flux. Une étude plus large, composée de plus nombreux patients, pourrait prendre en considération les autres résultats, de biologie moléculaire et cytogénétique notamment. Le nombre de patients ayant un marqueur moléculaire permettant le suivi de la maladie après traitement était insuffisant pour ce travail.

La cytométrie de flux permet de mettre en évidence des antigènes à la surface des cellules, qui sont caractéristiques du clone leucémique. On peut ainsi, grâce à cette technique, suivre l'évolution de ce clone, au phénotype souvent différent de celui des cellules souches hématopoïétiques.

Les analyses de la MRD ont été effectuées à différents moments, mais toujours après la récupération hématologique suite au 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> cycle de chimiothérapie:

- Contrôle de la maladie résiduelle MRD1: contrôle effectué entre J25 et J45 après le début du traitement et après reconstitution hématopoïétique (le plus souvent vers J30-35). Il reflète la réponse au premier cycle de chimiothérapie.
- Contrôle de la maladie résiduelle MRD2: contrôle effectué entre J20 et J48 (médiane à J31) après le 2<sup>ème</sup> traitement. Le patient a dans ce cas reçu deux cycles de chimiothérapie. Cette étape de contrôle a rarement eu lieu plus tardivement, au J55, J62 voire J136 après le 2<sup>ème</sup> traitement par exemple. La MRD2 correspond à la réponse au deuxième cycle de chimiothérapie.
- Contrôle de la maladie résiduelle MRD3: quelques contrôles ont été effectués après un troisième cycle de chimiothérapie aux environs de J19 à J44 (médiane à J25) après le 3<sup>ème</sup> cycle de chimiothérapie.

Selon la réponse au traitement et la récupération hématologique suite au traitement, le patient peut bénéficier de cycles plus ou moins rapprochés, ce qui peut expliquer la variation des délais de contrôles.

Le nombre de cellules analysées a été d'environ 20'000 à 100'000 cellules au total par échantillon, ce qui correspond, une fois les cellules sélectionnées en fonction du SSC/CD45, à environ 1000 à 20'000 cellules dans la fenêtre d'analyse finale. Selon les situations il n'a pas toujours été possible d'obtenir autant d'éléments, ce qui peut contribuer à des résultats moins fiables (par exemple: 100 cellules dans le gating final).

Au moment du diagnostic, les cellules blastiques analysées ont été sélectionnées en cytométrie de flux selon un side scatter et une expression de faible intensité de CD45 correspondant à une fenêtre d'analyse des cellules blastiques. Plusieurs marqueurs ont été testés, ce qui a permis de sélectionner les plus représentatifs du clone leucémique: présence aberrante de certains marqueurs ou absence de marqueurs généralement exprimés par les cellules normales. Cette caractérisation spécifique de chacun des clones leucémiques a été effectuée pour chacun des patients, ce qui a permis de reprendre les mêmes réglages pour leur suivi de la maladie résiduelle. Lors des contrôles de MRD, les protocoles enregistrés de ces patients ont été repris, permettant de comparer au niveau quantitatif les éléments malins restants après chimiothérapie.

Comme dit plus haut, cette étude rétrospective analyse le suivi des maladies résiduelles par cytométrie de flux chez des patients adultes atteints de leucémie myéloïde aiguë.

Pour se faire, il y a eu une première étape de récolte de données avec diverses informations utiles au travail, puis une mise en tableau des résultats. Ceci a permis une analyse graphique des résultats.

La récolte de données a été effectuée à l'aide de plusieurs documents. La majorité des informations se trouvaient dans des "fiches leucémie" collectées par les médecins assistants ces dernières années. Un complément d'information a été obtenu à l'aide du programme recensant les résultats de laboratoire de ce même hôpital.

Les données récoltées dans un premier temps ont été les suivantes:

- date de naissance du patient
- date du diagnostic
- →âge du patient au diagnostic
- analyses de cytogénétique
- analyses de biologie moléculaire

Ces informations nous ont permis de classer les patients selon un niveau de risque, basé sur la classification ELN (European leukemia Net). Cette dernière prévoit une classification en 3 niveaux de risques: favorable, intermédiaire, haut risque.

Les classifications ELN et selon HOVON évaluent les risques, et donc les pronostics, en fonction de plusieurs critères tels que, entre autres, l'âge du patient (< ou > 65ans), ses comorbidités, et donc le risque de supporter les effets secondaires du traitement, ainsi que les anomalies cytogénétiques et/ou moléculaires de la leucémie.

Par la suite d'autres données ont été récoltées, comme l'analyse de la cytologie médullaire et la cytométrie de flux. Ces deux éléments, combinés aux résultats de cytogénétique et biologie moléculaires cités plus haut, ont été analysés après chaque cure de chimiothérapie après récupération hématologique et si possible avant une allogreffe, afin de comparer les réponses aux traitements.

Les différentes analyses effectuées en fin de cures d'induction et de consolidation sont appelées "maladies résiduelles" ou MRD. Les résultats obtenus avant et après chacun des traitements permettent, d'une part, d'évaluer la réponse au traitement reçu de manière individuelle, d'autre part d'analyser la nécessité de chacune des cures lors d'analyse globale des résultats. C'est ce que nous souhaitons effectuer dans cette étude, en particulier évaluer l'utilité des cures d'agents déméthylants données après la chimiothérapie intensive chez les patients en attente de greffe. La question que nous nous sommes posée était la suivante: Le traitement déméthylant faisant le pont entre la chimiothérapie intensive et la greffe est-il utile, inutile ou délétère?

Nous avons analysé les résultats des MRD avant et après chacune des cures de chimiothérapie et/ou d'agents déméthylants.

Une fois récolté ces données, les patients ont été classés dans différents tableaux:

- 1) Classification selon la catégorie de risque (favorable, intermédiaire, haut risque)
- 2) Classification selon le type de traitement reçu (chimiothérapie seule, agents déméthylants seuls ou chimiothérapie suivie d'agents déméthylants avant allogreffe)
- 3) mix des 2: Patients à « haut risque » n'ayant reçu que de la chimiothérapie, ou les deux types de traitement.
- 4) Même principe pour les patients de risques intermédiaire ou favorable.
- 5) Classification des patients selon s'ils ont rechuté ou non

Le regroupement de données dans ces tableaux nous a permis d'analyser les maladies résiduelles en fonction du risque, du traitement et des rechutes. Les patients n'ayant reçu que des agents déméthylants (sans chimiothérapie) n'ont finalement pas été pris en compte pour les analyses.



UNIL | Université de Lausanne

Faculté de biologie  
et de médecine



Hospices cantonaux  
Centre hospitalier  
universitaire vaudois

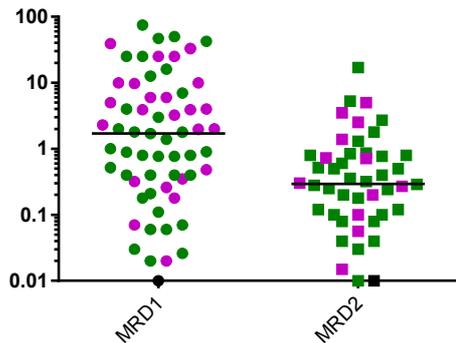
Au vu du caractère rétrospectif de cette étude certains résultats que nous souhaitions avoir manquaient parfois, en particulier les contrôles avant l'allogreffe. Aussi, les directives du protocole HOVON132 demandent une analyse centralisée de la MRD au moment de la récupération hématologique mais sans donner de directive précise quant au jour d'analyse. Seule une analyse de la MRD après le 2<sup>ème</sup> cycle est exigée dans ce protocole. La mesure de la MRD n'est pas requise pour les protocoles HOVON 103 et 102.

Il serait souhaitable, pour confirmer nos résultats, de procéder à une étude prospective afin de disposer de toutes les analyses nécessaires à l'évaluation de la MRD des patients aux divers moments clés du traitement: MRD1, MRD2, MRD3 et une analyse avant l'allogreffe. Cette analyse est en cours dans le cadre de l'étude multicentrique prospective HOVON 132. Aussi, les caractéristiques des 2 groupes de patients comparés après randomisation (avec ou sans traitement épigénétique faisant suite à la chimiothérapie) ne devraient pas être différentes au diagnostic pour permettre d'avoir une meilleure comparaison et éviter le biais de sélection de notre étude.

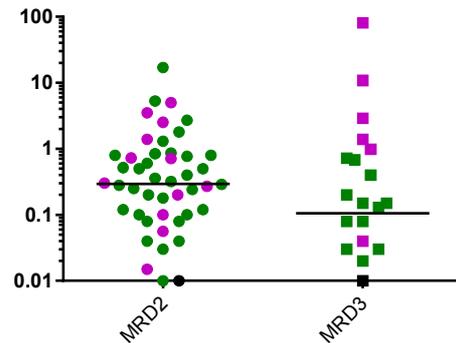
## RÉSULTATS

### Analyse globale

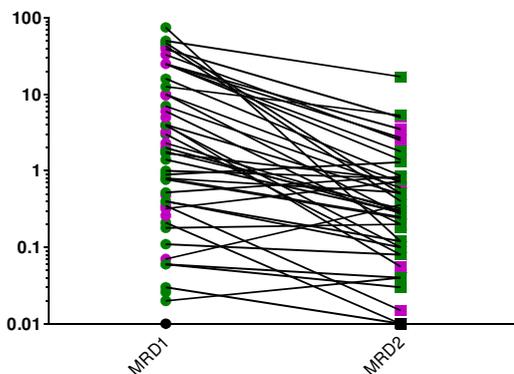
Tous les patients, tous risques et tous ttt confondus  
(sauf agents déméthylants seuls)



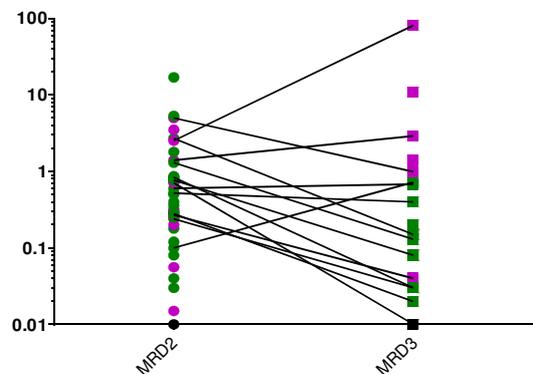
Tous les patients, tous risques et tous ttt confondus  
(sauf agents déméthylants seuls)



Tous les patients, tous risques et tous ttt confondus  
(sauf agents déméthylants seuls)



Tous les patients, tous risques et tous ttt confondus  
(sauf agents déméthylants seuls)



#### Légende:

- Axe des x: maladie résiduelle après traitements: MRD1, MRD2, MRD3
- Axe des y: pourcentage de blastes résiduels, rendu en résultat logarithmique pour une meilleure lecture
- En rose: Patients ayant récidivé
- En vert: Patients n'ayant pas récidivé
- MRD1 n=63, MRD2 n= 48 MRD3= 24
- Statistiques: MRD1 vs. MRD2:  $P = 0.0002$  (\*\*\*) (Mann-Whitney); MRD2 vs MRD3:  $P = 0.073$  (ns) (Mann-Whitney)

Ces graphiques montrent une vue d'ensemble de tous les résultats, à l'exception des patients ayant reçu uniquement des agents déméthylants car ces derniers ne sont pas représentatifs de la population ayant reçu de la chimiothérapie (seule ou en association).

A première vue nous constatons par l'analyse globale des résultats que, d'une manière générale, après chaque cure de chimiothérapie la maladie résiduelle diminue pour la majorité des patients. Toutefois si l'on analyse la correspondance des MRD pour chaque patient on constate que ces dernières n'évoluent pas de la même manière après une cure de chimiothérapie: certains patients voient une nette diminution de leur MRD (>1log), d'autres moins et au contraire certains patients avec une maladie résistante au traitement voient leur valeur de MRD augmenter. Globalement la 3<sup>ème</sup> cure de chimiothérapie paraît utile mais ceci n'est pas forcément le cas au niveau individuel, notamment évidemment pour les LMA réfractaires au traitement.

En d'autres termes, si l'on tient compte uniquement de l'analyse globale sans les graphiques de correspondance des MRD on peut conclure que chacune des cures garde son intérêt pour la majorité des patients, tous risques confondus. En représentant les correspondances de MRD pour chacun des patients nous nous rendons compte que certains patients ont une maladie résistante/réfractaire au traitement.

Plus loin nous analyserons les évolutions des MRD séparément selon les groupes de risques. Sous réserve du faible nombre de patients inclus et de la non exclusion, pour l'analyse, des cas qui n'étaient pas en rémission complète après le 2<sup>ème</sup> cycle de chimiothérapie (RC1), les résultats des MRD2 et MRD3 ne sont pas significativement différents alors que MRD1 et MRD2 le sont.

Nous pouvons également observer sur ces graphiques que plusieurs patients présentant une valeur élevée de MRD1, donc à priori une mauvaise réponse à la chimiothérapie d'induction, ne font pas partie des patients qui vont rechuter (points verts). Ceci est d'autant plus surprenant que la recherche des catégories de risques pour chacun de ces patients nous montre que ce sont des patients classés majoritairement dans les classes de risques élevés! (7 HR, 3 IR et 1 LR)

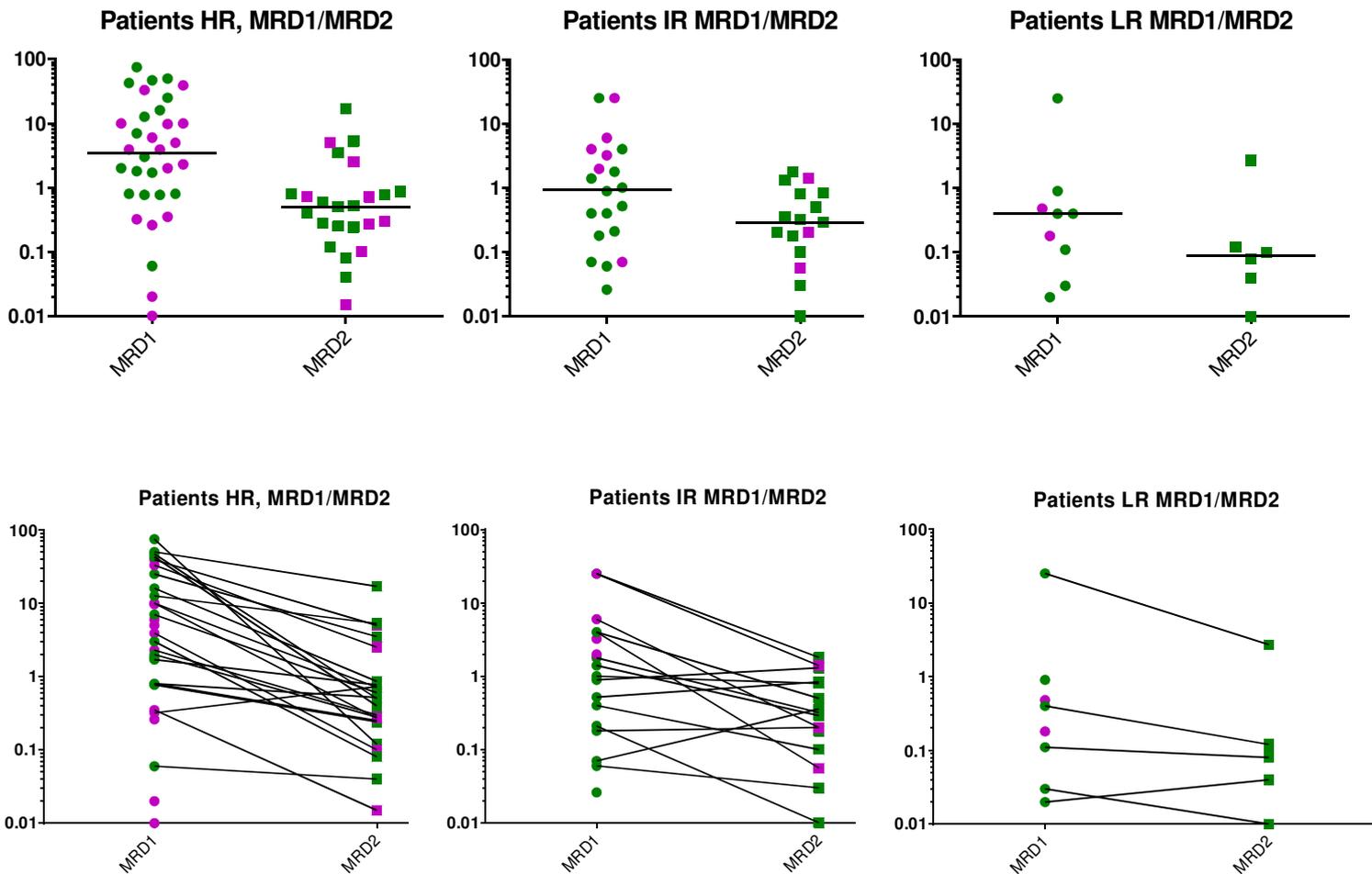
Patients avec MRD1 élevée mais qui n'ont pas rechuté							
no patient	MRD au dx	MRD1	MRD2	MRD3	cytogénétique	biologie moléculaire	risque
1	20%	1.78%	0.32%		normale	Hyperexpression WT1	I
4	50%	42.60%	0.40%		complexe del TP53	normale	H
12	93%	25%	2.70%	0.15%	t(8;21) = AML1-ETO	AML1-ETO+ C-KIT -	L
15	13%	1.40%	0.29%		normale	Hyperexpression WT1 à 3336 copies	I
28	14.40%	7.00%	0.60%	0.68%	normale	Hyperexpression WT1 à 3816 copies	H
34	47%	47%	0.50%		normale	FLT3-ITD douteux	H
50	50%	16%	0.86%		normale	Hyperexpression WT1 FLT3-ITD+	H
67	40%	50%	17%		del(7q) t(4;22) +8 +22	Légère Hyperexpression WT1 à 262 copies EVI1+	H
69	25%	25%	1.80%		47XY +8	normale	I
70	50%	12.60%	5.30%		trisomie 8	Hyperexpression WT1 à 4274 copies	H
74	19.30%	1.7%	0.77%	0.08%	del(7)	Hyperexpression WT1	H

Au contraire, quelques patients présentant une bonne réponse à la chimiothérapie d'induction (MRD1 basse) vont malgré cela rechuter. Ces patients font partie de toutes les classes de risque, mais également avec une prédominance dans les catégories à hauts risques (4HR, 1 IR, 2 LR). Ces patients illustrent le rôle majeur joué non seulement par la MRD mais également par l'oncogénétique, lorsque celle-ci est de mauvais pronostic.

Patients avec MRD1 basse mais qui ont quand-même rechuté							
no patient	MRD au dx	MRD1	MRD2	MRD3	cytogénétique	biologie moléculaire	risque
17	8%	0.35%	0.015%		complexe	non fait	H
18	16%	0.48%		1.40%	t(8;21) = AML1-ETO t(8;12)	Hyperexpression WT1 FIP1L1-PDGFRalpha -	L
20	40%	0.07%	0.008%		normale	Hyperexpression WT1 à 32535 copies NPM1+ FLT3-ITD+	I
21	20%	0.32%	0.73%		normale	Hyperexpression du WT1 à 1366 copies	H
41	74%	0.02%			-	-	H
53	60%	0.26%			trisomies 3,8,11,13,19,22	Légère surexpression WT1	H
73	25%	0.18%			trisomie8 del partielle (12)	Hyperexpression WT1 à 2906 copies	L

L'abréviation MRD1 représente le contrôle effectué à la fin de la première chimiothérapie d'induction, après récupération hématologique. MRD2 et MRD3 font référence aux contrôles effectués après le deuxième, respectivement troisième cycle de chimiothérapie (réinduction ou consolidation).

## MRD en fonction des classes de risque



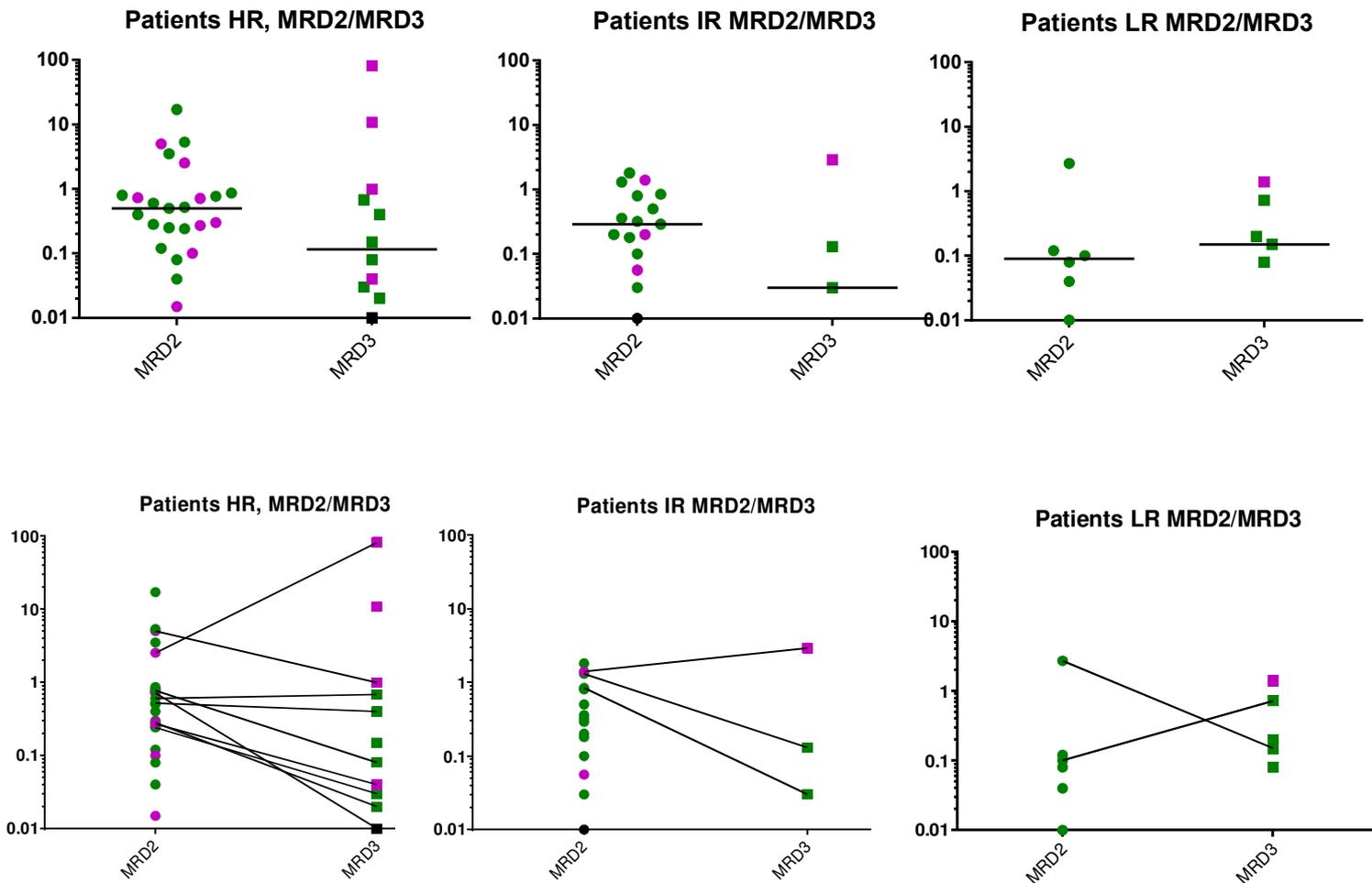
### Légende:

- Axe des x: maladie résiduelle après traitements: MRD1, MRD2
- Axe des y: pourcentage de blastes résiduels, rendu en résultat logarithmique pour une meilleure lecture
- En rose: Patients ayant récidivé
- En vert: Patients n'ayant pas récidivé
- Patients à haut risque (HR): MRD1 n= 34 MRD2 n= 25
- Patients à risque intermédiaire (IR): MRD1 n= 20, MRD2 n= 17
- Patients à bas risque (LR): MRD1 n= 9, MRD2 n= 6
- Statistiques : MRD1 vs MRD2 (Mann-Whitney): HR:  $P = 0.0008$  (\*\*\*) ; IR:  $P = 0.032$  (\*) ; LR:  $P = 0.26$  (ns)

Dans la classification actuelle en fonction des groupes pronostiques tenant compte de la cytogénétique et de la biologie moléculaire, on peut observer que les patients présentent des valeurs de MRD1 différentes selon leur classe de risque. En effet, les patients à haut risque (HR) présentent une MRD1 supérieure à celle des risques intermédiaires (IR). Ces derniers sont également plus élevés que les risques favorables (LR).

On voit également sur ces graphes que le taux de MRD chute entre le premier et le deuxième contrôle (MRD1, respectivement MRD2), ce qui confirme la nécessité et l'utilité de ce cycle.

Indépendamment des investigations génétiques, on peut formuler l'hypothèse que le taux de maladie résiduelle au premier contrôle post induction est un indice pronostique, puisque la plupart des patients ayant rechuté avaient un taux de MRD1 supérieur à la médiane après le premier cycle de chimiothérapie. Bien que plusieurs de ces patients, indiqués par des carrés roses sur la figure, ont eu une diminution de plus d'un log du taux de MRD après le deuxième cycle de chimiothérapie, ces patients ont tout de même rechuté ultérieurement, suggérant qu'une correction tardive du taux de MRD n'est pas prédictive d'un bon pronostic. Cela souligne, vraisemblablement, le rôle de l'oncogénétique chez ces patients à haut risque de rechute. Des analyses génétiques plus détaillées par NGS et cytogénétique pourraient être nécessaires pour éclaircir ce point.



Légende:

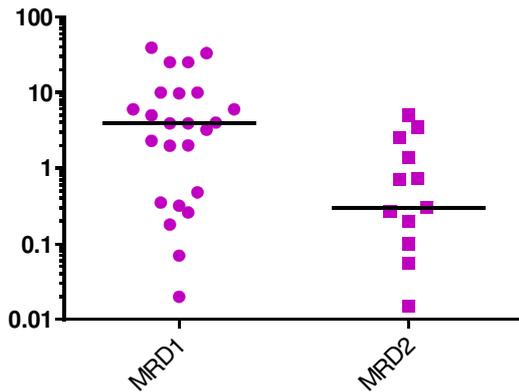
- Axe des x: maladie résiduelle après traitements: MRD2, MRD3
- Axe des y: pourcentage de blastes résiduels, rendu en résultat logarithmique pour une meilleure lecture
- En rose: Patients ayant récidivé
- En vert: Patients n'ayant pas récidivé
- Patients à haut risque (HR): MRD2 n= 25, MRD3 n= 12
- Patients à risque intermédiaire (IR): MRD2 n= 17, MRD3 n= 5
- Patients à bas risque (LR): MRD2 n= 6, MRD3 n= 7
- Statistiques : MRD2 vs MRD3 (Mann-Whitney): HR :  $P = 0.23$  (ns); IR :  $P = 0.18$  (ns); LR :  $P = 0.86$  (ns)

A première vue, ces graphes montrent un bénéfice du troisième cycle de chimiothérapie pour les patients classés dans les risques intermédiaire et haut, cependant les statistiques montrent une amélioration non significative du taux de MRD pour l'ensemble des patients. L'absence de signification statistique résulte du faible nombre de patients étudiés et de l'hétérogénéité des cas étudiés, 2 patients du groupe à haut risque ayant une leucémie réfractaire au traitement. Si ces 2 cas ne sont pas considérés dans l'analyse, les MRD2 et 3 diffèrent significativement ( $P = 0.0235$ ,  $n=23$  vs  $n = 10$ ), indiquant un bénéfice d'un 3<sup>ème</sup> cycle de chimiothérapie dans cette catégorie de patients qui ont une maladie chimio-sensible. Le nombre de patients des groupes intermédiaire et bas risques est clairement insuffisant pour que l'on puisse tirer des conclusions concernant le bénéfice d'un 3<sup>ème</sup> cycle de chimiothérapie.

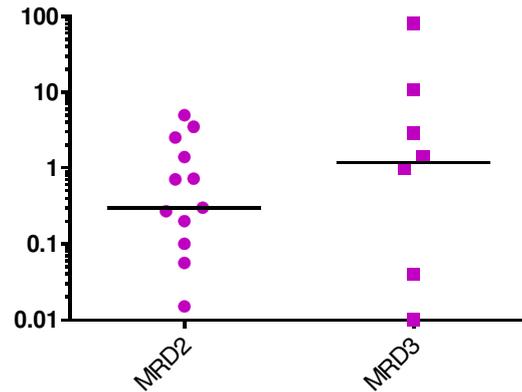
## MRD selon les rechutes

Patients avec rechute:

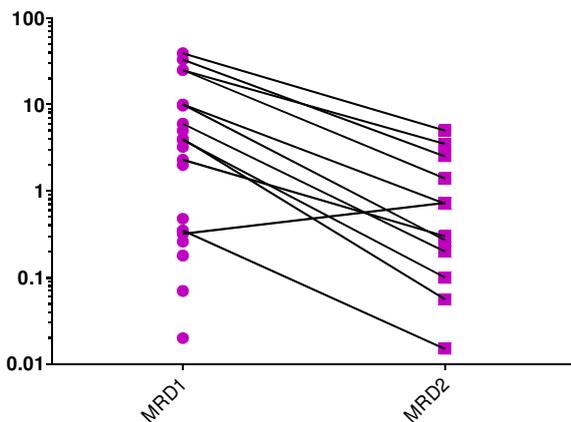
Tous les patients ayant rechuté, MRD1/MRD2



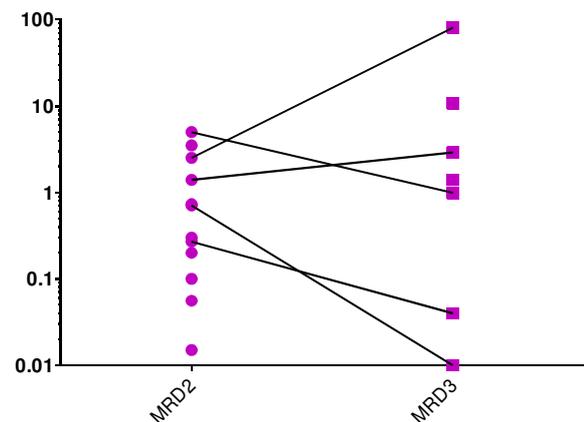
Tous les patients ayant rechuté, MRD2/MRD3



Tous les patients ayant rechuté, MRD1/MRD2



Tous les patients ayant rechuté, MRD2/MRD3



Légende:

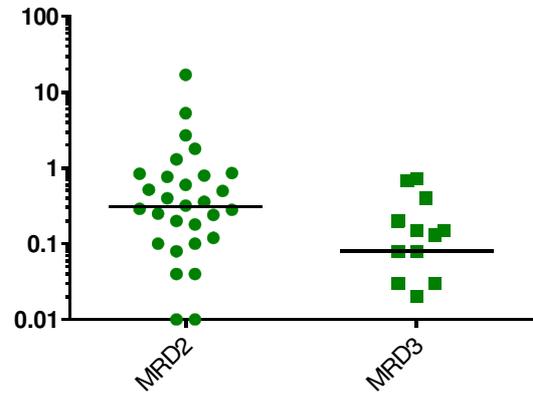
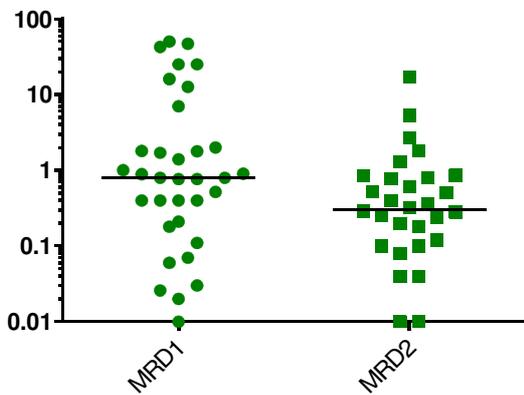
- Axe des x: maladie résiduelle après traitements: MRD1, MRD2, MRD3
- Axe des y: pourcentage de blastes résiduels, rendu en résultat logarithmique pour une meilleure lecture
- MRD1 n= 24, MRD2 n= 13, MRD3= 8
- Statistiques: MRD1 vs. MRD2:  $P = 0.0055$  (\*\*) (Mann-Whitney); MRD2 vs MRD3:  $P = 0.66$  (ns) (Mann-Whitney)

Ces graphiques montrent qu'à l'exception d'un patient, l'ensemble des patients ayant rechuté voient leur maladie résiduelle s'améliorer, donc diminuer, entre le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> cycle de chimiothérapie. Cependant, la maladie résiduelle augmente chez plusieurs patients entre le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> cycle, indiquant que ce dernier n'est pas bénéfique pour tous. Le faible nombre de patients rend néanmoins les statistiques non significatives.

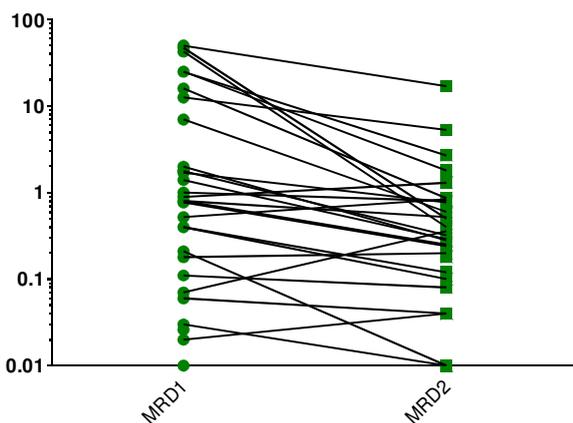
Sur les 24 patients qui ont récidivé, seuls deux présentent une leucémie classée comme risque favorable. Tous les autres étaient classés en risque intermédiaire ou défavorable.

Patients sans rechute:

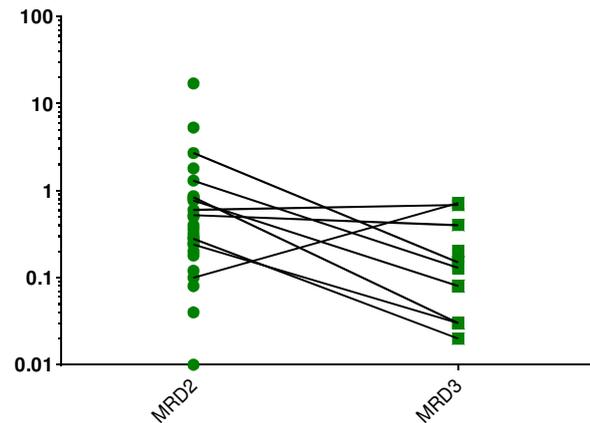
**Tous les patients n'ayant pas rechuté, MRD1/MRD2**    **Tous les patients n'ayant pas rechuté, MRD2/MRD3**



**Tous les patients n'ayant pas rechuté, MRD1/MRD2**



**Tous les patients n'ayant pas rechuté, MRD2/MRD3**



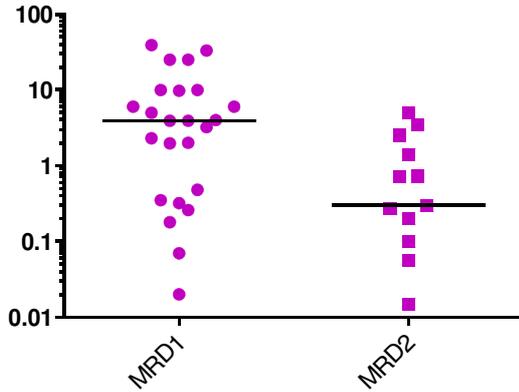
Légende:

- Axe des x: maladie résiduelle après traitements: MRD1, MRD2, MRD3
- Axe des y: pourcentage de blastes résiduels, rendu en résultat logarithmique pour une meilleure lecture
- MRD1 n= 34, MRD2 n= 30, MRD3= 15
- Statistiques: MRD1 vs. MRD2:  $P = 0.030$  (\*) (Mann-Whitney); MRD2 vs MRD3:  $P = 0.009$  (\*\*) (Mann-Whitney)

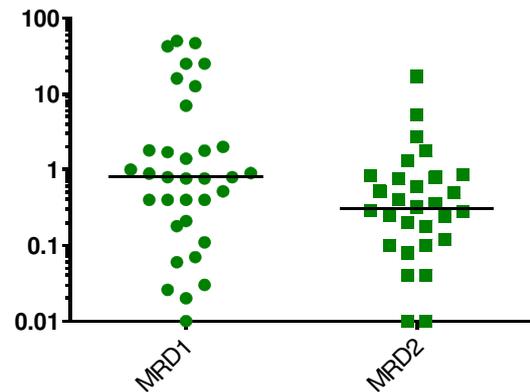
Contrairement aux patients ayant rechuté, les patients sans rechute voient leur maladie résiduelle diminuer, autant entre le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> cycle de chimiothérapie qu'entre le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup>, sauf cas exceptionnels, si l'on analyse l'ensemble des patients. Néanmoins si l'on analyse de manière individuelle l'évolution des MRD, on remarque que la réponse au traitement est plus variable.

## Comparaison des patients avec et sans rechute

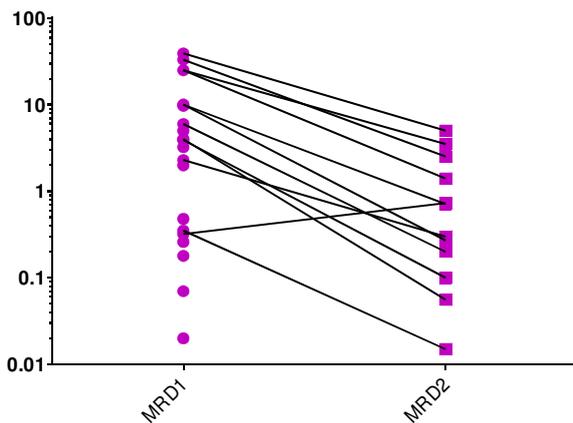
Tous les patients ayant rechuté, MRD1/MRD2



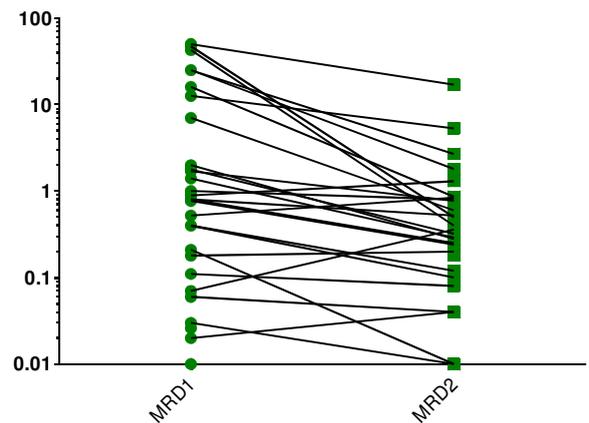
Tous les patients n'ayant pas rechuté, MRD1/MRD2



Tous les patients ayant rechuté, MRD1/MRD2



Tous les patients n'ayant pas rechuté, MRD1/MRD2



### Légende:

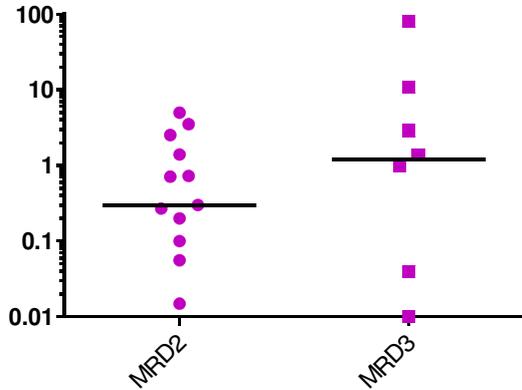
- Axe des x: maladie résiduelle après traitements: MRD1, MRD2
- Axe des y: pourcentage de blastes résiduels, rendu en résultat logarithmique pour une meilleure lecture
- Patients ayant rechuté: MRD1 n= 24, MRD2 n= 13
- Statistiques: MRD1 vs. MRD2:  $P = 0.0055$  (\*\*) (Mann-Whitney)
- Patients n'ayant pas rechuté: MRD1 n= 34, MRD2 n=30
- Statistiques: MRD1 vs. MRD2:  $P = 0.030$  (\*) (Mann-Whitney)

Si l'on compare les patients avec ou sans rechute on remarque que dans le groupe des personnes qui ont rechuté la médiane de la MRD1 est significativement plus élevée (environ 3%) que celle du groupe de patients n'ayant pas rechuté (environ 0.7-0.8%). Ceci confirme l'hypothèse que l'on pourrait prédire une rechute en analysant la maladie résiduelle après le premier cycle de chimiothérapie. L'évaluation du pronostic du patient devrait donc tenir compte de l'oncogénétique et des valeurs de maladie résiduelle après le premier cycle de chimiothérapie d'induction.

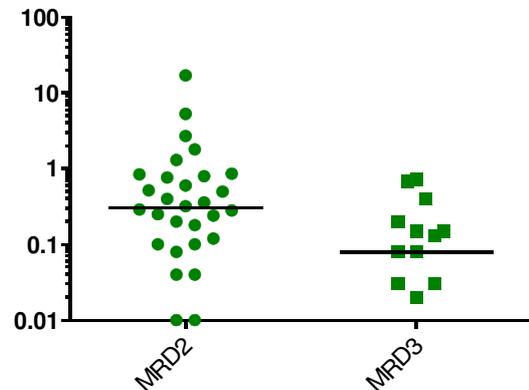
Toutefois certains patients avec une MRD basse rechutent et au contraire d'autres avec une MRD élevée ne rechutent pas. L'analyse de la MRD n'est donc pas toujours prédictive de la rechute. Sur les 24 MRD1 analysées chez les patients avec rechute, seuls deux présentent une leucémie classée comme risque favorable. Tous les autres étaient classés en risque intermédiaire ou défavorable. Au contraire, sur les 34 MRD1 analysées chez les patients sans rechute, les catégories de risques étaient bien mélangées: 7 patients présentaient une leucémie de pronostic favorable, 12 intermédiaire et 15 de mauvais pronostic.

On remarque également sur ces graphiques que globalement l'ensemble des patients, qu'ils rechutent ou non, tirent un bénéfice du 2<sup>ème</sup> cycle de chimiothérapie. Au niveau individuel il existe quelques patients qui voient leur maladie résiduelle augmenter entre le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> cycle mais cela reste une minorité (1 patient pour le groupe rechute et 3 patients dans le groupe sans rechute).

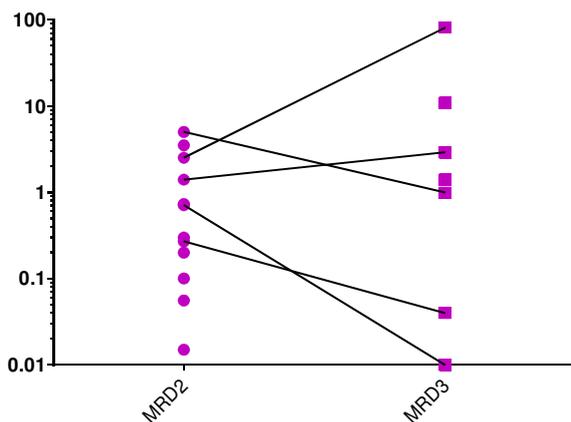
Tous les patients ayant rechuté, MRD2/MRD3



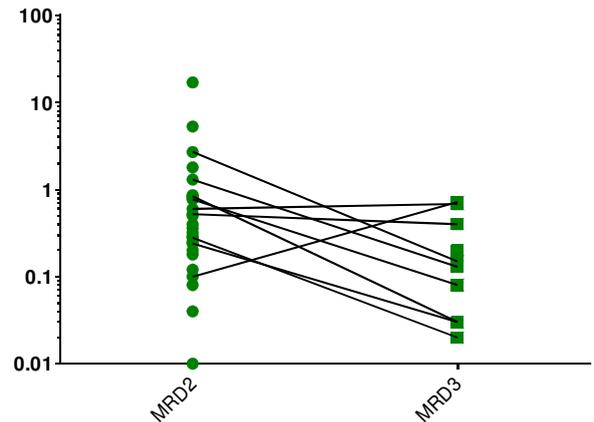
Tous les patients n'ayant pas rechuté, MRD2/MRD3



Tous les patients ayant rechuté, MRD2/MRD3



Tous les patients n'ayant pas rechuté, MRD2/MRD3



Légende:

- Axe des x: maladie résiduelle après traitements, MRD1, MRD2, MRD3
- Axe des y: pourcentage de blasts résiduels, rendu en résultat logarithmique pour une meilleure lecture
- Patients ayant rechuté: MRD2 n= 13 MRD3 n= 8
- Statistiques: MRD2 vs MRD3:  $P = 0.658$  (ns) (Mann-Whitney)
- Patients n'ayant pas rechuté: MRD2 n= 30, MRD3 n= 15
- Statistiques: MRD2 vs MRD3:  $P = 0.009$  (\*\*) (Mann-Whitney)

Au contraire de la MRD1, l'analyse de la MRD2 ne donne pas d'indication sur le devenir du patient concernant la rechute. En effet, les valeurs de MRD2 sont plus ou moins équivalentes dans ces 2 catégories de patients.

On remarque que les patients qui ont rechuté avaient par contre une MRD3 supérieure à la MRD2 contrairement aux patients sans rechute.

Lorsqu'on analyse les anomalies cytogénétiques et moléculaires des patients avec une MRD3 > 0.1% on remarque que les 5 patients avec une MRD3 > 0.1% mais qui n'ont pas rechuté présentent majoritairement une cytogénétique normale contrairement à ceux qui ont rechuté. Au contraire, sur

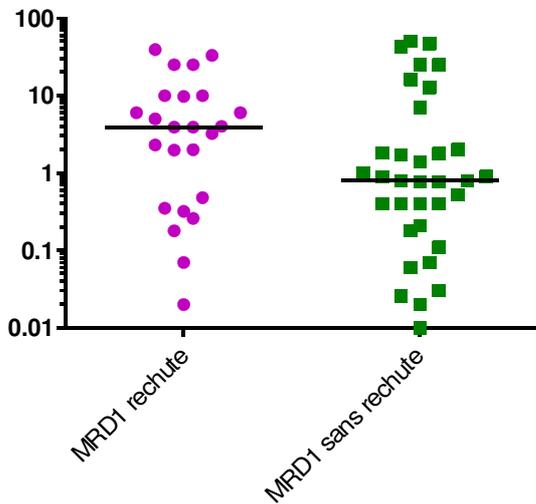
le plan moléculaire l'hyperexpression du gène WT1 n'est pas déterminante puisqu'elle peut se retrouver autant chez les patients avec que sans rechute.

Patients qui ont rechuté qui avaient une MRD3>0.1%							
no patient	MRD au dx	MRD1	MRD2	MRD3	cytogénétique	biologie moléculaire	risque
6	12%	2%		10.80%	pas de fiche	-	H
8	pas trouvé	25%	1.40%	2.90%	normale	hyperexpression WT1	I
18	16%	0.48%		1.40%	t(8;21) = AML1-ETO t(8;12)	Hyperexpression WT1 FIP1L1-PDGFRalpha -	L
65	73%	39%	5%	0.99%	47XY +8 (?)	Hyperexpression WT1 à 6543 copies FLT3-ITD+	H
72	71%	33%	2.52%	81%	9XY +6 +13 +2	Hyperexpression WT1 à 12190 copies NPM1+ FLT3-ITD+	H

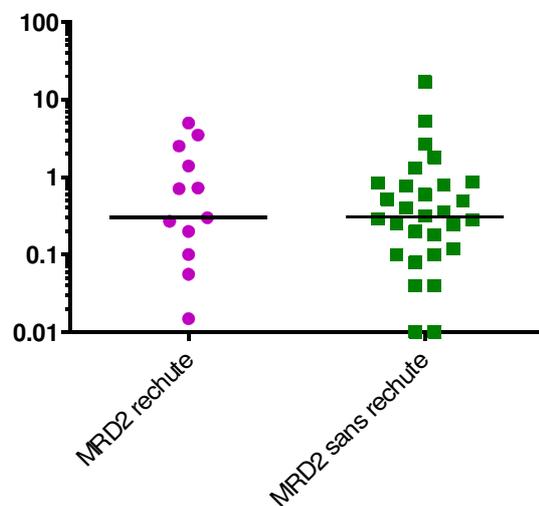
Patients sans rechute malgré MRD3>0.1%							
no patient	MRD au dx	MRD1	MRD2	MRD3	cytogénétique	biologie moléculaire	risque
7	80%	in	0.10%	0.72%	normale	Hyperexpression WT1 NPM1+	L
11	30%	0.90%		0.20%	normale	NPM1+	L
12	93%	25%	2.70%	0.15%	t(8;21) = AML1-ETO	AML1-ETO+ C-KIT -	L
19	81%	0.80%	0.52%	0.40%	t(6;11) réarrangement MLL- MLLT4	normale	H
28	14.40%	7.00%	0.60%	0.68%	normale	Hyperexpression WT1 à 3816 copies	H
42	20%	an on fait		0.15%	normale	Hyperexpression WT1 à 4641 copies rEV11 à 0.5	H
58	36%	0.89%	1.30%	0.13%	normale	Hyperexpression WT1 à 2906 copies	I

Pour une comparaison plus aisée des MRD des groupes de patients avec et sans rechute, ci-dessous des graphes comparant les MRD1, MRD2 et MRD3 des patients de ces 2 groupes

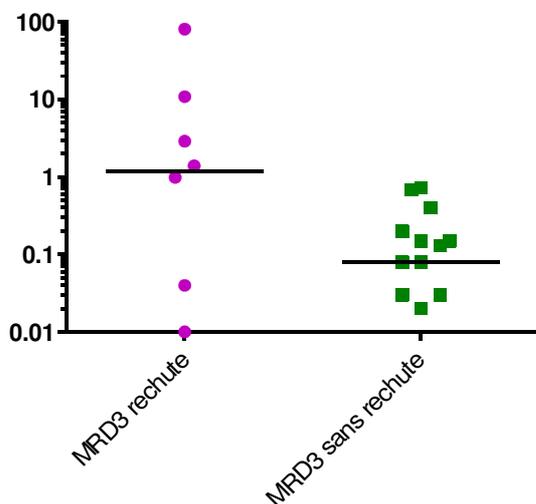
### MRD1: Patients avec rechute vs sans rechute



### MRD2: Patients avec rechute vs sans rechute



### MRD3: Patients avec rechute vs sans rechute



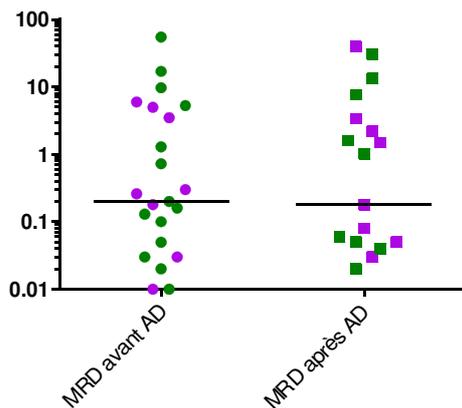
Comme mentionné plus haut, on peut remarquer que les MRD1 et MRD3 sont bien différentes entre les groupes rechute ou non rechute et ceci pourrait être utilisé pour catégoriser les patients. La MRD2 n'est, par contre, pas prédictive pour une future rechute.

Lorsque l'on recherche les catégories de risques des patients avec rechute et sans rechute on remarque étonnamment que les patients sans rechute n'appartiennent pas nécessairement à la catégorie des low risk, contrairement à ce dont on pourrait s'attendre. Pour les patients qui ont rechuté, la majorité d'entre eux font partie de la catégorie high risk mais on retrouve également des low risks. (patients nos 18 et 73)

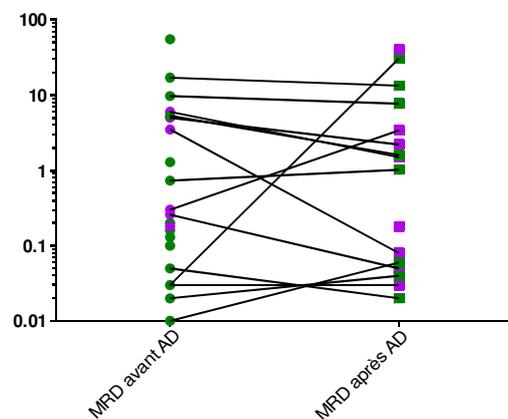
## Agents déméthylants: Bridging indispensable avant la greffe?

### MRD avant et après les agents déméthylants

Patients qui ont reçu chimio+AD, MRD avant/MRD après AD



Patients qui ont reçu chimio+AD, MRD avant/MRD après AD



#### Légende:

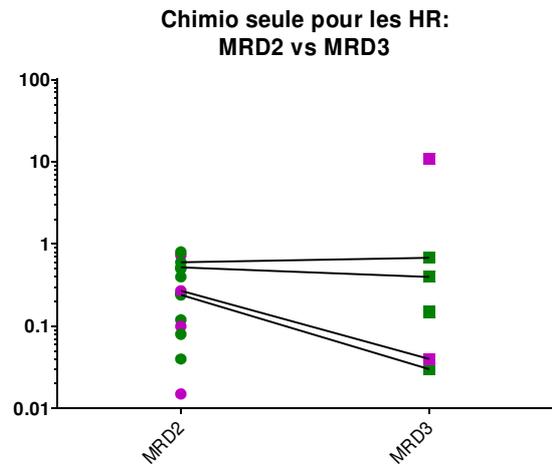
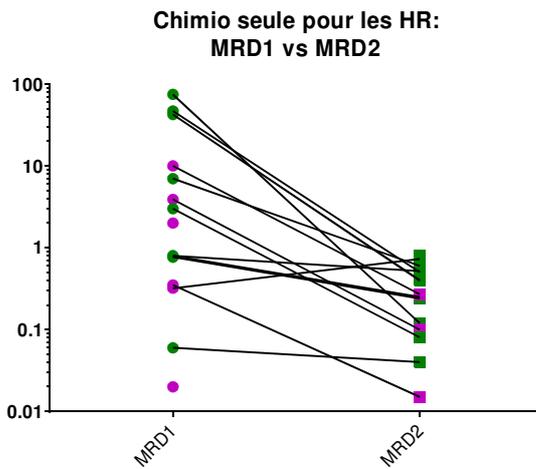
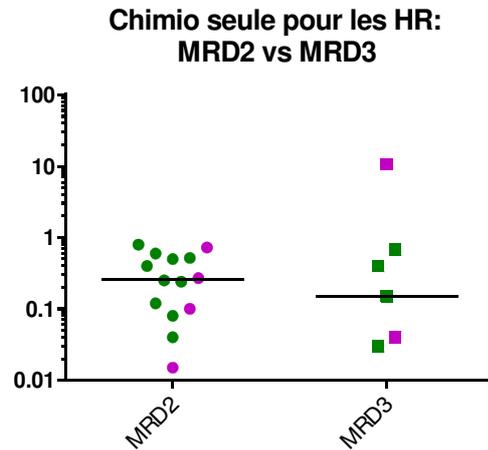
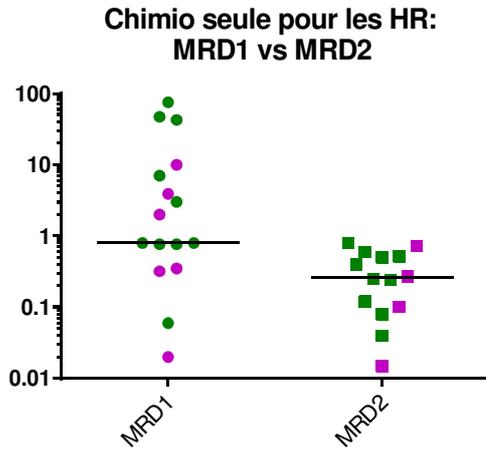
- Axe des x: maladie résiduelle avant et après traitement déméthylant (AD): MRD avant vs MRD après AD
- Axe des y: pourcentage de blastes résiduels, rendu en résultat logarithmique pour une meilleure lecture
- En rose: Patients ayant récidivé
- En vert: Patients n'ayant pas récidivé
- MRD avant AD n= 23, MRD après AD n= 19
- Statistiques: MRD avant vs après:  $P = 0.975$  (ns) (Mann-Whitney)

Ces deux graphiques montrent les valeurs de maladie résiduelle avant et après les agents déméthylants, chez des patients ayant reçu de la chimiothérapie intensive puis des agents déméthylants. A l'exception d'un patient appartenant au groupe de risque favorable, tous les patients sont de pronostic intermédiaire ou défavorable et sont dans l'attente d'une allogreffe.

On peut voir que la 5-azacitidine et la décitabine utilisées comme traitement de maintenance permettent une stabilisation voire une légère diminution de la maladie résiduelle en attendant l'allogreffe pour la majorité des patients. Le nombre de cycles de traitements épigénétiques varie de 1 à 26 cures, en moyenne 5,5 cures par patient.

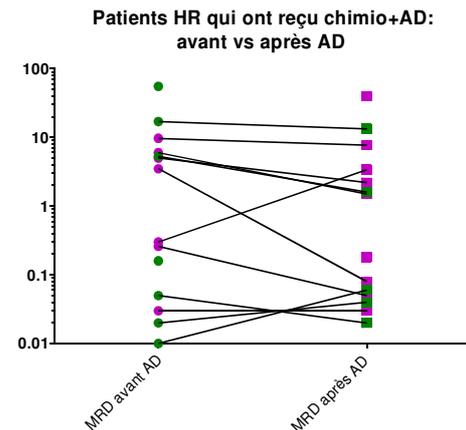
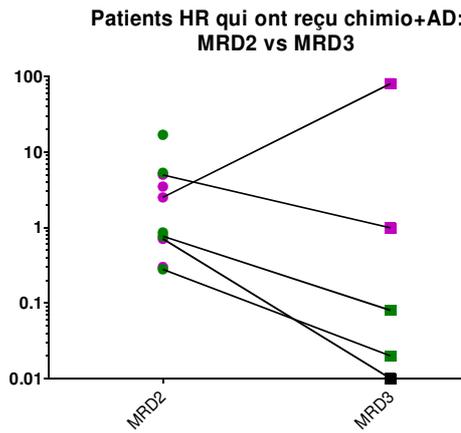
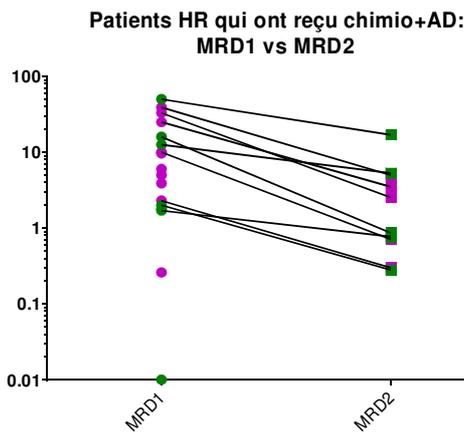
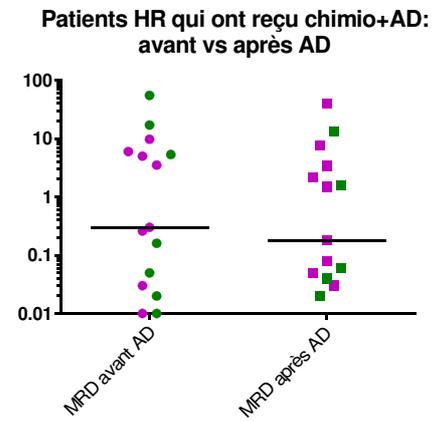
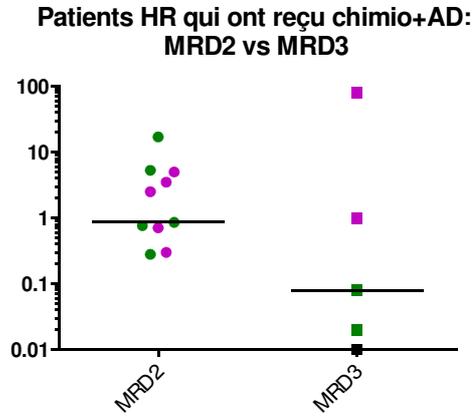
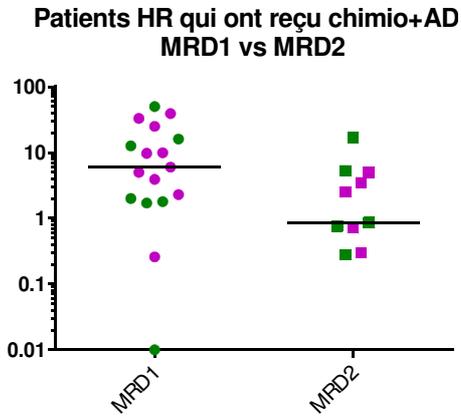
Afin de se rendre compte si l'ensemble des patients ayant reçu de la chimiothérapie suivie d'agents déméthylants tire un même bénéfice quelle que soit leur catégorie de risque, nous avons étudié séparément les hauts risques et les risques intermédiaires; les patients ayant bénéficié d'agents déméthylants à la fin de la chimiothérapie se trouvant majoritairement dans ces deux catégories.

Patients à haut risque: chimiothérapie seule vs chimiothérapie suivie d'agents déméthylants



Légende:

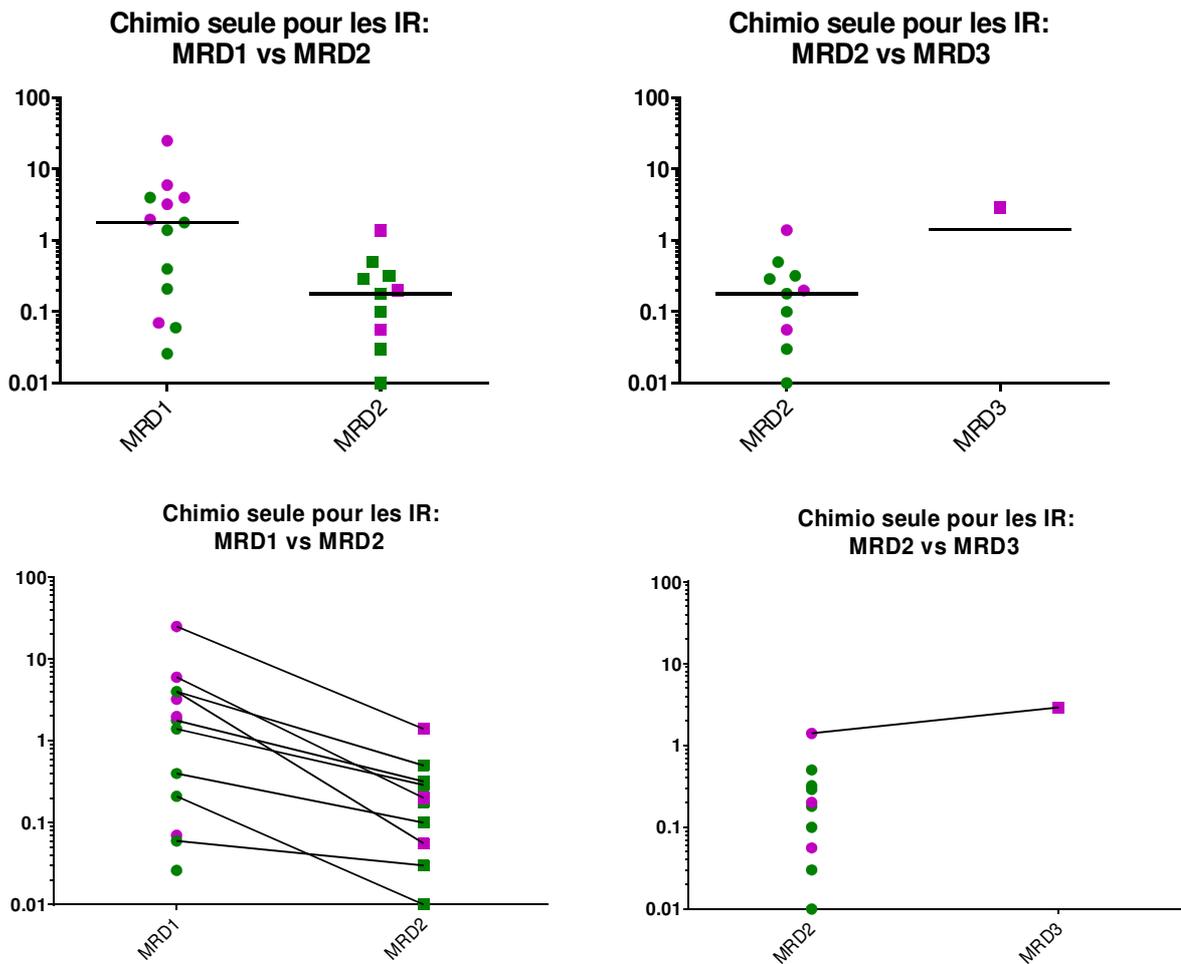
- Axe des x: maladie résiduelle après traitements, MRD1, MRD2, MRD3
- Axe des y: pourcentage de blastes résiduels, rendu en résultat logarithmique pour une meilleure lecture
- En rose: Patients ayant récidivé
- En vert: Patients n'ayant pas récidivé
- MRD1 n= 17, MRD2 n= 14, MRD3= 7
- Statistiques: MRD1 vs. MRD2:  $P = 0.0087$  (\*\*) (Mann-Whitney); MRD2 vs MRD3:  $P = 0.623$  (ns) (Mann-Whitney)



**Légende:**

- Axe des x: maladie résiduelle après traitements, MRD1, MRD2, MRD3
- Axe des y: pourcentage de blastes résiduels, rendu en résultat logarithmique pour une meilleure lecture
- En rose: Patients ayant récidivé
- En vert: Patients n'ayant pas récidivé
- MRD1 n= 17, MRD2 n= 11, MRD3= 5
- Statistiques: MRD1 vs. MRD2:  $P = 0.043$  (\*) (Mann-Whitney); MRD2 vs MRD3:  $P = 0.441$  (ns) (Mann-Whitney)
- MRD avant AD n= 15, MRD après AD n= 15
- Statistiques: MRD avant vs après:  $P = 0.660$  (ns) (Mann-Whitney)

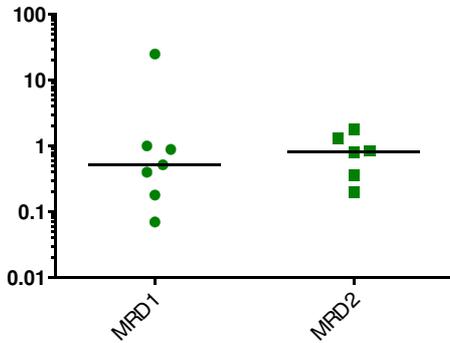
Patients à risque intermédiaire: chimiothérapie seule vs chimiothérapie suivie d'agents déméthylants



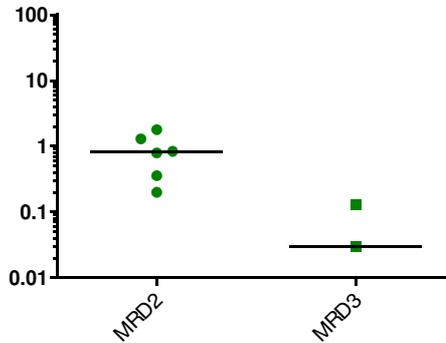
Légende:

- Axe des x: maladie résiduelle après traitements: MRD1, MRD2, MRD3
- Axe des y: pourcentage de blastes résiduels, rendu en résultat logarithmique pour une meilleure lecture
- En rose: Patients ayant récidivé
- En vert: Patients n'ayant pas récidivé
- MRD1 n= 13, MRD2 n= 11, MRD3= 2
- Statistiques: MRD1 vs. MRD2:  $P = 0.014$  (\*) (Mann-Whitney); MRD2 vs MRD3:  $P > 0.99$  (ns) (Mann-Whitney)

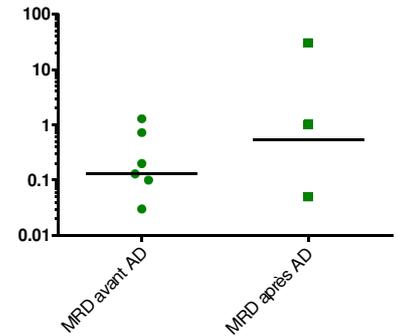
Patients IR qui ont reçu chimio+AD:  
MRD1 vs MRD2



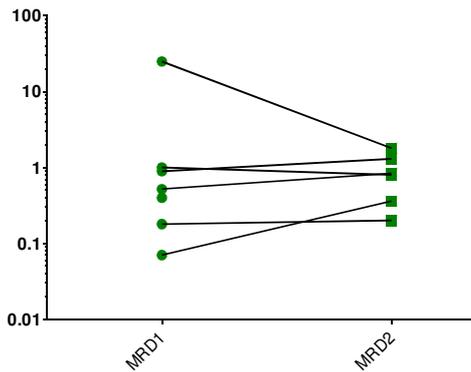
Patients IR qui ont reçu chimio+AD:  
MRD2 vs MRD3



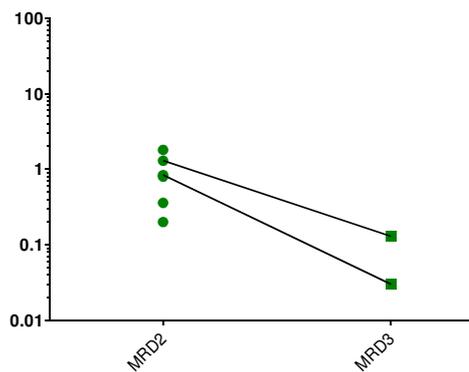
Patients IR ayant reçu AD:  
avant vs après AD



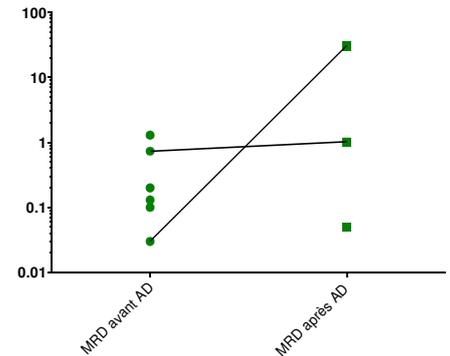
Patients IR qui ont reçu chimio+AD:  
MRD1 vs MRD2



Patients IR qui ont reçu chimio+AD:  
MRD2 vs MRD3



Patients IR ayant reçu AD:  
avant vs après AD



Légende:

- Axe des x: maladie résiduelle après traitements, MRD1, MRD2, MRD3
- Axe des y: pourcentage de blastes résiduels, rendu en résultat logarithmique pour une meilleure lecture
- En rose: Patients ayant récidivé
- En vert: Patients n'ayant pas récidivé
- MRD1 n= 7, MRD2 n= 6, MRD3= 3
- Statistiques: MRD1 vs. MRD2:  $P = 0.731$  (ns) (Mann-Whitney); MRD2 vs MRD3:  $P = 0.024$  (\*) (Mann-Whitney)
- MRD avant AD n= 7, MRD après AD n= 4
- Statistiques: MRD avant vs après:  $P = 0.83$  (ns) (Mann-Whitney)

Si l'on sépare les patients à haut risque de ceux à risque intermédiaire on observe que les hauts risques tirent un bénéfice des agents déméthylants alors que les risques intermédiaires ont une stabilisation voire une légère augmentation de leur maladie résiduelle. L'analyse statistique ne décèle pas de différence significative entre la MRD avant et après traitement avec des agents déméthylants avant allogreffe pour ces patients de risque intermédiaire sous réserve du faible nombre de cas étudiés, ce qui justifierait une étude de plus large envergure pour mieux analyser ces données.

On remarque par ailleurs qu'aucun patient du groupe de risque intermédiaire ayant reçu des agents déméthylants à la suite à la chimiothérapie n'a rechuté.

Nous souhaitons également comparer les analyses de MRD avant la greffe entre les patients au bénéfice d'une chimiothérapie sans agents déméthylants versus d'une chimiothérapie suivie d'agents déméthylants dans l'attente d'une allogreffe. Ceci n'a malheureusement pas été possible car les patients qui n'ont pas reçu d'agents déméthylants n'ont pas eu de contrôle de MRD juste avant la greffe, du moins dans notre base de données (peut-être que la MRD était effectuée dans un autre laboratoire des HUG)

On peut toutefois observer que les patients à haut risque ayant bénéficié d'agents déméthylants à l'issue de la chimiothérapie avaient globalement des MRD1 supérieures à celles des patients n'ayant bénéficié que de la chimiothérapie pour cette même catégorie. Concernant l'analyse du groupe de patients de risque intermédiaire il n'est pas possible de tirer de conclusions, leur nombre étant insuffisant.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Les buts de cette étude étaient de mettre en évidence la valeur prédictive de la MRD1 sur le devenir du patient et évaluer si cette dernière pouvait prédire une future rechute. Ce que l'on a pu observer est que la MRD1 est, de manière générale, plus élevée chez les patients classés dans les hauts risques par rapport aux risques intermédiaires, eux-mêmes présentant une MRD plus élevée par rapport aux catégories de risque favorable. Bien que la MRD1 puisse éventuellement aider à classer les patients dans les différentes catégories de risque, cette dernière ne permet toutefois pas toujours de prédire une rechute.

En effet, des patients sans rechute peuvent présenter une MRD1 élevée ou basse, tout comme les patients avec rechute peuvent présenter une réponse optimale ou médiocre à la première chimiothérapie d'induction. Néanmoins, la majorité des cas qui ont rechuté malgré une bonne réponse faisaient partie des catégories de mauvais pronostic. Au contraire, et à l'opposé de ce à quoi l'on pouvait s'attendre, plusieurs patients présentant une valeur élevée de MRD1, donc à priori une mauvaise réponse à la chimiothérapie d'induction, n'ont pas rechuté, et ce malgré leur classification dans les catégories de risque élevés.

La MRD n'est donc pas suffisante pour prédire le devenir du patient.

L'oncogénétique permet la stratification en fonction du risque pronostique et contribue à prédire le devenir du patient mais, comme la MRD, n'est pas suffisante à elle seule dans la prédiction de la réponse au traitement et la survie du patient. L'évaluation de la MRD et le bilan génétique sont tous deux nécessaires à l'attribution du patient à un groupe pronostique et à la stratification du traitement ainsi qu'au suivi de la maladie à plus long terme.

Par ailleurs dans la littérature on parle de seuil de maladie résiduelle MRD1 permettant de déterminer si une réponse à la chimiothérapie est optimale ou non. En effet, si, lors du contrôle de la MRD1, le pourcentage de blastes similaires au diagnostic représente moins de 0.1% de l'échantillon en cytométrie de flux, la maladie résiduelle est considérée comme négative et parle donc en faveur d'une bonne évolution pour le patient (prédictif de non rechute) (référence 14).

Dans notre étude, nous avons observé que le seuil de 0.1% était peut-être trop bas pour la MRD1. En effet, la majorité des patients considérés comme bons répondeurs et sans rechute avaient une médiane de MRD1 égale à 0.7-0.8% en cytométrie de flux, une médiane de MRD2 de 0.3% et de MRD3 à 0.08-0.1%. L'analyse de la MRD après le premier cycle d'induction se révèle donc être un bon facteur pronostic si on ne considère que cette valeur. S'il y a une divergence dans l'évaluation du pronostic entre l'analyse de la MRD en cytométrie de flux et l'oncogénétique (la cytogénétique ou la biologie moléculaire) au diagnostic, les anomalies génétiques doivent être considérées attentivement. En dépit d'une bonne réponse à la chimiothérapie avec une MRD dans la cible, une génétique défavorable peut avoir un impact de très mauvais pronostic sur la survie. Alternativement, une estimation du risque de rechute par la MRD est toujours intéressante et consiste un signal d'avertissement si la cible n'est pas atteinte après chaque cycle pour tous les patients quel que soit leur catégorie de risque pronostique. En cas de résultats insatisfaisants de la chimiothérapie avec persistance d'une MRD trop élevée, une adaptation du traitement est nécessaire et peut impliquer la prescription d'une chimiothérapie de sauvetage ou l'utilisation d'autres types d'agents comme des inhibiteurs de tyrosine kinase ou dans le futur une immunothérapie avec des anticorps monoclonaux de type BiTE ou encore une immunothérapie cellulaire (CAR-T cells) ou plus couramment, actuellement l'allogreffe apparentée, non apparentée ou haplo-identique.

Le deuxième objectif de notre étude évalue l'impact du traitement composé d'agents déméthylants chez les patients atteints de leucémie myéloïde aiguë de pronostics intermédiaire et défavorable dans

l'attente d'une allogreffe, en complément à la chimiothérapie. On retrouve dans la littérature un article (référence 4) qui évalue l'impact d'un traitement de 5-azacitidine avant une allogreffe chez des patients atteints de syndrome myélodysplasique. Il en ressort de bons résultats si le patient reçoit de la 5-azacitidine ou de la chimiothérapie avant la greffe, par contre les résultats sont moins bons lorsque le patient reçoit les 2 traitements combinés. Bien que sans potentiel curatif, les agents déméthylants sont une nouvelle approche thérapeutique permettant de prolonger la survie des patients avec SMD. Dans cette étude il a été démontré que la progression de la maladie pendant l'attente de la greffe était moindre chez les patients recevant de la 5-azacitidine en comparaison à ceux recevant de la chimiothérapie. La 5-azacitidine ou la décitabine en remplacement de la chimiothérapie intensive pourrait retarder la progression du syndrome myélodysplasique en attendant la greffe (15% vs 51%). Il a été démontré également que la survie était moins bonne chez les patients ayant reçu une chimiothérapie associée à la 5-azacitidine en comparaison à ceux ayant reçu l'un ou l'autre des traitements avant la greffe. Toutefois ceux ayant reçu les 2 types de traitement avaient une maladie plus résistante.

Dans notre étude nous nous sommes intéressés aux patients atteints de LMA et avons pu constater, tout comme l'étude précitée, que les agents déméthylants sont utiles pour maintenir une MRD basse avant l'allogreffe. Néanmoins, la chimiothérapie était nécessaire pour atteindre ce résultat. Nous avons dû éliminer de notre étude les patients n'ayant reçu que des agents déméthylants car ces derniers montraient des résultats totalement différents des patients ayant reçu de la chimiothérapie. Ces 2 catégories de patients étaient totalement différentes de par leur âge, leur fragilité et les traitements reçus. De plus, très peu de données étaient analysables, le nombre de patients chez qui un suivi de la MRD était disponible sous traitement d'agents déméthylants seuls étant insuffisant.

Les agents déméthylants contribuent donc au maintien de la réponse à la chimiothérapie dans l'attente de la greffe, en particulier chez les patients de risque défavorable.

Le nombre de cycles de traitements épigénétiques dans notre étude a varié de 1 à 26 cures, en moyenne 5,5 cures par patient.

Un autre article (référence 7) a étudié l'efficacité d'un traitement de 5-azacitidine chez les patients atteints de SMD high risk et LMA avec dysplasie multilignée. L'analyse a été effectuée uniquement sur les patients atteignant une rémission complète après la chimiothérapie d'induction. Seuls 40% des patients de cette étude ont donc bénéficié de la 5-azacitidine s.c comme agent de maintenance. Il est à noter que cette étude a été effectuée uniquement chez des patients non éligibles à la greffe. Il a été comparé l'évolution de la survie entre un traitement de 5-azacitidine et une chimiothérapie de consolidation. Il semblerait que, selon les auteurs, la 5-azacitidine puisse retarder la rechute ou la transformation en LMA chez les patients atteints de SMD mais n'empêche pas la rechute. Cette étude a également analysé le statut de méthylation de certains gènes afin d'évaluer leur évolution sous traitement déméthylant et analyser la prédiction de la réponse aux agents déméthylant en fonction du statut de méthylation. Il en est ressorti que l'on ne peut pas prédire une réponse aux agents déméthylants en fonction du statut de méthylation des 3 gènes analysés (CDKN2B, CDH1 et H1C1). Autrement dit, on ne peut pas utiliser le statut de méthylation de ces gènes pour sélectionner des patients potentiellement répondeurs à ce traitement. Toutefois il semblerait que les patients présentant une trisomie 8 répondraient mieux à la chimiothérapie ou aux agents déméthylants et pourraient même atteindre plus fréquemment une rémission complète avec ces derniers.

Dans notre étude, le nombre de patients inclus est relativement restreint et les conclusions préliminaires nécessitent une confirmation par une étude de plus large envergure. Il pourrait être intéressant d'étendre ces analyses à une étude prospective multicentrique. La valeur pronostique de

la MRD1 vs MRD2 est actuellement à l'étude dans plusieurs études multicentriques internationales dont l'étude HOVON132. L'inclusion d'un nombre supérieur de patients permet une analyse plus fiable et évite le biais de sélection observé dans notre étude avec un nombre plus élevé de patients de mauvais voire très mauvais pronostic dans le groupe des leucémies traitées par chimiothérapie intensive suivie d'agents déméthylants. Toutefois, une étude prospective n'est pas simple à réaliser. D'une part en l'absence de standardisation de la mesure de la MRD, une étude prospective nécessite que l'analyse de la MRD soit centralisée. D'autre part, les critères d'inclusion d'une étude prospective excluent souvent beaucoup de patients qui sont traités hors étude. Une telle sélection entraîne aussi des biais dans une étude prospective.

Notre étude a été effectuée avec des patients provenant d'un seul centre, elle représente la réalité du terrain, « real life », dans le centre concerné.

## REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier chaleureusement le Professeur Spertini qui m'a suivi tout au long de ce travail, pour sa disponibilité ainsi que le laboratoire des moelles qui m'a donné la possibilité d'accéder en tout temps à leur poste de travail pour la recherche des données.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1) Bumber, Y., H. Kantarjian, J. Jorgensen, S. Wen, S. Faderl, R. Castoro, J. Autry, et al. "A Randomized Study of Decitabine versus Conventional Care for Maintenance Therapy in Patients with Acute Myeloid Leukemia in Complete Remission." *Leukemia* 26, no. 11 (November 2012): 2428–31. doi:10.1038/leu.2012.153.
- 2) Buccisano, Francesco, Luca Maurillo, Maria Ilaria Del Principe, Giovanni Del Poeta, Giuseppe Sconocchia, Francesco Lo-Coco, William Arcese, Sergio Amadori, and Adriano Venditti. "Prognostic and Therapeutic Implications of Minimal Residual Disease Detection in Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 119, no. 2 (January 12, 2012): 332–41. doi:10.1182/blood-2011-08-363291.
- 3) Conway O'Brien, Emma, Steven Prideaux, and Timothy Chevassut. "The Epigenetic Landscape of Acute Myeloid Leukemia." *Advances in Hematology* 2014 (2014): 103175. doi:10.1155/2014/103175.
- 4) Damaj, Gandhi, Alain Duhamel, Marie Robin, Yves Beguin, Mauricette Michallet, Mohamad Mohty, Stephane Vigouroux, et al. "Impact of Azacitidine before Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Myelodysplastic Syndromes: A Study by the Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie-Cellulaire and the Groupe-Francophone Des Myélodysplasies." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30, no. 36 (December 20, 2012): 4533–40. doi:10.1200/JCO.2012.44.3499.
- 5) Estey, E. H. "Epigenetics in Clinical Practice: The Examples of Azacitidine and Decitabine in Myelodysplasia and Acute Myeloid Leukemia." *Leukemia* 27, no. 9 (September 2013): 1803–12. doi:10.1038/leu.2013.173.
- 6) Freireich, Emil J., Peter H. Wiernik, and David P. Steensma. "The Leukemias: A Half-Century of Discovery." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 32, no. 31 (November 1, 2014): 3463–69. doi:10.1200/JCO.2014.57.1034.

- 7) Grövdal, Michael, Mohsen Karimi, Rasheed Khan, Anni Aggerholm, Petar Antunovic, Jan Astermark, Per Bernell, et al. "Maintenance Treatment with Azacytidine for Patients with High-Risk Myelodysplastic Syndromes (MDS) or Acute Myeloid Leukaemia Following MDS in Complete Remission after Induction Chemotherapy." *British Journal of Haematology* 150, no. 3 (August 2010): 293–302. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08235.x.
- 8) Kihara, R., Y. Nagata, H. Kiyoi, T. Kato, E. Yamamoto, K. Suzuki, F. Chen, et al. "Comprehensive Analysis of Genetic Alterations and Their Prognostic Impacts in Adult Acute Myeloid Leukemia Patients." *Leukemia* 28, no. 8 (August 2014): 1586–95. doi:10.1038/leu.2014.55.
- 9) Loken, Michael R., Todd A. Alonzo, Laura Pardo, Robert B. Gerbing, Susana C. Raimondi, Betsy A. Hirsch, Phoenix A. Ho, et al. "Residual Disease Detected by Multidimensional Flow Cytometry Signifies High Relapse Risk in Patients with de Novo Acute Myeloid Leukemia: A Report from Children's Oncology Group." *Blood* 120, no. 8 (August 23, 2012): 1581–88. doi:10.1182/blood-2012-02-408336.
- 10) Lübbert, Michael, Hartmut Bertz, Michael Josef Müller, and Jürgen Finke. "When Azanucleoside Treatment Can Be Curative: Nonintensive Bridging Strategy before Allografting in Older Patients with Myelodysplastic Syndrome/acute Myeloid Leukemia." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31, no. 6 (February 20, 2013): 822–23. doi:10.1200/JCO.2012.46.4222.
- 11) Meldi, Kristen M., and Maria E. Figueroa. "Epigenetic Deregulation in Myeloid Malignancies." *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 165, no. 1 (January 2015): 102–14. doi:10.1016/j.trsl.2014.04.012.
- 12) Middeke, Jan M., Dietrich Beelen, Michael Stadler, Gudrun Göhring, Brigitte Schlegelberger, Herrad Baumann, Gesine Bug, et al. "Outcome of High-Risk Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Negative Impact of abn1(17p) and -5/5q-." *Blood* 120, no. 12 (September 20, 2012): 2521–28. doi:10.1182/blood-2012-03-417972.
- 13) Scholz, Bastian, and Rolf Marschalek. "Epigenetics and Blood Disorders." *British Journal of Haematology* 158, no. 3 (August 2012): 307–22. doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09193.x.
- 14) Terwijn, Monique, Wim L. J. van Putten, Angèle Kelder, Vincent H. J. van der Velden, Rik A. Brooimans, Thomas Pabst, Johan Maertens, et al. "High Prognostic Impact of Flow Cytometric Minimal Residual Disease Detection in Acute Myeloid Leukemia: Data from the HOVON/SAKK AML 42A Study." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31, no. 31 (November 1, 2013): 3889–97. doi:10.1200/JCO.2012.45.9628.
- 15) Thépot, Sylvain, Raphael Itzykson, Valerie Seegers, Christian Recher, Emmanuel Raffoux, Bruno Quesnel, Jacques Delaunay, et al. "Azacytidine in Untreated Acute Myeloid Leukemia: A Report on 149 Patients." *American Journal of Hematology* 89, no. 4 (April 2014): 410–16. doi:10.1002/ajh.23654.
- 16) Walter, Roland B., Ted A. Gooley, Brent L. Wood, Filippo Milano, Min Fang, Mohamed L. Sorror, Elihu H. Estey, et al. "Impact of Pretransplantation Minimal Residual Disease, as Detected by Multiparametric Flow Cytometry, on Outcome of Myeloablative Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, no. 9 (March 20, 2011): 1190–97. doi:10.1200/JCO.2010.31.8121.
- 17) "Diagnostic et Traitement de La Leucémie Myéloïde Aiguë - Fms-01414.pdf." Accessed August 13, 2015. <http://www.medicalforum.ch/docs/smf/2013/06/fr/fms-01414.pdf>.
- 18) <http://hematocell.univ-angers.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/64-enseignement-de-lhematologie-cellulaire-les-principales-maladies-hematologiques/classification-oms-2008-des-maladies-hematologiques-malignes/62-classification-oms-des-leucemies-aigues-myeloides>
- 19) [https://www.google.ch/search?q=classification+ELN&client=opera&hs=50D&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKewikhiCYi-HLAhVMlCwKHfvGCmwQ\\_AUIBygB&biw=895&bih=416](https://www.google.ch/search?q=classification+ELN&client=opera&hs=50D&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKewikhiCYi-HLAhVMlCwKHfvGCmwQ_AUIBygB&biw=895&bih=416)