



**HAL**  
open science

**Impact pronostique de la maladie résiduelle par  
quantification des mutations d'IDH1/2 par PCR digitale  
dans les leucémies aiguës myéloïdes incluses dans les  
protocoles alfa-0701 et 0702**

Yann Ferret

► **To cite this version:**

Yann Ferret. Impact pronostique de la maladie résiduelle par quantification des mutations d'IDH1/2 par PCR digitale dans les leucémies aiguës myéloïdes incluses dans les protocoles alfa-0701 et 0702. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01401995

**HAL Id: dumas-01401995**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01401995>**

Submitted on 24 Nov 2016

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

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

**Université de Picardie Jules Verne**  
**U.F.R. DE PHARMACIE**  
Année Universitaire 2015/2016

**MEMOIRE**  
**POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 29 juin 2016**  
**Par M. Yann FERRET**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990**  
**tient lieu de**

**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

-----

**IMPACT PRONOSTIQUE DE LA MALADIE RESIDUELLE PAR QUANTIFICATION DES**  
**MUTATIONS D'*IDH1/2* PAR PCR DIGITALE DANS LES LEUCEMIES AIGUES**  
**MYELOÏDES INCLUSES DANS LES PROTOCOLES ALFA-0701 ET 0702**

-----

**Membres du jury :**

**Président :** Professeur Saïd Kamel, CHU Amiens

**Assesseur(s) :** Professeur Claude Preudhomme, CHRU Lille  
Professeur Jean-Pierre Marolleau, CHU Amiens  
Docteur Aline Renneville, CHRU Lille

**Mémoire n° : 3144**



**Université de Picardie Jules Verne**  
**U.F.R. DE PHARMACIE**  
Année Universitaire 2015/2016

**MEMOIRE**  
**POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 29 juin 2016**  
**Par M. Yann FERRET**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990**  
**tient lieu de**

**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

-----

**IMPACT PRONOSTIQUE DE LA MALADIE RESIDUELLE PAR QUANTIFICATION DES**  
**MUTATIONS D'*IDH1/2* PAR PCR DIGITALE DANS LES LEUCEMIES AIGUES**  
**MYELOÏDES INCLUSES DANS LES PROTOCOLES ALFA-0701 ET 0702**

-----

**Membres du jury :**

**Président :** Professeur Saïd Kamel, CHU Amiens

**Assesseur(s) :** Professeur Claude Preudhomme, CHRU Lille

Professeur Jean-Pierre Marolleau, CHU Amiens

Docteur Aline Renneville, CHRU Lille

**Mémoire n° : 3144**

## Remerciements

### A mon président de thèse:

**Monsieur le Professeur Saïd Kamel**

*Professeur des Universités – Praticien hospitalier*

*Laboratoire de Biochimie*

*Centre Hospitalo-Universitaire d'Amiens*

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de remplacer Monsieur le Professeur Gilles Duverlie au pied levé et de présider cette thèse. Je salue votre disponibilité et votre professionnalisme. Soyez assuré de mon profond respect.

### A mes juges:

**Monsieur le Professeur Jean-Pierre Marolleau**

*Professeur des Universités – Praticien hospitalier*

*Chef du service d'hématologie clinique et thérapie cellulaire*

*Centre Hospitalo-Universitaire d'Amiens*

Pour avoir accepté de juger ce travail et plus largement pour tout ce que vous faites pour développer l'hématologie en Picardie. Veuillez trouver ici l'expression de mes sentiments les plus sincères.

**Madame le Docteur Aline Renneville**

*Praticien Hospitalier*

*Laboratoire d'Hématologie – Secteur Biologie Moléculaire*

*Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille*

Pour tous vos conseils et pour m'avoir fait l'honneur de corriger mon manuscrit. Merci pour votre grande disponibilité, votre efficacité et votre esprit scientifique. Soyez assurée de toute ma gratitude.

### A mon directeur de thèse:

**Monsieur le Professeur Claude Preudhomme**

*Professeur des Universités – Praticien hospitalier*

*Chef de service du laboratoire d'hématologie cellulaire*

*Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille*

Pour m'avoir fait l'honneur et le plaisir de me confier et d'encadrer ce beau projet. La confiance et la bienveillance que vous accordez à vos étudiants sont un grand moteur. J'ai un profond respect pour votre œuvre scientifique et votre humanité.

### **Je tiens également à remercier :**

Monsieur le Professeur Gilles Duverlie : vous m'aviez fait l'honneur d'accepter de présider ma thèse, les événements en auront décidé autrement. Je ne vous en suis pas moins reconnaissant pour votre soutien. Soyez assuré de mes sentiments les meilleurs.

### **Aux personnes qui ont participé à ce projet :**

Monsieur le Professeur Nicolas Boissel pour l'analyse statistique. Merci pour votre temps et vos explications précieuses. Soyez assuré de ma gratitude et de mon respect.

Nathalie Hélevaut pour l'expertise technique : pour tout ce que tu m'as appris, ta patience, ton petit caractère et ton grand cœur, et toutes ces petites aventures (mésaventures ?) vécues ensemble.

Sandrine Geffroy et Alice Marceau pour la production et l'interprétation des données mutationnelles en NGS, Karine Celli-Lebras et Cécile Frimat pour les données protocolaires, Olivier Nibourel pour l'extraction de données et ses connaissances en gestion de bases de données, Jordan Madic et Joel Paronnaud pour leur expertise en PCR digitale. Clotilde Descarpentries pour ses connaissances en recherche d'événement rare. Martin Figeac pour son expertise en biologie moléculaire. Les médecins et les biologistes du groupe ALFA.

### **Plus largement, au laboratoire d'hématologie du CHRU de Lille:**

Nathalie Grardel et Nicolas Duployez : si ce laboratoire était une famille, alors j'ai eu un grand frère et une tata (parce qu'on a qu'une maman).

Aurélie Venet, Pauline Grave, Shéhérazade Sebda, Maxime Bucci pour les bons moments passés dans ce sacré bureau.

Tous les biologistes, ingénieurs, bio-informaticiens et techniciens.

Il n'est probablement pas tant de laboratoires où la science et l'humain se servent si bien l'un l'autre.

**A toutes les personnes qui m'ont appris et continuent tous les jours de m'apprendre mon métier.**

**A tous mes co-internes, tout de même, c'était bien !**

**A tous mes amis**

Je ne pourrai pas tous vous citer alors lâchement je ne ferai pas de jaloux. Vous vous reconnaissez alors, Amis, comptez vous!

**A ma famille :**

La nouvelle, celle que j'ai gagnée, je suis un garçon chanceux. William, Emmanuel et les deux petits monstres, Alice, Faustin, Mélanie et Agassou !

Mes grandes sœurs Marielle et Laurie, il est loin notre jardin, notre grenier, notre prunier, elle est loin notre terrasse brûlante, ils sont loin nos jeux d'enfants. Je trouve qu'on s'en sort bien. Je vous aime tendrement.

Mes sacrés parents, des comme vous ça vous forge un caractère. Papa, on ne le dit pas tant, mais finalement je te ressemble assez (ce qui ne manquera pas d'inquiéter Maman). Maman, je ferai une autre thèse sur toi, tu n'apprendras pas grand-chose, mais il faut que le monde sache! Je vous aime très fort.

Ma Déborah, je ne pourrais évidemment pas conclure ces remerciements sans rendre hommage à cette patience dont tu m'as fait cadeau ces deux dernières années. Cette thèse te doit beaucoup. Drôle de vie qu'on a choisie, tu me la rends délicieuse. Les beaux jours reviennent, allons vivre toutes les autres !

## Liste des abréviations

1D: Une Dimension  
2D: Deux Dimensions  
5-HMC: 5-HydroxyMéthylCytosines  
5-MC: 5-MéthylCytosines  
Acétyl-CoA: Acétyl-Coenzyme A  
AF: Abondance Fractionnelle  
ALFA: Acute Leukemia French Association  
ATO: TriOxyde d'Arsenic  
ATRA: Acide tout-trans rétinolique  
BER: Base Excision Repair  
BOM: Biopsie Ostéo-Médullaire  
CD: Cluster de Différenciation  
CEBPA: CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha  
CGH: Hybridation Génomique Comparative  
CLARA: Clofarabine et Cytarabine à dose intermédiaire  
CMF: CytoMétrie en Flux  
co: cut off  
C-P4H: Collagen Prolyl 4-Hydroxylase  
CpG: îlots Cytosine-Guanine  
CSH: Cellule Souche Hématopoïétique  
CSL: Cellule Souche Leucémique  
D-2HG: D-2-HydroxyGlutarate  
DFS: Survie sans maladie  
DLI: Transfusion de lymphocytes du donneur  
dm: double muté  
DNMT: DNA MethylTransferase  
ELN: European Leukemia Net  
FAB: French American British  
FC: Facteurs de Croissance  
FDA: Food and Drug Administration  
FDH: Fumarate DésHydrogénase  
FISH: Fluorescence In Situ Hybridization  
FLAG-Ida: Fludarabine, Cytarabine, G-CSF et Idarubicine  
FLT3: Fms-Like related Tyrosine Kinase 3  
G/L: Giga/Litre  
G-CSF: Granulocyte Colony-Stimulating Factor  
GO: Gemtuzumab Ozogamicine  
HiDAC: Cytarabine haute dose  
HIF: Hypoxia Inducible Factor  
HIF-PHD: Hypoxia Inducible Factor-Prolyl Hydroxylase Domain  
HR: Hazard Ratio  
IC 95%: Intervalle de Confiance à 95%  
ICT: Chimiothérapie Intensive  
IDAC: Cytarabine dose standard  
IDH: Isocitrate Déshydrogénase  
ITD: Duplication Interne en Tandem  
KMT2A: K-specific MethylTransferase A  
LA: Leucémie Aigue  
LAIP: Immunophénotypes Aberrants Associés à la Leucémie  
LAL: Leucémie Aigue Lymphoblastique  
LAM: Leucémie Aigue Myéloïde  
LAM-CBF: LAM associées au Core Binding Factor



LAM-CN: LAM à Caryotype Normal  
LAM-MRC: LAM avec anomalies relatives aux myélodysplasies  
LAM-NOS: LAM sans autre spécification  
LAM-R/R: LAM en Rechute ou Réfractaire  
LAM-t: LAM induite par un traitement  
LAP: Leucémie Aigue Promyélocytaire  
LDAC: Cytarabine faible dose  
LDH: Lactate DésHydrogénase  
LOD: Seuil de détection  
LOQ: Seuil de quantification  
LT-HSC: Long Term Hematopoïetic Stem Cell  
m: muté  
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases  
MLL: Mixed-Lineage Leukemia  
MPO: MyéloPerOxydase  
MRD: Maladie résiduelle (Minimal Residual Disease)  
NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide  
NADP: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate  
NASDA: Naphtol-ASD-Acétate  
NCCN: National Comprehensive Cancer Network  
NGS: Séquençage de Nouvelle Génération  
NOD: Non Obese Diabetic  
NPM1: Nucléophosmin 1  
OMS: Organisation Mondiale de la Santé  
OS: Survie Globale  
p: p-value  
PCR: Réaction en Chaîne de la Polymérase  
PMIC: Phénotype Méthylé des Îlots CpG  
QPCR: Réaction en Chaîne de la Polymérase Quantitative  
RC: Rémission Complète  
RFS: Survie sans rechute  
RIC: Conditionnement d'intensité atténuée  
ROS: Reactive Oxygen Species  
RT: Rétro-Transcription  
RUNX1: Runt-Related Transcription Factor 1  
SCID: Severe Combined ImmunoDeficiency  
SDH: Succinate DésHydrogénase  
SL-IC: SCID Leukemia-Initiating Cells  
SMD: Syndromes MyéloDysplasique  
SMP: Syndrome MyéloProlifératif  
SNP: Single Nucleotide Polymorphism  
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription  
ST-HSC: Short Term Hematopoïetic Stem Cell  
TET: Tet Methylcytosine Dioxygenase  
TP53: Tumor Protein P53  
TRM: Mortalité Liée au Traitement  
wt: sauvage (wild type)  
WT1: Wilms Tumor 1  
 $\alpha$ -CG:  $\alpha$ -CétoGlutarate

## Table des matières

I.	Préambule .....	12
II.	Hématopoïèse et leucémogénèse.....	12
A.	Hématopoïèse .....	12
1.	Propriétés des CSH .....	12
2.	Régulation des CSH.....	14
3.	Le microenvironnement médullaire.....	15
B.	Hématopoïèse leucémique .....	15
1.	Notion de cellule souche leucémique ou CSL.....	15
2.	Mécanisme d'oncogénèse dans les LAM .....	16
C.	Leucémogénèse liée aux Isocitrate déshydrogénases .....	18
1.	Les isocitrate déshydrogénases et leur mutations : généralités .....	18
2.	La fonction néomorphique des IDH mutées .....	20
3.	L'oncogénèse liée au D-2HG.....	21
4.	Incidence des mutations d' <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i> dans les LAM .....	26
III.	Généralités sur les LAM.....	27
A.	Epidémiologie.....	28
B.	Etiologies .....	28
C.	Présentation clinique.....	29
D.	Présentation biologique .....	29
1.	Cytologie.....	29
2.	L'immunophénotypage .....	30
3.	La cytogénétique .....	30
4.	La biologie moléculaire.....	31
E.	Classifications des LAM .....	31
1.	Classification FAB.....	31
2.	Classification OMS.....	32
F.	Facteurs pronostiques.....	34
1.	Facteurs pronostiques liés au patient .....	34
2.	Facteurs pronostiques liés à la pathologie.....	34
3.	Facteurs pronostiques liés au traitement .....	39
4.	Facteurs pronostiques en situation de rechute .....	39
G.	Traitement des LAM.....	40
1.	Traitement d'induction .....	40
2.	Traitement post-rémission .....	41

3.	Thérapies ciblées et sous-groupes particuliers de LAM.....	42
4.	Patients âgés .....	46
5.	LAM réfractaires et en rechute .....	46
H.	MRD des LAM .....	46
1.	Généralités .....	46
2.	Techniques de mesure de la MRD.....	48
3.	Limites du suivi de la MRD .....	50
4.	MRD et attitude thérapeutique.....	50
5.	Les mutations d' <i>IDH1/2</i> en MRD.....	52
IV.	Objectifs .....	54
V.	Matériel et méthodes.....	54
A.	Patients.....	54
1.	Les protocoles Alfa 0701 et 0702 .....	54
B.	Méthodes .....	55
1.	Isolements cellulaires.....	55
2.	Extraction de l'ADN .....	55
3.	La PCR digitale .....	55
4.	Mise au point et optimisation du protocole de PCR digitale .....	62
5.	Réactifs et protocole .....	65
6.	Statistiques .....	67
VI.	Résultats.....	67
A.	Patients inclus.....	67
B.	Performances de la PCR digitale.....	71
1.	Qualité des tests.....	71
2.	Limites de détection et de quantification .....	71
C.	Prélèvements au diagnostic .....	71
D.	Données générales de survie .....	71
E.	Impact pronostique de la MRD <i>IDH1/2</i> en fin d'induction.....	74
1.	Recherche des meilleurs seuils décisionnels.....	74
2.	OS et DFS censurées à la greffe et ajustées sur le protocole, par niveau de réponse moléculaire et type de mutation d' <i>IDH1/2</i> .....	75
3.	Impact pronostique des autres variables et analyse multivariée .....	79
4.	Analyse temps-dépendante de la DFS.....	80
F.	Courbes de suivi de la MRD.....	81
VII.	Discussion .....	83
A.	Performances de la PCR digitale.....	83

B.	Profil génétique des LAM incluses.....	84
C.	Survie.....	85
1.	En fonction de la mutation.....	85
2.	En fonction de la réponse moléculaire.....	85
D.	MRD élevée en RC.....	86
E.	Limites .....	87
VIII.	Conclusion .....	87
IX.	Bibliographie.....	89

## I. Préambule

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par la prolifération incontrôlée de cellules myéloïdes immatures dont la différenciation est bloquée. Elles touchent majoritairement le sujet âgé. Le traitement repose essentiellement sur la chimiothérapie, éventuellement complétée d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) en fonction du pronostic de la maladie et de la capacité du patient à en supporter la toxicité. Si la guérison est possible dans 30 à 50% des cas, les taux et durées de rémission sont très disparates. Le classement des patients en groupes de pronostic conditionnant leur prise en charge est indispensable. Il intègre des facteurs pronostiques liés au patient et à la pathologie. La réponse au traitement évaluée par la mesure de la maladie résiduelle (MRD) en cours de traitement est un facteur pronostique de choix. Les marqueurs de MRD validés ne sont pas présents dans toutes les LAM et leur qualité varie. En développer de nouveaux est une problématique actuelle.

## II. Hématopoïèse et leucémogénèse

### A. Hématopoïèse

Les éléments figurés du sang c'est-à-dire les hématies, les polynucléaires, les lymphocytes, les monocytes et les plaquettes sont incapables de proliférer. Ils sont pourtant consommés à raison de  $10^{12}$  cellules par jour, une vitesse qui varie au cours d'événements pathologiques (hémorragies, infections...).

Le processus physiologique hiérarchisé qui permet l'homéostasie sanguine de ces éléments figurés, autrement dit leur renouvellement continu et régulé est appelé hématopoïèse.

Ce système est constitué d'étapes successives de différenciation et d'expansion cellulaire à partir d'un petit contingent de cellules multipotentes résidentes de la moelle osseuse qui en assure la pérennité : les cellules souches hématopoïétiques.

#### 1. Propriétés des CSH

Les CSH possèdent trois propriétés fondamentales :

-L'auto-renouvellement : capacité de se diviser à l'identique sans se différencier, de façon à maintenir et amplifier le pool de CSH.

-La multipotence ou potentiel de différenciation multi-lignées : capacité à se différencier en n'importe quelle cellule mature du sang.

-La capacité de reconstitution in vivo d'une hématopoïèse myéloïde et lymphoïde après injection à des souris immunodéficientes SCID ou NOD-SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency ou Non Obese Diabetic-Severe Combined ImmunoDeficiency )

D'autres propriétés leur sont particulières : la capacité à rester longtemps en quiescence mitotique (phase G0 du cycle cellulaire), la forte expression de l'aldéhyde déshydrogénase 1 qui confère une grande résistance au stress et l'activité télomérase prévenant la sénescence cellulaire

Par division une CSH engendre deux cellules filles dont l'une lui est identique et l'autre est un progéniteur capable de se différencier et proliférer mais incapable de s'auto-renouveler.

Les CSH représentent 0,01 à 0,05% des cellules de la moelle osseuse, on distingue parmi elles trois compartiments, définis par des critères phénotypiques et de fonction biologique (**Tableau 1**):

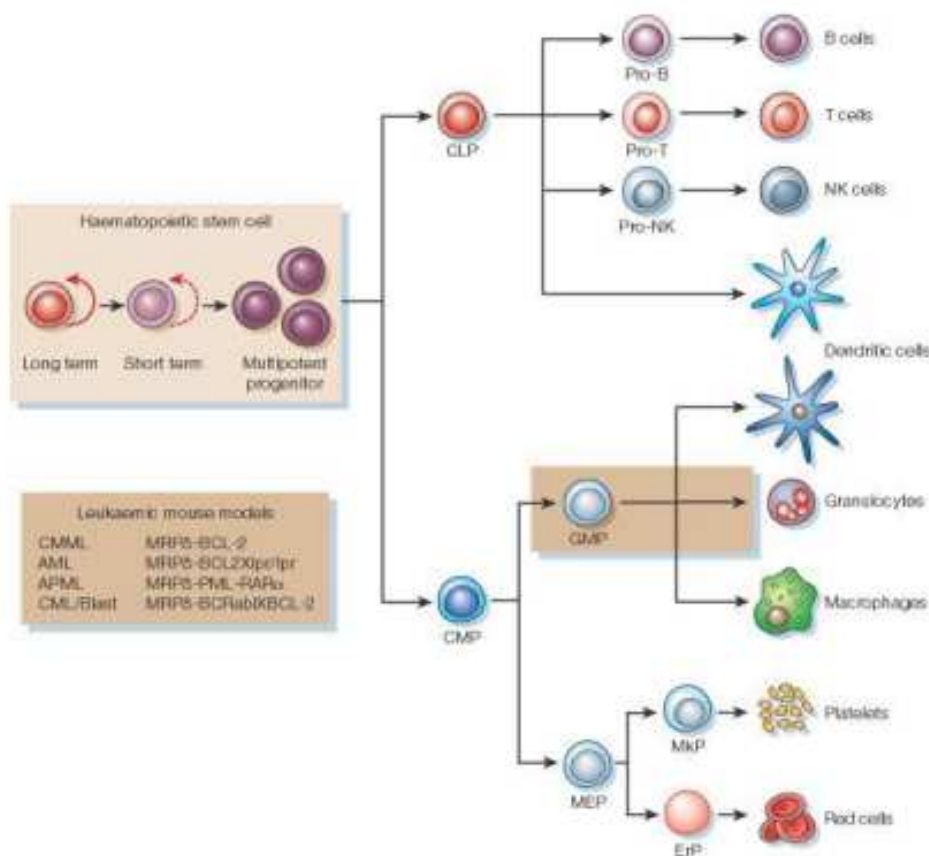
**Tableau 1 : Les compartiments de CSH et leurs propriétés**

Compartiment	Phénotype	Propriétés spécifiques
LT-HSC ou CSH de renouvellement à long terme	CD34+ CD38- CD90+ CD33- HLA-DR- KIT+ CD123+ Rho-123+	Auto-renouvellement illimité, toute la vie durant, ce sont elles qui pérennisent l'hématopoïèse
ST-HSC ou CSH avec renouvellement à court terme	Non décrit	Capacité de reconstitution d'une hématopoïèse pendant une durée limitée, environ 8 semaines
Progéniteurs multipotents	Pour les plus tardifs : -Progéniteur myéloïde commun CD34+ CD38+ HLA-DR+ CD33+ -Progéniteur lymphoïde commun CD34+ CD38+ HLA-DR+	Plus d'auto-renouvellement, prolifération et différenciation

La différenciation se poursuit ensuite en précurseurs (morphologiquement discernables), puis enfin en cellules matures fonctionnelles non ou peu proliférantes, incapables d'auto-renouvellement.

Les cellules matures représentent 99% des cellules médullaires.

Si l'organisation générale des lignées est connue (**Figure 1**), son arborescence précise semble complexe et les interconnexions possibles sont encore soumises à controverse en 2016.



**Figure 1 : Organisation générale des lignées de l'hématopoïèse (1)**

## 2. Régulation des CSH

### a) *Rôle des facteurs de croissance (FC) et des cytokines:*

FC et cytokines régulent de façon négative ou positive la prolifération, la différenciation ou la survie des cellules hématopoiétiques.

On distingue trois classes :

-Les FC « synergiques » : notamment les SCF, le LIF, le ligand de FLT3, l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-11. Ces FC provoquent l'entrée en cycle d'une fraction des CSH, et les sensibilisent aux autres FC en induisant l'expression de récepteurs membranaires.

-Les FC « multipotents » tels que l'IL-3 ou le GM-CSF pour les progéniteurs myéloïdes ou l'IL-7 pour les progéniteurs lymphoïdes, agissent à la fois sur les CSH et les progéniteurs en cycle et stimulent survie, prolifération et différenciation.

-Les FC « restreints » comme le G-CSF (granulocytes), M-CSF (monocytes et macrophages), l'érythropoïétine (érythrocytes), la thrombopoïétine (lignée mégacaryocytaire) ou l'IL-5 agissent sur la différenciation terminale des progéniteurs engagés dans une lignée particulière et sont également nécessaires à la maturation.

Les FC et les cytokines induisent l'activation de diverses voies de signalisation intracellulaires qui vont agir sur le cycle cellulaire, la différenciation ou encore l'apoptose (au rang desquelles notamment, les voies des Mitogen-Activated Protein Kinases ou MAPK, Signal Transducer and Activator of Transcription ou STAT, Phosphoinositides-3 Kinases ou PI3K).

Certains FC comme le TGF- $\beta$ , l'IFN- $\gamma$  ou le TNF- $\alpha$  régulent de façon négative l'hématopoïèse dans certaines situations pathologiques ou physiologiques (2).

Ce sont les combinaisons de FT et le fait qu'ils soient exprimés à des stades de différenciation particuliers qui permet de diriger les cellules vers une lignée spécifique, en orientant la réponse cellulaire en termes d'auto-renouvellement, de différenciation, de prolifération, d'apoptose, de sénescence, de migration ou encore d'adhésion (Figure 2) (3).

La régulation spécifique de l'auto-renouvellement mobilise entre autres les voies Wnt, Notch et Hedgehog ainsi que des facteurs de transcription (FT) de la famille HOX (notamment HoxB4) (1,4).

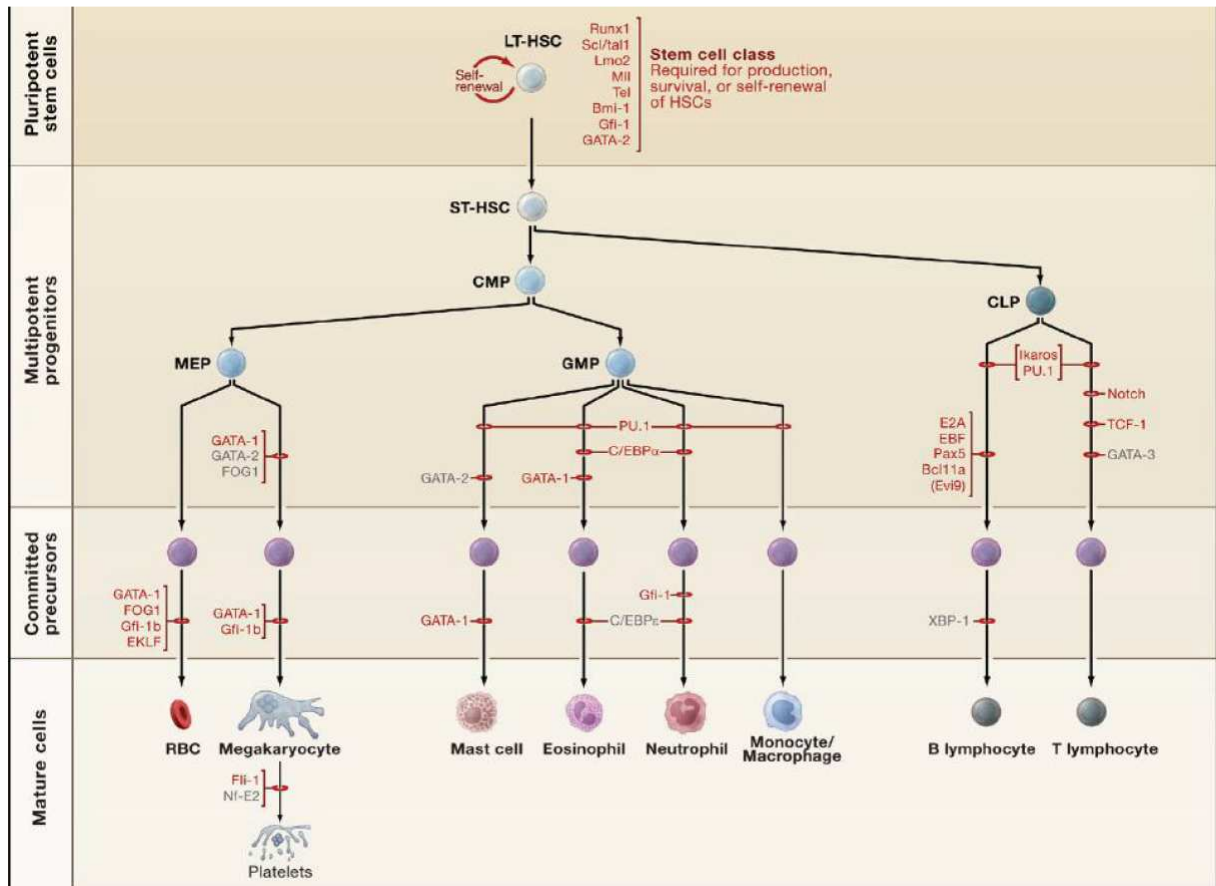


Figure 2 : Rôle des facteurs de transcription au cours de l'hématopoïèse physiologique chez les Mammifères (5)

### 3. Le microenvironnement médullaire

Le microenvironnement médullaire est défini comme l'ensemble des constituants non hématopoïétiques de la moelle (excepté les macrophages) participant au contrôle de l'hématopoïèse in situ.

Il se compose de différents éléments cellulaires (cellules stromales, ostéoblastes, adipocytes, CSH), de molécules solubles (FC et/ou chimiokines principalement sécrétées par les cellules stromales) et de molécules insolubles (protéines et enzymes de la matrice extracellulaire, molécules d'adhésion), organisés en une structure tridimensionnelle complexe (6).

Situé au niveau de l'endostéum, le microenvironnement ou « niche hématopoïétique » permet une régulation spatio-temporelle du nombre et de la fonction des CSH. Les interactions entre les CSH et les cellules micro-environnementales sont indispensables et sont médiées à la fois par des produits sécrétés et par des contacts intercellulaires.

## B. Hématopoïèse leucémique

### 1. Notion de cellule souche leucémique ou CSL

La mise en évidence de l'existence des CSL a été apportée par des travaux de l'équipe de John Dick sur des modèles murins. La transplantation de cellules primaires de LAM dans des souris immunodéficientes SCID (7) ou NOD-SCID (8) a permis de démontrer que seule une fraction minoritaire de cellules, les SL-IC (SCID Leukemia-Initiating Cells), est susceptible d'initier une LAM et de maintenir la croissance du clone leucémique à long terme in vivo. En plus de leur capacité à se



différencier et proliférer, les SL-IC possèdent un fort potentiel d'auto-renouvellement. Ces cellules SL-IC seraient essentiellement présentes dans la fraction cellulaire CD34+ CD38-. (8)

L'hématopoïèse leucémique se développe en parallèle de l'hématopoïèse normale. Elle conserve des caractéristiques comparables à cette dernière, entre autres sur le plan de la résistance à l'apoptose induite par les agents de chimiothérapie. Cette haute résistance résulte de la propension à la quiescence, et de l'expression de plusieurs gènes de multi-résistance aux drogues comme la P-glycoprotéine, MRP1 ou LRP. (9)

Les thérapeutiques actuelles restent ainsi peu efficaces sur le compartiment souche responsable des rechutes. Un des objectifs majeurs de la cancérologie moderne est une meilleure caractérisation et une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régulant les CSL, afin de mettre en place des thérapeutiques susceptibles d'éradiquer définitivement ce pool minoritaire de cellules.

## **2. Mécanisme d'oncogenèse dans les LAM**

### **a) Evènements oncogéniques**

L'étude des mécanismes moléculaires aboutissant au phénotype leucémique a permis de mettre en évidence un processus en plusieurs étapes, nécessitant la collaboration d'au moins deux évènements oncogéniques mutationnels.

Une mutation qui confère un avantage sélectif à une cellule est appelée mutation «driver». A l'inverse une mutation ne possédant pas un tel effet est dite «passenger». Cependant cette classification binaire des mutations dépend du contexte. Les sous-clones tumoraux sont en compétition entre eux et contre les cellules normales pour occuper l'espace et les ressources du microenvironnement tissulaire. Une modification de cet écosystème peut conférer un avantage sélectif à une mutation initialement «passenger» (par exemple une mutation de chimiorésistance). Jusqu'à maintenant c'est essentiellement la fréquence d'une mutation dans un ou des types de cancers qui a été utilisée pour apprécier le caractère «driver» d'une mutation (10). Ainsi une mutation survenant plus fréquemment que le hasard ne le voudrait est considérée comme «driver». Cette vision pourrait cependant être réductrice tant il est complexe de définir les déterminants du hasard. Par exemple de très grands gènes sont plus fréquemment mutés en vertu de leur longueur, d'autres peuvent l'être du fait de leur organisation chromatinienne (11).

Le nombre médian de mutations somatiques diffère d'un facteur supérieur à 1000 entre les différents types de cancers. Parmi eux les LAM possèdent l'un des plus faibles nombres de mutations par cas, bien qu'il y ait une grande hétérogénéité entre les individus (12).

Il est supposé qu'un cancer provoqué par des mutations survenant de façon aléatoire et donc rare (stochastique) devrait plutôt survenir après un faible nombre de mutations puissantes sur le plan oncogénique. A l'inverse un cancer rattaché à un contexte d'instabilité génétique pourrait évoluer par accumulation d'un grand nombre de mutations moins puissantes. La nature oncogénique des LAM serait ainsi plutôt stochastique (10).

En 2002, Gilliland et Griffin ont proposé le modèle «two-hit» de leucémogénèse (13). Dans ce modèle, deux lésions, chacune appartenant à une classe différente, coopèrent pour provoquer la LAM, aucune des deux n'étant suffisante à elle seule:

Les mutations de Classe I (récepteurs tyrosine kinase et signalisation) confèrent un avantage prolifératif et les mutations de classe II (facteurs de transcription) bloquent la différenciation et l'apoptose. L'événement initiateur serait de classe II et la mutation de classe I plus tardive.

Ce modèle a été un cadre conceptuel utile. Il est désormais dépassé : de nombreuses autres mutations géniques ont ensuite été identifiées, et de nouvelles catégories sont venues s'ajouter aux classes I et II.

La **Figure 3** décrit ces groupes.

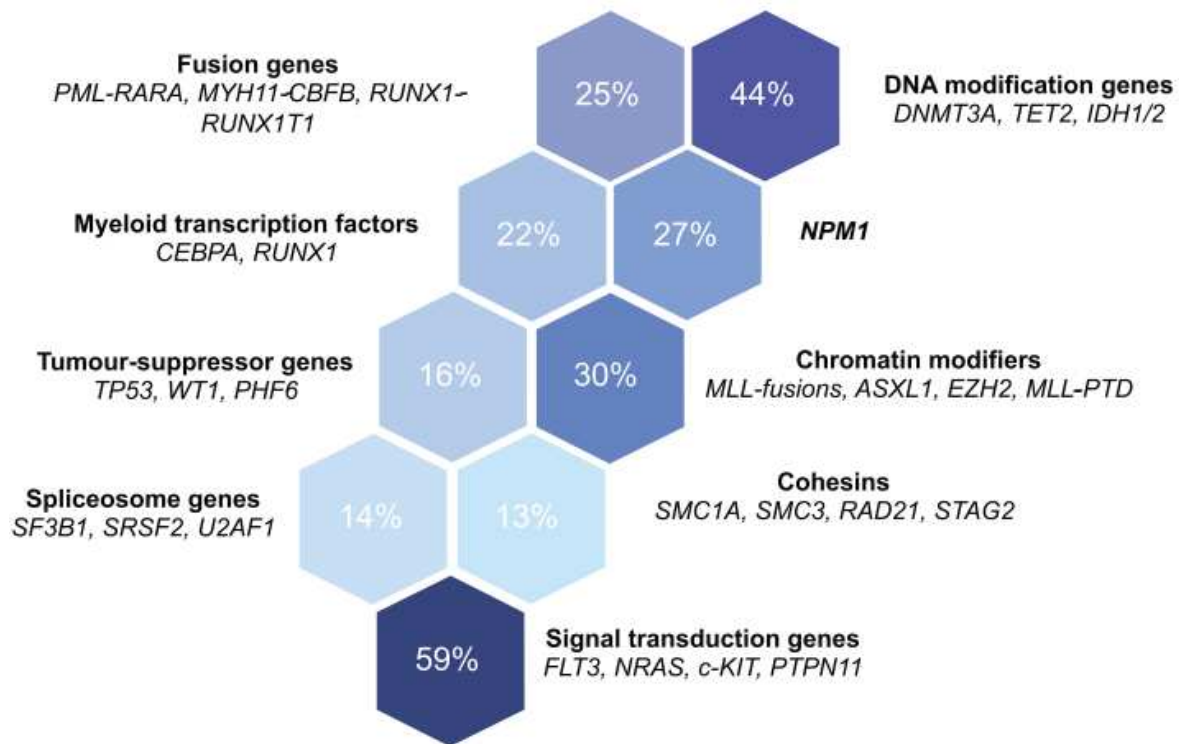


Figure 3 : Les principaux groupes de mutations récurrentes et leur fréquence dans les LAM de novo (10,12)

### b) Evolution et architecture clonale

L'évolution clonale peut être imaginée comme une succession de mutations «driver», où chaque nouveau clone se développe largement et domine le précédent. L'architecture clonale est alors dite linéaire (**Figure 4a**).

Les méthodes de séquençage haut débit ont néanmoins révélé que les LAM (mais aussi d'autres cancers) ont une architecture clonale plus complexe où la diversité et la domination relative des sous-clones varie au cours de la maladie (14), définissant un modèle d'architecture complexe ramifiée (**Figure 4b**).

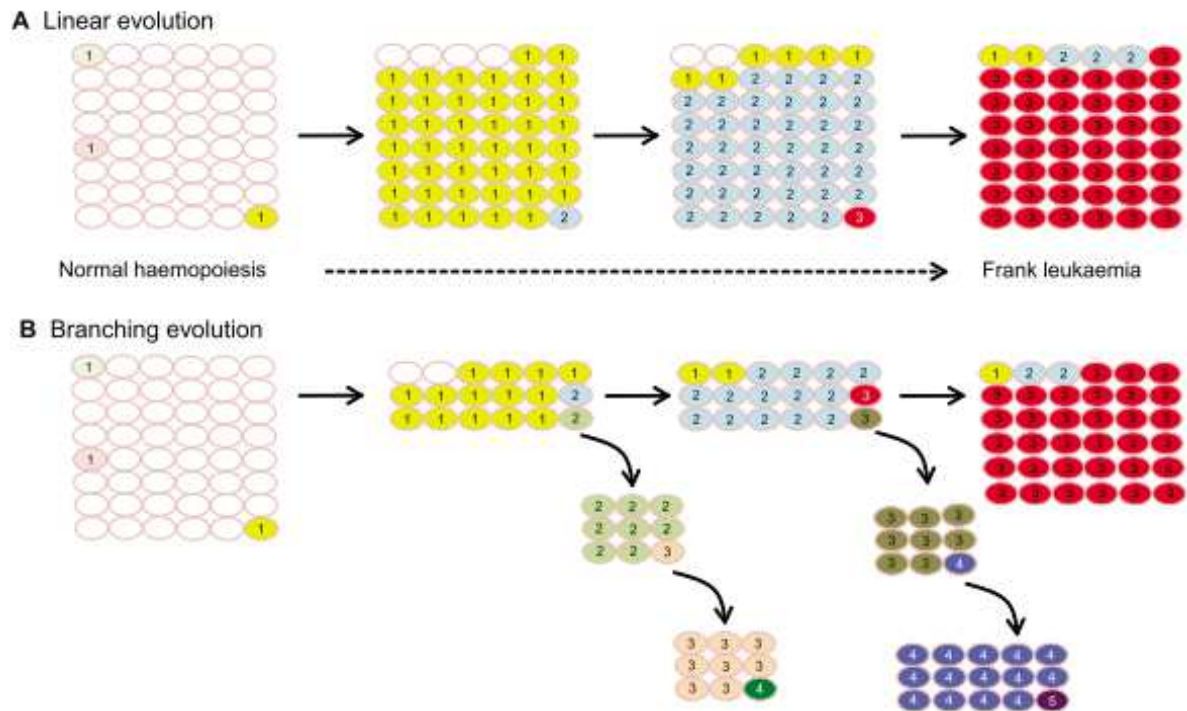


Figure 4 : Evolution linéaire ou ramifiée. Les nombres indiquent le nombre de mutations dans les cellules. Les cellules portant les mêmes mutations sont représentées de la même couleur (10)

## C. Leucémogénèse liée aux Isocitrate déshydrogénases

### 1. Les isocitrate déshydrogénases et leur mutations : généralités

La famille des IDH (Isocitrate Déshydrogénase) se compose chez l’Homme de trois membres homologues : IDH1, IDH2 et IDH3. Ces enzymes catalysent la décarboxylation oxydative

de l’isocitrate en  $\alpha$ -cétoglutarate ( $\alpha$ -CG), aussi appelé 2-oxoglutarate. IDH1 et IDH2 utilisent le NADP comme co-substrat (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate), le transformant en NADPH, tandis qu’IDH3 utilise le NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide). La localisation est cytosolique et péroxisomale pour IDH1, mitochondriale pour IDH2 et IDH3, ces deux derniers participant au cycle de Krebs (Figure 5).

IDH3 possède des propriétés de régulation allostérique permettant la régulation du cycle de Krebs.

Les deux autres isoformes, celles d’intérêt en oncologie, sont impliquées dans d’autres contextes : métabolisme et « glucose-sensing » (IDH1) et régulation de la respiration oxydative (IDH 2) (15)(16).

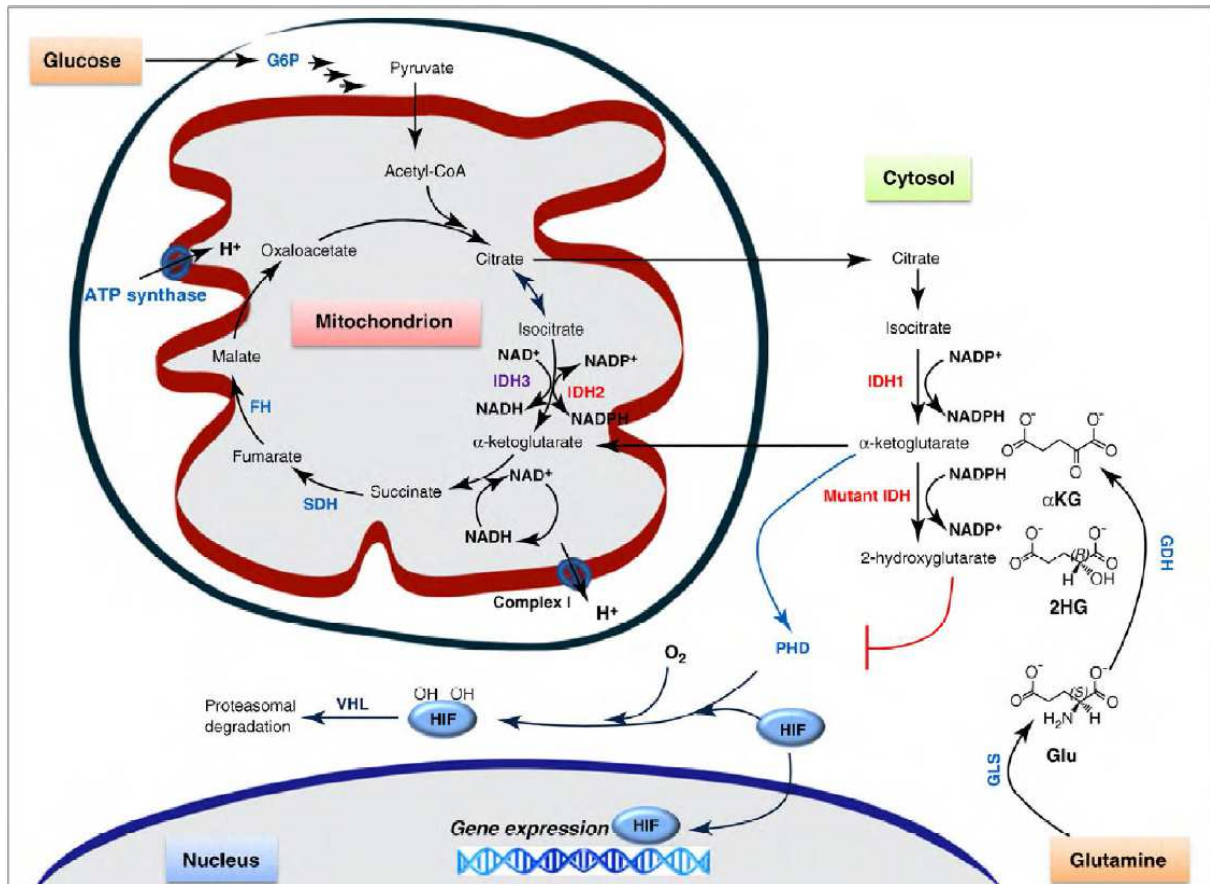


Figure 5 : Rôle des gènes *IDH* dans les gliomes et les LAM (17)

Le gène *IDH1* est localisé sur le chromosome 2 en position q33.3, il comprend 10 exons (dont 8 codants) étendus sur 19 kb.

Le gène *IDH2* présente de fortes homologies avec *IDH1*. Il est localisé sur le chromosome 15 en position q26.1 et comprend 8 exons codants.

Historiquement les mutations d'*IDH1* été identifiées en premier, par séquençage d'exome sur des patients atteints de cancer colorectal en 2006 (18). Par la suite et assez rapidement ont été mises au jour des mutations récurrentes d'*IDH1* et 2 dans des cas de gliomes, la plupart du temps de bas grade (19). Puis dans les leucémies aiguës myéloïdes (20–23). Enfin dans l'acidurie D-2-hydroxyglutarique de type II, une pathologie constitutive cette fois (24).

La quasi-totalité des mutations d'*IDH1* décrites consiste en une substitution de l'arginine en position 132 (site catalytique), principalement par une histidine (R132H). Apparaissent aussi par ordre de fréquence décroissant R132C, R132S, R132G, R132L, avec à chaque fois les mêmes conséquences fonctionnelles.

*IDH2* voit muter son arginine en position 172, qui est l'homologue structural de *IDH1*-R132 ou bien son arginine en position 140. Cette dernière occupe également la zone du site catalytique et se trouve dans située l'espace très près de la 172 (Figure 6). Les substitutions principales sont R172K et R140Q, mais existent également les substitutions R172S, R172W, R172M, R140W, R140L.

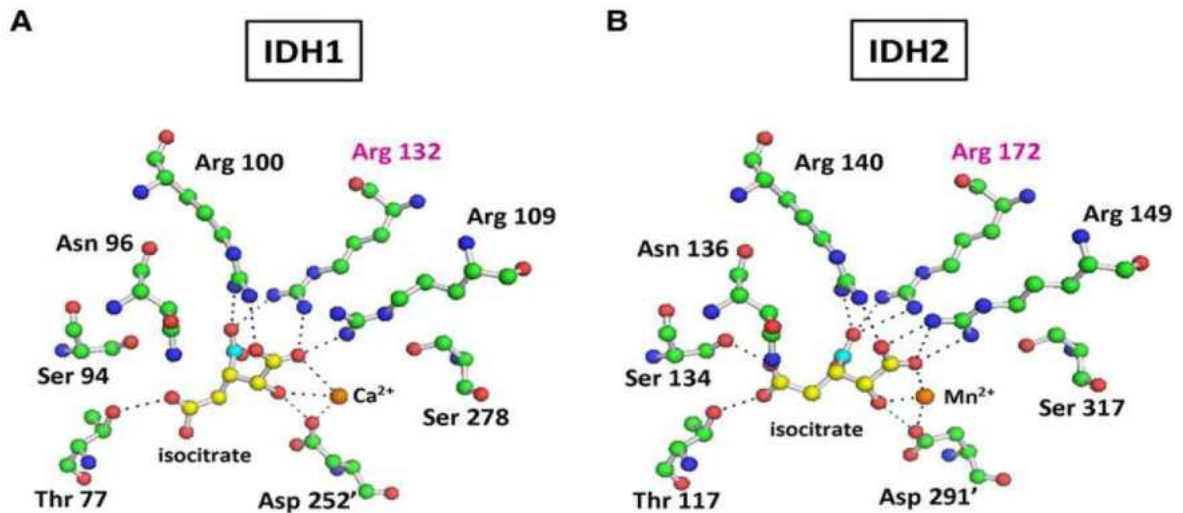


Figure 6 : Structure du site catalytique d'IDH1 et IDH2 (25)

## 2. La fonction néomorphique des IDH mutées

La thèse d'un effet perte de fonction associé à un effet dominant négatif des IDH mutées (IDHm) sur les sauvages (IDHwt), par formation d'hétérodimères wt/m catalytiquement inactifs a d'abord dominé, mais elle accusait quelques paradoxes :

Il a certes été constaté que la capacité de la protéine mutante à exercer sa fonction initiale était nettement atténuée, ce par des mesures de production d' $\alpha$ -CG ou de NADPH (26,27), ce qui allait dans le sens de cette première idée.

Et pourtant ces mutations possèdent les caractéristiques des mutations gain de fonction : elles sont somatiques, hétérozygotes et occupent des positions hautement conservées. En effet les mutations perte de fonction doivent être homozygotes pour avoir un retentissement phénotypique (sauf haplo-insuffisance), ce qui explique le fait qu'elles soient moins fréquentes, et des mutations à des positions variées doivent dans ce cas pouvoir causer la même conséquence simple qu'est la synthèse d'une protéine incapable de fonctionner.

Le voile va se lever progressivement sur ce mystère après 2009 lorsque Dang et al. découvrent une fonction néomorphique des protéines IDH1 mutantes (28), en réalité commune à toutes les IDH mutantes : la réduction NADPH-dépendante de l' $\alpha$ -CG en D-2-hydroxyglutarate. Cette nouvelle activité résulte d'une affinité accrue pour le NADPH et réduite pour l'isocitrate (21,25,28).

La formation des dimères protéiques étant un phénomène dynamique, les homodimères wt/wt, m/m et l'hétérodimère wt/m co-existent probablement dans la cellule mutée.

Cependant il apparaît que l'hétérodimère est le principal acteur des modifications d'activité.

En effet il a été montré qu'en son sein les deux sous-unités produisent du D-2HG, à partir d'isocitrate ou d' $\alpha$ -CG respectivement, associant donc production de l'oncométabolite et diminution de synthèse et consommation de l' $\alpha$ -CG (29).

En outre la perte de fonction wt induite génétiquement sur des lignées cellulaires mutées IDH1 entraîne une diminution de production de D-2HG, phénomène retrouvé également in vivo dans des

cas de gliome à cellules mutées ayant perdu l'allèle *IDH1* sauvage, montrant ainsi l'importance de la persistance cette sous unité wt dans l'accomplissement de la fonction néomorphique (30).

### 3. L'oncogenèse liée au D-2HG

Le rôle cellulaire du D-2HG est méconnu. Il pourrait constituer un intermédiaire dans la production de 5-aminolevulinate et des porphyrines au cours de la synthèse de l'hème (31,32).

Son oncogénicité résulte, au moins en partie, de son analogie structurale avec l' $\alpha$ -CG, qui en fait un inhibiteur compétitif des enzymes à activité  $\alpha$ -CG-dépendante (33).

Or ces enzymes sont nombreuses et ont des rôles variés, il en existe plus de 60 différentes dans les cellules des mammifères (34), et parmi elles la famille TET notamment, mais aussi HIF-PHD (Hypoxia Inducible Factor-Prolyl Hydroxylase Domain), les histones déméthylases et C-P4H (Collagen Prolyl 4-Hydroxylase), pouvant être impliquées dans la tumorigénèse respectivement par méthylation aberrante de l'ADN, stimulation de l'angiogénèse, modification des histones et maturation anormale du collagène.

D'autres pistes sont néanmoins envisagées, parmi elles des répercussions sur le cycle de Krebs, sur le glucose sensing ou bien encore la régulation du stress oxydatif (35).

#### a) TET

La famille d'enzymes TET est constituée de 3 membres : TET1, TET2 et TET3, acteurs de la régulation épigénétique.

Les TET catalysent la conversion des 5-méthylcytosines (5-MC) en 5-hydroxyméthylcytosines (5-HMC) (Figure 7) (36).

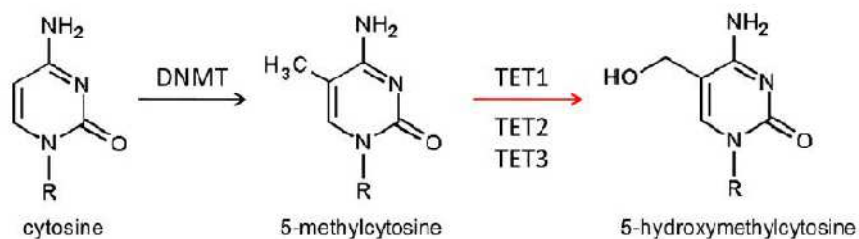


Figure 7 : Méthylation puis hydroxylation de la cytosine par les enzymes DNMT et TET

Ces dernières peuvent initier la déméthylation de l'ADN, soit passivement en excluant les DNA méthyltransférases (DNMT) des îlots cytosine-guanine (CpG), soit activement via les mécanismes de réparation par excision de base (BER) (37).

Les 5-HMCs empêchent la liaison de protéines au niveau des CpG méthylés, assurant par ce biais une régulation transcriptionnelle (37).

Le lien est maintenant établi entre TET, contrôle de la différenciation cellulaire et maintien des cellules souches embryonnaires (38).

De nombreuses études laissent à penser que la ou les voies oncogéniques dépendantes d'IDH passent par les TET :

-L'expression d'IDH1 et IDH2 mutantes de même que l'exposition à du D-2HG exogène inhibent TET in vivo comme in vitro, diminuant la production de 5-HMC, lequel processus est réversible à l'addition d' $\alpha$ -CG exogène (33).

-De même lorsqu'on compare les gliomes affichant une mutation d'IDH1 à ceux qui en sont dépourvus, on y retrouve des concentrations significativement supérieures en 5-HC et inférieures en 5-HMC (33). Il faut cependant concéder que la déplétion en 5-HMC est le lot de nombreux cancers indépendamment du statut mutationnel d'IDH (39).

-Une forte corrélation a été mise en lumière entre mutations d'IDH1 et 2 et phénotype méthylé des îlots CpG (PMIC) dans un sous-groupe de gliomes toujours (40).

-Deux études consécutives ont ensuite mis en évidence un profil d'hyperméthylation particulier homogène dans des gliomes mutés IDH, similaire au PMIC (41,42).

De façon intéressante ce profil restait stable quel que soit le grade du gliome, suggérant que ces modifications épigénétiques surviennent tôt dans la gliomagenèse (41). Or les mutations d'IDH sont également précoces (43).

-L'utilisation de vecteurs lentiviraux a permis d'induire des hyperméthylations dans des astrocytes humains après introduction de la mutation IDH1 R132H (44,45). A l'inverse lorsqu'était induite une surexpression d'IDH1 sauvage une hypométhylation était obtenue, ce qui laisse à penser que les concentrations en  $\alpha$ -CG pourraient aussi altérer le méthylome (45).

-Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) ont fait l'objet d'investigations du même ordre et les résultats concordent :

-Des cellules de LAM mutées IDH présentaient un profil d'hyperméthylation globale et spécifique de gène similaire à celui des cellules de LAM mutées TET (46).

-Une comparaison des niveaux de 2-HG et de 5HMC médullaires (respectivement plasmatique et cellulaire) et de leur évolution au cours de la maladie chez des patients a montré que lorsque les quantités de 2-HC diminuent en réponse au traitement celles de 5HMC augmentent et inversement à la rechute (47).

-Un modèle murin IDH R132H knock in spécifique et conditionnel du tissu hématopoïétique affichait un profil de méthylation de l'ADN proche de celui qui caractérise les LAM humaines mutées IDH 1 ou 2, et affectant des voies de signalisation impliquées dans la maintenance des cellules souches, la prolifération et la différenciation hématopoïétique ainsi que la leucémogénèse (48).

Ainsi il existerait un lien étroit entre IDH, TET, méthylation de l'ADN et tumorigénèse, dont une meilleure compréhension passera par l'amélioration de la connaissance du méthylome et de ses conséquences sur les profils d'expression génique.

## ***b) HIF et HIF-PDH***

HIF (Hypoxia Inducible Factor) est un facteur de transcription qui est associé, lorsqu'il est surexprimé, à la progression maligne et à un mauvais pronostic dans plusieurs cancers (49). Il a pour cible un large éventail de gènes impliqués dans l'adaptation cellulaire à l'hypoxie : modulant l'angiogénèse, la glycolyse, la signalisation par les facteurs de croissance, l'apoptose et les métastases (50).

En conditions de normoxie, l'enzyme HIF-PHD hydroxyle l'HIF sur deux résidus proline, ce qui provoque indirectement sa dégradation par le protéasome (Figure 8) (51).

Historiquement certaines études ont montré que l'HIF-PHD était inhibée par le D-2HG (33) ou sous basse concentration en  $\alpha$ -CG (27), permettant une stabilisation de l'HIF en dehors de l'hypoxie associée à une expression inappropriée de ses cibles.

Plusieurs études sur modèles murins ou in vivo tendaient de même à relier la régulation positive de l'HIF1 $\alpha$  ou de certaines de ses cibles aux mutations d'IDH ou à un apport exogène de D-2HG (27,33,52).

La piste prometteuse est remise en question depuis la parution consécutive d'études affichant des résultats en contradiction: le D-2HG n'inhiberait que très faiblement l'HIF-PHD (53) voire l'activerait (54) (55), il n'y aurait peut-être pas de corrélation entre le statut mutationnel d'IDH et l'expression d'HIF1 $\alpha$ , en tout cas dans les gliomes (49) (56), dans certaines lignées cellulaires l'expression d'IDH1 mutée R132H réduit les concentrations retrouvées d'HIF, et dans une lignée d'érythroleucémie l'inhibition de l'HIF-PHD a même permis d'inhiber la transformation leucémique induite par une IDH mutante (54,55). Est-ce à dire que dans certaines circonstances l'HIF serait un suppresseur de tumeur ?

La question du rôle d'HIF dans l'oncogenèse reste donc ouverte à l'heure actuelle.

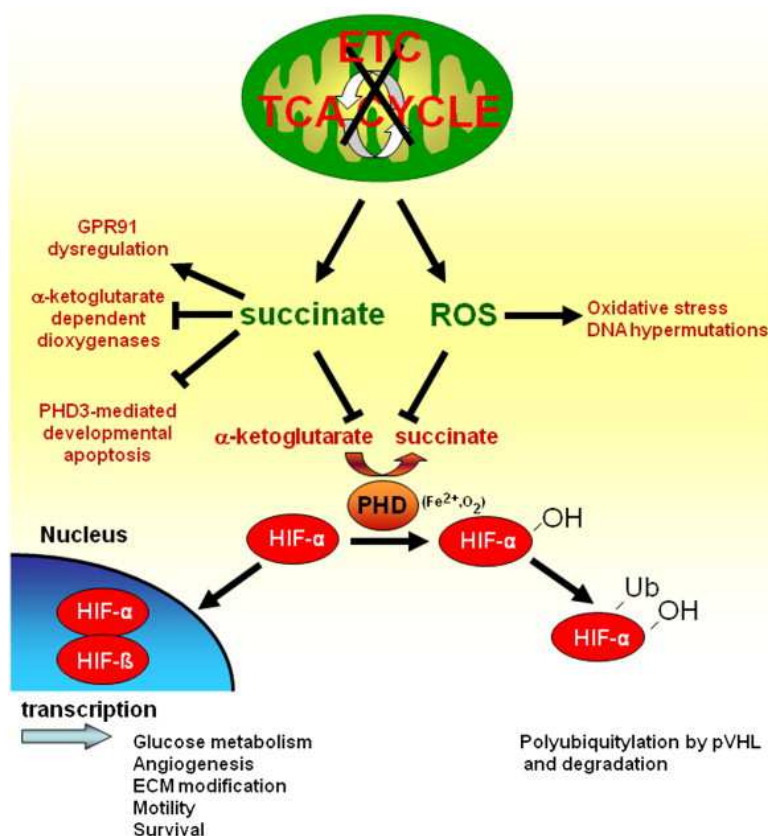


Figure 8 : Régulation de l'HIF en réponse à l'hypoxie (57)

### c) Les Histone déméthylases

Les histone déméthylases déméthylent les lysines méthylées. Elles régulent l'expression des gènes en modulant la structure de la chromatine et la liaison des facteurs de transcription.

Leur inhibition par le D-2HG pourrait entre autre bloquer la différenciation cellulaire (44).



Le D-2HG exogène et la perte de la fonction IDH1 sauvage inhibent in vitro et in vivo un certain nombre d'histones déméthylases. De même dans des gliomes humains IDH1 mutés et des lignées mutées IDH1 ou 2 on retrouve des marqueurs de méthylation des histones (33,44,53). Enfin chez des souris modifiées n'exprimant la mutation IDH1 qu'au niveau des cellules de l'hématopoïèse ont été observées une prolifération des progéniteurs hématopoïétiques et la présence d'histones hyperméthylées (48).

#### *d) La C-P4H*

La C-P4H hydroxyle les résidus proline du collagène et catalyse la production d'endostatine (33), protéine possédant des propriétés d'inhibition de l'angiogénèse et de la croissance tumorale (58).

Premièrement l'activité de la C-P4H semble effectivement réduite en présence d'IDH mutée : une étude faisant une nouvelle fois appel à la mutagenèse dirigée sur IDH1 montrait chez les souris mutées une diminution de l'hydroxylation du collagène (52).

Ensuite l'expression de l'endostatine est effectivement réduite en présence d'IDH1 mutée, tant dans des lignées cellulaires que dans des gliomes (33).

#### *e) Impact sur le cycle de Krebs*

L'effet Warburg est un phénomène paradoxal, décrit pour la première fois en 1924 par le physiologiste allemand éponyme. Il s'agit de la tendance des cellules cancéreuses à se détourner de la production d'énergie par phosphorylation oxydative au profit de la fermentation lactique après la glycolyse, en conditions pourtant aérobies. Les rendements énergétiques des deux voies étant très différents (rapport de 1 à 20), la consommation en glucose se trouve démultipliée au cœur du tissu tumoral.

Cette caractéristique est considérée comme une signature métabolique des cellules cancéreuses (59), d'ailleurs exploitée en imagerie par tomographie par émission de positons (TEP) avec le fluorodesoxyglucose marqué au fluor 18.

O. H. Warburg voyait dans cette dysrégulation du métabolisme énergétique une cause d'oncogenèse plutôt qu'une conséquence.

L'identification de mutation des gènes codant la succinate déshydrogénase (SDH) et la fumarate déshydrogénase (FDH), enzymes du cycle de Krebs, associées au développement de phéochromocytomes et de paragangliomes pour SDH, et de leiomyomes de la peau, de l'utérus et de tumeurs rénales pour FDH, a suscité un regain d'intérêt pour cette hypothèse oubliée et plus largement sur la question du lien entre dérégulation du métabolisme énergétique et cancer.

Plusieurs mécanismes ont été proposés, pouvant coexister :

-Certains auteurs pensent que le cycle de Krebs est peu altéré et que les effets oncogéniques secondaires à la perte d'activité de FDH ou SDH dépendent simplement de phénomènes similaires à ceux déjà décrits pour IDH. En effet leurs substrats, le fumarate et le succinate, alors accumulés, possèderaient des propriétés inhibitrices des enzymes à activité  $\alpha$ -CG-dépendante au même titre que le D-2HG. Le panel d'enzymes atteintes serait fonction de l'inhibiteur, expliquant des prédispositions à des tumeurs très différentes d'un gène muté à l'autre (57,60) (61).

-D'autres soutiennent que des conséquences directes sur le métabolisme énergétique existent et peuvent expliquer une partie de la tumorigénèse.

Ils s'appuient sur les travaux de Reitman et al notamment, qui démontrent la survenue d'une déplétion en acides tricarboxyliques (citrate, cis-aconitate,  $\alpha$ -CG, malate, fumarate) et une accumulation de leurs précurseurs de biosynthèse dans des lignées cellulaires porteuses des mutations d'*IDH1* R132H ou d'*IDH2* R172K, suggérant une régulation négative du cycle de Krebs (62).

Autre fait remarquable dans cette même étude, le D-2HG semble une fois de plus jouer le premier rôle. Les cellules mutées et les cellules traitées par l'oncométabolite affichent de nombreuses modifications métaboliques communes, ce qui n'est pas le cas de cellules KO pour *IDH1* sauvage (62).

Le D-2HG pourrait en outre avoir la capacité de découpler la chaîne respiratoire en inhibant la cytochrome C oxydase et l'ATP synthase (63,64). Le ralentissement du cycle de Krebs peut altérer le ratio cellulaire NADPH/NADP<sup>+</sup> avec des conséquences multiples (28).

La concentration cytosolique en acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA) s'en trouve aussi affectée, or elle régule l'acétylation de nombreuses protéines potentiellement oncogènes, dont les histones (62,65).

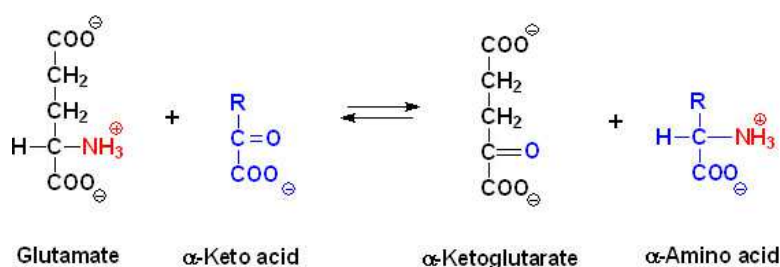
### f) *Le glutamate*

Le glutamate est un neurotransmetteur exciteur majeur du système nerveux central.

La voie glutamatergique est associée au développement tumoral, à la prolifération, la survie et les métastases dans les gliomes et d'autres tumeurs (66,67). Les cellules gliomateuses sécrètent du glutamate en excès, sur-activant les récepteurs glutamatergiques. S'ensuit une mort cellulaire massive et la promotion de la migration et de l'invasion cellulaire (68).

Or  $\alpha$ -CG, glutamate et glutamine sont étroitement liés au niveau cellulaire : le passage de l'une à l'autre de ces molécules s'effectue par simple transamination (**Figure 9**).

L'inhibition de la glutaminase qui convertit la glutamine en glutamate ralentit la prolifération des cellules gliomateuses *IDH1* mutées (69). Enfin l'équipe de Reitman retrouve une déplétion en glutamate dans les cellules *IDH* mutées (62). Si des liens semblent exister, leur teneur exacte reste à décrire.



**Figure 9 : Transamination Glutamate/ $\alpha$ -CG**

### g) *Glucose-Sensing*

Un contrôle anormal des entrées cellulaires en glucose est associé au développement de cancers du colon, du sein, de la prostate, du foie et de la vessie (70). *IDH1* contrôle la sécrétion glucose-dépendante d'insuline par les cellules beta du pancréas (71), d'où la présomption d'une relation. L'état des connaissances ne permet pas d'en affirmer plus mais d'aucuns suggèrent qu'*IDH* pourrait communiquer un signal de haute concentration en glucose aux effecteurs du glucose-sensing en aval via la production importante de NADPH. Cette voie pourrait ne pas être réservée aux seules cellules pancréatiques. Dans les cellules tumorales mutées persisterait ainsi un signal de glucose bas entraînant une utilisation excessive de glucose et par là un avantage prolifératif (15)

#### **h) Réponse cellulaire au stress oxydatif**

L'activité d'IDH1 et IDH2 est protectrice vis à vis des radicaux libres et augmente lors d'une exposition aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) (15). Cette défense passe par le NADPH produit, qui est un agent réducteur par action directe et interaction avec les systèmes du glutathion et de la thioredoxine (49).

Si l' $\alpha$ -CG présente aussi des propriétés antioxydantes (49), le D-2HG est capable d'induire un stress oxydatif dans des modèles animaux (72).

Cependant la production de ROS n'était pas significativement altérée dans des lignées cellulaires *IDH1* mutées (54), elle était même réduite dans le cerveau de souris *IDH1* R132H knock in, bien que paradoxalement le ratio NADP<sup>+</sup>/NADPH ait augmenté et le glutathion disponible diminué dans cette même expérience (52).

Ici encore les données contradictoires ne permettent pas de tirer une conclusion solide.

#### **4. Incidence des mutations d'IDH1 et IDH2 dans les LAM**

Les mutations d'*IDH1* et d'*IDH2* sont mutuellement exclusives (73). Elles ne sont pas spécifiques des LAM puisqu'elles ont été retrouvées à des fréquences variables dans d'autres tumeurs, comme les gliomes (74), les syndromes myélodysplasiques (SMD) (75), les syndromes myéloprolifératifs (SMP) (76) et les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) (77).

Les mutations d'*IDH1* sont retrouvées dans 6 à 8% de l'ensemble des LAM (78–80) et dans 10 à 12% des LAM à caryotype normal (LAM-CN) (79,81). Elles sont rares dans les LAM de l'enfant (82). Au sein des LAM-CN, elles sont étroitement associées aux mutations du gène *NPM1* (nucléophosmin 1) (78–80,83) et des associations avec duplications partielles en tandem (PTD) de *KMT2A* (K-specific Methyltransferase A, anciennement *MLL* pour Mixed-Lineage Leukemia) ont été rapportées (79).

Quant aux mutations d'*IDH2*, elles sont retrouvées dans 9 à 11% des LAM tout venant (78,80) et plus fréquemment dans les LAM-CN. Les mutations d'*IDH2* R140 sont souvent associées aux mutations de *NPM1* (84). Les mutations d'*IDH2* R172 sont décrites comme mutuellement exclusives des mutations *KMT2A*, *NPM1*, *FLT3* et *CEBPA* (CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha) (22,78). A la différence des mutations d'*IDH2* R172 retrouvées dans les gliomes et les LAM, les mutations d'*IDH2* R140 apparaissent restreintes aux LAM (Tableau 2).

Tableau 2 : Fréquences des mutations d'*IDH1* et *IDH2* chez les patients adultes et enfants (84)

Studies	AML, no.	<i>IDH1</i> <sup>mut</sup>	<i>IDH2</i> <sup>mut</sup>
Summary of adult cases	U-AML, 6877	7.3%	9.7% (R172 19%)
	CN-AML, 1805	11%	16% (R172 14%)
	AC-AML, 1503	3.5%	3.8%
Summary of pediatric cases	U-AML, 852	1.6%	2.2%

AC-AML, cytogenetically abnormal AML; U-AML, unselected AML.

La Figure 10 montre l'association entre les mutations d'*IDH1/2* et les autres anomalies génétiques fréquemment retrouvées dans les LAM.



Figure 10 : les mutations d'*IDH* dans le paysage génétique et épigénétique de 200 LAM de l'adulte, d'après (12)

### III. Généralités sur les LAM

Les LAM sont un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par une prolifération incontrôlée de cellules myéloïdes immatures appelées blastes, bloquées dans leur différenciation. Cette population de cellules possède un grand pouvoir proliférant à l'origine d'une insuffisance médullaire par inhibition de l'hématopoïèse physiologique. Le caractère aigu de la leucémie est dû au

potentiel évolutif rapide des symptômes et signes biologiques de la maladie, ainsi que sur la gravité des troubles viscéraux engendrés, en l'absence d'un traitement efficace.

## A. Epidémiologie

Le taux d'incidence standardisé sur la population mondiale est de 2,6 pour 100 000 chez l'homme et de 2,3 pour 100 000 chez la femme (rapport hommes/femmes 1,1).

En France, le nombre de nouveaux cas de LAM en France a été estimé à 2 791 en 2012, en augmentation régulière depuis 1980, sachant que la part attribuable aux changements démographiques (vieillissement de la population) correspond environ à 40 % de l'augmentation du nombre des cas sur cette période.

L'incidence en France est superposable à celle observée en Europe.

Il s'agit d'une pathologie touchant essentiellement le sujet âgé (Figure 11), l'âge médian au diagnostic est de 71 ans.

Ces affections restent de très mauvais pronostic avec une survie relative à 5 ans qui ne dépasse pas 20 % (85).

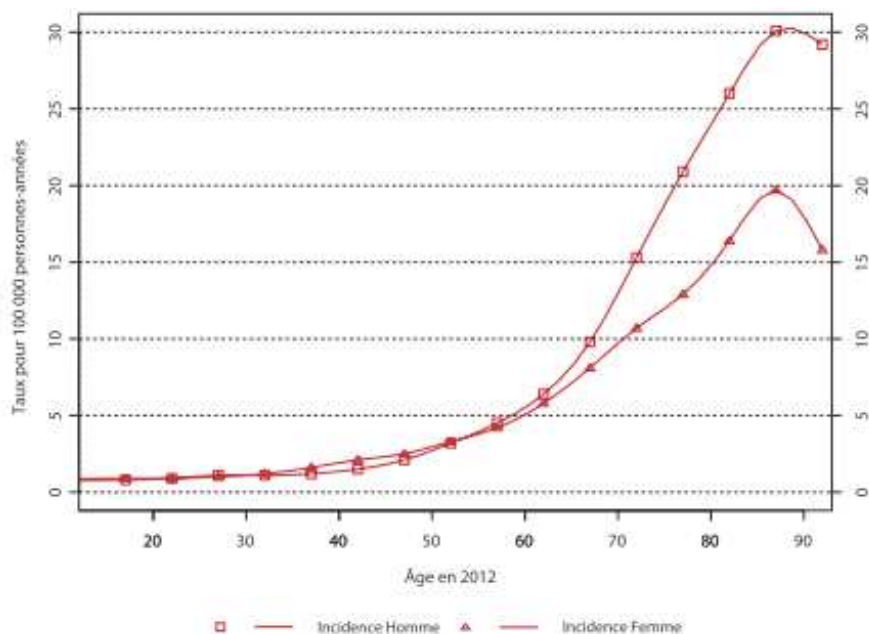


Figure 11 : Incidence des LAM par âge et sexe en France 2012 (85)

Les LAM représentent 80% des leucémies aiguës (LA) de l'adulte et 20% des LA de l'enfant.

## B. Etiologies

Les facteurs étiologiques démontrés sont variés :

- L'exposition à des agents chimiques dont le benzène, les anti-cancéreux (alkylants, inhibiteurs de topo-isomérase),
- L'exposition à des agents physiques, notamment les radiations ionisantes,
- Les facteurs génétiques constitutionnels favorisant l'instabilité génétique, (trisomie 21, la maladie de Fanconi),

-L'âge par le phénomène de « vieillissement » des cellules souches, engendrant des défauts de réparation de l'ADN responsables de modifications génétiques ou chromosomiques,

-La présence d'hémopathies myéloïdes pré-existantes à la LAM, notamment les SMP ou SMD.

## C. Présentation clinique

La présentation clinique résulte de deux conséquences de la maladie : l'insuffisance médullaire et le syndrome tumoral.

Les circonstances du diagnostic sont variables, allant de la découverte fortuite sur un hémogramme, aux symptômes graves nécessitant l'hospitalisation en urgence.

L'insuffisance médullaire peut se manifester sous trois syndromes :

-Anémique : avec pâleur, asthénie et dyspnée,

-Infectieux : secondaire à la neutropénie, touchant préférentiellement les sphères ORL et pulmonaire,

-Hémorragique : lié à la thrombopénie, se manifestant au niveau cutané ou muqueux, éventuellement aggravé par une coagulation intra-vasculaire disséminée.

Le syndrome tumoral regroupe les signes cliniques et paracliniques liés à l'infiltration des tissus par les cellules blastiques.

Il pourra s'agir d'une hépatosplénomégalie, de douleurs osseuses, d'hypertrophies au niveau gingival ou testiculaire, de lésions cutanées ou encore d'une méningite blastique.

L'hyperleucocytose a un retentissement clinique à partir de 100 Giga/Litre (G/L) : une leucostase à retentissements pulmonaire et cérébral.

## D. Présentation biologique

### 1. Cytologie

#### a) L'hémogramme

La numération de formule sanguine fera suspecter une LAM devant l'existence de cytopénie(s) associée(s) ou non à la présence de blastes. La leucocytose est très variable. Elle va de la leucopénie franche à une hyperleucocytose supérieure à 100 G/L. L'anémie de cause centrale, majoritairement normocytaire, normochrome et arégénérative est quasi-constante. La thrombopénie est fréquente. La blastose est variable.

Sur un frottis coloré au May-Grünwald Giemsa, les blastes sont des cellules présentant un rapport nucléocytoplasmique élevé, une chromatine fine contenant souvent un ou plusieurs nucléoles visibles et un cytoplasme basophile. Leur morphologie est par ailleurs variable d'un sous-type à l'autre (granulations, corps d'Auer). L'European Leukemia Net (ELN) recommande un décompte sur au moins 200 cellules (86).

#### b) Le myélogramme

Le myélogramme est indispensable à l'établissement du diagnostic. Il doit montrer une infiltration médullaire au moins égale à 20% de blastes, sauf en cas de t(15;17), t(8;21), inv(16) or t(16;16), selon

la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 2016 (87). L'ELN recommande un décompte sur au moins 500 cellules (86).

A leur description morphologique peut s'ajouter l'étude cytochimique de la myéloperoxydase (MPO) et des estérases non spécifiques (hydrolyse du Naphtol-ASD-Acétate ou NASDA), permettant de mettre en évidence dans certains cas une différenciation myéloïde ou monoblastique et monocytaire respectivement.

Ces données permettent la catégorisation de la LAM selon la classification FAB (French American British, voir III.E.1). En cas d'aspiration médullaire pauvre non informative, le myélogramme est complété par l'étude immuno-histochimique d'une biopsie ostéo-médullaire (BOM).

## 2. L'immunophénotypage

L'immunophénotypage, permet la détection de l'expression de divers antigènes de différenciation membranaires ou intra-cytoplasmiques par les cellules sanguines ou de la moelle osseuse. Il permet de :

- Différencier les LAM des LAL,
- Diagnostiquer les LAM de phénotype mixte
- Détecter les LAM indifférenciées
- Déterminer le stade de différenciation des cellules blastiques
- Détecter les phénotypes aberrants en vue d'un suivi de maladie résiduelle (MRD)

Le **Tableau 3** montre les marqueurs (clusters de différenciation, CD) qui au sein du panel déployé permettront de préciser le diagnostic de la LAM selon l'ELN (86).

**Tableau 3 : Marqueurs cellulaires de surface et cytoplasmiques essentiels au diagnostic des LAM (86)**

Stade ou lignée	Marqueur
Stade précoce	CD34, CD38, CD117, CD133, HLA-DR
Lignée granuleuse	CD13, CD15, CD16, CD33, CD65, cMPO
Lignée monocytaire	CD11c, CD14, CD64, lysozyme, CD4, CD11b, CD36
Lignée mégacaryocytaire	CD41, CD42, CD61
Lignée érythroblastique	CD235a

## 3. La cytogénétique

Le caryotype conventionnel des cellules blastiques, préférentiellement réalisé sur moelle osseuse, fournit une aide diagnostique et pronostique indispensable à la prise en charge d'une LAM. La présence d'une t(16;16)/inv(16;16), t(8;21) ou t(15;17) permet de poser le diagnostic de LAM indépendamment du pourcentage de blastes. Les valeurs pronostiques des anomalies retrouvées seront détaillées ci-après dans le chapitre dédié. Pour être interprétable, le caryotype doit être réalisé sur un minimum de vingt mitoses. L'établissement d'un caryotype normal nécessite l'analyse d'au moins 20 mitoses. Ce nombre est recommandé mais non obligatoire en présence d'une anomalie (86).

Les techniques de Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), sont mises en œuvre pour confirmer la présence de remaniements suspectés, ou pour détecter certains remaniements pouvant être cryptiques (KMT2A, par exemple).

#### 4. La biologie moléculaire

La biologie moléculaire réalisée au diagnostic permet d'étudier certaines altérations géniques rencontrées de manière récurrente dans les LAM. Elle représente une alternative pour la recherche de transcrits de fusion secondaires aux translocations récurrentes en cas d'échec du caryotype. Certains gènes tels que *NPM1*, *FLT3* et *CEBPA* constituent des marqueurs moléculaires décisionnels pour la prise en charge thérapeutique du patient dans les LAM-CN. Les marqueurs potentiels de suivi de la MRD seront aussi étudiés et le cas échéant quantifiés. Les mutations d'autres gènes sont des cibles thérapeutiques expérimentales et pourront à ce titre être recherchées (c'est le cas des mutations d'*IDH1* et *IDH2*).

Il est recommandé d'extraire de l'ARN et de l'ADN et de conserver un culot cellulaire. A défaut l'ARN sera privilégié (86).

### E. Classifications des LAM

#### 1. Classification FAB

Proposée en 1976, révisée en 1985 par le French American British Cooperative Group (FAB), la classification FAB catégorisait les LAM (définies alors par une blastose médullaire  $\geq 30\%$ ) selon des critères morphologiques et cytochimiques (MPO, NASDA) **Tableau 4** :

**Tableau 4 : Classification FAB avec associations cytogénétiques, d'après (88)**

Sous types FAB	Dénomination commune (% de cas)	MPO	Estérases non spécifiques	Associations cytogénétiques (% de cas)
M0	LAM avec différenciation minimale (3%)	-	-	Inv(3q26) et t(3;3) (1%)
M1	LAM sans maturation (15-20%)	+	-	
M2	LAM avec maturation (25-30%)	+	-	t(8;21) (40%) t(6;9) (1%)
M3	LA Promyélocytaire (LAP) (5-10%)	+	-	t(15;17) (98%) t(11;17) (1%) t(5;17) (1%)
M4	LA myélo-monocytaire (20%)	+	+	11q23 (20%) inv(3q26) et t(3;3) (3%) t(6;9) (1%)
M4Eo	LA myélo-monocytaire avec excès d'éosinophiles anormaux (5-10%)	+	+	Inv(16;16) et t(16;16) (80%)
M5	LA monocytaire	-	+	11q23 (20%) t(8;16) (2%)
M6	LA érythroblastique (3-5%)	+	-	
M7	LA mégacaryoblastique (3-12%)	-	+/-	t(1;22) (5%)

Ce classement établi dans un but diagnostique apporte peu d'informations concernant le pronostic de chaque entité.

Cette classification historique structure de nos jours une partie de la catégorie des LAM « Not Otherwise Specified » de la classification OMS des leucémies aiguës.



## 2. Classification OMS

La classification OMS des leucémies aiguës et des pathologies myéloïdes fait désormais référence. Elle vient tout juste d'être révisée en avril 2016 (87). Son chapitre « leucémies aiguës myéloïdes et néoplasies liées » a intégré au fil des éditions les avancées cytogénétiques et moléculaires successives ainsi que des critères d'antécédents pathologiques et thérapeutique possédant une valeur en termes de pronostic ou de réponse au traitement.

Le **Tableau 5** en présente les entités.

**Tableau 5 : Classification OMS 2016 des LAM et autres néoplasies liées (87)**

Leucémie aiguë myéloïde et néoplasies liées
Leucémie aiguë myéloïde avec anomalies génétiques récurrentes
LAM avec t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LAM avec inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
LAP (Leucémie aiguë promyélocytaire) avec <i>PML-RARA</i>
LAM avec t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
LAM avec t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
LAM avec inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
Entité provisoire: LAM avec <i>BCR-ABL1</i>
LAM avec mutation de <i>NPM1</i>
LAM avec mutations bialléliques de <i>CEBPA</i>
Entité provisoire: LAM avec mutations de <i>RUNX1</i>
Leucémie aiguë myéloïde avec anomalies liées aux myélodysplasies
Néoplasies myéloïdes liés à un traitement
Leucémie aiguë myéloïde sans autre spécification (NOS)
LAM avec différenciation minimale
LAM sans maturation
LAM avec maturation
Leucémie aiguë myélomonocytaire
Leucémie aiguë monoblastique/monocytaire
Leucémie érythroïde pure
Leucémie aiguë mégacaryoblastique
Leucémie aiguë à basophiles
Panmyélose aiguë avec myélofibrose
Sarcome myéloïde
Proliférations myéloïdes liées au syndrome de Down
Myélopoïèse anormale transitoire
Leucémie myéloïde associée au syndrome de Down

La première catégorie répertorie les LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes. Elle inclut notamment les LAM associées au Core Binding Factor (LAM-CBF) avec t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22), et les leucémies aiguës promyélocytaïres (LAP) avec t(15;17)(q22;q12). Ces trois entités distinctes se démarquent de ce groupe par leur pronostic favorable. Ces trois anomalies sont les seules à suffire pour porter le diagnostic de LAM indépendamment du pourcentage de blastes médullaires.

La révision 2016 apporte quelques nouveautés dans ce groupe. Les mutations de *CEBPA* doivent être bi-alléliques pour porter une valeur de bon pronostic et s'inscrire désormais dans cette catégorie. Ces mutations bi-alléliques de *CEBPA* et les mutations de *NPM1* l'emportent désormais sur la présence d'une dysplasie multilignée en l'absence d'anomalie cytogénétique relative aux SMD. Deux entités provisoires sont créées, les LAM avec *BCR-ABL1* car elles peuvent bénéficier d'un traitement par inhibiteur de tyrosine kinase, et les LAM de novo avec mutation de *RUNX1* en l'absence d'anomalie cytogénétique relative aux SMD, entité biologique distincte qui serait associée à un mauvais pronostic.

La seconde catégorie répertorie l'ensemble des LAM avec anomalies relatives aux myélodysplasies (LAM-MRC). Elle englobe les LAM secondaires à la transformation d'un SMD ou d'un SMD/SMP, celles caractérisées par la présence d'une dysplasie touchant plus de 50% des cellules d'au minimum deux lignées myéloïdes sauf si *NPM1* ou les deux allèles de *CEBPA* sont mutés, ou encore les LAM porteuses des anomalies cytogénétiques caractéristiques des myélodysplasies (**Tableau 6**).

**Tableau 6 : Anomalies cytogénétiques permettant le classement dans le groupe des LAM avec anomalies relatives aux SMD.**

Anomalies équilibrées	Anomalies déséquilibrées	Caryotype complexe
t(11;16)(q23;p13.3)	monosomie 7 ou del(7q)	Au moins trois anomalies cytogénétiques, aucune d'entre elles n'appartenant aux entités de la catégorie des LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes
t(1;3)(p36.3;q21.1)	monosomie 5 ou del(5q)	
t(3;21)(q26.2;q22.1)	i(17q) ou t(17p)	
t(2;11)(p21;23)	monosomie 13 ou del(13q)	
t(5;12)(q33;p12)	del(11q)	
t(5;7)(q33;q11.2)	del(12p) ou t(12p)	
t(5;17)(q33;p13)	idic(X)(q13)	
t(5;10)(q33;q21)		
t(3;5)(q25;q34)		

La délétion 9q présente jusqu'en 2008 est retirée dans la révision 2016 en raison de son association avec les mutations de *NPM1* et mutations bi-alléliques de *CEBPA*.

La troisième catégorie regroupe les néoplasies myéloïdes induites par un traitement (LAM-t). Elle réunit l'ensemble des SMD, SMD/SMP et LAM survenant après un traitement par agents alkylants ou inhibiteurs de topoisomérase II et/ou radiothérapie. Leur pronostic est défavorable.

Les LAM sans autre spécification (LAM-NOS) constituent la quatrième catégorie. Elle accueille l'ensemble des LAM ne possédant aucun critère pouvant les faire appartenir aux autres entités. La stratification de ce groupe repose sur des critères similaires à ceux employés dans la classification FAB auxquels s'ajoutent les LA à basophiles et les panmyéloses aiguës avec myélofibrose. Dans la nouvelle classification les myéloblastes sont toujours comptés comme un pourcentage de l'ensemble des cellules médullaires. L'entité érythroleucémie érythroïde / myéloïde est donc supprimée. Elle était définie par les cas comptant  $\geq 50\%$  de précurseurs érythroïdes et  $\geq 20\%$  de myéloblastes parmi les cellules non-érythroïdes.

Les sarcomes granulocytaires constituent la cinquième catégorie.

La sixième et dernière catégorie réunit les proliférations myéloïdes relatives au syndrome de Down. Elle distingue la réaction leucémoïde transitoire de la leucémie myéloïde associée au syndrome de Down.

Les néoplasies blastiques à cellules dendritiques plasmocytoïdes étaient rattachées au groupe des LAM dans la version 2008, elles en sont retirées dans la révision 2016.

## **F. Facteurs pronostiques**

Le pronostic des patients atteints de LAM est très hétérogène. Cette diversité s'expliquerait par les caractéristiques physiologiques et pathologiques propres à chaque patient, et par la variété des profils cytologiques, cytogénétiques et moléculaires.

### **1. Facteurs pronostiques liés au patient**

L'âge avancé au diagnostic est un facteur indépendant de mauvais pronostic. Il est associé à une diminution des taux de rémission complète (RC), de survie sans rechute (RFS) et de survie globale (OS). La résistance et la mortalité secondaires aux traitements sont accrues (86).

Les co-morbidités, les incapacités fonctionnelles (insuffisance cardio-pulmonaire, hépatique et rénale) et l'altération de l'état général diminuent la tolérance à la chimiothérapie d'induction et rendent les patients plus vulnérables aux infections.

La fréquence des anomalies cytogénétiques de pronostic défavorable est aussi plus importante chez les patients âgés (caryotypes complexes, anomalies des chromosomes 5, 7 et 17 notamment).

### **2. Facteurs pronostiques liés à la pathologie**

#### **a) Leucocytose au diagnostic**

Les LAM hyperleucocytaires sont caractérisées par une leucocytose sanguine supérieure à 100 G/L au diagnostic et sont un facteur de pronostic défavorable. La principale complication est la leucostase, cérébrale et/ou pulmonaire, secondaire à l'adhésion des blastes à l'endothélium vasculaire et leur adressage dans les tissus. Ce phénomène est pourvoyeur de décès précoces par hémorragie cérébrale ou défaillance respiratoire, et de rechutes par envahissement neuro-méningé. Un taux de LDH élevé (lactate déshydrogénase) et la présence d'une hépato-splénomégalie, eux aussi reflets de l'activité tumorale, sont aussi un impact pronostic défavorable (89).

#### **b) LAM secondaires**

Les LAM secondaires comprennent les LAM-t et les LAM-MRC de la classification OMS.

L'incidence des LAM-t croît avec l'âge. Si la fréquence des anomalies cytogénétiques défavorables, une éventuelle persistance de la pathologie initiale, et une possible cytotoxicité secondaire aux traitements antérieurs, permettent d'expliquer en partie le devenir de ces patients, la qualité de facteur indépendant de mauvais pronostic des LAM-t a tout de même été montrée (à l'exclusion des LAP-t). (90)

L'indépendance de la valeur pronostique reconnue aux LAM-MRC est plus controversée (91,92).

#### **c) Cytogénétique**

La cytogénétique est le facteur pronostique de la survie le plus puissant. Son intérêt est prouvé dans l'adaptation des stratégies thérapeutiques au risque, notamment concernant l'indication de l'allogreffe en première RC.

Communément, la stratification selon l'impact pronostique des anomalies cytogénétiques s'effectue en trois groupes. La classification la plus consensuelle est celle du groupe MRC de 2010 (93), bien que le bon classement de certaines anomalies dans les groupes intermédiaires et défavorable soit encore en discussion.

25% des cas de LAM comportent des anomalies cytogénétiques associées à une évolution favorable de la pathologie, caractérisée par des taux de RC supérieurs à 90% ainsi qu'une OS comprise entre 55 et 85%. Ce sont les LAP et les LAM-CBF.

10 à 20% des patients sont porteurs d'anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic, prédisant une OS inférieure à 20%. Ce groupe à haut risque cytogénétique tend à être représenté par une population plus âgée, atteinte de LAM secondaires. Il englobe notamment les inv(3)/t(3;3), délétions du bras long ou monosomies des chromosomes 5 et 7, anomalies du 3q, et les caryotypes complexes, définis par la présence d'au minimum trois anomalies cytogénétiques. Le caryotype monosomal, absent de l'étude MRC est également associé à un pronostic sombre. Il est défini par la présence d'une monosomie autosomale associée à au moins une monosomie autosomale additionnelle ou au moins une anomalie chromosomique structurale (en dehors de celles caractérisant les LAM-CBF ou les LAP) (94).

Enfin, un groupe à risque cytogénétique intermédiaire, extrêmement hétérogène, a été défini. Il englobe l'ensemble des anomalies cytogénétiques non répertoriées dans les groupes à pronostic favorable ou défavorable ainsi que les LAM-CN.

Néanmoins, l'impact pronostique de certaines anomalies rares : del(7q), trisomie 8 isolée, del(9q), t(v;11)(v;q23), t(9;11), del(20q) demeure incertain, conséquence du faible recrutement dans les essais cliniques ainsi que des divergences de protocoles thérapeutiques proposés aux patients (86).

La trisomie 22 ajoutée à la fusion *CBFB-MYH11* est associée à une plus longue RFS dans ce type de LAM-CBF. C'est le seul exemple d'anomalie cytogénétique additionnelle clairement associée à une modification du pronostic.

Les conséquences des autres remaniements chromosomiques additionnels restent à être évaluées.

#### **d) Biologie moléculaire**

La recherche de mutations de marqueurs pronostiques moléculaires est un complément indispensable. Ces marqueurs permettent notamment d'affiner la stratification au sein du groupe de risque cytogénétique intermédiaire.

Plusieurs classifications associant pronostic génétique et moléculaire ont été proposées, dont les trois principales sont rapportées dans le [Tableau 7](#).

La classification de l'ELN a longtemps fait autorité. Elle reprend le schéma classique de la classification cytogénétique, se divisant en trois groupes pronostiques : favorable, intermédiaire (I et II) et défavorable. Elle tient notamment compte du pronostic favorable associé aux mutations de *NPM1* dans les LAM-CN, nuancé par la présence d'une mutation *FLT3-ITD* (Duplication Interne en Tandem). Elle nécessite cependant d'être affinée sur plusieurs points :

-Il est désormais bien établi (et entériné par la révision OMS 2016) que concernant les mutations de *CEBPA*, seules les LAM ayant une mutation biallélique doivent figurer dans le groupe de cytogénétique favorable (87,95).

-Les mutations des gènes *TP53* et *RUNX1* sont associées à un mauvais pronostic (Tumor Protein P53 et Runt-related transcription factor respectivement) (87,96).

L'impact d'autres anomalies est plus discuté en termes de stratification. Outre atlantique le group National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (97) associe la présence de *FLT3-ITD* dans un

contexte de caryotype normal au groupe de pronostic défavorable (Tableau 8). Ce même groupe classe les patients porteurs d'une LAM-CBF avec une mutation de *KIT* dans le groupe intermédiaire.

De même est débattue l'importance des impacts pronostiques de *FLT3-ITD* avec d'autres anomalies (trisomie 8, *DNMT3A*, *KMT2A-PTD*, *TET2*), du ratio allélique de *FLT3-ITD*, de *KMT2A-PTD*, *IDH1/2* ou encore *ASXL1*, pour ne citer que les principaux (96,98–100).

**Tableau 7 : Classifications pronostiques selon les caractéristiques cytogénétiques et moléculaires des LAM, des différents groupes coopératifs d'après (86,96,98)**

	Döhner et al, Blood 2010	Patel et al, NEJM 2012	Grossmann et al, Blood 2012
<b>Favorable</b>	t(8;21)(q22;q22) : RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) : CBFβ-MYH11 NPM1 muté/FLT3-ITD - (*) CEBPA muté (*)	anomalies décrites par Döhner NPM1 muté/FLT3-ITD - associé à une mutation d'IDH1 ou IDH2	<b>Très favorable :</b> PML-RARA CEBPA double-muté <b>Favorable :</b> RUNX1-RUNX1T1 CBFβ-MYH11 NPM1 muté/FLT3-ITD -
<b>Intermédiaire</b>	<b>Intermédiaire I :</b> NPM1 muté/FLT3-ITD + (*) NPM1 wt/FLT3-ITD + (*) NPM1 wt/FLT3-ITD - (*) <b>Intermédiaire II :</b> t(9;11)(p22;q23) : MLLT3-MLL Autres anomalies cytogénétiques non décrites dans les groupes à risque favorable ou défavorable	CEBPA muté FLT3-ITD - associé à ASXL1, MLL-PTD, PHF6 et TET2 wt FLT3-ITD + associé à une trisomie 8 négative et MLL-PTD, TET2 et DNMT3A wt	CEBPA simple muté/FLT3-ITD + NPM1 muté/FLT3-ITD + caryotype normal
<b>Défavorable</b>	inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) : RPN1-EVI1 t(6;9)(p23;q24) : DEK-NUP214 t(v;11)(v;q23) : réarrangement MLL monosomie 5 ou del(5q) monosomie 7 anomalie (17p) caryotype complexe	anomalies décrites par Döhner FLT3 - ITD + associé à CEBPA wt et au moins une altération suivante : MLL- PTD, TET2, DNMT3A ou trisomie 8	<b>Défavorable :</b> MLL-PTD et/ou RUNX1 et/ou ASXL1 muté <b>Très défavorable :</b> TP53 muté

(\*) caryotype normal

**Tableau 8 : Classification pronostique des LAM proposée par le NCCN (97)**

RISK STATUS	CYTOGENETICS	MOLECULAR ABNORMALITIES
Favorable-risk	Core binding factor: inv(16) <sup>2,3</sup> or t(16;16) <sup>2</sup> or t(8;21) <sup>2</sup> t(15;17)	Normal cytogenetics: NPM1 mutation in the absence of FLT3-ITD or isolated biallelic CEBPA mutation
Intermediate-risk	Normal cytogenetics +8 alone t(9;11) Other non-defined	t(8;21), inv(16), t(16;16): with c-KIT <sup>5</sup> mutation
Poor-risk	Complex (≥3 clonal chromosomal abnormalities) Monosomal karyotype -5, 5q-, -7, 7q- 11q23 - non t(9;11) inv(3), t(3;3) t(6;9) t(9;22) <sup>4</sup>	Normal cytogenetics: with FLT3-ITD mutation <sup>6</sup>

### e) Impact pronostic des mutations d'*IDH1/2*

L'impact pronostic des mutations d'*IDH1/2* reste controversé, d'autant qu'il existe un manque d'homogénéité entre les études actuelles : les gènes étudiés et les codons atteints sont envisagés tantôt ensemble ou bien séparément.

Pour *IDH1m* certaines études rapportent une valeur pronostique défavorable dans le sous groupe de pronostic favorable *NPM1* muté sans *FLT3-ITD* des LAM-CN (22,78,101); alors que l'étude de *Schnittger* et al retrouve cet effet négatif uniquement dans le sous groupe *NPM1* non muté des LAM-CN (79). D'autres équipes ne retrouvent pas d'influence significative sur le pronostic.

L'impact pronostique des mutations d'*IDH2* semble dépendre du codon affecté.

En effet, il est reconnu que les LAM mutées *IDH2* R172K, représentent une entité biologique et clinique distincte caractérisés par des profils d'expression génique et de miRNA uniques (22), avec des taux de RC et de survie plus faibles que chez les patients non mutés (22,83).

L'impact pronostique des mutations *IDH2* R140 dans les LAM-CN est en revanche plus controversé. Parmi les rares études envisageant ces mutations à part des autres, deux leur attribuent une valeur pronostique positive (98,102).

Le [Tableau 9](#) reprend les conclusions des principales études portant sur le sujet.

**Tableau 9: caractéristiques cliniques et génotypiques des patients porteurs d'une mutation d'IDH1 ou IDH2 dans les LAM. D'après (84) (20–22,25,46,78–83,98,101–109). Données de survie concernant les mutations IDH1R132, IDH2R172, IDH2R140**

Summary of clinical characteristics and genotypic features in IDH1/2-mutated patients

Studies [references]	AML, no.	IDH1mut	IDH2mut	Association	Survival
Marcucci et al	CN-AML, 358	14%	19% (R172 19%)	IDH1mut with NPM1mut/FLT3-ITDneg/IDH2R172 older age, lack of other mutations, distinctive microarray gene and microRNA expression profiles	IDH1mut: shorter DFS in younger NPM1mut/FLT3-ITDneg CN-AML patients
					IDH2R140: no effect on survival
					IDH2R172: low CR
Thol et al	CN-AML, 272	NT	12.1% 3.8%	Normal CG	No difference (combined IDHmut R140/R172 analysis due to only 3 patients with IDH2mut (R172))
	AC-AML, 130	NT	(R172 10%)		
Wagner et al	CN-AML, 2/5	10.9%	N1	NPM1mut/FLT3-ITDneg	No effect
	AC-AML, 132	5.3%	NT		
Chou et al	U-AML, 493	5.5%	NT	IDH1mut with FABM1, normal CG, NPM1mut	No effect
	CN-AML, 227	8.8%		Stable marker: retained mutation in 11/11 cases at relapse	
	AC-AML, 249	2.4%			
Schnittger et al	U-AML, 1414	6.6%	NT	IDH1mut with females, FAB M1 or M2, normal CG, NPM1mut	Unfavorable impact on OS, CRR
	CN-AML, 673	10%		2. stable marker: retained mutation in 11/12 cases at relapse	Adverse impact in the NPM1wt
	AC-AML, 741	3.5%			
Paschka et al	U-AML, 805	8.0%	8.7% (R172 31%)	Older, low WBC, and higher PLT, normal CG, NPM1mut	No impact on OS and RFS in the entire cohort
				In CN-AML, NPM1mut/FLT3-ITDneg	In CN-AML, IDHmut with inferior OS and RFS in AML with NPM1mut/FLT3-ITDneg
Figueroa et al	AML, 385, < 60 y	6.2%	8.6% (R172 27%)	Intermediate CG, NPM1mut, mutual exclusive of TET2mut, specific DNA methylation profiles	No survival analysis
Ward et al	U-AML, 96	10.4%	17.7% (R172 29%)	Normal CG	No effect on survival; trend toward improved survival with IDH2mut
				None IDH2 patients with NPM1mut, FLT3mut	
Mardis et al	U-AML, 187	8.0%	0% (R172)	Normal CG	No effect on overall survival; possible inferior OS in CN-AML with NPM1wt
Gross et al	U-AML, 145	7.6%	1.4% (R172)	Normal CG	No effect
Green et al	AML, 1333, < 60 y	8%	NT	Older, normal CG, NPM1mut	No difference
					Adverse factor for relapse in patients with FLT3-ITDneg
Green et al	U-AML, 1473	NT	10% (R172 20%)	IDH2mut (R140) with NPM1mut	Favorable in IDH2mut (R140)
				IDH2mut (R172) with low WBC and lack of other mutations	Unfavorable in IDH2mut (R172)
Doissel et al	U-AML, 529	9.6%	3.0% (R172)	Normal CG; across FAB subtypes except AML, M3	CR tended to be low in IDH1 <sup>mut</sup> , increased RR in IDH1 <sup>mut</sup> , shorter OS in favorable genotype group (FLT3-ITD <sup>neg</sup> /NPM1 <sup>mut</sup> or FLT3-ITD <sup>neg</sup> /CEBPA <sup>mut</sup> )
				IDH1mut with NPM1mut	Low CR in IDH2mut (R172)
				IDH1/2mut (R172) with low WBC and lack of other mutations	
Abbas et al	U-AML, 093	6%	11% (R172 24%)	IDH1/2mut: older, normal CG, NPM1mut	No effect on OS
					IDH1mut: unfavorable in subgroup of FLT3-ITDwt/NPM1wt
Chou et al	U-AML, 446	NT	6.1% (R172 24%)	IDH2mut with normal CG, trisomy 8, NPM1mut, inverse correlation with CD34 and HLA-DR	IDH2mut with better OS in CN-AML
				IDH2mut (R172) with low WBC, mutually exclusive of NPM1mut	
				Stable marker: retained mutation in 7/8 cases at relapse	
Patel et al	U-AML, 196, 199	6.0%	2.0% (R172)	Tendency of IDH1mut with normal CG	No survival analysis
				IDH2mut (R172): lack of other mutations FAB M1, M2	
Patel et al	U-AML, 398	7%	8%	IDH1mut and IDH2mut with NPM1mut, mutual exclusive of IDH1/2mut and WT1mut.	Favorable in IDH2mut (R140)
Rakheja et al	AML with cuplike nuclei, 12	33%	33% (R172 0%)	High incidence of NPM1mut and FLT3-ITD	No survival analysis
Ravandi et al	U-AML, 170	IDH1/2 30%	IDH1/2 30%		Worse OS in FLT3-ITDneg/NPM1mut

Pediatric					
Andersson et al	U-AML, 227	1.3%	2.2%	Normal CG	No effect
Pigazzi et al	U-AML, 165	2.4%	NT	No correlation, FAB M1/M2	No effect
Damm et al	U-AML, 460	1.7%	2.2%	Intermediate age, FAB M1, M2, NPM1mut	No effect

### 3. Facteurs pronostiques liés au traitement

#### a) Délai entre diagnostic et traitement

Une étude américaine a évalué l'impact du délai entre diagnostic et début du traitement sur la réponse et la survie sur une cohorte rétrospective de 1660 LAM (110). Ce travail suggère qu'il est possible de retarder l'initiation du traitement des LAM uniquement chez les patients âgés de plus de 60 ans et qu'il est préférable de ne pas dépasser un délai de 5 jours.

#### b) Obtention de la rémission complète et réponse précoce

L'obtention d'une RC à l'issue d'une seule cure de chimiothérapie d'induction constitue un facteur pronostique essentiel pour la survie sans maladie et la survie globale.

RC est ainsi définie par l'ELN (86) :

- Polynucléaires neutrophiles circulants > 1 G/L,
- Indépendance aux transfusions de culots de globules rouges
- Plaquettes circulantes > 100 G/L,
- Pas de localisation extramédullaire,
- Blastose médullaire < 5%, absence de corps d'Auer.

En cas d'échec, des traitements de rattrapage permettent néanmoins de mettre en rémission certains patients; mais pour limiter le taux d'échec post-induction (d'impact pronostique très défavorable), les stratégies actuelles visent à identifier précocement les patients mauvais répondeurs. C'est l'objectif de la réalisation d'un myélogramme à J15 dans la plupart des protocoles thérapeutiques afin de détecter les patients mauvais répondeurs. La vitesse de clairance sanguine des blastes en cytométrie en flux (CMF) a également été testée avec succès dans cette application (111).

De même l'évaluation de la clairance blastique à J5, influence la réponse et la survie (112).

L'évaluation de la réponse précoce par quantification de la maladie résiduelle MRD sera abordée dans le chapitre éponyme.

### 4. Facteurs pronostiques en situation de rechute

La rechute est définie après une RC par la réapparition d'une blastose médullaire >5%, la présence de blastes dans le sang ou une localisation extramédullaire.

Malgré les progrès thérapeutiques, la fréquence des rechutes demeure élevée et les réponses aux traitements de la rechute sont décevantes avec une durée de seconde rémission souvent brève lorsqu'elle est atteinte et un pronostic sombre. Les facteurs pronostiques à la rechute sont aussi connus. Une étude hollandaise s'est intéressée à 667 patients de moins de 60 ans porteurs de LAM non promyélocytaire en 1<sup>ère</sup> rechute. Les quatre facteurs pronostiques mis en évidence sont la durée de la première rémission, les anomalies cytogénétiques au diagnostic, l'âge à la rechute et les antécédents de greffe de cellules souches. La combinaison de ces quatre facteurs permettait de distinguer trois groupes de risque: un groupe favorable avec une OS à 5 ans de 46 %, un groupe intermédiaire à 18 % et un groupe défavorable à 4 %. A noter néanmoins que 2/3 des patients se trouvaient dans le dernier groupe, avec une survie de 16 % à 1 an: pour ces patients, des approches palliatives ou protocolaires doivent probablement être privilégiées (113).



## G. Traitement des LAM

Les progrès récents dans la connaissance de la biologie des LAM devront conduire à la définition de traitements adaptés à chaque patient sur la base du profil génétique de sa pathologie. Pour l'heure la prise en charge des patients reste relativement uniforme.

Le traitement doit être instauré sous contrôle des désordres métaboliques, ainsi que de l'état infectieux du patient. Dans le cas des LAM à présentation hyperleucocytaire, il pourra être précédé d'une administration de cytostatiques (tel que l'hydroxyurée).

Leucémie aigue promyélocytaire exclue, la prise en charge des LAM repose sur la chimiothérapie intensive et l'allogreffe de moelle osseuse, au moins chez les patients les plus jeunes, capables de tolérer les traitements agressifs (114).

### 1. Traitement d'induction

Le traitement d'induction standard combine la cytarabine avec une anthracycline.

La combinaison habituelle est le « 3+7 » : 7 jours d'administration continue de cytarabine à 100 ou 200 mg/m<sup>2</sup>/J du jour 1 au jour 7 et daunorubicine à 60 mg/m<sup>2</sup>/J du jour 1 au jour 3.

#### a) Perspectives pour le traitement d'induction

Récemment plusieurs études randomisées ont évalué le recours à des doses plus élevées d'anthracyclines ou de cytarabine ou encore l'ajout d'un troisième agent durant l'induction. Il est cependant difficile de comparer ces études car elles diffèrent sur plusieurs paramètres clés, comme le nombre de cycles d'induction, les posologies dans le bras contrôle, et la suite du traitement proposée en fonction de la réponse.

##### (1) Anthracyclines

Trois études se sont attachées à comparer des doses journalières de daunorubicine de 90 contre 45 mg/m<sup>2</sup>/J dans un schéma d'induction 3+7, incluant des patients de tranche d'âge différente. Il en ressort que la dose de 45mg/m<sup>2</sup>/J est suboptimale jusqu'à l'âge de 65 ans (115–118).

Un seul essai récent a comparé les doses de 60 contre 90 mg/m<sup>2</sup>/J en 3+7, suivi d'un second cycle à 50 mg/m<sup>2</sup>/J pour les patients de risque favorable ou intermédiaire. La mortalité précoce était significativement supérieure à J 60 dans le bras 90 mg/m<sup>2</sup>/J. La durée de suivi est trop courte pour conclure de façon solide quant à une éventuelle différence d'OS (119).

Deux essais se sont attachés à évaluer l'idarubicine à 12mg/m<sup>2</sup>/J contre la daunorubicine à 80 mg/m<sup>2</sup>/J en 3+7 dans un cas ou 50 mg/m<sup>2</sup>/J en 5+7 dans le second, sans démontrer de supériorité d'un bras sur l'autre.

Les activités antileucémiques de 60 ou 90 mg/m<sup>2</sup>/J de daunorubicine ou 12 mg/m<sup>2</sup>/J d'idarubicine semblent similaires tout comme les profils de toxicité, en l'absence de second cycle impliquant une anthracycline systématique pour les répondeurs (120,121).

##### (2) Cytarabine

Depuis plus d'une décennie des groupes s'attachent à évaluer la pertinence de schémas à haute dose de cytarabine (HiDAC). Ces traitements ne sont pas homogènes, ils consistent en une dose de cytarabine comprise entre 1000 et 3000 mg/m<sup>2</sup>/12h chaque jour ou bien un jour sur deux associée à une anthracycline dans un schéma type 3+7 ou alternatif, et éventuellement une troisième molécule.

Historiquement, deux études avaient échoué à démontrer un bénéfice clinique clair de ce type d'approche par rapport à l'induction standard (IDAC), notamment du fait de la toxicité des protocoles testés (122,123).

Plus récemment, deux groupes ont testé des approches moins toxiques, associant une faible dose d'étoposide dans un cas, adoptant une démarche en double induction associant l'amsacrine dans l'autre.(124,125) Les résultats diffèrent. Dans la première étude les taux de réponse sont améliorés, sans augmentation de la mortalité précoce, la RFS est plus longue de même que l'OS chez les patients de moins de 45 ans. La seconde étude ne retrouve aucune différence significative entre les bras. La question de l'HiDAC en induction n'a donc toujours pas de réponse claire en 2016.

### (3) Ajout d'une troisième molécule

-Gemtuzumab ozogamicine (GO)

Le GO a été retiré du marché par la FDA (Food and Drug Administration) à cause de la mortalité précoce importante au cours de la première étude qui l'évaluait en induction (126). Cette décision est contestée depuis que plusieurs études ont montré un bénéfice significatif du GO combiné à la chimiothérapie d'induction ou d'induction-consolidation (127–130), mais pas en entretien (126,131).

La dose de 3 mg/m<sup>2</sup> peut être administrée aux patients âgés ou de façon itérative (128).

Le GO bénéficie aux patients de risque favorable et intermédiaire y compris avec FLT3-ITD mais pas à ceux qui présentent un caryotype défavorable (130).

-Analogues de purines

L'ajout de cladribine pourrait présenter un bénéfice particulièrement dans les groupes de haut risque, des patients de plus de 50 ans ou dont le caryotype est défavorable (132).

La clofarabine a une activité antileucémique (133,134), elle est en cours d'évaluation en combinaison avec le 3+7 traditionnel (135).

Dans une population jeune la combinaison fludarabine, cytarabine, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) et idarubicine (FLAG-Ida) a montré une amélioration des taux de RC en une cure et une réduction du risque de rechute (136).

-Sorafenib

Le sorafenib a une activité in vitro sur FLT3-ITD.

Le sorafenib n'a pas montré d'intérêt chez les patients âgés en combinaison avec l'induction et une consolidation avec IDAC avec ou sans FLT3-ITD (137).

Peu de données sont disponibles pour l'heure chez les patients jeunes.

## 2. Traitement post-rémission

### a) Consolidation

Des cycles HiDAC ou IDAC sont recommandés en consolidation. La dose, le schéma et le nombre de cycles ne sont pas consensuels pour toutes les catégories de patients. Néanmoins chez les patients jeunes sans projet d'allogreffe l'administration de plusieurs cycles de consolidation HiDAC à 3g/m<sup>2</sup> d'aracytine deux fois par jour aux jours 1,3,5 est le schéma privilégié.

L'essai randomisé ALFA-0702/CLARA (dont est issu 75% de la cohorte étudiée dans le présent travail) a comparé des cycles de consolidation Clofarabine/IDAC contre HiDAC chez des patients de risque intermédiaire et défavorable. La RFS était prolongée dans le premier bras.

### **b) Transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques**

L'un des points les plus critiques de la prise en charge est l'évaluation de la balance bénéfico-risque associée à l'allogreffe en première rémission pour chaque patient.

Si elle reste le meilleur moyen de prévenir la rechute, l'allogreffe est associée à une forte morbidité et une forte mortalité liées au traitement (TRM), surtout chez les patients âgés.

Chez les patients de risque favorable (LAM-CBF, et LAM à caryotype normal LAM-CN avec mutation biallélique de *CEBPA* ou mutation de *NPM1* sans *FLT3-ITD*), le risque de rechute est suffisamment bas et le taux de succès du rattrapage suffisamment élevé pour que l'allogreffe puisse être reportée à la seconde rémission. Cette stratégie a été validée par des études donneur contre sans donneur (138–140).

Les patients jeunes appartenant aux groupes de pronostic intermédiaire ou mauvais sont traditionnellement éligibles pour une allogreffe phéno- ou géno-identique en première RC.

L'évaluation de la balance bénéfico-risque telle qu'elle est codifiée par l'ELN (86) doit déjà être reconsidérée devant les avancées récentes dans la description des facteurs pronostiques (voir III.F) et les progrès des protocoles d'allogreffe. En effet l'incidence de la TRM a fortement diminué ces dernières années, surtout chez les patients âgés grâce au recours au conditionnement d'intensité atténuée (RIC). Le RIC pourrait même être préféré au conditionnement myélo-ablatif (MAC, traditionnel) chez les plus de 45 ans (141–143). Les sources alternatives de cellules souches sont aussi plus exploitées et de façon plus sûre, comme par exemple la greffe haplo-identique suivie de l'administration de cyclophosphamide.

## **3. Thérapies ciblées et sous-groupes particuliers de LAM**

### **a) LAM-CBF**

Des arguments forts plaident en faveur de l'usage du GO associé à une chimiothérapie intensive (ICT) pour traiter les LAM-CBF. Le GO n'est toujours pas disponible hors essais cliniques pour ces patients (127,130).

Le dasatinib n'a pas montré d'intérêt en maintenance dans les LAM-CBF avec mutation de *KIT* ou hyperexpression de *KIT* (144). Il est en cours d'évaluation (phase 3) en induction combiné avec ICT (145,146).

### **b) LAM avec mutation *FLT3-ITD***

Le Lestaurtinib n'a pas montré d'intérêt ni en consolidation ni dans les maladies en rechute/réfractaires (147,148).

La Midaustaurin est en cours de phase 3 en première induction avec 3+7.

Le Sorafenib a été évoqué ci-avant en induction, son intérêt post-greffe est en cours d'évaluation.

Les inhibiteurs de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>nde</sup> génération ont tendance à sélectionner des mutants *FLT3* résistants (149). De nouveaux inhibiteurs sont en développement.

### c) *LAM avec mutation de NPM1*

Plusieurs groupes ont voulu étudier les effets de l'acide tout-trans rétinoïque (ATRA) associé à la chimiothérapie dans les LAM non promyélocytaire. Les résultats sont contradictoires. Pas d'effet significatif dans un essai, contre un bénéfice restreint aux patients avec mutation de *NPM1* dans un second (150,151).

Le trioxyde d'arsenic (ATO) pourrait avoir un intérêt dans les LAM avec mutation de *NPM1* selon des études précliniques (152,153).

### d) *LAM avec mutations d'IDH1/2*

#### (1) Les inhibiteurs des IDH mutées.

Plusieurs études précliniques ont apporté des preuves de concept concernant les inhibiteurs des enzymes IDH mutées, montrant une levée du blocage de différenciation lié aux IDHm dans des cellules de patients atteints de LAM avec mutation *IDH2* R140Q, associée à la disparition de l'hyperméthylation de l'ADN et une diminution des quantités de D-2HG intracellulaire dans une lignée cellulaire modèle d'érythroleucémie mutée *IDH2* R140Q et des cellules de gliomes avec mutation d'*IDH1* (154–156).

De façon analogue à l'acide tout-trans-rétinoïque dans les leucémies aiguës promyélocytaire, les inhibiteurs d'IDHm lèvent le blocage de maturation des cellules leucémiques qui, une fois leur différenciation terminale atteinte suivront leur destin naturel en mourant d'apoptose. La présence d'une chimiothérapie concomitante promeut également l'apoptose des cellules leucémiques, cette fois en cours de différenciation, du fait de leur division rapide. Les agents différenciateurs présentent également l'avantage de n'être théoriquement pas cytopénisants.

L'évaluation clinique de plusieurs inhibiteurs pharmacologiques sélectifs des IDH mutées est en cours. Les études, de phase I et II, sont répertoriées dans le [Tableau 10](#). Trois d'entre elles incluent spécifiquement des hémopathies malignes.

Des résultats intermédiaires des deux études les plus avancées, portant sur l'AG-221 et l'AG-120, deux petits inhibiteurs sélectifs des IDH2m et IDH1m respectivement, ont été présentés (157,158). Ils sont particulièrement prometteurs :

Les deux molécules ont montré des profils de bonne tolérance et faible toxicité autorisant la poursuite de leur développement.

-Concernant l'AG-220, au premier mai 2015, 177 patients atteints de LAM en rechute ou réfractaires (LAM-R/R) ou non précédemment traitées, de SMD, leucémies myélomonocytaires chroniques ou sarcomes myéloïdes avaient été traités.

Les concentrations sériques et médullaires en D-2HG étaient normalisées chez 98% des patients avec mutation *IDH2* R140Q et 88% des patients avec mutation *IDH2* R172K. Cette différence entre mutations n'était pas retrouvée sur le plan de l'efficacité du traitement.

Sur 158 patients évaluable le taux de réponse globale était de 40%, dont 16,5% de véritables RC, associant clairance des blastes médullaires et restauration des taux de plaquettes et polynucléaires neutrophiles circulants.

Une importante variété de types et de cinétiques de réponse était observée incluant non seulement les véritables RC durables, mais aussi des cas de normalisation du compte de blastes médullaires sans

reconstitution hématologique complète ou à l'inverse des rémission partielle définies par une réduction de plus de 50% du taux de blastes médullaires sans clairance totale, associée en revanche à une normalisation de la numération sanguine. Enfin certains patients présentaient de façon durable une « maladie stable », fait rare dans les LAM. 21,7% des LAM-R/R atteignaient une RC vraie. Et l'ensemble composite des différentes réponses, vraies RC comprises et hors maladies stables représentait 28,6% des LAM-R/R.

Plusieurs patients en réponse partielle ou maladie stable ont pu recevoir plusieurs cycles de traitement et restaient dans l'étude aussi longtemps que les patients en RC, suggérant qu'un bénéfice clinique pourrait exister sans avoir atteint la RC.

-L'essai portant sur l'AG-120 avait inclus, au premier juillet 2015, 66 LAM-R/R et SMD récurrents ou réfractaires, dont 61 avaient une réponse évaluable. Une réponse objective était observée chez 22 sujets (36%) dont 11 en RC (18%). Les réponses étaient durables : la durée médiane de réponse était de 5,6 mois et plusieurs patients avaient une réponse d'au moins 11 mois. Une étude moléculaire complémentaire est en cours afin d'explorer les mécanismes de la réponse et de la résistance. Comme attendu les réponses étaient obtenues sans passer par une période d'aplasie.

Les responsables de l'essai rapportent plusieurs cas de syndrome de différenciation, se présentant selon les cas sous la forme d'une fièvre sans point d'appel infectieux, d'œdèmes, d'hypotension, d'effusions pleurales et péricardiques, ces signes cliniques étant contemporains d'une polynucléose neutrophile importante. Ce syndrome peut être dangereux s'il n'est pas rapidement diagnostiqué et traité par hydroxyurée, corticoïdes et éventuellement interruption temporaire de l'inhibiteur (159).

## (2) Autres approches

Le fait que les mutations d'*IDH1/2* sont associées à une hyperméthylation de l'ADN suggère une possible efficacité des agents déméthylants. La question n'a été étudiée que dans trois études rétrospectives sur des effectifs réduits, avec des résultats discordants (160–162).

Deux études précliniques portant sur la mutation *IDH1* R132H dans des modèles murins de sarcomes et de gliomes respectivement, rapportent un possible intérêt de la vaccination par peptide (163,164).

Tableau 10 : Essais en cours testant les inhibiteurs pharmacologiques des enzymes IDH mutées (165)

Target mutation	Compound (Company)	CT.gov identifier	Patient population	Target	Study design	Status (as of October 2015)
IDH2	AG-221 (Agiros/Celgene)	NCT01915498	Advanced hematologic malignancies; includes R/R AML and untreated AML in patients declining SOC chemotherapy	AML in	Phase I, multicenter, open-label, dose escalation	Dose expansion ongoing
IDH2	AG-221 (Agiros/Celgene)	NCT02273739	Gliomas and other solid tumors, including angioimmunoblastic T-cell lymphoma, intrabepatic cholangiocarcinoma, chondrosarcoma	T-cell	Phase I/II, multicenter, open-label, dose escalation and expansion	Ongoing
IDH1/2	AG-881 (Agiros)	NCT02481154	Advanced solid tumors including glioma, cholangiocarcinoma, chondrosarcoma	chondrosarcoma	Phase I, multicenter, open-label, dose escalation and expansion	Ongoing
IDH1/2	AG-881 (Agiros)	NCT02492737	Advanced hematologic malignancies; includes AML and MDS	AML and MDS	Phase I, multicenter, open-label, dose escalation and expansion	Ongoing
IDH1	AG-120 (Agiros)	NCT02074839	Advanced hematologic malignancies; includes relapsed/primary refractory AML, recurrent or refractory MDS	AML, recurrent or refractory MDS	Phase I, multicenter, open-label, dose escalation and expansion	Dose expansion progress
IDH1	AG-120 (Agiros)	NCT02073994	Gliomas and other advanced solid tumors including cholangiocarcinoma, chondrosarcoma	cholangiocarcinoma, chondrosarcoma	Phase I, multicenter, open-label, dose escalation and expansion	Ongoing
IDH1R132	IDH305 (Novartis)	NCT02381886	Advanced malignancies (including hematologic)	hematologic	Phase I, multicenter, open-label, dose escalation	Ongoing

SOC, standard of care.

#### **e) LAM avec cytogénétique de pronostic défavorable**

Dans ce sous-groupe les progrès sont modestes. La cladribine combinée à divers schémas d'induction pourrait bénéficier à ces patients (132,166).

#### **4. Patients âgés**

Le pronostic des patients âgés demeure sombre. Il répond à des facteurs liés au patient et à la leucémie. L'état général et la présence de comorbidités ou de dysfonction d'organes affectent la tolérance à l'ICT. Les leucémies post-syndrome myélodysplasique de mauvais pronostic sont aussi plus fréquentes dans ce groupe.

Lorsque le risque ELN est favorable, l'ICT est préférée si elle peut être tolérée (167,168). Lorsque les patients sont trop fragiles pour l'ICT, l'administration de cytarabine faible dose (LDAC) est assez consensuelle mais n'est d'aucun secours si le caryotype est défavorable (169).

La décitabine et l'azacitidine, deux agents hypométhylants ont montré de meilleurs résultats que les LDAC à moyen terme, avec une plus longue survie médiane et à un an, sans bénéfice à long terme cependant. Les agents hypométhylants bénéficient particulièrement aux patients dont le caryotype est défavorable et/ou présentant des anomalies liées aux SMD (170,171).

Des résultats de phase II suggèrent un intérêt possible du Volasertib, (inhibiteur de polo like kinase) associé à LDAC (172), et de la vosaroxine (inhibiteur de topoisomérase) associé à la décitabine (173).

#### **5. LAM réfractaires et en rechute**

Le traitement des LAM réfractaires ou en rechute reste mal défini. L'âge, la durée de la première rémission, la cytogénétique et l'antécédent de greffe allogénique de moelle osseuse sont les paramètres qui président aux choix du praticien. Hors leucémie promyélocytaire, le principal objectif de la thérapie de rattrapage, si elle est mise en place, est de mener les patients à l'allogreffe, à l'aide de thérapies ciblées ou d'une ICT si possible. Lorsqu'une seconde réponse est obtenue, l'allogreffe bénéficie au moins aux patients qui appartenaient initialement aux groupes de risque intermédiaire et élevé (174).

En rattrapage choix des molécules et de leurs posologies est assez ouvert. La cytarabine est souvent utilisée, à dose variable, avec une anthracycline ou bien une molécule nouvelle dans le cadre d'un essai thérapeutique.

### **H. MRD des LAM**

#### **1. Généralités**

##### **a) Définition**

Dans les années soixante (175), l'obtention d'une RC, définie par un compte de blastes en microscopie inférieur à 5% dans la moelle osseuse en sortie d'aplasie a été reconnue comme un marqueur de première importance du pronostic à long terme des patients atteint de LAM. Depuis lors les progrès techniques n'ont cessé de générer de nouveaux moyens d'étudier et quantifier la maladie résiduelle, c'est-à-dire le contingent de cellules pathologiques encore présentes chez le patient à un stade donné de son traitement, autrement dit les cellules les plus résistantes à la chimiothérapie et susceptibles de générer une rechute. Dans les années 80 et 90 le terme de maladie résiduelle minimale (minimal residual disease, MRD) s'est imposé pour distinguer l'évaluation morphologique de l'évaluation par ces techniques plus sensible en RC (176). Ainsi traditionnellement

toute technique dont la sensibilité excède celle de la microscopie en lumière visible (y compris assistée par immunohistochimie) est considérée comme une technique d'évaluation de la MRD.

La mesure de la MRD est un concept qui dépasse largement le cadre des LAM. Dans des pathologies telles que la leucémie myéloïde chronique et les leucémies aiguës lymphoblastiques, sa valeur pronostique indépendante surclassant les autres facteurs pronostiques pré-thérapeutiques est bien établie et son utilisation largement répandue et standardisée.

Sa faisabilité et son intérêt au regard des progrès thérapeutiques récents sont à l'étude ou en développement dans d'autres hémopathies comme le myélome ou certains lymphomes.

La quantification de la maladie résiduelle présente des intérêts à différents temps thérapeutiques qu'il convient de distinguer (Figure 12):

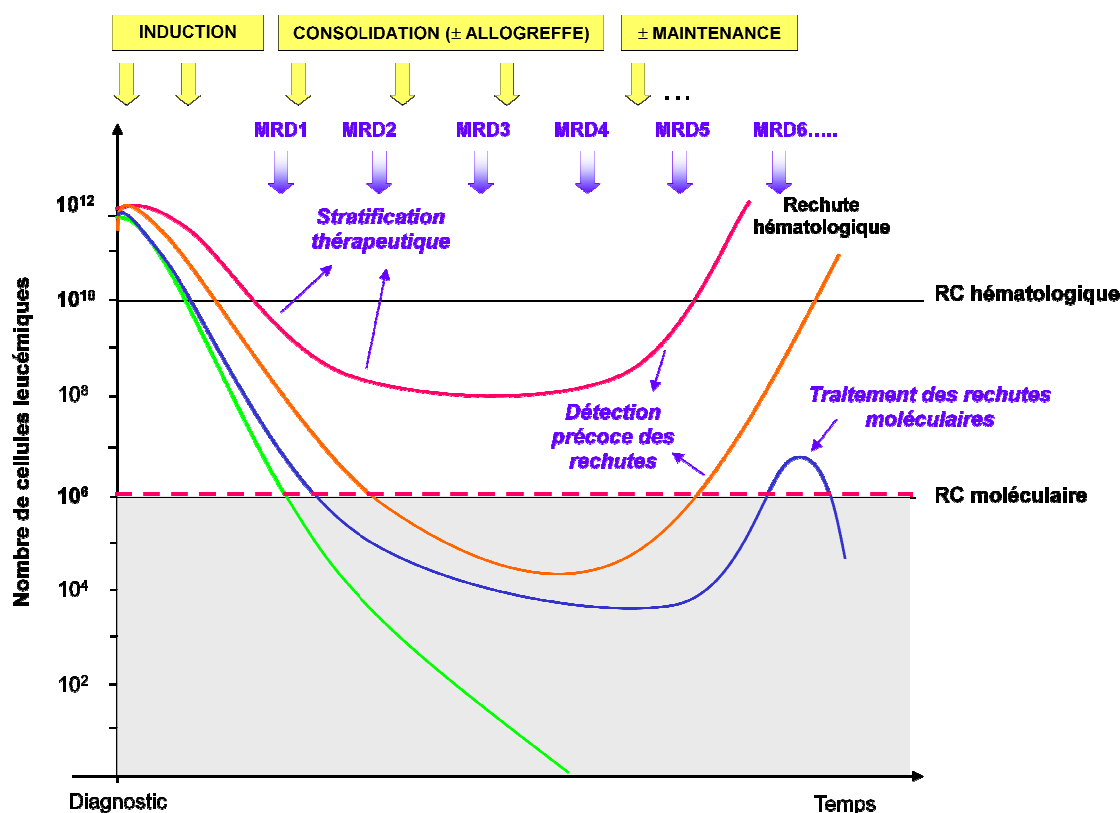


Figure 12 : MRD et temps thérapeutiques (source A. Renneville)

### b) Evaluation de l'efficacité du traitement

Depuis le début des années 2000, un grand nombre d'études mono- ou multi-centriques ont confirmé l'impact pronostique d'une valeur faible de la quantification de la MRD au cours du traitement des LAM (177–184). Certaines études définissent des seuils décisionnels permettant la stratification des patients en groupes de risque de rechute. Ces seuils se situent généralement autour de 0,1%-1% en fonction des cibles. D'autres groupes ont cherché à démontrer une relation linéaire entre diminution des valeurs de MRD et pronostic.

Le moment idéal pour mesurer la MRD est soumis à controverse. Faire le point en fin d'induction peut permettre d'orienter précocement un patient à haut risque vers une intensification sans perte de temps ni toxicité associée à un ou plusieurs cycles de consolidation. A l'inverse, des données du groupe HOVON suggèrent que certains patients en RC mais avec une MRD supérieure au seuil



décisionnel en fin d'induction voient celle-ci diminuer suffisamment en fin de consolidation pour permettre leur reclassement dans un groupe de faible risque de rechute (183).

### **c) *Post-traitement: détection précoce des rechutes***

Les rechutes peuvent être brutales et survenir quelques jours seulement après un myélogramme ne retrouvant pourtant aucun excès de blastes, et sans autre signe biologique ou clinique avant-coureur.

Il est désormais reconnu qu'au-delà de certains seuils de positivité de la MRD, la rechute est quasi-inévitable en l'absence de nouvelle intervention thérapeutique (185,186). Le terme de rechute moléculaire est employé dans cette situation. Le suivi peut souvent être effectué sur sang plutôt que sur moelle (180,185–188). Une attention toute particulière doit être portée à la fréquence des points de suivi de la MRD : selon les sous-types de LAM les cinétiques de rechute sont différentes, ainsi une rechute peut survenir rapidement et ne pas être détectée si l'intervalle de temps entre les prélèvements de contrôle est trop long (179,185,187,189,190).

### **d) *MRD pré-allogreffe de moelle osseuse***

Plusieurs études décrivent un impact pronostique défavorable de la positivité de la MRD avant transplantation (191–193). L'allogreffe profite malgré tout plus à ces patients que la chimiothérapie seule (183).

Dans ce cas la positivité de la MRD pourrait permettre d'envisager des mesures additionnelles spécifiquement pour ces patients à haut risque.

## **2. *Techniques de mesure de la MRD***

### **a) *Techniques de biologie moléculaire***

Les appareils de réaction en chaîne de la polymérase quantitative (QPCR) sont largement répandus dans les laboratoires. La nature exponentielle de la PCR permet d'atteindre des seuils de détection très bas. Les protocoles sont de plus en plus standardisés. Les transcrits de fusion, les gènes mutés ou surexprimés sont actuellement suivis avec cette technique, précédée d'une étape de rétro-transcription (RT) en cas de travail sur ARN (transcrits).

#### **(1) *Transcrits de fusion***

Certains types de LAM sont définis par la présence d'une translocation chromosomique récurrente, qui génère l'expression d'un transcrit de fusion pouvant être utilisé comme marqueur spécifique des cellules leucémiques (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *DEK-NUP214*, *KMT2A-MLLT3* entre autres) (194–197). Malheureusement seulement 30% des adultes, et 50% des enfants présentent de telles translocations (Chez les enfants plus de CBF et de réarrangements *KMT2A*). (198) Le suivi de ces marqueurs en RT-QPCR est particulièrement sensible (autour de  $10^{-5}$ ), bien qu'il dépende du niveau d'expression du transcrit (194).

#### **(2) *Mutations***

La quasi-totalité des LAM présente des mutations sur un certain nombre de gènes maintenant bien décrits, mais seuls certains gènes le sont sous forme de hotspots (*NPM1*, *IDH1/2* par exemple), permettant la détection et la quantification des copies d'ADN ou d'ARN mutés par QPCR ou RT-QPCR sans qu'il ne soit nécessaire de designer des amorces spécifiques d'allèle pour chaque patient (199).

Cette dernière méthode nécessite des moyens financiers et humains qui dépassent les capacités de la plupart des laboratoires (elle est réservée à l'étude de la MRD des LAL, dans un cadre standardisé particulier). Nous verrons par ailleurs plus loin qu'indépendamment des contraintes techniques tous

les gènes ne se valent pas en tant que marqueurs de MRD. *NPM1* est le gène le plus performant étudié dans cette application. Le suivi sur ARN permet d'atteindre une sensibilité allant jusqu'à  $10^{-5}$ . Les mutations exploitables de *NPM1* sont retrouvées dans 30% des LAM-CN. Elles sont plus rares chez l'enfant (198).

### (3) Gènes surexprimés

Un transcrit de fusion ou un gène muté exploitable n'existent pas pour toutes les LAM.

Assurer le suivi de la MRD chez les patients restant est d'autant plus important qu'ils sont en grande partie ceux dont le pronostic est moins favorable (ni LAM-CBF, ni *NPM1* muté).

Mesurer la surexpression d'un gène présente une difficulté particulière : l'expression normale par les cellules saines doit être prise en compte. Ainsi même pour un marqueur surexprimé dans quasiment toutes les LAM, la nécessité d'un niveau de surexpression suffisant pour obtenir une sensibilité analytique informative restreint le nombre de patients pouvant bénéficier d'un suivi. L'exemple classique est le gène *WT1* (Wilms Tumor 1). La valeur pronostique de la MRD *WT1* sur le risque de rechute et la survie a été démontrée par de nombreuses publications et cela quelque soit le stade du traitement (post induction, prégreffe ou post greffe). 70 à 80% des patients pourront ainsi être suivis avec une sensibilité de  $10^{-2}$  à  $10^{-3}$  dans le sang (et rarement au-delà de  $10^{-2}$  dans la moelle) (181,200,201).

### (4) Séquençage de nouvelle génération (NGS)

Le NGS est encore à l'état de développement dans cette application. Il pourrait permettre la détection et le suivi d'un grand nombre d'anomalies, (transcrits, hyperexpression, mutations hotspot ou non comme *CEBPA* par exemple), autorisant non seulement le suivi de MRD classique mais aussi l'analyse fine de l'évolution des sous-populations clonales.

#### **b) Cytométrie en flux**

Il est possible de suivre la maladie résiduelle des LAM par CMF grâce à l'identification d'immunophénotypes aberrants associés à la leucémie (LAIP). Ces LAIP peuvent être classés en quatre types :

- Infidélité de lignée, lorsqu'un marqueur de cellule B, T ou NK est exprimé par les blastes myéloïdes (ex : CD7, CD19, CD2)

- Hyper-expression d'antigène par rapport aux cellules normales (ex : CD33 notamment)

- Perte d'expression d'un antigène (ex : DR CD33 CD13)

- Expression asynchrone d'antigène, lorsque des marqueurs d'immaturité ou de maturité sont exprimés à des stades aberrants (ex : CD34+ CD65/ CD11b) (202)

Les protocoles multi-couleurs actuels permettent une caractérisation très fine de chaque cellule. Si un panel d'anticorps suffisamment large est utilisé, 80 à 90% des patients pourront être suivis (182,183).

Dans de nombreux cas l'expression des antigènes de surface varie au sein de la population clonale leucémique, en partie du fait des divers stades de maturité. Un même LAIP ne représentera pas toutes les cellules leucémiques, et donc pas nécessairement celles qui auront la capacité de provoquer une rechute.

Afin de résoudre ce problème l'ajout de marqueurs de la cellule souche aux marqueurs de LAIP a été proposé (203,204). Cela grève théoriquement la sensibilité analytique dans la mesure où les cellules souches leucémiques sont rares, mais l'approche a montré des performances comparables à la CMF-LAIP classique ainsi qu'à la quantification de l'hyperexpression de *WT1* dans une étude (205).

### 3. Limites du suivi de la MRD

#### a) Evolution clonale

Le clone malin dominant au diagnostic est souvent génétiquement instable et des évolutions vont se produire en son sein au cours de la progression de la pathologie. De plus le traitement peut sélectionner un sous-clone minoritaire de telle manière qu'il devienne majoritaire à la rechute. La fréquence des modifications de cible est très variable d'un marqueur de MRD à l'autre. Elle est par exemple rarissime pour *NPM1*, alors que les mutations de *FLT3-ITD* et *WT1* disparaissent ou apparaissent à la rechute dans plus de 20% des cas (206–210).

Les marqueurs immunophénotypiques n'étant pas partie prenante des processus leucémiques mais plutôt les produits d'une homéostasie cellulaire perturbée, ils seront les plus fréquemment perdus (211,212). Il est donc prudent de suivre plusieurs LAIP à la fois pour éviter les résultats faussement négatifs suite à la perte d'une cible. Cela nécessite le recours à des panels d'anticorps très larges et donc coûteux. Le suivi de la MRD basé sur des marqueurs des cellules souches ont été décrits comme stable à la rechute (205).

#### b) Clones pré-leucémiques

Les mutations de *DNMT3A* ont été décrites comme pouvant persister après éradication du clone leucémique (213,214) (215,216). Ce gène est même désormais considéré comme pouvant signer une hématopoïèse clonale de signification indéterminée. Il en est de même pour *TET2*.

On considère généralement que les gènes mutés le plus précocement au cours de la leucémogénèse sont les meilleurs candidats en tant que marqueurs de MRD car ils sont les moins susceptibles d'évoluer à la rechute. Mais, en contrepartie, ces gènes peuvent se révéler être dans certains cas mutés au sein d'un clone pré-leucémique.

#### c) Positivité de la MRD post-traitement

Une MRD détectable post-consolidation n'est pas synonyme de rechute. Il y a pour tous les marqueurs un seuil en dessous duquel la rechute est possible, mais pas certaine (183–187,189). Il se pourrait que les marqueurs mettent en évidence des cellules trop matures pour être capables de provoquer une rechute. La CMF sur cellules souches devrait pouvoir répondre à cette question dans les prochaines années. Une autre hypothèse est que les cellules leucémiques détectées sont en assez petit nombre et sensibles à l'action du système immunitaire pour que leur prolifération soit contenue. Le fait que le seuil de rechute certaine soit plus élevé chez les patients allogreffés plaide dans ce sens (187) mais les données actuelles n'autorisent aucune conclusion.

### 4. MRD et attitude thérapeutique

Un patient classé sur la base des facteurs pronostiques pré-thérapeutiques dans un groupe de haut risque de rechute mais présentant une MRD intéctable en fin d'induction ou de consolidation peut-il être dispensé d'une allogreffe de moelle osseuse ? Ou bien au contraire est-ce spécifiquement ces patients que l'allogreffe a le plus de chance de sauver ?

De même, un patient en rechute moléculaire doit-il recevoir au plus vite un traitement pré-emptif ? Mais si ce traitement est toxique, ne vaut-il pas mieux attendre la rechute cytologique pour traiter ?

Plusieurs groupes se sont penchés sur ces questions, leurs résultats sont résumés dans le [Tableau 11](#). Aucun résultat d'étude randomisé n'est disponible pour le moment.

**Tableau 11 : MRD et attitude thérapeutique (217)**

Response evaluation	Trial	Result	<i>p</i>
Treatment intensification, chemotherapy	MRC AML 18	Pending	
Treatment intensification, allogeneic transplant	Zhu et al. [2013]	OS 72% in transplanted high-risk patients	0.007
		OS 27% in nontransplanted high-risk patients	
Treatment de-escalation	Zhu et al. [2013]	OS 76% in transplanted low-risk patients	0.013
		OS 100% in nontransplanted low-risk patients	
Molecular relapse	Trial	Result	
Wait and watch	AML17+	Pending	
	AML19		
Initiation of donor search	AML17+	Pending	
	AML19		
Demethylating agent	Socel et al. [2011]	7/10 response	
		3/10 reentered CR	
	Platzbecker et al. [2012]	10/20 reentered CR	
		4/20 long term survivors	
Leukaemia aberration specific treatment	Boissel et al. [2011]	1/8 long-term survivors	
Discontinuation of immunosuppression	Doubek et al. [2009]	1/3 long-term survivor	
Donor lymphocyte infusion	Doubek et al. [2009]	3/3 response	
		1/3 long-term survivor	
	Pozzi et al. [2013]	OS 44% 17 DLI-treated patients <i>versus</i> 14% 21 non-DLI-treated patients	0.004
Reduced dose standard chemotherapy	Doubek et al. [2009]	3/15 response	
		No long-term survivors	
Standard chemotherapy	AML17+	Pending	
	AML19		
Direct allogeneic transplantation	none		
AML, acute myeloid leukaemia; CR, complete response; MRC, Medical Research Council; MRD, minimal residual disease; OS, overall survival.			

#### **a) Intensification du traitement guidée par la MRD**

Un premier travail a été mené en 2010 incluant des LAM pédiatriques, dans lequel la stratification du risque basée sur la maladie résiduelle ajoutée aux facteurs de risque pré-traitement déterminait l'intensification du traitement et la consolidation. Les bons résultats en terme de survie à long terme étaient attribués par les auteurs au recours à la stratification sur la MRD (bien que l'étude ne soit pas randomisée) (218).

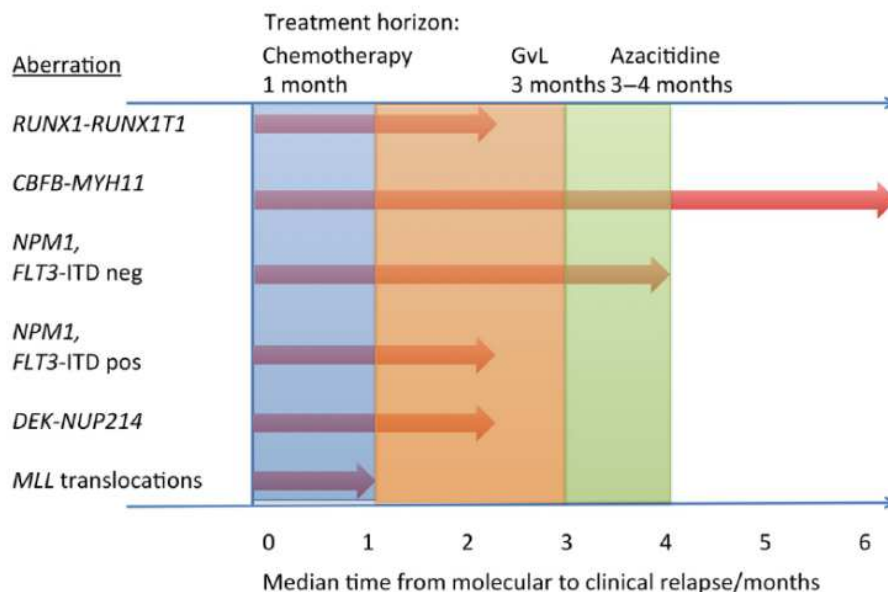
Une seconde équipe a utilisé la MRD au seuil décisionnel de 0,1% comme critère d'indication de l'allogreffe dans des LAM-CBF de l'adulte. Un bénéfice était retrouvé pour le groupe des patients

dont l'orientation thérapeutique était guidée par la MRD comparé à celui des patients ayant souhaité aller contre la décision ainsi suggérée. Ce type d'approche est cependant exposé au risque de biais de sélection (219).

## b) Traitement pré-emptif

### (1) Cinétique de rechute

Les cinétiques de rechute sont très différentes d'un sous-type de LAM à l'autre (185–187,189). Les données publiées sont résumées dans la **Figure 13** (217). Comme le suggère cette illustration la connaissance de ces cinétiques pourrait permettre de choisir le traitement pré-emptif le plus pertinent devant une rechute moléculaire ou à défaut à préciser la fréquence de la surveillance.



**Figure 13 : Délai médian de la rechute moléculaire à la rechute clinique et délai d'action des traitements pré-emptifs (217)**

### (2) Quels traitements pré-emptifs ?

La transfusion de lymphocytes du donneur (donor lymphocytes infusion DLI) a montré un bénéfice en terme de survie dans un groupe de 17 patients en rechute moléculaire comparé à 21 patients du même centre eux aussi en rechute moléculaire mais dont le type de greffon ou l'indisponibilité du donneur ne permettait pas de réaliser des DLI (220).

Le Dasatinib n'a pas montré d'intérêt en traitement pré-emptif des LAM-CBF en rechute moléculaire par rapport à la littérature (144).

L'azacitidine a permis d'éviter ou plus souvent de différer la rechute dans deux études non randomisées. Le recours à cette molécule ou à un autre agent déméthylant ne serait envisageable que pour les LAM dont la cinétique de rechute est lente (221,222).

## 5. Les mutations d'*IDH1/2* en MRD

Nous venons de voir que les marqueurs de MRD disponibles s'ils sont variés, ne sont pas présents chez tous les patients. Pour résumer la situation en biologie moléculaire les patients qui n'ont pas un transcrite de fusion ni une mutation exploitable de *NPM1* pourront souvent être suivis sur l'hyperexpression de *WT1*, moins performante sur les plans de la sensibilité et de la spécificité vis-à-vis de la LAM. La MRD *FLT3-ITD* est techniquement plus difficile à mettre en place en routine

hospitalière et ce marqueur peut être perdu à la rechute, mais son impact pronostique a été montré (209).

Le développement de nouveaux marqueurs de MRD dans les LAM pourrait permettre de suivre plus de patients, et d'assurer un suivi de meilleure qualité soit par l'utilisation d'un marqueur plus performant soit grâce au suivi de plusieurs cibles à la fois.

L'évaluation des mutations des gènes *IDH1/2* dans cette application a donc suivi de près leur découverte. Leur organisation en « hotspots » facilite techniquement leur accès, elles sont relativement précoces dans le processus de leucémogénèse et donc peut susceptibles d'être perdues au cours de l'évolution clonale (106). Elles sont présentes dans 15 % des LAM et sont récemment devenues des cibles thérapeutiques prometteuses. Elles possédaient donc à priori les qualités d'un bon marqueur de MRD.

-Chou et ses collaborateurs ont analysé en 2012 des prélèvements de moelle osseuse de 46 patients au diagnostic, en RC et à la rechute. Etaient étudiées des mutations *IDH1* R132 *IDH2* R140 et R172 (respectivement n=19 ; 18 et 9) en séquençage par technique Sanger. L'évolution de la MRD *IDH1/2* était en adéquation avec l'histoire de la maladie pour 43 des 46 patients (223).

-En 2013 une équipe américaine retrouvait des résultats similaires en mesurant la MRD via le 2-HG du plasma médullaire quantifié en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Mais sur les 6 patients étudiés (2 mutés *IDH1*, 4 *IDH2*) seuls 2 avaient atteint la RC (47).

-En 2013 également une équipe tchèque comparait l'évolution de la MRD *IDH2* R140Q en QPCR aux données cliniques et à la MRD *NPM1* chez 8 patients (6 *NPM1*) sur 60 échantillons de sang ou moelle. La MRD *IDH* était bien corrélée au statut de la maladie et à la MRD *NPM1* sauf pour un patient (224).

-En 2014 une étude du groupe ALFA (Acute Leukemia French Association) a montré que les quantités de 2-HG sérique et leur ratio stéréoisomérique D/L, mesurés en spectrométrie de masse prédisaient étaient corrélées à la présence d'une mutation d'*IDH1/2* chez les patients leucémiques, mais surtout étaient prédictives en fin d'induction (n=36) de l'OS et de la survie sans maladie (DFS) ainsi que fortement corrélées aux MRD *WT1* et *NPM1* (225).

-Une étude récente réalisée au sein du laboratoire d'hématologie du CHRU de Lille, au nom du groupe ALFA, avait pour objet de comparer la MRD *NPM1* en RT-QPCR aux MRD *IDH1/2* (et *DNMT3A*, voir III.H.3.b) quantifiées en NGS. Les patients inclus étaient issus du protocole ALFA-0701 et étaient porteurs d'une mutation de *NPM1*, 8 avaient également une mutation d'*IDH1* et 9 une mutation d'*IDH2*. La MRD était quantifiée en fin d'induction, en fin de première et de seconde consolidation.

Secondairement à des problèmes de contaminations le seuil de détection des mutations était limité à 0.07% pour les deux gènes. Le seuil décisionnel définissant une MRD dite positive ou négative, retenu après tracé d'une courbe ROC était de 0,1%.

Les MRD *NPM1*, *IDH1/2* et les histoires de la maladie concordaient dans 13 cas: 4 patients ont rechuté et avaient des MRD positives, 9 restaient en RC avec des MRD négatives. Chez les 4 patients restant en revanche existaient des points pour lesquels la mutation de *NPM1* était indétectable alors que les niveaux d'*IDH1/2* étaient positifs.

La MRD a donc permis de prédire la rechute, ou une évolution pathologique clonale dans le cas du dernier patient, dans 100% des cas, faisant ainsi mieux que la MRD *NPM1* dans ce petit groupe de patients.

## IV. Objectifs

Dans ce contexte d'intérêt croissant pour la MRD *IDH1/2*, il devenait nécessaire d'évaluer son impact pronostique sur une large cohorte. Le seuil décisionnel de la précédente étude lilloise était très proche du seuil de détection. Peut-être le meilleur seuil décisionnel avoisine-t-il effectivement 0,1%. A moins qu'une technique plus sensible ne permette de détecter de très discrètes réponses incomplètes ou rechutes moléculaires.

Nous avons donc choisi d'évaluer l'impact pronostique de la MRD *IDH1/2* sur les patients mutés des protocoles ALFA-0701 et 0702, en effectuant la quantification en PCR digitale, espérant atteindre une meilleure sensibilité analytique qu'en NGS, tout en simplifiant le procédé et en diminuant les coûts en vue d'une possible utilisation hospitalière future. L'objectif de ce travail était également de tester ce nouvel outil.

## V. Matériel et méthodes

### A. Patients

Parmi les patients des protocoles ALFA-0701 (n=278) et 0702 (n=704) ont été retenus ceux présentant une mutation d'*IDH1* R132C/R132H/R132G, ou d'*IDH2* R140Q/R172K, ayant obtenu une RC et pour lesquels au moins un prélèvement de moelle osseuse ultérieur à l'induction était exploitable (culot cellulaire ou ADN déjà extrait). L'analyse a été effectuée sur les échantillons de moelle osseuse ou à défaut de sang périphérique prélevés lors du diagnostic, ainsi que l'ensemble des points de suivi sur moelle osseuse uniquement, disponibles pour cet effectif. Les échantillons reçus des centres participants étaient conservés au laboratoire d'Hématologie au Centre de Biologie Pathologie de Lille et au Centre de Conservation des échantillons du CHRU de Lille.

#### 1. Les protocoles Alfa 0701 et 0702

Les protocoles ALFA-0701 et 0702 sont des essais cliniques académiques menés par le groupe coopérateur ALFA, qui regroupe environ 1/3 des centres français prenant en charge les patients atteints de LAM.

-ALFA-0701 est un protocole ouvert randomisé de phase III qui a eu pour objet d'évaluer l'effet du GO administré en induction et en consolidation comparé à celui d'un traitement standard, sur la survie de patients âgés (50-70 ans) atteints de LAM de novo (pas de LAM-t ni LAM-MRC) (128). Les taux de réponse étaient similaires dans les deux groupes et la survie sans événement, la RFS et l'OS étaient prolongées dans le groupe GO.

-ALFA-0702 est un protocole de phase II randomisé comparant la clofarabine associée à des doses intermédiaires de cytarabine (CLARA), à la cytarabine à forte dose (HDAC) en consolidation chez les patients jeunes (18-60 ans) atteints de LAM de novo, LAP et LAM-CBF exclues. La RFS était prolongée par le protocole clofarabine/IDAC dans les groupes de patients de risque intermédiaire et défavorable (226).

## B. Méthodes

### 1. Isolements cellulaires

Les leucocytes de la moelle osseuse ou du sang recueillis sur tube EDTA sont isolés en culots cellulaires. Le prélèvement mélangé à un tampon de lyse dans un volume total de 40 mL. Après 15 minutes d'incubation, la suspension est centrifugée 10 minutes à 4°C à 3000 tours/minute. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire obtenu est remis en suspension dans 40 mL d'une solution de lavage. Le tube subit une nouvelle centrifugation, identique à la précédente. Le surnageant est de nouveau éliminé et le culot cellulaire est repris dans 10 mL de solution de lavage. Les leucocytes sont à ce stade numérés sur un compteur cellulaire (automate Sysmex™). Après une troisième centrifugation selon le même procédé, le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est remis en suspension en solution de lavage, réparti en aliquots de 5 ou 10 millions de cellules. Ces aliquots sont enfin centrifugés 4 minutes à 4°C à 12 000 tours/minute. Le surnageant est éliminé et les culots secs sont conservés à -80°C.

### 2. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est réalisée à partir des culots cellulaires secs à l'aide du kit QIAmp® Tissue Kit de Qiagen. Cette technique d'extraction sur colonne permet l'obtention de fragments d'ADN (jusqu'à 50 kb) dépourvus de contaminants susceptibles d'interférer au cours des étapes de PCR ultérieures. Chaque culot sec décongelé est repris dans un mélange de 200 µL de PBS (Phosphate Buffer Saline), 25 µL de protéinase K à 1 mg/mL et 200 µL de tampon AL et incubé une nuit à 56°C. 200 µL d'éthanol absolu sont ajoutés afin de précipiter l'ADN à froid. La suspension obtenue est placée dans une colonne et centrifugée à température ambiante 2 minutes à 6000G. Le filtrat est éliminé. La colonne est lavée une première fois par 500 µL de tampon AW1 et centrifugée à température ambiante 1 minute à 6000G. Un second lavage est effectué par 500 µL de tampon AW2 et le filtrat est rejeté après une centrifugation à température ambiante 3 minutes à 13000G. L'ADN est enfin élué par centrifugation dans deux fois 100 µL de tampon AE préalablement chauffé à 70°C. L'ADN recueilli est conservé à -20 °C.

La concentration des solutions d'ADN est mesurée en spectrophotométrie (Dropsense™).

### 3. La PCR digitale

La PCR digitale, ou PCR numérique, a été développée pour permettre une quantification absolue et hautement précise de séquences d'acides nucléiques cibles. L'échantillon mélangé aux réactifs d'amplification est fractionné en milliers de partitions qui sont autant de microréacteurs (micro-puits, gouttelettes selon les fabricants). Les cibles sont distribuées aléatoirement dans ces compartiments. La réaction de PCR a lieu dans les partitions où la cible est présente, produisant un signal détectable. La mesure de ce dernier a lieu en point final. Chaque fraction est comptée individuellement et classée dans une catégorie positive ou négative quant à la présence initiale en son sein de la cible (quelle qu'en soit la quantité) ou son absence. L'appellation « digitale » ou « numérique » de la technique vient de ce classement binaire en « tout ou rien » : absence de la cible ou présence d'au moins une cible avant amplification dans le compartiment. Enfin le lien sera établi entre le nombre mesuré de fractions positives et le nombre de copies de la cible distribuées dans l'échantillon. Cette relation est statistiquement décrite par la loi de Poisson qui estime combien de compartiments contenaient une cible, combien en contenaient deux, trois et ainsi de suite.



## a) La PCR digitale DDPCR™ Bio-Rad

### (1) Principe

Dans le système développé par la firme Bio-Rad, le fractionnement du milieu réactionnel est effectué en émulsion.

Un mélange réactionnel de PCR similaire une PCR en temps réel classique est préparé. Il peut contenir des sondes d'hydrolyse TaqMan marquées par un fluorophore FAM VIC ou HEX comme dans notre cas ou bien un intercalant de type EvaGreen. La spécificité du mélange dédié à la PCR digitale est qu'il contient des agents tensio-actifs qui vont favoriser la génération de l'émulsion.

#### (a) Génération des gouttelettes

Les échantillons ainsi qu'une huile sont chargés sur une cartouche microfluidique composée de microcanaux croisés où la rencontre des deux liquides aura lieu. Le mélange est assuré par un appareil appelé QX100 ou QX200 droplet generator, qui agite la cartouche.

Les règles de la mécanique des fluides deviennent plus simples et prévisibles dans les systèmes de petite taille. Les avancées techniques ont permis depuis quelques années la fabrication de canaux réguliers de très faible diamètre permettant de tels écoulements. L'émergence de la microfluidique a permis la révolution biotechnologique récente qui a commencé par le séquençage haut débit.

Dans notre cas l'écoulement forcé par le générateur va produire pour chaque échantillon environ 20000 gouttelettes de taille identique de l'ordre du nanolitre (Figure 14). Cette uniformité de taille va permettre une distribution aléatoire des copies d'ADN dans les gouttelettes (Figure 15).

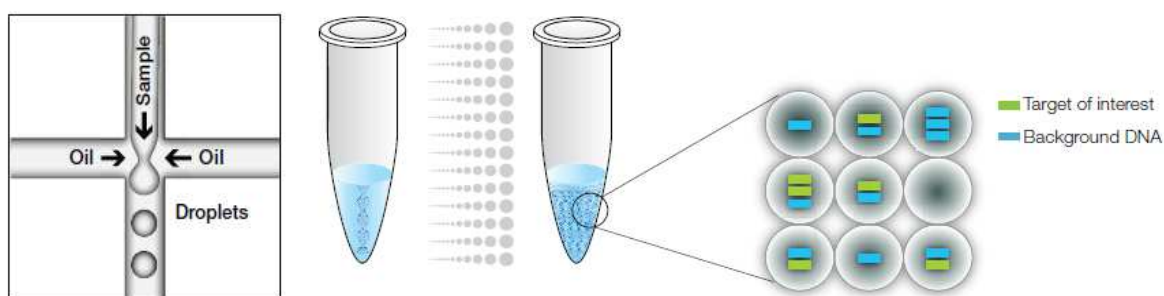


Figure 14 : génération de gouttelettes de taille et de volume uniformes (source Bio-Rad)

Figure 15 : Répartition aléatoire des copies d'ADN dans les 20000 gouttelettes (source Bio-Rad)

#### (b) Amplification PCR

Les gouttelettes sont transférées sur une plaque 96 puits (thermoscellée) et subissent un protocole d'amplification PCR classique sur thermocycleur avec cependant un ramping adapté. Le ramping du thermocycleur est sa vitesse de passage d'une température à l'autre. La viscosité de l'émulsion ne permet pas les mouvements de convection qui se produisent en milieu fluide et permettent une uniformisation rapide de la température du milieu réactionnel, ce qui impose un ramping lent.

#### (c) Nature du signal

Le système de PCR digitale est adapté à la détection de mutations rares de type hotspot ou SNP (Single Nucleotide Polymorphism), autrement dit une mutation se produisant toujours sur le même nucléotide d'une séquence donnée. Des amorces encadrent le hotspot et permettent l'amplification de la séquence cible. Deux sondes spécifiques de l'allèle muté ou de l'allèle sauvage, s'hybrident de façon compétitive à la séquence cible (Figure 16). Elles sont respectivement marquées par les fluorophore FAM et HEX, dont la fluorescence est éteinte par un quencher (extincteur de

fluorescence). Lorsque qu'une cible est présente dans le milieu, la sonde s'y fixe préférentiellement à chaque étape d'anéaling. Elle sera hydrolysée par la polymérase lors de l'amplification, libérant le fluorophore de son quencher (Figure 17).

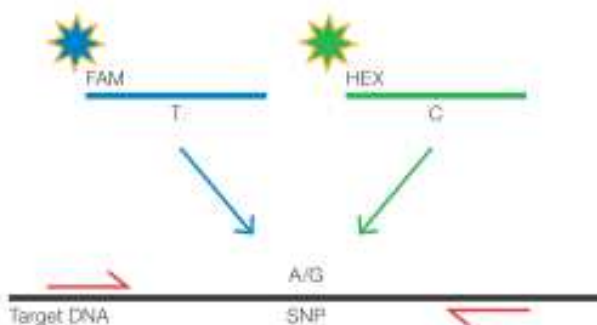


Figure 16 : Hybridation compétitive des sondes (source Bio-Rad)

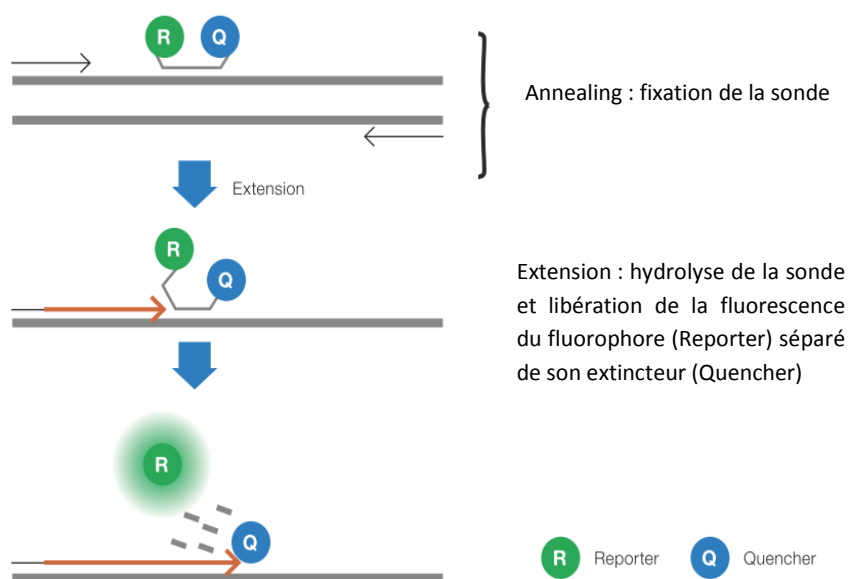


Figure 17 : Hydrolyse de la sonde et fluorescence (source Bio-Rad)

#### (d) Lecture du signal

La lecture a lieu en point final. La plaque est chargée sur un lecteur de gouttelettes appelé QX100 ou QX200 droplet reader. Une aiguille perce le film de scellage et aspire chaque échantillon. A la manière d'un cytomètre de flux, les gouttelettes sont alignées dans un fin capillaire et analysées individuellement en passant successivement devant un détecteur (Figure 18). La paroi des gouttelettes a été rigidifiée par les hautes températures de l'amplification, elles résistent ainsi aux forces de cisaillement imposées à cette étape. Un certain nombre de gouttelettes auront néanmoins été perdues au cours des étapes précédentes. En fonction de la matrice et de l'opérateur le nombre de gouttelettes lues in fine se situera en général entre 10 000 et 18 000 gouttelettes. L'excitation est assurée par deux diodes. La fluorescence est mesurée dans deux canaux d'émission pour le FAM et l'HEX/VIC. Chaque gouttelette est mesurée, celles dont la taille n'est pas standard (fusion de gouttes) seront rejetées. L'intensité de fluorescence dans chaque canal est enregistrée. Chaque lecture d'échantillon commence et se termine par un cycle de lavage afin d'éviter les contaminations inter-échantillons.

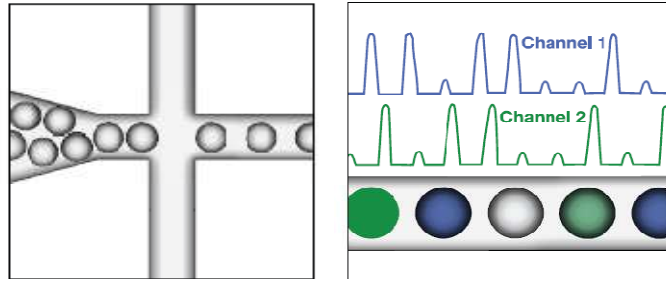


Figure 18 : Lecture individuelle des gouttelettes, mesure de la fluorescence dans deux canaux (source Bio-Rad)

(e) Analyse des données

Dans les gouttelettes qui contenaient au moins une copie d'un l'ADN cible avant amplification, l'hydrolyse de la sonde correspondante a eu lieu. Ces gouttelettes émettent une fluorescence d'intensité supérieure aux autres dans le canal concerné et seront considérées comme positives, les autres négatives.

L'analyse est effectuée par le logiciel Quantasoft™.

Pour chaque canal les données peuvent être visualisées sous la forme d'un graphique en une dimension (1D), où chaque point rapporte pour une gouttelette son numéro en abscisse et son intensité de fluorescence en ordonnée. La Figure 19 en montre un exemple : les gouttelettes bleues dont l'intensité de fluorescence dépasse le seuil (ligne rose) sont considérées comme positives (score 1), les grises sont négatives (score 0)

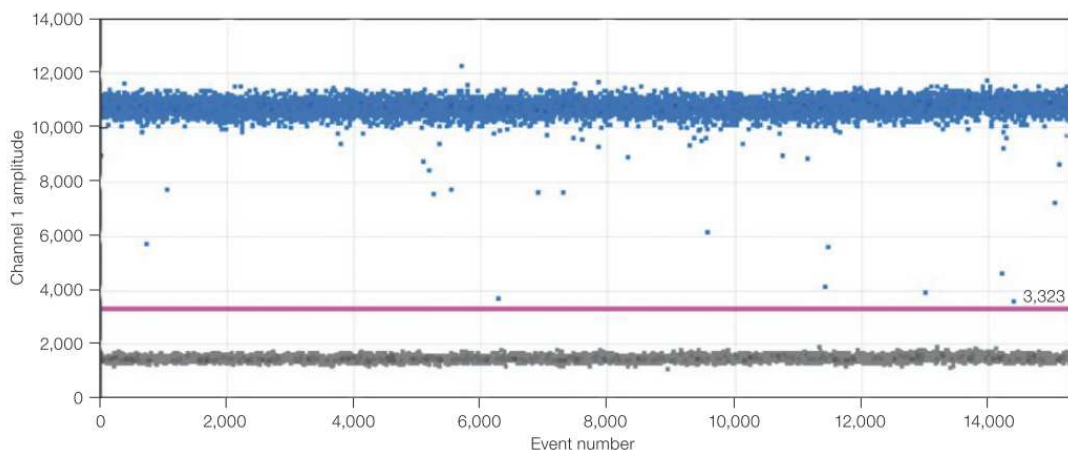


Figure 19 : représentation 1D du canal FAM (muté) pour un échantillon (source Bio-Rad)

Les données des deux canaux peuvent aussi être visualisées ensemble sur un graphique en deux dimensions (2D). Chaque point rapporte alors pour une gouttelette son intensité de fluorescence dans le canal HEX ou VIC en abscisse et son intensité de fluorescence dans le canal FAM en ordonnée (Figure 20).

Les gouttelettes sont réparties en quatre catégories de fluorescence visualisables par autant de nuages de points :

- FAM negative, HEX negative gris (gouttelettes double-négatives)
- FAM positive, HEX negative bleu
- FAM negative, HEX positive vert

-FAM positive, HEX positive orange (gouttelettes double-positives)

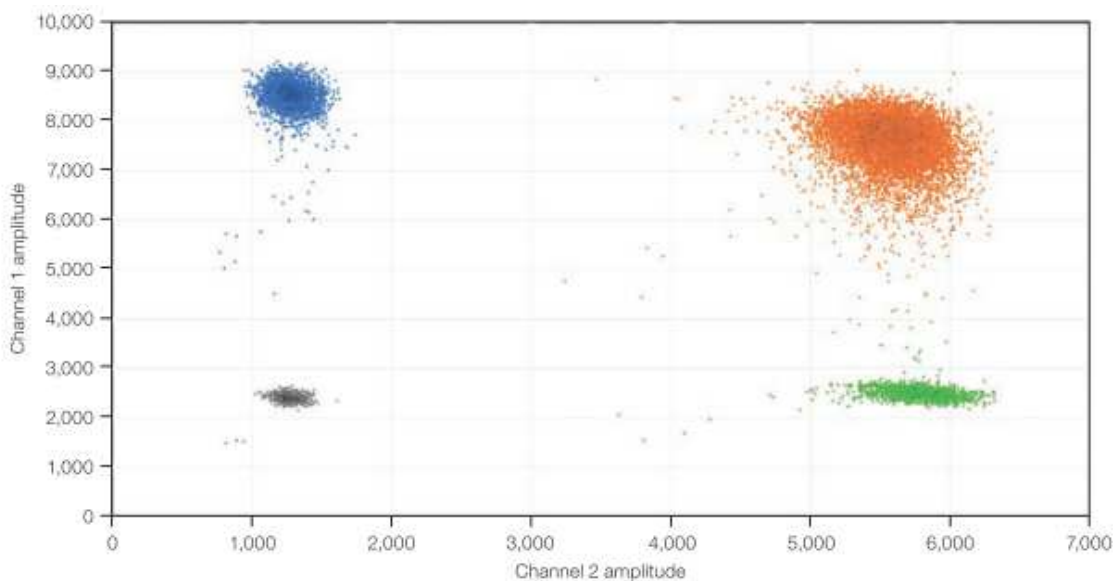


Figure 20 : Représentation 2D pour un échantillon (source Bio-Rad)

(f) Loi de Poisson

Comment relier un nombre de gouttelettes de score 1 c'est-à-dire contenant 1, 2, 3, 4, 5 copies ou plus, à un nombre de copies effectivement présentes dans l'échantillon ?

Pour illustrer la loi statistique de Poisson, prenons l'exemple d'un damier (Figure 21):

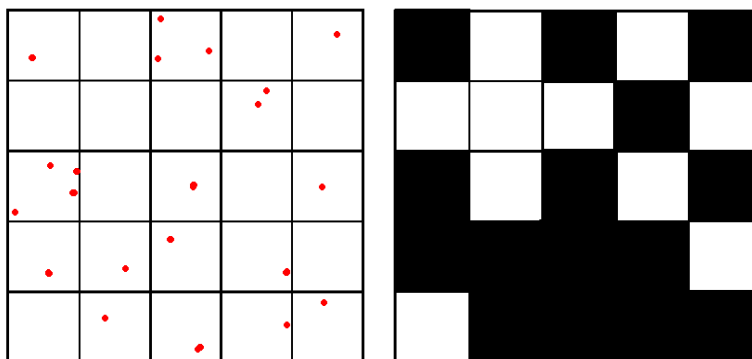


Figure 21 : Loi de Poisson, exemple du damier

Quelqu'un verse un sac de N billes sur un damier de X cases de taille identique. Chaque case est une fraction du damier et les billes se répartissent de façon aléatoire sur celui-ci. On compte x cases positives contenant une bille rouge ou plus (cases noires).

La loi de poisson va estimer N à partir de x :

Soit  $p = \text{fraction de cases positives} = x/X$  et  $n$  l'estimation de N.

$$n/X = -\ln(1-p) = -\ln(1-x/X) \text{ ie } n = (-\ln(1-x/X)) * X$$

N sera compris dans  $n \pm$  intervalle de confiance

Dans notre cas les billes rouges sont les copies d'ADN cible, X est le nombre de gouttelettes générées dans l'échantillon, et x le nombre de gouttelettes de score 1.

Dans la [Figure 22](#) par exemple pour une partition en 143 gouttelettes, si 70 sont positives, la loi de poisson estime le nombre de copies présentes à 96.

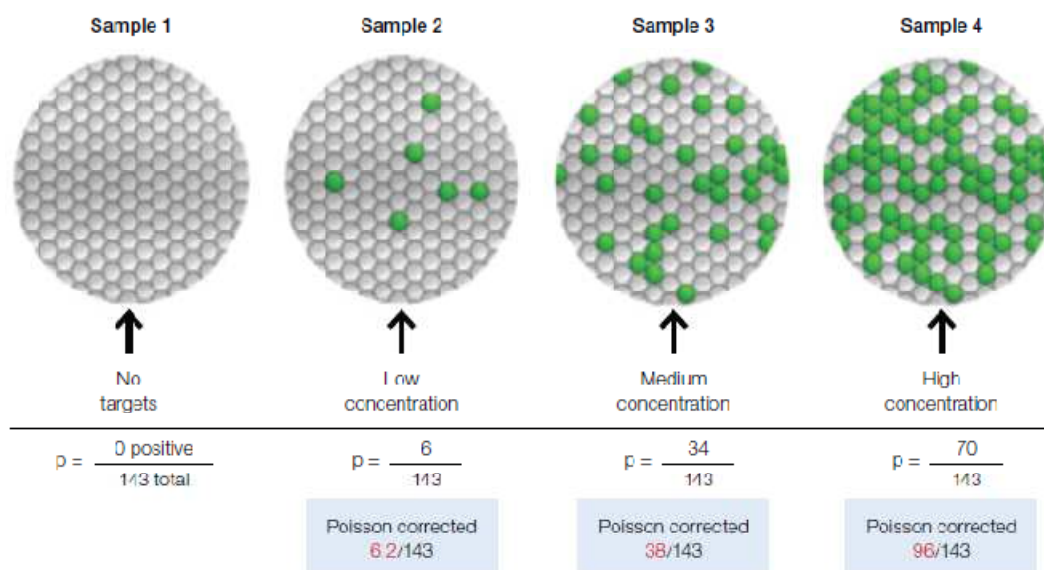


Figure 22 : Exemple d'estimation du nombre de copies d'ADN cible dans un échantillon (source Bio-Rad)

Le logiciel calcule donc une estimation du nombre de copies de l'allèle muté et une estimation du nombre de copies de l'allèle sauvage présentes dans l'échantillon. Ces estimations sont encadrées par des intervalles de confiance qui tiennent compte à la fois du nombre de partitions, de l'erreur de partitionnement et de l'erreur de sous-échantillonnage.

Les conditions d'utilisation de la PCR digitale permettent d'atteindre des intervalles de confiance étroits et donc une quantification absolue précise.

La variable d'intérêt pour la MRD est l'abondance fractionnelle (AF) de la mutation ainsi définie :

$AF = \frac{N_{mut}}{N_{mut} + N_{wt}}$  avec  $N_{mut}$  et  $N_{wt}$  respectivement le nombre de copies mutées et non mutées.

Les mutations d'*IDH1/2* étant hétérozygotes le pourcentage de cellules porteuses de la mutation sera le double de l'AF. (Par exemple une abondance fractionnelle à 50% correspond à 100% de cellules porteuses de la mutation)

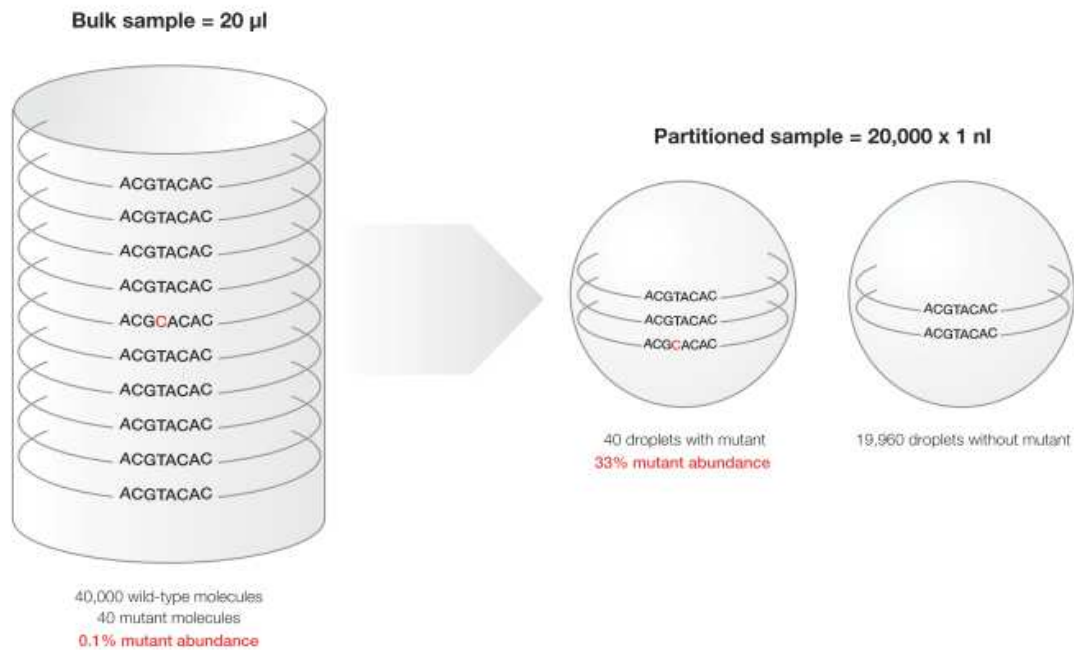
## b) Intérêts théorique de la PCR digitale

### (1) Par rapport à la PCR quantitative

#### (a) Rapport signal sur bruit en détection d'événement rare

La détection de mutation rare est une problématique particulière. Elle consiste à détecter et quantifier un très faible nombre de copies d'ADN muté dilué dans une très grande quantité de copies non mutées n'en différant que par un seul nucléotide. L'effet de compétition limite la sensibilité analytique même avec des systèmes très spécifiques. L'effet de partitionnement qui caractérise la PCR digitale va permettre à la copie mutante de se trouver localement (dans une gouttelette) dans une abondance relative bien plus élevée qu'en solution libre. Le signal qu'elle générera sera ainsi bien plus facile à détecter.

Considérant par exemple un cas dans lequel la mutation recherchée est en abondance relative de 0,1% par rapport à l'ADN wt, la **Figure 23** montre que la partition multiplier cette abondance relative par plus de 300, permettant théoriquement d'améliorer les seuils de détection et quantification.



**Figure 23 : Effet du partitionnement sur l'abondance relative d'une copie d'ADN mutante dans un excès de copies wild type (source Bio-Rad)**

**(b) Autres**

-Résistance au biais d'efficacité de PCR : en QPCR une efficacité de PCR moindre va se traduire par un CT plus tardif et une sous estimation de quantité. En PCR digitale les nuages de points pourront être déformés ou avoir une intensité de fluorescence moindre mais tant qu'ils peuvent être séparés la précision de la quantification n'est pas affectée.

De plus les inhibiteurs de PCR seront dilués.

-La quantification est absolue. Il n'est pas nécessaire de tracer une courbe d'étalonnage.

-Moindre dépendance à la spécificité des systèmes de sondes

**(2) Par rapport au NGS**

La PCR digitale ne permet pas le séquençage. Dans l'application qui est la notre l'intérêt de la PCR digitale réside dans sa moindre vulnérabilité technique aux contaminations, permettant d'espérer des seuils de détection et quantification plus bas, sa simplicité d'utilisation et son faible coût.

**c) Autres applications de la PCR digitale**

-Quantification absolue de cibles (Charges virales par exemple)

-Altérations génomiques de type variation de nombre de copies

-Expression de gènes et analyse de microARN

-NGS : quantification de bibliothèques

-Analyse de cellule unique

## 4. Mise au point et optimisation du protocole de PCR digitale

### a) Température d'annealing

La température d'annealing est l'un des paramètres les plus critiques pour la spécificité de la réaction. Si elle est trop basse elle peut engendrer des amplifications non spécifiques. A l'inverse une température trop élevée réduira le rendement. Le calcul de la température théorique d'hybridation d'une amorce ou d'une sonde ne dispense pas d'un ajustement empirique.

Pour chacune des mutations étudiées (*IDH2* R140Q et R172K, *IDH2* R132C R132H et R132G) nous avons testé le protocole sur des échantillons de moelle de patients au diagnostic en gradient de température. Cela consiste à tester plusieurs températures d'annealing sur une même plaque 96 puits et en une seule opération en programmant un thermocycleur capable d'appliquer des températures différentes de quelques degrés à des puits adjacents.

La température d'annealing diminue linéairement de 65 à 55°C de la ligne A à la ligne H.

La température optimale doit permettre la plus grande différence d'amplitude de fluorescence entre les gouttelettes positives et négatives sans provoquer d'amplifications non spécifiques, et être si possible commune à toutes les mutations ce qui permettra par la suite l'amplification de plusieurs mutations sur une même plaque.

La **Figure 24** montre les représentations 1D des résultats obtenus pour la mutation R140Q. Dans cet exemple la meilleure discrimination entre signaux positifs et négatifs est obtenue dans les puits G01 et H01.

La température finalement retenue est 56°C.

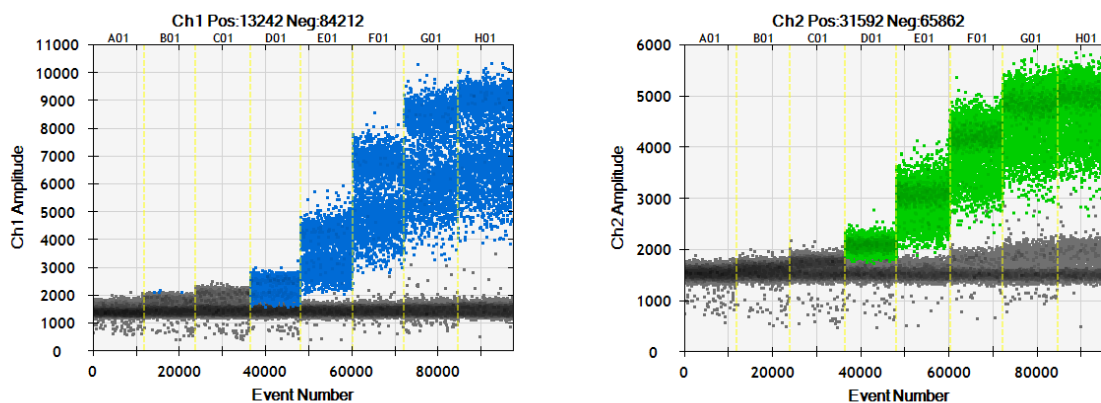


Figure 24 : Test en gradient de température d'annealing, *IDH2* R140Q. De A à H : de 65 à 55°C.

### b) Concentration d'ADN dans chaque puits

#### (1) Quantité d'ADN à tester

La quantité d'ADN à tester d'un échantillon dépend directement de la limite de détection recherchée. Selon Poisson si l'on veut affirmer, dans un intervalle de confiance de 95%, qu'un évènement a une fréquence de  $1/X$  évènements, il faudra tester au moins  $3X$  évènements (Cette affirmation est connue sous le nom de règle de trois).

Dans une première série de tests afin de déterminer s'il était possible de faire mieux ou s'il fallait revoir les objectifs à la baisse, le seuil de détection recherché était de 0,01% soit un facteur 10 plus bas que celui précédemment atteint en NGS au sein du laboratoire au CHRU de Lille.

Autrement dit nous devions pouvoir détecter une copie mutée parmi 10000 (fréquence 0,01%) il fallait donc tester au moins 30000 copies. Sachant qu'un génome haploïde pèse 3,3pg, cela correspond à  $30000 \times 0,0033 = 99 \text{ ng}$  d'ADN minimum.

## (2) Quantité d'ADN maximale par puits

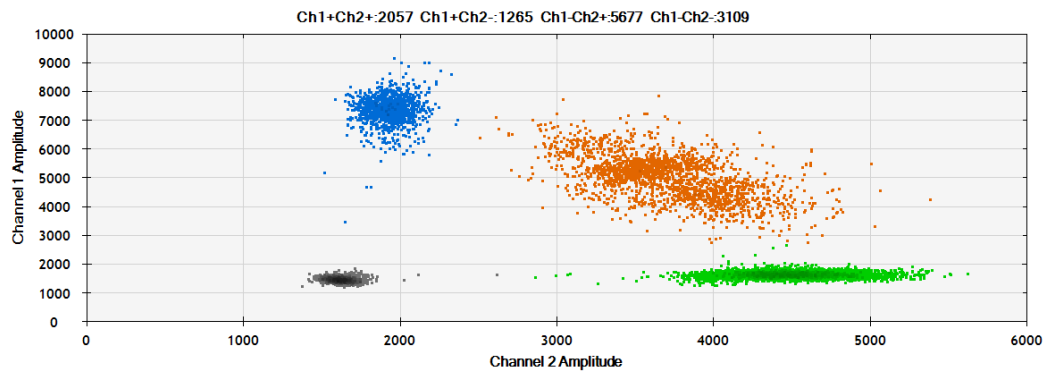
Le nombre de copies que l'on peut charger dans un puits de la plaque n'est pas illimité. Pourtant théoriquement pour des nombres de copies introduites considérables aboutissant à un grand nombre de gouttelettes contenant 5, 6 copies ou plus, il restera statistiquement toujours un faible nombre de gouttelettes n'en contenant aucune, permettant l'application de la loi de poisson. Le facteur limitant est ici la viscosité du prélèvement. En effet la préparation du mélange réactionnel impose un volume final de 20µL. L'augmentation du nombre de copies testées nécessite une augmentation de la concentration en ADN qui s'accompagne une augmentation de la viscosité. Pour des tests sur ADN humain et en fonction de la dégradation des brins, le fabricant suggère qu'au-delà de 60ng par puits il peut être utile de réduire la viscosité en fractionnant l'ADN à l'aide d'enzymes de restriction. Il est alors théoriquement possible d'analyser près de 400 ng par puits. Il est possible également de répartir la quantité d'ADN à tester dans plusieurs puits et d'en réunir les résultats à posteriori. Nous avons testé un ADN P extrait de la moelle osseuse d'un patient au diagnostic avec mutation d'*IDH2* R140Q et un ADN N médullaire d'un patient ne présentant pas de mutation d'*IDH* à des concentrations croissantes afin de déterminer de façon empirique jusqu'à quelle valeur les résultats étaient fiables sans devoir recourir à une enzyme de restriction. Les quantités testées étaient 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 et 120 ng par puits. La [Figure 25](#) montre les représentations 2D obtenues à 50, 90 et 120 ng. Les nuages de points restent bien délimités aux faibles concentrations mais une légère dispersion apparaît au-delà de 110 ng. Les [Figure 26](#) et [Figure 27](#) montrent les abondances fractionnelles obtenues à toutes les concentrations testées pour l'échantillon P et N. Elles sont très stables même à concentration élevée non optimale.

Nous avons décidé de retenir pour l'étude un protocole à 180 ng d'ADN réparti en deux puits soit 90 ng/puits X2. Plusieurs raisons ont présidé à ce choix :

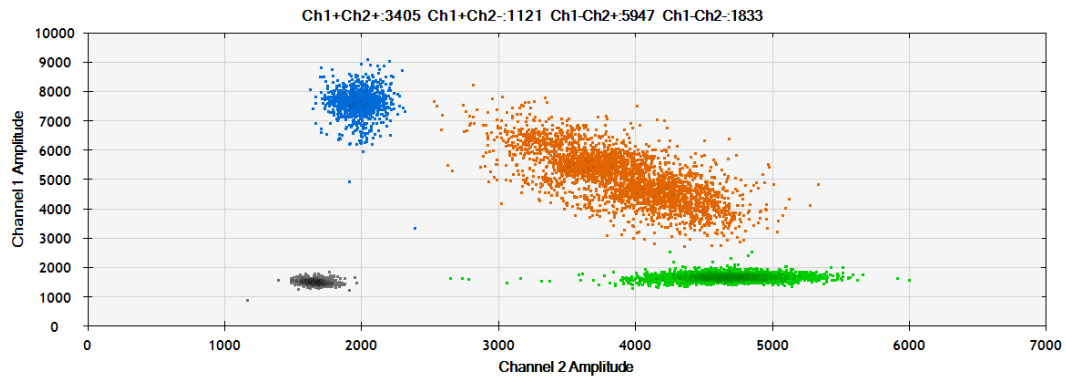
Les concentrations des solutions d'ADN utilisées sont mesurées par spectrométrie (Dropsense®). Les valeurs sont peu précises et soumises à des facteurs de biais difficilement prévisibles, la nature des solvants et les modes opératoires utilisés pour l'extraction n'étant par exemple pas homogènes d'une ville à l'autre impliquée dans le protocole.

Pour cette raison et pour prévenir d'éventuels événements techniques aléatoires (pipetage, génération de gouttelettes médiocre) pouvant réduire le nombre de copies analysées dans un puits, nous avons choisi de tester un large excès de copies et de les répartir dans des puits différents, dans les limites une viscosité satisfaisante.

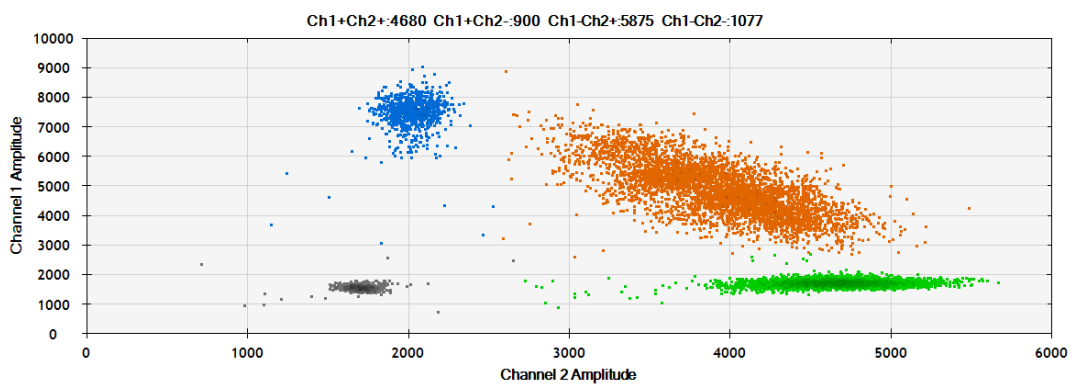




50 ng



90 ng



120 ng

Figure 25 : Test de concentration limite, graphe 2D aux concentrations 50, 90 et 120 ng

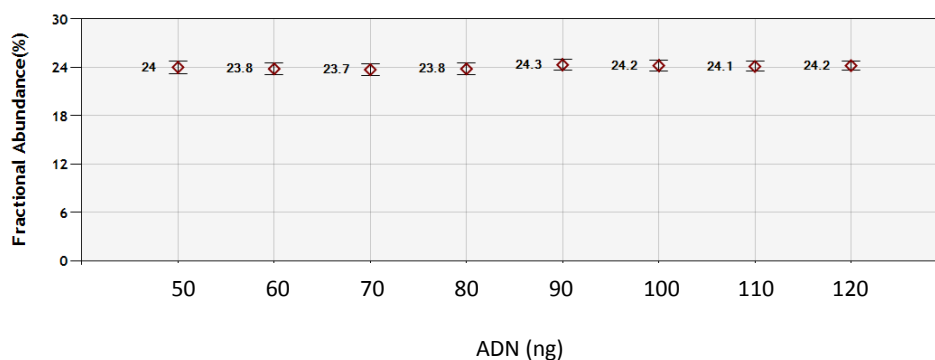


Figure 26 : AF de l'échantillon P aux différentes concentrations testées

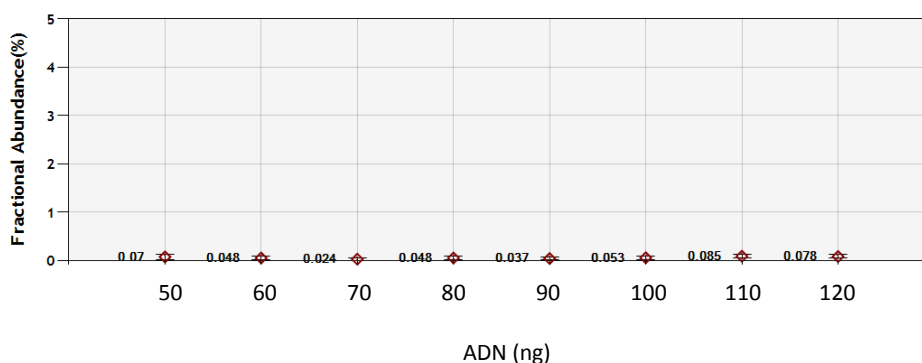


Figure 27 : AF de l'échantillon N aux différentes concentrations testées

### c) Calcul des seuils de détection et de quantification

Les moyens à disposition ne permettaient pas d'effectuer le grand nombre de réactions nécessaires au calcul de seuils de détection et de quantification (LOD et LOQ) conformes aux recommandations de référence, dictées par le groupe international de consensus NCCLS (227).

En revanche une approximation satisfaisante est donnée par les formules suivantes :

LOD=moyenne des contrôles d'ADN wt + 3 écart-types des contrôles d'ADN wt

LOQ=moyenne des contrôles d'ADN wt + 10 écart-types des contrôles d'ADN wt

Pour une trentaine de réactions de contrôle sur ADN non muté par mutation.

### d) Détection des contaminations

Un mélange réactionnel complet mais exempt d'ADN contrôlait l'absence de contamination des réactifs, du matériel et de l'environnement par des copies d'ADN muté (comme non muté), à raison d'au moins 4 puits par mutation et par plaque.

## 5. Réactifs et protocole

Les détails relatifs à la composition des mélanges réactionnels et au protocole d'amplification sont réunis dans le [Tableau 12](#) ci-dessous.

Tableau 12 : Réactifs et protocoles d'amplification

Sondes et amorces d'amplification					
Gène	Mutation	Nom du DDPCR™ Mut Assay (Bio Rad)	Amorce / sonde	Type de sonde / fluorophore	
IDH2	R140Q	IDH2, p.R140Q, Hsa	Amorce sens		
			Amorce antisens		
			Sonde	TaqMan FAM	
		IDH2, WT for p.R140Q, H		Amorce sens	
				Amorce antisens	
			Sonde	TaqMan HEX	
IDH2	R172K	IDH2, p.R172K, Hsa	Amorce sens		
			Amorce antisens		
			Sonde	TaqMan FAM	
		IDH2, WT for p.R172K, H		Amorce sens	
				Amorce antisens	
			Sonde	TaqMan HEX	
IDH1	R132H	IDH2, p.R132H, Hsa	Amorce sens		
			Amorce antisens		
			Sonde	TaqMan FAM	
		IDH2, WT for p.R132H, H		Amorce sens	
				Amorce antisens	
			Sonde	TaqMan HEX	
	R132C	IDH2, p.R132C, Hsa		Amorce sens	
				Amorce antisens	
			Sonde	TaqMan FAM	
		IDH2, WT for p.R132C, H		Amorce sens	
Amorce antisens					
		Sonde	TaqMan HEX		
R132G	IDH2, p.R132G, Hsa		Amorce sens		
			Amorce antisens		
		Sonde	TaqMan FAM		
	IDH2, WT for p.R132G, H		Amorce sens		
			Amorce antisens		
		Sonde	TaqMan HEX		

Mélange réactionnel pour l'amplification	
Réactif	Volume (µL)
DDPCR™ supermix for probes (2X)	10
DDPCR™ Mut Assay mutation (20X)	1
DDPCR™ Mut Assay WT (20X)	1
ADN génomique (90ng/µL)	8
Volume réactionnel total	20

Protocole d'amplification				
Etape	Nombre de cycles	Temps	Température	Ramping (en fin d'étape)
Dénaturation initiale	1x	10 min	95°C	
Amplification	40x	30 s	94°C	2,5°C/s
		1 min	56°C	2°C/s
Inactivation de l'enzyme	1x	10 min	98°C	2,5°C/s
Fin	1x	∞	10°C	

Ramping : vitesse d'ascension ou de diminution de la température

## 6. Statistiques

Les données d'OS et de DFS ont été analysées selon le modèle de Cox et les courbes tracées selon la méthode de Kaplan Meier. Une analyse temps dépendante de la DFS a également été réalisée, suivant le modèle de Mantel Byar. La significativité des tests était évaluée au seuil de 5%. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Stata®.

## VI. Résultats

### A. Patients inclus

103 patients ont été retenus pour analyse, totalisant 211 prélèvements de moelle osseuse de suivi avec une médiane de 2 prélèvements par patient. La répartition du nombre de points de suivi par patient est détaillée ci-dessous ([Tableau 13](#)). Les prélèvements au diagnostic de moelle (60) ou à défaut de sang (37) de 97 de ces patients ont également été analysés. Les caractéristiques des patients inclus sont présentées dans les [Tableaux 14, 15, 16 et 17](#).

Tableau 13 : Répartition du nombre de points de suivi par patient

Au moins 1 point	Au moins 2 points	Au moins 3 points	Au moins 4 points	Au moins 5 points	6 points
103	64	31	10	2	1

Tableau 14 : Répartition des mutations d'IDH1/2 dans les protocoles ALFA 0701 et 0702

	Alfa 0701	Alfa 0702	Total Alfa
Patients protocolaires	278	704	982

	IDH1 R132	IDH2 R140	IDH2 R172	Total
Patients IDHmut	61	63	36	160
% total	6,2%	6,4%	3,7%	16,3%

	IDH1 R132	IDH2 R140	IDH2 R172	Total
Patients IDHmut en RC	50	61	27	131
% patients IDHmut	82,0%	97,0%	75,0%	82,0%

(Répartition non significativement différente test CHI 2 de pearson p=0,67)

Tableau 15 : Répartition des mutations d'IDH et des rechutes dans la cohorte finale

	IDH1 R132C	IDH1 R132G	IDH1 R132H	IDH2 R140Q	IDH2 R172K	Total
Patients analysables	15	5	16	46	21	103
Rechutes	6	1	7	17	10	41

Tableau 16 : Caractéristiques des patients inclus en fonction du protocole

		ALFA 0701	ALFA 0702	Total général	% hors ND
Effectif	Patients	26	77	103	
	Femmes	16	39	55	<b>53,4%</b>
	Hommes	10	38	48	<b>46,6%</b>
Age (années)	Age median	61,8	50,5	54,1	
	Age min	51,2	22,1	22,1	
	Age max	69,6	60,0	69,6	
Leucocytose au diagnostic (G/L)	Leucocytose diag médiane	18,4	5,5	7,5	
	Leucocytose diag min	0,8	0,76	0,76	
	Leucocytose diag max	157	377,4	377,4	
Caryotype	5q-, 11q-	1		1	<b>1,0%</b>
	7q-, complexe		1	1	<b>1,0%</b>
	9q-		1	1	<b>1,0%</b>
	Complexe		1	1	<b>1,0%</b>
	del7q/+8, +10	1		1	<b>1,0%</b>
	Echec	1	4	5	<b>4,9%</b>
	monosomie 7		3	3	<b>2,9%</b>
	Normal	21	50	71	<b>68,9%</b>
	t(1;16), +der(1)t(1;1)		1	1	<b>1,0%</b>
	t(1;7)		1	1	<b>1,0%</b>
	t(3;5)		1	1	<b>1,0%</b>
	t(6;9)		1	1	<b>1,0%</b>
	t(8;22)		1	1	<b>1,0%</b>
	Tétraploïde	1	1	2	<b>1,9%</b>
	trisomie 11		5	5	<b>4,9%</b>
	trisomie 13	1		1	<b>1,0%</b>
trisomie 4		1	1	<b>1,0%</b>	
trisomie 8		5	5	<b>4,9%</b>	
Mutation de <i>NPM1</i>	<i>NPM1wt</i>	10	43	53	<b>51,5%</b>
	<i>NPM1m</i>	16	34	50	<b>48,5%</b>
	ND				
Duplication interne en tandem de <i>FLT3</i>	<i>FLT3-ITD Négatif</i>	23	60	83	<b>81,4%</b>
	<i>FLT3-ITD</i>	3	16	19	<b>18,6%</b>
	ND		1	1	
Autre mutation de <i>FLT3</i>	<i>FLT3m negative</i>	24	69	93	<b>91,2%</b>
	<i>FLT3m</i>	2	7	9	<b>8,8%</b>
	ND		1	1	
Mutation de <i>CEBPA</i>	<i>CEBPAwt</i>	25	71	96	<b>96,0%</b>
	<i>CEBPAm</i>	1 (dm)	3	4	<b>4,0%</b>
	ND		3	3	
Mutation de <i>DNMT3A</i>	<i>DNMT3Awt</i>	17	37	54	<b>65,1%</b>
	<i>DNMT3Am</i>	6	23	29	<b>34,9%</b>
	ND	3	17	20	
Mutation de <i>DNMT3A</i> R882	<i>DNMT3A R882 Négatif</i>	22	45	67	<b>80,7%</b>
	<i>DNMT3A R882 Positif</i>	1	15	16	<b>19,3%</b>
	ND	3	17	20	
Mutation de <i>TET2</i>	<i>TET2wt</i>	20	58	78	<b>94,0%</b>
	<i>TET2m</i>	3	2	5	<b>6,0%</b>
	ND	3	17	20	

dm : double muté

Tableau 17 : Caractéristiques génétiques des LAM incluses en fonction de la mutation D'IDH1/2

	IDH1 R132C	IDH1 R132G	IDH1 R132H	Total IDH1	% IDH1 hors ND	IDH2 R140Q	IDH2 R172K	Total IDH2	% R140Q hors ND	% R172K hors ND	% IDH2 hors ND	
Caryotype	5q-, 11q-					1		1	2,4%		1,6%	
	7q-, complexe	1			1						3,0%	
	9q-					1		1	2,4%		1,6%	
	complexe	1			1						3,0%	
	del7q/+8, +10						1	1		5,0%	1,6%	
	Echec	1	2		3		2	2				
	monosomie 7		1		1	3,0%	2	2	4,9%		3,3%	
	Normal	8	2	15	25	75,8%	33	13	46	80,5%	65,0%	75,4%
	t(1;16), +der(1)t(1;1)	1			1	3,0%						
	t(1;7)						1		1	2,4%		1,6%
	t(3;5)						1		1	2,4%		1,6%
	t(6;9)			1	1	3,0%						
	t(8;22)	1			1	3,0%						
	tétraploïde						1	1	2	2,4%	5,0%	3,3%
	trisomie 11							5	5		<b>25,0%</b>	8,2%
	trisomie 13						1		1	2,4%		1,6%
trisomie 4	1			1	3,0%							
trisomie 8	1			1	3,0%	3	1	4	6,8%	4,8%	6,2%	
Mutation de <i>NPM1</i>	<i>NPM1wt</i>	9	1	2	12	33,3%	20	21	41	43,5%	100,0%	61,2%
	<i>NPM1m</i>	6	4	14	24	66,7%	26	26	56,5%	<b>0,0%</b>	38,8%	
	ND											
Duplication interne en tandem de <i>FLT3</i>	<i>FLT3-ITD</i> Négatif	14	4	10	28	77,8%	34	21	55	75,6%	100,0%	83,3%
	<i>FLT3-ITD</i>	1	1	6	8	22,2%	11		11	24,4%	<b>0,0%</b>	16,7%
	ND						1		1			
Autre mutation de <i>FLT3</i>	<i>FLT3m</i> Négatif	15	4	15	34	94,4%	38	21	59	84,4%	100,0%	89,4%
	<i>FLT3m</i>		1	1	2	5,6%	7		7	15,6%	<b>0,0%</b>	10,6%
	ND						1		1			
Mutation de <i>CEBPA</i>	<i>CEBPAwt</i>	14	5	15	34	97,1%	42	20	62	95,5%	95,2%	95,4%
	<i>CEBPA<sub>m</sub></i>			1	1	2,9%	2	1	3	4,5%	4,8%	4,6%
	ND	1 (dm)			1 (dm)		2		2			
Mutation de <i>DNMT3A</i>	<i>DNMT3Awt</i>	9	1	6	16	64,0%	24	14	38	61,5%	73,7%	65,5%
	<i>DNMT3A<sub>m</sub></i>	3	2	4	9	36,0%	15	5	20	38,5%	<b>26,3%</b>	34,5%
	ND	3	2	6	11		7	2	9			
Mutation de <i>DNMT3A</i> R882	<i>DNMT3A</i> R882 Négatif	11	3	9	23	92,0%	27	17	44	69,2%	89,5%	75,9%
	<i>DNMT3A</i> R882	1		1	2	8,0%	12	2	14	30,8%	<b>10,5%</b>	24,1%
	ND	3	2	6	11		7	2	9			
Mutation de <i>TET2</i>	<i>TET2wt</i>	10	3	10	23	92,0%	37	18	55	94,9%	94,7%	94,8%
	<i>TET2<sub>m</sub></i>	2			2	8,0%	2	1	3	5,1%	5,3%	5,2%
	ND	3	2	6	11		7	2	9			

dm : double muté

## B. Performances de la PCR digitale

### 1. Qualité des tests

Le nombre médian de gouttelettes acceptées pour un échantillon (deux puits) était de 24474.

### 2. Limites de détection et de quantification

Les seuils de détection et de quantification obtenus pour chaque mutation sont rapportés dans le tableau **Tableau 18** ci-dessous.

Tableau 18 : LOD et LOQ

	LOD	LOQ
IDH2 R140Q	0,090	0,22
IDH2 R172K	0,044	0,10
IDH1 R132C	0,176	0,337
IDH1 R132H	0,090	0,172
IDH1 R132G	0,018	0,080

## C. Prélèvements au diagnostic

Au diagnostic l'AF médiane dans le sang était de 36,7% soit 73,4% de cellules mutées. Dans la moelle l'AF médiane était de 42,85% soit 85,7% de cellules mutées (**Tableau 19**). Dans 9 cas dont 8 sur sang, l'AF au diagnostic était inférieure à 10%. Dans tous les cas sauf un cela correspondait à une leucocytose au diagnostic inférieure à 4G/L.

Tableau 19 : Abondances fractionnelles au diagnostic sur sang et moelle osseuse

	Sang	Moelle
N	37	60
AF Médiane (%)	36,70	42,85
AF Min (%)	0,13	8,20
AF Max (%)	53,00	49,90

## D. Données générales de survie

### a) Suivi médian

Le suivi médian des 103 patients inclus était de 2,78 ans soit 2 ans et 9 mois (intervalle de confiance à 95% ou IC 95% à [2,45;3,02])

### b) OS et DFS en fonction du statut mutationnel d'IDH1/2 et du protocole

Le **Tableau 20** et les courbes de Kaplan-Meier **Figures 28, 29, 30 et 31** ci-dessous rapportent les données d'OS et de DFS par mutation d'IDH1/2 et par protocole. Les mutations d'IDH1 R132 ont été regroupées en raison de leurs faibles effectifs. Les différences d'OS et de DFS retrouvées ne sont pas significatives.



Tableau 20 OS et DFS à 3 ans par mutation et protocole

	% OS 3 ans	IC 95% OS	% DFS 3 ans	IC 95% DFS
Tous	69,5	[58,7;78,0]	52,7	[42,2;62,1]
<i>IDH1</i> R132	65,3	[42,3;81,0]	52,8	[34,4;68,3]
<i>IDH2</i> R140Q	69,0	[53,2;80,3]	53,2	[37,6;66,6]
<i>IDH2</i> R172K	75,6	[50,9;89,1]	50,8	[27,5;70,1]
ALFA 0701	66,3	[43,4;81,7]	43,9	[24,0;62,1]
ALFA 0702	70,7	[58,2;80,1]	55,6	[43,4;66,2]

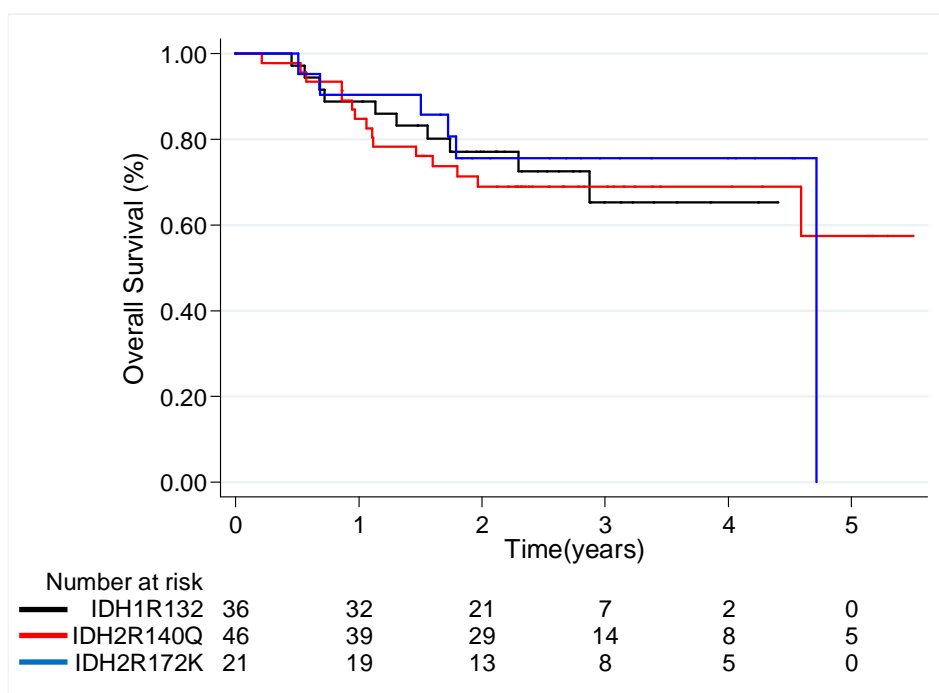


Figure 28 : OS en fonction du statut mutationnel d'*IDH1/2*

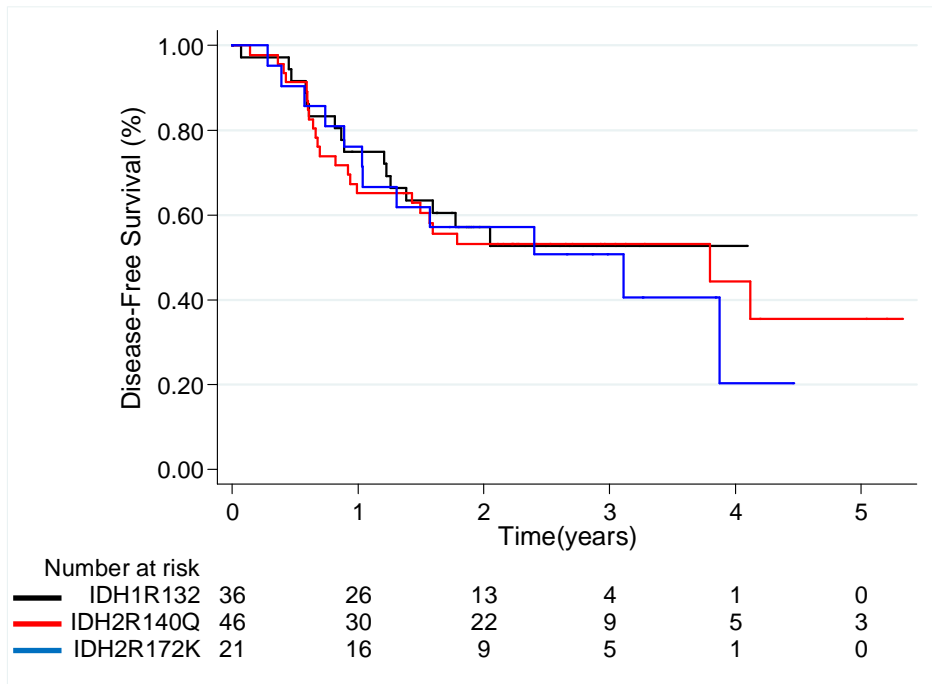


Figure 29 : DFS en fonction de la mutation d'IDH1/2

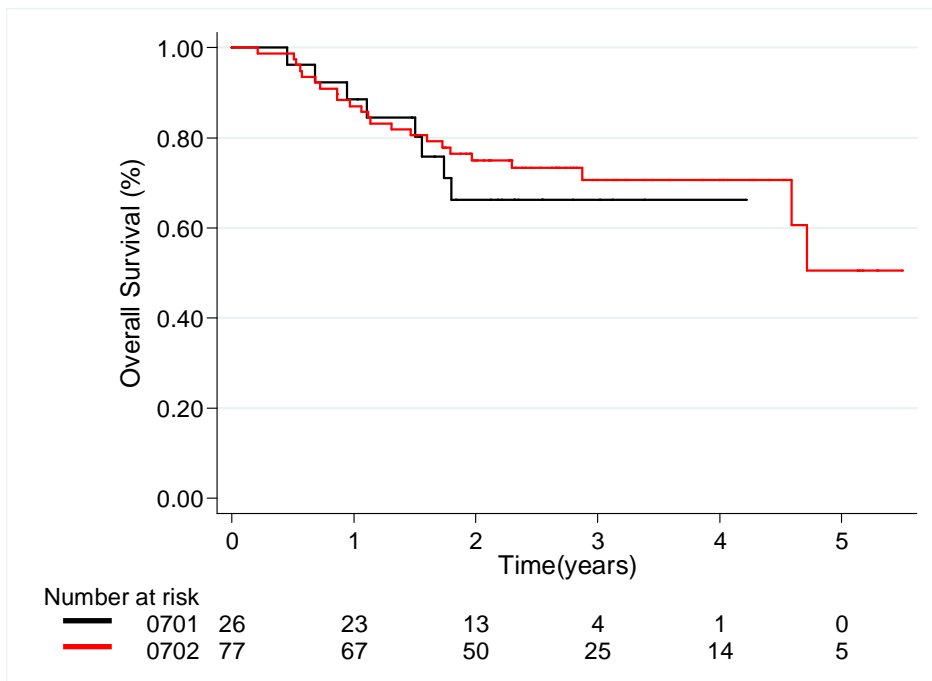


Figure 30 : OS en fonction du protocole

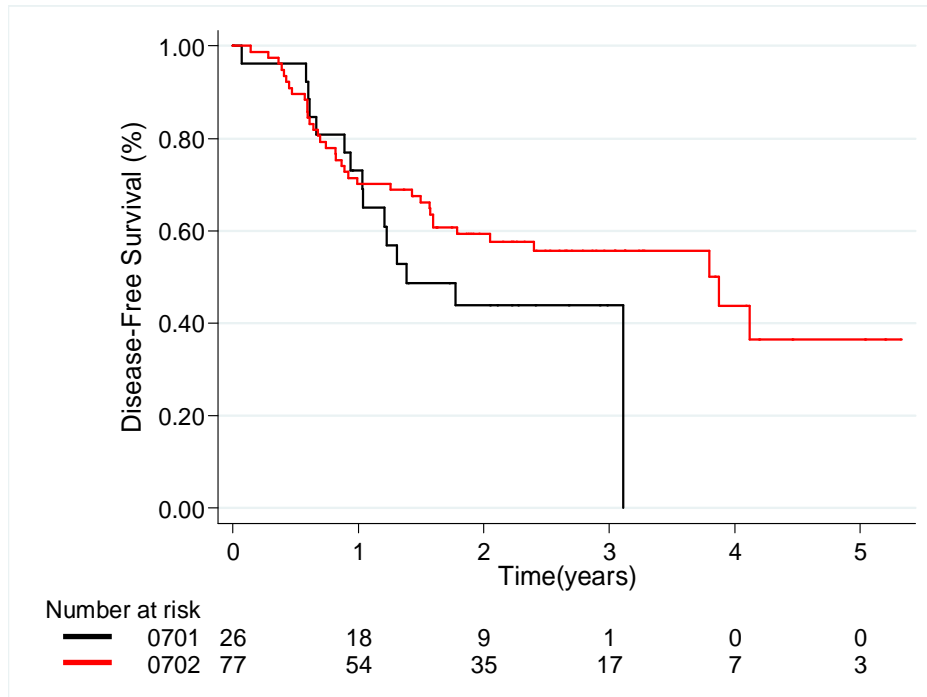


Figure 31 : DFS en fonction du protocole

## E. Impact pronostique de la MRD *IDH1/2* en fin d'induction

### 1. Recherche des meilleurs seuils décisionnels

Nous avons réalisé pour les trois groupes de mutations d'*IDH1/2* une recherche du meilleur seuil de MRD décisionnel en fin d'induction sur les données de DFS. Les représentations graphiques ci-dessous (Figures 32, 33 et 34) se lisent ainsi : elles représentent la valeur du test du Chi deux en fonction du  $-\log$  de l'abondance fractionnelle. Plus la hauteur du pic est importante, plus la valeur en abscisse est un cut-off pertinent. A l'exception des valeurs extrêmes de MRD, parce-qu'elles sont représentées par de très faibles effectifs : les valeurs de Chi-deux obtenues peuvent alors être très élevées sans être significatives. Ce phénomène est appelé « effet de bord ». Il se produit dans notre cas pour les mutations d'*IDH2* R172K au-delà d'un  $-\log(\text{MRD})$  de 1,8. Ces résultats permettent de définir des seuils autour de 0,1% pour *IDH1* R132 et 0,5% pour *IDH2* R140Q. Il n'y a aucune valeur de MRD significative pour *IDH2* R172K.

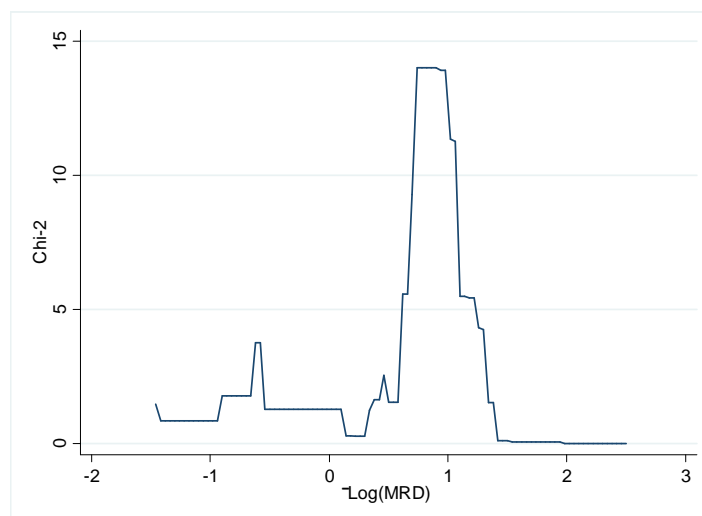


Figure 32 : Recherche de seuil pour *IDH1m*. Seuil significatif à  $-\log(\text{MRD})=1$ , autrement dit une AF à 0,1%

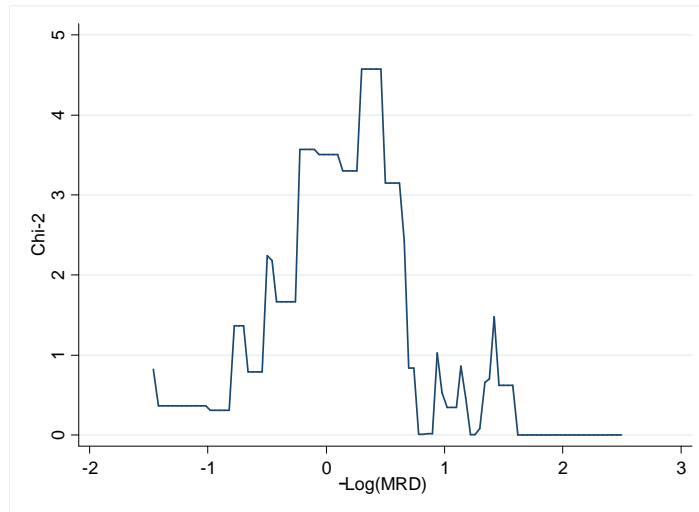


Figure 33 : Recherche de seuil pour *IDH2* R140Q. Seuil significatif à  $-\log(\text{MRD})=0,3$ , autrement dit une AF à 0,5%

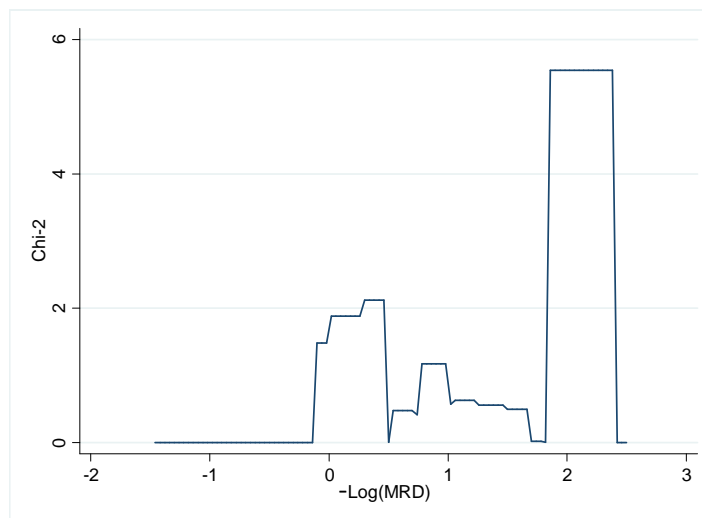


Figure 34 : Recherche de seuil pour *IDH2* R172K. Pas de seuil significatif, le pic de droite est un effet de bord

## 2. OS et DFS censurées à la greffe et ajustées sur le protocole, par niveau de réponse moléculaire et type de mutation d'*IDH1/2*

Nous avons appliqué les seuils décisionnels nouvellement définis pour évaluer l'impact pronostique de la MRD *IDH1/2* sur l'OS et la DFS, suivant un modèle de Cox et en appliquant une censure à l'allogreffe de moelle osseuse et un ajustement sur le protocole afin de limiter le biais que ces variables induisent sur la survenue des décès et des rechutes.

Les résultats obtenus sont rapportés dans les [Tableaux 21 et 22](#) et les [Figures 35, 36, 37, 38, 39 et 40](#).

Les groupes de patients dont l'Abondance Fractionnelle en fin d'induction est supérieure ou inférieure au meilleur seuil décisionnel sont désignés par les termes MRD $>$ co et MRD $<$ co respectivement (co pour « cut off », c'est-à-dire le seuil décisionnel). Les résultats statistiquement significatifs au seuil de 5% figurent en caractères gras (Hazard Ratio : HR et p-value : p).

a) OS

Tableau 21 : OS censurée à la greffe par réponse moléculaire et mutation

	MRD>co		MRD<co		HR	IC 95% HR	p
	% OS 3 ans	IC 95% OS	% OS 3 ans	IC 95% OS			
<i>IDH1</i> R132 - <i>IDH2</i> R140Q	62,4	[35,1;80,9]	87,9	[70,9;95,23]	<b>0,23</b>	<b>[0,09;0,62]</b>	<b>0,003</b>
<i>IDH1</i> R132	65,8	[31,0;86,0]	100	-	-	-	0,067
<i>IDH2</i> R140Q	55,4	[13,0;84,3]	84	[62,8;93,7]	0,31	[0,07;1,47]	0,141

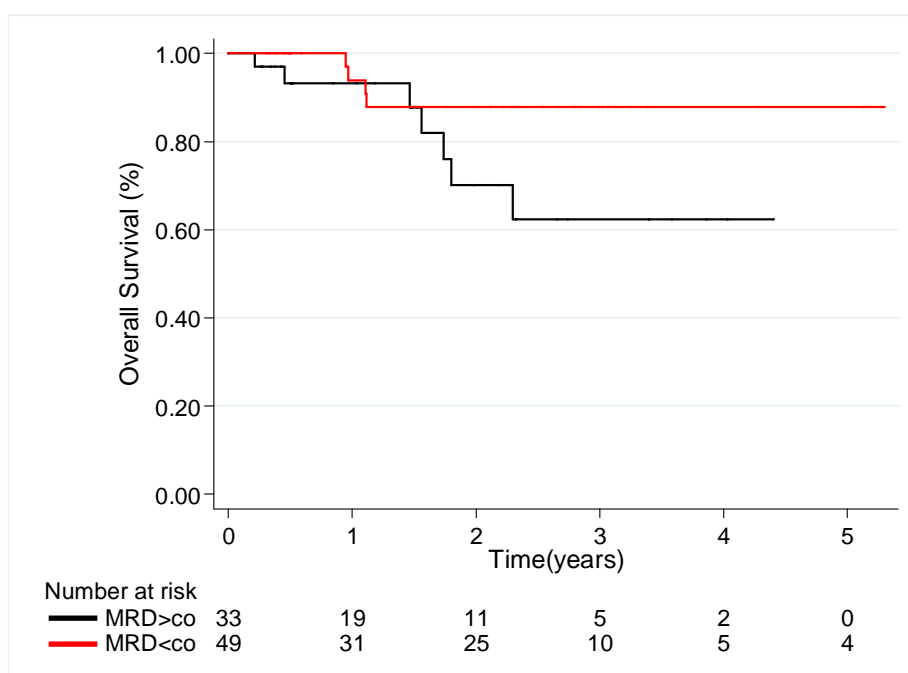


Figure 35 : OS censurée à la greffe par réponse moléculaire pour les mutations d'*IDH1* R132 et *IDH2* R140Q

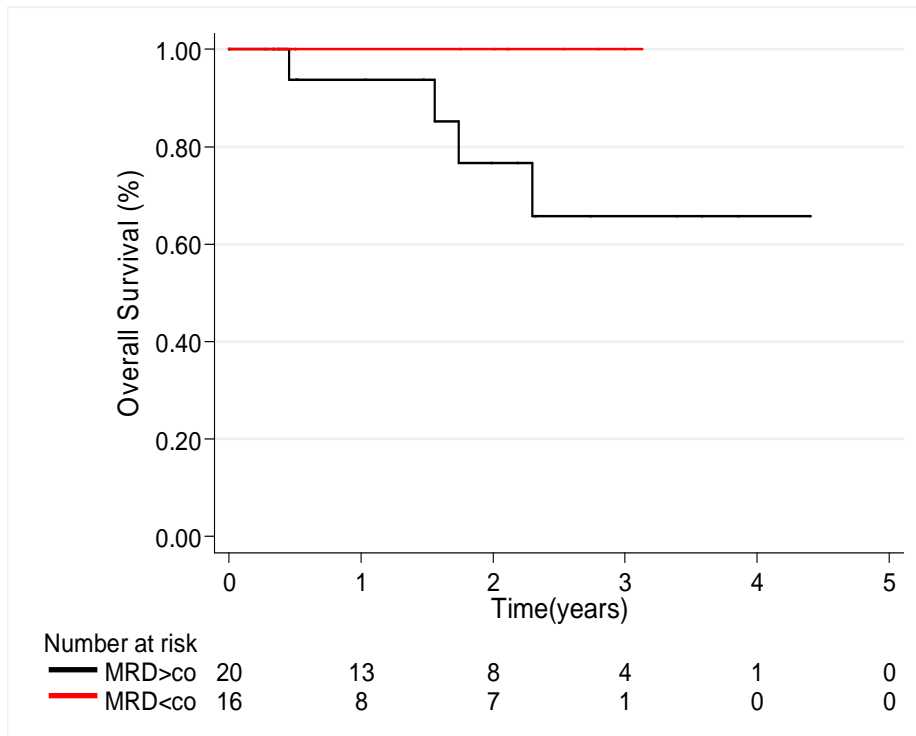


Figure 36 : OS censurée à la greffe par réponse moléculaire pour les mutations d'*IDH1* R132 (seuil AF=0,1%)

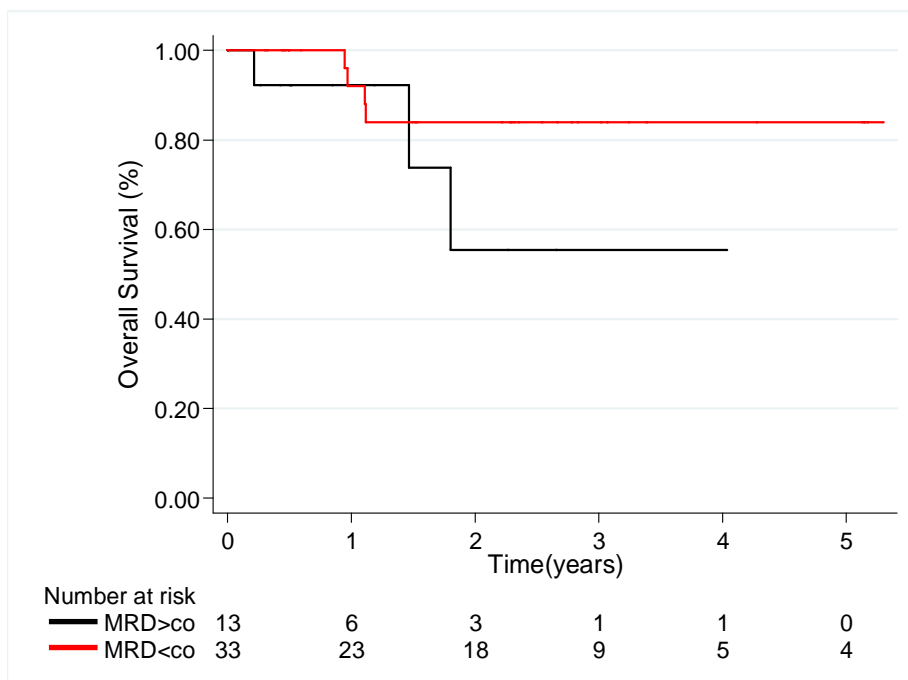


Figure 37 : OS censurée à la greffe par réponse moléculaire pour les mutations d'*IDH2* R140Q (seuil AF=0,5%)

L'impact pronostique de la MRD post-induction sur l'OS est significatif dans le groupe *IDH1* R132 - *IDH2* R140Q uniquement. L'allure des courbes dans les deux sous-groupes est similaire.

b) DFS

Tableau 22 : DFS censurée à la greffe par réponse moléculaire et mutation

	MRD>co		MRD<co		HR	IC 95% HR	p
	% DFS 3 ans	IC 95% DFS	% DFS 3 ans	IC 95% DFS			
<i>IDH1</i> R132 - <i>IDH2</i> R140Q	21,6	[6,1;43,1]	74,9	[55,9;86,6]	0,24	[0,10;0,58]	<b>0,002</b>
<i>IDH1</i> R132	21,4	[4,0;47,8]	100	-	-	-	<b>0,0005</b>
<i>IDH2</i> R140Q	-	-	66,6	[43,9;81,8]	0,26	[0,08;0,90]	<b>0,033</b>

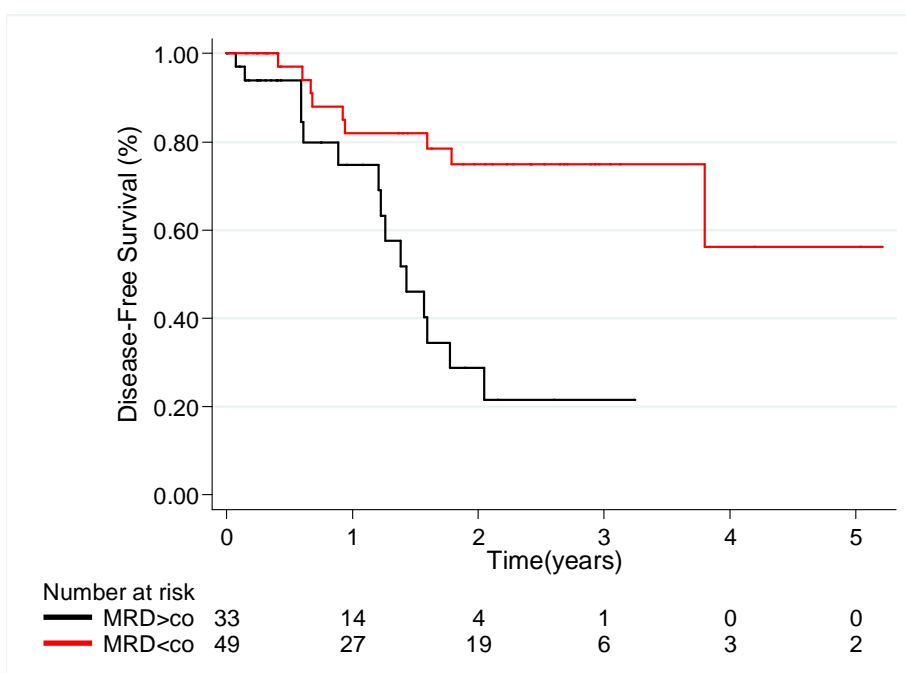


Figure 38 : DFS censurée à la greffe par réponse moléculaire pour les mutations d'*IDH1* R132 et *IDH2* R140Q

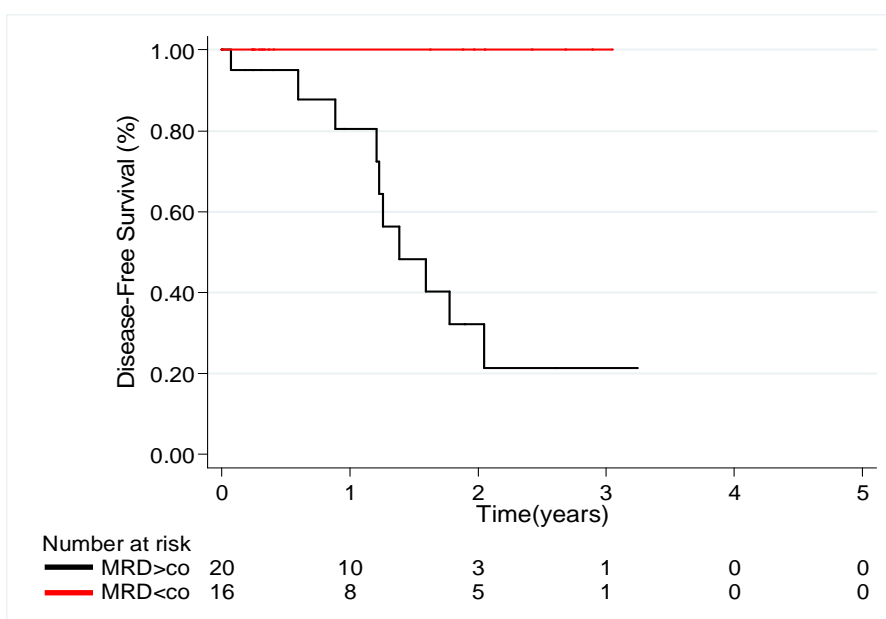


Figure 39 : DFS censurée à la greffe par réponse moléculaire pour les mutations d'*IDH1* R132 (seuil AF=0,1%)

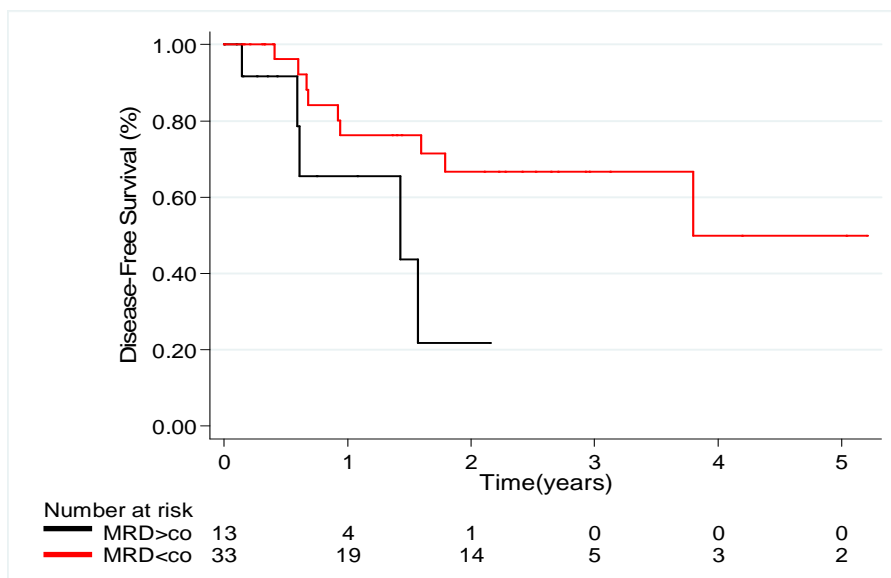


Figure 40 : DFS censurée à la greffe par réponse moléculaire pour les mutations d'IDH2 R140Q (seuil AF=0,5%)

L'impact pronostique de la MRD post-induction sur la DFS est significatif dans les trois groupes.

### 3. Impact pronostique des autres variables et analyse multivariée

Pour des raisons d'effectifs insuffisants dans les sous-groupes pour obtenir une puissance statistique suffisante, l'analyse de l'ensemble des variables recueillies, univariée et multivariée, n'a pu être effectuée que sur les patients IDH1 132 et IDH2 R140Q regroupés. Pour les mêmes raisons n'ont été retenues que les variables quantitatives et les variables qualitatives dont chacune les modalités comptaient un effectif supérieur à 10. Ainsi ont été rejetées les variables : mutations de FLT3 non ITD, de CEBPA et de TET2. Il s'agit de nouveau d'une analyse selon le modèle de Cox ajustée sur le protocole et avec censure à l'allogreffe de moelle osseuse, de l'OS et de la DFS.

Les résultats sont résumés dans les Tableaux 23, 24, 25 et 26.

#### a) OS

Tableau 23 : Analyse univariée sur l'OS censurée à la greffe

	HR	IC 95% HR	p
MRD<co	0,33	[0,10;1,12]	0,074
Age	1,08	[0,99;1,19]	0,100
Leucocytose au diagnostic	1,00	[1,00;1,01]	0,283
<b>NPM1m</b>	<b>0,31</b>	<b>[0,11;0,92]</b>	<b>0,035</b>
<b>Caryotype normal</b>	<b>0,33</b>	<b>[0,11;0,98]</b>	<b>0,046</b>
FLT3-ITD	1,87	[0,39;8,88]	0,431
<b>DNMT3Am</b>	<b>3,39</b>	<b>[1,12;10,22]</b>	<b>0,03</b>

Tableau 24 : Analyse multivariée sur l'OS censurée à la greffe

	HR	IC 95% HR	p-value
MRD<co	0,25	[0,06;1,15]	0,076
NPM1m	0,71	[0,13;3,95]	0,696
Caryotype normal	0,51	[0,08;3,16]	0,465
DNMT3Am	2,09	[0,58;7,58]	0,261



En analyse univariée *NPM1m*, la normalité du caryotype et *DNMT3Am* ont un impact significatif sur l'OS censurée à la greffe (défavorable pour *DNMT3Am*, favorable pour les deux autres), mais pas une MRD<co. Aucune de ces variables n'a un impact significatif sur l'OS censurée à la greffe en analyse multivariée.

## b) DFS

Tableau 25 : Analyse univariée sur la DFS censurée à la greffe

	HR	IC 95% HR	p
<b>MRD&lt;co</b>	<b>0,24</b>	<b>[0,10;0,58]</b>	<b>0,002</b>
âge	1,02	[0,97;1,08]	0,365
Leucocytose au diagnostic	1,00	[0,99;1,00]	0,929
<b><i>NPM1m</i></b>	<b>0,33</b>	<b>[0,16;0,67]</b>	<b>0,002</b>
<b>Caryotype normal</b>	<b>0,32</b>	<b>[0,15;0,71,]</b>	<b>0,005</b>
<i>FLT3</i> -ITD	1,43	[0,49;4,16]	0,510
<i>DNMT3Am</i>	1,89	[0,88;4,04]	0,101

Tableau 26 : Analyse multivariée sur la DFS censurée à la greffe

	HR	IC 95% HR	p
<b>MRD&lt;co</b>	<b>0,23</b>	<b>[0,09;0,62]</b>	<b>0,003</b>
<i>NPM1m</i>	0,51	[0,20;1,34]	0,172
Caryotype normal	0,36	[0,11;1,21]	0,099

En analyse univariée une MRD<co, La présence d'une mutation de *NPM1* ou d'un caryotype normal ont un impact significatif favorable sur la DFS.

En revanche seule la MRD aux seuils définis précédemment (0,1% pour *IDH1* et 0,5% pour les mutations d'*IDH2* R140Q) a un impact significatif sur DFS censurée à la greffe en analyse multivariée.

## 4. Analyse temps-dépendante de la DFS

Afin d'évaluer le bénéfice de l'allogreffe de moelle osseuse en fonction de la réponse moléculaire sur la DFS, nous avons réalisé une analyse de Mantel Byar, ajustée sur le protocole pour le groupe *IDH1* R132 et *IDH2* R140Q.

Ce modèle permet d'analyser ensemble le devenir des patients non greffés et celui des patients greffés du diagnostic jusqu'au moment de leur greffe d'une part, et dans un second groupe le devenir des patients greffés à partir de la date de leur greffe.

Les résultats sont présentés dans le [Tableau 27](#) et la [Figure 41](#):

Lorsque la MRD>co (courbes noires) la greffe n'a pas un effet protecteur de la rechute significatif, bien que les courbes évoquent une tendance.

Le groupe MRD<co compte des effectifs plus importants. Il existe une tendance plus nette à la limite de la significativité (p=0,056), pour une meilleure DFS chez les non greffés dans ce groupe.

Tableau 27 : Effet de l'allogreffe sur la DFS en fonction de la réponse moléculaire *IDH1* R132-*IDH2* R140Q

	HR	IC 95% HR	p
MRD>co	0,92	[0,31;2,77]	0,891
MRD<co	2,87	[0,97;8,49]	0,056

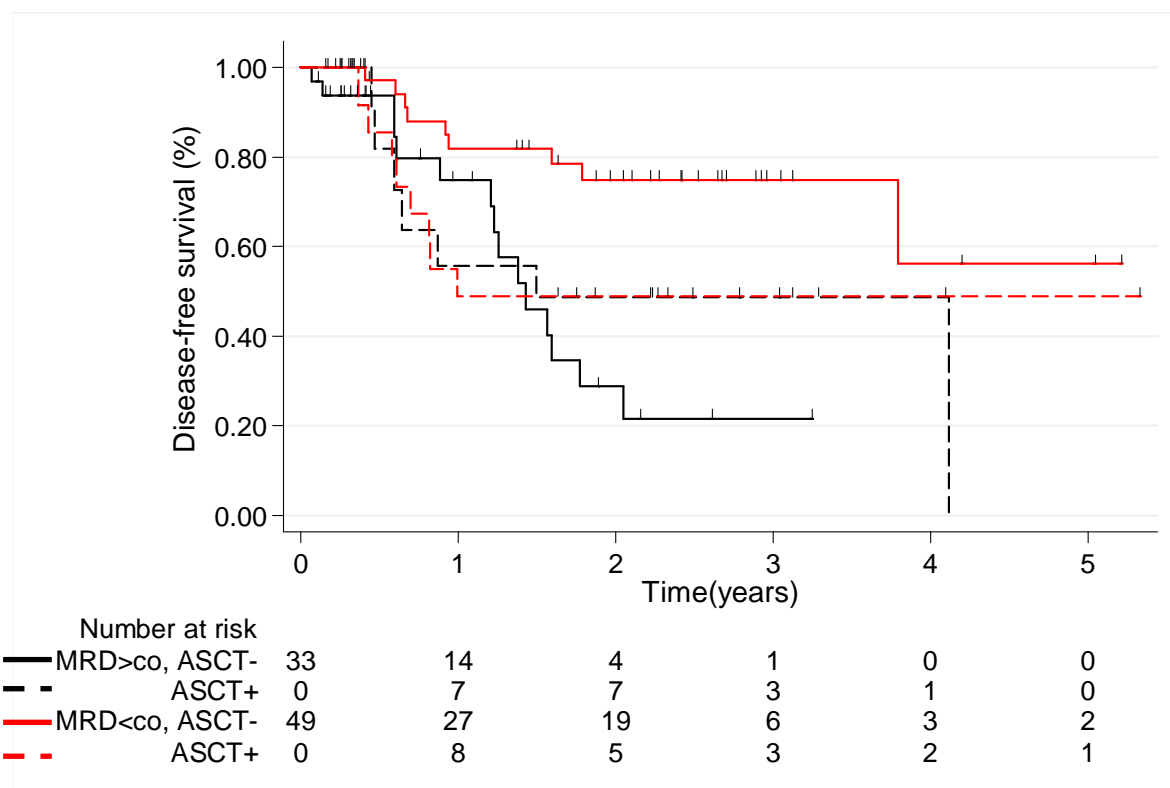


Figure 41 : Analyse temps-dépendante de la DFS en fonction de l'allogreffe et de la réponse moléculaire *IDH1* R132-*IDH2* R140Q

## F. Courbes de suivi de la MRD

Dans la majorité des cas (96/103), la MRD *IDH1/2* suivait une évolution cohérente avec les événements, et parallèle aux autres marqueurs de MRD disponibles: mutations de *NPM1* (exemple ci-dessous [Figure 42](#)) ou expression de *WT1*.

De façon notable la MRD *IDH1/2* restait fortement positive (AF>10%) à long terme chez 7 patients en RC (4 *IDH2* R140Q, 2 *IDH1* R132C et 1 *IDH1* R132H), de façon discordante avec les autres marqueurs de MRD disponibles. (Exemple ci-dessous [Figure 43](#)).

Nous sommes intéressés au devenir de ces patients particuliers et avons recherché un éventuel profil génétique ou clinique commun ([Tableau 28](#)). Les résultats sont hétérogènes et il est difficile d'en tirer des conclusions.

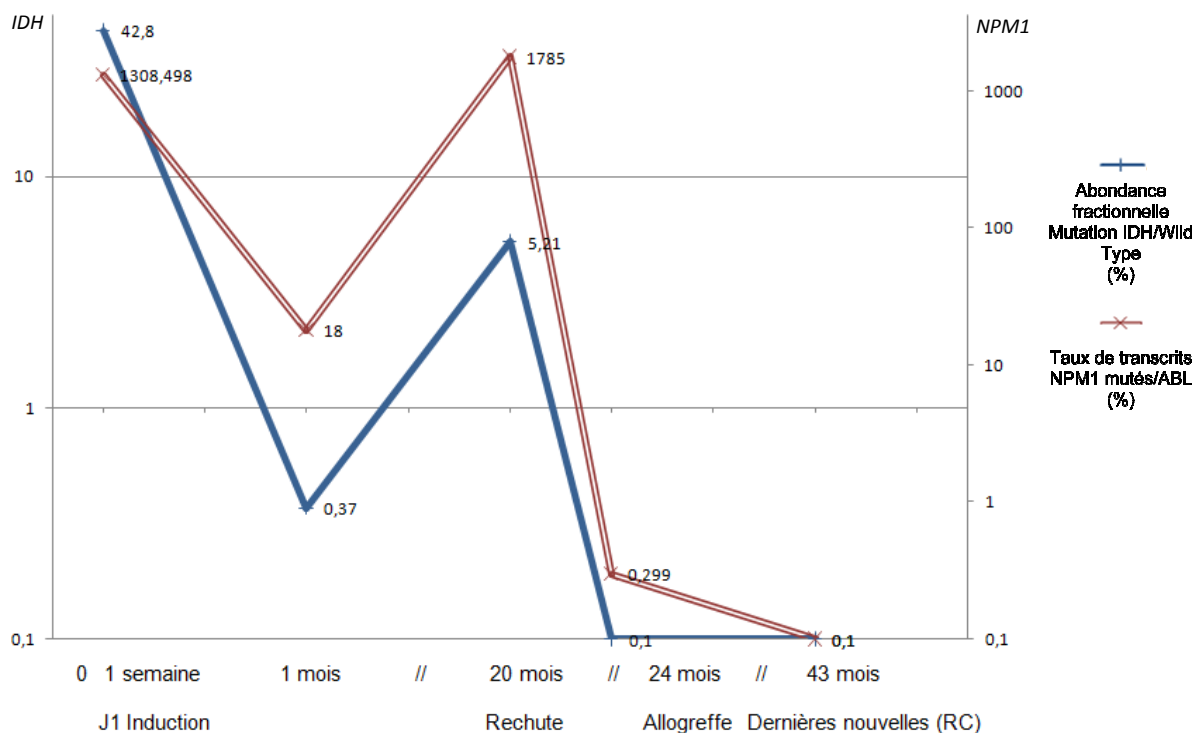


Figure 42 : Exemple d'évolution parallèle des courbes de suivi des MRD *IDH1/2* et *NPM1* (*IDH1* R132H)

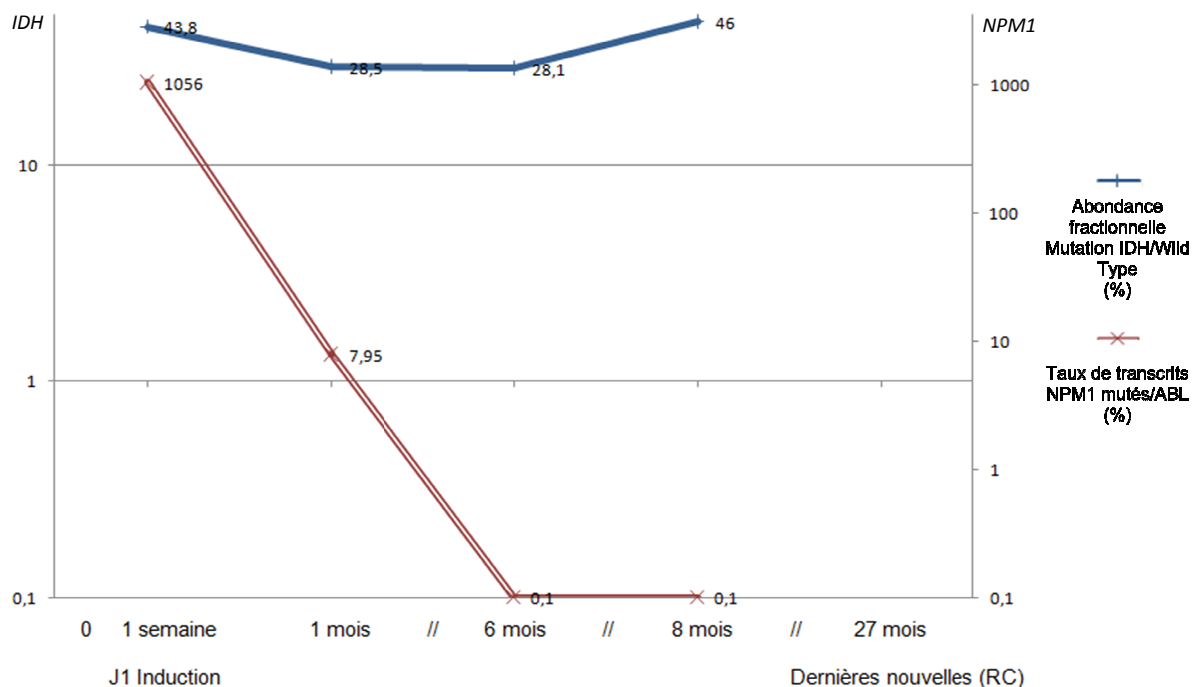


Figure 43 : Exemple de persistance d'une MRD *IDH1/2* élevée en RC avec une MRD *NPM1* indétectable (*IDH2* R140Q, patient 1)

Tableau 28 : Caractéristiques des 7 patients ayant présenté une MRD *IDH1/2* élevée persistante en RC

Patient	Age au diagnostic	Sexe	Leucocytose au diagnostic	Caryotype	<i>NPM1m</i>	<i>FLT3-ITD</i>	<i>FLT3m</i>	<i>CEBPAm</i>	Surexpression <i>EVI1</i>	<i>WT1m</i>	<i>DNMT3am</i>	<i>DNMT3a R882</i>	<i>TET2m</i>	<i>IDH1/2m</i>	Devenir
1	50	F	28	Normal	1	1	1	0	nd	0	nd	nd	nd	R140Q	Vivant RC1 à 2 ans (sans allogreffe)
2	55	H	2,4	Trisomie 8	0	0	0	nd	nd	0	1	1	0	R140Q	Rechute à 4 ans
3	55	H	4,7	Normal	1	0	0	0	nd	0	nd	nd	nd	R140Q	Décès post allogreffe
4	50	H	43	Normal	0	1	0	0	0	0	1	1	0	R140Q	Rechute à 1,5 ans
5	68	F	34	Echec	1	1	0	0	0	0	0	0	0	R132G	Décès post allogreffe
6	60	F	100	Normal	1	0	0	0	0	nd	0	0	0	R132C	Rechute à 1,5 ans
7	63	F	3,2	Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	R132C	Rechute sous forme AREB à 2,5 ans, stable depuis 1 an sans traitement

## VII. Discussion

### A. Performances de la PCR digitale

L'objectif d'une limite de détection inférieure à 0,01% d'AF n'a pas été atteint. Le facteur limitant la sensibilité analytique n'était pas le nombre de copies testées mais le bruit de fond des contrôles sur ADN wt. Le profil analytique de ces contrôles est particulier : aucune gouttelette simple positif en ADN muté n'a été détectée pour aucun de ces contrôles, quelle que soit la mutation. Les seules gouttelettes positives en ADN muté étaient double positives (voir l'exemple [Figure 44](#)). Il s'agit en réalité de gouttelettes faussement positives.

En effet dans nos conditions d'analyse, en moyenne entre la moitié et trois quarts des gouttelettes étaient positives en wt. Ce qui veut dire qu'une copie d'ADN muté répartie de façon aléatoire doit se trouver en moyenne entre une fois sur deux et une fois sur quatre dans une gouttelette ne contenant pas de copie wt. Cette proportion est d'ailleurs respectée dans les échantillons réellement positifs. La probabilité que les copies d'ADN muté ne se trouvent jamais dans une gouttelette en l'absence d'une copie wt et ce pour un grand nombre d'échantillons est proche de zéro.

Les contrôles sans ADN attestent par ailleurs de l'absence de contaminations.

Ce type de signaux faussement positifs dépendants de la présence de la cible non mutée dans les gouttelettes est décrit par le fabricant et est imputée par lui à des erreurs de la polymérase induites par des séquences particulières ou des dommages de l'ADN.

La polymérase va, à une faible fréquence, introduire dans la séquence néo synthétisée à partir de la copie wt une mutation favorisant la fixation de la sonde mutée puis son hydrolyse.

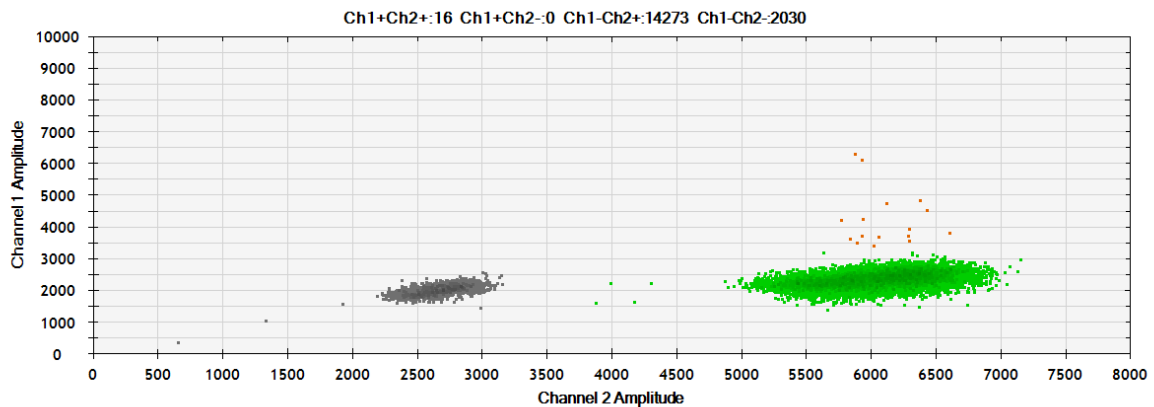


Figure 44 : Exemple de contrôle wt (R132H). Les gouttelettes orange sont faussement positives.

L'utilisation d'une polymérase différente pourrait avoir un intérêt. Bien que l'enzyme commercialisée par Bio-Rad soit déjà une polymérase de haute fidélité. Le kit commercialisé contient l'enzyme déjà mélangée aux autres réactifs, ce qui ne permet pas à l'heure actuelle d'en tester une autre.

## B. Profil génétique des LAM incluses

L'analyse des caractéristiques des patients (VI.A) permet de constater que, comme attendu (voir II.C.4), parmi les LAM incluses figure une grande proportion de LAM-CN et *NPM1m*, auxquelles les mutations d'*IDH1/2* sont nettement associées. Les mutations de *DNMT3A* et de *FLT3* sont également bien représentées, elles sont effectivement fréquentes dans les LAM et associées à *NPM1m*.

Aucune LAM-CBF n'a été incluse. Les LAM-CBF constituaient un critère d'exclusion dans le protocole ALFA-0702. Et seulement 3% de LAM de caryotype favorable ont été incluses dans le protocole ALFA-0701, probablement du fait de la faible incidence de ce type de LAM dans la population âgée, peut-être associé dans la tranche des 50-60 ans à la concurrence des inclusions dans le protocole CBF-2006. Les mutations d'*IDH1/2* sont décrites comme quasiment exclusives des LAM-CBF (voir II.C.4, Figure 10), nos données se sont pas contributives pour étayer cette observation.

Les données présentées ne concernent que les patients finalement analysés et ayant donc atteint la RC. Elles ne reflètent pas l'ensemble du paysage génétique des LAM *IDH1/2m*. Il est par exemple possible que la fréquence des LAM de pronostic cytogénétique défavorable soit sous-estimée. Ces biais nécessitent une interprétation prudente.

Néanmoins il convient de signaler que 25% (5/21) des mutations *IDH2* R172K sont associées à une trisomie 11. Or la trisomie 11 est rare dans les LAM, environ 1% (228). Peu d'études détaillent les anomalies cytogénétiques retrouvées avec les mutations d'*IDH1/2* et nous n'avons retrouvé qu'une étude décrivant 4 LAM *IDH2* R172K, dont 2 présentaient une trisomie 11 (229). Dans notre cohorte la trisomie 11 n'est retrouvée associée à aucune autre mutation d'*IDH1/2*. Dans l'ensemble des patients du protocole ALFA-0701 (données non disponibles pour le protocole ALFA-0702), seulement 1,8% (5/278) ont une trisomie 11 (2 sur 4 ont la mutation *IDH2* R172K).

Les trisomies 11 sont traditionnellement associées à des anomalies de *KMT2A* (amplification ou duplication partielle en tandem) (230), mais les mutations d'*IDH2* R172K sont presque exclusives des mutations de *KMT2A*. Dans notre cohorte 3 des 5 cas n'ont pas la mutation *KMT2A*-PTD, les deux autres cas ne sont pas documentés. Cette association trisomie 11/*IDH2* R172K si elle est vérifiée pourrait être une information intéressante pour l'exploration de la leucémogénèse de ces LAM. Une

étude des LAM *IDH2* R172K de caryotype normal en CGH (Hybridation Génomique Comparative) ou SNP array à la recherche de gains cryptiques dans le chromosome 11 pourrait avoir un intérêt de même que la recherche de mutations dans les gènes connus pour être impliqués dans la leucémogénèse présents sur le chromosome 11.

Par ailleurs aucune mutation *IDH2* R172K n'était accompagnée d'une mutation de *CEBPA*, *NPM1* ni *FLT3*, conformément à la littérature (voir II.C.4).

## C. Survie

### 1. En fonction de la mutation

Le mauvais pronostic associé à *IDH2* R172K serait au moins en partie lié à un plus faible taux de RC (voir III.F.2.e), une tendance est observée dans notre cohorte mais elle n'est pas significative (Tableau 14).

Chez les patients ayant atteint la RC, nous ne retrouvons pas de différence d'OS ni de DFS en fonction de la mutation (voir VI.D.b).

### 2. En fonction de la réponse moléculaire

Dans notre cohorte la MRD *IDH1/IDH2* R140Q est la seule variable qui a un impact pronostique de la rechute (DFS censurée à la greffe) en analyse multivariée (voir VI.E.3.b).

Dans le groupe de pronostic intermédiaire actuel, un patient « bon répondeur » en MRD *IDH1/2* peut-il être exempté d'une allogreffe de moelle osseuse ? L'analyse temps dépendant qui vise à répondre à cette question clinique essentielle n'a pas permis de trancher (voir VI.E.4). Le test est à la limite de la significativité ( $p=0,056$ ). La durée de suivi des patients du protocole ALFA-0702 est encore assez courte et les données sont régulièrement mises à jour. Le test méritera d'être réitéré après actualisation des dernières nouvelles et permettra probablement de confirmer ou infirmer la tendance.

La MRD *IDH2* R172K n'est pas corrélée à la rechute, dans nos conditions d'analyse. Nous avons vu que les seuils décisionnels pertinents variaient en fonction de la mutation. Il est permis d'imaginer qu'un seuil décisionnel pertinent existe pour *IDH2* R172K mais que les LOD et LOQ de la PCR digitale ne nous ont pas permis de l'atteindre. Les travaux de H Debarri (216) ont montré que le NGS ne permettait actuellement pas de faire mieux en termes de sensibilité analytique. Si cette hypothèse est vraie nous nous heurtons à une limite technique.

Une autre hypothèse est que la MRD *IDH2* R172K n'est réellement pas corrélée à la survenue d'une rechute. Cette idée s'accorde bien avec la nature biologique et clinique particulière de ces mutations.

Les seuils décisionnels de 0,1% et 0,5% définis pour les autres mutations sont assez élevés et sont techniquement assez accessibles. La sensibilité analytique décevante au regard des objectifs initiaux obtenue en PCR digitale n'est pas problématique, au moins en fin d'induction.

La nécessité d'atteindre de meilleurs seuils de détection et quantification peut être discutée. Elle devra être évaluée notamment pour des points prélevés après consolidation ou en suivi au long cours pour la détection précoce des rechutes moléculaires.

## D. MRD élevée en RC

La persistance d'une MRD *IDH1/2* élevée chez des patients en RC et de façon discordante avec les autres marqueurs de MRD disponibles, observée chez 7 patients de notre cohorte, est un phénomène déjà décrit :

-Chou et Al. rapportent 3 cas de persistance en RC : 2 *IDH2* R140Q et 1 *IDH1* R132H, avec aucune rechute en 10, 4 et 4 ans. L'étude était menée sur 19 *IDH1* R132, 18 *IDH2* R140 et 9 *IDH2* R172, mutations confirmées somatiques sur prélèvements périphériques et recherchées par séquençage en technique Sanger sur moelle. Dans deux des trois cas le 2-HG extrait des leucocytes circulants a été quantifié en spectrométrie de masse en RC précoce et retrouvait une production anormalement haute de l'oncométabolite en accord avec la MRD *IDH1/2* (223).

-Jeziskova et al retrouvent 1 cas (sur 8) de persistance d'*IDH2* R140Q en RC, suivie d'une rechute à 11 mois. Le patient avait une neutrophilie et une lymphocytose, et était traité par corticothérapie pour une maladie de Crohn. La recherche était effectuée en QPCR sur moelle (224).

-Debarri et al décrivent 4 cas similaires : 2 *IDH1* R132C, 1 *IDH1* R132H et 1 *IDH2* R140Q. 3 d'entre eux ont rechuté après 504, 395 et 158 jours, le quatrième a développé un syndrome myélodysplasique ayant perdu la mutation *NPM1* présente au diagnostic. Cette étude a été menée sur 8 patients *IDH1m* et 9 *IDH2m* en NGS (216).

Quels enseignements tirer de ces données associées aux nôtres (Tableau 28) ?

-Le phénomène a été observé pour les mutations d'*IDH1* R132C, R132H, R132G et d'*IDH2* R140Q, mais pas R172K. Le faible nombre de cas décrits ne permet pas de dire s'il s'agit d'une coïncidence favorisée par la faible fréquence de cette mutation ou si cela constitue une nouvelle particularité propre à ce codon.

-L'événement n'est pas rare, il va selon les études de 6 à 24% des LAM *IDH1/2m*.

-Il conviendrait comme dans l'étude de Chou et Al., de vérifier la nature systématiquement somatique de la mutation chez ces patients particuliers par une recherche des mutations par exemple sur biopsie de peau. En effet les mutations d'*IDH2* R140Q peuvent être constitutionnelles (la pathologie étant rare, on ne sait pas si d'autres mutations d'*IDH1/2* peuvent être impliquées). Elles provoquent l'acidurie à D-2HG de type 2. Cette pathologie est autosomique dominante, à pénétrance incomplète. Les individus, homozygotes pourront être atteints d'un syndrome neuro-métabolique de gravité variable mais peuvent aussi rester asymptomatiques. L'anomalie semble préférentiellement survenir de novo mais un cas hérité d'une mosaïque d'un parent est rapporté (24).

-Dans le cas d'anomalies somatiques, les mutations d'*IDH1/2* pourraient se comporter comme *DNMT3A*, des mutations très précoces insuffisantes pour provoquer seules une LAM, pouvant être pré-leucémiques en accord avec le modèle multi-étapes de leucémogénèse, ou à l'origine d'une hématopoïèse clonale de signification indéterminé.

-L'impact de la persistance de la mutation sur le devenir des patient est incertain, si l'on résume l'ensemble des 15 cas décrits on compte 7 rechutes dont 5 en moins d'1,5 ans, 2 évolutions sous forme de SMD et 4 rémissions dont une avec un recul court de 2 ans et trois de plus de 4 ans (plus deux décès post allogreffe). Les cas rapportés de mutation constitutionnelle d'*IDH1/2* ne semblaient pas associés à un risque oncologique particulier mais il s'agissait de patients jeunes (24).

Si la MRD *IDH1/2* devait être utilisée en pratique courante dans le futur, la connaissance du pronostic associé à ce type d'évolution de la maladie résiduelle déterminera la nécessité de le rechercher systématiquement ou non. L'interprétation des données de MRD pourrait s'en trouver compliquée.

-Il ne s'est pas dégagé dans notre cohorte de profil génétique particulier associé à ces MRD élevées en RC. Une étude des données mutationnelles des 7 patients sur un panel de gènes plus large permettrait d'approfondir la recherche.

## E. Limites

Les données n'ont pas permis d'évaluer la MRD post-consolidation mais que la MRD post-induction. En effet passée l'induction, les dates de début ou fin des temps thérapeutiques étaient absentes du recueil des données du protocole ALFA-0702, ne permettant pas de situer avec certitude les points de suivi suivants dans l'histoire clinique des patients.

Nous avons trop peu de prélèvements de suivi au long cours (voir [Tableau 13](#)) pour pouvoir étudier de façon précise l'association rechute moléculaire-rechute et sa cinétique.

Nous n'avons pas comparé la MRD mesurée sur moelle et sur sang. Les seuls échantillons sanguins exploités sont des prélèvements au diagnostic. L'analyse de prélèvements au diagnostic avait deux objectifs. Le premier était de vérifier la présence de la mutation, détectée initialement par plusieurs méthodes et laboratoires différents et souvent indétectable sur les points de suivis. (Cela nous a notamment permis d'exclure un patient dont la supposée mutation *IDH1* R132C n'a jamais été retrouvée). Le second était d'obtenir un ordre de grandeur de l'abondance de la mutation au diagnostic. Ces échantillons, non appariés, (les échantillons de sang ont été utilisés lorsqu'il n'y avait pas de moelle disponible) ne permettent pas de comparer les abondances fractionnelles sur sang et sur moelle. Il sera nécessaire de comparer les MRD sur sang et sur moelle afin de déterminer quel prélèvement est le plus pertinent. La différence sera critique surtout pour les valeurs basses en suivi.

## VIII. Conclusion

La MRD est un outil de stratification pronostique majeur dans les leucémies aiguës. Nos résultats suggèrent que les mutations d'*IDH1* et *IDH2* R140Q pourraient être des marqueurs de MRD pertinents dans les LAM. Ces données devront être validées sur une cohorte indépendante. L'intérêt de MRD *IDH1/2* serait une aide à la stratification pronostique des patients actuellement classés dans les groupes intermédiaires, notamment en l'absence d'une mutation d'*NPM1* ou d'une hyper-expression de *WT1* pouvant être suivies en MRD, mais aussi potentiellement en combinaison avec ces marqueurs de MRD. Les données de notre cohorte ne sont cependant pas assez puissantes pour ériger la réponse moléculaire *IDH1/2* en critère d'indication de l'allogreffe.

Le prélèvement le plus pertinent pour l'analyse moléculaire est à définir.

L'intérêt de la quantification du D-2HG sérique en spectrométrie de masse en tant que marqueur de la MRD de fin d'induction dans les LAM *IDH1/2m* a également été montré dans une étude du groupe ALFA (voir III.H.5) (225). Les 31 patients ayant atteint la RC inclus dans ce travail étaient également issus des protocoles ALFA-0701 et 0702. Sachant que nous avons pu inclure dans notre cohorte 103 des 131 patients mutés en RC il est probable qu'une part respectable des 31 patients soient communs aux deux études. Une analyse des données appariées pourrait être une étape dans la comparaison des deux approches.



Avec l'avènement des inhibiteurs des enzymes IDH1 et 2 mutées, la personnalisation du traitement à partir des données de MRD per et post-traitement pourrait devenir un nouveau champ d'investigation.

## IX. Bibliographie

1. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):105–11.
2. Beyne-Rauzy O. Tumor necrosis factor- inhibits hTERT gene expression in human myeloid normal and leukemic cells. *Blood*. 2005 Nov 1;106(9):3200–5.
3. Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol*. 2007 Feb;7(2):105–17.
4. Huntly BJP, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer*. 2005 Apr;5(4):311–21.
5. Orkin SH, Zon LI. SnapShot: hematopoiesis. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):712.
6. Nardi NB, Alfonso ZZ. The hematopoietic stroma. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al*. 1999 May;32(5):601–9.
7. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994 Feb 17;367(6464):645–8.
8. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997 Jul;3(7):730–7.
9. De Figueiredo-Pontes LL, Pintão M-CT, Oliveira LCO, Dalmazzo LFF, Jácomo RH, Garcia AB, et al. Determination of P-glycoprotein, MDR-related protein 1, breast cancer resistance protein, and lung-resistance protein expression in leukemic stem cells of acute myeloid leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008 May;74B(3):163–8.
10. Grove CS, Vassiliou GS. Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? *Dis Model Mech*. 2014 Aug 1;7(8):941–51.
11. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013 Jun 16;499(7457):214–8.
12. The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2013 May 30;368(22):2059–74.
13. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002 Sep 1;100(5):1532–42.
14. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012 Jan 11;481(7382):506–10.
15. Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2 Mutations in Cancer: Alterations at a Crossroads of Cellular Metabolism. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2010 Jul 7;102(13):932–41.
16. Yen KE, Bittinger MA, Su SM, Fantin VR. Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene*. 2010 Dec 9;29(49):6409–17.
17. Dang L, Jin S, Su SM. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mol Med*. 2010 Sep;16(9):387–97.
18. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2006 Oct 13;314(5797):268–74.
19. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008 Sep 26;321(5897):1807–12.
20. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome. *N Engl J Med*. 2009 Sep 10;361(11):1058–66.

21. Gross S, Cairns RA, Minden MD, Driggers EM, Bittinger MA, Jang HG, et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med*. 2010 Feb 15;207(2):339–44.
22. Marcucci G, Maharry K, Wu Y-Z, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 May 10;28(14):2348–55.
23. Ward PS, Cross JR, Lu C, Weigert O, Abel-Wahab O, Levine RL, et al. Identification of additional IDH mutations associated with oncometabolite R(-)-2-hydroxyglutarate production. *Oncogene*. 2012 May 10;31(19):2491–8.
24. Kranendijk M, Struys EA, van Schaftingen E, Gibson KM, Kanhai WA, van der Knaap MS, et al. IDH2 Mutations in Patients with D-2-Hydroxyglutaric Aciduria. *Science*. 2010 Oct 15;330(6002):336–336.
25. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, et al. The Common Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting  $\alpha$ -Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. 2010 Mar;17(3):225–34.
26. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):765–73.
27. Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, et al. Glioma-Derived Mutations in IDH1 Dominantly Inhibit IDH1 Catalytic Activity and Induce HIF-1. *Science*. 2009 Apr 10;324(5924):261–5.
28. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009 Dec 10;462(7274):739–44.
29. Pietrak B, Zhao H, Qi H, Quinn C, Gao E, Boyer JG, et al. A tale of two subunits: how the neomorphic R132H IDH1 mutation enhances production of  $\alpha$ HG. *Biochemistry (Mosc)*. 2011 May 31;50(21):4804–12.
30. Jin G, Reitman ZJ, Duncan CG, Spasojevic I, Gooden DM, Rasheed BA, et al. Disruption of wild-type IDH1 suppresses D-2-hydroxyglutarate production in IDH1-mutated gliomas. *Cancer Res*. 2013 Jan 15;73(2):496–501.
31. Lindahl G, Lindstedt G, Lindstedt S. Metabolism of 2-amino-5-hydroxyadipic acid in the rat. *Arch Biochem Biophys*. 1967 Mar;119(1):347–52.
32. Chalmers RA, Lawson AM, Watts RW, Tavill AS, Kamerling JP, Hey E, et al. D-2-hydroxyglutaric aciduria: case report and biochemical studies. *J Inher Metab Dis*. 1980;3(1):11–5.
33. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim S-H, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*. 2011 Jan 18;19(1):17–30.
34. Loenarz C, Schofield CJ. Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. *Nat Chem Biol*. 2008 Mar;4(3):152–6.
35. Krell D, Mulholland P, Frampton AE, Krell J, Stebbing J, Bardella C. IDH mutations in tumorigenesis and their potential role as novel therapeutic targets. *Future Oncol Lond Engl*. 2013 Dec;9(12):1923–35.
36. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009 May 15;324(5929):930–5.
37. Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming G, Song H. Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle Georget Tex*. 2011 Aug 15;10(16):2662–8.
38. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 2010 Aug 26;466(7310):1129–33.

39. Jin S-G, Jiang Y, Qiu R, Rauch TA, Wang Y, Schackert G, et al. 5-Hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations. *Cancer Res.* 2011 Dec 15;71(24):7360–5.
40. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell.* 2010 May 18;17(5):510–22.
41. Laffaire J, Everhard S, Idbaih A, Crinière E, Marie Y, de Reyniès A, et al. Methylation profiling identifies 2 groups of gliomas according to their tumorigenesis. *Neuro-Oncol.* 2011 Jan;13(1):84–98.
42. Christensen BC, Smith AA, Zheng S, Koestler DC, Houseman EA, Marsit CJ, et al. DNA methylation, isocitrate dehydrogenase mutation, and survival in glioma. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Jan 19;103(2):143–53.
43. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol.* 2009 Apr;174(4):1149–53.
44. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature.* 2012 Mar 22;483(7390):474–8.
45. Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature.* 2012 Mar 22;483(7390):479–83.
46. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell.* 2010 Dec 14;18(6):553–67.
47. Pollyea DA, Kohrt HE, Zhang B, Zehnder J, Schenkein D, Fantin V, et al. 2-Hydroxyglutarate in IDH mutant acute myeloid leukemia: predicting patient responses, minimal residual disease and correlations with methylcytosine and hydroxymethylcytosine levels. *Leuk Lymphoma.* 2013 Feb;54(2):408–10.
48. Sasaki M, Knobbe CB, Munger JC, Lind EF, Brenner D, Brüstle A, et al. IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. *Nature.* 2012 Aug 30;488(7413):656–9.
49. Metellus P, Colin C, Taieb D, Guedj E, Nanni-Metellus I, de Paula AM, et al. IDH mutation status impact on in vivo hypoxia biomarkers expression: new insights from a clinical, nuclear imaging and immunohistochemical study in 33 glioma patients. *J Neurooncol.* 2011 Dec;105(3):591–600.
50. Weljie AM, Bondareva A, Zang P, Jirik FR. (1)H NMR metabolomics identification of markers of hypoxia-induced metabolic shifts in a breast cancer model system. *J Biomol NMR.* 2011 Apr;49(3-4):185–93.
51. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell.* 2010 Oct 22;40(2):294–309.
52. Sasaki M, Knobbe CB, Itsumi M, Elia AJ, Harris IS, Chio IIC, et al. D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH1 perturbs collagen maturation and basement membrane function. *Genes Dev.* 2012 Sep 15;26(18):2038–49.
53. Chowdhury R, Yeoh KK, Tian Y-M, Hillringhaus L, Bagg EA, Rose NR, et al. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Rep.* 2011 May;12(5):463–9.
54. Koivunen P, Lee S, Duncan CG, Lopez G, Lu G, Ramkissoon S, et al. Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature.* 2012 Mar 22;483(7390):484–8.
55. Losman J-A, Looper RE, Koivunen P, Lee S, Schneider RK, McMahon C, et al. (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science.* 2013 Mar 29;339(6127):1621–5.
56. Williams SC, Karajannis MA, Chiriboga L, Golfinos JG, von Deimling A, Zagzag D. R132H-mutation of isocitrate dehydrogenase-1 is not sufficient for HIF-1 $\alpha$  upregulation in adult glioma. *Acta Neuropathol (Berl).* 2011 Feb;121(2):279–81.

57. Bardella C, Pollard PJ, Tomlinson I. SDH mutations in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Nov;1807(11):1432–43.
58. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 1997 Jan 24;88(2):277–85.
59. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
60. Pollard P, Wortham N, Barclay E, Alam A, Elia G, Manek S, et al. Evidence of increased microvessel density and activation of the hypoxia pathway in tumours from the hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome. *J Pathol*. 2005 Jan;205(1):41–9.
61. Smith EH, Janknecht R, Maher LJ. Succinate inhibition of alpha-ketoglutarate-dependent enzymes in a yeast model of paraganglioma. *Hum Mol Genet*. 2007 Dec 15;16(24):3136–48.
62. Reitman ZJ, Jin G, Karoly ED, Spasojevic I, Yang J, Kinzler KW, et al. Profiling the effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations on the cellular metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 22;108(8):3270–5.
63. Latini A, da Silva CG, Ferreira GC, Schuck PF, Scussiato K, Sarkis JJ, et al. Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. *Mol Genet Metab*. 2005 Oct;86(1-2):188–99.
64. Kölker S, Pawlak V, Ahlemeyer B, Okun JG, Hörster F, Mayatepek E, et al. NMDA receptor activation and respiratory chain complex V inhibition contribute to neurodegeneration in d-2-hydroxyglutaric aciduria. *Eur J Neurosci*. 2002 Jul;16(1):21–8.
65. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1076–80.
66. Luksch H, Uckermann O, Stepulak A, Hendruschk S, Marzahn J, Bastian S, et al. Silencing of selected glutamate receptor subunits modulates cancer growth. *Anticancer Res*. 2011 Oct;31(10):3181–92.
67. Piao Y, Lu L, de Groot J. AMPA receptors promote perivascular glioma invasion via beta1 integrin-dependent adhesion to the extracellular matrix. *Neuro-Oncol*. 2009 Jun;11(3):260–73.
68. Lyons SA, Chung WJ, Weaver AK, Ogunrinu T, Sontheimer H. Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion. *Cancer Res*. 2007 Oct 1;67(19):9463–71.
69. Seltzer MJ, Bennett BD, Joshi AD, Gao P, Thomas AG, Ferraris DV, et al. Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Res*. 2010 Nov 15;70(22):8981–7.
70. McFarland MS, Cripps R. Diabetes mellitus and increased risk of cancer: focus on metformin and the insulin analogs. *Pharmacotherapy*. 2010 Nov;30(11):1159–78.
71. Ronnebaum SM, Ilkayeva O, Burgess SC, Joseph JW, Lu D, Stevens RD, et al. A pyruvate cycling pathway involving cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase regulates glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem*. 2006 Oct 13;281(41):30593–602.
72. Latini A, Scussiato K, Rosa RB, Llesuy S, Belló-Klein A, Dutra-Filho CS, et al. D-2-hydroxyglutaric acid induces oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Eur J Neurosci*. 2003 May;17(10):2017–22.
73. Rakheja D, Konoplev S, Medeiros LJ, Chen W. IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Hum Pathol*. 2012 Oct;43(10):1541–51.
74. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N Engl J Med*. 2009;360(8):765–73.
75. Patnaik MM, Hanson CA, Hodnefield JM, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, et al. Differential prognostic effect of IDH1 versus IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes: a Mayo Clinic Study of 277 patients. *Leukemia*. 2012 Jan;26(1):101–5.

76. Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, Guglielmelli P, Patel J, Caramazza D, et al. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia*. 2010 Jul;24(7):1302–9.
77. Zhang Y, Wei H, Tang K, Lin D, Zhang C, Mi Y, et al. Mutation Analysis of Isocitrate Dehydrogenase in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Genet Test Mol Biomark*. 2012 Aug;16(8):991–5.
78. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Habdank M, Krönke J, Bullinger L, et al. 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. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 8;28(22):3636–43.
79. Schnittger S, Haferlach C, Ulke M, Alpermann T, Kern W, Haferlach T. IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status. *Blood*. 2010 Dec 16;116(25):5486–96.
80. Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, Schelen A, Koenders JE, Zeilemaker A, et al. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood*. 2010 Sep 23;116(12):2122–6.
81. Patel KP, Ravandi F, Ma D, Paladugu A, Barkoh BA, Medeiros LJ, et al. Acute Myeloid Leukemia With IDH1 or IDH2 Mutation Frequency and Clinicopathologic Features. *Am J Clin Pathol*. 2011 Jan 1;135(1):35–45.
82. Damm F, Thol F, Hollink I, Zimmermann M, Reinhardt K, van den Heuvel-Eibrink MM, et al. Prevalence and prognostic value of IDH1 and IDH2 mutations in childhood AML: a study of the AML–BFM and DCOG study groups. *Leukemia*. 2011 Nov;25(11):1704–10.
83. Green CL, Evans CM, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. The prognostic significance of IDH1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on FLT3/ITD status. *Blood*. 2010 Oct 14;116(15):2779–82.
84. Rakheja D, Konoplev S, Medeiros LJ, Chen W. IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Hum Pathol*. 2012 Oct;43(10):1541–51.
85. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012: étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire; 2013.
86. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010 Jan 21;115(3):453–74.
87. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* [Internet]. 2016 Apr 11 [cited 2016 May 16]; Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2016-03-643544>
88. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999 Sep 30;341(14):1051–62.
89. Smith ML, Hills RK, Grimwade D. Independent prognostic variables in acute myeloid leukaemia. *Blood Rev*. 2011 Jan;25(1):39–51.
90. Kayser S, Dohner K, Krauter J, Kohne C-H, Horst HA, Held G, et al. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood*. 2011 Feb 17;117(7):2137–45.
91. Weinberg OK, Seetharam M, Ren L, Seo K, Ma L, Merker JD, et al. Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. *Blood*. 2009 Feb 26;113(9):1906–8.
92. Miesner M, Haferlach C, Bacher U, Weiss T, Maciejewski K, Kohlmann A, et al. Multilineage dysplasia (MLD) in acute myeloid leukemia (AML) correlates with MDS-related cytogenetic abnormalities and a prior

- history of MDS or MDS/MPN but has no independent prognostic relevance: a comparison of 408 cases classified as “AML not otherwise specified” (AML-NOS) or “AML with myelodysplasia-related changes” (AML-MRC). *Blood*. 2010 Oct 14;116(15):2742–51.
93. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010 Jul 22;116(3):354–65.
94. Kayser S, Zucknick M, Dohner K, Krauter J, Kohne C-H, Horst HA, et al. Monosomal karyotype in adult acute myeloid leukemia: prognostic impact and outcome after different treatment strategies. *Blood*. 2012 Jan 12;119(2):551–8.
95. Wouters BJ, Lowenberg B, Erpelinck-Verschueren CAJ, van Putten WLJ, Valk PJM, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood*. 2009 Mar 26;113(13):3088–91.
96. Grossmann V, Schnittger S, Kohlmann A, Eder C, Roller A, Dicker F, et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. *Blood*. 2012 Oct 11;120(15):2963–72.
97. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Acute Myeloid Leukemia version 1.2015. NCCN.org.
98. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012 Mar 22;366(12):1079–89.
99. Sloan CE, Lusk MR, Boccuti AM, Sehgal AR, Zhao J, Daber RD, et al. A Modified Integrated Genetic Model for Risk Prediction in Younger Patients with Acute Myeloid Leukemia. Mills K, editor. *PLOS ONE*. 2016 Apr 6;11(4):e0153016.
100. Mead AJ, Linch DC, Hills RK, Wheatley K, Burnett AK, Gale RE. FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2007 Aug 15;110(4):1262–70.
101. Boissel N, Nibourel O, Renneville A, Gardin C, Reman O, Contentin N, et al. Prognostic Impact of Isocitrate Dehydrogenase Enzyme Isoforms 1 and 2 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *J Clin Oncol*. 2010 Oct 8;28(23):3717–23.
102. Green CL, Evans CM, Zhao L, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, et al. The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation. *Blood*. 2011 Jul 14;118(2):409–12.
103. Thol F, Damm F, Wagner K, Göhring G, Schlegelberger B, Hoelzer D, et al. Prognostic impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010 Jul 29;116(4):614–6.
104. Wagner K, Damm F, Göhring G, Görlich K, Heuser M, Schäfer I, et al. Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 May 10;28(14):2356–64.
105. Chou W-C, Hou H-A, Chen C-Y, Tang J-L, Yao M, Tsay W, et al. Distinct clinical and biologic characteristics in adult acute myeloid leukemia bearing the isocitrate dehydrogenase 1 mutation. *Blood*. 2010 Apr 8;115(14):2749–54.
106. Chou W-C, Lei W-C, Ko B-S, Hou H-A, Chen C-Y, Tang J-L, et al. The prognostic impact and stability of Isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011 Feb;25(2):246–53.
107. Rakheja D, Konoplev S, Su M, Wheeler D, Muzny DM, Ruvolo VR, et al. High incidence of IDH mutations in acute myeloid leukaemia with cuplike nuclei. *Br J Haematol*. 2011 Oct;155(1):125–8.
108. Andersson AK, Miller DW, Lynch JA, Lemoff AS, Cai Z, Pounds SB, et al. IDH1 and IDH2 mutations in pediatric acute leukemia. *Leukemia*. 2011 Oct;25(10):1570–7.

109. Pigazzi M, Ferrari G, Masetti R, Falini B, Martinolli F, Basso G, et al. Low prevalence of IDH1 gene mutation in childhood AML in Italy. *Leukemia*. 2011 Jan;25(1):173–4.
110. Sekeres MA, Elson P, Kalaycio ME, Advani AS, Copelan EA, Faderl S, et al. Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Blood*. 2009 Jan 1;113(1):28–36.
111. Lacombe F, Arnoulet C, Maynadié M, Lippert E, Luquet I, Pigneux A, et al. Early clearance of peripheral blasts measured by flow cytometry during the first week of AML induction therapy as a new independent prognostic factor: a GOELAMS study. *Leukemia*. 2009 Feb;23(2):350–7.
112. Elliott MA, Litzow MR, Letendre LL, Wolf RC, Hanson CA, Tefferi A, et al. Early peripheral blood blast clearance during induction chemotherapy for acute myeloid leukemia predicts superior relapse-free survival. *Blood*. 2007 Dec 15;110(13):4172–4.
113. Breems DA, Van Putten WLJ, Huijgens PC, Ossenkoppele GJ, Verhoef GEG, Verdonck LF, et al. Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005 Mar 20;23(9):1969–78.
114. Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016 Jan 7;127(1):53–61.
115. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, Litzow MR, Luger SM, Paietta EM, et al. Anthracycline Dose Intensification in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2009 Sep 24;361(13):1249–59.
116. Lusk MR, Lee J-W, Fernandez HF, Lazarus HM, Rowe JM, Tallman MS, et al. High Dose Daunorubicin Improves Survival in AML up to Age 60, Across All Cytogenetic Risk Groups Including Patients with Unfavorable Cytogenetic Risk, and FLT3-ITD Mutant AML: Updated Analyses from Eastern Cooperative Oncology Trial E1900. *Blood*. 2014 Dec 5;124(21):373–373.
117. Löwenberg B, Ossenkoppele GJ, van Putten W, Schouten HC, Graux C, Ferrant A, et al. High-Dose Daunorubicin in Older Patients with Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2009 Sep 24;361(13):1235–48.
118. Lee J-H, Joo Y-D, Kim H, Bae SH, Kim MK, Zang DY, et al. A randomized trial comparing standard versus high-dose daunorubicin induction in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011 Oct 6;118(14):3832–41.
119. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Kell J, Cavenagh J, Kjeldsen L, et al. A randomized comparison of daunorubicin 90 mg/m<sup>2</sup> vs 60 mg/m<sup>2</sup> in AML induction: results from the UK NCRI AML17 trial in 1206 patients. *Blood*. 2015 Jun 18;125(25):3878–85.
120. Pautas C, Merabet F, Thomas X, Raffoux E, Gardin C, Corm S, et al. Randomized Study of Intensified Anthracycline Doses for Induction and Recombinant Interleukin-2 for Maintenance in Patients With Acute Myeloid Leukemia Age 50 to 70 Years: Results of the ALFA-9801 Study. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 10;28(5):808–14.
121. Ohtake S, Miyawaki S, Fujita H, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, et al. Randomized study of induction therapy comparing standard-dose idarubicin with high-dose daunorubicin in adult patients with previously untreated acute myeloid leukemia: the JALSG AML201 Study. *Blood*. 2011 Feb 24;117(8):2358–65.
122. Weick JK, Kopecky KJ, Appelbaum FR, Head DR, Kingsbury LL, Balcerzak SP, et al. A randomized investigation of high-dose versus standard-dose cytosine arabinoside with daunorubicin in patients with previously untreated acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood*. 1996 Oct 15;88(8):2841–51.
123. Bishop JF, Matthews JP, Young GA, Szer J, Gillett A, Joshua D, et al. A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1996 Mar 1;87(5):1710–7.
124. Löwenberg B, Pabst T, Vellenga E, van Putten W, Schouten HC, Graux C, et al. Cytarabine Dose for Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2011 Mar 17;364(11):1027–36.
125. Willemze R, Suci S, Meloni G, Labar B, Marie J-P, Halkes CJM, et al. High-Dose Cytarabine in Induction Treatment Improves the Outcome of Adult Patients Younger Than Age 46 Years With Acute Myeloid Leukemia: Results of the EORTC-GIMEMA AML-12 Trial. *J Clin Oncol*. 2014 Jan 20;32(3):219–28.



126. Petersdorf SH, Kopecky KJ, Slovak M, Willman C, Nevill T, Brandwein J, et al. A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013 Jun 13;121(24):4854–60.
127. Burnett AK, Hills RK, Milligan D, Kjeldsen L, Kell J, Russell NH, et al. Identification of Patients With Acute Myeloblastic Leukemia Who Benefit From the Addition of Gemtuzumab Ozogamicin: Results of the MRC AML15 Trial. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 1;29(4):369–77.
128. Castaigne S, Pautas C, Terré C, Raffoux E, Bordessoule D, Bastie J-N, et al. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Lond Engl*. 2012 Apr 21;379(9825):1508–16.
129. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Kell J, Freeman S, Kjeldsen L, et al. Addition of Gemtuzumab Ozogamicin to Induction Chemotherapy Improves Survival in Older Patients With Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2012 Nov 10;30(32):3924–31.
130. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, Delaunay J, Petersdorf S, Othus M, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet Oncol*. 2014 Aug;15(9):986–96.
131. Löwenberg B, Beck J, Graux C, et al. Gemtuzumab ozogamicin as post-remission treatment in AML at 60 years of age or more: results of a multicenter phase 3 study. *Blood* 2010;115(13):2586-2591.
132. Holowiecki J, Grosicki S, Giebel S, Robak T, Kyrzcz-Krzemien S, Kuliczowski K, et al. Cladribine, But Not Fludarabine, Added to Daunorubicin and Cytarabine During Induction Prolongs Survival of Patients With Acute Myeloid Leukemia: A Multicenter, Randomized Phase III Study. *J Clin Oncol*. 2012 Jul 10;30(20):2441–8.
133. Faderl S, Verstovsek S, Cortes J, Ravandi F, Beran M, Garcia-Manero G, et al. Clofarabine and cytarabine combination as induction therapy for acute myeloid leukemia (AML) in patients 50 years of age or older. *Blood*. 2006 Jul 1;108(1):45–51.
134. Kantarjian HM, Erba HP, Claxton D, Arellano M, Lyons RM, Kovascovics T, et al. Phase II Study of Clofarabine Monotherapy in Previously Untreated Older Adults With Acute Myeloid Leukemia and Unfavorable Prognostic Factors. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 1;28(4):549–55.
135. Willemze R, Suci S, Muus P, Halkes CJM, Meloni G, Meert L, et al. Clofarabine in combination with a standard remission induction regimen (cytosine arabinoside and idarubicin) in patients with previously untreated intermediate and bad-risk acute myelogenous leukemia (AML) or high-risk myelodysplastic syndrome (HR-MDS): phase I results of an ongoing phase I/II study of the leukemia groups of EORTC and GIMEMA (EORTC GIMEMA 06061/AML-14A trial). *Ann Hematol* [Internet]. 2014 Mar 29 [cited 2016 Apr 13]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00277-014-2056-6>
136. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Hunter AE, Kjeldsen L, Yin J, et al. Optimization of Chemotherapy for Younger Patients With Acute Myeloid Leukemia: Results of the Medical Research Council AML15 Trial. *J Clin Oncol*. 2013 Sep 20;31(27):3360–8.
137. Serve H, Krug U, Wagner R, Sauerland MC, Heinecke A, Brunnberg U, et al. Sorafenib in Combination With Intensive Chemotherapy in Elderly Patients With Acute Myeloid Leukemia: Results From a Randomized, Placebo-Controlled Trial. *J Clin Oncol*. 2013 Sep 1;31(25):3110–8.
138. Cornelissen JJ, van Putten WLJ, Verdonck LF, Theobald M, Jacky E, Daenen SMG, et al. Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? *Blood*. 2007 May 1;109(9):3658–66.
139. Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, Honda S, Sierra J, Djulbegovic BJ, et al. Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia in First Complete Remission: Systematic Review and Meta-analysis of Prospective Clinical Trials. *JAMA*. 2009 Jun 10;301(22):2349.
140. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2008 May;358(18):1909–18.

141. Russell NH, Kjeldsen L, Craddock C, Pagliuca A, Yin JA, Clark RE, et al. A comparative assessment of the curative potential of reduced intensity allografts in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2015 Jul;29(7):1478–84.
142. Cornelissen JJ, Versluis J, Passweg JR, van Putten WLJ, Manz MG, Maertens J, et al. Comparative therapeutic value of post-remission approaches in patients with acute myeloid leukemia aged 40–60 years. *Leukemia*. 2015 May;29(5):1041–50.
143. Passweg JR, Labopin M, Cornelissen J, Volin L, Socié G, Huynh A, et al. Conditioning intensity in middle-aged patients with AML in first CR: no advantage for myeloablative regimens irrespective of the risk group—an observational analysis by the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Aug;50(8):1063–8.
144. Boissel N, Renneville A, Leguay T, Lefebvre PC, Recher C, Lecerf T, et al. Dasatinib in high-risk core binding factor acute myeloid leukemia in first complete remission: a French Acute Myeloid Leukemia Intergroup trial. *Haematologica*. 2015 Jun 1;100(6):780–5.
145. Paschka P, Schlenk RF, Weber D, et al. Dasatinib (DAS) in combination with chemotherapy and as maintenance in core-binding factor (CBF) acute myeloid leukemia (AML): a phase Ib/IIa study of the German-Austrian AML Study Group (AMLSG) [abstract]. *Haematologica* 2015;100(s1). Abstract 515.
146. Marcucci G, Geyer S, Zhao W, et al. Adding KIT inhibitor dasatinib (DAS) to chemotherapy overcomes the negative impact of KIT mutation/over-expression in core binding factor (CBF) acute myeloid leukemia (AML): results from CALGB 10801 (Alliance) [abstract]. *Blood* 2014;124(21). Abstract 8.
147. Levis M, Ravandi F, Wang ES, Baer MR, Perl A, Coutre S, et al. Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for patients with FLT3 mutant AML in first relapse. *Blood*. 2011 Mar 24;117(12):3294–301.
148. Knapper S, Hills RK, Cavenagh JD, et al. A randomised comparison of the sequential addition of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) to standard first line chemotherapy for FLT3-mutated acute myeloid leukemia: The UK experience [abstract]. *Blood* 2014;124(21). Abstract 3736.
149. Daver N, Cortes J, Ravandi F, Patel KP, Burger JA, Konopleva M, et al. Secondary mutations as mediators of resistance to targeted therapy in leukemia. *Blood*. 2015 May 21;125(21):3236–45.
150. Burnett AK, Hills RK, Green C, Jenkinson S, Koo K, Patel Y, et al. The impact on outcome of the addition of all-trans retinoic acid to intensive chemotherapy in younger patients with nonacute promyelocytic acute myeloid leukemia: overall results and results in genotypic subgroups defined by mutations in NPM1, FLT3, and CEBPA. *Blood*. 2010 Feb 4;115(5):948–56.
151. Schlenk RF, Dohner K, Kneba M, Gotze K, Hartmann F, del Valle F, et al. Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from the AMLSG Trial AML HD98B. *Haematologica*. 2009 Jan 1;94(1):54–60.
152. El Hajj H, Dassouki Z, Berthier C, Raffoux E, Ades L, Legrand O, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide trigger degradation of mutated NPM1, resulting in apoptosis of AML cells. *Blood*. 2015 May 28;125(22):3447–54.
153. Martelli MP, Gionfriddo I, Mezzasoma F, Milano F, Pierangeli S, Mulas F, et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid target NPM1 mutant oncoprotein levels and induce apoptosis in NPM1-mutated AML cells. *Blood*. 2015 May 28;125(22):3455–65.
154. Wang F, Travins J, DeLaBarre B, Penard-Lacronique V, Schalm S, Hansen E, et al. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science*. 2013 May 3;340(6132):622–6.
155. Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, Turcan S, Grommes C, Campos C, et al. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science*. 2013 May 3;340(6132):626–30.
156. Kernytsky A, Wang F, Hansen E, Schalm S, Straley K, Gliser C, et al. IDH2 mutation-induced histone and DNA hypermethylation is progressively reversed by small-molecule inhibition. *Blood*. 2015 Jan 8;125(2):296–303.

157. DiNardo C, Stein EM, Altman JK et al. AG-221, an oral, selective, first-in-class, potent inhibitor of the IDH2 mutant enzyme, induced durable responses in a phase 1 study of IDH2 mutation-positive advanced hematologic malignancies. In European Hematology Association Learning Center 13 June 2015; 100710: Abstract P569.90.
158. DiNardo C, de Botton S, Pollyea DA, et al. Molecular profiling and relationship with clinical response in patients with IDH1 mutation-positive hematologic malignancies receiving AG-120, a first-in-class potent inhibitor of mutant IDH1, in addition to data from the completed dose escalation portion of the phase 1 study. *Blood*. 126 (2015), p. A1306.
159. Kc B, DiNardo CD. Evidence for Clinical Differentiation and Differentiation Syndrome in Patients With Acute Myeloid Leukemia and IDH1 Mutations Treated With the Targeted Mutant IDH1 Inhibitor, AG-120. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2016 May 5;
160. Emadi A, Faramand R, Carter-Cooper B, Tolu S, Ford LA, Lapidus RG, et al. Presence of isocitrate dehydrogenase mutations may predict clinical response to hypomethylating agents in patients with acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2015 May;90(5):E77–9.
161. Metzeler KH, Walker A, Geyer S, Garzon R, Klisovic RB, Bloomfield CD, et al. DNMT3A mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012 May;26(5):1106–7.
162. DiNardo CD, Patel KP, Garcia-Manero G, Luthra R, Pierce S, Borthakur G, et al. Lack of association of IDH1, IDH2 and DNMT3A mutations with outcome in older patients with acute myeloid leukemia treated with hypomethylating agents. *Leuk Lymphoma*. 2014 Aug;55(8):1925–9.
163. Schumacher T, Bunse L, Pusch S, Sahm F, Wiestler B, Quandt J, et al. A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature*. 2014 Aug 21;512(7514):324–7.
164. Pellegatta S, Valletta L, Corbetta C, Patanè M, Zucca I, Riccardi Sirtori F, et al. Effective immunotargeting of the IDH1 mutation R132H in a murine model of intracranial glioma. *Acta Neuropathol Commun*. 2015;3:4.
165. Dang L, Yen K, Attar EC. IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. *Ann Oncol*. 2016 Apr;27(4):599–608.
166. Jaglal MV, Duong VH, Bello CM, Al Ali NH, Padron E, Fernandez HF, et al. Cladribine, cytarabine, filgrastim, and mitoxantrone (CLAG-M) compared to standard induction in acute myeloid leukemia from myelodysplastic syndrome after azanucleoside failure. *Leuk Res*. 2014 Apr;38(4):443–6.
167. Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrozek K, Margeson D, et al. Favorable Prognostic Impact of NPM1 Mutations in Older Patients With Cytogenetically Normal De Novo Acute Myeloid Leukemia and Associated Gene- and MicroRNA-Expression Signatures: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 1;28(4):596–604.
168. Gardin C, Chevret S, Pautas C, Turlure P, Raffoux E, Thomas X, et al. Superior Long-Term Outcome With Idarubicin Compared With High-Dose Daunorubicin in Patients With Acute Myeloid Leukemia Age 50 Years and Older. *J Clin Oncol*. 2013 Jan 20;31(3):321–7.
169. Burnett AK, Milligan D, Prentice AG, Goldstone AH, McMullin MF, Hills RK, et al. A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment. *Cancer*. 2007 Mar 15;109(6):1114–24.
170. Kantarjian HM, Thomas XG, Dmoszynska A, Wierzbowska A, Mazur G, Mayer J, et al. Multicenter, Randomized, Open-Label, Phase III Trial of Decitabine Versus Patient Choice, With Physician Advice, of Either Supportive Care or Low-Dose Cytarabine for the Treatment of Older Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2012 Jul 20;30(21):2670–7.
171. Dombret H, Seymour JF, Butrym A, Wierzbowska A, Selleslag D, Jang JH, et al. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with  $\geq 30\%$  blasts. *Blood*. 2015 Jul 16;126(3):291–9.

172. Dohner H, Lubbert M, Fiedler W, Fouillard L, Haaland A, Brandwein JM, et al. Randomized, phase 2 trial of low-dose cytarabine with or without volasertib in AML patients not suitable for induction therapy. *Blood*. 2014 Aug 28;124(9):1426–33.
173. Naval D, Kantarjian HM, Garcia-Manero G, et al. Phase I/II study of vosaroxin and decitabine in newly diagnosed older patients (pts) with acute myeloid leukemia (AML) and high risk myelodysplastic syndrome (MDS) [abstract]. *Blood* 2014;124(21). Abstract 385.
174. Burnett AK, Goldstone A, Hills RK, Milligan D, Prentice A, Yin J, et al. Curability of Patients With Acute Myeloid Leukemia Who Did Not Undergo Transplantation in First Remission. *J Clin Oncol*. 2013 Apr 1;31(10):1293–301.
175. Freireich EJ, Gehan EA, Sulman D, Boggs DR, Frei E. The effect of chemotherapy on acute leukemia in the human. *J Chronic Dis*. 1961 Dec;14:593–608.
176. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood*. 1995 Mar 15;85(6):1416–34.
177. Schnittger S, Weisser M, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. New score predicting for prognosis in PML-RARA+, AML1-ETO+, or CBFMYH11+ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood*. 2003 Oct 15;102(8):2746–55.
178. Stentoft J, Hokland P, Ostergaard M, Hasle H, Nyvold CG. Minimal residual core binding factor AMLs by real time quantitative PCR--initial response to chemotherapy predicts event free survival and close monitoring of peripheral blood unravels the kinetics of relapse. *Leuk Res*. 2006 Apr;30(4):389–95.
179. Ommen HB, Nyvold CG, Braendstrup K, Andersen BL, Ommen IB, Hasle H, et al. Relapse prediction in acute myeloid leukaemia patients in complete remission using WT1 as a molecular marker: development of a mathematical model to predict time from molecular to clinical relapse and define optimal sampling intervals. *Br J Haematol*. 2008 Jun;141(6):782–91.
180. Cilloni D, Messa F, Arruga F, Defilippi I, Gottardi E, Fava M, et al. Early prediction of treatment outcome in acute myeloid leukemia by measurement of WT1 transcript levels in peripheral blood samples collected after chemotherapy. *Haematologica*. 2008 Jun;93(6):921–4.
181. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Nov 1;27(31):5195–201.
182. Freeman SD, Virgo P, Couzens S, Grimwade D, Russell N, Hills RK, et al. Prognostic relevance of treatment response measured by flow cytometric residual disease detection in older patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Nov 10;31(32):4123–31.
183. Terwijn M, van Putten WLJ, Kelder A, van der Velden VHJ, Brooimans RA, Pabst T, et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Nov 1;31(31):3889–97.
184. Krönke J, Schlenk RF, Jensen K-O, Tschürtz F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Jul 1;29(19):2709–16.
185. Ommen HB, Schnittger S, Jovanovic JV, Ommen IB, Hasle H, Østergaard M, et al. Strikingly different molecular relapse kinetics in NPM1c, PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, and CFB-MYH11 acute myeloid leukemias. *Blood*. 2010 Jan 14;115(2):198–205.
186. Yin JAL, O'Brien MA, Hills RK, Daly SB, Wheatley K, Burnett AK. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. *Blood*. 2012 Oct 4;120(14):2826–35.

187. Ommen HB, Hokland P, Haferlach T, Abildgaard L, Alpermann T, Haferlach C, et al. Relapse kinetics in acute myeloid leukaemias with MLL translocations or partial tandem duplications within the MLL gene. *Br J Haematol*. 2014 Jun;165(5):618–28.
188. Abildgaard L, Ommen HB, Lausen B, Hasle H, Nyvold CG. A novel RT-qPCR assay for quantification of the MLL-MLL3 fusion transcript in acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol*. 2013 Nov;91(5):394–8.
189. Ommen HB, Touzart A, MacIntyre E, Kern W, Haferlach T, Haferlach C, et al. The kinetics of relapse in DEK-NUP214-positive acute myeloid leukemia patients. *Eur J Haematol*. 2015 Nov;95(5):436–41.
190. Weisser M, Kern W, Rauhut S, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, et al. Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2005 Aug;19(8):1416–23.
191. Jacobsohn DA, Tse WT, Chaleff S, Rademaker A, Duerst R, Olszewski M, et al. High WT1 gene expression before haematopoietic stem cell transplant in children with acute myeloid leukaemia predicts poor event-free survival. *Br J Haematol*. 2009 Sep;146(6):669–74.
192. Walter RB, Gooley TA, Wood BL, Milano F, Fang M, Sorror ML, 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. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Mar 20;29(9):1190–7.
193. Rossi G, Carella AM, Minervini MM, di Nardo F, Waure C de, Greco MM, et al. Optimal time-points for minimal residual disease monitoring change on the basis of the method used in patients with acute myeloid leukemia who underwent allogeneic stem cell transplantation: a comparison between multiparameter flow cytometry and Wilms' tumor 1 expression. *Leuk Res*. 2015 Feb;39(2):138–43.
194. Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of "real-time" quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2318–57.
195. Østergaard M, Stentoft J, Hokland P. A real-time quantitative RT-PCR assay for monitoring DEK-CAN fusion transcripts arising from translocation t(6;9) in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2004 Nov;28(11):1213–5.
196. Tobal K, Frost L, Liu Yin JA. Quantification of DEK-CAN fusion transcript by real-time reverse transcription polymerase reaction in patients with t(6;9) acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2004 Oct;89(10):1267–9.
197. Willekens C, Blanchet O, Renneville A, Cornillet-Lefebvre P, Pautas C, Guieze R, et al. 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*. 2016 Mar 1;101(3):328–35.
198. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? *Blood*. 2014 Nov 27;124(23):3345–55.
199. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, Dell'Oro MG, Gottardi E, Specchia G, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia*. 2006 Jun;20(6):1103–8.
200. Buccisano F, Maurillo L, Del Principe MI, Del Poeta G, Sconocchia G, Lo-Coco F, et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012 Jan 12;119(2):332–41.
201. DiNardo CD, Luger SM. Beyond morphology: minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2012 Mar;19(2):82–8.
202. Kern W, Bacher U, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010 Sep;23(3):379–90.

203. Larsen HØ, Roug AS, Just T, Brown GD, Hokland P. Expression of the hMICL in acute myeloid leukemia- a highly reliable disease marker at diagnosis and during follow-up. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012 Jan;82(1):3–8.
204. Van Rhenen A, Moshaver B, Kelder A, Feller N, Nieuwint AWM, Zweegman S, et al. Aberrant marker expression patterns on the CD34+CD38- stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission. *Leukemia.* 2007 Aug;21(8):1700–7.
205. Roug AS, Larsen HØ, Nederby L, Just T, Brown G, Nyvold CG, et al. hMICL and CD123 in combination with a CD45/CD34/CD117 backbone - a universal marker combination for the detection of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2014 Jan;164(2):212–22.
206. Nyvold CG, Stentoft J, Braendstrup K, Melsvik D, Moestrup SK, Juhl-Christensen C, et al. Wilms' tumor 1 mutation accumulated during therapy in acute myeloid leukemia: Biological and clinical implications. *Leukemia.* 2006 Nov;20(11):2051–4.
207. Bachas C, Schuurhuis GJ, Hollink IHIM, Kwidama ZJ, Goemans BF, Zwaan CM, et al. High-frequency type I/II mutational shifts between diagnosis and relapse are associated with outcome in pediatric AML: implications for personalized medicine. *Blood.* 2010 Oct 14;116(15):2752–8.
208. Bibault J-E, Figeac M, Hélevaut N, Rodriguez C, Quief S, Sebda S, et al. Next-generation sequencing of FLT3 internal tandem duplications for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2015 Sep 8;6(26):22812–21.
209. Chou W-C, Hou H-A, Liu C-Y, Chen C-Y, Lin L-I, Huang Y-N, et al. Sensitive measurement of quantity dynamics of FLT3 internal tandem duplication at early time points provides prognostic information. *Ann Oncol.* 2011 Mar 1;22(3):696–704.
210. Abdelhamid E, Preudhomme C, Helevaut N, Nibourel O, Gardin C, Rousselot P, et al. Minimal residual disease monitoring based on FLT3 internal tandem duplication in adult acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2012 Mar;36(3):316–23.
211. Feller N, van der Pol MA, van Stijn A, Weijers GWD, Westra AH, Evertse BW, et al. MRD parameters using immunophenotypic detection methods are highly reliable in predicting survival in acute myeloid leukaemia. *Leukemia.* 2004 Aug;18(8):1380–90.
212. Voskova D, Schoch C, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. Stability of leukemia-associated aberrant immunophenotypes in patients with acute myeloid leukemia between diagnosis and relapse: comparison with cytomorphologic, cytogenetic, and molecular genetic findings. *Cytometry B Clin Cytom.* 2004 Nov;62(1):25–38.
213. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 2014 Dec 25;371(26):2488–98.
214. Genovese G, Köhler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014 Dec 25;371(26):2477–87.
215. Pløen GG, Nederby L, Guldborg P, Hansen M, Ebbesen LH, Jensen UB, et al. Persistence of DNMT3A mutations at long-term remission in adult patients with AML. *Br J Haematol.* 2014 Nov;167(4):478–86.
216. Debarri H, Lebon D, Roumier C, Cheok M, Marceau-Renaut A, Nibourel O, et al. IDH1/2 but not DNMT3A mutations are suitable targets for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients: a study by the Acute Leukemia French Association. *Oncotarget.* 2015 Dec 8;6(39):42345–53.
217. Ommen HB. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia: a review of the current evolving strategies. *Ther Adv Hematol.* 2016 Feb 1;7(1):3–16.
218. Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, Ribeiro RC, Bowman WP, Taub J, et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncol.* 2010 Jun;11(6):543–52.

219. Zhu H-H, Zhang X-H, Qin Y-Z, Liu D-H, Jiang H, Chen H, et al. MRD-directed risk stratification treatment may improve outcomes of t(8;21) AML in the first complete remission: results from the AML05 multicenter trial. *Blood*. 2013 May 16;121(20):4056–62.
220. Pozzi S, Geroldi S, Tedone E, Luchetti S, Grasso R, Colombo N, et al. Leukaemia relapse after allogeneic transplants for acute myeloid leukaemia: predictive role of WT1 expression. *Br J Haematol*. 2013 Feb;160(4):503–9.
221. Sockel K, Wermke M, Radke J, Kiani A, Schaich M, Bornhäuser M, et al. Minimal residual disease-directed preemptive treatment with azacitidine in patients with NPM1-mutant acute myeloid leukemia and molecular relapse. *Haematologica*. 2011 Oct;96(10):1568–70.
222. Platzbecker U, Wermke M, Radke J, Oelschlaegel U, Seltmann F, Kiani A, et al. Azacitidine for treatment of imminent relapse in MDS or AML patients after allogeneic HSCT: results of the RELAZA trial. *Leukemia*. 2012 Mar;26(3):381–9.
223. Chou W-C, Peng K-Y, Lei W-C, Ko B-S, Tsay W, Kuo C-H, et al. Persistence of mutant isocitrate dehydrogenase in patients with acute myeloid leukemia in remission. *Leukemia*. 2012 Mar;26(3):527–9.
224. Jeziskova I, Razga F, Toskova M, Dvorakova D, Timilsina S, Mayer J, et al. Quantitative detection of IDH2 mutation for minimal residual disease monitoring in patients with acute myeloid leukemia and its comparison with mutations in NPM1 gene. *Leuk Lymphoma*. 2013 Apr;54(4):867–70.
225. Janin M, Mylonas E, Saada V, Micol J-B, Renneville A, Quivoron C, et al. Serum 2-hydroxyglutarate production in IDH1- and IDH2-mutated de novo acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2014 Feb 1;32(4):297–305.
226. Thomas X, de Botton S, Chevret S, et al. Clofarabine-based consolidation improves relapse-free survival of younger adults with non-favorable acute myeloid leukemia (AML) in first remission: results of the randomized ALFA-0702/CLARA study [abstract]. *Blood*. 2015;126(23). Abstract 218.
227. Tholen DW. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation: approved guideline. Wayne, Pa.: NCCLS; 2004.
228. Heinonen K, Mrózek K, Lawrence D, Arthur DC, Pettenati MJ, Stamberg J, et al. Clinical characteristics of patients with de novo acute myeloid leukaemia and isolated trisomy 11: a Cancer and Leukemia Group B study. *Br J Haematol*. 1998 Jun;101(3):513–20.
229. Chotirat S, Thongnoppakhun W, Promsuwicha O, Boonthimat C, Auewarakul CU. Molecular alterations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (IDH1 and IDH2) metabolic genes and additional genetic mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 2012;5(1):5.
230. Whitman SP. The MLL partial tandem duplication: evidence for recessive gain-of-function in acute myeloid leukemia identifies a novel patient subgroup for molecular-targeted therapy. *Blood*. 2005 Mar 15;106(1):345–52.





**MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**DE**  
**(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)**

Nom : Ferret

Prénom : Yann

Titre du mémoire / thèse :

IMPACT PRONOSTIQUE DE LA MALADIE RESIDUELLE PAR QUANTIFICATION DES MUTATIONS D'*IDH1/2* PAR PCR DIGITALE DANS LES LEUCEMIES AIGUES MYELOÏDES INCLUSES DANS LES PROTOCOLES ALFA 0701 ET 0702

Mots –clés : MALADIE RESIDUELLE, LEUCEMIE AIGUE MYELOÏDE, PCR DIGITALE, ISOCITRATE DESHYDOGENASE

---

**Résumé :** Nous avons évalué les mutations d'*IDH1/2* en tant que marqueurs de MRD dans les LAM des protocoles ALFA-0701 et -0702. Nous avons quantifié l'abondance fractionnelle (AF) des mutations sur ADN génomique par PCR digitale. L'impact de la MRD de fin d'induction sur les DFS et OS a été évalué en analyse multivariée selon un modèle de Cox. Les variables étaient l'âge, la leucocytose au diagnostic, la cytogénétique, les mutations d'*NPM1*, *FLT3-ITD* et *DNMT3A*. Une analyse temps-dépendante selon un modèle de Mantel Byar a évalué le bénéfice de l'allogreffe en fonction de la réponse moléculaire. 97 prélèvements au diagnostic et 211 prélèvements de suivi de 103 patients ont été analysés. Aucun impact pronostique n'a été retrouvé pour la MRD *IDH2* R172K. En revanche la MRD *IDH1-IDH2* R140Q est la seule variable ayant un impact significatif sur la DFS en analyse multivariée ( $p=0,003$ ), avec des seuils décisionnels en AF à 0,1% et 0,5% respectivement pour *IDH1* et *IDH2* R140Q. L'analyse temps-dépendante montre une tendance à la limite de la significativité ( $p=0,056$ ) pour une meilleure DFS en absence d'allogreffe dans le groupe de bonne réponse moléculaire. De façon notable la MRD *IDH1/2* restait fortement positive (AF>10%) à long terme chez 7 patients en RC (4 R140Q, 2 R132C et 1 R132H), en discordance avec les autres marqueurs de MRD disponibles. Ce type de profil déjà décrit pourrait correspondre à des cas d'hématopoïèse clonale avec mutation d'*IDH1/2*, pré-leucémique et de pronostic incertain. Nos résultats suggèrent que les mutations d'*IDH1* et *IDH2* R140Q, pourraient être des marqueurs de MRD pertinents dans les LAM, en complément de la MRD *NPM1*, pour aider à la stratification pronostique des patients actuellement classés dans les groupes intermédiaires. Ces données devront être validées sur une cohorte indépendante.

---

**Membres du jury :**

**Président :** Professeur Gilles Duverlie, CHU Amiens

**Assesseur(s) :** Professeur Claude Preudhomme, CHRU Lille

Professeur Jean-Pierre Marolleau, CHU Amiens

Docteur Aline Renneville, CHRU Lille