



HAL
open science

Sélection clonale sous Azacitidine chez les patients atteints d'un syndrome myélodysplasique ou d'une leucémie aiguë myéloïde secondaire à un traitement

Anne Calleja

► **To cite this version:**

Anne Calleja. Sélection clonale sous Azacitidine chez les patients atteints d'un syndrome myélodysplasique ou d'une leucémie aiguë myéloïde secondaire à un traitement. Médecine humaine et pathologie. 2020. dumas-02968256

HAL Id: dumas-02968256

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02968256>

Submitted on 15 Oct 2020

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 Nice Sophia-Antipolis
Faculté de Médecine de Nice
Année 2020



Thèse d'exercice en Médecine
Pour l'obtention du Diplôme d'état de
Docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement à La Faculté de Médecine de Nice
le Vendredi 3 juillet 2020
par

Anne CALLEJA

Née le 22 septembre 1990 à Saint Priest en Jarez (42)

Sélection clonale sous Azacitidine chez les patients atteints d'un syndrome myélodysplasique ou d'une leucémie aigue myéloïde secondaire à un traitement

Devant le jury composé de :

Madame le Professeur Sophie Raynaud	Présidente du jury
Monsieur le Docteur Patrick Auberger	Assesseur
Monsieur le Professeur Thomas Cluzeau	Directeur de thèse
Monsieur le Docteur Michael Loschi	Assesseur
Monsieur le Professeur Pierre Simon Rohrllich	Assesseur



Université de Nice Sophia-Antipolis
Faculté de Médecine de Nice
Année 2020



Thèse d'exercice en Médecine
Pour l'obtention du Diplôme d'état de
Docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement à La Faculté de Médecine de Nice
le Vendredi 3 juillet 2020
par

Anne CALLEJA

Née le 22 septembre 1990 à Saint Priest en Jarez (42)

Sélection clonale sous Azacitidine chez les patients atteints d'un syndrome myélodysplasique ou d'une leucémie aigue myéloïde secondaire à un traitement

Devant le jury composé de :

Madame le Professeur Sophie Raynaud	Présidente du jury
Monsieur le Docteur Patrick Auberger	Assesseur
Monsieur le Professeur Thomas Cluzeau	Directeur de thèse
Monsieur le Docteur Michael Loschi	Assesseur
Monsieur le Professeur Pierre Simon Rohrllich	Assesseur

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice

Doyen

Pr. BAQUÉ Patrick

Vice-doyens

Pédagogie

Pr. ALUNNI Véronique

Recherche

Pr. DELLAMONICA Jean

Etudiants

M. JOUAN Robin

Chargé de mission projet Campus

Pr. PAQUIS Philippe

Conservateur de la bibliothèque

Mme AMSELLE Danièle

Directrice administrative des services

Mme CALLEA Isabelle

Doyens Honoraires

M. RAMPAL Patrick

M. BENCHIMOL Daniel

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice
PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M.	BAQUÉ Patrick	Anatomie - Chirurgie Générale (42.01)
M.	BERNARDIN Gilles	Réanimation Médicale (48.02)
Mme	BLANC-PEDEUTOUR Florence	Cancérologie – Génétique (47.02)
M.	BOILEAU Pascal	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M.	DARCOURT Jacques	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
M.	DRICI Milou-Daniel	Pharmacologie Clinique (48.03)
M.	ESNAULT Vincent	Néphrologie (52-03)
M.	FUZIBET Jean-Gabriel	Médecine Interne (53.01)
M.	GILSON Éric	Biologie Cellulaire (44.03)
M.	GUGENHEIM Jean	Chirurgie Digestive (52.02)
M.	HASSEN KHODJA Reda	Chirurgie Vasculaire (51.04)
M.	HÉBUTERNE Xavier	Nutrition (44.04)
M.	HOFMAN Paul	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
Mme	ICHAÏ Carole	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	LACOUR Jean-Philippe	Dermato-Vénéréologie (50.03)
M.	LEFTHERIOTIS Georges	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (51.04)
M.	MARQUETTE Charles-Hugo	Pneumologie (51.01)
M.	MARTY Pierre	Parasitologie et Mycologie (45.02)
M.	MICHELIS Jean-François	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
M.	MOUROUX Jérôme	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)
Mme	PAQUIS Véronique	Génétique (47.04)
M.	PAQUIS Philippe	Neurochirurgie (49.02)
M.	PRADIER Christian	Épidémiologie, Économie de la Santé et Prévention (46.01)
M.	QUATREHOMME Gérald	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M.	RAUCOULES-AIMÉ Marc	Anesthésie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	ROBERT Philippe	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M.	SCHNEIDER Stéphane	Nutrition (44.04)
M.	THYSS Antoine	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M.	TRAN Albert	Hépatogastro-entérologie (52.01)

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice
PROFESSEURS PREMIERE CLASSE

Mme	ASKENAZY-GITTARD Florence	Pédopsychiatrie (49.04)
M.	BARRANGER Emmanuel	Gynécologie Obstétrique (54.03)
M.	BÉRARD Étienne	Pédiatrie (54.01)
M.	BONGAIN André	Gynécologie-Obstétrique (54.03)
Mme	BREUIL Véronique	Rhumatologie (50.01)
M.	CASTILLO Laurent	O.R.L. (55.01)
M.	CHEVALLIER Patrick	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
M.	DE PERETTI Fernand	Anatomie-Chirurgie Orthopédique (42.01)
M.	FERRARI Émile	Cardiologie (51.02)
M.	FERRERO Jean-Marc	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	FONTAINE Denys	Neurochirurgie (49.02)
M.	GIBELIN Pierre	Cardiologie (51.02)
M.	HANNOUN-LEVI Jean-Michel	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	LEVRAUT Jacques	Médecine d'urgence (48.05)
M.	LONJON Michel	Neurochirurgie (49.02)
M.	MOUNIER Nicolas	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M.	PADOVANI Bernard	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
M.	PASSERON Thierry	Dermato-Vénéréologie (50-03)
M.	PICHE Thierry	Gastro-entérologie (52.01)
Mme	RAYNAUD Dominique	Hématologie (47.01)
M.	ROSENTHAL Éric	Médecine Interne (53.01)
M.	STACCINI Pascal	Biostatistiques et Informatique Médicale (46.04)
M.	THOMAS Pierre	Neurologie (49.01)
M.	TROJANI Christophe	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice
PROFESSEURS DEUXIEME CLASSE

Mme	ALUNNI Véronique	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M.	ANTY Rodolphe	Gastro-entérologie (52.01)
M.	BAHADORAN Philippe	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	BAILLIF Stéphanie	Ophtalmologie (55.02)
Mme	BANNWARTH Sylvie	Génétique (47.04)
M.	BENIZRI Emmanuel	Chirurgie Générale (53.02)
M.	BENOIT Michel	Psychiatrie (49.03)
M.	BERTHET Jean-Philippe	Chirurgie Thoracique (51-03)
M.	BOZEC Alexandre	ORL- Cancérologie (47.02)
M.	BREAUD Jean	Chirurgie Infantile (54-02)
Mme	BUREL-VANDENBOS Fanny	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M.	CHEVALIER Nicolas	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)
Mme	CHINETTI Giulia	Biochimie-Biologie Moléculaire (44.01)
M.	CLUZEAU Thomas	Hématologie (47.01)
M.	DELLAMONICA Jean	réanimation médicale (48.02)
M.	DELOTTE Jérôme	Gynécologie-obstétrique (54.03)
M	FAVRE Guillaume	Néphrologie (44-02)
M.	FOURNIER Jean-Paul	Thérapeutique (48-04)
Mme	GIORDANENGO Valérie	Bactériologie-Virologie (45.01)
Mme	GIOVANNINI-CHAMI Lisa	Pédiatrie (54.01)
M.	GUÉRIN Olivier	Méd. In ; Gériatrie (53.01)
M.	IANNELLI Antonio	Chirurgie Digestive (52.02)
M.	ILIE Marius	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M	JEAN BAPTISTE Elixène	Chirurgie vasculaire (51.04)
M.	ROHRLICH Pierre	Pédiatrie (54.01)
M.	ROUX Christian	rhumatologie (50.01)
M.	RUIMY Raymond	Bactériologie-virologie (45.01)
Mme	SACCONI Sabrina	Neurologie (49.01)
M.	SADOUL Jean-Louis	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)
M.	VANBIERVLIEET Geoffroy	Gastro-entérologie (52.01)

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice
MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

M.	AMBROSETTI Damien	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	BERNARD-POMIER Ghislaine	Immunologie (47.03)
M.	BRONSARD Nicolas	Anatomie Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (42.01)
M.	CAMUZARD Olivier	Chirurgie Plastique (50-04)
Mme	CONTENTI-LIPRANDI Julie	Médecine d'urgence (48-04)
M.	DOGLIO Alain	Bactériologie-Virologie (45.01)
M	DOYEN Jérôme	Radiothérapie (47.02)
M.	FOSSE Thierry	Bactériologie-Virologie-Hygiène (45.01)
M.	GARRAFFO Rodolphe	Pharmacologie Fondamentale (48.03)
Mme	HINAULT Charlotte	Biochimie et biologie moléculaire (44.01)
M.	HUMBERT Olivier	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme	LAMY Brigitte	Bactériologie-virologie (45.01)
Mme	LONG-MIRA Elodie	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	MAGNIÉ Marie-Noëlle	Physiologie (44.02)
M.	MASSALOU Damien	Chirurgie Viscérale (52-02)
Mme	MOCERI Pamela	Cardiologie (51.02)
M.	MONTAUDIE Henri	Dermatologie (50.03)
Mme	MUSSO-LASSALLE Sandra	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M.	NAÏMI Mourad	Biochimie et Biologie moléculaire (44.01)
Mme	POMARES Christelle	Parasitologie et mycologie (45.02)
M.	SAVOLDELLI Charles	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie (55.03)
Mme	SEITZ-POLSKI barbara	Immunologie (47.03)
M.	SQUARA Fabien	Cardiologie (51.02)
M.	TESTA Jean	Épidémiologie Économie de la Santé et Prévention (46.01)
Mme	THUMMLER Susanne	Pédopsychiatrie (49-04)
M.	TOULON Pierre	Hématologie et Transfusion (47.01)

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice
MAITRE DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS

M. DARMON David Médecine Générale (53.03)
 Mme GROS Auriane Orthophonie (69)

PROFESSEURS AGRÉGÉS

Mme LANDI Rebecca Anglais

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

M. DURAND Matthieu Urologie (52.04)
 M. SICARD Antoine Néphrologie (52-03)

PROFESSEURS ASSOCIÉS

M. GARDON Gilles Médecine Générale (53.03)
 Mme MONNIER Brigitte Médecine Générale (53.03)

MAITRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Mme CASTA Céline Médecine Générale (53.03)
 M. GASPERINI Fabrice Médecine Générale (53.03)
 M. HOGU Nicolas Médecine Générale (53.03)

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice
Constitution du jury en qualité de 4ème membre
Professeurs Honoraires

M. AMIEL Jean	M. GASTAUD Pierre
M ALBERTINI Marc	M. GÉRARD Jean-Pierre
M. BALAS Daniel	M. GILLET Jean-Yves
M. BATT Michel	M. GRELLIER Patrick
M. BLAIVE Bruno	M. GRIMAUD Dominique
M. BOQUET Patrice	M. HOFLIGER Philippe
M. BOURGEON André	M. JOURDAN Jacques
M. BOUTTÉ Patrick	M. LAMBERT Jean-Claude
M. BRUNETON Jean-Noël	M. LAZDUNSKI Michel
Mme BUSSIERE Françoise	M. LEFEBVRE Jean-Claude
M. CAMOUS Jean-Pierre	M. LE FICHOUX Yves
M. CANIVET Bertrand	Mme LEBRETON Elisabeth
M. CASSUTO Jill-patrice	M. MARIANI Roger
M. CHATEL Marcel	M. MASSEYEFF René
M. COUSSEMENT Alain	M. MATTEI Mathieu
Mme CRENESSE Dominique	M. MOUIEL Jean
M. DARCOURT Guy	Mme MYQUEL Martine
M. DELLAMONICA Pierre	M. ORTONNE Jean-Paul
M. DELMONT Jean	M. PRINGUEY Dominique
M. DEMARD François	M. SANTINI Joseph
M. DESNUELLE Claude	M. SAUTRON Jean Baptiste
M. DOLISI Claude	M. SCHNEIDER Maurice
Mme EULLER-ZIEGLER Liana	M. TOUBOL Jacques
M. FENICHEL Patrick	M. TRAN Dinh Khiem
M . FRANCO Alain	M VAN OBBERGHEN Emmanuel
M. FREYCHET Pierre	M. ZIEGLER Gérard

M.C.U. Honoraires

M. ARNOLD Jacques	M. GIUDICELLI Jean
M. BASTERIS Bernard	M. MAGNÉ Jacques
M. BENOLIEL José	Mme MEMRAN Nadine
Mlle CHICHMANIAN Rose-Marie	M. MENGUAL Raymond
Mme DONZEAU Michèle	M. PHILIP Patrick
M. EMILIOZZI Roméo	M. POIRÉE Jean-Claude
M. FRANKEN Philippe	Mme ROURE Marie-Claire
M. GASTAUD Marcel	

Remerciements

A Madame la Professeure Sophie Raynaud, merci pour ta gentillesse, ton investissement et ta transmission de savoir. Merci de m'avoir intéressé à la biologie et de m'avoir fait découvrir le monde de la LLC.

A Monsieur le Professeur Thomas Cluzeau. Merci pour ces années d'enseignement, pour ton soutien, tes conseils professionnels, ta bienveillance et ta patience.

A Monsieur le Professeur Pierre Simon Rohrllich qui m'a accueillie dans son service à mon arrivée. Merci de m'avoir accompagnée dans mes premiers pas en hématologie. Merci également pour les visites, votre bonne humeur et vos anecdotes.

A Monsieur le Docteur Patrick Auberger qui a accepté de faire partie de mon jury. Je te remercie de m'avoir accueillie pour cette année de master 2. J'ai découvert dans ton équipe la passion de la science. Je te remercie pour ton écoute, ton soutien et tes encouragements pour tous les domaines de ma vie.

A Monsieur le Docteur Michael Loschi. Je suis fière d'être (presque) la première interne d'une longue série de jury de thèse dont tu feras partie. Merci pour ta confiance, ton écoute, ton soutien et tes encouragements quotidiens.

Les Montiliens

Merci à mes amis d'enfance, à ceux qui restent malgré la distance et le temps. Merci à Magali et Alham pour ces moments passés comme si l'on s'était quittées la veille. Merci à Justine et Marie d'être toujours présentes. Merci à Fred et sa famille pour m'accueillir à chaque passage éclair à Montélimar.

Les Suzkass

Merci à vous d'être là dans les bon et mauvais moments, merci pour votre soutien et votre amitié inégalée. Merci pour ces week-ends et vacances tous ensemble, et c'est pas fini...

Merci à Vaness pour tous nos voyages, nos aventures et nos confidences, à Morgane pour faire exploser le compteur dyspraxie, à Camille parce qu'on restera les 5%, au Colonel Roméo pour tes exploits en randonnée et à vélo, à Quentin pour ton écoute et tes goûts cinématographiques (*a star is born*), à Jérémy pour ta bonne humeur et ton soutien en toutes circonstances, à Steph pour nos premières heures à l'hôpital passées en endoscopie, à Marion ma voisine de galère et nos renforcements positifs de dernière minute, et à Eline pour ces moments et ces randonnées magiques.

A tous les +1 qui sont nos valeurs ajoutées (Axel, Axelle, Florine, Amaury, Léo, Remi, Loulou et Charles). Bisous à Jojo le futur chef de gang des suzkids et à Viktor le petit dernier.

Les Nicois,

Merci à l'équipe kawabunga pour avoir exploité au maximum mes capacités en escape game. A Violaine, pour nos soirées pizza/sushi/crêpes, nos déménagements, et nos scénarios pour les futures revues. A Laurie pour les brunchs, les soirées raclettes... nos débriefs émissions culturelles. A Laura, pour tes directives, tes conseils et ta présence. c'est sûr !! on fait sauter le record. A Sam pour ta présence malgré la distance, la prochaine fois on se le fait ce brunch ☺. Merci à Ghis pour tes compétences en barbeuk. Merci à Philippe et Annie de nous accueillir dans leur maison pour nos après-midi piscine et nos nouvel-ans.

A Glwadys, pour ces 6 + 1 mois de coloc, pour ton grain de folie qui a rendu le confinement supportable. Ne change rien, tu es parfaite comme tu es et puis tu n'y arriverais pas de toute façon...

À Lucas merci pour ta présence, nos longues conversations et nos apéros. Merci ton soutien, tes conseils et de m'avoir permise de garder les pieds sur terre au cours de nos années d'internat.

À Caroline, mon binôme de biologie, une belle rencontre et une belle amitié qui gagne en valeur avec les années.

À mes co-internes pour avoir rendu mes journées dans les services plus légères : Claire, Stéphane, Vladou, Rinzine, Renaud, Edmond, Clémence, Emilie, Didac, Maria ma petite boule, Benichou, et tous les autres internes que je croise régulièrement depuis ces dernières années.

Merci à l'équipe médicale d'hématologie. Merci au Pr Mounier, au Dr Manonne pour leurs enseignements et leur bienveillance. Merci aux Docteurs Karsenti (Karaoké time) et Richez pour cet été en HDJ. Merci au Dr Vinti pour les visites musicales, votre bonne humeur, votre bienveillance et votre enseignement, je vous dois mes meilleures PL.

Merci à toutes les équipes paramédicales, de l'HDJ à l'UP en passant par le 3iem, j'ai appris énormément à vos côtés. Pensées aux amitiés créées, Marie tu es une infirmière et une maman formidable, Jeni pour ta présence et ton amitié depuis des années, vous allez me manquer

Merci à toute l'équipe du C3M : A Guigui pour ton encadrement, vive le weekly planner, à Lulu et Arnaud pour leurs conseils, à Nathan pour m'avoir tout appris des manips et à Coco et chacha pour leur bonne humeur et leurs encouragements.

Merci aux autres services qui ont participé à ma formation, l'équipe du CAL, merci pour ces 6 mois intensifs et enrichissants, merci au Dr Ré pour m'avoir épaulée au début de mon internat.

Merci à toute l'équipe de réanimation pour votre accueil pendant 6 mois dans votre service. Merci aux médecins pour leur bienveillance, leurs encouragements et leurs conseils avisés. Merci à Jean pour tes conseils et ton écoute. Merci à Hervé pour me permettre de garder un esprit critique (cynique ?). Merci à DD pour m'avoir appris tous ce que je connais en cardio (amlor et perindopril ☺). Merci à Mathieu pour ton soutien, j'espère que tu trouveras la place que tu mérites, tu es un excellent médecin. Merci à toute l'équipe paramédicale pour votre bonne humeur et votre accueil quotidien (non je ne suis plus interne dans le service...quoique...le COVID et je reviens). Grace à vous je me sens moins seule durant mes gardes.

Merci à l'équipe Toulousaine pour leur accueil pendant 6 mois, Merci aux professeurs Ysebaert et Recher, aux docteurs Huguet, Oberic, Tavitian, Bertoli pour leur enseignement, leur bonne humeur, et leur soutien. Merci à tous mes co internes, à Noemie pour le début d'une amitié entre perseverantes on se comprend. Merci à Marc pour ces 3 mois de leucémie intense. Merci à toute les équipes paramédicales pour leur gentillesse et leur patiente.

Ma famille

Merci à tous d'être présent à mes côtés. J'ai la chance de toujours trouver une écoute, de l'aide, de la compagnie et de ne pas avoir à me soucier d'être seule, je sais que grâce à vous je ne le serai jamais. Merci pour les valeurs que je défends, on a tous une histoire et je vous dois d'être fière de la mienne. Merci Maman et Marie pour ce qu'on a toutes les 3 et qu'on a su reconstruire, je suis tellement fière de vous, de nous, je vous aime...

Jean, merci pour tout ce que tu m'apportes et plus encore...

Merci pour ta présence, merci de me supporter (ce n'est pas évident tous les jours).

Merci pour nos projets, ton écoute (et je parle...), ton soutien, ta patience, ta tendresse.

Tu es mon point de repère... Je t'aime

Table des matières

Partie 1	14
Introduction	14
I- Epidémiologie.....	14
II- Physiopathologie.....	15
III- Caractéristiques cliniques et biologiques	15
1) Clinique	15
2) Cytologie.....	16
3) Cytogénétique	16
IV- Pronostic	18
V- Traitement.....	18
Résumé du papier.....	19
I- Matériels et méthodes.....	19
II- Résultats.....	19
1) Cytogénétique	19
2) Moléculaire.....	20
Conclusion.....	23
Bibliographie	24
Partie 2 : published paper	26

Listes des abbreviations

AZA : Azacitidine

ADN : Acide désoxyribonucléique

CHIP : Clone Hématopoïétique à Potentiel Indéterminé

DNMT3A : DNA methyl-transferase 3A

FLT3 : Fms-like tyrosine kinase 3

IDH1/2 : isocitrate déshydrogénases

IPSS : International Prognostic Scoring System

IPSS-R : International Prognostic Scoring System révisé

IWG : International Working Group

JAK2 : Janus kinase 2

LAM : Leucémie aigue myéloïde

LAM-t : Leucémie aigue myéloïde secondaire à un traitement cytotoxique

NGS : next generation sequencing

NM : néoplasie myéloïde

NM-t : néoplasie myéloïde secondaire à un traitement cytotoxique

NPM1 : nucleophosmin 1

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PTPN11 : protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11

SMD : syndrome myélodysplasique

SMD-t : syndrome myélodysplasique secondaire à un traitement cytotoxique

TET2 : Ten-eleven-translocation 2

VAF : Variant allèle frequency

WT1 : Wilms tumor 1

Partie 1

Introduction

Les néoplasies myéloïdes post traitement cytotoxique (NM-t) représentent 10-20 % des néoplasies myéloïdes (1)

Parmi ces néoplasies myéloïdes on retrouve :

- des Leucémies Aigües Myéloïdes (LAM) définies comme la conséquence de mutations génétiques au niveau des précurseurs hématopoïétiques conduisant à une accumulation médullaire de cellules immatures. Ces cellules sont capables de prolifération et de division mais ont perdu leur capacité de différenciation en cellule mature.
- des Syndromes Myélodysplasiques (SMD) définis comme néoplasie clonale médullaire liée à l'acquisition de mutation par un précurseur hématopoïétique entraînant une dysplasie et une hématopoïèse inefficace entraînant des cytopénies périphériques. Ils peuvent évoluer en LAM.

Ces NM-t sont définies dans la dernière classification OMS de 2016 comme une catégorie distincte (2). Elles présentent des caractéristiques particulières, principalement en terme de cytogénétique, où elles sont fréquemment associées à des caryotypes complexes et à des anomalies cytogénétiques défavorables (3)(4). Ces caractéristiques leur confèrent un pronostic défavorable et une prise en charge difficile (4)(5).

I- Epidémiologie

Elles représentent 10 à 20% des néoplasies myéloïdes et l'âge médian au diagnostic est de 61 ans(1)(6). Les NM-t sont décrites pour la première fois dans les années 1970 pour définir les patients développant une néoplasie myéloïde après un traitement cytotoxique. Pour plus de 80% des patients le traitement impliqué était une chimiothérapie pour une pathologie cancéreuse (70% pour une tumeur solide et 30% pour une hémopathie). Les 20% des patients restants correspondent à des patients ayant reçu des traitements cytotoxiques dans le cadre d'une pathologie non cancéreuse ou lors d'une autogreffe indiquée pour une hémopathie non maligne(5)(7). L'incidence de survenue des NM-t varie en fonction du traitement, de son intensité, de la pathologie sous-jacente, et de caractéristiques personnelles du patient. Elles surviennent en général dans la première décennie suivant le traitement cytotoxique.

Avec l'amélioration de la prise en charge des néoplasies au cours des années, l'incidence des NM-t est en voie d'augmentation.(8)(9)

II- Physiopathologie

Les principaux traitements cytotoxiques impliqués sont les agents alkylants, les inhibiteurs de topo isomérase et la radiothérapie. Chaque traitement met en jeu un mécanisme différent entraînant le développement d'une NM-t permettant de décrire des profils distincts.(10)(11)

Ainsi après un traitement par agent alkylant ou après une radiothérapie, le développement d'une NM-t survient dans les 4 à 7 ans suivant l'exposition. Le profil cytogénétique est défavorable avec des caryotypes complexes et une importante proportion de monosomies 5 ou 7, délétion 5q ou 17p.(4)(8)

Après un traitement par inhibiteurs de la topo isomérase II, les NM-t se développent plus précocement (2-3 ans) et au niveau cytogénétique on décrit des translocations chromosomiques (11q23 ou 21q22).(12)

Seuls 10% des patients traités pour un cancer développeront une NM-t, leur développement est plurifactoriel. On retrouve des facteurs environnementaux, l'âge du patient, la dose administrée, le type et la durée d'exposition aux traitements mais également des prédispositions individuelles. En effet, certaines prédispositions génétiques telles que des mutations dans des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN ou des polymorphismes au niveau des gènes impliqués dans le métabolisme des médicaments pourraient favoriser le développement de NM-t.(13). Par ailleurs les traitements pourraient sélectionner la progression d'un Clone Hématopoïétique à Potentiel Indéterminé (CHIP) présent chez le patient. Les CHIP sont définis par la présence de mutations décrites dans les hémopathies sans anomalie au niveau de la numération ou présence d'une NM.(14)(15) Les mutations les plus fréquemment impliquées sont *DNMT3A*, *TET2* et *ASXL1*. La proportion de ces mutations décrites dans la population générale augmente avec l'âge et augmente le risque de développer une NM.(16)

III- Caractéristiques cliniques et biologiques

1) Clinique

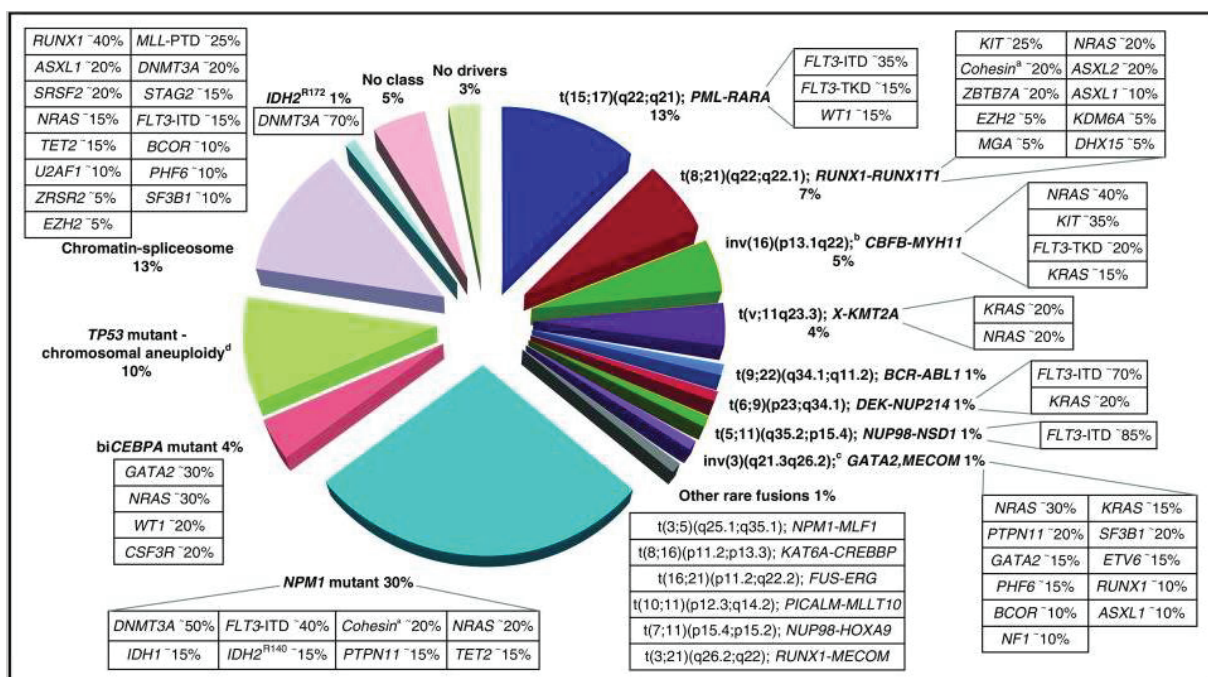
La présentation clinique des NM-t ne diffère pas de celle des NM *de novo* et reste aspécifique. Les patients consultent pour altération de l'état général : asthénie, symptômes d'insuffisance médullaire (pâleur, dyspnée, saignement, purpura, infection) ou lors d'une découverte fortuite sur un bilan sanguin.

2) Cytologie

Les caractéristiques cytologiques telles que la présence de cytopénies ou d'une hyperleucocytose dans les cas de LAM hyper leucocytaires sont similaires à leur homologues *de novo*. De même les marquages immunophénotypiques des NM-t n'ont pas de signature propre.

3) Cytogénétique

On retrouve une plus grande proportion d'anomalies chez les patients avec une NM-t que chez les patients avec une NM *de novo*. (4) Ces anomalies reflètent le mauvais pronostic de ces maladies.



Classification ELN des anomalies cytogénétiques des NM (Döhner H, et al. Blood. 2017)

a) Caryotype

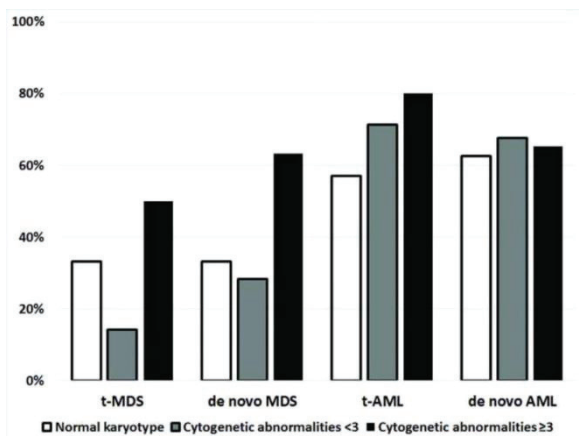
Plus de 90% des patients avec une NM-t présentent des anomalies caryotypiques, elles sont similaires à celles mise en évidence dans les NM *de novo* mais plus fréquemment retrouvées.

En comparaison à leurs homologues *de novo* on retrouve moins de caryotypes normaux (10 versus 40%) et plus de caryotypes défavorables (46 versus 20%). (17) Les anomalies caryotypiques fréquentes sont des anomalies des chromosomes 5 et 7, ainsi qu'une grande proportion de caryotypes complexes pour lesquels la survie globale médiane associée est inférieure à 1 an.

b) Moléculaire

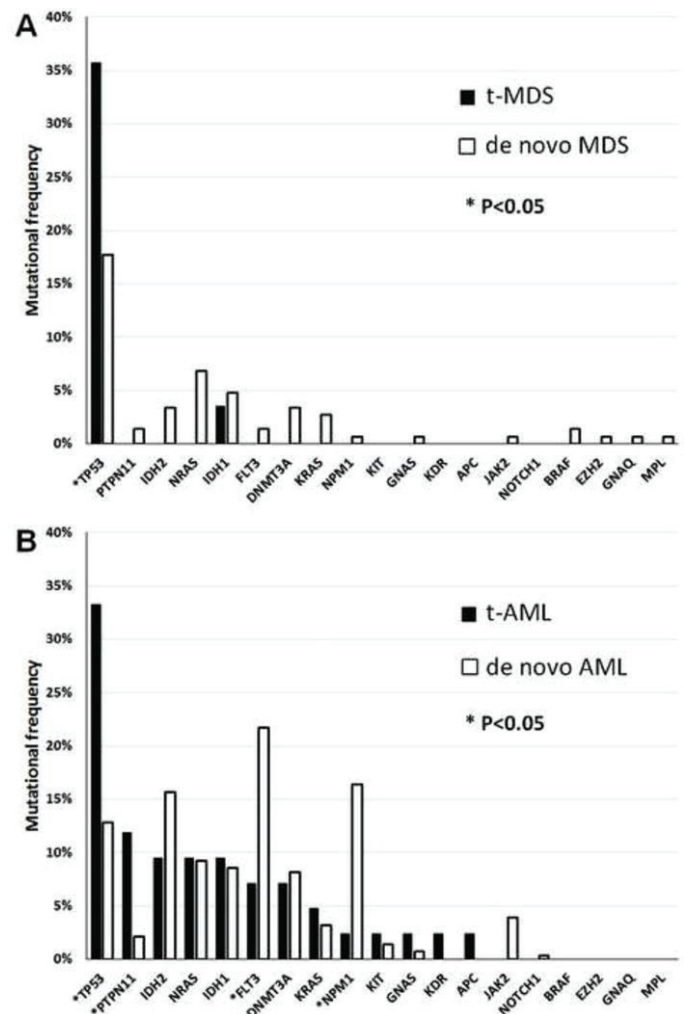
A l'instar des anomalies caryotypiques les anomalies mutationnelles sont identiques à celles retrouvées dans les NM *de novo*, en proportion plus importante.(18) Entre 25 et 50% des patients avec une NM-t présentent une mutation de *TP53*, elle représente la mutation la plus impliquée dans le développement des NM-t.(19) Les mutations de *TP53* sont un facteur de mauvais pronostic indépendamment associées à une mauvaise réponse au traitement et à des taux de survie plus bas.(20) Les mutations de *TP53* sont souvent associée à des anomalies caryotypiques telles que la del5q ou del17p. La conséquence de leur association se traduit par la perte de l'hétérozygotie pour la protéine p53 et donc l'impossibilité d'avoir une protéine même partiellement active entraînant une perte de fonction de la protéine.(19)(21)

Les mutations recherchées dans les NM *de novo* sont également celles recherchées dans les NM-t. Parmi elles les mutations fréquemment décrites dans les NM-t sont les mutations de *TET2*, *PTPN11*, *IDH1/2*, *NRAS*, *FLT3* (*NPM1* est peu décrite).(22) Le pronostic de ces mutations dans le sous-groupe des NM-t est peu décrit.



(22)Au dessus : Pourcentage des mutation pour un caryotype normal, anormal non complexe et complexe pour les NM-t et NM *de novo*.

(22)A droite :Profil mutationnel des NM-t en comparaison à leur homologue *de novo*. A) SMD et B) LAM



IV- Pronostic

Le pronostic des NM-t est moins bon que celui de leurs homologues *de novo*. La plupart des patients atteints d'une NM-t a une médiane de survie inférieure à 1 an et la survie globale à 5 ans est estimée à moins de 10%.⁽⁵⁾⁽⁷⁾⁽⁴⁾ Le facteur influençant ces résultats est en grande partie le pronostic cytogénétique défavorable de ces maladies. Les scores pronostiques impliquant les caractéristiques cytogénétiques tels que l'IPSS et l'IPSS-R dans les SMD sont applicables aux SMD-t.⁽²³⁾ Les autres facteurs impliqués sont liés au terrain ; les patients sont souvent âgés (âge médian 61 ans) et présentent des comorbidités liées à la pathologie et au traitement primitif.

V- Traitement

Le traitement de référence des NM-t est celui des NM. L'évaluation des patients est primordiale pour identifier les patients éligibles à un traitement intensif.

Pour les patients en bon état de santé général, accessibles à un traitement intensif, une chimiothérapie d'induction (cytarabine + anthracycline, CPX 351, chimiothérapie sans anthracycline : haute dose d'aracytine) peut être proposée suivie d'une intensification par allogreffe de cellules souches hématopoïétiques ou des chimiothérapies de consolidation adaptées. Récemment le CPX 351, une forme liposomale de daunorubicine et cytarabine, a montré un bénéfice en terme de survie globale en comparaison à la chimiothérapie d'induction de référence chez les patients âgés présentant une LAM secondaire à un SMD. A noter que un cinquième des patients présentaient un NM-t ⁽²⁴⁾. Depuis, l'utilisation du CPX 351 a été autorisée aux États-Unis en première ligne chez les patients présentant une LAM secondaire à un SMD ou à un traitement cytotoxique. Le CPX 351 est autorisé en Europe et en France, les résultats d'étude en vraie vie en France confirment l'intérêt de cette molécule dans cette population. ⁽²⁵⁾

La plupart des patients n'est pas éligible à un traitement intensif, l'objectif thérapeutique pour ces patients est l'obtention d'une rémission afin de prolonger et d'améliorer leur qualité de vie. Chez les patients nécessitant un traitement (LAM et SMD de haut risque) mais inéligibles à un traitement intensif le traitement de référence est l'AZACITIDINE (AZA). C'est un agent hypométhylant qui a montré son efficacité en améliorant la survie globale en comparaison aux soins de support et à la cytarabine à faible dose.⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾

En comparaison à leurs homologues *de novo*, les résultats des patients atteints d'un NM-t sont moins bons en termes de réponse et de survie.

Les schémas thérapeutiques sont en train d'évoluer avec la mise en évidence de mutations récurrentes au sein des néoplasies myéloïdes. Ces mutations prennent une importance théranostique et pronostique. Actuellement aucun traitement spécifique n'est proposé aux NM-t et le rôle de ces mutations ainsi que leur évolution sous traitement ne sont pas assez connus.

L'objectif de ce travail était de mettre en évidence l'évolution des profils mutationnels et la réponse de patients atteints de NM-t traités par AZA

Résumé du papier

I- Matériels et méthodes

Nous avons conduit une étude rétrospective bi-centrique, le CHU de Nice et le Mofitt Cancer Center de Tampa. Les patients inclus présentaient une LAM ou un SMD post cytotoxique diagnostiqués selon les critères OMS 2016. Ils étaient traités par AZA à la dose recommandée de 75mg/m²/jour pendant 7 jours tous les 28 jours. La réponse au traitement était évaluée selon les critères IWG de 2006 en fonction de la réponse médullaire et des cytopénies. Pour l'étude cytogénétique, les patients avaient un prélèvement médullaire au moment du diagnostic puis un ou plusieurs en cours de traitement. Une analyse cytogénétique ainsi qu'un séquençage moléculaire en NGS couvrant un panel de 19 gènes impliqués dans les hémopathies myéloïdes était réalisé sur les prélèvements médullaires. Les mutations candidates avec une fréquence allélique > 5% étaient retenues.

II- Résultats

19 patients ont été inclus dans cette étude (7 SMD-t et 12 LAM-t) avec un âge médian de 71 ans. L'intervalle médian entre la première néoplasie et le développement de la NM-t était de 5 ans. Ils avaient reçu une médiane de 6 cycles d'AZA et la survie globale médiane était de 14 mois.

1) Cytogénétique

Au diagnostic respectivement 5,5,2 et 7 patients avaient un bon, intermédiaire, mauvais ou très mauvais pronostic caryotypique selon le score IPSS-R. En cours de traitement on observait la disparition des anomalies caryotypiques chez 2 patients, la persistance d'un caryotype normal chez 2 patients, la persistance d'anomalie chez 1 patient et l'évolution des anomalies caryotypiques chez 9 patients. Aucune corrélation n'a été retrouvée entre ces évolutions et la réponse au traitement.

2) Moléculaire

Au diagnostic 8/19 patients étaient porteurs de mutation, respectivement 4,2,3 patients avaient 1, 2 et 3 mutations. Les mutations retrouvées étaient des mutations de *TP53* (4) *TET2* (2) *DNMT3A* (2) et *NPM1* (2). Chez les patients répondant à l'AZA, 7/8 patients présentaient des mutations. Les mutations de *TP53*(2), *DNMT3A* (1) et *JAK*(2) disparaissaient au cours du traitement. Chez les 13 patients en progression ou rechute 12 patients présentaient des mutations. On décrivait l'apparition de mutation de *TP53* (3) , *ASXL1* (2), *DNMT3A* (2), *IDH1* (2), *NRAS* (2), *GATA2* (1), *TET2* (1), et *RUNX1* (1) sous AZA.

Nous avons analysé la corrélation entre la réponse à l'AZA et l'évolution clonale. Chez les patients répondant à l'AZA nous observions l'apparition de mutation chez 3 patients, la stabilité du profil mutationnel chez 1 patient et la disparition de mutation concomitante à l'émergence de 2 mutations chez 1 patient. Chez les 12 patients en rechute ou réfractaire, la VAF du clone principal restait > 25%. On observait l'apparition de mutations pour 9 patients et une stabilité des clones chez 3 patients, dont l'émergence d'un clone muté *TP53* chez 5 patients. Finalement nous n'observions pas de corrélation entre la réponse au traitement et l'évolution des profils mutationnels.

Nous nous sommes intéressés aux fonctions cellulaires impactées par les différentes mutations. Ainsi au diagnostic 5 patients étaient mutés pour des gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN (*DNMT3A*, *TET2* et *IDH1/2*), 2 de ces patients répondaient au traitement tandis que 3 progressaient. Chez 3 patients nous n'observions aucun impact de l'AZA sur le profil mutationnel. Les mutations impliquées dans la méthylation de l'ADN étaient fréquemment associées à des mutations impliquées dans la transduction du signal. En cours de traitement par AZA, nous avons observé l'émergence de mutations impliquées dans la méthylation de l'ADN chez 6 patients, 4 parmi eux n'avaient pas de mutation au diagnostic. 4 patients parmi les 6 répondaient favorablement à l'AZA malgré l'apparition de mutations. Concernant les mutations impliquées dans la régulation transcriptionnelle (*TP53*, *RUNX1* et *GATA2*), 4 patients présentaient une mutation de *TP53* au diagnostic, 3 parmi eux ont répondu à l'AZA avec une extinction de la mutation *TP53* chez 2 patients et une progression associée à une majoration de la VAF du clone *TP53*. Lors de la rechute ou de la progression nous observions une réapparition ou une augmentation du clone portant la mutation *TP53*. L'apparition de mutations impliquées dans la régulation transcriptionnelle au court du traitement par AZA était décrite chez 5 patients, de façon concomitante à une maladie stable (2 patients) ou à une progression de la maladie (3 patients).

Discussion

L'étude de l'évolution clonale dans les NM est utilisée comme un outil prédisant la réponse ou la progression de la maladie(28). L'émergence de mutations sous traitement est fréquemment associée à une progression ou une rechute.(29) Ces mutations peuvent être dues à l'évolution de la maladie ou à une pression de sélection effectuée par le traitement. Dans les SMD avec délétion 5q, il a été montré que l'utilisation du Lénalidomide entraînait la sélection de clone muté *TP53*(21). De la même façon l'étude moléculaire de patients ayant reçu de l'AZA en pré greffe a révélé une sélection clonale au moment de la rechute(30). L'émergence de mutations des NM-t sous AZA n'est pas encore décrite et pourrait avoir une importance pronostique. Nous avons fait le choix d'étudier le sous-groupe des NM-t à cause de la fréquence des anomalies cytogénétiques qui leur est associée. Seul 42% de notre population présentaient des mutations au moment du diagnostic, ce qui est peu en comparaison à ce qui est décrit dans la littérature dans ce sous-groupe (80%) et qui peut être expliqué par le nombre restreint de gènes étudiés dans notre panel NGS.

Malgré le faible effectif de l'étude nous avons pu observer des données intéressantes, parmi les 10 patients non mutés au diagnostic, 3 répondaient à l'AZA, de façon concomitante à l'apparition de mutations chez 3 ces patients. Chez les 7 patients ne répondant pas à l'AZA, nous observons des modifications caryotypiques et l'émergence de mutations chez tous excepté chez 1 patient.

Si les mutations décrites sont identiques dans les NM *de novo*, elles sont plus fréquentes dans les NM-t, en particulier pour la mutation *TP53* qui est décrite dans 5-10% des NM *de novo* et de 25 à 50% pour les NM-t(22). Dans notre cohorte 21% des patients présentaient une mutation *TP53* au diagnostic, ce qui est cohérent avec ce qui est décrit dans la littérature. En dépit du mauvais pronostic associé aux mutations *TP53*, les données de la littérature montrent qu'elles répondent à l'AZA mais la durée de la réponse est plus courte que pour les patients non mutés *TP53*(31)(32). Les données retrouvées dans notre étude sont concordantes avec la littérature. Nous observons en effet une réponse à l'AZA pour 75% des patients porteurs d'une mutation *TP53*(3/4) et une rechute avec réapparition du clone *TP53* chez 2 patients. Les mutations impliquées dans la méthylation de l'ADN (*TET2*, *DNMT3A*) sont décrites pour répondre favorablement à un traitement par AZA, ce qui n'était pas le cas dans notre étude(33)(34). Tous nos patients porteurs de mutations impliquées dans la méthylation de l'ADN possédaient des mutations associées, ce qui pourrait être une explication pour les discordances de réponse avec les données de la littérature.

Nous décrivons chez nos patients un certain nombre de clones mutés persistant sous AZA malgré une réponse au traitement, ce qui avait déjà été décrit auparavant(35). Ces résultats confirment le manque de spécificité du mécanisme thérapeutique de l’AZA. L’AZA est un agent hypométhylant qui modifie la méthylation des précurseurs hématopoïétiques et suspend ainsi la croissance et la prolifération des cellules néoplasiques. Cependant seuls 40% des patients répondent au traitement par AZA et la réponse ne persiste pas dans le temps. Actuellement il ne semble pas y avoir de prédisposition permettant de prédire la réponse ou la perte de cette dernière sous AZA. Malgré notre faible effectif, notre étude semble confirmer cette absence de spécificité de l’AZA, aucun profil mutationnel ou évolution sous traitement ne coïncide avec les réponses sous AZA.

Devant la perte d’efficacité de l’AZA au cours des cycles et la résistance inéluctable de la maladie au traitement, les associations thérapeutiques combinant l’AZA à une autre molécule sont en plein essor. Parmi les combinaisons prometteuses on retrouve l’AZA associé au Venetoclax, un inhibiteur oral de BCL2 qui rétablit la sensibilité des cellules à la mort apoptotique. L’étude d’escalade de dose du Venetoclax en association avec un agent hypométhylant chez les patients atteints de LAM non éligibles à un traitement intensif comprend un sous-groupe de patient avec une LAM-t. Parmi les 36 patients analysables le taux de réponse était de 67% et était identique à celui des LAM de novo(36). L’essai américain M14-358 incluant des LAM en première ligne chez des sujets > 75 ans a montré l’efficacité de cette association avec un taux de réponse complète de 37% et de réponse complète avec réponse hématologique incomplète de 24% (37). Cette étude a abouti à une autorisation de la FDA en novembre 2018 de cette bi thérapie chez les sujets > 75 ans non éligibles à la chimiothérapie intensive atteints d’une LAM. Un essai de phase 3 (VIALE-A (www.clinicaltrial.gov:NCT02993523)) étudiant l’AZA seul en comparaison avec l’association AZA et Venetoclax est actuellement en cours. Récemment la caractérisation moléculaire des NM permet le développement de thérapie ciblée. En monothérapie ces molécules ne permettent pas d’obtenir une réponse durable. L’association des thérapies ciblées aux traitements de référence donne des résultats intéressants. Les thérapies ciblant les mutations *IDH1/2* sont actuellement en cours d’étude en association avec l’AZA(38)(39). L’analyse intermédiaire de l’essai AG221-AML-005 (www.clinicaltrial.gov:NCT03683433), étudiant l’association Enasidenib (inhibiteur oral IDH2) avec l’AZA en comparaison à l’AZA seul chez des patients atteints de LAM non éligibles à un traitement intensif montre des résultats intéressants. Les taux de réponse globale sont de 68% pour le bras association et de 42% pour le bras AZA seul avec des taux de réponse complète respectivement de 50 et 12%. La durée médiane de réponse pour le bras association est de 24 mois et de 12 mois dans le bras AZA seul. L’ivosidenib (inhibiteur oral d’IDH1) en association avec l’AZA est étudié au cours d’une phase Ib ([www.clinicaltrial.gov: NCT02677922](http://www.clinicaltrial.gov:NCT02677922)).

Les résultats présentés retrouvent sur 23 patients (dont 8 LAM-t) avec un suivi médian de 16 mois une survie globale à 82% à 1 an, un taux de réponse globale de 78% avec un taux de réponse complète de 60%. Les mutations *IDH1/2* représentent 20% des LAM et 5% des SMD.

Les inhibiteurs de FLT3, de plusieurs générations sont évalués en association avec de la chimiothérapie intensive mais également en association avec les agents hypométhylants. Le Sorafénib a été utilisé en combinaison avec l'AZA chez 43 patients avec une LAM en rechute ou réfractaire et retrouvait des taux de réponse globale de l'ordre de 46%(40)(41). De la même façon le Quizartinib en association avec l'AZA (phase I/II) retrouvaient une réponse globale de l'ordre de 75%(42). Une étude de phase II évaluant l'association AZA à la Midostaurine chez 24 patients de plus de 65 ans atteints d'une LAM montre une toxicité additionnelle avec un arrêt précoce des traitements et des réponses similaires à un traitement par AZA seul. (43)Des essais sont actuellement en cours pour étudier l'association d'inhibiteur de FLT3 à l'AZA (www.clinicaltrial.gov: NCT01892371, NCT02752035 and NCT02196857).

Finalement le développement d'une molécule ciblant les mutations *TP53*, l'APR 246, semble adapté aux NM-t(44). En effet les mutations *TP53* sont présentes chez 25 à 50% des patients avec un NM-t et confèrent un mauvais pronostic aux patients. De plus sous AZA il est démontré que les mutations de *TP53* répondent uniquement transitoirement. Actuellement des études visant à évaluer l'efficacité de cette molécule en association avec l'AZA sont en cours. Une étude française de phase Ib/II associant l'APR246 à l'AZA chez des patients atteints de SMD et LAM avec mutation de *TP53* vient de se terminer. Parmi les 55 patients inclus, 18 patients (33%) étaient atteints de NM-t. Les résultats de cette étude montrent une réponse globale de 87% pour un taux de réponse complète de 53%(www.clinicaltrial.gov: NCT03072043). Une phase III visant à comparer l'association AZA et APR246 à l'AZA seul est ouverte (NCT03745716).

Conclusion

Ce travail permet de confirmer la complexité moléculaire des NM-t. On confirme également l'efficacité de l'AZA sur les mutations de *TP53* ne perdurant pas dans le temps. Les NM-t restent de mauvais pronostic et le traitement de référence aujourd'hui ne permet pas de réponses optimales. Nos données moléculaires confirment également le fait que l'AZA reste un traitement non sélectif et nous n'avons pas mis en évidence de profil mutationnel répondant ou résistant à son utilisation.


Enfin l'avènement des thérapies ciblées permet une évolution des thérapeutiques à proposer à ces patients avec des associations ciblant les anomalies moléculaires présentes.

Bibliographie

1. Bueso-Ramos CE, Kanagal-Shamanna R, Routbort MJ, Hanson CA. Therapy-Related Myeloid Neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 2015 Aug;144(2):207–18.
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391–405.
3. Rowley JD, Olney HJ. International workshop on the relationship of prior therapy to balanced chromosome aberrations in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: Overview report. *Genes Chromosom Cancer*. 2002 Apr;33(4):331–45.
4. Smith SM, Le Beau MM, Huo D, Karrison T, Sobecks RM, Anastasi J, et al. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood*. 2003 Jul 1;102(1):43–52.
5. Kayser S, Döhner K, Krauter J, Köhne 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.
6. Dorez GM, Devesa SS, Curtis RE, Linet MS, Morton LM. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood*. 2012 Jan 5;119(1):34–43.
7. Fianchi L, Pagano L, Piciocchi A, Candoni A, Gaidano G, Breccia M, et al. Characteristics and outcome of therapy-related myeloid neoplasms: Report from the Italian network on secondary leukemias: Italian t-MN Report. *Am J Hematol*. 2015 May;90(5):E80–5.
8. Morton LM, Dorez GM, Schonfeld SJ, Linet MS, Sigel BS, Lam CJK, et al. Association of Chemotherapy for Solid Tumors With Development of Therapy-Related Myelodysplastic Syndrome or Acute Myeloid Leukemia in the Modern Era. *JAMA Oncol*. 2019 Mar 1;5(3):318.
9. Morton LM, Dorez GM, Tucker MA, Kim CJ, Onel K, Gilbert ES, et al. Evolving risk of therapy-related acute myeloid leukemia following cancer chemotherapy among adults in the United States, 1975-2008. *Blood*. 2013 Apr 11;121(15):2996–3004.
10. Pedersen-Bjergaard J, Philip P. Two different classes of therapy-related and de-novo acute myeloid leukemia? *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1991 Aug;55(1):119–24.
11. Pedersen-Bjergaard J. Insights into Leukemogenesis from Therapy-Related Leukemia. *N Engl J Med*. 2005 Apr 14;352(15):1591–4.
12. Ratain MJ, Rowley JD. Therapy-related acute myeloid leukemia secondary to inhibitors of topoisomerase II: From the bedside to the target genes. *Annals of Oncology*. 1992 Feb;3(2):107–11.
13. Churpek JE, Larson RA. The evolving challenge of therapy-related myeloid neoplasms. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2013 Dec;26(4):309–17.
14. Lee-Six H, Øbro NF, Shepherd MS, Grossmann S, Dawson K, Belmonte M, et al. Population dynamics of normal human blood inferred from somatic mutations. *Nature*. 2018 Sep;561(7724):473–8.
15. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015 Jul 2;126(1):9–16.
16. 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.
17. Schoch C, Kern W, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T. Karyotype is an independent prognostic parameter in therapy-related acute myeloid leukemia (t-AML): an analysis of 93 patients with t-AML in comparison to 1091 patients with de novo AML. *Leukemia*. 2004 Jan;18(1):120–5.
18. Shih AH, Chung SS, Dolezal EK, Zhang S-J, Abdel-Wahab OI, Park CY, et al. Mutational analysis of therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myelogenous leukemia. *Haematologica*. 2013 Jun 1;98(6):908–12.
19. Cleven AH, Nardi V, Ok CY, Goswami M, Dal Cin P, Zheng Z, et al. High p53 protein expression in therapy-related myeloid neoplasms is associated with adverse karyotype and poor outcome. *Mod Pathol*. 2015 Apr;28(4):552–63.
20. Wong TN, Ramsingh G, Young AL, Miller CA, Touma W, Welch JS, et al. Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. *Nature*. 2015 Feb;518(7540):552–5.
21. Lodé L, Ménard A, Flet L, Richebourg S, Loirat M, Eveillard M, et al. Emergence and evolution of TP53 mutations are key features of disease progression in myelodysplastic patients with lower-risk del(5q) treated with lenalidomide. *Haematologica*. 2018 Apr;103(4):e143–6.
22. Ok CY, Patel KP, Garcia-Manero G, Routbort MJ, Fu B, Tang G, et al. Mutational profiling of therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia by next generation sequencing, a comparison with de novo diseases. *Leukemia Research*. 2015 Mar;39(3):348–54.
23. Ok CY, Hasserjian RP, Fox PS, Stingo F, Zuo Z, Young KH, et al. Application of the International Prognostic Scoring System-Revised in therapy-related myelodysplastic syndromes and oligoblastic acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2014 Jan;28(1):185–9.

24. Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, Newell LF, Lin TL, Ritchie EK, et al. CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. *JCO*. 2018 Sep 10;36(26):2684–92.
25. Chiche E, Bertoli S, Rahmé R, Micol J baptiste, Pasquier F, Peterlin P, et al. CPX 351 induces deep response and suppress the impact of poor prognosis mutation (TP53, ASXL1, RUNX1 and EVI1) defined by ELN 2017 in t-AML and MRC AML: a report from a multicentric french cohort. Abstract.
26. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The Lancet Oncology*. 2009 Mar;10(3):223–32.
27. Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, et al. Azacitidine Prolongs Overall Survival Compared With Conventional Care Regimens in Elderly Patients With Low Bone Marrow Blast Count Acute Myeloid Leukemia. *JCO*. 2010 Feb 1;28(4):562–9.
28. Uy GL, Duncavage EJ, Chang GS, Jacoby MA, Miller CA, Shao J, et al. Dynamic changes in the clonal structure of MDS and AML in response to epigenetic therapy. *Leukemia*. 2017 Apr;31(4):872–81.
29. Mossner M, Jann JC, Wittig J, Nolte F, Fey S, Nowak V, et al. Mutational hierarchies in myelodysplastic syndromes dynamically adapt and evolve upon therapy response and failure. *Blood*. 2016 Sep 1;128(9):1246–59.
30. Jacoby MA, Duncavage EJ, Chang GS, Miller CA, Shao J, Elliott K, et al. Subclones dominate at MDS progression following allogeneic hematopoietic cell transplant. *JCI insight*. 2018 Mar 8;3(5).
31. Ok CY, Patel KP, Garcia-Manero G, Routbort MJ, Peng J, Tang G, et al. TP53 mutation characteristics in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia is similar to de novo diseases. *Journal of hematology & oncology*. 2015 May 8;8:45.
32. Takahashi K, Patel K, Bueso-Ramos C, Zhang J, Gumbs C, Jabbour E, et al. Clinical implications of TP53 mutations in myelodysplastic syndromes treated with hypomethylating agents. *Oncotarget*. 2016 Mar 22;7(12):14172–87.
33. Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, Mansat-De Mas V, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2011 Jul;25(7):1147–52.
34. 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.
35. Kennedy JA, Ebert BL. Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2017 Mar 20;35(9):968–74.
36. DiNardo CD, Pratz K, Pullarkat V, Jonas BA, Arellano M, Becker PS, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2019 Jan 3;133(1):7–17.
37. DiNardo CD, Pratz K, Pullarkat V, Jonas BA, Arellano M, Becker PS, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2019 Jan 3;133(1):7–17.
38. DiNardo CD. Ivosidenib in IDH1-Mutated Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine*. 2018 Sep 20;379(12):1186.
39. Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, Fathi AT, Roboz GJ, Altman JK, et al. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017 Aug 10;130(6):722–31.
40. Ravandi F, Alattar ML, Grunwald MR, Rudek MA, Rajkhowa T, Richie MA, et al. Phase 2 study of azacitidine plus sorafenib in patients with acute myeloid leukemia and FLT-3 internal tandem duplication mutation. *Blood*. 2013 Jun 6;121(23):4655–62.
41. Ohanian M, Garcia-Manero G, Levis M, Jabbour E, Daver N, Borthakur G, et al. Sorafenib Combined with 5-azacytidine in Older Patients with Untreated *FLT3* -ITD Mutated Acute Myeloid Leukemia: OHANIAN ET AL. *Am J Hematol*. 2018 Sep;93(9):1136–41.
42. Short NJ, Kantarjian H, Ravandi F, Daver N. Emerging treatment paradigms with FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Therapeutic Advances in Hematology*. 2019 Jan;10:204062071982731.
43. Tomlinson BK, Gallogly MM, Kane DM, Metheny L, Lazarus HM, William BM, et al. A Phase II Study of Midostaurin and 5-Azacitidine for Untreated Elderly and Unfit Patients With FLT3 Wild-type Acute Myelogenous Leukemia. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 2019 Nov;S2152265019320968.
44. Perdrix A, Najem A, Saussez S, Awada A, Journe F, Ghanem G, et al. PRIMA-1 and PRIMA-1(Met) (APR-246): From Mutant/Wild Type p53 Reactivation to Unexpected Mechanisms Underlying Their Potent Anti-Tumor Effect in Combinatorial Therapies. *Cancers*. 2017 Dec 16;9(12).

Clonal selection in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia under azacitidine treatment

Anne Calleja^{1,2}  | Seongseok Yun³ | Chimène Moreilhon⁴ | Jean Michel Karsenti¹ | Lauris Gastaud⁵ | Lionel Mannone¹ | Rami Komrokji³ | Najla al Ali³ | Bérangère Dadone-montaudie⁶ | Guillaume Robert² | Patrick Auberger² | Sophie Raynaud⁴ | David A. Sallman³ | Thomas Cluzeau^{1,2}

¹Hematology Department, Cote D'Azur University, Nice Sophia Antipolis University, CHU of Nice, Nice, France

²Cote d'Azur University, INSERM U1065, Mediterranean Center of Molecular Medicine, Nice, France

³Department of Malignant Hematology, H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, Tampa, FL, USA

⁴Cote D'Azur University, Nice Sophia Antipolis University, CHU of Nice, Onco-hematology Laboratory, Nice, France

⁵Oncology Department, Antoine Lacassagne Center, Nice, France

⁶Anatomopathology Department, Cote d'Azur University, Nice Sophia Antipolis University, CHU of Nice, Nice, France

Correspondence

Thomas Cluzeau, Hematology department, Cote D'Azur University, Nice Sophia Antipolis University, CHU of Nice, 151 Route Saint Antoine de Ginestière, 06200 Nice, France.

Email: Cluzeau.t@chu-nice.fr

Abstract

Introduction: Therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia (t-MDS/AML) are defined as complications of previous cytotoxic therapy. Azacitidine (AZA), a hypomethylating agent, has showed activity in t-MDS/AML.

Objectives: We evaluated the clonal dynamics of AZA-treated t-MDS/AML.

Methods: We collected bone marrow samples, at diagnosis and during treatment, from AZA-treated t-MDS/AML patients. NGS on 19 myeloid genes was performed, and candidate mutations with a variant allele frequency >5% were selected.

Results: Seven t-AML and 12 t-MDS were included with median age of 71 (56-82) years old, median number of AZA cycles of 6 (1-15), and median overall survival (OS) of 14 (3-29) months. We observed correlation between AZA response and clonal selection. Decrease of *TP53*-mutated clone was correlated with response to AZA, confirming AZA efficacy in this subgroup. In some patients, emergence of mutations was correlated with progression or relapse without impact on OS. Clones with mutations in genes for DNA methylation regulation frequently occurred with other mutations and remained stable during AZA treatment, independent of AZA response.

Conclusion: We confirmed that the molecular complexity of t-MNs and that the follow-up of clonal selection during AZA treatment could be useful to define treatment combination.

KEYWORDS

acute myeloid leukemia, azacitidine, clonal selection, myelodysplastic syndromes, *TP53* mutation

1 | INTRODUCTION

Therapy-related myeloid neoplasms (t-MN), which comprise therapy-related acute myeloid leukemia (t-AML) and myelodysplastic syndrome (t-MDS), are defined by the WHO 2016 classification¹ as

a late complication of previous cytotoxic therapy including chemotherapy and/or radiotherapy. Latency period of developing t-MN after prior treatment for a solid tumor is maximal in the first 5 years after treatment with peak onset at 2 years. In contrast, patients with a primary hematological malignancy have persistent risk of

David A. Sallman and Thomas Cluzeau contributed equally to this work.

© 2020 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

developing t-MN over 10 years with a peak at 5 years.²⁻⁴ T-MN represent about 10%-20% of newly diagnosed AML and MDS.^{2,5,6}

Alkylating agents, topoisomerase II inhibitors, antimetabolites, and radiotherapy are cytotoxic treatments most frequently known to induce t-MN although t-MN have been described in the setting of numerous anti-cancer treatments.^{2,5} T-MN are frequently associated with recurrent chromosomal aberrations based on specific therapy with alkylating agents commonly leading to abnormalities of chromosome 5/7 (often in the setting of complex cytogenetics), while topoisomerase II inhibitors being associated with balanced rearrangements including 11q23.^{2,7,8} Risk to develop t-MN is correlated with type, dose, and duration of treatment but also environment, age, and comorbidities of patient.^{2,5} Additionally, recent studies strongly support that the presence of clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) is significantly associated with the risk of developing a subsequent t-MN.^{9,10} These studies suggest that pre-existing clones may be selected following cytotoxic chemotherapy.

Outcomes of t-MN are poor, with lower response rate and overall survival estimated around 10% at 5 years.⁵ Azacitidine (AZA), a hypomethylating agent, is the standard treatment for AML, and MDS patients were not eligible for intensive chemotherapy.^{11,12} Response rates for AZA treatment of t-MN are similar to de novo MDS but were associated with shorter survival.¹³⁻¹⁶

The genetic landscape of MDS/AML has been extensively studied with driver mutations involving transcription factors, signal transduction proteins, epigenetic modifiers, and components of RNA splicing.¹⁷⁻¹⁹ Notably, the molecular architecture in patients with therapy-related disease is distinct from de novo myeloid neoplasms. We identified an increased absolute number of mutations in t-MNs as well as a greater frequency of *TP53* (30%), *TET2* (13%), and *DNMT3A* (10.2%) than their de novo counterpart.^{6,20,21} Molecular complexity and/or specific mutations in t-MN could explain the lack of efficacy of treatments and the poor prognosis of these patients. Although clonal selection during MDS therapies has been investigated, to date, no study has evaluated the clonal dynamic which occurs with AZA treatment.²²⁻²⁴

The aim of our study was to describe clonal selection in AZA-treated t-MDS/t-AML patients and to correlate it to AZA response.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Patients and samples

We collected bone marrow mononuclear cells from AZA-treated patients for t-MN (t-MDS or t-AML) in two centers (CHU of Nice, France and Moffitt Cancer Center and Research Institute, Tampa, Florida, USA). Patients were more than 18 years old. Diagnosis of MDS and AML was based on bone marrow sample and classified according to the WHO 2016 classification. For each MDS and oligoblastic patient (ie, $\leq 30\%$ blasts), International Prognostic Scoring System (IPSS) score was calculated. Patients had bone marrow assessment at the time of diagnosis and serially while on

Novelty statement

We evaluated here for the first time the clonal dynamics of AZA-treated t-MDS/AML. We confirmed the molecular complexity of t-MNs and the relevance of a follow-up of clonal selection during AZA treatment. This could be used to define a personalized treatment combination.

the treatment. We obtained sample during response for 11 patients (58%) and at relapse or progression for 10 patients (53%). AZA response was defined according to IWG 2006 criteria for MDS patients²⁵ and Cheson et al criteria for AML.²⁶ Patients in complete remission (CR), partial remission (PR), medullary complete remission (mCR), and/or stable disease with hematological improvement (HI) were considered as responders, and patients in stable disease without hematological improvement, progression, or relapse were considered as non-responders.

2.2 | Treatment

All patients were treated by subcutaneous or intravenous AZA according to the manufactory recommendations: 75 mg/m²/d for 7 days, every 28 days. Treatment was administrated until progression or hematopoietic allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) in case of response (n = 4).

2.3 | NGS Analysis

NGS analysis was performed from bone marrow samples before and during AZA treatment. DNA was isolated from bone marrow mononuclear cells (QIAamp DNA blood mini Kit (Qiagen), at diagnosis and under AZA. All samples were run in duplicate. In the CHU of Nice, samples were sequenced using Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) 316v2 Chips. We used the Ion AmpliSeq™ AML Cancer Research Panel to analyze 19 genes. In the Moffitt Cancer Center and Research Institute, targeted amplicon-based NGS of up to 37 myeloid genes was performed.

DNA samples were subjected to targeted genome sequencing using Illumina HiSeq2000 instrument as previously described.²⁷ We analyzed 19 genes that were common to both sample sets, and candidate mutations with a variant allele frequency >5% were selected.

2.4 | Statistical analysis

Patient characteristics, overall response rates (ORR, ie, CR, PR, mCR, and SD with HI), and CR rates were described using mean and median tests. Overall survival (OS) was calculated from the date of sequencing

until the date of death. OS was estimated using Kaplan-Meier method. All calculations were performed using SPSS v22 software (IBM SPSS Statistics). The course of the clonal dynamic for each patient was illustrated using the “fishplot” package for R (Version 3.4.2).²⁸

3 | RESULTS

3.1 | Characteristics of enrolled patients

All patients' characteristics at diagnosis are reported in Table 1. A total of 19 patients were included: seven from the CHU of Nice and 12 from the Moffitt Cancer Center and Research Institute. Sex ratio was 0.9 (M/F). Median age at diagnosis was 71 years (range, 56-82). Among the 19 patients, seven had t-AML and 12 had t-MDS. All patients had a primary treated neoplasia including eight breast cancers, six lymphomas, one thyroid cancer, one laryngeal cancer, one endometrial cancer, one renal clear cell carcinoma, and one melanoma. Median time between the first cancer and MDS/AML was 5 years (range, 0.3-21). Median number of AZA cycles was 6 (range, 1-15). Median overall survival was 14 months (range, 3-29).

3.2 | Cytogenetic characterization

Cytogenetic at diagnosis was available in all patients and in 14 patients under treatment. (Table S1). At diagnosis, 5, 5, 2, and 7 patients had good, intermediate, poor, and very poor prognosis according to IPSS-R cytogenetic classification.²⁹ We observed disappearance of cytogenetics abnormalities in two patients (P#13 and P#19), persistence of cytogenetics abnormalities in one patient (P#17), persistence of normal karyotype in two patients (P#14 and P#15), and evolution of cytogenetic abnormalities in nine patients. We did not identify a correlation with response of treatment and with mutational profiles.

3.3 | Molecular characterization of AZA-treated t-MDS/AML

The patient's mutational profiles at diagnosis and under AZA treatment were illustrated in Figure 1A,B. At diagnosis, mutations were identified in eight of 19 patients (42%) with a range of 0-3 mutation per patient. Ten patients were divided into any pathological mutation, four patients had only one mutation, two patients had two mutations, and three patients had three mutations at diagnosis.

Based on number of mutations (0, 1, 2, and 3), the OS was 15, 14, 14, and 9 months, respectively ($P = .23$; data not shown). Notably, the 10 patients without identification of variants by NGS all had cytogenetic abnormalities (Table 1).

At diagnosis (Figure 1A), 8/19 patients had mutations with a median of two mutations per patients (range, 1-3). The most frequent mutations included *TP53* ($n = 4$), *TET2* ($n = 3$), *DNMT3A* ($n = 2$), and

NPM1 ($n = 2$). Of note, five among the six patients with *DNMT3A*, *TET2*, and *ASXL1* mutations had additional mutations at the time of diagnosis which can be an evolution of clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP). At the time of AZA response (Figure 1B), 7/8 responder patients were mutated with a median of two mutations per patients (range, 1-3). Mutations occurring at this time were *ASXL1* ($n = 1$), *DNMT3A* ($n = 1$), *IDH1/2* ($n = 2$), *TET2* ($n = 1$), and *WT1* ($n = 2$). Mutations that were cleared below the VAF cutoff at the time of AZA response were *TP53* ($n = 2$), *DNMT3A* ($n = 1$), and *JAK2* ($n = 1$). At the time of AZA progression or relapse (Figure 1B), 12/13 non-responder patients had mutation with a median of two mutations per patient (range 1-3). Mutations occurring at the time of AZA progression were *ASXL1* ($n = 2$), *DNMT3A* ($n = 2$), *GATA2* ($n = 1$), *IDH1* ($n = 2$), *NRAS* ($n = 2$), *TET2* ($n = 1$), *TP53* ($n = 3$), and *RUNX1* ($n = 1$). Mutations that were cleared below VAF cutoff at the time of progression under AZA were *PNPT1* ($n = 1$). We represented dynamic evolution of patient mutational profile under AZA in Figure 1.

3.4 | Correlation between AZA response and clonal selection

Patients' characteristics under treatment are reported in (Figure 2) Table 2. We observed CR in 3 patients (P#1, P#3, and P#13; Figure 2A). Regarding the responders patients without CR (Figure 2B), we detected emergence of mutations in three patients (P#2, P#5, and P#18), stability of mutational profile in 1 patient (P#9), and disappearance of a mutation and concomitant occurrence of two mutations in one patient (P#11). We analyzed also mutational profiles of 12 patients at progression, relapse or SD without HI. In 10 of 12 patients, the VAF of the main clone was >25%. In five patients (P#1, P#10, P#16, P#17, and P#19) (Figure 2C), we detected emergence or re-emergence of *TP53* mutation at the time of relapse/progression. We detected emergence of mutations in nine patients and no modification in the three remaining patients (P#14, P#15, and P# 19).

Finally, we observed 10% of patients ($n = 2$) became NGS negative. There was no change in mutational profile in four out of nine patients (21%) in the course of AZA treatment, without correlation with AZA response. We detected emergence of mutations in 58% of patients (11/19).

3.5 | Correlation between AZA response and putative function of mutated clones

We first focused in genes involved in DNA methylation regulation and identified mutations in *DNMT3A*, *TET2*, and *IDH1/2* (Figure S1). Of note, in MDS and AML, *DNMT3A* and *TET2* mutations have been associated with favorable AZA response.³⁰⁻³³

At diagnosis, we detected clones with mutations in genes involved in DNA methylation regulation in five patients (patients #9, #11, #14, #15, and #19; Figure S1). Median VAF of these clones was

TABLE 1 Patient characteristics at diagnosis

Patient	Sex	Age	Diagnosis	WHO	IPSS Score	AML risk classification (ELN 2017)	Medullary Blastose (%)	Hemoglobin (g/dL)	Neutrophil (/mm ³)	Platelets (/mm ³)
#1	F	71	31/10/2011	AML	.	Adverse	25	9.3	2800	71 000
#2	F	82	21/11/2011	RAEB2	High	.	19	11.9	1300	92 000
#3	F	73	12/04/2016	RAEB2	High	.	12	7.7	700	80 000
#4	F	79	19/03/2011	AML	.	Intermediate	27	6.9	400	20 000
#5	M	61	01/01/2006	AML	.	Adverse	20	10.6	300	69 000
#6	M	79	15/10/2011	RAEB2	Intermediate 2	.	11	8.6	100	59 000
#7	F	56	29/12/2011	AML	.	Intermediate	85	10.7	1000	50 000
#8	F	76	27/03/2015	RAEB1	Intermediate 2	.	7	8.9	700	124 000
#9	M	59	14/08/2014	AML	.	favorable	64	11.9	8400	54 000
#10	F	68	21/02/2014	DCRM	High	.	11	9.6	940	110 000
#11	M	63	06/10/2015	MDS	Intermediate 2	.	1	8.5	410	20 000
#12	F	81	18/03/2014	CMML	Intermediate 1	.	10	8.7	3500	274 000
#13	M	75	08/10/2012	DCRM	Intermediate 1	.	2	12.4	4100	311 000
#14	M	68	04/11/2014	AML	.	Favorable	14	9.5	400	62 000
#15	M	69	28/01/2014	DCRM	Low	.	2	12.4	NA	140 000
#16	M	64	05/06/2015	DCRM	Intermediate 1	.	3	11	3500	121 000
#17	M	73	11/06/2015	MDS	Intermediate 2	.	3	9.2	3000	95 000
#18	F	70	25/02/2015	AML	.	Intermediate	73	9.1	380	87 000
#19	F	75	29/06/2015	MDS	Intermediate 2	.	10	8.4	900	138 000

Abbreviation: NA, not available.

39% (range, 24-50). Patients #9 and #11 were AZA responders (respectively, mCR and SD with HI), whereas patients #14, #15, and #19 were in progression. Median number of AZA cycles was 5 (range, 3-8), and median OS was 14 months (range, 3-15). In patients #9, #14,

and #15, we failed to detect any change of mutated clone VAF under AZA treatment. For these three patients, mutations in DNA methylation regulator were also associated with mutations involved in signal transduction.



Karyotype at diagnosis	NGS mutation At diagnosis (VAF)	Cycle	Primary neoplasia	Treatment	Time between the 2 neoplasia
46,XX,del(3)(q21),del(5)(q13q33),der(5)t(5;7)(q?15;q11),del(7)(q11),der(12)t(3;12)(q21;q?21),der(19)t(?1;19)(p2?1;q13)[19]/46,XX[1]	TP53 (39,3)	13	Breast lymphoma	Radiotherapy	14 y
46,XX, del(7)(q11q33)[16]/46,XX [4]	ASXL1 (10,7)	13	Breast adenocarcinoma	Surgery and radiotherapy	10 mo
45 XX-3 der(5)t(3;5)(q11q11) []/47,sl1,idem + 8+22[6]/48, sl2, idem,+8,+21 + 22 [2]/49,sl3,idem + der(5)+8 + 21+22 [6]/48sl4, idem + 8+22 + mar[8]	TP53 (41)	15	Breast adenocarcinoma	Surgery, chemotherapy and radiotherapy	5 y
48,XX,+i(21)(q10),i(21)(q10)[17]/46,XX[4]	0	12	Breast adenocarcinoma	Radiotherapy	NA
46,XX,del(7)(q21q35) [11]/46,idem,del(5)(q31q35) [10]	0	9	Breast adenocarcinoma	Radiotherapy, chemotherapy	5 y
46,XY,del(20)(q?) [20]	PTPN11 (5,3)	9	Thyroide cancer	Radiotherapy	9 mo
46,XX,t(11;19)(q23;p13) [19]/ 46,XX [1]	0	3	Breast cancer	Radiotherapy chemotherapy	3 y
44 ~ 47, XX, add(3)(p11), -5, +5, -17, -18, -19, +19, +r, +3-5mar[cp13]/46, XX[7]	0	5	Follicular lymphoma	R-CHOP and radiotherapy	12 y
46, XX[20]	DNMT3A (20) IDH1 (19) NPM1 (19)	4	laryngeal cancer	radiotherapy and cisplatine	11 y
45,XX,add(1)(p13),del(5)(q13q33),-7,der(15;17)(q10;q10),-20,+2mar[cp20]	0	10	Small lymphocytic lymphoma	MEACOP	21 y
44-46,XY,del(5)(q13q33),t(6;11)(p21;q14), -7, -20, del(20)(q11.2q13.3), +1-2 mar[CP18]/46, XY[2].	DNMT3A (24,29) TP53 (46,82) JAK2 (47,89)	3	DLCLB	R-CHOP	13 y
46,XY,inv(3)(q21q26)[13]/46,XY[7].	0	15	Melanoma, prostate	NA	NA
47, XY, +8[4]/45, XY, -11[1]	0	4	Hodgkin lymphoma	MOPP-ABV	21 y
46, XX[20]	TET2 (49,9) WT1 (32,61) NPM1 (34)	8	RCC	IL2, Xgeva	2 y
46, XX[20]	NRAS(36,44) TET2(33,52)	6	Breast adenocarcinoma	AC-T	8 y
46,XX,del(5)(q15q13)[7]/44 ~ 45,del(3)(p21p25),-5,der(7;22)(p10;q10), add(8)(q24),der(12;17)(q10;q10), +1 ~ 3mar[cp7]/46, XX[6]	0	1	Breast adenocarcinoma	AC-T	1 y
45,X-7[9]/46,XX[11].	0	4	Endometrial adenocarcinoma	Carboplatin, taxol	4 mo
46, XX[20]	0	2	Breast adenocarcinoma	Cytosan, taxotere	5 y
45-47, XY, -5, +9, add(9)(q22), -11, add(11)(p11.2), +15, add(17)(p13), -18, del922)(q13), +1-2mar[cp19]/46, XY[1]	TET2(46) TP53 (3)	6	DLCLB	R-CHOP	4 y

Patients #11 and #19 were mutated in DNA methylation regulators gene and signal transduction process. Under AZA treatment, we observed an increased in both mutations in patient #11 whereas a diminution of clone with mutation in DNA methylation regulators

(VAF 46 to 26%) with an increase of signal transduction mutation (VAF 3 to 21%) in patient #19.

Emergence of DNA methylation regulation-mutated clones occurred in six patients under AZA treatment (patients #2, #4, #5, #6,

#10, and #18; Figure S1). Four among these patients had no mutation before AZA treatment. Median number of AZA cycles was 9 (range, 2-13), and median OS was 13 months (range, 7-15). Patients #2, #4, #5, and #18 were AZA responders (3 SD-HI and 1 PR), whereas the two remaining patients progressed upon treatment. Patient #10 progression was associated with the emergence of DNA methylation regulator mutations and *TP53* mutation. In patient #5, appearance of DNA methylation regulator mutations was correlated with stable disease, but at the time of progression, patient #5 loses this DNA methylation regulator mutation while gaining three new mutations. Responding patients #4, #5, and #18 had no mutation at diagnosis and stay in responses at the time of DNA methylation regulator mutation emergence. In patient #2, PR response was correlated with acquisition of DNA methylation regulator mutation and signal transduction mutation.

In patient #6, we detected at the time of progression a disappearance of a *PTPN11*-mutated clone and the emergence of two new DNA methylation regulator mutations (*DNMT3A* and *TET2*).

We also interrogated mutations involved in transcriptional regulation including *TP53*, *RUNX1*, and *GATA2*. In MDS, *TP53*-mutated patients are known to initially respond to hypomethylating treatment but the duration of their response remained short.^{30,34}

At diagnosis, patients #1, #3, #11, and #19 presented with *TP53* mutations (Figure 2 and Figure S1). Median number of cycle was 10 (range 3-15). Median OS was 15 months (range, 12-22). Patients #1 and #3 were AZA responders (CR), in good agreement with the disappearance of the *TP53* mutation with a VAF cutoff of 5%. At relapse, we detected re-emergence of a *TP53* mutation only in patient #1. We observed an increase of mutation in transcription factor with a VAF from 3% to 21% associated with progression in patient #19. Three among these four patients were AZA responders.

OS of *TP53*-mutated patients was 14 and 15 months when mutations emerge at diagnosis or under treatment, respectively. Among patient with *TP53* mutation, three patients went to allo-SCT (P#11, P#16, and P#19).

Emergence of clones with mutation in transcription factor under AZA treatment occurred in five patients (#5, #7, #10, #16, and #17; Figure S1). Median number of cycles was 4 (range 1-10), and median OS was 15 months (range 6-15). Appearance of these mutations occurred during stable disease in patients #7 and #16 and at the time of progression in patients #5, #7, and #17. Mutation in transcription factor was associated with other mutations in patients #5 and #10 and was isolated in patients #7, #16, and #17.

4 | DISCUSSION

Clonal selection in myeloid neoplasms is currently being studied to predict response or disease progression. Emergence of subclones has been reported at progression and/or relapse in MDS and AML patients.³⁵ This selection could be induced by either pressure selection of treatment or natural evolution of the disease.²³ Clonal

selection has been evaluated under supportive care or lenalidomide treatment in MDS and showed a clonal selection with or without therapy.²³ Notably, selection of mutational profiles was heterogeneous with some patients having no clonal variance during several years, while other had a highly dynamic shift of their mutational profile.^{22,36,37} To our knowledge, mutational selection under AZA treatment in therapy-related MDS/AML has not been explored and could have an interest in term of prognosis and prediction of response or relapse. Recently, analysis of clonal selection under AZA treatment before allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT)³² confirmed that AZA could select mutated clones and showed that recurrent clones could re-emerge at relapse. Other studies established that AZA may influence variant allele frequencies in MDS patients.³¹ Nevertheless, these studies suggested a limited selectivity of AZA treatment. Usual response criteria and outcome could be improved by monitoring clonal selection under AZA treatment.^{31,35}

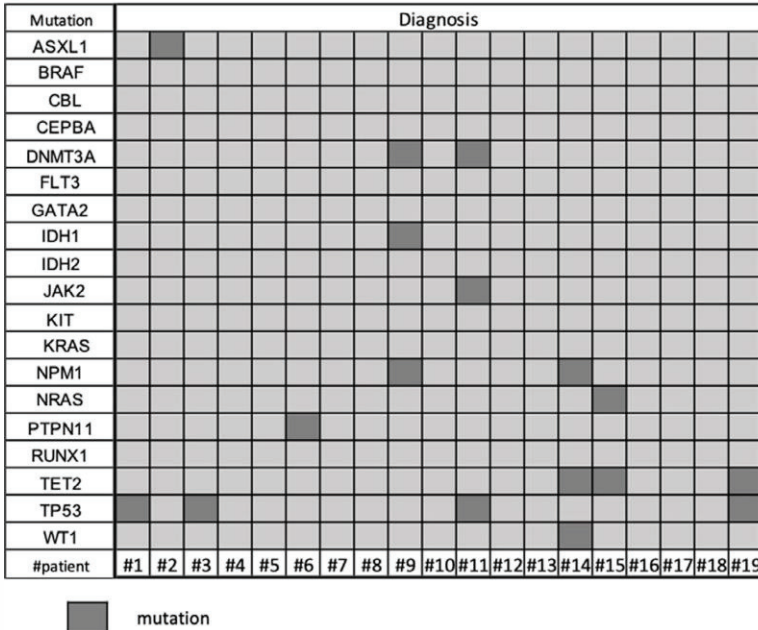
In the present study, we focused our study on therapy-related MDS and AML. T-MDS and t-AML have cytogenetic features and outcome that differ from de novo MDS and AML and belong to a specific subgroup called t-MN in 2016 WHO classification.²¹ Chromosomal abnormalities are observed in more than 80% of t-MN patients, and high-risk cytogenetic abnormalities are more frequently observed.²⁰ Identification of only 42% of t-MN patients mutated in our cohort at diagnosis could be explained by the restricted panel used. Nevertheless, in concordance with these data, all patients had a clonal abnormality identified either by cytogenetics or by NGS.

Even if the study was performed in small number of patients, we described some interesting observations. Among the 10 patients without mutation at diagnosis (P#4, #5, #7, #8, #10, #12, #13, #16, #17, and #18), we observed AZA response in P#13, P#5, and P#18.

We observed disappearance of cytogenetic abnormalities in P#13 karyotype and clonal cytogenetic selection in P#5 and P#18. In parallel, we observed emergence of mutations in these three patients under AZA treatment. In addition, we observed cytogenetic clonal modification in all other patients without AZA response. In parallel, we observed emergence of mutations in all patients except P#8.

Mutational profiles are also different in t-MN compared to MDS/AML, with a mutation frequency higher in classically mutated genes.²⁰ For example, 5%-10% of *TP53* mutations are found in patients with de novo MDS/AML, whereas we detected 27%-38% of *TP53* mutations in t-MDS/AML patients.⁶ Although *FLT3* mutations occur around 30% of AML patients, there was no patient in our cohort with *FLT3* mutation. The frequency of *NPM1* mutations was also decreased in our cohort (11% vs 30%) supporting distinct molecular architecture in therapy-related patients. Three retrospective studies^{14,15,38} reported a significant activity of AZA in patients with t-MNs with median OS from 10 to 14 months. One prospective study³⁹ confirmed AZA efficacy and showed no difference in response and OS between de novo and t-MDS/t-AML.

(A) **mutational pattern at diagnosis**



(B) **mutational profile evolution under AZA treatment**

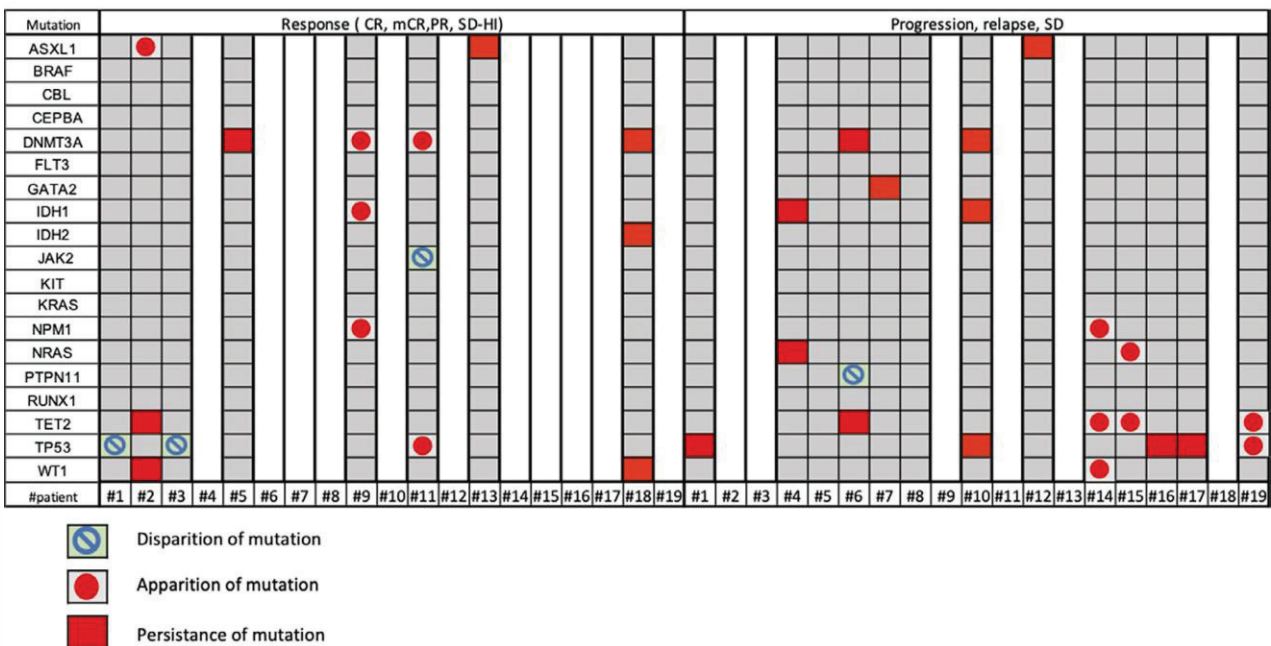


FIGURE 1 Mutational profile selection at diagnosis and under AZA treatment

Regarding mutations in transcription factor, we detected 21% of *TP53*-mutated patients at diagnosis (four out of 19 patients), which was consistent with frequency of *TP53* mutation in t-MN.⁴⁰ *TP53* mutation is often associated with complex karyotype and confers a poor prognosis.¹⁸

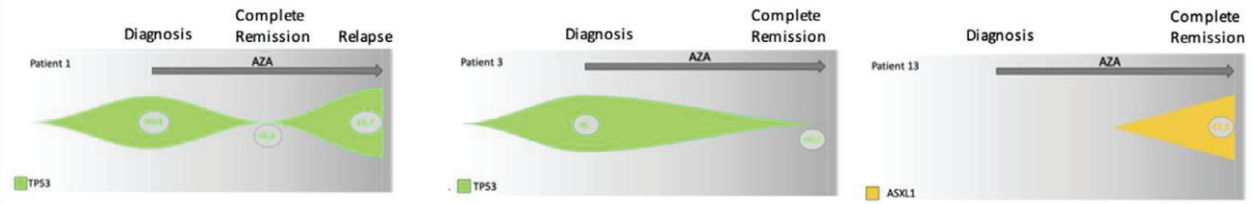
Despite their poor prognosis, *TP53*-mutated clones seemed to respond to AZA, although duration of response was shorter.^{18,35,41} We report here a decrease of *TP53*-mutated clone under AZA

treatment correlated with a short duration of response, consistent with other studies.³⁵

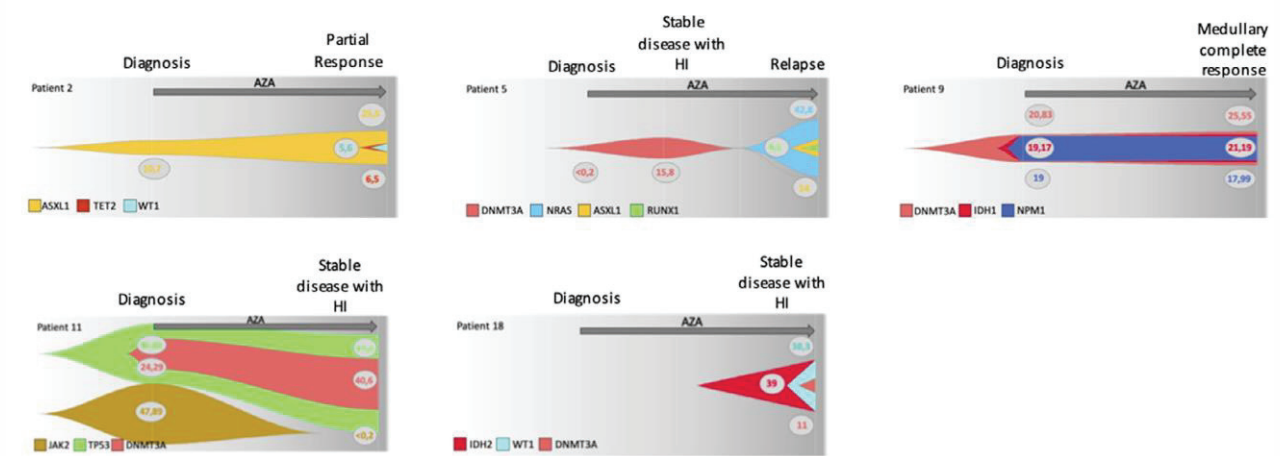
Moreover, emergence of *TP53* mutation or increased of tumor burden during AZA course was associated with progression.

Patients with mutations in genes for DNA methylation regulation such as *TET2* and *DNMT3A* are likely responders to AZA.^{34,42-45} In our study, we did not confirm these results. We thus suggested that other mutations combined with *TET2* and *DNMT3A* could influence

(A) **Clonal selection under AZA treatment patient with CR**



(B) **Clonal selection under AZA treatment patient with non CR response**



(C) **Clonal selection under AZA treatment patient with progression**

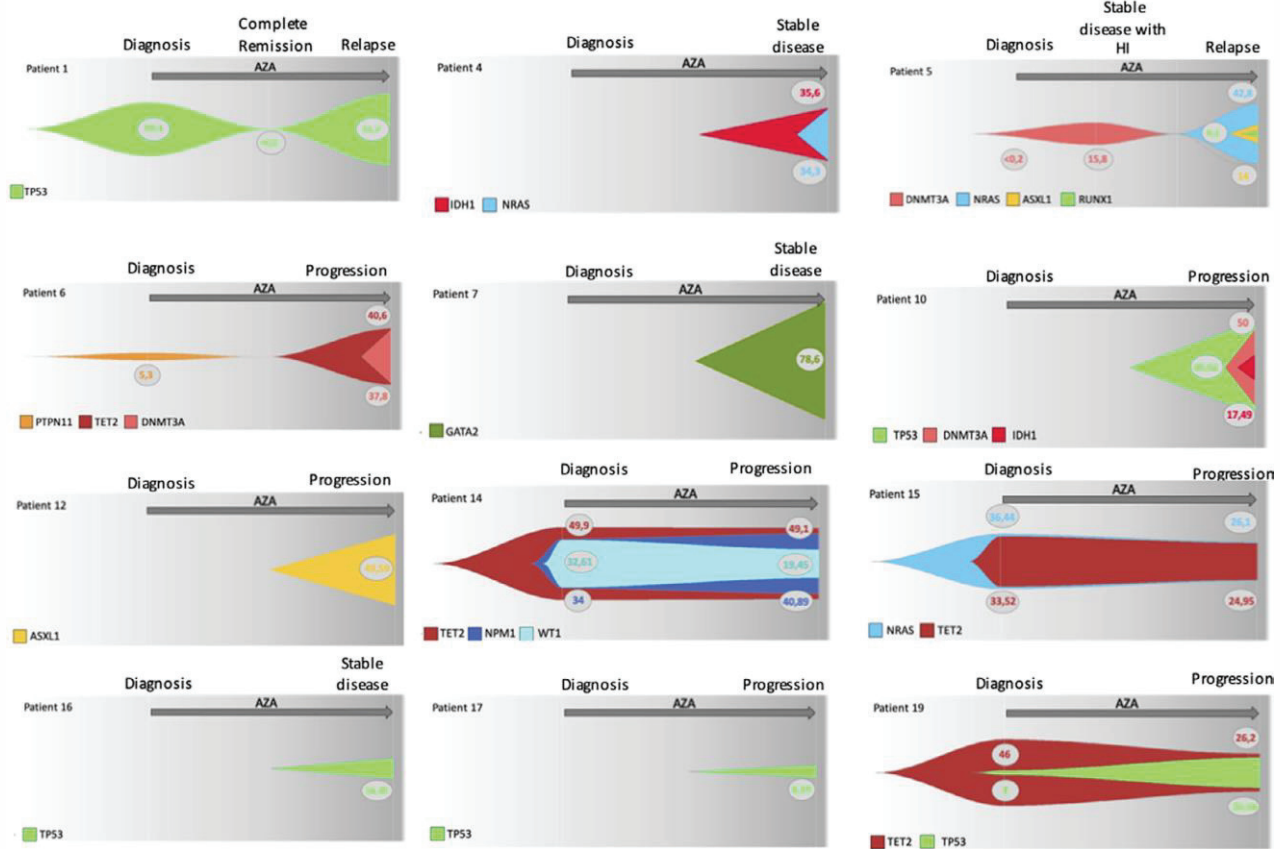


FIGURE 2 Clonal selection under AZA treatment



TABLE 2 Patient characteristics under treatment

Patient	Cycle (number)	NGS mutation At diagnosis (VAF)	Response under AZA	Time to response (mo)	Medullary blastose	Hemoglobin (g/dL)	Neutrophil (/mm ³)	Platelets (/mm ³)	NGS mutation under AZA (VAF)
#1	13	TP53 (39,3)	CR	6	0	13.9	1300	241 000	0
			Progression		25	8.3	1500	20 000	TP53 (51,7)
#2	13	ASXL1 (10,7)	PR	9	8	8.2	1500	220 000	ASXL1 (25,3) TET2 (6,5) WT1 (5,6)
#3	15	TP53 (41)	RC	6	0	12.6	1800	239 000	0
#4	12	0	SD	12	?	<0.5	<1500	<100 000	NRAS(34,3) IDH1 (35,6)
#5	9	0	SD HI	5	14	6.7	900	79 000	DNMT3A (15,8)
			Progression		50	9.1	12 000	442 000	ASXL1 (14) NRAS (42,8) RUNX1 (4,5)
#6	9	PTPN11 (5,3)	progression	6	22	10	200	43 000	DNMT3A (37,8) TET2(40)
#7	3	0	SD	2	62	8.9	1900	15 000	GATA2(78,6)
#8	5	0	Progression	6	18	8.8	290	87 000	0
#9	4	DNMT3A (20) IDH1 (19) NPM1 (19)	mCR	NA	4	9.8	450	26 000	DNMT3A (25,5) IDH1 (21,19)NPM1 (17,89)
#10	10	0	Progression	12	40	9.2	350	41 000	DNMT3A(50) IDH1 (17,49) TP53 (60,62)
#11	3	DNMT3A (24,29) TP53 (46,82) JAK2 (47,89)	SD HI	3	0	8.3	600	47 000	DNMT3A (40,6) TP53(77,24)
#12	15	0	Progression	15	39	8.3	850	92 000	ASXL1 (49,59)
#13	4	0	CR	15	2	8.7	2300	165 000	ASXL1 (47,6)
#14	8	TET2 (49,9) WT1 (32,61) NPM1 (34)	Progression	7	54	7.9	800	35 000	TET2 (49,1) WT1(19,45) NPM1 (40,99)
#15	6	NRAS(36,44) TET2(33,52)	Progression	NA	4	8.5	600	24 000	NRAS(26,1) TET2 (24,95)
#16	1	0	SD	3	1	10	1000	212 000	TP53 (14,40)
#17	4	0	Progression	9	0	8.5	0	8000	TP53 (8,58)
#18	2	0	SD HI	4	70	7.5	700	62 000	DNMT3A (38,3) IDH2(39) WT1(11)
#19	6	TET2(46) TP53 (3)	Progression	4	16	10.2	480	23 000	TET2(26,2) TP53 (20,58)

Abbreviation: NA, not available.



AZA sensitivity of this subgroup of patients. We found mutations persisting under AZA, even during response as shown by Uy et al³⁵. Therefore, we confirmed that AZA is not a selective treatment on specific mutated clones involved in t-AML or t-MDS. In the future, it could be interesting to perform the same study in patients treated by combination like AZA + venetoclax showing promising results and being considered as a standard of care in few countries.⁴⁶

Characterization of genetic landscape in hematological malignancies allowed emergence of targeted therapy with the development of specific inhibitors for IDH 1/2 and FLT3 in AML patients that are now being evaluated in MDS patients as well as in combination with other agents including AZA. Enasidenib and ivosidenib,^{47,48} differentiating agents targeting *IDH2/IDH1* mutations, are approved by the Food and Drug Administration (FDA) for refractory AML mutations. Clinical trials evaluating combination with AZA are ongoing (www.clinicaltrials.gov: NCT03383575/ NCT03173248). Of particular importance, three of our t-MDS/AML patients acquired IDH1/2 mutations on serial assessment. First- and second-generation *FLT3* inhibitors are currently used in combination for AML.⁴⁹ Studies assessing AZA in combination with *FLT3* inhibitors are ongoing in AML/MDS. (www.clinicaltrials.gov: NCT01892371, NCT02752035, and NCT02196857). In our study, no patient exhibited a *FLT3* mutation at baseline or serial assessment, which likely supports the infrequency of this mutation in therapy-related disease.

Finally, APR-246⁵⁰ is a drug reactivating mutant p53 protein by reactivating mutant p53 into wild-type p53 conformation and function and then re-inducing cell death program.

A phase 1b/2 evaluating safety and efficacy of APR-246 in combination with AZA for *TP53* mutant MNs is ongoing (www.clinicaltrials.gov: NCT03072043). Sequential targeted therapy in combination with AZA depending on the clonal architecture of patients could offer additional therapeutic options for patients.

In conclusion, our data confirmed molecular complexity of t-MNs. We observed positive effect of AZA on *TP53* mutation that was correlated with treatment response. Resistance to AZA was frequently accompanied by clonal progression. Molecular profiling before and during AZA treatment could be useful to define which combination of targeted therapies could benefit to patients.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all patients and family including in this study.

CONFLICT OF INTEREST

T.C disclosed consultancy with Celgene, Menarini, Jazz. DAS has research funding from Celgene and Speaker's Bureau/Advisory Board from Celgene and Agios.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

A.C, C.M, and Y.S collected data. A.C, C.M, S.Y, J.M.K, L.G, L.M, B.D, G.R, P.A, D.S, S.R, and T.C edited the manuscript. S.R and T.C designed the study. A.C and T.C wrote the manuscript.

ORCID

Anne Calleja  <https://orcid.org/0000-0003-0714-7921>

REFERENCES

- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405.
- McNerney ME, Godley LA, Le Beau MM. Therapy-related myeloid neoplasms: when genetics and environment collide. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(9):513-527.
- Radivoyevitch T, Sachs RK, Gale RP, et al. Defining AML and MDS second cancer risk dynamics after diagnoses of first cancers treated or not with radiation. *Leukemia*. 2016;30(2):285-294.
- Morton LM, Dores GM, Tucker MA, et al. Evolving risk of therapy-related acute myeloid leukemia following cancer chemotherapy among adults in the United States, 1975-2008. *Blood*. 2013;121(15):2996-3004.
- Zahid MF, Parnes A, Savani BN, Litzow MR, Hashmi SK. Therapy-related myeloid neoplasms - what have we learned so far? *World J Stem Cells*. 2016;8(8):231-242.
- Singhal D, Wee LYA, Kutyna MM, et al. The mutational burden of therapy-related myeloid neoplasms is similar to primary myelodysplastic syndrome but has a distinctive distribution. *Leukemia* [Internet]. 2019 [cited 2019 Aug 7]. 33(12):2842-2853; Available from: <http://www.nature.com/articles/s41375-019-0479-8>
- Ezoe S. Secondary leukemia associated with the anti-cancer agent, etoposide, a topoisomerase II inhibitor. *Int J Environ Res Public Health*. 2012;9(7):2444-2453.
- Smith SM, Le Beau MM, Huo D, et al. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood*. 2003;102(1):43-52.
- Gillis NK, Ball M, Zhang Q, et al. Clonal haemopoiesis and therapy-related myeloid malignancies in elderly patients: a proof-of-concept, case-control study. *Lancet Oncol*. 2017;18(1):112-121.
- Takahashi K, Wang F, Kantarjian H, et al. Preleukaemic clonal haemopoiesis and risk of therapy-related myeloid neoplasms: a case-control study. *Lancet Oncol*. 2017;18(1):100-111.
- Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*. 2009;10(3):223-232.
- Schuh AC, Dohner H, Pleyer L, Seymour JF, Fenaux P, Dombret H. Azacitidine in adult patients with acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol/Hematol*. 2017;116:159-177.
- Klimek VM, Dolezal EK, Tees MT, et al. Efficacy of hypomethylating agents in therapy-related myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2012;36(9):1093-1097.
- Fianchi L, Criscuolo M, Lunghi M, et al. Outcome of therapy-related myeloid neoplasms treated with azacitidine. *Journal Hematol Oncol*. 2012;1(5):44.
- Bally C, Thepot S, Quesnel B, et al. Azacitidine in the treatment of therapy related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia (tMDS/AML): a report on 54 patients by the Groupe Francophone Des Myelodysplasies (GFM). *Leuk Res*. 2013;37(6):637-640.
- Dohner H, Dolnik A, Tang L, et al. Cytogenetics and gene mutations influence survival in older patients with acute myeloid leukemia treated with azacitidine or conventional care. *Leukemia*. 2018;32(12):2546-2557.
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22):3616-3627; quiz 3699.



18. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2496-2506.
19. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209-2221.
20. Shih AH, Chung SS, Dolezal EK, et al. Mutational analysis of therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myelogenous leukemia. *Haematologica*. 2013;98(6):908-912.
21. Ok CY, Patel KP, Garcia-Manero G, et al. Mutational profiling of therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia by next generation sequencing, a comparison with de novo diseases. *Leuk Res*. 2015;39(3):348-354.
22. da Silva-Coelho P, Kroeze LI, Yoshida K, et al. Clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nat Commun*. 2017;21(8):15099.
23. Mossner M, Jann JC, Wittig J, et al. Mutational hierarchies in myelodysplastic syndromes dynamically adapt and evolve upon therapy response and failure. *Blood*. 2016;128(9):1246-1259.
24. Fabiani E, Falconi G, Fianchi L, et al. Clonal evolution in therapy-related neoplasms. *Oncotarget*. 2017;8(7):12031-12040.
25. Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood*. 2006;108(2):419-425.
26. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *JCO*. 2003;21(24):4642-4649.
27. Sallman DA, Komrokji R, Vaupel C, et al. Impact of TP53 mutation variant allele frequency on phenotype and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2016;30(3):666-673.
28. Miller CA, McMichael J, Dang HX, et al. Visualizing tumor evolution with the fishplot package for R. *BMC Genom*. 2016;17(1):880.
29. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454-2465.
30. Welch JS, Petti AA, Miller CA, et al. TP53 and decitabine in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2016;375(21):2023-2036.
31. Polgarova K, Vargova K, Kulvait V, et al. Somatic mutation dynamics in MDS patients treated with azacitidine indicate clonal selection in patients-responders. *Oncotarget*. 2017;8(67):111966-111978.
32. Jacoby MA, Duncavage EJ, Chang GS, et al. Subclones dominate at MDS progression following allogeneic hematopoietic cell transplant. *JCI Insight*. 2018;3(5):98962.
33. Coombs CC, Sallman DA, Devlin SM, et al. Mutational correlates of response to hypomethylating agent therapy in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2016;101(11):e457-e460.
34. Bejar R, Lord A, Stevenson K, et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood*. 2014;124(17):2705-2712.
35. Uy GL, Duncavage EJ, Chang GS, et al. Dynamic changes in the clonal structure of MDS and AML in response to epigenetic therapy. *Leukemia*. 2017;31(4):872-881.
36. Stosch JM, Heumuller A, Niemoller C, et al. Gene mutations and clonal architecture in myelodysplastic syndromes and changes upon progression to acute myeloid leukaemia and under treatment. *Br J Haematol*. 2018;182(6):830-842.
37. Makishima H, Yoshizato T, Yoshida K, et al. Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2017;49(2):204-212.
38. Duong VH, Lancet JE, Alrawi E, et al. Outcome of azacitidine treatment in patients with therapy-related myeloid neoplasms with assessment of prognostic risk stratification models. *Leuk Res*. 2013;37(5):510-515.
39. Prebet T, Sun Z, Ketterling RP, et al. Azacitidine with or without Entinostat for the treatment of therapy-related myeloid neoplasm: further results of the E1905 North American Leukemia Intergroup study. *Br J Haematol*. 2016;172(3):384-391.
40. Ok CY, Patel KP, Garcia-Manero G, et al. TP53 mutation characteristics in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia is similar to de novo diseases. *J Hematol Oncol*. 2015;8(8):45.
41. Takahashi K, Patel K, Bueso-Ramos C, et al. Clinical implications of TP53 mutations in myelodysplastic syndromes treated with hypomethylating agents. *Oncotarget*. 2016;7(12):14172-14187.
42. Kennedy JA, Ebert BL. Clinical implications of genetic mutations in myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):968-974.
43. Lee EJ, Zeidan AM. Genome sequencing in myelodysplastic syndromes: can molecular mutations predict benefit from hypomethylating agent therapy? *Expert Rev Hematol*. 2015;8(2):155-158.
44. Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2011;25(7):1147-1152.
45. Metzeler KH, Walker A, Geyer S, et al. DNMT3A mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012;26(5):1106-1107.
46. DiNardo CD, Pratz K, Pullarkat V, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naïve, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2019;133(1):7-17.
47. Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, et al. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017;130(6):722-731.
48. DiNardo CD. Ivosidenib in IDH1-mutated acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2018;379(12):1186.
49. Garcia JS, Stone RM. The development of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2017;31(4):663-680.
50. Perdrix A, Najem A, Saussez S, et al. PRIMA-1 and PRIMA-1Met (APR-246): from mutant/Wild type p53 reactivation to unexpected mechanisms underlying their potent anti-tumor effect in Combinatorial therapies. *Cancers*. 2017;9(12):172.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Calleja A, Yun S, Moreilhon C, et al. Clonal selection in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia under azacitidine treatment. *Eur J Haematol*. 2020;00:1-11. <https://doi.org/10.1111/ejh.13390>

Supplemental Table 1 : cytogenetics characteristics at diagnosis and under treatment

Patient	Karyotype at diagnosis	Karyotype under AZA treatment	Response under AZA
#1	46,XX,del(3)(q21),del(5)(q13q33),der(5)t(5;7)(q215;q11),del(7)(q11),der(12)t(3;12)(q21;q721),der(19)t(7;19)(p27;q13),der(19)t(3;19)(p19;q11)	NA	CR / progression
#2	46,XX,del(7)(q11q33)[16]/46,XX[4]	NA	PR
#3	45,XX-3,der(5)t(3;5)(q11;q11)[1]/47,sil,idem+8,-22[6]/48,sil,idem,+8,-21,+22[2]/49,sil,idem+der(5)+8,-21,+22[6]/48s4,der(5)t(3;5)(q11;q11)+8,-21,+22+mar[4]/46,XX[1]	49,XX-3 der(5)t(3;5)(q11;q11)+8,-21,+22+mar[4]/46,XX[1]	RC
#4	48,XX,-t(21)(q10),t(21)(q10)[17]/46,XX[4]	NA	SD
#5	46,XX,del(7)(q21,q35)[11] / 46,idem,del(5)(q31,q35)[10]	46,XX,del(7)(q22,q36)[3] / 46,idem,t(11;11)(p15;q272)[17]	SD HI
#6	46,XY,del(20)(q7)[20]	NA	progression
#7	46,XX,t(11;19)(q23;p13)[19]/46,XX[1]	NA	SD
#8	44-47,XX,add(3)(p11),-5,+5,-17,-18,-19,+19,+r,+3-5mar[cp13]/46,XX[7]	46-48,XX,-5,+11,-17,- 18,add(19)(p13.3)x2,+add(19)(p13.1),+22,+1-2mar[cp14]/46,XX[6]	Progression
#9	46,XX[20]	46,XX,inv(1)(p13q21)[18]/46,XX[2]	mCR
#10	45,XX,add(1)(p13),del(5)(q13q33)-7,der(15;17)(q10;q10)-20,+2mar[cp20]	44-46,XX,t(1;20)(p13;q11.2),del(5)(q13q33)-7,der(15;17)(q10;q10),+1-2mar[cp13]/46,XX[7]	Progression
#11	44-46,XY,del(5)(q13q33);t(6;11)(q21;q14),-7,-20,del(20)(q11.2q13.3),+1-2,mar[CP18]/46,XY[2]	45,XY,-5,-6,del(11)(q23),+mar[cp5]	SD HI
#12	46,XY,inv(3)(q21q26)[13]/46,XY[7]	46,XY,inv(3)(q21q26)[4]/45,idem,-7[1]/45,idem,-7,t(9;22)(q34;q11.2)[15]	Progression
#13	47,XY,+8[4]/45,XY,-11[1]	46,XX[20]	CR
#14	46,XX[20]	46,XY[20]	Progression
#15	46,XX[20]	46,XY[20]	Progression
#16	46,XX,del(5)(q15q13)[7]/44-45,del(3)(p21p25),-5,der(7;22)(p10;q10),add(8)(q24),der(12;17)(q10;q10),+1-3mar[cp7]/46,XX[6]	46,XX,del(5)(q15q13)[7]/44-45,del(3)(p21p25),-5,der(7;22)(p10;q10),add(8)(q24),der(12;17)(q10;q10),+1-3mar[cp7]/46,XX[6]	SD
#17	45,X-7[9]/46,XX[11]	45,XX,-7[18]/46,XX[2]	Progression
#18	46,XX[20]	46,XX,del(7)(q22)[6]/46,XX[14]	SD HI
#19	45-47,XY,-5,+9,add(9)(q22),-11,add(11)(p11.2),+15,add(17)(p13),-18,de(922)(q13),+1-2mar[cp19]/46,XY[1]	46,XX[20]	Progression

Cytogenetic classification (R-IPSS) :

-Very good: -Y, del(11q);

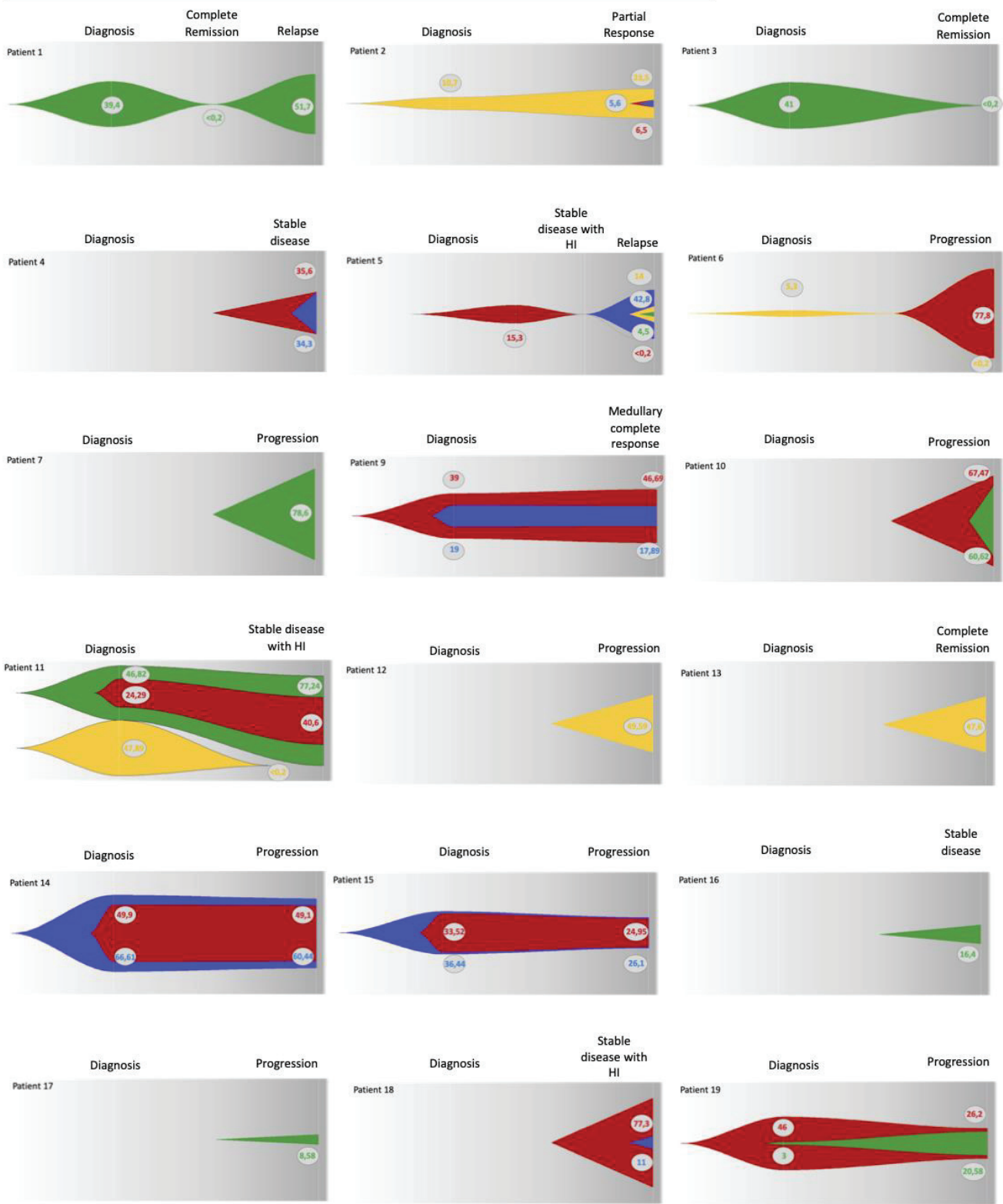
-Good : Normal, del(5q), del(12p), del(20q), double including del(5q)

-Intermediate:del(7q), +8, +19, i(17q), any other single or double independent clones

-Poor :7, inv(3)/t(3q)/del(3q), double including -7/del(7q), Complex: 3 abnormalities

-Very poor: Complex: >3 abnormalities

Supplemental Figure 1: Clonal evolution and function of mutated clone under AZA treatment patient 1 to 19



Abstract

Introduction: Therapy related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia (t-MDS/AML) are defined as complications of previous cytotoxic therapy. Azacitidine (AZA), a hypomethylating agent, has showed activity in t-MDS/AML.

Objectives: We evaluated the clonal dynamics of AZA treated t-MDS/AML.

Methods: We collected bone marrow samples, at diagnosis and during treatment, from AZA-treated t-MDS/AML patients. NGS on 19 myeloid genes was performed and candidate mutations with a variant allele frequency >5 % were selected.

Results: 7 t-AML and 12 t-MDS were included with median age of 71 (56-82) years old, median number of AZA cycles of 6 (1-15) and median overall survival (OS) of 14 (3-29) months. We observed correlation between AZA response and clonal selection. Decrease of *TP53* mutated clone was correlated with response to AZA, confirming AZA efficacy in this subgroup. In some patients, emergence of mutations was correlated with progression or relapse without impact on OS. Clones with mutations in genes for DNA methylation regulation frequently occurred with other mutations and remained stable during AZA treatment, independent of AZA response.

Conclusion: We confirmed the molecular complexity of t-MNs and that the follow-up of clonal selection during AZA treatment could be useful to define treatment combination.