



HAL
open science

Etude des altérations génomiques des leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte : vers une approche thérapeutique personnalisée ?

Laurène Fenwarth

► To cite this version:

Laurène Fenwarth. Etude des altérations génomiques des leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte : vers une approche thérapeutique personnalisée ?. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUS004 . tel-03461299

HAL Id: tel-03461299

<https://theses.hal.science/tel-03461299>

Submitted on 1 Dec 2021

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 LILLE

École Doctorale Biologie Santé De Lille

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

Discipline : Hématologie

Laurène Fenwarth

**ETUDE DES ALTERATIONS GÉNOMIQUES DES LEUCÉMIES AIGUËS MYÉLOÏDES
DE L'ADULTE : VERS UNE APPROCHE THÉRAPEUTIQUE PERSONNALISÉE ?**

Présentée et soutenue publiquement le 25 Janvier 2021 devant le jury composé de :

**Professeur Bruno QUESNEL
Docteur Emmanuelle CLAPPIER
Professeur Gérard MICHEL
Professeur Mathilde HUNAULT-BERGER
Professeur Claude PREUDHOMME**

**Président
Rapporteure
Rapporteur
Examinatrice
Directeur de thèse**

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt porté à ce travail.

Je remercie le Professeur Bruno Quesnel de me faire l'honneur de présider le jury.

Je remercie le Docteur Emmanuelle Clappier et le Professeur Gérard Michel d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse.

Je remercie le Professeur Mathilde Hunault d'avoir accepté d'être examinatrice de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Claude Preudhomme pour avoir dirigé cette thèse. Merci pour la confiance que vous m'accordez à travers la réalisation des projets passés et en cours et pour votre soutien dans mon parcours atypique... Soyez assuré de toute ma reconnaissance.

Je tiens à remercier le Professeur Raphaël Itzykson pour sa précieuse aide dans ce travail.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des biologistes et cliniciens du groupe ALFA pour leur collaboration dans l'étude ALFA-0702. Je remercie l'ensemble des patients qui ont participé à cet essai.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Nicolas et Alice, qui m'ont partagé leur intérêt pour l'Hématologie et m'ont tant appris dans cette discipline. Un grand merci à Elise de m'avoir transmis sa passion pour la MRD dans les LAM !

J'adresse mes remerciements à mes collègues biologistes du Laboratoire d'Hématologie : Gauthier et Coralie.

A mes collègues ingénieurs, Sandrine, Maxime et Nathalie, sans qui ce travail n'aurait été possible.

J'adresse mes profonds remerciements à ma famille pour leur soutien indéfectible depuis toutes ces années. Ce travail met enfin un terme à ces quelques années d'études !....

Enfin, je ne peux oublier de remercier mes amis, et tout particulièrement Amélie, Aude, Violaine et François pour leur présence et tous ces bons moments passés ensemble !

AVANT PROPOS

Ce travail s'articule autour de l'analyse des altérations génomiques en single nucleotide polymorphism array (SNP-array) et des mutations par séquençage haut débit dans les leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte jeune à partir de la cohorte de patients inclus dans le protocole ALFA-0702.

Les analyses réalisées au cours de ce travail ont donné lieu à différentes publications en premier auteur ou co-premier auteur :

- **Fenwarth L**, Duployez N, Thomas X, Boissel N, Geffroy S, Marceau-Renaut A, et al. Clofarabine Improves Relapse-Free Survival of Acute Myeloid Leukemia in Younger Adults with Micro-Complex Karyotype. *Cancers*. 30 déc 2019;12(1).

- **Fenwarth L**, Thomas X, de Botton S, Duployez N, Bourhis JH, Lesieur A, et al. A Personalized Approach to Guide Allogeneic Stem Cell Transplantation in Younger Adults with Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. [Epub ahead of print].

- **Fenwarth L**, Fournier E, Cheok M, Boyer T, Gonzales F, Castaigne S, et al. Biomarkers of Gemtuzumab Ozogamicin Response for Acute Myeloid Leukemia Treatment. *Int J Mol Sci*. 6 août 2020;21(16).

- Ducourneau B*, **Fenwarth L***, Duployez N, Lambert J, Struski S, Luquet I, et al. Cytogenetically masked CBFβ-MYH11 fusion and concomitant TP53 deletion in a case of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Leuk Lymphoma*. 2020;61(7):1772-4.

Ce projet de thèse a fait l'objet de communications scientifiques orales au cours de différents congrès :

- « Clofarabine-Based Consolidation Improves Relapse-Free Survival of Patients with Acute Myeloid Leukemia with Complex or Micro-Complex Karyotype: Results from the Randomized CLARA Study (ALFA-0702 trial) », **Fenwarth L**, Duployez N., Thomas X., Boissel N., Geffroy S., Marceau-Renaut A., Caillot D., Raffoux E., Lemasle E., Marolleau J.-P., Berthon C., Cheok M. H., Peyrouze P., Pigneux A., Vey N., Celli-Lebras K., Terré C., Preudhomme C., Dombret H., présenté lors du congrès de l'ASH en 2017, de la SFH en 2018 et de la BHS en 2019,

- « Etude du profil moléculaire des LAM de l'adulte jeune : Vers une approche thérapeutique personnalisée ? Résultats de l'étude ALFA-0702 », **Fenwarth L**, Itzykson R., Duployez N., Berthon C., Sujobert P., Celli-Lebras K., Marceau-Renaut A., Pigneux A., De Botton S., Chantepie S., Vey N., Raffoux E., Caillot D., Turlure P., Lemasle E., Pautas C., Chevret S., Thomas X., Dombret H., Preudhomme C., présenté lors du congrès de la SFH en 2019.

La publication des résultats de l'analyse en SNP-array des patients randomisés dans l'étude ALFA-0702 a donné lieu à la mise en place d'une collaboration avec l'équipe de Nikolas Herold (Stockholm, Suède).

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	6
LISTE DES ABREVIATIONS.....	7
LISTE DE ABREVIATIONS DES GENES.....	8
INTRODUCTION.....	10
A. GENERALITES.....	10
B. DIAGNOSTIC.....	11
1. Diagnostic clinique.....	11
2. Diagnostic biologique	11
a. Cytologie.....	11
b. Immunophénotypage	12
c. Cytogénétique	12
d. Biologie moléculaire	14
C. LEUCEMOGENESE DES LAM.....	25
D. CLASSIFICATION OMS 2016.....	28
E. FACTEURS PRONOSTIQUES	30
1. Facteurs pré-thérapeutiques.....	30
a. Liés au patient	30
b. Liés aux altérations cytogénétiques et moléculaires	31
2. Facteurs post-thérapeutiques : le suivi de la maladie résiduelle	32
F. PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DES LAM DE L'ADULTE JEUNE.....	34
a. Traitement conventionnel.....	34
* Traitement d'induction	34
* Traitement post-rémission	34
b. Place des nouveaux agents dans le traitement des LAM	35
* Inhibiteurs de FLT3.....	36
* Inhibiteurs d'IDH.....	38
* Inhibiteurs de KIT	39
* Inhibiteurs de la voie RAS	40
* Inhibiteurs de TP53	40
* Inhibiteurs de MDM2.....	41
* Inhibiteurs de BCL2	41
* Gemtuzumab ozogamicine	43
* Inhibiteurs de checkpoints.....	43
* Inhibiteur de la voie sonic hedgehog.....	44
G. PROTOCOLE ALFA-0702	44
H. VERS UNE APPROCHE THERAPEUTIQUE PERSONNALISEE ?.....	46
1. Identification de nouveaux biomarqueurs moléculaires pronostiques	46

2. Vers une approche « banque de connaissance »	47
OBJECTIFS	50
RESULTATS.....	51
A. INTERET DE LA CLOFARABINE SUR LA SURVIE SANS RECHUTE DANS LES LAM DE L'ADULTE JEUNE AVEC CARYOTYPE MICRO-COMPLEXE.....	51
B. VERS UNE APPROCHE PERSONNALISEE POUR GUIDER L'ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES DES LAM DE L'ADULTE JEUNE	61
C. ÉTUDE DES BIOMARQUEURS PREDICTIFS DE LA REPOSE AU GEMTUZUMAB OZOGAMICINE DANS LE TRAITEMENT DES LAM	90
CONCLUSION.....	130
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	133

TABLE DES ILLUSTRATIONS

A. Figures

Figure 1 : Taux d'incidence des LAM selon la classe d'âge et le sexe en France en 2018, d'après les données du réseau Francim (Le Guyader-Peyrou et al. 2019).....	10
Figure 2 : Impact pronostique des réarrangements chromosomiques récurrents dans les LAM, d'après Grimwade et al. (Grimwade et al. 2010).....	13
Figure 3 : Classification fonctionnelle des gènes impliqués dans la leucémogénèse des LAM, d'après Döhner et al. (Döhner et al. 2015)	14
Figure 4: Rôle des mutations d'IDH et IDH2 dans les cancers (Medeiros et al. 2017)	21
Figure 5 : Modèles de hiérarchies clonales dans les LAM (Martignoles et al. 2018)	27
Figure 6 : Impact pronostique de l'âge dans les LAM des patients diagnostiqués entre 2000 et 2016, d'après le registre américain SEER (<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i> , www.seer.cancer.gov)	30
Figure 7 : Seuils de détection pour l'évaluation de la maladie résiduelle selon les approches utilisées....	32
Figure 8 : Mécanismes d'action des inhibiteurs de FLT3, d'après Daver et al. (Daver et al. 2019b)	37
Figure 9 : Design de l'étude ALFA-0702.....	45
Figure 10: Stratification pronostique selon la classification de Papaemmanuil (Papaemmanuil et al. 2016)	47
Figure 11: Approche « banque de connaissance ».....	48

B. Tableaux

Tableau 1: Classification FAB des LAM.....	12
Tableau 2: Classification OMS 2016 des LAM	29
Tableau 3 : Classification pronostique de l'ELN 2017 d'après Döhner et al. (Döhner et al. 2017)	31
Tableau 4 : Traitements ciblés des LAM approuvés par l'agence américaine du médicament	36

LISTE DES ABREVIATIONS

5-hmc	5-hydroxyméthylcytosine
5-mc	5-méthylcytosine
ADC	<i>Antibody-drug conjugate</i>
CBF	<i>Core binding factor</i>
CHIP	<i>Clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i>
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée
CMF	Cytométrie en Flux
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
ddPCR	<i>Droplet digital polymerase chain reaction</i>
DfN	<i>Different from Normal</i>
DTA	<i>Dnmt3a, tet2, asx1</i>
EFS	<i>Event-free survival</i>
ELN	<i>European leukemianet</i>
FAB	Franco américain britannique
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FISH	Hybridation In Situ en Fluorescence
<i>FLT3-ITD</i>	<i>FLT3-internal tandem duplication</i>
<i>FLT3-TKD</i>	<i>FLT3-tyrosine kinase domain</i>
GO	Gemtuzumab ozogamicine
H2AK119	Lysine 119 de l'histone H2A
H3K27	Lysine 27 de l'histone H3
H3K4	Lysine 4 de l'histone H3
HMA	Hypomethylating agent
HR	Hazard ratio
HSCT	<i>Hematopoietic stem cell transplantation</i>
LAIP	<i>Leukemia associated immunophenotypes</i>
LAL	Leucémie aiguë lymphoblastique
LAM	Leucémie aiguë myéloïde
LAP	Leucémie aiguë promyélocytaire
LDAC	<i>Low dose cytarabine</i>
MRD	<i>Minimal residual disease</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OS	<i>Overall survival</i>
PRIMA-1	<i>p53 Re-activation and Induction of Massive Apoptosis</i>
R-2-HG	R-2-hydroxyglutarate
RC	Rémission complète
RCp	Rémission complète sans récupération plaquettaire
RCh	RC avec récupération hématologique partielle
RFS	<i>Relapse-free survival</i>
RHD	<i>Runt homology domain</i>
RT-qPCR	<i>Real-time quantitative polymerase chain reaction</i>
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
SNP-array	<i>Single-Nucleotide Polymorphism array</i>
TRM	<i>Treatment-related Mortality</i>

LISTE DE ABREVIATIONS DES GENES

Symbole	Nom du gène	Localisation chromosomique
<i>ASXL1</i>	ASXL transcriptional regulator 1	20q11.21
<i>BAK</i>	BCL2 antagonist/killer	6p21.31
<i>BAX</i>	BCL2 associated X, apoptosis regulator	19q13.33
<i>BCL2</i>	BCL2 apoptosis regulator	18q21.33
<i>BCOR</i>	BCL6 corepressor	Xp11.4
<i>BRAF</i>	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase	7q34
<i>CALR</i>	calreticulin	19p13.13
<i>CBL</i>	Cbl proto-oncogene	11q23.3
<i>CEBPA</i>	CCAAT enhancer binding protein alpha	19q13.11
<i>CSF3R</i>	colony stimulating factor 3 receptor	1p34.3
<i>DEK</i>	DEK proto-oncogene	6p22.3
<i>DNMT3A</i>	DNA methyltransferase 3 alpha	2p23.3
<i>ETV6</i>	ETS variant transcription factor 6	12p13.2
<i>EZH2</i>	enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit	7q36.1
<i>FLT3</i>	fms related receptor tyrosine kinase 3	13q12.2
<i>GATA1</i>	GATA binding protein 1	Xp11.23
<i>GATA2</i>	GATA binding protein 2	3q21.3
<i>IDH1</i>	isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1	2q34
<i>IDH2</i>	isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2	15q26.1
<i>JAK2</i>	Janus kinase 2	9p24.1
<i>KIT</i>	KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	4q12
<i>KMT2A</i>	lysine methyltransferase 2A	11q23.3
<i>KRAS</i>	KRAS proto-oncogene, GTPase	12p12.1
<i>MCL1</i>	MCL1 apoptosis regulator, BCL2 family member	1q21.2
<i>MDM2</i>	MDM2 proto-oncogene	12q15
<i>MLLT3</i>	MLLT3 super elongation complex subunit	9p21.3
<i>MPL</i>	MPL proto-oncogene, thrombopoietin receptor	1p34.2
<i>NIPBL</i>	NIPBL cohesin loading factor	5p13.2
<i>NPM1</i>	nucleophosmin 1	5q35.1
<i>NRAS</i>	NRAS proto-oncogene, GTPase	1p13.2
<i>NUP214</i>	nucleoporin 214	9q34.13
<i>PHF6</i>	PHD finger protein 6	Xq26.2
<i>PI3K</i>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase	3q26.32
<i>PTEN</i>	phosphatase and tensin homolog	10q23.31
<i>PTPN11</i>	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11	12q24.13
<i>RAD21</i>	RAD21 cohesin complex component	8q24.11
<i>RUNX1</i>	RUNX family transcription factor 1	21q22.12
<i>SETBP1</i>	SET binding protein 1	18q12.3
<i>SF3B1</i>	splicing factor 3b subunit 1	2q33.1

Symbole	Nom du gène	Localisation chromosomique
<i>SMC1A</i>	structural maintenance of chromosomes 1A	Xp11.22
<i>SMC3</i>	structural maintenance of chromosomes 3	10q25.2
<i>SRSF2</i>	serine and arginine rich splicing factor 2	17q25.2
<i>STAG2</i>	stromal antigen 2	Xq25
<i>TET2</i>	tet methylcytosine dioxygenase 2	4q24
<i>TP53</i>	tumor protein p53	17p13.1
<i>U2AF1</i>	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1	21q22.3
<i>WT1</i>	WT1 transcription factor	11p13
<i>ZRSR2</i>	zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2	Xp22.2

INTRODUCTION

A. Généralités

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) représentent un groupe hétérogène d'hémopathies malignes, résultant d'une prolifération clonale de progéniteurs myéloïdes bloqués à un stade plus ou moins avancé de la différenciation et appelés blastes. Ces blastes altèrent l'hématopoïèse normale et conduisent à une insuffisance de production médullaire.

Les LAM surviennent généralement de novo, mais peuvent également être secondaires à un traitement préalable (chimiothérapie, radiothérapie) ou à l'évolution clonale d'un syndrome myélodysplasique ou d'un syndrome myéloprolifératif. Plus rarement, les LAM peuvent survenir dans un contexte de syndrome de prédisposition.

Les LAM constituent une affection rare avec 3428 nouveaux cas en France en 2018, correspondant à un taux d'incidence standardisé monde de 3,1/100 000 personnes-années chez l'homme et 2,3/100 000 personnes-années chez la femme (Le Guyader-Peyrou et al. 2019). Le sexe ratio est de 1,3. L'incidence des LAM est faible avant 40 ans puis augmente significativement avec l'âge, avec un âge médian au diagnostic de 69 ans chez l'homme et de 72 ans chez la femme (Le Guyader-Peyrou et al. 2019).

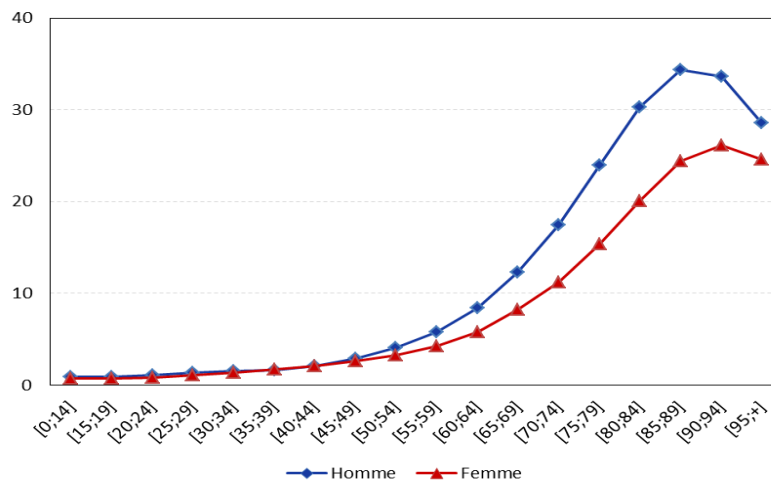


Figure 1 : Taux d'incidence des LAM selon la classe d'âge et le sexe en France en 2018, d'après les données du réseau Francim (Le Guyader-Peyrou et al. 2019)

B. Diagnostic

1.Diagnostic clinique

La présentation clinique des LAM est aspécifique, polymorphe et variable d'un individu à l'autre. Elle est le reflet de l'insuffisance médullaire et de l'infiltration tumorale.

L'insuffisance médullaire se traduit, en fonction du degré des cytopénies, par un syndrome anémique, un syndrome infectieux (fièvre, infections) en rapport avec la neutropénie, et un syndrome hémorragique cutané et/ou muqueux en rapport avec la thrombopénie et/ou avec une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) associée. La CIVD est plus fréquemment associée à la leucémie aiguë promyélocytaire (LAP).

Le syndrome tumoral, moins fréquent que dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), est varié et peut orienter vers un sous-type de LAM. Les signes de syndrome tumoral sont les suivants :

- le syndrome de leucostase, témoignant d'une hyperleucocytose majeure, plus volontiers retrouvé dans les leucémies aiguës à composante monocytaire (LAM 4 et LAM 5 selon la classification Franco Américano Britannique (FAB)).

- les sarcomes myéloïdes (également appelés chloromes), plus fréquemment associés à une LAM 2 selon la classification FAB ;

- les atteintes cutané-muqueuses (hypertrophie gingivale et leukemia cutis) sont plutôt évocatrices d'une LAM monoblastique (LAM 5 selon la classification FAB) ;

- la splénomégalie, l'hépatomégalie, les adénopathies et les douleurs osseuses.

2.Diagnostic biologique

a.Cytologie

Le diagnostic de LAM repose sur la présence d'au moins 20% de blastes sur frottis sanguin périphérique ou médullaire, à l'exception des LAM à core-binding factor (CBF) et des LAP pour lesquelles la présence de l'anomalie cytogénétique (inv(16)/t(16 ;16), t(8 ;21) ou t(15 ;17)) suffit

à poser le diagnostic. La classification morphologique des LAM repose sur le phénotype des blastes au microscope (indifférencié, myéloïde, monoblastique, érythroblastique ou mégacaryoblastique) définissant les différents sous-groupes dans la classification FAB décrite ci-après (Bennett et al. 1976, 1985).

Tableau 1: Classification FAB des LAM

Sous-type FAB de LAM	Description
LAM 0	Indifférenciée
LAM 1	Myéloblastique sans différenciation
LAM 2	Myéloblastique avec différenciation
LAM 3	Promyélocytaire
LAM 4	Myélomonocytaire
LAM 4 Eo	Myélomonocytaire avec éosinophilie
LAM 5a	Monoblastique sans différenciation
LAM 5b	Monoblastique avec différenciation
LAM 6	Erythroblastique
LAM 7	Mégacaryoblastique

b. Immunophénotypage

La cytométrie en flux (CMF) permet de déterminer les antigènes présents à la surface des blastes et ainsi de caractériser le type de leucémie aiguë (myéloïde ou lymphoblastique).

Les marqueurs antigéniques utiles au diagnostic de LAM sont : les marqueurs d’immaturité (CD34, CD117, CD33, CD13, HLA-DR), de la lignée granulocytaire (CD65 et MPO intracytoplasmique), de la lignée monocytaire (CD14, CD36, CD64), de la lignée mégacaryocytaire (CD41, CD61) et enfin de la lignée érythroïde (CD235a, CD36) (Béné et al. 2011; Döhner et al. 2017).

c. Cytogénétique

La cytogénétique conventionnelle permet de détecter les réarrangements chromosomiques numériques ainsi que les translocations et les inversions. Les altérations cytogénétiques, événements généralement précoces dans la leucémogénèse des LAM, sont particulièrement fréquentes chez l’enfant (70-80%) (Creutzig et al. 2012) tandis que près de la moitié des LAM de l’adulte ont un caryotype normal (Grimwade et al. 2010).

Les réarrangements cytogénétiques les plus fréquents définissent le groupe des LAM avec altérations génétiques récurrentes dans la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) révisée en 2016 (Arber et al. 2016).

Certaines altérations cytogénétiques récurrentes sont associées à un pronostic spécifique et sont intégrées dans la classification pronostique actuelle des LAM de l'European LeukemiaNetwork (ELN) révisée en 2017 (Figure 2) (Grimwade et al. 2010; Döhner et al. 2017). Ainsi, les LAM CBF ($t(8;21)(q22;q22.1)$, $RUNX1-RUNX1T1$; $inv(16)(p13.1q22)$ ou $t(16;16)(p13.1;q22)$, $CBFB-MYH11$) et les LAP ($t(15;17)(q22;q21)$, $PML-RARA$) confèrent un pronostic favorable, tandis que les LAM avec $t(9;11)(p21.3;q23.3)$, $MLLT3-KMT2A$ sont associées à un pronostic intermédiaire. A l'inverse, d'autres altérations cytogénétiques telles que les $t(6;9)(p23;q34.1)$, $DEK-NUP214$, $inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2)$, $GATA2-MECOM$, les monosomies 5 ou 7, les délétions 5q/7q/17p, et les caryotypes complexes ou monosomaux confèrent un pronostic défavorable.

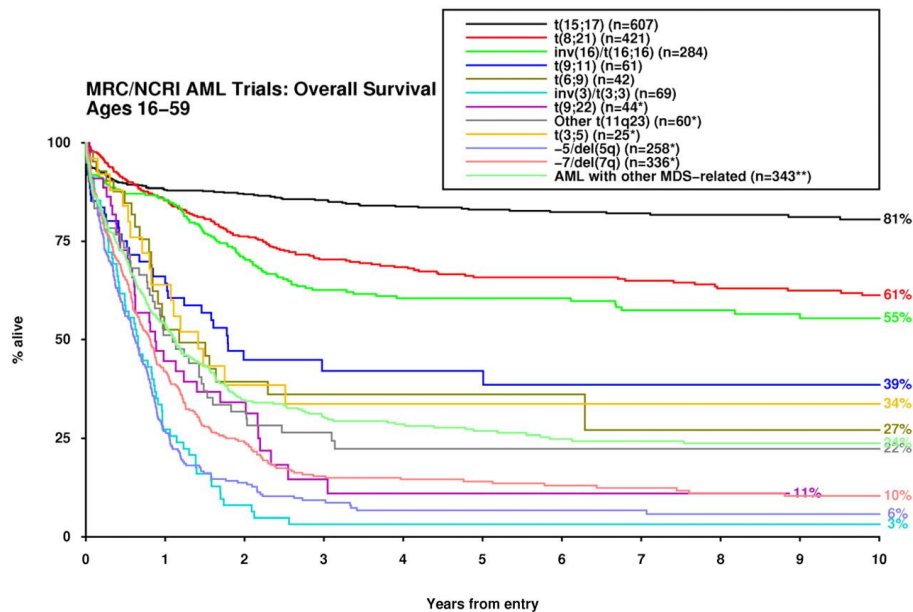


Figure 2 : Impact pronostique des réarrangements chromosomiques récurrents dans les LAM, d'après Grimwade et al. (Grimwade et al. 2010)

L'hybridation in situ en fluorescence (FISH) permet l'identification de certains réarrangements complexes ou non vus en cytogénétique conventionnelle (translocation cryptique ou perte de matériel chromosomique, par exemple).

d. Biologie moléculaire

Outre les réarrangements chromosomiques, des délétions, amplifications ou mutations ponctuelles sont identifiées dans les LAM, et confèrent un avantage sur la différenciation, la prolifération ou la survie cellulaire du clone leucémique.

On distingue 8 classes fonctionnelles de mutations détaillées ci-après Figure 3 (Döhner et al. 2015).

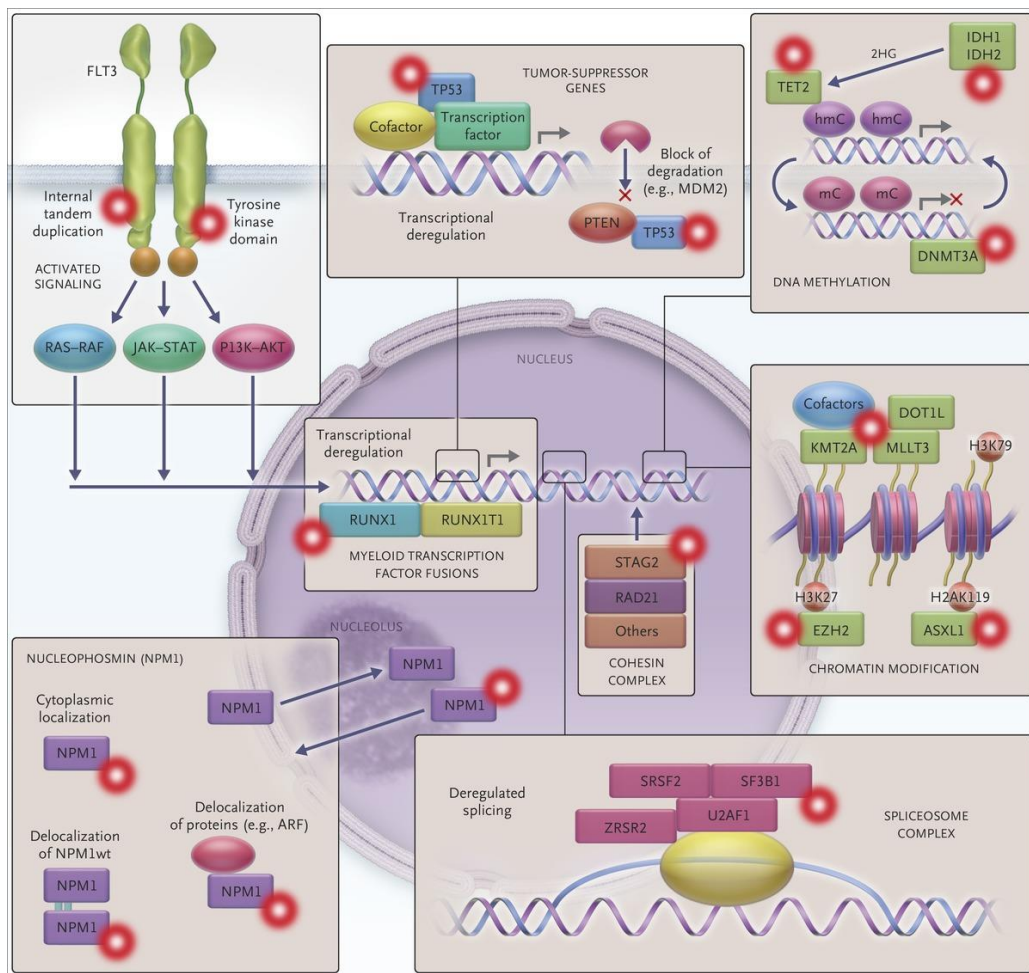


Figure 3 : Classification fonctionnelle des gènes impliqués dans la leucémogénèse des LAM, d'après Döhner et al. (Döhner et al. 2015)

NPM1 (~33%)

Le gène *NPM1* (*Nucléophosmine 1*), situé en 5q35.1, représente le gène le plus souvent muté dans les LAM (~33%). *NPM1* code pour une protéine chaperonne nucléaire essentiellement impliquée dans la biogénèse du ribosome, le contrôle de la stabilité génomique, la réponse au stress dépendante de *TP53*, et la modulation des voies de suppression de la croissance par interaction avec Arf (Heath et al. 2017).

Les mutations de *NPM1* sont particulièrement fréquentes dans les LAM avec caryotype normal (50%), et sont souvent associées aux duplications en tandem du gène *FLT3* (*FLT3-Internal Tandem Duplication, FLT3-ITD*), aux mutations *DNMT3A*, *IDH1/2*, et *TET2* (Döhner et al. 2015).

Le pronostic des mutations de *NPM1* dépend de la présence des mutations *FLT3-ITD*. Chez les patients avec caryotype normal, il a été initialement montré que les mutations de *NPM1* étaient associées à un pronostic favorable en l'absence de mutation de *FLT3-ITD* (Döhner et al. 2005; Falini et al. 2005; Schnittger et al. 2005). Plus récemment, il a été observé que les patients présentant une mutation de *NPM1* associée à une mutation *FLT3-ITD* avec ratio allélique faible (<0,5) avaient un pronostic similaire à ceux sans mutation *FLT3-ITD* associée (Gale et al. 2008; Pratcorona et al. 2013). Ainsi, la classification ELN 2017 intègre les mutations de *NPM1* sans mutation *FLT3-ITD* ou associées à une mutation *FLT3-ITD* avec un ratio allélique faible (<0,5) dans le groupe de risque favorable, et les mutations de *NPM1* associées à des mutations *FLT3-ITD* avec un ratio allélique élevé ($\geq 0,5$) dans le groupe de risque intermédiaire (Döhner et al. 2017). Néanmoins, dans cette classification, l'impact pronostique du statut mutationnel *NPM1/FLT3-ITD* ne prend pas en compte la présence éventuelle d'altérations cytogénétiques associées. Une large étude rétrospective internationale a été réalisée à partir de 2426 patients avec mutation de *NPM1* sans mutation *FLT3-ITD* ou associée à une mutation *FLT3-ITD* avec ratio allélique faible (Angenendt et al. 2019). Au sein de cette cohorte, 17,6% des patients avaient un caryotype anormal (caryotype intermédiaire : 13,6% et caryotype défavorable : 3,4%), et la présence d'un caryotype défavorable était associée à une survie globale (*Overall Survival, OS*) et une survie sans événement (*Event-Free Survival, EFS*) significativement diminuées. Ainsi, l'impact pronostique des mutations de *NPM1* semble dépendre non seulement des mutations

FLT3-ITD mais également des altérations cytogénétiques associées.

Gènes impliqués dans les voies de signalisation (~60%)

Les mutations de gènes impliqués dans les voies de signalisation tels que *FLT3*, *KIT*, *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *JAK2*, représentent la classe fonctionnelle la plus fréquemment mutée dans la LAM. Ces mutations activent de façon constitutive les voies de signalisation telles que la voie PI3K-AKT et confèrent un avantage prolifératif, induisant ainsi la survie cellulaire des clones leucémiques.

FLT3 (~35%)

Le gène *FLT3* (*Fms-like Tyrosine Kinase 3*), localisé au niveau du bras long du chromosome 13 (13q12.2), code pour un récepteur à activité tyrosine kinase de classe III. Au cours de l'hématopoïèse normale, l'expression du gène *FLT3* est restreinte aux progéniteurs immatures, incluant les cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34+. La liaison du ligand au récepteur *FLT3* entraîne son homodimérisation et l'activation des voies de signalisation RAS/RAF/MEK et PI3K/AKT en aval (Gilliland and Griffin 2002).

Les mutations de type *FLT3*-ITD, ou ponctuelles dans le domaine d'activation tyrosine kinase (*tyrosine kinase domain*, *FLT3*-TKD) sont identifiées dans environ 20-30% et 5-10% des cas respectivement, et entraînent une activation constitutive des voies de signalisation PI3K et RAS (Gilliland and Griffin 2002).

Les mutations *FLT3*-ITD sont fréquentes chez l'adulte jeune avec un caryotype normal et sont associées à un pronostic d'autant plus défavorable que le ratio allélique de la mutation est élevé ($\geq 0,5$) (Döhner et al. 2017).

RAS (10-15%)

Les gènes de la famille des oncogènes *Ras* (*KRAS*, *NRAS*, ou leurs régulateurs, *PTPN11* et *NF1*) codent pour des petites protéines à activité GTPasique dont les mutations induisent un excès de prolifération par activation de la voie RAS/RAF/MEK. Les mutations des gènes *NRAS* et *KRAS* sont le plus souvent des mutations ponctuelles, survenant généralement au niveau des

codons 12, 13 et 61. Les mutations *N-/K-RAS* semblent être associées à la transformation des syndromes myélodysplasiques en LAM (Badar et al. 2015).

***KIT* (<5%)**

Le proto-oncogène *KIT*, situé en 4q12, code pour un récepteur à activité tyrosine kinase de classe III, dont le ligand est le *stem cell factor* (SCF). Les mutations de *KIT*, surviennent le plus souvent au niveau du domaine tyrosine kinase et sont de type gain de fonction, conduisant à une activation constitutive des voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire, en particulier des CSH. Les mutations de *KIT* sont plus communément retrouvées dans les LAM CBF (25-30%), et confèrent un pronostic défavorable aux LAM avec t(8;21) mais pas aux LAM avec inv(16)/t(16;16) (Boissel et al. 2006; Duployez et al. 2016; Ishikawa et al. 2020).

Gènes codant pour les facteurs de transcription (20-25%)

Les principaux gènes ou transcrits de fusion codant pour des facteurs de transcription dans les LAM sont : *RUNX1/CBFB*, *CEBPA* et *GATA2*. Les mutations ou translocations à l'origine des transcrits de fusion altèrent la transcription et entraînent un blocage de différenciation des cellules hématopoïétiques.

***RUNX1* (10%)**

Le gène *RUNX1* (*RUNX family transcription factor 1*), situé en 21q22.12, code pour un facteur de transcription majeur dans l'hématopoïèse. *RUNX1* contient un domaine d'homologie Runt (RHD) de 128 acides aminés, hautement conservé, responsable de la liaison à l'ADN et de l'hétérodimérisation avec le *CBFβ*. *RUNX1* régule l'expression de gènes impliqués dans la différenciation hématopoïétique, la biogénèse du ribosome, la régulation du cycle cellulaire et les voies de signalisation dépendantes de TP53 ou du TGFβ (Sood et al. 2017). Il a été montré plus récemment que *RUNX1* était impliqué dans la régulation épigénétique, et induisait une déméthylation de l'ADN par le recrutement d'enzymes telles que les protéines de la famille TET (Suzuki et al. 2017).

Les mutations de *RUNX1* sont de type faux-sens, non-sens, ou *frameshift*, et peuvent

survenir sur l'ensemble du gène mais sont plus fréquentes dans le domaine RHD. Ces mutations peuvent être bi-alléliques et sont fréquemment associées à un caryotype normal. Les mutations de *RUNX1* sont généralement exclusives des mutations de *NPM1* et *CEBPA*, et sont souvent associées aux mutations d'*ASXL1*, *IDH2* et *KMT2A-PTD* (Grimwade et al. 2016).

Les mutations de *RUNX1* constituent une entité distincte provisoire dans la classification OMS 2016. Différentes études ont montré l'impact pronostique défavorable des mutations de *RUNX1* (Tang et al. 2009; Schnittger et al. 2011; Gaidzik et al. 2016). Ainsi, ces mutations sont désormais intégrées au groupe de risque défavorable dans la classification ELN 2017 (Döhner et al. 2017).

Les mutations de *RUNX1* peuvent être constitutionnelles, à l'origine de thrombopénies familiales avec prédisposition aux LAM (syndrome FPD/AML) (Song et al. 1999).

CEBPA (10%)

Le gène *CEBPA* (*CCAAT enhancer binding protein alpha*), situé en 19q13.11, joue un rôle clé dans la différenciation des cellules de la lignée myéloïde. Les mutations du gène *CEBPA* sont de deux types : *frameshift* dans le domaine N-terminal où elles conduisent à une protéine tronquée de 30 kDa inhibant l'isoforme de 42kDa par effet dominant négatif, et *in-frame* dans la région C-terminale, affectant les propriétés de liaison à l'ADN et de dimérisation (Pabst and Mueller 2007). Les mutations de *CEBPA* sont plus fréquentes chez les patients jeunes et en cas de caryotype normal. Dans deux-tiers des cas, les patients présentent des mutations bi-alléliques de *CEBPA*, avec classiquement une mutation de type *frameshift* en N-terminal et une insertion ou délétion *in-frame* en C-terminal (Pabst et al. 2009; Wouters et al. 2009; Tawana et al. 2015). Ces mutations bi-alléliques de *CEBPA* sont associées à un pronostic favorable dans la classification ELN 2017 (Döhner et al. 2017).

Les mutations de *CEBPA* sont fréquemment accompagnées de mutations de *GATA2* et *WT1*, en particulier en cas de mutation bi-allélique de *CEBPA*.

Les mutations de *CEBPA* peuvent également être constitutionnelles, généralement de type *frameshift*, localisées en N-terminal. Ces mutations prédisposent aux LAM, et ne sont associées à aucune anomalie hématologique ni extra-hématologique (Tawana et al. 2015).

GATA2 (~5%)

GATA2 (GATA binding protein 2) est un membre de la famille des facteurs de transcription GATA comprenant six membres. Le gène *GATA2* est localisé au niveau du bras long du chromosome 3 (3q21.3). La protéine *GATA2* comprend deux domaines de liaison à l'ADN en doigt de zinc, et deux domaines de transactivation. *GATA2* joue un rôle clé dans l'hématopoïèse en favorisant l'émergence de CSH à partir de l'endothélium au cours de la transition endothélio-hématopoïétique. *GATA2* contribue au maintien et à la prolifération du pool de CSH, en coopération étroite avec d'autres facteurs de transcription tels que *RUNX1*, *PU.1*, *NOTCH1*, *EVI1*, et *FLI1* (Vicente et al. 2012a; Gao et al. 2013). L'expression de *GATA2* diminue au cours du temps afin de promouvoir la différenciation hématopoïétique. La modulation de l'expression ou de l'activité de *GATA2* peut ainsi promouvoir la leucémogénèse (Wlodarski et al. 2017). Il a été montré que l'hyperexpression de *GATA2* était associée aux mutations de *NPM1* et *FLT3-ITD*, et à une hyperexpression de *WT1* et *EVI1* (Vicente et al. 2012b). Les mutations de *GATA2* sont fréquentes chez les patients présentant une LAM de cytogénétique intermédiaire avec mutation bi-allélique de *CEBPA* (~10%) (Fasan et al. 2013).

Des mutations germinales de *GATA2* ont été décrites et sont à l'origine de différents phénotypes tels que le syndrome MonoMAC, associant monocytopenie et infections à Mycobactéries, le syndrome d'Emberger, associant myélodysplasie et lymphoedème, le syndrome DCML (déficit en cellules dendritiques, monocytes, lymphocytes B et NK), et les syndromes myélodysplasiques/LAM (Chong et al. 2018).

Gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN

La différenciation des CSH est sous le contrôle de facteurs de transcription au niveau génique, et de la méthylation de l'ADN au niveau épigénétique. La méthylation des îlots CpG constitue un garant de la stabilité génomique. Des altérations de la méthylation de l'ADN, telles que l'hyperméthylation des îlots CpG dans les promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur et l'hypométhylation globale du reste du génome sont décrites dans différents cancers (Feinberg and Vogelstein 1983; Ehrlich 2002; Esteller 2008; Akalin et al. 2012; Guillaumot et al. 2016). Des mutations de gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*) ont été

décrites dans les LAM et sont détaillées ci-après.

DNMT3A (~20-30%)

La protéine DNMT3A (*DNA methyltransferase 3 alpha*) est une enzyme qui catalyse l'addition d'un groupement méthyl sur un résidu cytosine au sein des îlots CpG (Ley et al. 2010).

Le gène *DNMT3A* est localisé au niveau du bras court du chromosome 2 (2p23.3). Les mutations du gène *DNMT3A* constituent des événements précoces dans la leucémogénèse des LAM, et sont identifiées au sein des CSH quiescentes (Eriksson et al. 2015). Près de 60% des mutations de *DNMT3A* surviennent dans le domaine méthyltransférase au niveau du résidu R882, entraînant une perte de l'activité catalytique de la protéine par effet dominant négatif, et donc une hypométhylation des îlots CpG de l'ADN, promouvant ainsi un blocage de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques et la prolifération (Challen et al. 2011; Russler-Germain et al. 2014).

Les mutations de *DNMT3A* sont plus fréquemment associées aux LAM à caryotype normal, ainsi qu'aux mutations *NPM1* et *FLT3-ITD*. Les mutations de *DNMT3A* semblent être associées à un pronostic défavorable, en particulier quand elles sont associées aux mutations *NPM1* et *FLT3-ITD* (Ley et al. 2010; Ribeiro et al. 2012; Bezerra et al. 2020).

TET2 (10-20%)

La protéine TET2 (*Ten-eleven Translocation-2*) est codée par le gène *TET2*, situé en 4q24, et appartient à la famille des enzymes TET, composée de 3 membres : TET1, TET2 et TET3. Les protéines TET sont des hydroxylases catalysant la transformation du 5-méthylcytosine (5-mc) en 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmc) en présence d'oxyde de Fer (Fe²⁺) et d' α -cétoglutarate, et promeuvent ainsi la déméthylation de l'ADN. Leur activité peut être accrue en présence d'acide ascorbique (Solary et al. 2014).

Des mutations inactivatrices de *TET2* sont décrites dans les LAM, induisant une diminution du taux de 5-hmc, à l'origine d'une hyperméthylation de l'ADN et donc à une répression de la différenciation et à une prolifération des CSH (Moran-Crusio et al. 2011; Solary et al. 2014).

IDH 1/2 (16-19%)

Les isocitrate déshydrogénases 1 et 2 (IDH1/2) sont des enzymes catalysant la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en α -cétoglutarate dans la mitochondrie. Des mutations d'*IDH1* et *IDH2* ont été décrites dans les tumeurs solides et les hémopathies myéloïdes. Ces mutations surviennent dans les domaines conservés au niveau du résidu R132 d'*IDH1* et des résidus R140 et R172 d'*IDH2*, conduisant alors à la réduction de l' α -cétoglutarate en R-2-hydroxyglutarate (R-2-HG), un oncométabolite qui inhibe les histones déméthylases et l'activité des protéines TET (Figure 4)(Xu et al. 2011). La hausse anormale de production du métabolite R-2-HG induit une hyperméthylation des histones et de l'ADN, et une modification de la chromatine, entraînant un blocage de la différenciation des cellules hématopoïétiques (Kats et al. 2014).

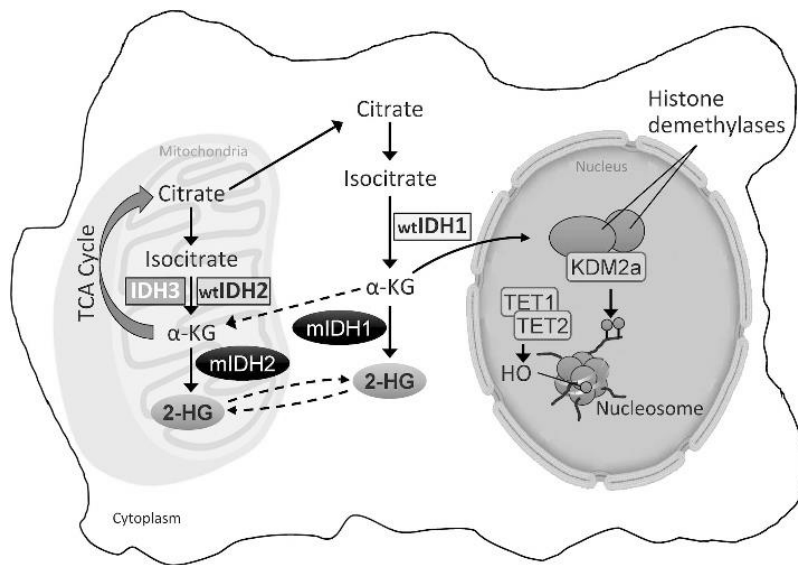


Figure 4: Rôle des mutations d'IDH et IDH2 dans les cancers (Medeiros et al. 2017)

Gènes impliqués dans la modification de la chromatine

L'hématopoïèse requiert une régulation étroite, dans le temps et selon les lignées, de l'expression des gènes tels que les gènes homéotiques. L'expression de ces gènes est contrôlée en retour par les complexes protéiques polycomb (PRC1 et PRC2) et trithorax, qui vont induire des modifications post-traductionnelles des histones. L'équilibre entre ces complexes joue un

rôle crucial dans le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire (Greenblatt and Nimer 2014). Des mutations dans les gènes impliqués dans la régulation post-traductionnelle des histones sont ainsi décrites dans les LAM.

ASXL1 (10-15%)

Le gène *ASXL1* (*Addition of Sex combs Like 1*), localisé en 20q11.21, code pour une protéine des complexes polycombs. La protéine ASXL1 est impliquée dans deux activités post-traductionnelles distinctes : la désubiquitinylation de la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119) via le complexe PRC1 et la triméthylation de la lysine 27 sur l'histone H3 (H3K27) via la sous-unité EZH2 du complexe PRC2 (Scheuermann et al. 2010; Abdel-Wahab et al. 2012). ASXL1 agit ainsi comme un suppresseur de tumeur en réprimant l'expression d'oncogènes tels que *HOXA9* (Greenblatt and Nimer 2014).

Les mutations d'*ASXL1* induisent une diminution du recrutement du complexe répresseur PRC2 et ainsi de la triméthylation de l'H3K27 (Abdel-Wahab et al. 2012).

La plupart des mutations d'*ASXL1* surviennent au niveau de l'exon 12 et sont de type *frameshift* ou stop, conduisant à la perte du résidu carboxyterminal de l'homéodomaine au niveau de la protéine. Ces mutations sont associées à un pronostic péjoratif, et classent les patients dans le groupe défavorable selon la classification ELN 2017 (Metzeler et al. 2011; Pratcorona et al. 2012; Schnittger et al. 2013a; Paschka et al. 2015; Döhner et al. 2017).

EZH2 (2%)

La protéine EZH2 (*enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*) est une sous-unité du complexe polycomb PRC2 (*Polycomb repressive complex 2*). EZH2 est une histone méthyltransférase permettant la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 conférant ainsi un rôle de répresseur transcriptionnel. EZH2 joue un rôle majeur dans le développement embryonnaire, et est impliqué dans l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la différenciation. EZH2 est impliqué dans le contrôle de la structure de la chromatine et le maintien des capacités d'auto-renouvellement des CSH en promouvant l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et l'extinction d'autres gènes impliqués dans la différenciation (Lund et

al. 2014).

EZH2 exerce des fonctions opposées (suppresseur de tumeur/proto-oncogène) suivant le type de tumeur et le stade de la maladie. Dans les LAM, le type de mutation d'*EZH2* (gain/perte de fonction) est fonction du stade de la maladie. Les stades précoces de LAM sont associés à des mutations inactivatrices d'*EZH2*, tandis que dans les stades plus avancés, *EZH2* aura un rôle de proto-oncogène et les mutations de type gain de fonction seront alors plus fréquentes (Basheer et al. 2019).

KMT2A (~5-10%)

Le gène *KMT2A* (*Lysine Methyltransferase 2A*) code pour une histone méthyltransférase et catalyse la méthylation de la lysine 4 sur l'histone H3 (H3K4), promouvant ainsi l'activation de la transcription de gènes du développement tels que les gènes *Hox* (Milne et al. 2002; Greenblatt and Nimer 2014). Les réarrangements et les duplications en tandem partielles de *KMT2A* conduisent à l'acquisition d'une nouvelle activité méthyltransférase via le recrutement de la méthyltransférase DOT1L. Il en résulte une hyperméthylation en H3K79 et une expression aberrante de gènes tels que *HOXA* et *MEIS1* (Milne et al. 2002).

Gènes suppresseurs de tumeur

TP53 (~8%)

La protéine p53, codée par le gène *TP53* (*Tumor protein 53*) située en 17p13.1, est une protéine suppresseur de tumeur clé dans le maintien de la stabilité génomique, par son rôle dans le contrôle de l'apoptose, de la sénescence cellulaire, du métabolisme et de la réparation de l'ADN. La protéine p53 est activée en réponse à des dommages de l'ADN ou en situation de stress, et conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et à l'apoptose.

Des mutations du gène *TP53*, conduisant à une perte partielle ou totale de fonction de la protéine p53, sont retrouvées dans plus de 50% des cancers (Vogelstein et al. 2000). Dans les LAM, la fréquence des mutations de *TP53* est plus faible, variant de 8% dans les LAM de novo à 15% dans les LAM secondaires (Lindsley et al. 2015; Papaemmanuil et al. 2016). L'incidence des mutations de *TP53* augmente avec l'âge. Les mutations de *TP53* peuvent être de type

frameshift, non-sens, mais sont plus souvent de type faux-sens. Ces mutations surviennent fréquemment au niveau du domaine de liaison à l'ADN, empêchant alors la transcription de gènes cibles. Les mutations de *TP53* sont associées aux caryotypes complexes (dans 70% des cas) et monosomaux, aux monosomies 5 et 7, ainsi qu'aux délétions 5q et 7q (Haferlach et al. 2008; Rücker et al. 2012). Les mutations de *TP53* sont associées à une chimiorésistance et une survie pauvre, et classent les patients dans le groupe de risque défavorable dans la classification ELN 2017 (Bowen et al. 2009; Rücker et al. 2012; Döhner et al. 2017).

***WT1* (~10%)**

Les mutations du gène *WT1* (*Wilms' Tumor 1*), localisé en 11p13, ont été initialement identifiées dans les tumeurs familiales de Wilms. La protéine WT1 est un facteur de transcription, constitué d'un domaine de transactivation en N-terminal et de 4 domaines en doigt de zinc qui partagent des motifs de liaison à l'ADN, communs avec EGRF1. *WT1* est exprimé par les progéniteurs hématopoïétiques CD34+ et est impliqué dans la différenciation des cellules hématopoïétiques (Svedberg et al. 2001). Physiologiquement, WT1 n'est plus détectable dans les cellules sanguines périphériques matures. Le gène *WT1* est fréquemment surexprimé dans les cancers, en particulier dans les LAM. Les mutations de *WT1* sont essentiellement localisées dans les domaines en doigt de zinc, au niveau de l'exon 7 et de l'exon 9, et sont associées aux mutations *FLT3-ITD*, *CEBPA* et *NPM1* (Hou et al. 2010).

Gènes codant pour des protéines du splicéosome (~10%)

L'épissage de l'ARN messager est une étape clé dans la maturation protéique et donc la régulation de l'expression génique. Des mutations dans les gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation de l'épissage ont été identifiées dans certains cancers et peuvent entraîner l'activation de proto-oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (Dvinge et al. 2016). Des mutations dans des gènes du splicéosome tels que *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* et *ZRSR2* ont été décrites dans les LAM et semblent promouvoir le développement de la LAM via une altération de l'épissage de gènes impliqués dans la régulation épigénétique, la transcription et le maintien de l'intégrité du génome (Dvinge et al. 2016). Les mutations des

gènes du spliceosome sont généralement mutuellement exclusives et souvent associées aux mutations de *RUNX1*, *ASXL1*, *TET2* et *IDH2*. L'incidence des mutations des gènes du spliceosome augmente avec l'âge, et ces mutations semblent être associées à un pronostic défavorable (DiNardo and Cortes 2016).

Gènes codant pour des protéines du complexe de la cohésine (6-13%)

Le complexe de la cohésine est constitué de différentes sous-unités codées notamment par les gènes *STAG2*, *RAD21*, *SMC1A* et *SMC3*. Ce complexe est nécessaire à la cohésion des chromatines sœurs au cours de la mitose et de la méiose (Thol et al. 2014).

Les mutations dans les gènes de la cohésine représentent des événements précoces dans le développement des LAM et d'autres pathologies myéloïdes. Ces mutations modulent l'accessibilité de la chromatine aux facteurs de transcription hématopoïétiques tels que *GATA2*, *RUNX1* et *ERG*, promouvant ainsi les propriétés des CSH et altérant la différenciation hématopoïétique (Mazumdar et al. 2015; Cuartero et al. 2019).

Les mutations dans ce complexes sont habituellement mutuellement exclusives et sont souvent associées aux mutations de *NPM1*, *TET2*, *ASXL1* et *EZH2* (Thol et al. 2014).

C. Leucémogénèse des LAM

La LAM résulte d'un processus multi-étapes nécessitant la coopération entre des événements de classe I (mutations de *FLT3*, *NRAS*, *KRAS*, *KIT*, *PTPN11* et *CBL*), à l'origine d'une activation constitutive de voies de signalisation tyrosine kinase, conférant un avantage prolifératif ou sur la survie cellulaire, et les événements de classe II affectant les facteurs de transcription (tels que *RUNX1*, *CEBPA* et *KMT2A*) et donc la différenciation hématopoïétique (Kelly and Gilliland 2002; Fröhling et al. 2005).

De larges études pangénomiques telles que le séquençage d'exome/génome ou le *single nucleotide polymorphism array* (SNP-array) ont contribué à une meilleure caractérisation du profil moléculaire des LAM. Ainsi, environ 40% des patients ne présentent aucune mutation dans les gènes codant pour les voies de signalisation tyrosine kinase. Les mutations de gènes

codant pour des facteurs de transcription sont retrouvées dans environ 20% des cas et les transcrits de fusions dans moins de la moitié des cas (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013). Plus récemment des études de méthylation de l'ADN ont permis de comprendre que l'expression de gènes codant pour les voies de signalisation tyrosine kinase et les facteurs de transcription était régulée par des facteurs épigénétiques (Greenblatt and Nimer 2014). Des mutations de gènes impliqués dans la régulation épigénétique (méthylation de l'ADN et modification de la chromatine par exemple) ont été identifiées dans près de 70% des LAM et constituent une classe critique de mutations dans la leucémogénèse des LAM (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013).

Plus récemment, des études en *single cell* ont permis de caractériser la séquence d'apparition des mutations et ont ainsi identifié différents modèles de hiérarchie clonale, linéaire ou branchée, à l'origine des LAM (Figure 5) (Hirsch et al. 2016; Martignoles et al. 2018).

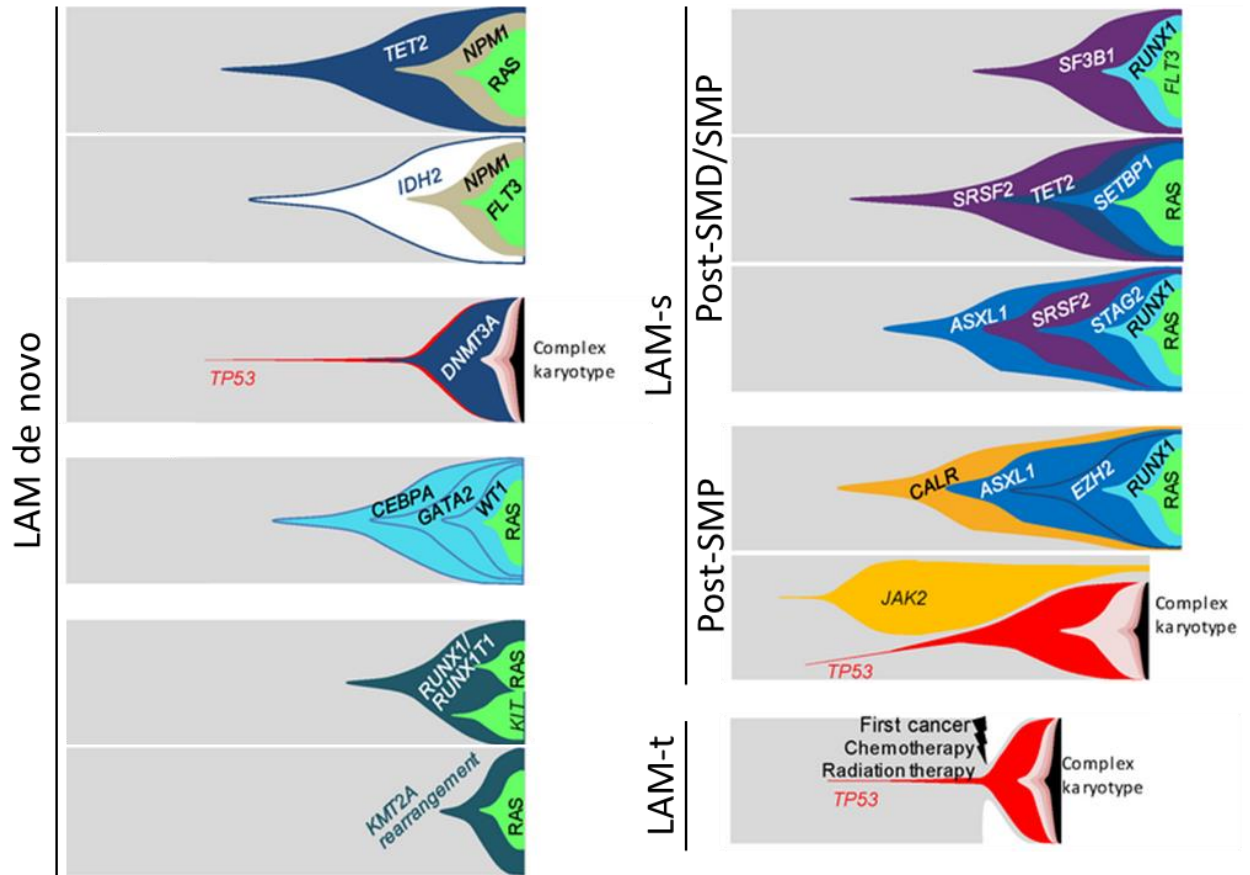


Figure 5 : Modèles de hiérarchies clonales dans les LAM (Martignoles et al. 2018)

LAM-s : LAM secondaires ; LAM-t : LAM secondaires à un traitement

Dans le cas des LAM de novo, l'évolution clonale peut émailler de mutations dans les gènes de régulation de l'épigénétique tels que *DNMT3A*, *TET2*, suivies de mutations de *NPM1* ou de gènes codant pour un facteur de transcription (*CEBPA*, *RUNX1* ou *GATA2*), puis de mutations des gènes des voies de signalisation (*FLT3*, *KIT*, *RAS*...). Dans ce modèle, les mutations des gènes de l'épigénétique correspondent souvent à une hématopoïèse clonale liée l'âge (*Clonal hematopoiesis of indeterminate potential* – CHIP). Dans les LAM de novo où la mutation de CHIP est portée par le gène *TP53*, l'évolution clonale est différente, marquée par l'acquisition de mutations additionnelles au niveau de gènes de l'épigénétique, le plus souvent *DNMT3A*, suivies d'altérations chromosomiques par instabilité génétique liée à la mutation du gène *TP53*. Dans ce modèle, il n'existe pas de mutation de *NPM1* ni de mutation de gènes codant pour des facteurs de transcription associée (Papaemmanuil et al. 2016).

Les LAM peuvent également résulter de l'acquisition successive d'une mutation de *NPM1* ou de gènes codant pour des facteurs de transcription, suivie de mutations dans les gènes impliqués dans la prolifération sans mutation liée à la CHIP. Ce modèle correspond le plus souvent aux LAM avec mutation bi-allélique de *CEBPA*.

Les LAM de novo peuvent également résulter d'une évolution clonale plus courte, avec des altérations cytogénétiques initiatrices suivies de mutations dans les gènes des voies de signalisation tyrosine kinase/RAS. Dans ces cas, les mutations de *NPM1*, *RUNX1*, *CEBPA* ou *GATA2* ne sont jamais retrouvées (Papaemmanuil et al. 2016). Ce modèle est plus fréquent chez l'enfant et l'adulte jeune (LAM-CBF, LAM avec réarrangement de *KMT2A*).

Dans le cas des LAM secondaires, la hiérarchie clonale est fonction du contexte (syndrome myélodysplasique/myéloprolifératif ou traitement antérieur). Une étude incluant 93 patients présentant une LAM secondaire à un SMD a permis d'identifier 8 mutations spécifiques au sein de 3 classes fonctionnelles : spliceosome (*SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2* et *SF3B1*), modification de la chromatine (*ASXL1*, *BCOR* et *EZH2*) et cohésine (*STAG2*) (Lindsley et al. 2015). Les LAM post-SMD résultent de la succession d'une ou plusieurs mutations spécifiques de LAM secondaires, suivies par l'acquisition de mutations dans les gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (*RAS*, *FLT3*...). Dans les LAM secondaires à des syndromes myéloprolifératifs, les mutations initiatrices surviennent le plus souvent dans les gènes *JAK2*, *CALR* ou *MPL*. L'évolution clonale est ensuite marquée par l'acquisition successive de mutations de gènes de l'épigénétique puis de gènes des voies de signalisation (Martignoles et al. 2018).

Les LAM secondaires à un traitement résultent de la sélection d'un clone porteur d'une mutation de *TP53* par le traitement préalable (chimiothérapie/radiothérapie).

D. Classification OMS 2016

La classification actuelle des LAM repose la classification OMS révisée en 2016 (Tableau 2) (Arber et al. 2016). Cette classification prend en compte les éléments morphologiques, cytochimiques et immunohistochimiques, permettant ainsi d'identifier le type de lignée et le degré de maturation des cellules leucémiques, tel que dans la classification FAB. A la différence

de cette dernière, la classification OMS intègre en plus des altérations cytogénétiques (*RUNX1-RUNX1T1*, *MLLT3-KMT2A*, *DEK-NUP214*...) ou moléculaires (mutations de *NPM1*, *CEBPA*, ou *RUNX1*), la notion de myélodysplasie sous-jacente ou de chimiothérapie antérieure. Enfin, une nouvelle entité appelée « néoplasies myéloïdes avec prédisposition germinale » a été intégrée dans la dernière révision de cette classification (Arber et al. 2016).

Tableau 2: Classification OMS 2016 des LAM

LAM avec anomalies génétiques récurrentes
LAM avec t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LAM avec inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
LAP avec <i>PML-RARA</i>
LAM avec t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
LAM avec t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
LAM avec inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
Entité provisoire: LAM avec <i>BCR-ABL1</i>
LAM avec mutation <i>NPM1</i>
LAM avec mutation bi-allélique <i>CEBPA</i>
Entité provisoire: LAM avec mutation <i>RUNX1</i>
LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies
Néoplasies myéloïdes post-chimiothérapie
LAM, sans autre spécification
LAM avec différenciation minimale
LAM sans maturation
LAM avec maturation
Leucémie aiguë myélomonocytaire
Leucémie aiguë monoblastique/monocytaire
Leucémie érythroïde pure
Leucémie aiguë mégacaryoblastique
Leucémie aiguë à composante basophile
LA avec myélofibrose
Sarcomes myéloïdes
Proliférations myéloïdes liés au syndrome de Down
Prolifération myéloïde transitoire
Leucémies myéloïdes associées au syndrome de Down
Néoplasies myélodes avec prédisposition germinale

E. Facteurs pronostiques

Les facteurs pronostiques des LAM dépendent essentiellement des altérations cytogénétiques et moléculaires, du patient, ainsi que de la réponse au traitement.

1.Facteurs pré-thérapeutiques

a.Liés au patient

L'âge du patient au diagnostic de LAM représente un facteur de risque indépendant, avec un pronostic d'autant plus péjoratif que la LAM survient à un âge avancé (Büchner and Heinecke 1996; Creutzig et al. 2008; Juliusson et al. 2009). Cette constatation s'explique par l'incidence plus élevée des altérations génétiques défavorables avec l'âge.

D'autre part, l'état général et les comorbidités du patient impactent directement sur la décision thérapeutique et la tolérance au traitement (Döhner et al. 2017).

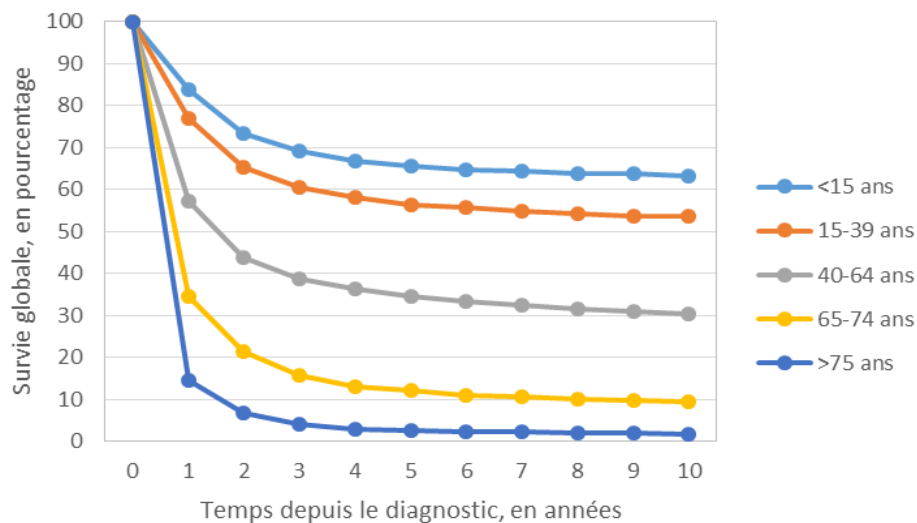


Figure 6 : Impact pronostique de l'âge dans les LAM des patients diagnostiqués entre 2000 et 2016, d'après le registre américain SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*, www.seer.cancer.gov)

b.Liés aux altérations cytogénétiques et moléculaires

Les altérations cytogénétiques représentent des facteurs pronostiques bien identifiés chez l'adulte (Grimwade et al. 2010).

Les mutations, identifiées chez près de 90% des patients, représentent des facteurs pronostiques majeurs. Certaines de ces mutations ont été intégrées dans la classification de ELN 2017, stratifiant les patients selon trois groupes pronostiques et guidant la décision thérapeutique (Tableau 3) (Papaemmanuil et al. 2016; Döhner et al. 2017). Cette révision intègre certaines mutations dont l'impact prédomine sur les altérations cytogénétiques. Les mutations bi-alléliques de *CEBPA* et les mutations de *NPM1* en l'absence de mutation *FLT3-ITD* ou avec une ITD à faible ratio allélique sont de bon pronostic. Les mutations *FLT3-ITD* ainsi que des *RUNX1*, *ASXL1* et *TP53* sont associées à un pronostic défavorable (Paschka et al. 2015; Gaidzik et al. 2016; Papaemmanuil et al. 2016).

Tableau 3 : Classification pronostique de l'ELN 2017 d'après Döhner et al. (Döhner et al. 2017)

Pronostic	Altérations génétiques et cytogénétiques
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutation de <i>NPM1</i> sans <i>FLT3-ITD</i> ou avec ratio allélique de <i>FLT3-ITD</i> bas (<0,5) Mutations bi-alléliques de <i>CEBPA</i>
Intermédiaire	Mutation de <i>NPM1</i> et <i>FLT3-ITD</i> avec ratio allélique élevé Absence de <i>FLT3-ITD</i> ou <i>FLT3-ITD</i> avec ratio allélique bas sans mutation de <i>NPM1</i> (sans altération génétique de mauvais pronostic) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> Anomalies cytogénétiques non classées favorables ni de mauvais pronostic
Défavorable	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); réarrangement de <i>KMT2A</i> t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2-MECOM (EVI1)</i> -5 ou del(5q); -7; -17/abn(17p) Caryotype complexe ou présence d'une monosomie sur le caryotype <i>FLT3-ITD</i> avec ratio allélique élevé sans mutation de <i>NPM1</i> Mutation de <i>RUNX1</i> , <i>ASXL1</i> ou <i>TP53</i>

2. Facteurs post-thérapeutiques : le suivi de la maladie résiduelle

Le suivi de la maladie résiduelle (*Minimal residual disease, MRD*) constitue un facteur pronostique post-thérapeutique indépendant, permettant d'identifier des cellules leucémiques résiduelles avec une résolution supérieure à celle de l'examen morphologique (10^{-2}) (Jongen-Lavrencic et al. 2018).

La MRD revêt d'un intérêt majeur pour apprécier l'efficacité d'un traitement, adapter la stratégie thérapeutique, et surveiller de façon plus étroite l'apparition d'une rechute afin d'intervenir plus précocement (Schuurhuis et al. 2018) La MRD représente un critère d'évaluation de substitution de l'EFS et pourrait ainsi aider à accélérer l'approbation de nouveaux traitements (Hourigan et al. 2017).

Différentes techniques sont utilisées pour le suivi de la MRD parmi lesquelles la CMF et la *real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)* représentent les deux techniques les plus fréquemment réalisées en pratique clinique courante (Figure 7) (Schuurhuis et al. 2018)

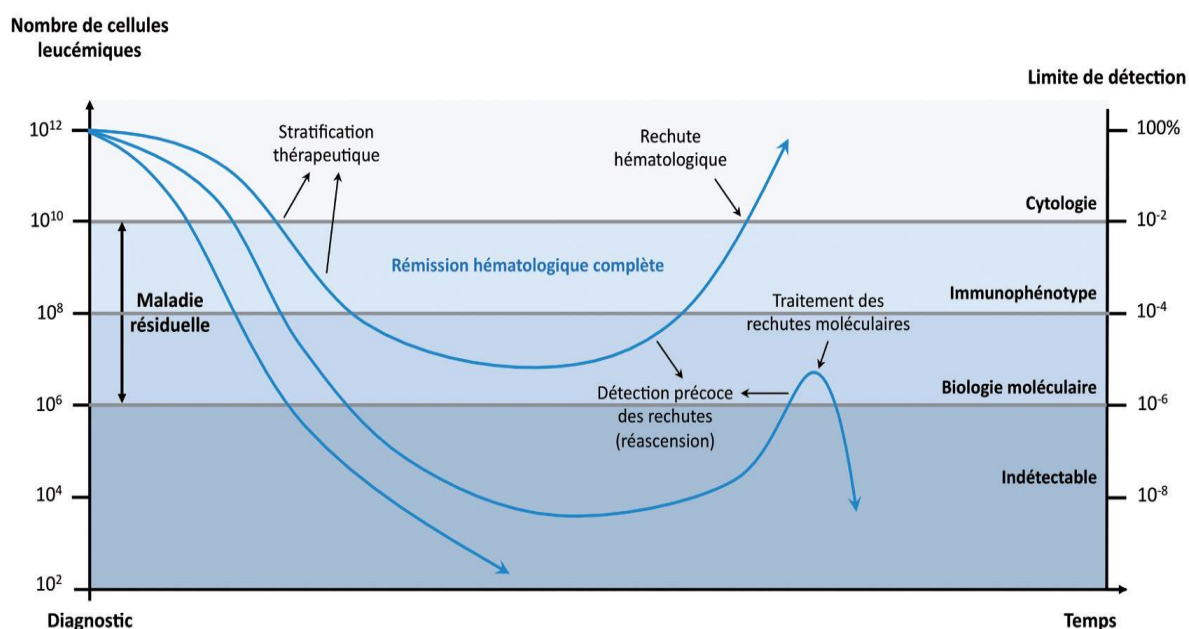


Figure 7 : Seuils de détection pour l'évaluation de la maladie résiduelle selon les approches utilisées

Le suivi de la MRD en CMF repose sur l'évaluation de l'expression aberrante d'antigènes par les blastes de LAM selon deux techniques : l'immunophénotype associé aux leucémies (*Leukemia Associated ImmunoPhenotypes*, LAIP) déterminé au diagnostic de LAM, et l'identification d'immunophénotypes différents de la normale (*Different from Normal*, DfN) en cours de suivi. L'évaluation de la MRD par CMF est réalisable dans environ 90% des patients (Ravandi et al. 2018).

Les LAIP peuvent correspondre à 1) des antigènes anormalement exprimés en comparaison aux progéniteurs de la lignée myéloïde de même stade de différenciation, 2) des marqueurs d'autres lignées, 3) l'expression asynchrone d'antigènes (co-expression de marqueurs d'immatunité et de maturité)(Kern et al. 2010). Les LAIP peuvent varier au cours du temps et suivant les traitements. Cette évolution peut s'expliquer par l'instabilité antigénique du clone principal, l'émergence d'un nouveau clone leucémique, ou l'expansion d'un sous-clone chimio-résistant sous la pression thérapeutique.

La stratégie DfN est une approche complémentaire permettant d'identifier les blastes par déviation de leur chemin de maturation en comparaison à celui des cellules normales (Schuurhuis et al. 2018).

La sensibilité de la CMF pour détecter des cellules leucémiques résiduelles est de 10^{-4} .

L'évaluation de la MRD par RT-qPCR est une approche hautement sensible (seuil de détection : 10^{-4} à 10^{-6}) permettant le suivi d'altérations génétiques telles que les mutations de *NPM1* ou de certains transcrits de fusion tels que *CBF-MYH11*, *RUNX1-RUNX1T1*, *PML-RARA*. En raison de la présence nécessaire de certaines cibles moléculaires spécifiques, cette technique n'est applicable qu'à environ 40% des patients (Schuurhuis et al. 2018).

La PCR digitale (*droplet digital PCR*, ddPCR) représente également une approche de haute résolution (seuil de détection : 10^{-5} à 10^{-6}) offrant la possibilité d'un suivi de tout type de mutation/transcrit de fusion.

Le suivi de la MRD en NGS est une approche en cours de développement. Le NGS permet de détecter des mutations dans près de 90% des LAM, avec un seuil de sensibilité d'environ 10^{-3} à 10^{-4} pour les technologies actuelles. Néanmoins, environ 50% des mutations identifiées au

diagnostic persistant en rémission complète (RC), parmi lesquelles, les mutations de *DNMT3A*, *TET2* et *ASXL1* (mutations « DTA ») sont les plus fréquemment retrouvées (Jongen-Lavrencic et al. 2018). Ces mutations sont associées à une hématopoïèse clonale liée à l'âge et n'ont pas d'impact pronostique.

L'évaluation de la MRD en NGS nécessite donc de suivre les mutations « non-DTA » et serait donc réalisable dans environ 40-50% des cas. La persistance d'une MRD positive en RC représenterait un facteur pronostique indépendant sur la survie sans rechute et la survie globale (Jongen-Lavrencic et al. 2018).

F. Prise en charge thérapeutique des LAM de l'adulte jeune

a. Traitement conventionnel

***Traitement d'induction**

La prise en charge thérapeutique des LAM de l'adulte jeune (18-60 ans) a longtemps reposé sur une polychimiothérapie intensive associant de la daunorubicine 60 mg/m²/j pendant 3 jours à de la cytarabine 100-200 mg/m²/j pendant 7 jours (schéma « 3+7 »). Ce régime d'induction permet l'obtention d'une RC dans 60-80% des LAM de l'adulte jeune (Dombret and Gardin 2016).

***Traitement post-rémission**

La décision du type de traitement en post-induction (chimiothérapie de consolidation/allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*, HSCT) dépend des facteurs pré-thérapeutiques et de la réponse au traitement d'induction évaluée par la mesure de la maladie résiduelle.

L'HSCT représente le traitement de choix pour prévenir le risque de rechute dans les LAM mais est grevée d'une morbidité et mortalité (*treatment-related mortality*, TRM) non négligeables en particulier chez les patients les plus âgés. Au cours des dernières années, l'utilisation de conditionnements atténués chez les patients les plus âgés ou présentant des comorbidités a permis une diminution de la TRM (Sengsayadeth et al. 2015). La décision d'HSCT

dépend de la balance bénéfico-risque entre la morbi-mortalité non liée à la rechute et le risque de rechute – reposant principalement sur les facteurs pronostiques pré-thérapeutiques – et du type de donneur. L'HSCT est recommandée lorsque le risque de rechute sans HSCT est supérieur à 35-40%, c'est-à-dire chez les patients des groupes intermédiaire ou défavorable selon l'ELN 2017 (Cornelissen et al. 2012; Döhner et al. 2017).

La chimiothérapie intensive de consolidation, proposée chez les adultes non candidats à l'HSCT, repose sur la cytarabine à dose intermédiaire (1000 à 1500 mg/m²) ou à forte dose (3000 mg/m²), ou sur une polychimiothérapie (Schlenk 2014).

b.Place des nouveaux agents dans le traitement des LAM

L'identification des altérations moléculaires dans les LAM a permis non seulement une meilleure stratification des patients mais a également contribué au développement de thérapies ciblées. Ainsi, la prise en charge thérapeutique des LAM a changé substantiellement en 2017 avec l'approbation par l'agence américaine du médicament (FDA, *Food and Drug Administration*) de nouveaux agents thérapeutiques tels que le gemtuzumab ozogamicine, les inhibiteurs de FLT3, d'IDH1/2 ou de BCL2 (Tableau 4). Ces nouvelles molécules ont ainsi offert de nouvelles options thérapeutiques aux patients, en particulier à ceux dont l'âge ou les comorbidités les rendaient inéligibles à une chimiothérapie intensive, appelés patients « *unfits* ».

Tableau 4 : Traitements ciblés des LAM approuvés par l'agence américaine du médicament

Drogue/Schéma de traitement	Indication approuvée par la FDA*	Date de la 1ère approbation par la FDA
Rydapt/midostaurine en combinaison avec la chimiothérapie intensive	LAM avec mutation de <i>FLT3</i>	28 Avril 2017
Idhifa/énasidénib	LAM en rechute/réfractaire avec mutation d' <i>IDH2</i>	01 Août 2017
Mylotarg/gemtuzumab ozogamicine seul ou en combinaison avec daunorubicine et cytarabine	LAM CD33+	1 ^{er} Septembre 2017
Tibsovo/ivosidénib	LAM ≥75 ans inéligible à la chimiothérapie intensive avec mutation d' <i>IDH1</i>	20 Juillet 2018
Daurismo/glasdégib + LDAC	>75 ans ou inéligible à la chimiothérapie intensive pour la CI	21 Novembre 2018
Vénétoclax + HMA ou LDAC	LAM ≥75 ans non antérieurement traitée ou inéligible à la chimiothérapie intensive	21 Novembre 2018
Xospata/giltéritinib fumarate	LAM en rechute/réfractaire avec mutation de <i>FLT3</i>	28 Novembre 2018

FDA: Food and Drug Administration, LDAC : low-dose cytarabine, HMA : hypomethylating agent

***Inhibiteurs de FLT3**

Les inhibiteurs de FLT3 ont été introduits dans les essais cliniques à partir de 2002. Les inhibiteurs de première génération (midostaurine, sorafénib, lestaurtinib...) ont une activité multi-kinases, non sélective de FLT3, et dont l'efficacité est contrebalancée par d'importantes toxicités en raison de leur manque de spécificité (effet « *off-target* »). Les inhibiteurs de seconde génération sont plus spécifiques de FLT3 et ainsi associés à moins d'effet *off-target* (Daver et al. 2019b).

Selon leur mécanisme d'action, on distingue deux types d'inhibiteurs de FLT3 : les inhibiteurs de classe I qui se lient au site de liaison à l'ATP quelle que soit la conformation du récepteur, tandis que les inhibiteurs de classe II se fixent au récepteur dans sa conformation inactive au niveau de la région hydrophobe sous-jacente au domaine de liaison à l'ATP (Daver et al. 2019b). Ainsi, les inhibiteurs de type I (midostaurine, giltéritinib, lestaurtinib, sunitinib et crénolanib) sont actifs sur les mutations de type ITD et TKD alors que les inhibiteurs de classe II

(sorafénib, ponatinib, quizartinib) sont spécifiques des mutations de type ITD, les mutations de type TKD induisant une conformation active du récepteur (Figure 8).

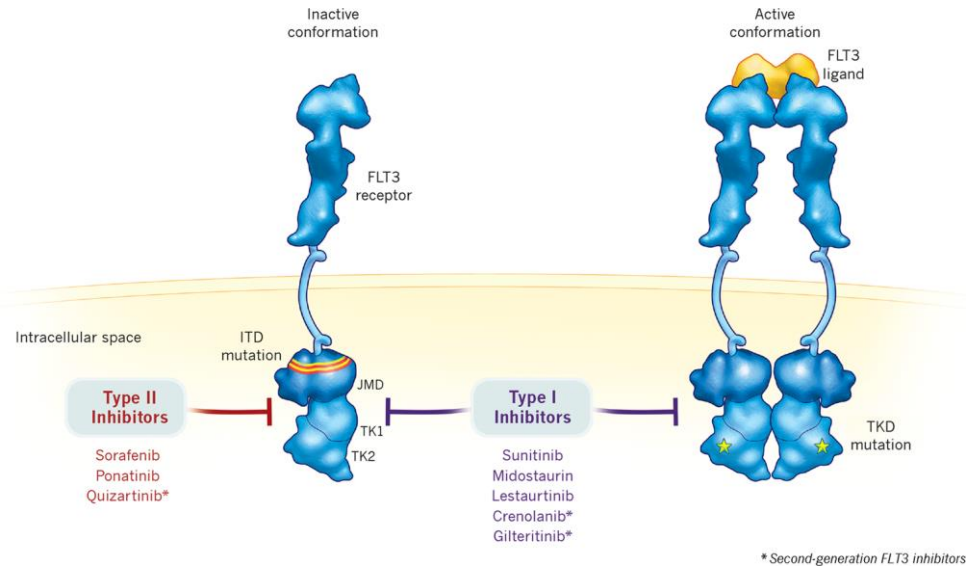


Figure 8 : Mécanismes d'action des inhibiteurs de FLT3, d'après Daver et al. (Daver et al. 2019b)

L'étude randomisée de phase III RATIFY, menée chez 717 patients diagnostiqués pour une LAM non antérieurement traitée avec mutation de FLT3 a montré une amélioration significative de la survie globale des patients traités dans le bras midostaurine en comparaison à ceux traités dans le bras placebo (survie globale médiane : 74,7 mois vs 25,6 mois, hazard ratio[HR] : 0,78, IC95% :0,63-0,96; P=0,009) avec un profil de toxicité similaire entre les deux bras (Stone et al. 2017). Ces résultats ont conduit à l'approbation de la midostaurine par la FDA en 2017 dans le traitement des LAM de l'adulte non antérieurement traitées avec mutation *FLT3* (ITD ou TKD) en combinaison avec le traitement intensif standard.

Plus récemment, le gilteritinib, inhibiteur de deuxième génération, hautement spécifique des mutations *FLT3*-ITD et -TKD, est le second inhibiteur de FLT3 à avoir été approuvé par la FDA, en monothérapie dans les LAM avec mutation de FLT3 en rechute/réfractaires sur les résultats de l'étude ADMIRAL. Cette étude randomisée de phase III, a montré une augmentation significative de la survie globale dans le bras gilteritinib en comparaison au bras standard avec chimiothérapie de rattrapage (survie médiane : 9,3 mois vs 5,6 mois ; HR : 0,64, IC95% : 0,49-0,83 ; P<0.001)(Perl et al. 2019).

Le quizartinib (AC220) est un inhibiteur tyrosine kinase de type II dont l'administration en monothérapie a montré une activité anti-leucémique chez les patients en rechute/réfractaire, avec un taux de réponse composite (RC + RC incomplète + RC avec récupération hématologique incomplète) de 47 à 56% (Cortes et al. 2018a, 2018b). L'étude randomisée de phase III QuANTUM-R a comparé le bénéfice du quizartinib vs chimiothérapie de rattrapage sur la survie globale chez 367 adultes avec LAM en rechute/réfractaire (Cortes et al. 2019b). Cette étude a montré une efficacité limitée du quizartinib, avec une survie globale médiane de 6,2 mois vs 4,7 mois dans le bras contrôle (HR = 0,76, IC95% : 0,58-0,98, P=0,02). En EFS, il n'était pas observé de différence statistiquement significative entre le quizartinib et la chimiothérapie de rattrapage (EFS médiane : 1,4 mois vs 0,9 mois ; HR = 0,90, IC95% : 0,70-1,16, P=0,11). Par ailleurs, les effets secondaires, cardiaques notamment, étaient plus fréquemment observés dans le bras expérimental. Collectivement, ces résultats ont conduit à un refus d'approbation du quizartinib par la FDA.

D'autres inhibiteurs de FLT3 sont en cours d'évaluation dans des essais de phase plus ou moins avancée, en première ligne, en induction ou en maintenance (Perl 2017). Enfin, une étude de phase III comparant l'efficacité du crénolanib – inhibiteur de seconde génération – à la midostaurine en première ligne de traitement est actuellement en cours (NCT03258931, (Stone et al. 2019)).

***Inhibiteurs d'IDH**

L'énasidénib (AG-221), inhibiteur d'IDH2, représente le premier inhibiteur d'IDH à avoir démontré une efficacité dans la LAM. Dans un essai multicentrique de phase 1/2, 176 patients avec une LAM en rechute/réfractaire ont reçu un traitement par énasidénib. Chez ces patients, l'énasidénib a permis l'obtention d'une réponse globale de 40,3% avec une survie globale médiane de 9,3 mois (Stein et al. 2017). Chez les 19,3% de patients en RC, la survie globale médiane était de 19,7 mois. Un syndrome de différenciation était observé dans 11,7% des cas mais pouvait être pris en charge de façon efficace par administration de corticoïdes (Fathi et al. 2018). L'énasidénib a ainsi obtenu l'approbation de la FDA en 2017 pour les LAM en rechute/réfractaires avec mutation *d'IDH2*.

De façon similaire, l'ivosidénib (AG-120), inhibiteur d'IDH1, a été testé dans une étude de phase 1/2. Le taux de réponse globale était de 41,6% dont 21,6% de RC chez les patients avec LAM en rechute/réfractaire (n=125 patients), et la durée médiane de réponse était de 6,5 mois (DiNardo et al. 2018b). Chez les patients non antérieurement traités, 42,4% des patients traités par ivosidénib étaient en RC ou RC avec récupération hématologique partielle (RCh), la durée médiane de RC/RCh n'était pas atteinte et la survie globale médiane était de 12,6 mois (Roboz et al. 2020). Au total 79% des patients expérimentaient des toxicités de grade ≥ 3 , et 18% des patients présentaient un syndrome de différenciation. Ces résultats ont ainsi conduit à l'approbation par la FDA de l'ivosidénib dans les LAM de l'adulte avec mutation d'*IDH1* en rechute/réfractaires en 2017, puis en première ligne chez les patients âgés d'au moins 75 ans non antérieurement traités, inéligibles à la chimiothérapie intensive 2019.

Récemment, une étude de phase I a évalué le bénéfice de l'ivosidénib/énasidénib en combinaison avec une chimiothérapie intensive en traitement de première ligne dans LAM de l'adulte avec mutation *IDH1/2* (Stein et al. 2020). Un total de 153 patients a été inclus dans l'étude (bras ivosidénib : n=60 patients ; bras énasidénib : n=91 patients). Le taux de RC était de 55% dans le bras ivosidénib et 47% dans le bras énasidénib, soit une réponse globale (RC/RCh) de 72% et 63% respectivement. Les syndromes de différenciation étaient moins fréquents que lors de l'utilisation des inhibiteurs d'*IDH1/2* en monothérapie (3,3% dans le bras ivosidénib et 2,2% dans le bras énasidénib). Une étude randomisée de phase III est actuellement en cours afin de confirmer ces premiers résultats (étude HOVON 150 AML ; clinicaltrials.gov : NCT03839771).

***Inhibiteurs de KIT**

Les mutations de KIT sont fréquentes dans les LAM CBF et constituent des cibles thérapeutiques potentielles. La midostaurine et le dasatinib sont des inhibiteurs multikinases, avec notamment une activité contre les mutations de *KIT*. Deux études de phase II (AMLSG 11-08 et CALGB 10801) ont évalué la faisabilité et l'efficacité de l'adjonction du dasatinib en induction, consolidation et maintenance à la polychimiothérapie intensive en première ligne de traitement des LAM CBF (Paschka et al. 2018; Marcucci et al. 2020). Dans l'essai AMLSG 11-08, le taux de réponse globale (CR + CR incomplète) était de 94% et la survie globale à 4 ans était de 74,7% (Paschka et al. 2018). De façon similaire dans l'étude CALGB 10801, le taux de RC était de

90%, avec une survie sans maladie et une survie globale à 3 ans de 75 et 77% respectivement (Marcucci et al. 2020). Par ailleurs, une étude de phase II a évalué l'efficacité du dasatinib en traitement de maintenance dans les LAM CBF en RC mais avec une MRD moléculaire positive. A deux ans, la survie sans maladie était similaire entre les patients traités par dasatinib et ceux n'ayant pas reçu de traitement de maintenance (40,2% vs 50,0%, P=0,74) (Boissel et al. 2015). Une étude randomisée de phase III (NCT02013648) est actuellement en cours pour évaluer le bénéfice de l'ajout du dasatinib au traitement intensif standard dans les LAM CBF non antérieurement traitées.

***Inhibiteurs de la voie RAS**

Des mutations de gènes de la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK sont fréquentes dans les LAM et sont parfois impliquées dans les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de FLT3, d'IDH1/2 ou encore de BCL-2. La voie de signalisation RAS représente donc une cible thérapeutique d'intérêt potentiel dans les LAM.

Des inhibiteurs de MEK-1/2, le solumétinib et le tramétinib ont montré une efficacité limitée dans le traitement des LAM, y compris en combinaison avec un inhibiteur de la voie PI3K-Akt, susceptible d'être activée dans les cas de résistance aux inhibiteurs de MEK (taux de réponse : 17-22%) (Jain et al. 2014; Ragon et al. 2019).

***Inhibiteurs de TP53**

L'APR-246 est un analogue méthylé de PRIMA-1 (*p53 Re-activation and Induction of Massive Apoptosis*) capable d'induire l'apoptose de cellules mutées *TP53*. L'APR-246 est spontanément converti en une forme active, le méthylène quinuclidinone qui, après liaison covalente aux résidus cystéine des protéines p53 mutées, va restaurer leur activité en favorisant leur conformation *wild-type* (Lambert et al. 2009; Zhang et al. 2018).

Une étude de lignées cellulaires mutées *TP53* a montré l'effet synergique pro-apoptotique de la combinaison APR-246 et azacitidine en comparaison à l'azacitidine seule, et un arrêt du cycle cellulaire dans 83% des cellules traitées par cette combinaison (Maslah et al. 2020).

Deux études cliniques de phase II (NCT03072043, NCT03588078) ont récemment confirmé le bénéfice de l'adjonction de l'APR-246 au traitement par azacitidine dans les SMD et les LAM,

avec un taux de réponse globale de 75-87%, dont 53-56% de RC (Cluzeau et al. 2019; Sallman et al. 2019).

***Inhibiteurs de MDM2**

MDM2 est une ubiquitine ligase E3 qui régule négativement l'activité de p53 en induisant sa dégradation dans le protéasome (Moll and Petrenko 2003). Dans différents cancers dont les LAM, la protéine MDM2 peut être anormalement surexprimée par amplification du gène *MDM2*, promouvant alors la dégradation de la protéine p53 (Momand et al. 1998). L'inhibition de l'interaction MDM2-p53 représente une cible d'intérêt pour restaurer l'activité de la protéine p53. Les inhibiteurs de MDM2 pourraient ainsi potentialiser l'activité cytotoxique de certains agents de chimiothérapie tels que la cytarabine et la daunorubicine en particulier dans les LAM sans mutation de *TP53* (Kojima et al. 2005). Une étude de phase I/Ib a démontré un profil de toxicité acceptable ainsi qu'une activité anti-leucémique de l'idasanutline en monothérapie ou en combinaison avec la cytarabine (Yee et al. 2014). Ces résultats ont conduit à une étude randomisée de phase III (essai MIRROS ; NCT02545283) évaluant l'efficacité de la combinaison idasanutline – cytarabine vs placebo – cytarabine. Les résultats préliminaires de l'étude ne montrent pas de bénéfice de l'adjonction d'idasanutline sur la survie globale (survie globale médiane : 8,3 vs 9,1 mois, (HR : 1,08 ; IC95% : 0,81-1,45 ; P=0,58) (E-Poster EHA 2020 EP532).

***Inhibiteurs de BCL2**

Les protéines de la famille BCL2 (BCL2, BCL-XL, MCL1...) jouent un rôle clé dans le contrôle de la voie intrinsèque de l'apoptose. Cette famille de protéines peut être divisée en 4 groupes fonctionnels : les suppresseurs (BCL2, BCL-XL, MCL1...), les activateurs (BIM, PUMA), les effecteurs (BAX, BAK) et les sensibilisateurs (NOXA). Les suppresseurs répriment l'activité pro-apoptotique des activateurs et des effecteurs, tandis que les sensibilisateurs inhibent l'activité des suppresseurs. Les activateurs et les effecteurs induisent une augmentation de la perméabilité de la membrane externe mitochondriale, relarguant ainsi le cytochrome C et générant l'activation de la caspase 9, ce qui conduit à la mort de la cellule (Pollyea et al. 2019). L'expression de *BCL2* est fréquemment augmentée dans les LAM, à l'origine d'une résistance aux traitements et de la survie des cellules leucémiques.

Le vénétoclax (ABT-199) est un BH3 mimétique, inhibiteur hautement sélectif de BCL2, induisant in vitro l'apoptose dans les lignées cellulaires de LAM (Pan et al. 2015). L'administration du vénétoclax en monothérapie dans les LAM de haut-risque en rechute/réfractaires inéligibles à la chimiothérapie a conduit à un taux de réponse globale de 19%, avec un profil de toxicité acceptable (Konopleva et al. 2016).

Des études précliniques ont montré que différents agents tels que les anthracyclines, la cytarabine, ou les agents hypométylants agissent de façon synergique avec le vénétoclax pour déclencher l'apoptose des cellules leucémiques (Bogenberger et al. 2015; Niu et al. 2016). Ainsi, l'azacitidine semble promouvoir l'action du vénétoclax par un mécanisme non épigénétique, en induisant l'expression de protéines pro-apoptotiques NOXA et PUMA (Jin et al. 2020). D'autre part, MCL1 peut induire une séquestration de BIM, à l'origine d'une résistance au vénétoclax. L'administration de daunorubicine ou de cytarabine permet de réprimer ce mécanisme de résistance en diminuant l'expression de MCL1, promouvant ainsi l'apoptose (Niu et al. 2016).

Le vénétoclax a ensuite été testé dans des études de phase Ib/II en association avec des agents hypométylants ou avec de la cytarabine à faible dose chez des patients avec LAM non antérieurement traitée âgés d'au moins 60 ans inéligibles à la chimiothérapie intensive. En association avec l'azacitidine ou la décitabine, le vénétoclax a permis l'obtention d'une réponse globale (RC + RC incomplète) de 67% parmi les 145 patients traités, avec une durée de réponse médiane de 11,3 mois et une survie globale médiane de 17,5 mois (DiNardo et al. 2018a, 2019). D'autre part, l'association vénétoclax-cytarabine à faible dose a conduit à un taux de réponse globale de 54% parmi les 82 patients inclus, avec une durée de réponse médiane de 8,1 mois et une survie globale médiane de 10,1 mois (Wei et al. 2019).

Ces deux études ont conduit la FDA à approuver le vénétoclax en association avec des agents hypométylants ou avec de la cytarabine à faible dose dans les LAM des sujets âgés d'au moins 75 ans inéligibles à la chimiothérapie intensive en novembre 2018.

Deux études randomisées de phase III, ont été menées chez des sujets âgés de 75 ans et plus non antérieurement traités pour confirmer le bénéfice de l'adjonction du vénétoclax à la cytarabine à faible dose (étude VIALE-C ; NCT03069352) ou aux agents hypométylants (étude VIALE-A ; NCT02993523).

L'étude VIALE-C a montré que l'adjonction du vénétoclax à la cytarabine faible dose permettait une réduction de 30% du risque de décès en comparaison à la cytarabine seule (survie globale médiane : 8,4 vs 4,1 mois, HR : 0,70, IC95% [0,50-0,99], P=0,04). Le taux de réponse globale était de 48% dans le bras expérimental et 13% dans le bras contrôle (P<0,001) (Wei et al. 2020).

L'étude VIALE-A a évalué le bénéfice de la combinaison azacitidine – vénétoclax en comparaison à l'azacitidine seule. La survie globale médiane était de 14,7 mois dans le bras azacitidine-vénétoclax vs 9,6 mois dans le bras azacitidine seule (HR : 0,66, IC95% [0,52-0,85], P<0,001), et le taux de réponse globale était de 66,4% vs 28,3% (P<0,001) (DiNardo et al. 2020).

***Gemtuzumab ozogamicine**

Le CD33 est un antigène présent à la surface des cellules de la lignée myéloïde, et largement exprimé par les blastes myéloïdes (>80%)(Sievers et al. 2001). Le gemtuzumab ozogamicine (GO, Mylotarg®), conjugué anticorps-médicament (ADC, *antibody-drug conjugate*) dirigé contre l'antigène CD33 représente le premier ADC à avoir été approuvé par la FDA en oncologie. Le GO a démontré son efficacité dans le traitement de la LAM, en particulier chez les patients de risque favorable. Une revue des essais cliniques et des marqueurs biologiques d'efficacité du gemtuzumab ozogamicine, réalisée dans le cadre de cette thèse, est proposée page 90.

***Inhibiteurs de checkpoints**

Le système immunitaire joue un rôle majeur dans le contrôle du développement tumoral et la résistance aux traitements. Ce rôle a été particulièrement mis en exergue dans les tumeurs solides et a révolutionné la prise en charge de différents cancers solides avec le développement d'inhibiteurs de checkpoints (anti-PD1, anti-PDL1, anti-CTLA4). Dans les hémopathies malignes, le développement des inhibiteurs de checkpoints est moins avancé.

Les LAM sont associées à une augmentation de l'expression de cellules T CD8+ coexprimant les marqueurs PD-1 TIM3, et LAG3. Les modèles murins montrent des effets anti-leucémiques du CTLA4, PD-1, PD-L1 et TIM3 (Williams et al. 2019).

Une étude de phase 1/1b a évalué l'efficacité de l'ipilimumab (anti-CTLA4) en monothérapie dans le traitement de rechutes post-allogreffe chez des patients pris en charge pour une

hémopathie maligne. Quatre des 12 patients diagnostiqués pour une LAM présentaient une réponse complète et durable (> 1an) (Davids et al. 2016).

Le nivolumab, anti-PD1, a été testé en combinaison avec un agent hypométhylant, l'azacitidine dans une étude de phase II menée chez des patients en rechute/réfractaires de LAM. Le taux de réponse globale était de 33% (n=22/70 patients) (Daver et al. 2019a).

***Inhibiteur de la voie sonic hedgehog**

La voie Hedgehog est une voie de signalisation hautement conservée et joue un rôle clef dans le développement embryonnaire et dans la maintenance de l'état souche des cellules. Cette voie est impliquée dans la survie et l'expansion des cellules souches hématopoïétiques (Wellbrock et al. 2015).

Une étude randomisée de phase II a évalué l'efficacité de l'adjonction du glasdégib à la cytarabine à faible dose (Cortes et al. 2019a). Le glasdégib a amélioré significativement la survie globale des patients avec une LAM ou un syndrome myélodysplasique de haut risque 8,8 vs 4,9 mois (P=0,0004). Le glasdégib a obtenu l'approbation de la FDA en 2018 dans les LAM des patients âgés d'au moins 75 ans ou inéligibles pour la chimiothérapie, en association avec la cytarabine à faible dose.

G. Protocole ALFA-0702

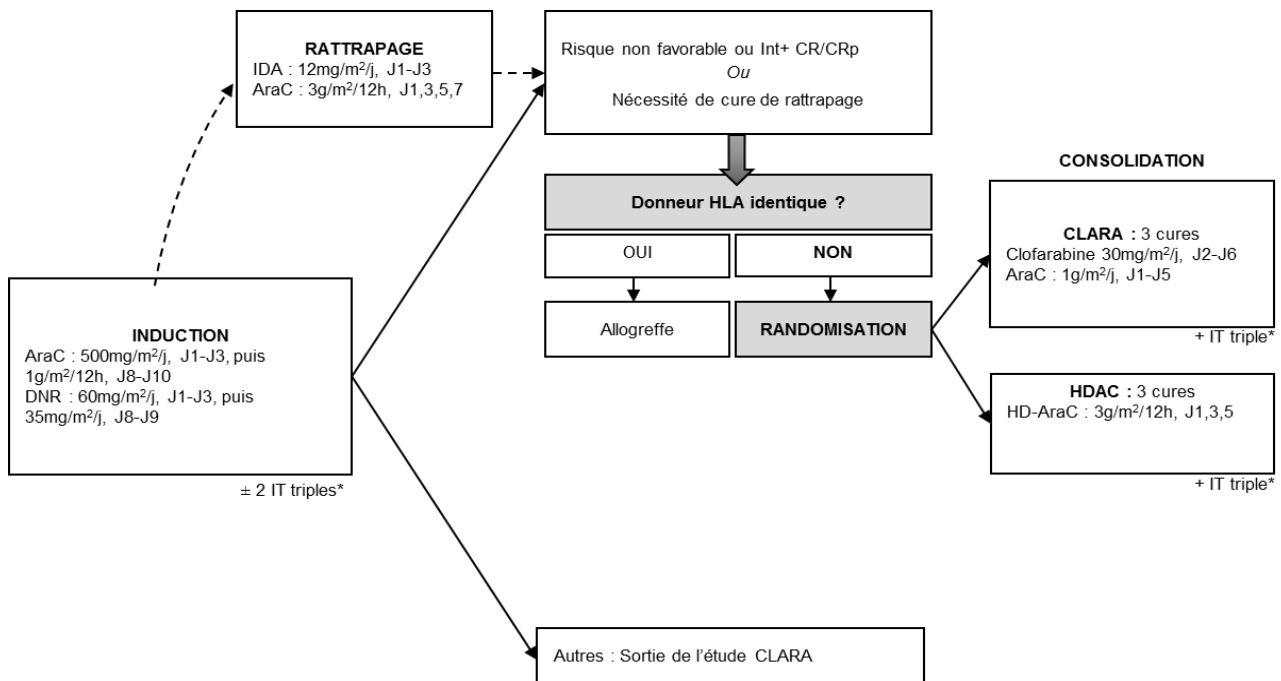
Le protocole ALFA-0702 est une étude prospective multicentrique randomisée de phase II évaluant l'intérêt d'un régime de consolidation à base de clofarabine en comparaison à la cytarabine à forte dose chez les patients âgés de 18 à 59 ans diagnostiqués pour une LAM de novo non antérieurement traitée. Cette étude a été conduite entre mars 2009 et septembre 2013.

Les patients inclus dans l'étude recevaient une chimiothérapie séquentielle d'induction associant daunorubicine (60 mg/m²/j de J1 à J3 et 35 mg/m²/j à J8 et J9), cytarabine (500 mg/m²/j de J1 à J3 et 1 g/m²/12h de J8 à J10). Une cure de rattrapage comprenant de l'idarubicine (12 mg/m²/j de J1 à J3), et de la cytarabine (3 g/m²/12h à J1, 3, 5, et 7) était

réalisée en cas d'échec d'induction.

Les patients de risque favorable en RC/ RC sans récupération plaquettaire (RCp) recevaient un traitement de consolidation par 3 cycles de cytarabine à forte dose.

Les patients de risque intermédiaire ou défavorable en RC/RCp à l'issue de la cure d'induction/rattrapage étaient éligibles à l'HSCT en traitement de consolidation. En l'absence de donneur HLA compatible, les patients étaient randomisés dans l'étude CLARA pour le traitement de consolidation. L'étude CLARA consistait en un bras associant clofarabine 30 mg/m²/j de J2 à J6 et cytarabine 1g/m²/j de J1 à J5 (bras CLARA) et un bras associant de la cytarabine 3 g/m²/12h à J1, J3 et J5 (bras HDAC). Une HSCT pouvait être réalisée chez les patients randomisés dans les cas d'identification tardive de donneur.



Groupes de risque	Caractéristiques
Risque Intermédiaire-1	Caryotype normal avec mutation de <i>NPM1</i> ou de <i>CEBPA</i> sans mutation <i>FLT3-ITD</i>
Risque Intermédiaire-2	Autres cas
Risque défavorable	-5, -7, 5q-, 7q-, Réarrangements de <i>KMT2A</i> incluant <i>KMT2A-PTD</i> (excepté t(9;11)) t(6;9) Caryotype complexe (> 2 anomalies) Anomalies 3q26 ou <i>EVI1+</i> > 1 cure pour obtention de la RC

Figure 9 : Design de l'étude ALFA-0702

L'objectif principal de l'étude était de comparer la RFS entre les deux bras de randomisation, CLARA et HDAC.

Au total, 713 patients ont été inclus dans l'étude. A l'issue de la cure d'induction, 616 patients (86,4%) étaient en RC/RCp, parmi lesquels 221 patients ont été randomisés (bras CLARA : n=107 patients, bras HDAC : n=114 patients).

La RFS à 2 ans des patients randomisés était de 58,5%, IC95% [49%-67%] dans le bras CLARA et 46,5%, IC95% [37%-55%] dans le bras HDAC (HR : 0,76 ; IC95% [0,54-1,09] ; P = 0,13). Dans une analyse de sensibilité, en censurant les 110 patients qui étaient allogreffés en RC/RCp, la RFS à 2 ans était de 53,3% dans le bras CLARA vs 31,0% dans le bras HDAC (HR : 0,63; IC95% [0,41-0,98]; P = 0,043) (Thomas et al. 2017).

H. Vers une approche thérapeutique personnalisée ?

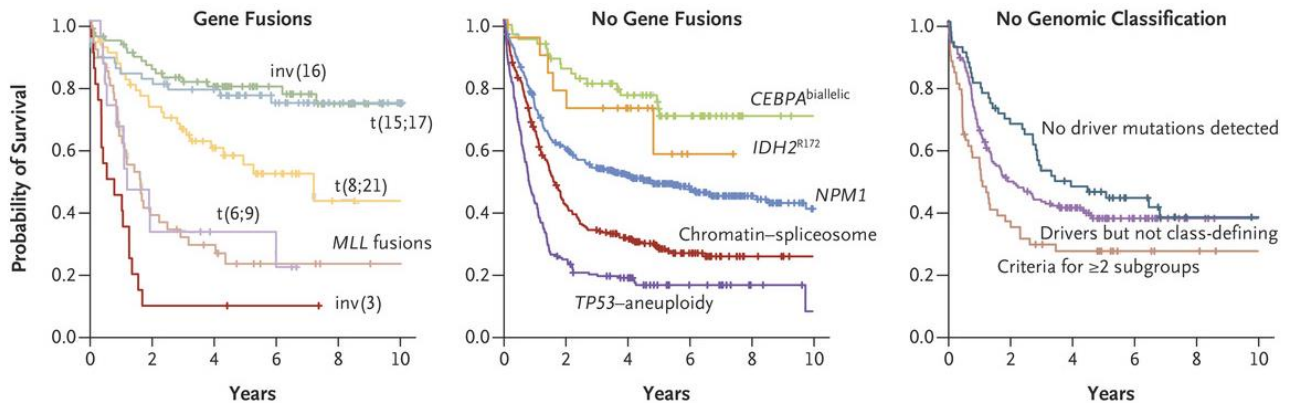
1. Identification de nouveaux biomarqueurs moléculaires pronostiques

Les larges études du profil moléculaire des LAM menées au cours des dernières années ont conduit à l'identification de nouveaux marqueurs pronostiques tels que *CEBPA*, *FLT3*, *RUNX1*, *ASXL1*, *WT1* ou encore *KIT* dans les LAM CBF (Marcucci et al. 2011; Patel et al. 2012; Schnittger et al. 2013b; Döhner et al. 2015). Le pronostic de la LAM est donc lié à une architecture génomique composite et ne peut être restreint à la présence d'un seul marqueur pronostique tel que défini dans la classification ELN 2017 (Moarii and Papaemmanuil 2017).

Une étude du profil moléculaire incluant l'analyse cytogénétique et le séquençage de 111 gènes de 1540 patients inclus dans trois études prospectives multicentriques AML-HD98A, AML-HD98D et AMLSG-07-04 a été réalisée (Papaemmanuil et al. 2016). Cette étude a permis d'identifier au moins une mutation dans 96% des cas (1478/1540 patients), et a conduit à l'établissement de 11 classes de LAM avec un pronostic distinct, regroupées dans 3 grandes catégories : transcrits de fusion (*inv(16)*, *t(8;21)*, *t(15;17)*, *t(6;9)*, *inv(3)*, fusions impliquant *KMT2A*), absence de transcrit de fusion (mutations *CEBPA* bialléliques, *IDH2* R172, *NPM1*, *TP53*-aneuploïdie, chromatine-splicéosome), et absence de classification génomique (mutations

drivers non classantes, mutations non *drivers*, anomalies mixtes) (Figure 10).

Figure 10: Stratification pronostique selon la classification de Papaemmanuil (Papaemmanuil et al. 2016)



Cette nouvelle classification a permis de classer 80% de la population analysée dans un groupe unique tandis que 48% de la population seulement était classée en se basant sur la classification OMS en vigueur lors de l'étude, i.e. la classification OMS 2008. Selon la classification proposée par Papaemmanuil et al, 4% des patients présentaient des altérations classant dans deux catégories ou plus, et seulement 11% des patients avec *driver* mutations ne pouvaient être classés (Papaemmanuil et al. 2016). Par ailleurs, il était observé une corrélation entre les différentes catégories et la survie globale des patients. Ainsi, les patients avec mutation de type chromatine-splicéosome avaient un pronostic défavorable. D'autre part, il a été montré que la présence de co-mutations pouvait moduler l'impact pronostique de certaines mutations. Ainsi, chez les patients présentant une mutation de *NPM1*, le pronostic était défavorable en présence de co-mutations de *DNMT3A* et *FLT3-ITD*, ce qui a été confirmé ultérieurement (Bezerra et al. 2020).

2. Vers une approche « banque de connaissance »

Un des enjeux majeurs dans la prise en charge des LAM de l'adulte jeune réside dans l'indication de l'HSCT en RC1 chez les patients traités par chimiothérapie intensive (Cornelissen

and Blaise 2016; Dombret and Gardin 2016).

La stratification pronostique des patients repose sur la classification ELN 2017 et inclut un nombre restreint d'altérations cytogénétiques et moléculaires.

Les études « donneur vs absence de donneur de cellules souches hématopoïétiques » ont permis d'évaluer l'intérêt de l'HSCT en comparaison à la chimiothérapie intensive de consolidation et ont conduit aux recommandations sur l'indication d'HSCT en RC1 dans les LAM (Schlenk et al. 2008; Koreth et al. 2009; Majhail et al. 2015; Döhner et al. 2017). Ces études ont montré le bénéfice de l'HSCT sur la survie sans rechute et la survie globale chez les patients de risque défavorable mais pas chez les patients de risque favorable.

Récemment des modèles de prédiction multifactoriels ont été développés afin d'évaluer le pronostic des patients en prenant en compte de façon exhaustive l'ensemble des caractéristiques cliniques, biologiques et moléculaires de la LAM. Ainsi, une approche « banque de connaissance » développée par Gerstung et al. a été développée à partir des 1540 patients inclus dans les études prospectives de l'AMLSG et étudiés par Papaemmanuil et al. (Papaemmanuil et al. 2016; Gerstung et al. 2017). Ce modèle multi-étape intègre 100 variables cliniques, cytogénétiques, génétiques et le type de traitement (HSCT ou non), et permet de prédire la survie globale, le risque de décès non en rémission, le risque de décès non en rechute, le risque de décès en rechute et le traitement optimal de consolidation pour chaque patient : chimiothérapie ou HSCT (Figure 11).

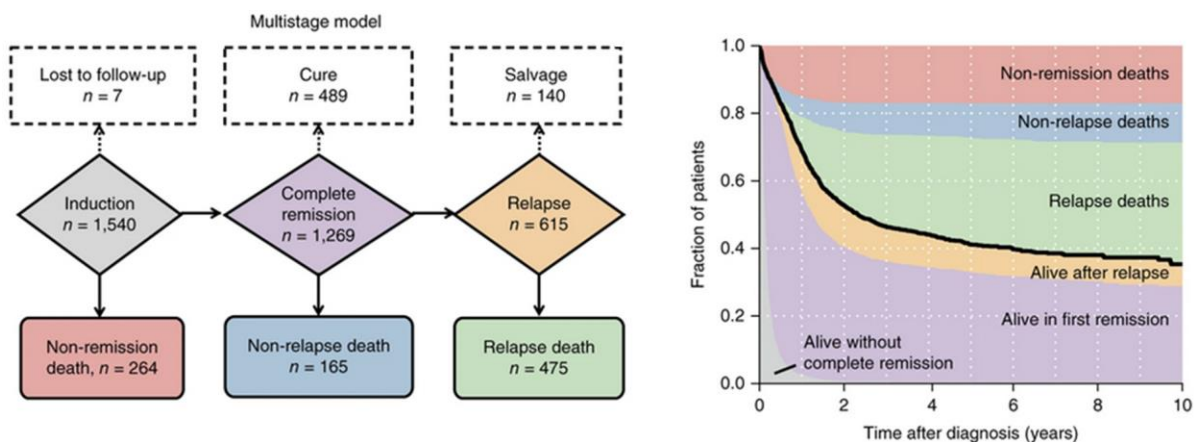


Figure 11: Approche « banque de connaissance », d'après Gerstung (Gerstung et al. 2017)

Cette approche personnalisée permettrait de réduire de 20 à 25% le nombre de patients allogreffés tout en préservant la survie globale (Gerstung et al. 2017).

Les prédictions des causes de décès ont été validées dans des cohortes indépendantes : une cohorte du TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) et une cohorte rétrospective monocentrique (Gerstung et al. 2017; Huet et al. 2018). Ces deux cohortes indépendantes ont également montré la supériorité du modèle multi-étapes dans la prédiction de la survie globale en comparaison à l'ELN 2017 et l'ELN 2010.

OBJECTIFS

Les LAM représentent des entités hétérogènes sur le plan clinique et biologique. Les études de biologie moléculaire de haute résolution ont permis de mieux appréhender le profil moléculaire des LAM au cours des dernières années. De nouvelles approches sont en cours de développement telle que la SNP-array, qui permet d'identifier des altérations numériques de petite taille et des pertes d'hétérozygoties, mais l'impact pronostique de ces altérations est peu connu, et donc la place de cette technique dans la pratique clinique quotidienne reste à définir.

La caractérisation de nouveaux marqueurs a conduit au développement d'approches multifactorielles intégrant un nombre plus large de paramètres, cliniques et biologiques. Ces nouvelles approches visent à refléter au mieux les singularités de la LAM de chaque patient et ainsi optimiser la prédiction du pronostic des patients afin de guider leur prise en charge thérapeutique. Un enjeu majeur dans le traitement des LAM est l'indication d'HSCT en RC1. A l'heure actuelle, cette indication repose sur l'âge du patient au diagnostic de LAM, ses comorbidités et son groupe de risque selon la classification ELN 2017. L'approche « banque de connaissance » développée par Gerstung et al, permet de prédire la survie des patients de façon personnalisée, mais la prédiction du bénéfice de l'allogreffe en RC1 selon cette approche n'est pas encore validée.

Par ailleurs, la prise en charge des patients a substantiellement évolué au cours des dernières années avec le développement de thérapies ciblées. Plusieurs d'entre elles ont montré leur efficacité à travers différents essais cliniques. Ces nouvelles thérapies offrent de nouvelles options thérapeutiques en monothérapie ou en association à la chimiothérapie intensive dans la prise en charge des patients. Différents marqueurs permettent de prédire la réponse à ces traitements. Le troisième axe de ce travail sera ainsi consacré à une revue sur les biomarqueurs prédictifs de réponse au gemtuzumab ozogamicine dans le traitement des LAM.

RESULTATS

A. Intérêt de la clofarabine sur la survie sans rechute dans les LAM de l'adulte jeune avec caryotype micro-complexe

L'analyse en SNP-array permet l'identification du nombre de copies de gènes et des pertes d'hétérozygotie sans altération du nombre de copies de gènes. De précédentes études de LAM en SNP-array ont mis en évidence des altérations génomiques récurrentes incluant des gènes d'intérêt dans les LAM tels que *TET2*, *CBL* ou *FLT3* (Jacoby and Walter 2012). Peu d'études ont évalué l'impact pronostique des altérations identifiées en SNP-array.

Dans le protocole ALFA-0702, le régime de consolidation à base de clofarabine semblait bénéficier aux patients avec un risque plus défavorable (Thomas et al. 2017). Afin de mieux définir le sous-groupe de patients susceptibles de bénéficier de ce traitement, une étude en SNP-array a été conduite chez les patients randomisés de l'étude pour lesquels de l'ADN au diagnostic était disponible.

L'analyse SNP-array a été réalisée chez 187 patients (CLARA : n=92 patients, HDAC : n=95 patients). En comparaison au traitement standard (HDAC), le régime de consolidation à base de clofarabine (CLARA) n'améliorait pas la RFS des patients avec caryotype complexe en cytogénétique conventionnelle (RFS à 4 ans : 36,4% vs. 18,8%, respectivement ; p=0,134). En définissant les caryotypes « micro-complexes » par la présence d'au moins 4 anomalies en SNP-array, le groupe de patients de risque défavorable a pu être élargi. Ainsi, le régime CLARA améliorait la RFS des patients avec caryotypes « micro-complexe » (CLARA vs HDAC, RFS à 4 ans : 44,4% vs 13,8%, p=0,004). Dans la cohorte analysée, 8% des patients présentaient une mutation de *TP53*, associée à un pronostic défavorable (RFS à 4 ans : 20,0% vs. 43,7% ; p=0,029). En analyse multivariée, la présence d'un caryotype micro-complexe représentait le seul facteur de mauvais pronostic chez les patients du bras HDAC (hazard ratio : 2,324, CI95% : 1,337–4,041, p=0,003).

Ainsi, la SNP-array représente une approche robuste pour redéfinir le sous-groupe de patients susceptibles de bénéficier de nouveaux régimes de consolidation.

Brief Report

Clofarabine Improves Relapse-Free Survival of Acute Myeloid Leukemia in Younger Adults with Micro-Complex Karyotype

Laurène Fenwarth ^{1,2}, Nicolas Duployez ^{1,2}, Xavier Thomas ^{3,4}, Nicolas Boissel ^{5,6}, Sandrine Geffroy ^{1,2}, Alice Marceau-Renaut ^{1,2}, Denis Caillot ⁷, Emmanuel Raffoux ⁵, Emilie Lemasle ⁸, Jean-Pierre Marolleau ⁹, Céline Berthon ¹⁰, Meyling H. Cheok ², Pauline Peyrouze ², Arnaud Pigneux ¹¹, Norbert Vey ¹², Karine Celli-Lebras ⁴, Christine Terré ¹³, Claude Preudhomme ^{1,2,4,*} and Hervé Dombret ^{4,5,6}

¹ Laboratory of Hematology, CHU Lille, 59000 Lille, France; laurene.fenwarth@chru-lille.fr (L.F.); nicolas.duployez@chru-lille.fr (N.D.); sandrine.geffroy@chru-lille.fr (S.G.); alice.marceau@chru-lille.fr (A.M.-R.)

² Jean-Pierre AUBERT Research Center, University Lille, Inserm, UMR-S 1277, 59000 Lille, France; meyling.cheok@inserm.fr (M.H.C.); pauline.peyrouze@inserm.fr (P.P.)

³ Lyon Sud, University Hospital, 69495 Pierre-Bénite Lyon, France; xavier.thomas@chu-lyon.fr

⁴ ALFA Group, 75010 Paris, France; karine.celli-lebras@aphp.fr (K.C.-L.); herve.dombret@aphp.fr (H.D.)

⁵ Hematology Department, Saint-Louis Hospital, 75010 Paris, France; nicolas.boissel@aphp.fr (N.B.); emmanuel.raffoux@aphp.fr (E.R.)

⁶ EA3518, Saint-Louis Institute for Research, Paris University, 75010 Paris, France

⁷ Hematology Department, Dijon University Hospital, 21000 Dijon, France; denis.caillot@chu-dijon.fr

⁸ Hematology Department, Henri Becquerel Cancer Center, 76038 Rouen, France; emilie.lemasle@chb.unicancer.fr

⁹ Hematology Department, Amiens University Hospital, 80054 Amiens, France; marolleau.jean-pierre@chu-amiens.fr

¹⁰ Hematology Department, CHU Lille, 59000 Lille, France; celine.berthon@chru-lille.fr

¹¹ Hematology Department, Bordeaux Haut-Leveque University Hospital, 33600 Pessac, France; arnaud.pigneux@chu-bordeaux.fr

¹² Onco-Hematology Department, Paoli-Calmettes Cancer Institute, 13009 Marseille, France; veyn@unicancer.ipc.fr

¹³ Laboratory of Hematology, André Mignot Hospital, 78157 Le Chesnay, France; cterre@ch-versailles.fr

* Correspondence: claude.preudhomme@chru-lille.fr; Tel.: +33(0)-320-44-47-83

Received: 3 December 2019; Accepted: 27 December 2019; Published: 30 December 2019

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) encompasses heterogeneous entities with dismal outcomes. Intermediate and unfavorable-risk AML represent the most difficult-to-treat entities. We recently reported the benefit of the clofarabine-based consolidation (CLARA) regimen compared to the standard high-dose cytarabine (HDAC) regimen in younger AML patients. Here, we aimed at assessing the clinical significance of single-nucleotide polymorphism (SNP)-array alterations and their interactions with chemotherapy regimens. A SNP-array was successfully performed in 187 out of the 221 intent-to-treat patients (CLARA arm: n = 92 patients, HDAC arm: n = 95 patients). The CLARA regimen did not significantly improve relapse-free survival (RFS) among patients who displayed a complex karyotype when compared to the HDAC regimen (4-year RFS (4y-RFS): 36.4% vs. 18.8%, respectively; $p = 0.134$). Defining micro-complex karyotypes from at least four SNP-array lesions enabled us to refine and enlarge the subset of adverse patients. In such patients, the CLARA regimen significantly improved RFS compared to the HDAC regimen (4y-RFS: 44.4% vs. 13.8%, respectively; $p = 0.004$). From our study cohort, 8% of patients displayed TP53 mutations, which were associated with an impaired RFS (4y-RFS: 20.0% vs 43.7%; $p = 0.029$). In a multivariate analysis, micro-complex karyotypes remained the sole poor prognostic factor in the HDAC arm (hazard ratio (HR) = 2.324 (95% confidence interval (CI) = 1.337–4.041), $p = 0.003$). The SNP array represents a powerful and reproductive approach to refine adverse AML patients that may benefit from alternative consolidation regimens.

Keywords: [acute myeloid leukemia](#); [snp-array](#); [micro-complex karyotype](#)

1. Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) encompasses heterogeneous entities, but its global outcome remains of concern. Recurrent numerical and structural cytogenetic abnormalities are among the most important prognostic factors in AML and are now routinely used to inform disease classification and stratify patients [1]. Among AML cytogenetic subgroups, complex karyotypes stand as one of the most difficult-to-treat. On the other hand, nearly 50% of AML patients show a normal karyotype in

conventional cytogenetics, and about 25% have uncommon aberrations [2]. In this context, high resolution approaches such as single-nucleotide polymorphism (SNP)-array karyotyping are attractive to better characterize unrecognized or cryptic copy number alterations (CNAs) and copy-neutral-loss of heterozygosity (CN-LOH), and these approaches may provide new information in AML diagnosis and prognostication [3]. Some studies have shown the feasibility of interrogating AML genomes with such technologies [4,5]. They have led to the discovery of novel recurrent gene deletion, amplification, and CN-LOH encompassing important targets including TET2, CBL, EZH2 or FLT3 (reviewed in [6]). However, few studies have focused on the prognostic impact of SNP-array lesions in clinical practice. Recently, we reported the benefits of the clofarabine combination with intermediate-dose cytarabine (CLARA arm) compared to standard high-dose cytarabine (HDAC arm) as consolidation chemotherapy in AML patients with intermediate or unfavorable cytogenetics who were enrolled in the randomized Acute Leukemia French Association (ALFA)-0702 trial and the subsequent CLARA study [7]. Here, we describe the SNP-array profiling of this well-annotated cohort of AML patients and evaluate the prognostic impact of these genetic alterations on clinical outcomes and their interactions with chemotherapy regimens.

2. Methods

2.1. Patients and Treatment

From March 2009 to September 2013, 713 patients aged 18–59 years old with previously untreated de novo AML were included in the phase II randomized multicenter ALFA-0702 trial (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00932412) [7]. Informed consent for both treatment and genetic analysis was obtained before the inclusion in accordance with the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved in December 2008 by the Institutional Review Board of the French Regulatory Agency and the Ethics Committee Sud-Est IV, France (ID: 08/099). Patients with intermediate or unfavorable-risk AML who had achieved first complete remission (CR) after one or two induction courses and who had no identified human leukocyte antigen-compatible donor were randomly assigned to the CLARA study (n = 221 patients). The CLARA study compared three clofarabine-based consolidation courses (CLARA arm) to three high-dose cytarabine courses (HDAC arm). Among the 221-intent-to-treat patients, the SNP-array was performed in 187 (85%) who had available genomic DNA.

2.2. SNP-A Karyotyping

Bone marrow or peripheral blood samples at diagnosis were analyzed by a Cytoscan HD array (ThermoFisher (Santa Clara, CA, USA)) according to the manufacturer's instructions, as previously described [8]. Data were screened according to the

Chromosome Analysis Suite (ChAS) 3.1 software (ThermoFisher), with stringent filters. In order to exclude germline alterations, only CNAs larger than 20 kb—including at least 20 consecutive markers and telomeric and interstitial copy-neutral-loss of heterozygosity (CN-LOH) over 3 and 10 Mb, respectively—were considered for this analysis. Additionally, all CNAs and CN-LOH fulfilling these criteria were approved through a visual inspection, and they were annotated based on the human genome version 19 (hg19) of the University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser.

2.3. Mutational Analysis

The genomic data of the NPM1, CEBPA and FLT3-ITD mutations were provided by standard procedures, as previously described [3,9]. The TP53 mutations were screened by high-throughput sequencing (full gene). Briefly, libraries were prepared by using the Haloplex System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, and then they were run on a MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). Raw data were processed with the SureCall (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and SeqNext (JSI Medical systems Corp., New York, NY, USA) softwares.

2.4. Statistical Analysis

The principal endpoint was relapse-free survival (RFS). RFS was defined from the date of the CR/CR with incomplete platelet recovery (CRp) to the date of relapse or death or last contact for patients alive in continuous CR/CRp. RFS was estimated by the Kaplan–Meier method and compared by the log-rank test. Comparisons were performed by the Wilcoxon rank-sum test for continuous variables and by χ^2 or the Fisher exact test for categorical variables. The hazard ratio (HR) was given with a 95% confidence interval (95% CI). Multivariate analyses were performed by using the Cox proportional hazard model. Statistical analyses were carried out with the use of the SPSS Statistics V22.0 software (IBM Corp., Chicago, IL, USA). All p-values were two-sided, with $p < 0.05$ considered as statistically significant.

3. Results and Discussion

The patient characteristics are summarized in [Table S1](#). The SNP-array was performed in 187 randomized patients (CLARA arm, $n = 92$; HDAC arm, $n = 95$). A total of 801 SNP-array alterations were identified. The median number of abnormalities was two per patient (first quartile: 1; third quartile: 4; range: 0–46) and did not significantly differ between both randomization arms ($p = 0.41$) ([Table S1](#)). CNAs accounted for the most common lesions (losses: 54%, gains: 38%; vs. CN-LOH: 8%). The third quartile (75th percentile) was found to be the optimal cut-off to discriminate AML patients into

prognostic subgroups. Consequently, AML genomes harboring four or more SNP-array lesions (including CNA and CN-LOH) were defined as the “micro-complex” karyotype. Overall, a total of 27 patients displayed the complex karyotype (i.e., at least three chromosomal abnormalities) in conventional cytogenetics, while 56 patients harbored the “micro-complex” karyotype, including 20 patients with the complex karyotype. The micro-complex karyotype was not found in the seven remaining patients, possibly due to low bone marrow/blood blast infiltration and/or balanced alterations.

Among patients with the complex karyotype, the CLARA-based consolidation was associated with a trend of a better RFS, although it did not reach statistical significance (4-year RFS (4y-RFS), 36.4% vs. 18.8%; $p = 0.134$) (Figure 1A). Interestingly, when considering all patients with the micro-complex karyotype, the CLARA consolidation significantly improved RFS (4y-RFS, 44.4% vs. 13.8%; $p = 0.004$) (Figure 1B). Similar results were observed when censoring at the time of allogeneic stem cell transplantation in first remission ($p = 0.012$). By contrast, the treatment arm did not impact RFS in patients without the micro-complex karyotype (4y-RFS, 46.9% vs. 46.6%; $p = 0.698$).

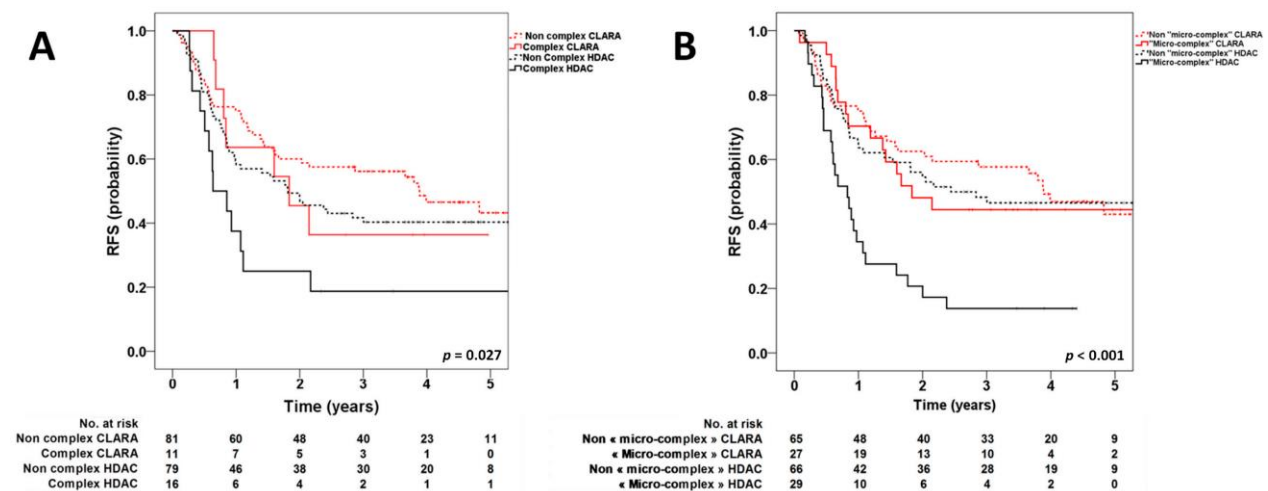


Figure 1. Kaplan–Meier estimates of relapse-free survival according to treatment arm (clofarabine-based consolidation (CLARA) vs. high-dose cytarabine (HDAC)) and complex karyotype (A) (4y-RFS: complex CLARA vs. non-complex CLARA, $p = 0.49$; complex HDAC vs. non-complex HDAC, $p = 0.039$; complex CLARA vs. complex HDAC, $p = 0.13$; non-complex CLARA vs. non-complex HDAC, $p = 0.23$) and micro-complex karyotype (B) (4y-RFS micro-complex CLARA vs. non-micro-complex CLARA, $p = 0.58$; micro-complex HDAC vs. non-micro-complex HDAC, $p < 0.001$; micro-complex CLARA vs. micro-complex HDAC, $p = 0.004$; non-micro-complex CLARA vs. non-micro-complex HDAC, $p = 0.70$).

Considering the well-known association between TP53 mutations and complex karyotypes among hematological malignancies [10], TP53 sequencing was performed in

the present cohort. A total of 15 patients (8%) carried at least one TP53 mutation, among which 12 harbored a complex karyotype and 12 had a micro-complex karyotype. As expected, the TP53 mutations statistically impaired RFS in the whole cohort (4y-RFS, 20.0% vs. 43.7%; $p = 0.029$).

In a multivariate analysis that took both TP53 mutations, complex karyotypes, and micro-complex karyotypes into account, only micro-complex karyotypes remained a poor prognostic factor in the HDAC arm (HR, 2.32 (95% CI = 1.34–4.04); $p = 0.003$). By contrast, none of them had a prognostic value in the CLARA arm (Table 1). Only a few studies have assessed the prognostic value of SNP-array karyotyping in AML. A previous study by Bullinger et al. [4] showed that neither the presence nor the number of CNAs predict outcome, but this study focused on cytogenetically normal AML; this is in contrast to our cohort, which was enriched with patients who harbored abnormal cytogenetics. Another study by Parkin et al. [5] found that two or more SNP-array alterations negatively impacted overall survival, including when controlling for age and karyotype in multivariate analysis. A difference in the cut-off chosen by the authors may have been due to the use of different SNP-array chips, different patient selections, and different treatments. Overall, the effect observed in the present cohort may have reflected changes in mRNA expression at putative target genes that are involved in leukemogenesis and disease resistance. However, we did not identify any recurrent pattern of CNA or CN-LOH that was associated with a poor outcome. One could hypothesize that a high number of SNP-array alterations could reflect a genomic instability that is concordant with a more aggressive disease and resistance to cytarabine. Clofarabine added, either simultaneously with or in sequence, to cytarabine may overcome this factor by increasing cytarabine accumulation in AML cells [7].

Table 1. Multivariate Cox model analysis of relapse-free survival (RFS).

Variables	Hazard Ratio	95%CI	p-Value
HDAC			
Micro-complex karyotype	2.32	1.34–4.04	<0.01
Complex karyotype	1.55	0.73–3.28	0.25
TP53 mutation	0.77	0.3–1.99	0.59
CLARA			
Micro-complex karyotype	1.03	0.49–2.17	0.94
Complex karyotype	0.57	0.13–2.5	0.45
TP53 mutation	4.83	0.92–25.25	0.06

4. Conclusions

In conclusion, our results demonstrate that SNP-array analysis could represent a powerful and reproductive tool to better detect patients with poor prognosis, especially in patients who lack a favorable risk factor in conventional genetics. Indeed, these results demonstrate that a SNP-array could refine the stratification of adult AML by identifying patients with a micro-complex karyotype (defined by at least four SNP-array abnormalities) who present a higher risk of relapse. Additionally, this study allowed us to characterize the relationship between the micro-complex karyotype and its prognostic significance in the context of alternative consolidation regimens. The current report enlarges our previous published findings about the benefits of the clofarabine-based consolidation in younger AML patients with intermediate or unfavorable cytogenetics. We suggest that this effect could be restricted to AML with micro-complex karyotypes, which represent an outstanding marker as compared to complex karyotypes or TP53 mutations. However, broader prospective studies are required to further confirm the prognostic impact of micro-complex karyotypes.

Supplementary Materials

The following are available online at <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/1/88/s1>. Table S1: Patient characteristics at AML diagnosis.

Author Contributions

X.T. was the principal investigator of the CLARA study from the Acute Leukemia French Association (ALFA 0702 Trial); N.B., D.C., E.R., E.L., J.-P.M., C.B., A.P., N.V. and H.D. enrolled patients in the study; C.T. reviewed all cytogenetic data; H.D., C.T. and C.P. created the patient database; K.C.-L. ensured database management; L.F., S.G., N.D., M.H.C., A.M.-R. and P.P. performed genomic analysis; L.F. performed the research and wrote the manuscript; C.P. revised the manuscript, which was approved by all authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research received no external funding.

Acknowledgments

The authors thank all Acute Leukemia French Association (ALFA) investigators and French Innovative Leukemia Organization (FILO) investigators who participated in the ALFA-0702 trial. The authors thank Christophe Roumier and Olivier Nibourel (Tumour Bank for the Acute Leukemia French Association certification NF 96900-2014/65453-1, Centre Hospitalier Regional Universitaire Lille) for handling, conditioning, and storing patient samples. The work of all clinical research assistants is also acknowledged.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Döhner, H.; Estey, E.; Grimwade, D.; Amadori, S.; Appelbaum, F.R.; Büchner, T.; Dombret, H.; Ebert, B.L.; Fenaux, P.; Larson, R.A.; et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **2017**, *129*, 424–447. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Grimwade, D.; Hills, R.K.; Moorman, A.V.; Walker, H.; Chatters, S.; Goldstone, A.H.; Wheatley, K.; Harrison, C.J.; Burnett, A.K.; National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: Determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* **2010**, *116*, 354–365. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Renneville, A.; Abdelali, R.B.; Chevret, S.; Nibourel, O.; Cheok, M.; Pautas, C.; Duléry, R.; Boyer, T.; Cayuela, J.M.; Hayette, S.; et al. Clinical impact of gene mutations and lesions detected by SNP-array karyotyping in acute myeloid leukemia patients in the context of gemtuzumab ozogamicin treatment: Results of the ALFA-0701 trial. *Oncotarget* **2013**, *5*, 916–932. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Bullinger, L.; Krönke, J.; Schön, C.; Radtke, I.; Urbauer, K.; Botzenhardt, U.; Gaidzik, V.; Carió, A.; Senger, C.; Schlenk, R.F.; et al. Identification of acquired copy number alterations and uniparental disomies in cytogenetically normal acute myeloid leukemia using high-resolution single-nucleotide polymorphism analysis. *Leukemia* **2010**, *24*, 438–449. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Parkin, B.; Erba, H.; Ouillette, P.; Roulston, D.; Purkayastha, A.; Karp, J.; Talpaz, M.; Kujawski, L.; Shakhan, S.; Li, C.; et al. Acquired genomic copy number aberrations and survival in adult acute myelogenous leukemia. *Blood* **2010**, *116*, 4958–4967. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Jacoby, M.A.; Walter, M.J. Detection of copy number alterations in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2012**, *12*, 253–264. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Thomas, X.; de Botton, S.; Chevret, S.; Caillot, D.; Raffoux, E.; Lemasle, E.; Marolleau, J.P.; Berthon, C.; Pigneux, A.; Vey, N.; et al. Randomized Phase II Study of Clofarabine-Based Consolidation for Younger Adults With Acute Myeloid Leukemia in First Remission. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 1223–1230. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Duployez, N.; Boudry-Labis, E.; Roumier, C.; Boissel, N.; Petit, A.; Geffroy, S.; Helevaut, N.; Celli-Lebras, K.; Terré, C.; Fenneteau, O.; et al. SNP-array lesions in core binding factor acute myeloid leukemia. *Oncotarget* **2018**, *9*, 6478–6489. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Balsat, M.; Renneville, A.; Thomas, X.; de Botton, S.; Caillot, D.; Marceau, A.; Lemasle, E.; Marolleau, J.P.; Nibourel, O.; Berthon, C.; et al. Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With NPM1 Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 185–193. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Kuykendall, A.; Duployez, N.; Boissel, N.; Lancet, J.E.; Welch, J.S. Acute Myeloid Leukemia: The Good, the Bad, and the Ugly. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* **2018**, *38*, 555–573. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

B. Vers une approche personnalisée pour guider l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques des LAM de l'adulte jeune

La classification ELN 2017 permet de stratifier les LAM de l'adulte jeune selon trois groupes pronostiques distincts mais ne tient compte que d'un nombre restreint d'altérations cytogénétiques et moléculaires. Un modèle de prédiction multifactoriel – ou approche « banque de connaissance » – basé sur l'intégration de 100 paramètres clinico-biologiques a été récemment développé par Gerstung et al (Gerstung et al. 2017) afin de mieux apprécier le pronostic des LAM de l'adulte et de guider leur prise en charge thérapeutique, en particulier la décision d'HSCT en RC1. L'objectif de ce travail était de valider l'algorithme développé par Gerstung et al. (score de Gerstung) dans la cohorte des LAM de l'adulte jeune issue du protocole ALFA-0702, et d'évaluer la performance de cette approche dans la décision d'HSCT en RC1.

La prédiction de la survie globale (*Overall survival*, OS) selon l'approche de Gerstung était supérieure à celle de la classification pronostique de l'ELN 2017 (index de concordance : 68,9 vs 63,0).

Parmi les patients en RC1, l'HSCT en RC1 définie comme une variable temps-dépendant était délétère chez les patients de risque favorable selon l'ELN 2017 et chez ceux avec une MRD *NPM1* négative (tests d'interaction : $P=0,01$ et $P=0,02$, respectivement). En utilisant l'algorithme décrit par Gerstung pour prédire l'OS à 5 ans en l'absence d'HSCT en RC1, nous avons identifié, dans une analyse temps-dépendant similaire, une interaction significative entre le score de Gerstung et l'HSCT, avec un effet délétère de l'HSCT en RC1 chez les patients de bon pronostic selon le score de Gerstung (score de Gerstung ≥ 40 , test d'interaction : $P=0,01$).

Enfin, en intégrant l'ELN 2017, la MRD *NPM1* et le score de Gerstung parmi les 545 patients en RC1, 278 patients (51,0%) étaient des candidats à l'HSCT et 267 (49,0%) des candidats à la chimiothérapie de consolidation.

Ainsi, la combinaison de l'algorithme de Gerstung avec l'ELN 2017 et la MRD offre une approche personnalisée prometteuse pour optimiser l'indication d'HSCT dans les LAM de l'adulte jeune.

A Personalized Approach to Guide Allogeneic Stem Cell Transplantation in Younger Adults with Acute Myeloid Leukemia.

Authors: Laurène Fenwarth¹, Xavier Thomas², Stéphane de Botton³, Nicolas Duployez¹, Jean-Henri Bourhis³, Auriane Lesieur¹, Gael Fortin⁴, Paul-Arthur Meslin⁴, Ibrahim Yakoub-Agha⁵, Pierre Sujobert⁶, Pierre-Yves Dumas⁷, Christian Recher⁸, Delphine Lebon⁹, Céline Berthon^{1,10}, Mauricette Michallet², Arnaud Pigneux⁷, Stéphanie Nguyen¹¹, Sylvain Chantepie¹², Norbert Vey¹³, Emmanuel Raffoux¹⁴, Karine Celli-Lebras¹⁵, Claude Gardin¹⁶, Juliette Lambert¹⁷, Jean-Valère Malfuson¹⁸, Denis Caillot¹⁹, Sébastien Maury²⁰, Benoît Ducourneau^{1,21}, Pascal Turlure²², Emilie Lemasle²³, Cécile Pautas²⁰, Sylvie Chevret²⁴, Christine Terré²⁵, Nicolas Boissel²⁶, Gérard Socié²⁷, Hervé Dombret¹⁴, Claude Preudhomme^{1*}, Raphael Itzykson^{14,4*}.

*These authors contributed equally as senior authors.

Affiliations

¹Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, IRCL, UMR9020 – UMR1277 - Canther – Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France,

²Service d'hématologie clinique, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Lyon Sud, Pierre-Bénite, France,

³Département d'Hématologie, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France,

⁴Université de Paris, Génomes, biologie cellulaire et thérapeutique U944, INSERM, CNRS, F-75010 Paris, France,

⁵CHU de Lille, Univ Lille, INSERM U1286, Infinite, 59000 Lille, France,

⁶Service d'hématologie biologique, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Lyon Sud, Pierre-Bénite, France,

⁷Service d'hématologie et thérapie cellulaire, CHU Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France,

⁸Service d'hématologie, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Institut Universitaire du Cancer Toulouse – Oncopole, Toulouse, France,

⁹Service d'Hématologie clinique, CHU Amiens, France,

¹⁰Service d'Hématologie, CHU Lille, F-59000 Lille, France,

¹¹Service d'Hématologie clinique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, F-75013 Paris, France,

¹²Service d'hématologie clinique, CHU Caen, France,

¹³Service d'Hématologie, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France,

¹⁴Service Hématologie Adultes, Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, F-75010 Paris, France,

¹⁵Acute Leukemia French Association coordination office, IRSL, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

¹⁶Service d'Hématologie clinique, Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny, France,

¹⁷Département d'Hématologie clinique, Hôpital André Mignot, Centre Hospitalier de Versailles, Le Chesnay, France,

¹⁸Service d'Hématologie clinique, Hôpital d'Instruction des Armées Percy, Clamart, France,

¹⁹Service d'hématologie clinique, CHU Dijon, France,

²⁰Service d'Hématologie clinique, Hôpital Henri Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Créteil, France,

²¹Laboratoire d'hématologie, CH Valenciennes, France,

²²Service d'hématologie clinique, CHU Limoges, France,

²³Service d'hématologie, Centre Henri Becquerel, Rouen, France,

²⁴Service de biostatistiques et informatique médicale, Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, F-75010 Paris, France,

²⁵Laboratoire d'hématologie, CH Versailles, Le Chesnay, France

²⁶Service Hématologie Adolescents Jeunes Adultes, Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, F-75010 Paris, France

²⁷Service Hématologie Greffe, Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, F-75010 Paris, France.

Correspondence:

Raphael Itzykson

Service Hématologie Adultes, Hôpital Saint-Louis, 1 Avenue Claude Vellefaux, F-75010 Paris, France

email: raphael.itzykson@aphp.fr

Phone: +33 1 71 20 70 31

Fax: +33 1 42 38 51 28

Running title: Personalized Approach to guide HSCT in AML

Main Text: 4005 words

Abstract: 240 words

Number of references: 51

Number of figures/tables: 5

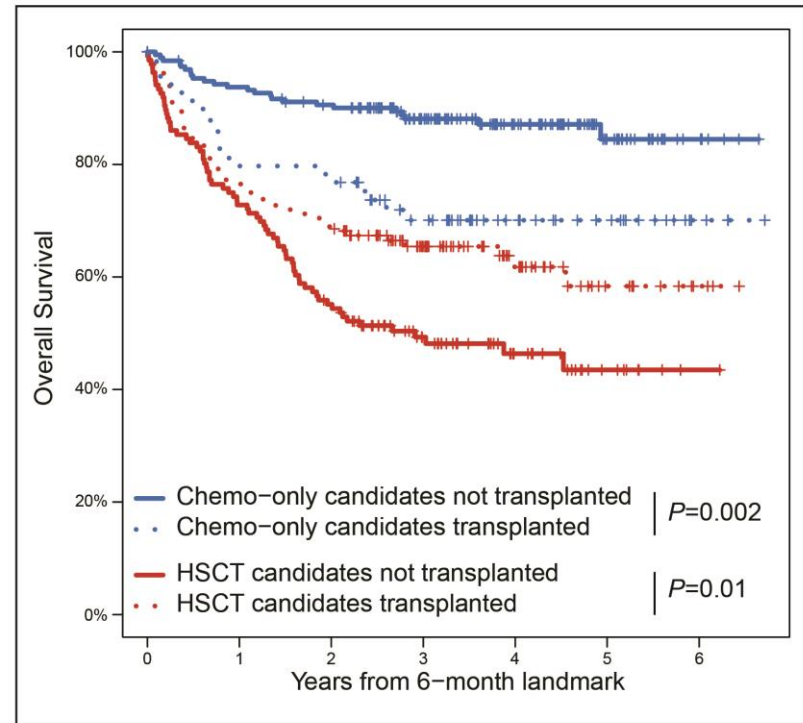
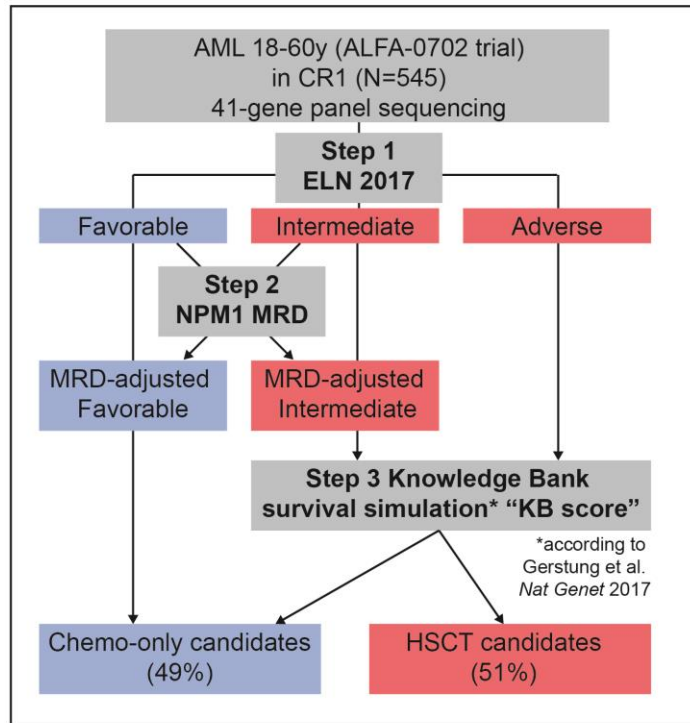
Key Points

*A knowledge-bank (KB) algorithm provides more accurate outcome prediction than the current ELN risk stratification.

*The decision to perform HSCT in first CR in AML can be personalized by integrating ELN 2017 risk, *NPM1* MRD, and KB simulation.

Visual Abstract

A Personalized Approach to Guide HSCT Indication in Younger Adults with AML



Abstract

A multistage model instructed by a large dataset (knowledge bank [KB] algorithm) has recently been developed to improve outcome prediction and tailor therapeutic decision, including hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in AML. We assessed the performance of the KB in guiding HSCT decision in first complete remission (CR1) in 656 AML patients younger than 60 years from the ALFA-0702 trial (NCT00932412). KB predictions of Overall Survival (OS) were superior to those of European LeukemiaNet (ELN) 2017 risk stratification (C-index 68.9 versus 63.0).

Among patients reaching CR1, HSCT in CR1, as a time-dependent covariate was detrimental in those with favorable ELN 2017 risk and those with negative *NPM1* MRD (interaction tests $P=0.01$ and $P=0.02$, respectively). Using KB simulations of survival at 5 years in a scenario without HSCT in CR1 (KB score), we identified in a similar time-dependent analysis a significant interaction between the KB score and HSCT, with HSCT in CR1 being detrimental only in patients with a good prognosis based on KB simulations (KB score ≥ 40 , interaction test $P=0.01$). We could finally integrate ELN 2017, *NPM1* MRD and KB scores to sort 545 CR1 patients into 278 (51.0%) HSCT candidates and 267 (49.0%) chemo-only candidates. In both time-dependent and 6-month landmark analyses, HSCT significantly improved OS in HSCT candidates while it significantly shortened OS in chemo-only candidates. Integrating KB predictions with ELN 2017 and MRD may thus represent a promising approach to optimize HSCT timing in younger AML patients.

Introduction

The decision to proceed to allogeneic stem cell transplantation (HSCT) is the mainstay of precision medicine in newly diagnosed AML patients younger than 60 years achieving a first complete remission (CR1) with intensive chemotherapy.^{1,2}

Risk stratification was initially based on a limited set of recurrent cytogenetic and genetic lesions.³⁻⁵ The recent European LeukemiaNet (ELN) 2017 stratification also accounts for the allelic ratio of *FLT3* internal tandem duplications (*FLT3*-ITDs),⁶⁻⁹ and mutations in *TP53*, *RUNX1* or *ASXL1*.¹⁰

Current guidelines on the timing of HSCT in AML have been informed by pivotal ‘donor versus no donor’ studies demonstrating that, in patients with favorable genetic risk, HSCT led to similar long-term outcome compared to other post-remission therapies.¹⁰⁻¹³ These ‘genetic randomization’ studies became less relevant with the expanding use of donors others than HLA-identical siblings.^{14,15} Authors have also considered HSCT as a time-dependent covariate to control for the immortal time bias.¹⁶⁻¹⁹

Collectively, these studies confirmed the benefit of HSCT in adverse risk patients, with conflicting data for intermediate risk patients. None of them identified a subset of patients with a significant benefit of chemotherapy-based consolidation compared to HSCT.^{11-13,16-18}

Minimal residual disease (MRD) is also increasingly used to predict the benefit of HSCT in AML. Transcript-based MRD can identify the subset of *NPM1* mutated patients who benefit from HSCT.^{20,21}

Papaemmanuil et al. previously described the mutational landscape of 111 genes in 1,540 AML patients accrued between 1993 and 2004 in German-Austrian AML Study Group (AML5SG) trials.²² Gerstung et al applied on this cohort a multistage model with random effects to generate a ‘knowledge bank’ (KB) that integrates clinical, cytogenetic, genetic, and treatment (HSCT) variables. The resulting KB algorithm generates personalized survival simulations.²³ Because of improvements in AML management since accrual of this training cohort,²⁴ KB simulations may not necessarily match the outcome of patients treated in more recent years. However, KB predictions, used as continuous prognostic scores, have been shown to predict prognosis more accurately than ELN risk stratifications.^{23,25}

The KB algorithm can also simulate the survival of a given patient in different treatment scenarios, including HSCT in CR1 or HSCT deferred beyond relapse. Gerstung et al proposed to

use the differences between these simulations to estimate the benefit of HSCT in CR1. Whether the KB algorithm can indeed identify HSCT candidates has yet to be validated. Here we integrate KB predictions with ELN 2017 and *NPM1* MRD to identify patients benefiting from HSCT in CR1 in a cohort of 656 patients prospectively enrolled in the ALFA-0702 trial.

Patients and Methods

Patients and treatment

The ALFA-0702 trial (ClinicalTrials.gov NCT00932412) was a phase II multicenter randomized study including 18-59 years-old patients with newly diagnosed de novo AML, excluding Acute Promyelocytic and Core Binding Factor Leukemias. Patients achieving complete remission (CR) defined per international criteria,²⁶ or CR with incomplete platelet recovery (platelet count < 100 x10⁹/L, CRp)²⁷ after a daunorubicin and cytarabine timed sequential induction chemotherapy (with or without a high-dose cytarabine based salvage course) and with protocol-defined non-favorable risk (**Supplementary Table 1**), were eligible for HSCT in first CR/CRp (henceforth CR1). In the absence of HLA-matched donor (sibling or 10/10 matched unrelated donor) or if otherwise ineligible for HSCT, they were randomly assigned to receive either 3 cycles of high-dose cytarabine (HDAC) or 3 cycles of clofarabine associated with intermediate-dose cytarabine (CLARA) as consolidation regimen. Patients with protocol-defined favorable risk were not randomized and received 3 HDAC cycles. Results of the CLARA randomization have previously been published.²⁸ Of 713 patients included in the trial, 656 (92.0%) had DNA available at inclusion for centralized genomic analyses (**Supplementary Figure 1**).

Targeted sequencing

Bone marrow samples from AML patients at diagnosis were studied by targeted sequencing of 41 recurrently mutated genes (**Supplementary Table 2**). All diagnosis samples were screened for the presence of *FLT3*-ITDs by fragment analysis as previously described.²⁰ High and low *FLT3*-ITDs were defined per ELN 2017 guidelines.¹⁰ Over 50 recurrent gene rearrangements and *KMT2A* partial tandem duplications (*KMT2A*-PTD) were sought using ligation-dependent RT-PCR amplification.²⁹ Further details are provided in the **Supplementary Appendix**.

NPM1 MRD

Methods are detailed in the **Supplementary Appendix**. A > 4 log reduction in peripheral blood MRD after the first induction course was used to define MRD negativity, a threshold previously shown to indicate HSCT benefit in patients with both typical (A/B/D) and non-typical *NPM1* mutations.^{20,21}

Definitions

ELN 2017 classification was applied retrospectively, after central review of cytogenetics and gene mutations, accounting for RT-PCR results when available.¹⁰ Conditioning regimens were classified as myeloablative (MAC) or reduced intensity (RIC) according to recommendations.³⁰

Knowledge bank algorithm

Variables were recoded according to Gerstung et al.²³ Missing data was imputed as previously reported,^{23,25} using the original AMLSG dataset that served to derive the KB algorithm.²² We then ran the KB algorithm as published,²³ to simulate the survival of each patient in the absence of HSCT in CR1. We further refer to the 5-year overall survival from diagnosis estimated by these simulations as the ‘KB score’, a continuous variable ranging from 0 to 100, with lower KB score indicating worse prognosis. Further KB simulations are indicated in the **Supplementary Methods and Supplementary Table 3**.

Statistical analysis

Data are summarized as numbers and percentages or medians and ranges or interquartile ranges (IQR). Group comparisons were carried with Fisher tests for categorical variables, Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests for continuous variables with 2 or >2 groups, respectively. Overall Survival (OS) was defined as the time-interval between inclusion in the ALFA-0702 trial and death or loss of follow-up. Disease-free survival (DFS) was computed from the date of CR1 until relapse, death or loss to follow-up, whichever came first. Survival distributions were done

with the Kaplan-Meier estimator. Follow-up was computed with the inverse method.³¹ Univariate and multivariate analyses were carried with log-rank tests and Cox models, respectively. The proportional hazard assumption was validated by visual inspection and testing of Schöenfeld residuals.³² Multicollinearity was inspected by studying the variance inflation factor (VIF), considering $VIF > 4$ as unacceptable.³³ To measure the goodness-of-fit of prognostic models, Harrell's concordance indexes (C-indexes)³⁴ were obtained after bootstrap cross validation trained from 100 samples, with R package *pec*. The impact of HSCT on OS was studied in patients reaching CR1, with a landmark at 45 days from inclusion considering HSCT in CR1 as a time-dependent covariate, using the method of Simon-Makuch for survival curves³⁵ and the Mantel-Byar method for group comparisons.³⁶ Multivariate analyses were carried with Andersen-Gill models.³⁷ Interaction analyses between HSCT and covariates were tested by introducing interaction terms in multivariable models, and forest plots displayed with the R package *anoimt*. Analyses were performed with R 3.5.3 (cran.r-project.org).

Results

Patients characteristics

Median age of the 656 genotyped patients was 46 years (range 18 – 60, **Table 1**), comparable to the 57 patients without centralized genomics (**Supplementary Table 4**). Of 147 (22.4%) *FLT3*-ITD patients, 87 (13.3%) and 60 (9.1%) had low (< 0.5) and high (≥ 0.5) allelic ratios respectively (**Supplementary Figure 2**). ELN 2017 risk was favorable, intermediate and adverse in 231 (35.2%), 194 (29.6%) and 222 (33.8%) patients respectively. Nine (1.4%) patients were not classified by ELN 2017 due to missing cytogenetics and lack of stratifying mutation (**Supplementary Table 5**). With a median follow-up of 4.2 years (95%CI 4.0 - 4.4), 5-year OS was 58.2% (95%CI 54.3-62.4%). CR1 was achieved in 563 (85.8%) patients after one (N=525) or two (N=38) courses. Median interval between inclusion and CR1 was 45 days (range 23-124 days). A population of 545 CR1 patients could be analyzed for HSCT benefit after exclusion of the 9 patients with unknown ELN 2017 risk and of 9 patients relapsing before the day 45 landmark chosen for those analyses ('HSCT eligible' population, **Table 1, Supplementary Figure 1**). Their 5-year DFS and OS from CR1 was 56.1% (95%CI 51.7-60.8%) and 64.9%

(95%CI 60.5-69.6%), respectively. Ninety-one (16.7%) received clofarabine-based (CLARA) instead of HDAC courses.

Prognostic role of European LeukemiaNet 2017 classification

Five-year OS was 77.0% (95%CI 71.7-82.7%), 57.0% (95%CI 50.0-64.9%) and 40.0% (95%CI 33.4-47.8%) in patients with favorable, intermediate and adverse risk, respectively (log-rank test $P<10^{-5}$, **Supplementary Figure 3A**). CR1 was achieved in 219 (94.8%) favorable, 166 (85.6%) intermediate, and 160 (72.1%) adverse ELN 2017 risk patients ($P<10^{-5}$). DFS also varied significantly according to ELN 2017 risk with 5-year estimates of 72.1% (95%CI 66.4-78.4%), 53.7% (95%CI 46.3-62.3%) and 36.3% (95%CI 28.1-46.8%) in patients with favorable, intermediate and adverse risk respectively (overall log-rank test $P<10^{-5}$, **Supplementary Figure 3B**). Differences in CR rates, OS and DFS according to *FLT3*-ITD allelic ratio did not reach statistical significance (**Supplementary Figure 4**).

Prognostic value of the Knowledge-bank algorithm

Of the 100 variables (16 clinical, 26 cytogenetic and 58 molecular) that can instruct KB predictions, 3 clinical (LDH, hemoglobin, splenomegaly) and 24 genetic variables were unavailable. The mutation frequency of these 24 genes was at most 5.4% in the AMLSG cohort that served to develop the KB.²³ Data in the remaining 73 variables was missing in less than 5% of patients. After imputation of missing data as recommended by Gerstung et al,²³ we derived for each patient a 'KB score' ranging from 0 to 100, with lower values potentially indicating worse prognosis (**Supplementary Figure 5**). As a continuous variable, a higher KB score was associated with a lower risk of death (OS: HR=0.65, 95% CI 0.60-0.71 for a 10% increase in KB score, $P<10^{-5}$) or failure beyond CR (DFS: HR=0.74, 95% CI: 0.68-0.80, $P<10^{-5}$). For graphical purposes, we binned KB scores in three arbitrary groups. Patients with a KB score <20 (N=180), 20-39 (N= 268) or ≥ 40 (N= 208) had 5y-OS of 31.9% (95% CI 25.4-40.2%), 57.5% (95% CI 51.4-64.4%) and 81.6% (95% CI 76.2-87.4%, log-rank test $P<10^{-5}$, **Figure 1A**), and 5y-DFS of 37.0% (95% CI 29.4-46.5%), 51.1% (95% CI 43.3-60.3%) and 73.1% (95% CI 67.0-79.8%, log-rank test $P=0.004$, **Figure 1B**). ELN 2017 risk stratification and KB score (as a continuous

variable) were correlated with median KB scores of 45.2 [IQR 35.1-57.8], 29.3 [IQR 21.1-37.0] and 18.3 [IQR 7.0-28.8] in patients with favorable, intermediate and adverse ELN 2017, respectively ($P < 10^{-5}$, **Supplementary Figure 6**). As a continuous variable, the KB score had increased predictive value compared to ELN 2017 stratification, with bootstrapped C-indexes of 68.9 versus 63.0 respectively for OS and 65.4 versus 60.4 respectively for DFS. Even after arbitrary discretization as in **Figure 1**, the bootstrapped C-indexes of KB score categories were 67.0 and 62.5 for OS and DFS, respectively, thus still superior to ELN 2017 (63.0 and 60.4, respectively).

Prediction of HSCT benefit with MRD-adjusted ELN 2017 risk

Of the 545 patients eligible for HSCT in CR1, 276 (50.6%) were transplanted in CR1, including 53, 106 and 117 patients with favorable, intermediate and adverse ELN 2017 risk, corresponding to 24.2%, 63.9% and 73.1% of each risk group, respectively. HSCT was done after myeloablative (N=178) or reduced intensity (N=94) conditioning (conditioning not available in N=4) from a matched related donor (N=120), a matched unrelated donor (N=137) or an alternative donor (N=19).

Considering HSCT as a time-dependent covariate in a bivariate analysis adjusted on ELN 2017 risk, the impact of HSCT was detrimental on OS from the day 45 landmark in patients with favorable risk AML (HR=2.78, 95% CI 1.50-5.12, $P=0.001$), and overall neutral in those with intermediate (HR=0.68, 95% CI 0.40-1.13, $P=0.14$) or adverse risk (HR=0.87, 95% CI 0.53-1.45, $P=0.59$), with a significant interaction between ELN 2017 risk categories and HSCT ($P=0.01$, **Figure 2**).

MRD was available in 143 (65.0%) of the 220 *NPM1*-mutated patients eligible for HSCT in CR1. Of those, 106 (74.1%) had a negative MRD after the first induction course. As previously published,^{20,21} there was a significant interaction between MRD and HSCT benefit (interaction test $P=0.02$), with MRD negativity being associated with a significant detriment of HSCT (HR=4.37, 95% CI 1.71-11.17, $P=0.002$, **Figure 2**). We next considered an MRD-adjusted ELN 2017 risk stratification to identify a potential benefit of HSCT in CR1. Fourteen patients with intermediate ELN 2017 risk but negative MRD were re-assigned to the favorable risk group and

27 patients with favorable ELN 2017 risk but a positive MRD to the intermediate risk group, resulting in a total of 206 favorable risk ‘chemo-only candidates’, and 339 ‘HSCT candidates’ (step 2, **Figure 3**). Of those, 215 (63.4%) ‘HSCT candidates’ and 61 (29.6%) ‘Chemo-only candidates’ were transplanted in CR1 based on ALFA-0702 recommendations and investigator’s choice (**Supplementary Figure 7A**). In a time-dependent analysis, the impact of HSCT on OS from day 45 landmark was not significantly beneficial in the 339 ‘HSCT candidates’ (HR=0.80, 95% CI 0.57-1.12, $P=0.19$) and was significantly detrimental in the 206 ‘Chemo-only candidates’ (HR=4.21, 95% CI 2.16-8.20, $P<10^{-5}$), again with a significant interaction between the post-remission stratification and HSCT ($P=3\times 10^{-5}$, **Supplementary Figure 7B**). Therefore, an *NPM1* MRD adjusted ELN 2017 risk classification can identify patients for whom HSCT in CR1 is detrimental but is not sufficient to robustly identify patients benefiting from HSCT in CR1.

Prediction of HSCT benefit with the KB algorithm

We next investigated whether the KB algorithm could identify patients benefiting from HSCT in CR1. We first attempted to validate the approach published by Gerstung et al., where the KB algorithm is used to simulate the survival of each patient with versus without HSCT in CR1 (see **Methods supra**), and differences in simulated survival are used to guide HSCT decision. This first approach was not validated in our dataset (details in **Supplementary Methods, Supplementary Results and Supplementary Figure 8**). Because the benefit of HSCT is often confined to patients with poorer prognosis, and because of the strong prognostic value of the KB score, we alternatively inspected whether a lower KB score could predict HSCT benefit. A systematic inspection of various cutoffs for the KB score identified a threshold value of 40 as optimal for the discrimination of HSCT benefit (**Supplementary Methods, Supplementary Figure 9**). Of the 545 patients eligible for HSCT in CR1, 355 (65.1%) had a KB score lower than 40, of whom 218 (61.4%) were actually transplanted in CR1. In those 355 patients, there was no significant benefit of HSCT in CR1 (HR=0.93, 95% CI 0.67-1.29, $P=0.68$), whereas HSCT was detrimental in the 190 patients with a KB score of 40 or higher (HR=3.00, 95% CI 1.38-6.50, $P=0.005$), with a significant interaction between HSCT and this KB score threshold ($P=0.01$, **Figure 2**).

HSCT decision integrating ELN 2017, MRD and the KB score

We finally sought to combine the MRD-adjusted ELN stratification with this KB score threshold to optimally identify patients in whom HSCT in CR1 induces a survival benefit. For that purpose, we further refined the definition of ‘HSCT candidates’ as those with non-favorable MRD-adjusted ELN risk and a KB score less than 40. Though there was still a significant association between a KB score < 40 and higher MRD-adjusted risk (Fisher test $P < 10^{-5}$, **Supplementary Figure 10**), 47 (26.3%) of the 179 patients with intermediate MRD-adjusted risk and 14 (8.8%) of the 160 adverse risk patients had a KB score ≥ 40 and were reclassified as ‘chemo-only candidates’, leaving 278 (51.0%) of the 545 patients as ‘HSCT candidates’ and the remaining 267 (49.0%) patients as ‘Chemo-only candidates’ (step 3, **Figure 3**). Among intermediate-risk patients, HSCT candidates were significantly older ($P < 10^{-5}$), had higher bone marrow blast percentages ($P = 0.0009$), more frequent spliceosome gene mutations (14.4% vs 0%, $P = 0.004$) and less frequent *NPM1* mutations (21.2% vs 42.6%, $P = 0.007$) than chemo-only candidates. Among adverse-risk patients, the 14 patients that were predicted not to benefit from transplant in CR1 were younger ($P < 10^{-5}$), more frequently harbored *KMT2A*-PTD (21.4% vs 4.1%, $P = 0.03$) but never presented with monosomal karyotype (0% versus 23.1%, $P = 0.07$, **Supplementary Table 6**).

One hundred eighty-five (66.5%) ‘HSCT candidates’ and 91 (34.1%) ‘Chemo-only candidates’ were transplanted in CR1 in the ALFA 0702 study. The repartition of the 66 transplanted done beyond relapse is shown on **Figure 3**. In a time-dependent analysis, there was a strong interaction between this integrated transplant indication and the outcome of HSCT ($P = 1.5 \times 10^{-5}$). Transplantation in CR1 was detrimental in chemo-only candidates (HR=3.19, 95% CI 1.81-5.61, $P = 5 \times 10^{-5}$) but was associated with a significant benefit in OS from the day 45 landmark in ‘HSCT candidates’ (HR=0.67, 95% CI 0.47-0.96, $P = 0.03$, Simon-Makuch plot in **Supplementary Figure 11**). Based on C-indexes and proportion of HSCT candidates, this stringent HSCT policy, requiring both an MRD-adjusted ELN 2017 intermediate or adverse risk and a KB score lower than 40 to indicate HSCT, represented an optimal compromise between prediction of HSCT benefit and number of patients requiring an HSCT, compared to a liberal policy requiring either a non-favorable MRD-adjusted ELN 2017 risk or a KB score lower than

40, or a transplant indication solely guided by either MRD-adjusted ELN 2017 or KB score (**Supplementary Figure 10**).

Finally, in a landmark analysis at 6 months from inclusion, when 529 (97.1%) of the 545 HSCT eligible patients were still alive and 201 (72.8%) of the 276 HSCTs in CR1 had been performed, the OS of transplant recipients from the 6-month landmark was significantly longer (5y-OS 58.4%, 95% CI 48.4-70.3%) than that of non-transplanted patients (43.5%, 95% CI 34.5-54.8%, $P=0.01$) among ‘HSCT candidates’ based on the stringent HSCT policy, while amongst ‘chemo-only candidates’, HSCT significantly reduced OS (70.1%, 95% CI 59.8-82.1%) versus 84.5%, 95% CI 77.7-91.8%, $P=0.002$), again with a significant interaction between transplant indication and HSCT ($P=9.10^{-5}$, **Figure 4**).

Discussion

By studying a cohort of 656 patients prospectively enrolled in the ALFA-0702 trial with targeted sequencing of 41 genes, we showed that ELN 2017, *NPM1* MRD and the KB algorithm can be integrated to refine HSCT indication in AML.

Our study population consisted of patients younger than 60 eligible for intensive chemotherapy, thus representing the core population of patients eligible for HSCT in daily practice. The high exhaustivity (92%) of centralized genomics and the multicentric nature of the ALFA-0702 academic trial limit the selection biases inherent to these studies. Indeed, the genetic spectrum in our cohort agreed with previous findings in comparable populations.^{4,22} Only 1.4% of patients could not be classified in the ELN 2017 system. Though our analyses confirm the prognostic relevance of ELN risk system, we found limited differences in OS and DFS between patients with high and low allelic ratios of *FLT3*-ITDs, as also found by others.^{38,39} This result, which is discrepant from previous reports,^{6,40} stresses the need to interrogate some of the modifications operated during the 2017 update of ELN guidelines on the basis of large consortiums.⁴¹

We could confirm previous results on smaller patient cohorts regarding the clear superiority of KB over ELN stratification in predicting outcome,²⁵ with bootstrapped C- indexes of 68.9 versus 63.0 respectively for the prediction of OS. These values notably point to the need for further improvement of ELN risk stratification. As previously shown,^{23,25} the predictive power of the KB

is robust to missing data, though the clinical parameters unavailable in the ALFA-0702 trial (LDH, hemoglobin and splenomegaly) had limited individual predictive power in the KB dataset,²² and the genes not assessed by targeted sequencing in our study are infrequently mutated in AML and have limited prognostic impact.^{4,22,42} For graphical purposes, we have discretized results from the KB predictions (**Figure 2**). C-indexes for such arbitrary discretization were still superior to ELN 2017 for OS and DFS, but how this continuous score should be implemented in daily practice for prognostication remains to be addressed.

Choosing who to transplant in CR1 remains the main question in the management of younger AML patients treated intensively. In recent years and in the absence of randomized trials, time-dependent analysis has become a robust tool to interrogate the benefit of HSCT in defined patient subgroups.¹⁶⁻¹⁸ In the ALFA-0702, HSCT indication was guided by trial-specific criteria inspired by ELN 2010. As a result, the proportion of patients who underwent HSCT was, to some extent, balanced between ELN 2017 categories, thus limiting the biases inherent to these uncontrolled analyses. Information on donor availability was lacking in the ALFA-0702 study, precluding a formal ‘donor versus no donor’ comparison. We confirmed that favorable risk AML does not benefit from HSCT in CR1,^{6-9,16-18} especially when accounting for *NPM1* MRD to reassign patients with a favorable genotype but a positive to the intermediate risk group, and those with intermediate genotype but negative MRD to the favorable group.^{20,21} However, even such an ‘MRD adjusted’ ELN risk stratification could not robustly identify the subset of patients with a clear survival benefit of HSCT after CR1.

The multistage model of Gerstung et al accounts for the risk of relapse and non-relapse mortality at all times, thus theoretically allowing to capture the risks and benefits of performing an HSCT either in CR1 or later, after relapse. In the KB development cohort, 12% of patients were predicted to derive an OS benefit > 10% by timing HSCT in CR1. In our cohort, a similar approach led to identify 111 (20.4%) such CR1 patients, but we found no differential effect of HSCT in those patients (interaction test: $P=0.27$, details in **Supplementary Results**). It is possible that estimation of non-relapse mortality by the KB, which has been developed based on data from patients transplanted between 1993 and 2004 after different post-remission consolidations,²² does not provide an accurate risk/benefit evaluation of HSCT in more recent decades, given the continued improvement of the procedure.² This stresses the need for a

continuous update of KB with more recent datasets. Another caveat of the multistage model underlying the current KB algorithm is that it does not explicitly estimate the proportion of patients who can achieve a second CR after relapse and be successfully transplanted in CR2. However, the overall benefit of this strategy remains questionable.⁴³

We thus turned to an alternative way to refine HSCT indications based on KB predictions. Since the benefit of HSCT in CR1 has consistently been shown to be highest in patients with poor prognosis,^{2,17,23} we simulated the long-term (5-year) OS of each patient in a scenario without HSCT in CR1. Simulating survival rather than incidence of relapse may better capture the benefit of salvage on long-term outcome. The resulting ‘KB score’ ranges from 0 to 100, with lower values indicating worse outcome. We identified a KB score of 40 or lower as the best threshold to identify the benefit of HSCT in CR1. Expectedly, there was a significant overlap between MRD-adjusted ELN 2017 and this KB-guide rule for HSCT allocation. However, combining these systems reclassified 26.3% of intermediate and 8.8% of adverse risk patients in CR1 in the ‘chemo-only’ group that may not need HSCT in CR1. Though some demographic, clinical and molecular differences were identified between these reclassified patients and those from their cognate ELN 2017 risk category, none could substitute the KB approach, strengthening the relevance of this machine learning tool for accurate risk profiling in AML.

This combined stratification strongly interacted with the benefit of HSCT in both time-dependent and 6-month landmark analyses. The 278 ‘transplant candidates’ derived a significant OS benefit from HSCT in CR1, when HSCT significantly impaired OS in the 267 ‘chemo-only candidates’. This stratification seems superior to previous ones, where non-significant differences were found in the favorable risk group,^{16,18} and comforts integration of MRD and the KB algorithm to optimize the use of HSCT in CR1. Importantly, this stringent HSCT policy identified patients likely to benefit from transplant better than more liberal policies (**Supplementary Figure 10**). This suggests that the current KB alone cannot substitute for MRD to identify among ‘favorable-risk’ patients those at higher risk of relapse.^{20,44}

As all machine learning approaches, the internal logic of the KB algorithm is a ‘black box’.⁴⁵ KB simulations can be made through web-based tools. We have derived a similar tool to guide HSCT indication according to our strategy in daily practice (<https://alfa-group.shinyapps.io/alfa-hsct/>).

Further improvements in personalized HSCT decisions are needed. They will require refined multistage models, accounting for CR2 and transplant modalities, more recent patient data capturing the continued improvement in AML management,⁴⁶ such as new disease-modifying agents (eg FLT3 inhibitors),⁴⁷ and progresses in transplantation techniques.⁴⁸ Finally, personalized predictions integrating recently developed prognostic gene expression profiles,⁴⁹ or other MRD techniques suited for *NPM1* wildtype patients,^{50,51} are an area of future investigation. Until then, implementation of our personalized, integrated, HSCT decision tool will require prospective evaluation in clinical trials integrating upfront chemotherapy with transplant strategy.

Acknowledgements

The authors are indebted to all investigators and clinical research associates from the ALFA group, to Sandrine Geffroy, Maxime Bucci and Fabien Subtil for technical help. LF has received grants from Association Action Leucémies and Fondation I-SITE ULNE. RI is supported by grants from Association Laurette Fugain, Association Princesse Margot, Association pour la Recherche contre le Cancer, Fondation Leucémie Espoir, and Ligue Contre le Cancer. ND is supported by the North-West Canceropole (GIRCI AAP-AE 2018).

This study was funded by the French National Institute (PHRC 2007/1911 and PRTK TRANSLA10-060).

Authorship Contributions

LF, BD and ND performed the sequencing analyses and interpreted the genomic data. AL, LF, BD, ND and NB performed and interpreted MRD analyses. LF and RI designed the study, assembled and analyzed the data and drafted the manuscript. HD, CPr and RI supervised the study. XT, SdB, JHB, IYA, PYD, CB, MM, AP, SN, SC, NV, ER, KCL, DC, SM, BD, PT, EL, CR, DL, CG, JL, JVM, CPa and GS provided clinical data. PS analyzed the data. GF and PAM designed the web application. SC supervised management of the clinical data. CT centrally reviewed cytogenetics data. All authors revised the manuscript and accepted its final version.

Disclosure of Conflicts of Interest

The authors have no relevant conflict of interest to disclose.

References

1. Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;127(1):53-61.
2. Cornelissen JJ, Blaise D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. *Blood*. 2016;127(1):62-70.
3. Grimwade D, Walker H, Harrison G, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*. 2001;98(5):1312-1320.
4. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1079-1089.
5. Dohner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115(3):453-474.
6. Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, et al. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood*. 2014;124(23):3441-3449.
7. Pratcorona M, Brunet S, Nomdedeu J, et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood*. 2013;121(14):2734-2738.
8. Versluis J, In 't Hout FE, Devillier R, et al. Comparative value of post-remission treatment in cytogenetically normal AML subclassified by NPM1 and FLT3-ITD allelic ratio. *Leukemia*. 2017;31(1):26-33.

- 9.Ho AD, Schetelig J, Bochtler T, et al. Allogeneic Stem Cell Transplantation Improves Survival in Patients with Acute Myeloid Leukemia Characterized by a High Allelic Ratio of Mutant FLT3-ITD. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(3):462-469.
- 10.Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-447.
- 11.Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008;358(18):1909-1918.
- 12.Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA*. 2009;301(22):2349-2361.
- 13.Majhail NS, Farnia SH, Carpenter PA, et al. Indications for Autologous and Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(11):1863-1869.
- 14.Ciurea SO, Zhang MJ, Bacigalupo AA, et al. Haploidentical transplant with posttransplant cyclophosphamide vs matched unrelated donor transplant for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015;126(8):1033-1040.
- 15.Rashidi A, Hamadani M, Zhang MJ, et al. Outcomes of haploidentical vs matched sibling transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission. *Blood Adv*. 2019;3(12):1826-1836.
- 16.Burnett AK, Hills RK, Milligan DW, et al. Attempts to optimize induction and consolidation treatment in acute myeloid leukemia: results of the MRC AML12 trial. *J Clin Oncol*. 2010;28(4):586-595.
- 17.Cornelissen JJ, Breems D, van Putten WL, et al. Comparative analysis of the value of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in acute myeloid leukemia with monosomal karyotype versus other cytogenetic risk categories. *J Clin Oncol*. 2012;30(17):2140-2146.
- 18.Schlenk RF, Dohner K, Mack S, et al. Prospective evaluation of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation from matched related and matched unrelated donors in younger adults

with high-risk acute myeloid leukemia: German-Austrian trial AMLHD98A. *J Clin Oncol.* 2010;28(30):4642-4648.

19.Giobbie-Hurder A, Gelber RD, Regan MM. Challenges of guarantee-time bias. *J Clin Oncol.* 2013;31(23):2963-2969.

20.Balsat M, Renneville A, Thomas X, et al. Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With NPM1 Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *J Clin Oncol.* 2017;35(2):185-193.

21.Lesieur A, Thomas X, Nibourel O, et al. Minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia with non-A/B/D-NPM1 mutations by digital PCR: feasibility and clinical use. *submitted.* 2020.

22.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.

23.Gerstung M, Papaemmanuil E, Martincorena I, et al. Precision oncology for acute myeloid leukemia using a knowledge bank approach. *Nat Genet.* 2017;49(3):332-340.

24.Burnett AK, Hills RK, Russell N. Twenty five years of UK trials in acute myeloid leukaemia: what have we learned? *Br J Haematol.* 2020;188(1):86-100.

25.Huet S, Paubelle E, Lours C, et al. Validation of the prognostic value of the knowledge bank approach to determine AML prognosis in real life. *Blood.* 2018;132(8):865-867.

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. *J Clin Oncol.* 2003;21(24):4642-4649.

27.Sievers EL, Larson RA, Stadtmauer EA, et al. Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol.* 2001;19(13):3244-3254.

28. Thomas X, de Botton S, Chevret S, et al. Randomized Phase II Study of Clofarabine-Based Consolidation for Younger Adults With Acute Myeloid Leukemia in First Remission. *J Clin Oncol*. 2017;35(11):1223-1230.
29. Ruminy P, Marchand V, Buchbinder N, et al. Multiplexed targeted sequencing of recurrent fusion genes in acute leukaemia. *Leukemia*. 2016;30(3):757-760.
30. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(12):1628-1633.
31. Korn EL. Censoring distributions as a measure of follow-up in survival analysis. *Stat Med*. 1986;5(3):255-260.
32. Grambsch PM, Therneau TM. Proportional Hazards Tests and Diagnostics Based on Weighted Residuals. *Biometrika*. 1994;81(3):515-526.
33. O'Brien RM. A Caution Regarding Rules of Thumb for Variance Inflation Factors. *Quality & Quantity*. 2007;41(5):673-690.
34. Harrell FE, Jr., Lee KL, Mark DB. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med*. 1996;15(4):361-387.
35. Simon R, Makuch RW. A non-parametric graphical representation of the relationship between survival and the occurrence of an event: application to responder versus non-responder bias. *Stat Med*. 1984;3(1):35-44.
36. Mantel N, Byar DP. Evaluation of Response-Time Data Involving Transient States: An Illustration Using Heart-Transplant Data. *Journal of the American Statistical Association*. 1974;69(345):81-86.
37. Andersen PK, Gill RD. Cox's Regression Model for Counting Processes: A Large Sample Study. *Ann Statist*. 1982;10(4):1100-1120.
38. Harada Y, Nagata Y, Kihara R, et al. Prognostic analysis according to the 2017 ELN risk stratification by genetics in adult acute myeloid leukemia patients treated in the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) AML201 study. *Leuk Res*. 2018;66:20-27.

39. Boddu PC, Kadia TM, Garcia-Manero G, et al. Validation of the 2017 European LeukemiaNet classification for acute myeloid leukemia with NPM1 and FLT3-internal tandem duplication genotypes. *Cancer*. 2019;125(7):1091-1100.
40. Dohner K, Thiede C, Jahn N, et al. Impact of NPM1/FLT3-ITD genotypes defined by the 2017 European LeukemiaNet in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2019.
41. Angenendt L, Rollig C, Montesinos P, et al. Chromosomal Abnormalities and Prognosis in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia: A Pooled Analysis of Individual Patient Data From Nine International Cohorts. *J Clin Oncol*. 2019;37(29):2632-2642.
42. TCGA TCGAC. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059-2074.
43. Forman SJ, Rowe JM. The myth of the second remission of acute leukemia in the adult. *Blood*. 2013;121(7):1077-1082.
44. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121(12):2213-2223.
45. Miotto R, Wang F, Wang S, Jiang X, Dudley JT. Deep learning for healthcare: review, opportunities and challenges. *Brief Bioinform*. 2018;19(6):1236-1246.
46. Burnett AK, Hills RK, Russell N. Twenty five years of UK trials in acute myeloid leukaemia: what have we learned? *Br J Haematol*. 2019.
47. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*. 2017;377(5):454-464.
48. Yu S, Huang F, Wang Y, et al. Haploidentical transplantation might have superior graft-versus-leukemia effect than HLA-matched sibling transplantation for high-risk acute myeloid leukemia in first complete remission: a prospective multicentre cohort study. *Leukemia*. 2020;34(5):1433-1443.
49. Ng SW, Mitchell A, Kennedy JA, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature*. 2016;540(7633):433-437.

50.Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2018;378(13):1189-1199.

51.Freeman SD, Hills RK, Virgo P, et al. Measurable Residual Disease at Induction Redefines Partial Response in Acute Myeloid Leukemia and Stratifies Outcomes in Patients at Standard Risk Without NPM1 Mutations. *J Clin Oncol.* 2018;36(15):1486-1497.

Tables

Table 1. Study Population

Characteristic	Total genotyped (N=656)		HSCT eligible (N=545)	
	N or median	% or range	N or median	% or range
Age, years	46	18-60	46	18-60
Sex				
Male	351	53.5	285	52.3
Female	305	46.5	260	47.7
ECOG PS				
0	284	43.3	233	42.8
1	298	45.5	250	45.9
2-3	66	10	56	10.2
NA	8	1.2	6	1.1
WBC, 10 ⁹ /L	8.4	0.3-377.4	8.7	0.3-377.4
ELN 2017 risk				
Favorable	231	35.2	219	40.2
Intermediate	194	29.6	166	30.4
Adverse	222	33.8	160	29.4
Missing	9	1.4	0	0

Figure Legends

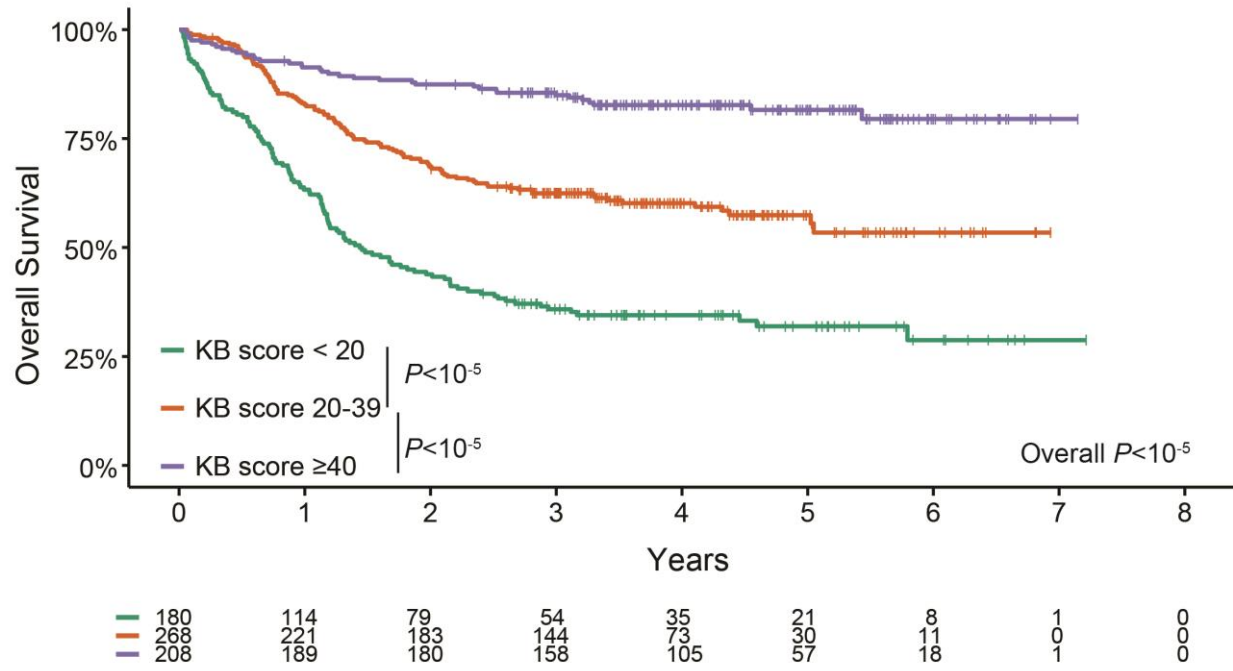
Figure 1. Validation of the prognostic relevance of the knowledge-bank approach. (A.) Overall Survival of all 656 patients and (B.) Disease-Free Survival of the 545 CR1 patients according to the KB score arbitrarily binned in three groups (KB score <20, 20-39, and ≥40). *P* values from log-rank tests.

Figure 2. Forest plot of interaction between ELN 2017 risk, *NPM1* MRD and KB score threshold with HSCT in CR1. Hazard ratio (HR) and 95% confidence intervals (in brackets) of the effect of HSCT in CR1 (as a time-dependent covariate) on overall survival after the day 45 landmark in the 545 patients eligible for HSCT in CR1 according to ELN 2017 risk, *NPM1* MRD (in the 143 assessed patients) or by the KB score threshold of 40. *P* values from interaction tests in bivariate Cox models.

Figure 3. Flow chart of the 3-step development of a personalized approach to guide HSCT indication in CR1, successively integrating ELN 2017 risk, *NPM1* MRD and KB score threshold. The subsets of patients assigned to the ‘chemo-only’ and the ‘HSCT’ post-remission strategies at each step are indicated by blue and red boxes, respectively.

Figure 4. Landmark analysis at 6 months of the impact of HSCT in CR1. Kaplan-Meier estimates for OS from a 6-month landmark of the 268 ‘HSCT candidates’ and 261 ‘chemo-only candidates’ still alive at 6 months from inclusion (96.4% and 97.8% of the total HSCT and chemo-only candidates respectively, see **Figure 3**) transplanted (N=132 HSCT candidates, N=69 chemo-only candidates) or not transplanted (N=136 HSCT candidates, N=192 chemo-only candidates) before the 6-month landmark. *P* values from log-rank tests and from the interaction term of a bivariate Cox model.

A



B

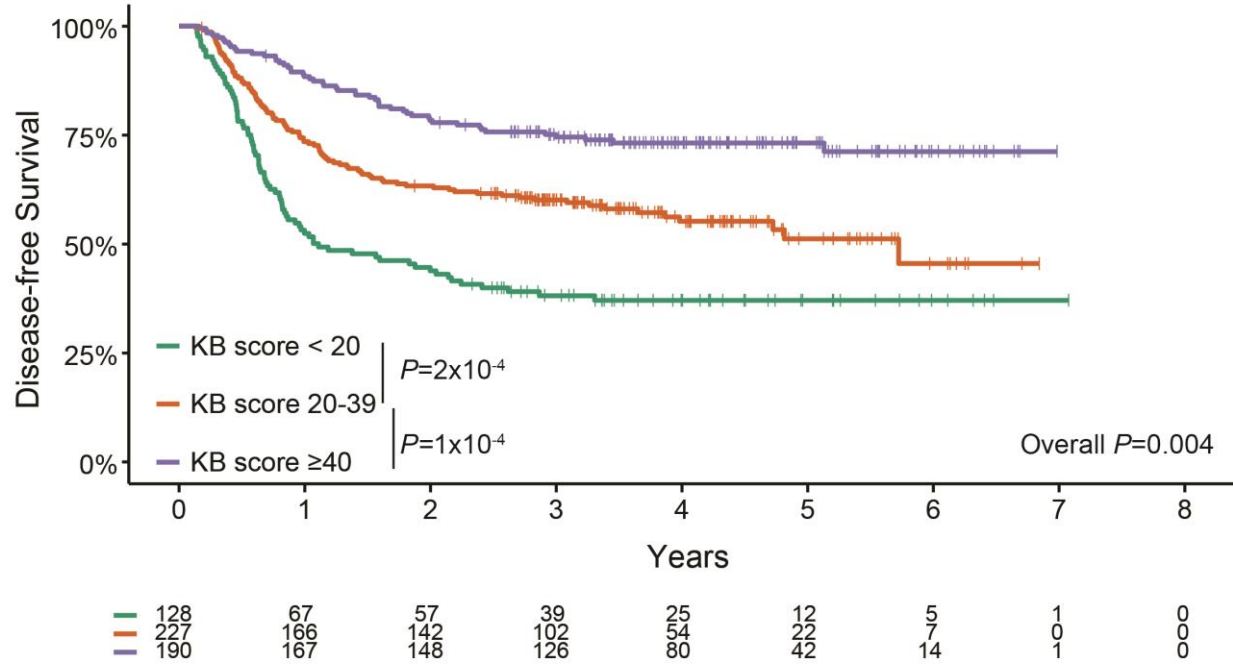


Figure 1

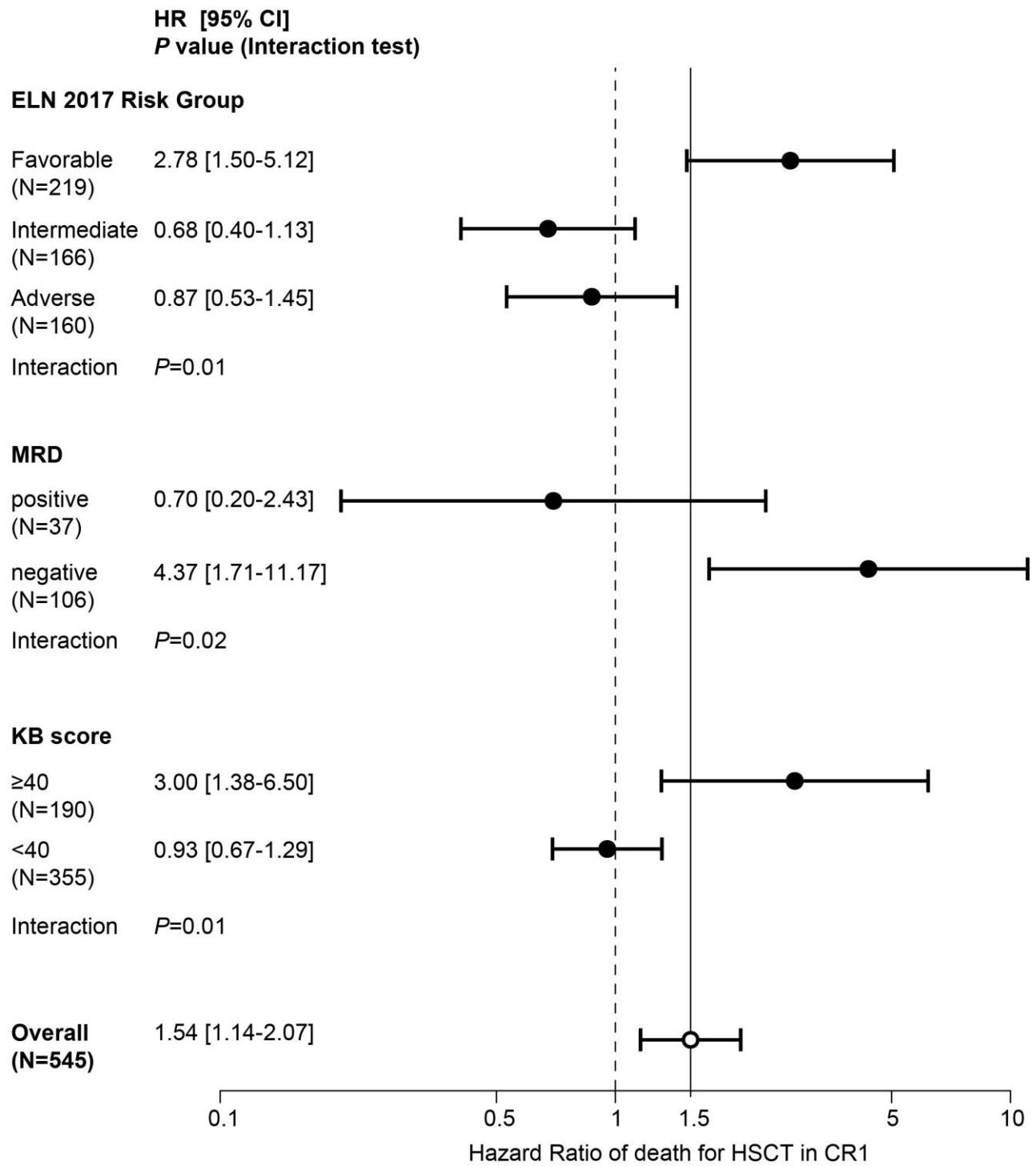


Figure 2

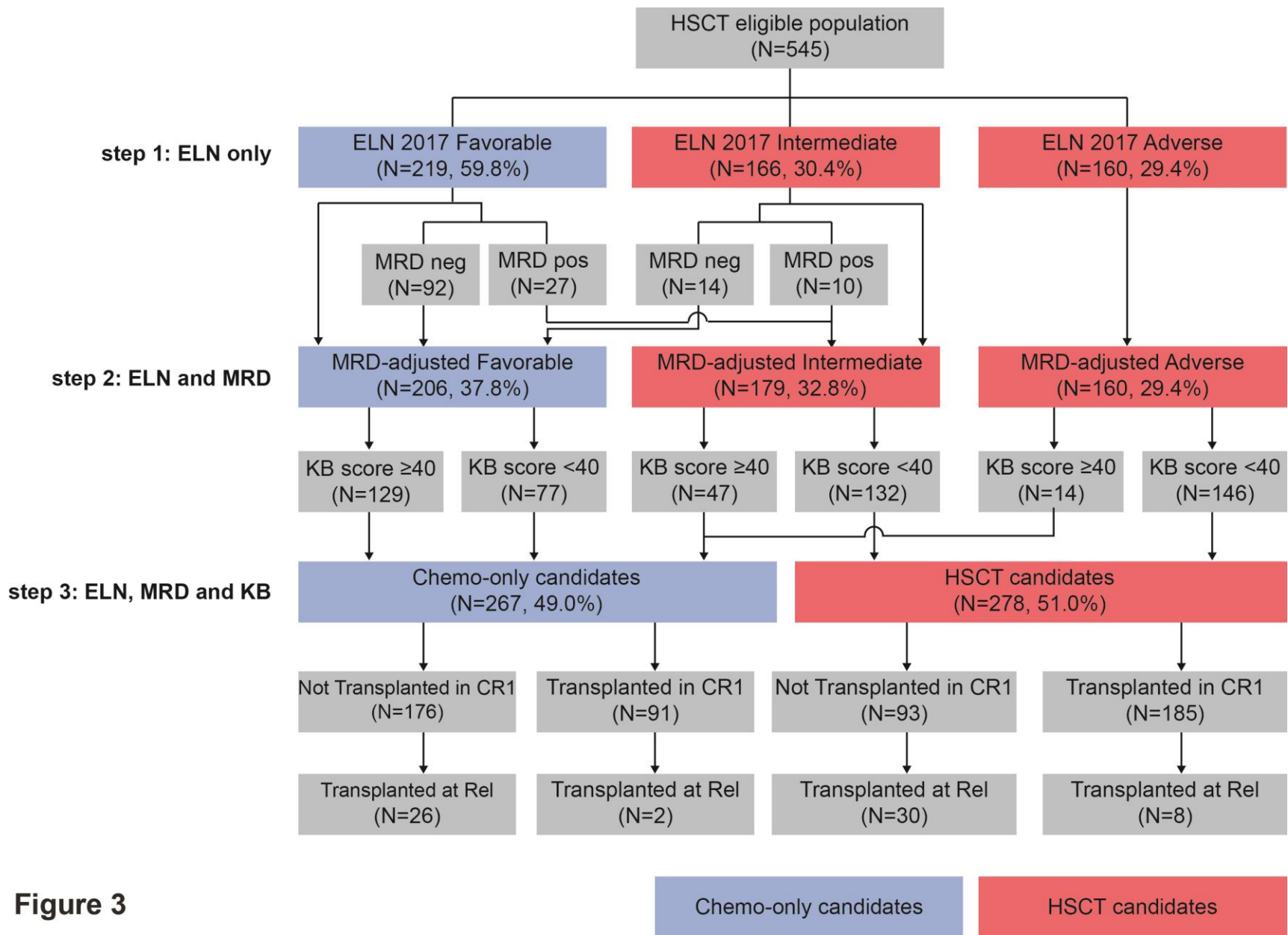
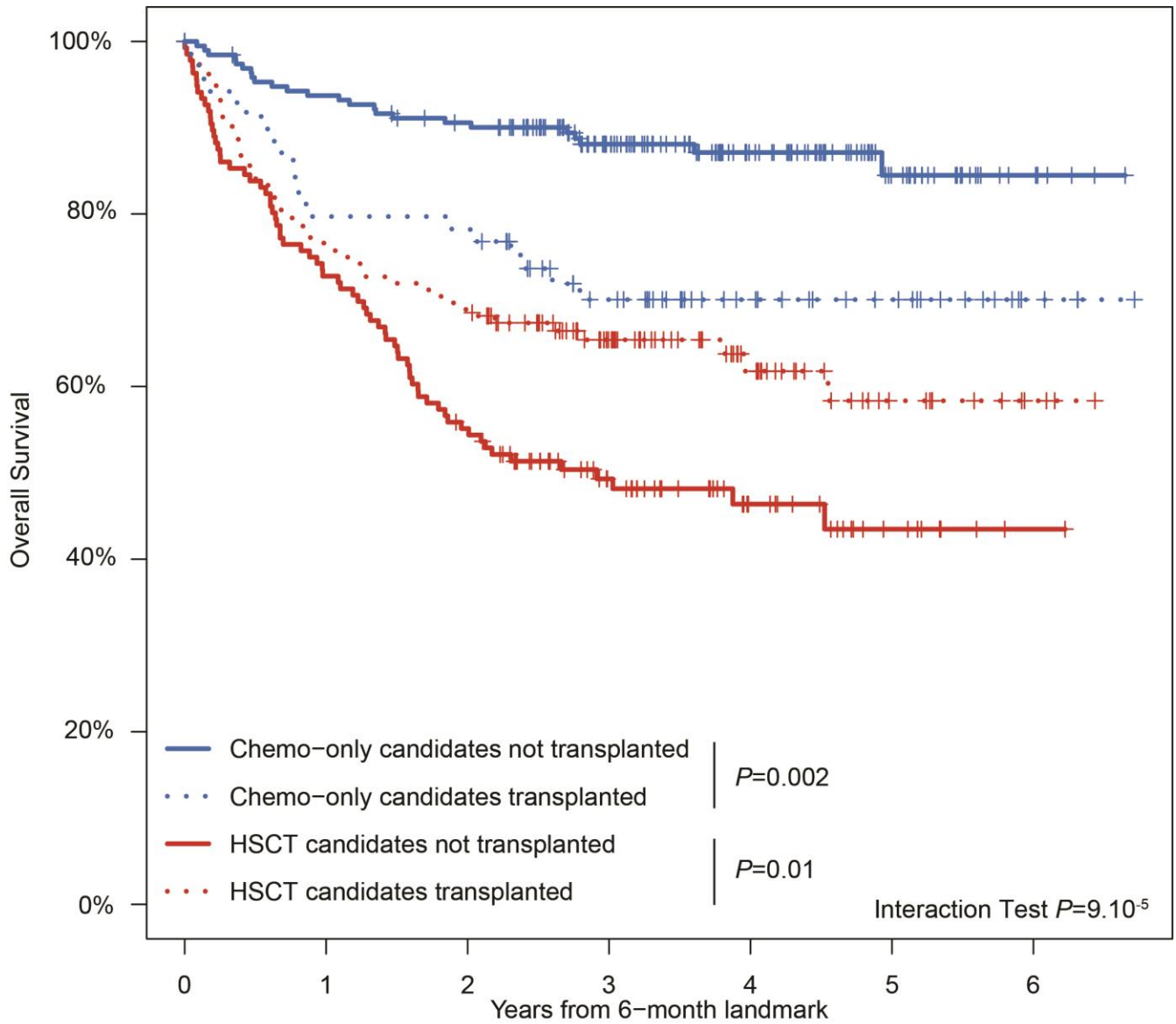


Figure 3



N at risk

	0	1	2	3	4	5	6
—	192	179	169	121	68	29	7
···	69	55	54	37	22	15	4
—	136	99	74	43	22	8	1
···	132	101	91	57	31	11	3

Figure 4

C. Etude des biomarqueurs prédictifs de la réponse au gemtuzumab ozogamicine dans le traitement des LAM

Le CD33 est un marqueur exprimé à la surface des cellules leucémiques chez 85 à 90% des patients diagnostiqués pour une LAM. Le gemtuzumab ozogamicine (GO, Mylotarg®) est un conjugué anticorps-médicament composé d'un anticorps dirigé contre le CD33 couplé à un antibiotique antitumoral (la calichéamicine). Le GO a démontré son efficacité dans le traitement des LAM CD33+ à travers des essais cliniques successifs et obtenu l'approbation de la FDA le 1er septembre 2017 chez les patients avec LAM CD33+ âgés d'au moins 2 ans. Cette approbation a été étendue aux LAM CD33+ âgées d'au moins 1 mois depuis le 16 juin 2020.

Différents essais cliniques ont montré des disparités de réponse au GO entre les patients et ont conduit à l'identification de biomarqueurs prédictifs de la réponse au GO. Ainsi, l'expression du CD33, les altérations cytogénétiques favorables telles que les t(8;21), inv(16)/(16;16) et t(15;17) constituent des facteurs prédictifs de bonne réponse au GO. De plus, différentes études ont montré le bénéfice du GO chez les patients présentant une mutation de *NPM1*, *FLT3*-ITD ou d'autres gènes impliqués dans les voies de signalisation.

Plus récemment, de nouveaux marqueurs théranostiques ont été identifiés tels que l'évaluation de la MRD, l'expression cellule souche leucémique évaluée par le score LSC17, les mutations ou les SNP dans les gènes impliqués dans le métabolisme du GO (*CD33*, *ABCB1*). Un score moléculaire, le CD33_PGx6_Score, dérivé du génotypage de six SNP du gène *CD33* a été développé et semble être corrélé à une meilleure survie sans rechute chez les patients avec un score supérieur ou égal à 0 traités par GO.

La revue qui suit reprend les principales études cliniques disponibles ayant évalué l'efficacité du gemtuzumab ozogamicine et décrit les différents facteurs prédictifs de réponse à ce traitement.



Biomarkers of Gemtuzumab Ozogamicin Response for Acute Myeloid Leukemia Treatment

Laurène Fenwarth^{1,*}, Elise Fournier¹, Meyling Cheok¹, Thomas Boyer², Fanny Gonzales¹, Sylvie Castaigne³, Nicolas Boissel⁴, Juliette Lambert³, Hervé Dombret⁵, Claude Preudhomme¹ and Nicolas Duployez¹

¹UMR 9020–UMR-S 1277–Canther–Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, Institut de Recherche contre le Cancer de Lille, University Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, F-59000 Lille, France

²Laboratory of Hematology, CHU Amiens, F-80054 Amiens, France

³Department of Hematology, CH Versailles, F-78157 Le Chesnay, France

⁴Adolescent and Young Adult Hematology Unit, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Université de Paris, F-75010 Paris, France

⁵Department of Hematology, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Université de Paris, F-75010 Paris, France

* Author to whom correspondence should be addressed.

Int. J. Mol. Sci. **2020**, *21*(16), 5626; <https://doi.org/10.3390/ijms21165626>

Received: 20 July 2020 / Accepted: 3 August 2020 / Published: 6 August 2020

(This article belongs to the Special Issue [Pathogenesis and Treatment of Leukemia and Myelodysplastic Syndromes](#))

Abstract

Gemtuzumab ozogamicin (GO, Mylotarg[®]) consists of a humanized CD33-targeted antibody-drug conjugated to a calicheamicin derivative. Growing evidence of GO efficacy in acute myeloid leukemia (AML), demonstrated by improved outcomes in CD33-positive AML patients across phase I to III clinical trials, led to the Food and Drug Administration (FDA) approval on 1 September 2017 in CD33-positive AML patients aged 2 years and older. Discrepancies in GO recipients outcome have raised significant efforts to characterize biomarkers predictive of GO response and have refined the subset of patients that may strongly benefit from GO. Among them, CD33 expression levels, favorable cytogenetics (t(8;21), inv(16)/t(16;16), t(15;17)) and molecular alterations, such as NPM1, FLT3-internal tandem duplications and other signaling

mutations, represent well-known candidates. Additionally, in depth analyses including minimal residual disease monitoring, stemness expression (LSC17 score), mutations or single nucleotide polymorphisms in GO pathway genes (CD33, ABCB1) and molecular-derived scores, such as the recently set up CD33_PGx6_Score, represent promising markers to enhance GO response prediction and improve patient management.

Keywords: [acute myeloid leukemia](#); [gemtuzumab ozogamicin](#); [biomarkers](#); [CD33](#); [FLT3](#); [therapy](#)

1. Introduction

Standard of care for acute myeloid leukemia (AML) has long been based on chemotherapy combinations with or without hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Despite efforts in supportive care improvement, 5-year overall survival (OS) of adult patients with AML remains at 30–40% [1]. Over the past years, significant advances have been made in understanding the AML mutational landscape, identifying leukemic cells and characterizing their intrinsic properties leading to the development of new drugs, among which eight have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of AML between 2017 and 2019. Notably, gemtuzumab ozogamicin (GO, CMA-676, Mylotarg®) is a humanized cluster of differentiation 33 (CD33)-targeted antibody-drug conjugated to a calicheamicin derivative, a natural antitumor antibiotic. CD33 antigen represents a hallmark of myeloid leukemic blasts, widely expressed in AML patients. Several clinical studies have highlighted the clinical benefit of GO on patient outcome. GO stands for the first antibody drug conjugate approved by the FDA. Enhanced knowledge about the GO metabolic pathway at both cellular and molecular levels has raised and improved understanding on GO response biomarkers.

After a brief review about the mechanism of action of GO and its efficacy across successive clinical trials, this review will discuss the biomarkers predicting GO response ([Figure 1](#)).

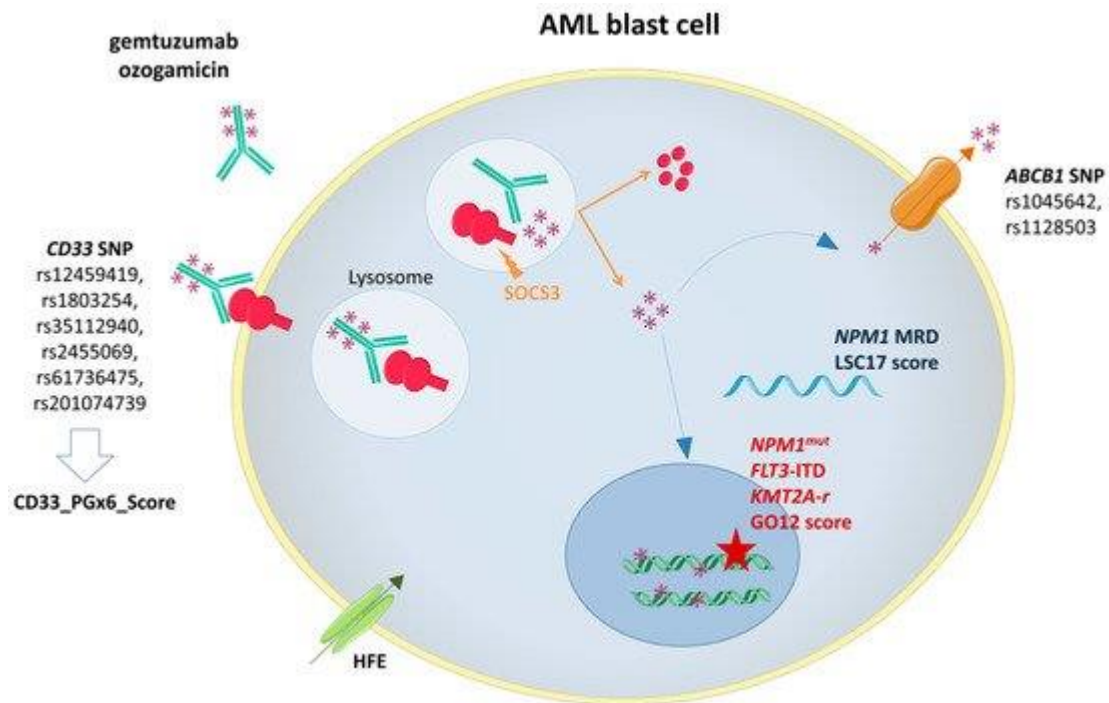


Figure 1. Gemtuzumab ozogamicin (GO) mechanism of action and biomarkers of response. SOCS3: Suppressor Of Cytokine Signaling 3; ABCB1: ATP-binding cassette subfamily B member 1 gene; NPM1^{mut}: Nucleophosmin 1 gene mutation; FLT3-ITD: FMS-Like Tyrosine Kinase 3 Internal Tandem Duplication; KMT2A-r: Lysine Methyltransferase 2A rearrangement.

2. Gemtuzumab Ozogamicin

2.1. CD33: The Target Antigen

The CD33 antigen is a 67 kD single chain transmembrane glycoprotein that belongs to the sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins family (Siglecs) [2]. The CD33 gene, located on chromosome 19q13.4, is composed of eight exons. Exons 1 and 2 encode for the amino-terminal V-set signal peptide, an immunoglobulin-like domain mediating the sialic-acid binding, exons 3 and 4 encode the C2-set domain, and exon 5 encodes the transmembrane domain. The intracytoplasmic domain, encoded by exons 6, 7a and 7b, comprises two tyrosine-based inhibitory signaling motifs (Y340 and Y358) which, upon phosphorylation, provide docking sites for the Src homology-2 domain-containing tyrosine phosphatases (SHP) and the suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) [3,4,5]. In turn, SHP-1 and SHP-2 dephosphorylate CD33 and negatively regulate other surrounding receptors [3]. SOCS3 competes with SHP-1/2 for CD33

binding and recruits the Elongin B/C-Cul2/Cul5-SOCS-box protein E3 ubiquitin ligase leading to the proteasomal degradation of CD33 and SOCS3 [6].

CD33 is a differentiation antigen especially expressed among myeloid progenitors, while it is not expressed by normal hematopoietic stem cells [7]. AML originates from clonal evolution of driver and cooperative genetic alterations in multipotent CD34⁺/CD33⁻ stem cells and/or in committed CD34⁺/CD33⁺ myeloid progenitors [8,9,10]. Previous studies have shown that CD33 was expressed on leukemic blasts in 85% to 90% of AML patients [11,12]. Collectively, these data raised a huge interest to consider CD33 as potent and selective therapeutic target in AML.

2.2. Mechanism of Action

GO consists of a recombinant humanized immunoglobulin G4 kappa CD33-targeted antibody (hP67.6) covalently linked to the semi-synthetic antitumor antibiotic of the enediyne family, the N-acetyl gamma calicheamicin, via the acid-labile hybrid 4-(4'-acetylphenoxy)butanoic acid linker [13]. After binding to the CD33 antigen, the complex GO-CD33 is rapidly internalized [14]. In the cytoplasm, this complex is routed in the lysosome. Under the acidic environment of the lysosome, the butanoic acid linker is hydrolyzed, releasing the toxic moiety of the GO. The calicheamicin derivative is reduced by the glutathione into a highly reactive species which induces simple- and double-stranded DNA breaks, leading to DNA-damage [15,16,17]. Downstream, the DNA repair pathway is activated through the ataxia-telangiectasia mutated (ATM)/ataxia-telangiectasia and Rad3-related (ATR) and the DNA-dependent protein kinase pathways [18,19]. In turn, ATM and ATR proteins phosphorylate Chk1 and Chk2 proteins, which eventually results in G2/M cell cycle arrest. The DNA-dependent pathway activation mediates DNA repair through H2AX phosphorylation. Hence, cells defective in ATM, DNA-dependent protein kinase or genes coding for the non-homologous end joining repair are hypersensitive to calicheamicin [16,20]. However, the predominant downstream pathway following the ATM/ATR activation is the mitochondrial apoptotic pathway mediated by the B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) family proteins Bax and Bak which releases the cytochrome-c and eventually activates caspases 9 and 3. This pro-apoptotic pathway acts independently of the tumor protein 53 (TP53) and Fas-Associated protein with Death Domain (FADD)-signaling pathways [21,22]. Data from a phase II trial suggest that Bcl-2 antisense (Oblimersen sodium) may enhance the pro-apoptotic pathway in patients treated concomitantly with GO [23].

2.3. Clinical Data

Successive clinical trials have demonstrated the anti-leukemic activity of GO and its clinical benefit on patient outcome ([Table 1](#)).

Table 1. Overview of the main clinical trials evaluating GO efficacy

Trial Acronym	Dates of Recruitment	Phase	Patient Population	Median Age of Patients in Years (Range)	Evaluable Patients	GO Dosing	Treatment Plan	Outcomes	Ref.
Adult Trials									
	NA	I	Relapsed/refractory AML patients	54 (24–73)	40	Escalating doses, 0.25 to 9 mg/m ²	Single arm trial, GO administered as single agent	ORR: 8/40 patients (20%)	Sievers 1999 [24]
	1997–1999	II	AML patients in first relapse	61 (22–84)	142	9 mg/m ² , 2 doses recommended (max. 3 doses), with at least 14 days between 2 doses	Single arm trial, GO administered as single agent	ORR: 42/142 patients (30%), CR rate: 16%, CRp rate: 13%	Sievers 2001 [25]
Mylofrance-1	2005	II	De novo AML in first relapse	64 (22–80)	57	Fractionated doses: 3 mg/m ² on days 1, 4 and 7 of the first course	Single arm trial, GO administered as single agent in induction, followed by cytarabine-based consolidation	ORR: 19/57 (33%), CR rate: 15/57 (26%), CRp: 4/57 (7%)	Taksin 2007 [26]
Mylofrance-2	2006–2007	I/II	De novo AML in first relapse	60 (40–70)	20	Fractionated doses: 3 mg/m ² on days 1, 4 and 7 of the first course	Single arm trial, GO combined with DA (DA dosing finding)	ORR: 13/20 patients (65%), CR rate: 11/20 patients (55%), CRp rate: 2/20 patients (10%)	Farhat 2012 [27]
MRC AML15	2002–2006	III	De novo/secondary AML	50 (15–71)	1113	3 mg/m ² on day 1 of course 1 +/- on day 1 of the course 3	Randomization at induction and at consolidation. Induction regimen (DA or ADE or FLAG-Ida) +/- GO. Consolidation regimen (MACE or MidAC or high-dose cytarabine) +/- GO	GO- vs. no GO-arm: CR, 82% vs. 83%, OR: 1.04, 95% CI: 0.76–1.42, p = 0.8; 5-year OS, 43% vs. 41%, HR: 0.92, 95% CI: 0.79–1.08, p = 0.3; 5-year RFS: 39% vs. 35%, HR: 0.87, 95% CI: 0.73–1.02, p = 0.09	Burnett 2011 [28]

Trial Acronym	Dates of Recruitment	Phase	Patient Population	Median Age of Patients in Years (Range)	Evaluable Patients	GO Dosing	Treatment Plan	Outcomes	Ref.
SWOG S0106	2004–2009	III	De novo AML	47 (18–60)	595	6 mg/m ² on day 4; additional 3 doses of GO, 5 mg/m ² for patients in CR after consolidation	Randomized trial, GO plus modified DA (daunorubicin, 45 mg/m ² /d, day 1 to day 3; cytarabine, 100 mg/m ² /d, day 1 to day 7) vs. standard DA (daunorubicin, 60 mg/m ² /d, day 1 to day 3; cytarabine, 100 mg/m ² /d, day 1 to day 7)	DA + GO vs. DA alone: ORR: 76% vs. 74%, p = 0.36; CR rate: 69% vs. 70%, p = 0.59; 5-year RFS: 43% vs. 42%, p = 0.40; 5-year OS: 46% vs. 50%, p = 0.85	Petersdorf 2013 [29]
NCRI AML16	2006–2010	III	De novo/secondary AML and high-risk MDS	67 (51–84)	1115	3 mg/m ² on day 1 of the first course	Randomized trial: DA or daunorubicin/clofarabine +/- GO	GO- vs. no GO-arm: ORR: 70% vs. 68%, OR: 0.88, 95% CI: 0.68–1.13, p = 0.3; 3-year OS: 25% vs. 20%; HR: 0.87, 95% CI: 0.76–1.00, p = 0.05; 3-year RFS: 21% vs. 16%, HR: 0.84, 95% CI: 0.71–0.99, p = 0.04	Burnett 2012 [30]
GOELAMS-AML 2006 IR	2007–2010	III	De novo AML patients with intermediate cytogenetic risk	50 (18–60)	238	6 mg/m ² on day 4 of the induction and on day 4 of the first consolidation course	Randomized trial: intensive induction regimen (DA) +/- GO, consolidation (MidAC) +/- GO, +/- HSCT	GO- vs. no-GO-arm: CR rate: 91.6% vs. 86.5%, p = NS; 3-year OS: 53% vs. 46%, p = NS; 3-year EFS: 51% vs. 33%, p = NS. In non HSCT recipients, GO vs. no GO-arm: 3-year EFS: 53.7% vs. 27%, p = 0.0308	Delaunay 2011 [31]
ALFA-0701	2008–2010	III	De novo AML	62 (50–70)	271	3 mg/m ² on days 1, 4, and 7 of induction and on day 1 of each of the subsequent two consolidation courses	Randomized trial: DA +/- GO	GO- vs. no-GO-arm: ORR: 81.5% vs. 73.5% (p = 0.15) (CR: 70.4% vs. 69.9%; CRp: 11.1% vs. 3.7%); median EFS: 13.6 months vs. 8.5 months, HR: 0.66, 95% CI: 0.49–0.89, p = 0.006; median OS: 27.5 months vs. 21.8 months, HR: 0.81,	Castaigne 2012, Lambert 2019 [32,33]

Trial Acronym	Dates of Recruitment	Phase	Patient Population	Median Age of Patients in Years (Range)	Evaluable Patients	GO Dosing	Treatment Plan	Outcomes	Ref.
								95% CI: 0.60–1.09, p = 0.16	
UK NCRI AML17	2009–2011	III	De novo or secondary AML and high-risk MDS	50 (0–81)	788	3 mg/m ² vs. 6 mg/m ² on day 1 of induction	Randomized trial: GO 3 vs. 6 mg/m ² + combined with ADE vs. DA	GO 3 mg/m ² vs. 6 mg/m ² : ORR: 89% vs. 86%, HR: 1.34, 95%CI:0.88–2.04, p = 0.17; (CR rate 82% vs. 76%, OR: 1.46, 95%CI: 1.04–2.06, p = 0.03); 4-year OS: 50% vs. 47%, HR: 1.10, 95% CI: 0.90–1.34, p = 0.3; 4-year RFS: 44% vs. 38%, HR: 1.11, 95% CI: 0.91–1.35, p = 0.3	Burnett 2016 [34]
EORTC-GIMEMA AML-17	2002–2007	III	De novo/secondary AML	67 (60–75)	472	3 mg/m ² for 2 doses, on days 1 and 15 of induction, 3 mg/m ² on the first day of consolidation	Randomized trial: intensive chemotherapy (MICE induction) +/- GO	GO vs. no-GO-arm: ORR: 45% vs. 49%; OR: 0.86, 95% CI, 0.6–1.23, p = 0.46; OS: HR: 1.20, 95% CI: 0.99–1.45, p = 0.07; RFS: HR: 1.08, 95% CI: 0.81–1.44, p = 0.61	Amadori 2013 [35]
EORTC-GIMEMA AML-19	2004–2013	III	De novo/secondary AML unfit for intensive chemotherapy	77 (62–88)	237	6 mg/m ² on day 1 and 3 mg/m ² on day 8, +/-2 mg/m ² /month for up to 8 doses	Randomized trial: GO alone vs. BSC	GO- vs. BSC-arm: median OS: 4.9 months vs. 3.6 months, HR: 0.69, 95% CI: 0.53–0.90, p = 0.005	Amadori 2016 [36]
Pediatric trials									
	1999–2002	I	Relapsed/refractory AML patients	12 (1–16)	29	Escalating doses, 6 to 9 mg/m ²	Single arm trial, GO administered as single agent	ORR: 8/29 patients (28%); CR rate: 14%; CRp rate: 14%)	Arceci et al. 2005 [37]
COG-AAML00P2	2002–2006	II	Refractory de novo AML or newly diagnosed secondary	11.5 (0.8–19.8)	45	2 to 3 mg/m ²	Non randomized multi-arm trial, GO + cytarabine + mitoxantrone (arm A) vs. GO+ cytarabine+ L-asparaginase (arm B)	Arm A vs. arm B: ORR: 55% vs. 40%, p = NS; 1-year EFS: 55% vs. 21.8%, p = NS; 1-year OS: 64.6%	Aplenc 2008 [38]

Trial Acronym	Dates of Recruitment	Phase	Patient Population	Median Age of Patients in Years (Range)	Evaluable Patients	GO Dosing	Treatment Plan	Outcomes	Ref.
AML								vs. 45.0% p = NS	
COG-AAML03P1	2003–2005	II	Newly diagnosed de novo AML	9.5 (0.07–21.6)	340	3 mg/m ² on day 6 of course 1 and day 7 of course 4	Single arm trial, GO combined with intensive chemotherapy	CR rate: 83.1%; 3-year OS: 66%; 3-year EFS: 53%	Cooper 2012 [39]
COG-AAML0531	2006–2010	III	Newly diagnosed de novo AML	9.7 (0–29)	1022	3 mg/m ² on day 6 of induction course 1, and on day 7 of intensification course 2	Randomized trial, GO +/- standard chemotherapy	GO- vs. no-GO arm: CR rate: 88.3% vs. 85.1, p = 0.15; 3-year EFS: 53.1% vs. 46.9%, HR: 0.83, 95% CI: 0.70–0.99, p = 0.04; 3-year OS: 69.4% vs. 65.4%; HR: 0.91, 95% CI: 0.74–1.13, p = 0.39	Gamis 2014 [40]

COG: Children’s Oncology Group; MDS: myelodysplastic syndrome; CR: Complete Remission; CRp: all criteria for CR without the full recovery of platelets count; ORR: overall response rate (CR+CRp); DA: daunorubicin plus cytarabine; DAE: cytarabine, daunorubicin, and etoposide; FLAG-Ida: fludarabine, cytarabine, granulocyte colony-stimulating factor, and idarubicin; MACE: amsacrine, cytarabine and etoposide; MidAC: mitoxantrone and cytarabine; MICE: mitoxantrone, cytarabine, and etoposide; BSC: best supportive care, HSCT: hematopoietic stem cell transplantation; NA: Not available; NS: not significant.

2.3.1. GO Administered as Monotherapy

In a phase I dose escalation trial, 40 adult patients with relapsed/refractory CD33-positive AML received GO until a maximum dose of 9 mg/m² saturating almost all AML CD33-binding sites (92.2%) with an acceptable safety profile [24]. Similarly, a phase I trial undertaken in 29 children with relapsed/refractory AML, showed the tolerability and the efficacy of GO (overall response rate [ORR], 28%) [37].

Three phase II trials assessed the safety and the efficacy of GO as a single agent given at 9 mg/m² on day 1 and day 14 in adult AML patients experiencing first relapse. A total of 30% of the patient population achieved complete remission (CR)/complete remission without platelet recovery (CRp) [25]. Based on these results, GO was granted FDA accelerated approval on 17 May 2000 as a monotherapy for CD33-positive AML patients older than 60 years of age, experiencing first relapse and unfit for intensive treatment [41]. Of note, final analysis revealed that this GO schedule was associated with frequent grade 3 and 4 hematological toxicities (profound neutropenia and thrombocytopenia) and liver toxicities (veno-occlusive disease) [42].

The European Organization for Research and Treatment of Cancer-Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (EORTC-GIMEMA) AML-19 trial is a sequential phase II/III trial that first determined the best GO induction regimen (GO administered as monotherapy, 6 mg/m² on day 1 plus 3 mg/m² on day 8 versus [vs.] GO 3 mg/m² on days 1, 3 and 5) before undertaking the phase III trial comparing GO to best supportive care in previously untreated AML patients older than 61 years unfit for intensive chemotherapy. The GO schedule 6 mg/m² on day 1 plus 3 mg/m² on day 8 led to a higher rate of disease non-progression, defined as the rate of patients in CR/CRp or in stable disease at the end of induction course (63% vs. 38%), and was retained for the phase III [43]. In the subsequent phase III, first-line GO monotherapy significantly improved OS compared to best supportive care (1-year OS: 24.3% vs. 9.7%, hazard ratio [HR]: 0.69, 95% CI: 0.53–0.90, p = 0.005) [36].

2.3.2. GO Administered in Combination with Intensive Chemotherapy

A phase III randomized trial was undertaken by the Southwest Oncology Group (SWOG, S0106 trial) to further confirm the clinical benefit of the addition of GO (6 mg/m² on day 4) to the standard '3 + 7' induction regimen, associating daunorubicin and cytarabine. Patients allocated to

the GO arm received lower dose of daunorubicin (45 mg/m² vs. 60 mg/m² in the control arm) in order to balance toxicities [29]. However, the interim analysis revealed higher rate of fatal induction toxicities in the GO arm (5.5% vs. 1.4%, p = 0.0062) leading to the premature end of the study and withdrawal from the market on 21 June 2010. Final data analysis of the S0106 trial failed to demonstrate any clinical benefit of the addition of GO neither on relapse-free survival (RFS) nor on OS (GO arm vs. non GO arm: 5-year RFS: 43% vs. 42%, p = 0.40; 5-year OS: 46% vs. 50%, p = 0.85).

In an attempt to reduce GO toxicities, a dose-finding trial assessed the addition of GO 3 mg/m² vs. 6 mg/m² to intensive chemotherapy regimens. The addition of GO 6 mg/m² was not feasible due to hepatotoxicity and delayed hematopoietic recovery. However, 3 mg/m² GO appeared effective and safe [44]. This study led to two randomized phase III trials, addressing the clinical benefit of adding GO 3 mg/m² to the induction regimen in younger adults (Medical Research Council (MRC) AML15 trial) and in older patients (National Cancer Research Institute (NCRI) AML16 trial) [28,30]. In these two trials, the addition of GO showed an improved OS in older patients, and in younger adults with favorable-risk AML. Given the rapid re-expression on the CD33 antigen after GO exposure [14,17], a phase II trial addressed the efficacy of fractionated GO (3 mg/m² on days 1, 4 and 7) in adults with relapsed AML [26]. Fractionated GO administered as monotherapy led to a CR/CRp rate of 33% with a good safety profile, in particular, no grade 3 or 4 liver toxicity. When combining fractionated GO to chemotherapy, 65% to 75% of patients achieved CR/CRp [27,45]. Based on these encouraging results of lowering and fractionating doses of GO, the randomized phase III trial Acute Leukemia French Association (ALFA)-0701 compared the clinical benefit of low fractionated doses of GO in addition to the standard intensive chemotherapy regimen in newly diagnosed CD33-positive AML patients, aged 50 to 70 years old [32]. In the experimental arm, patients were administered fractionated doses of GO 3 mg/m², during induction (on days 1, 4 and 7) and consolidation courses (on day 1 of each course). Event-free survival (EFS) was remarkably improved in the GO arm (median EFS, assessed by the blinded independent review: 13.6 vs. 8.5 months, HR: 0.66, 95% CI: 0.49–0.89, p = 0.006) whilst median OS did not significantly differ between the two arms (HR: 0.81, 95% CI: 0.60–1.09, p = 0.16) [33]. These results led the FDA to approve GO for newly diagnosed CD33-positive AML in adults and for relapsed or refractory CD33-positive AML in patients aged 2 years and older on 1 September 2017. GO received the European Medicines Agency's (EMA)

marketing authorization on 19 April 2018 for the treatment of de novo CD33-positive AML patients aged 15 years and above as frontline therapy in combination with daunorubicin and cytarabine.

Corroborating these results, a meta-analysis including 3325 patients from five open-label randomized phase III controlled trials (MRC AML15, NCRI AML16, SWOG S0106, GOELAMS-AML 2006 IR and ALFA-0701 [28,29,30,31,32]) highlighted the benefit of the addition of GO on the risk of relapse (RR) and on OS (RR: OR: 0.81, 95% CI: 0.73–0.90, $p = 0.0001$; 5-year OS: OR: 0.90, 95% CI: 0.82–0.98, $p = 0.01$) [46].

More recently, a phase III trial, the NCRI AML17 trial, evaluated the impact of GO dosing 3 vs. 6 mg/m² combined with intensive chemotherapy in previously untreated AML patients. Among the 788 included patients, increased GO dosing (6 mg/m²) did not improve neither response rate nor patient outcome (OS: HR: 1.10, 95% CI: 0.90–1.34, $p = 0.3$; RFS: HR: 1.11, 95% CI: 0.91–1.35, $p = 0.3$) [34].

In the pediatric population, phase II studies from the Children's Oncology Group (COG, AAML00P2 and AAML03P1) demonstrated the benefit of the addition of GO to chemotherapy [38,39]. In the subsequent phase III trial AAML0531, AML patients aged 0 to 29 years with newly diagnosed AML were randomly assigned to a five-course chemotherapy regimen alone or combined with two doses of GO 3 mg/m² (on day 6 during induction course 1, and on day 7 during intensification course 2). Among the 1022 evaluable patients, GO recipients experienced better EFS (3-year EFS: 53.1% vs. 46.9%, HR: 0.83, 95% CI: 0.70–0.99, $p = 0.04$) but no improved OS (3-year OS: 69.4% vs. 65.4%, HR: 0.91, 95% CI: 0.74–1.13, $p = 0.39$) [40]. Based on these results, the FDA extended the indication of GO to newly diagnosed CD33-positive AML patients aged one month and older, on June 16, 2020.

3. Biomarkers

3.1. CD33 Expression on AML Cells

As previously described, CD33 is widely expressed in AML patients (>80%, [25]). However, the CD33 expression level on leukemic cells is heterogeneous, varying more than 2 log-fold among AML patients [47,48]. In the pediatric AAML03P1 cohort, high expression of CD33 is associated with poor outcome in multivariate analysis [47,49]. In vitro studies demonstrated that GO-

induced cytotoxicity was highly dependent on cell surface expression of CD33 and higher CD33 expression levels correlated with an increase of GO binding to CD33 antigenic sites and thus enhanced clearance of AML blasts [14,50]. Remarkably, good responders among GO recipients express higher mean of CD33 expression levels inversely correlated with a low ATP-binding cassette subfamily B-member 1 (ABCB1) expression which mediates drug efflux [51]. Among the 825 patients from the pediatric AAML0531 trial, GO improved EFS in patients with high CD33 expression (quartiles (Q), Q2-Q4, GO vs. no-GO, 5-year EFS: 53% vs. 41%, $p = 0.005$), whereas patients with low CD33 expression (Q1) did not benefit from the addition of GO to the induction chemotherapy (GO vs. no-GO, 5-year EFS: 53% vs. 58%, $p = 0.456$) [48]. By contrast, in the adult population no interaction on survival was observed between CD33 expression quartiles and GO in non-core binding factor (CBF)-AML patients [52]. However, GO reduced the RR of adult patients with Q4-CD33 expression (HR: 0.63, 95% CI: 0.35–1.12). Higher CD33 expression have been observed in patients displaying mutations in Nucleophosmin 1 (NPM1) gene or FMS-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplications (FLT3-ITD) and is further detailed in the corresponding section [47,48,52,53,54,55]. In a retrospective analysis performed on 200 adult patients from the ALFA-0701 trial, and considering CD33 expression as a binary variable defined by a 70% cutoff, GO improved EFS and RFS of patients with high CD33 expression even after adjustment for cytogenetics and NPM1/FLT3-ITD mutations [55]. Thus CD33 expression appears, as expected, as an important pre-treatment biomarker for GO response.

3.2. Prognostic Impact of the Cytogenetic Alterations on GO Efficacy

The benefit of GO has been widely observed in the non-adverse cytogenetic-risk groups [28,32,36,46,56]. In a meta-analysis, the addition of GO was strongly associated with a survival benefit in patients from good (acute promyelocytic leukemia [APL] excluded) and intermediate cytogenetic groups (absolute survival benefit at 6 years: + 20.7%; OR: 0.47, 95% CI: 0.31–0.73, $p = 0.0006$; + 5.7%; OR: 0.84, 95% CI: 0.75–0.95, $p = 0.005$, respectively) [46]. Conversely, in the adverse cytogenetic group, in which the CD33 expression level is usually lower, GO failed to improve OS (absolute survival benefit at 6 years: + 2.2%, OR: 0.99, 95% CI: 0.83–1.18, $p = 0.9$). CBF-AMLs correlate with a low CD33 expression [52]. It is assumed that the first event, $t(8;21)/inv(16)/t(16;16)$, initiates very early in preleukemic CD33⁻ cells [57]. By contrast, subsequent driver events, such as tyrosine kinase mutations leading to the proliferative AML

phenotype occur when the cells express CD33 [58]. Hence, GO could eradicate the proliferative clone and spare CD33⁻ preleukemic cells. Additionally, GO efficacy in CBF-AML may be explained by a high sensitivity of CBF-AML blasts to calicheamicin [9,59]. A phase II trial assessed the efficacy of the FLAG induction regimen, including fludarabine, cytarabine and filgrastim, combined with GO 3 mg/m², at induction day 1, and post-remission courses 1 and 2 day 1 (FLAG-GO) as frontline therapy in adult CBF-AML patients. Among the 45 enrolled patients, the FLAG-GO regimen was associated with a high remission rate (95%), and 3-year OS and RFS of 78% and 85% respectively [60]. A recent study assessed the benefit of the FLAG-GO regimen compared to the association FLAG and idarubicin regimen (FLAG-Ida). The FLAG-GO regimen was associated with a higher molecular response rate (76% vs. 42%, p = 0.002) and an improved 5-year RFS (87% vs. 68%, p = 0.02), but not 5-year OS (p = 0.7) compared to the FLAG-Ida regimen [61].

The standard of care for APL treatment relies on all-trans retinoic acid (ATRA) plus or minus arsenic trioxide (ATO)-based regimen [62,63]. However, APL blast cells express the CD33 antigen in nearly 100% of APL patients along with a low ABCB1 expression and offer the opportunity of a new treatment option for APL patients [64,65,66]. Administered as a single-agent or combined with ATRA, GO improved response rate of APL patients [67,68,69,70]. Interestingly, in vitro studies have reported the efficacy of GO in ATRA- or arsenic trioxide (ATO)-resistant APL cell lines which translated into remission achievement in clinical trials [65,71]. The combination of ATRA plus ATO with or without GO appeared safe and effective, with a CR rate of 90%, and 81% in high-risk patients [72]. These results were further confirmed in the phase III UK-NCRI AML17 trial [70]. In high-risk APL patients treated with ATRA, the addition of GO plus ATO was as effective as the adjunction of idarubicine (5-year OS: 84% vs. 100%, p = 0.453) [73]. Recently, the SWOG assessed the efficacy of ATRA plus ATO with GO combination in high-risk APL patients in a phase II trial (SWOG S0535). Among the 70 evaluable patients, 86% achieved CR and the 3-year OS and 3-year RFS were 86% and 91%, respectively [74]. Hence, this chemotherapy-free combination appears as a relevant option in high-risk APL patient management.

11q23/lysine methyltransferase 2A (KMT2A) rearrangements are recurrent cytogenetic alterations in AML, more commonly identified in children. These rearrangements correlate with elevated CD33 expression levels on leukemic cells [48,75]. Several reports have highlighted the

anti-leukemic effect of GO in relapsed/refractory KMT2A-rearranged AML [76,77]. In the COG AAML0531 trial, 215 patients harbored a 11q23/KMT2A rearrangement. In this patient population, patients treated with GO plus chemotherapy experienced a significantly higher EFS than those treated with chemotherapy alone (5-year EFS: 48% vs. 28%, $p = 0.002$), although 5-year OS did not reach significant difference across treatment arms (5-year OS: 64% vs. 53%, $p = 0.053$) [78].

3.3. Prognostic Impact of the Molecular Profile on GO Efficacy

Aside from favorable cytogenetic alterations, GO seems to benefit patients with NPM1 or FLT3 mutations.

NPM1 mutations are identified in 25% to 35% of AML patients and more frequently in cytogenetically normal AML (45%–60%) [79]. As previously mentioned, patients with NPM1 mutations display higher CD33 expression levels [53,54,55]. In the ALFA-0701 trial, the subset analyses pointed out the benefit of the addition of GO on 2-year EFS, RFS and OS in NPM1-mutated patients [32]. Recently, the prospective, randomized phase III trial Acute Myeloid Leukemia Study Group (AML SG) 09-09 addressed the clinical benefit of the addition of GO to induction (3 mg/m² on day 1) and consolidation chemotherapy (3 mg/m² on day 1 of the first consolidation cycle) in adult patients with NPM1-mutated AML eligible to receive intensive chemotherapy [80]. Among the 588 included patients, 292 were assigned to the GO arm and 296 to the standard arm. GO did not improve 2-year EFS in this trial (HR: 0.83, 95% CI: 0.65–1.04, $p = 0.10$). In patients achieving CR/CR with incomplete hematologic recovery, GO significantly decreased the cumulative incidence of relapse (HR: 0.66, 95% CI: 0.49–0.88, $p = 0.005$). Interestingly, GO improved 2-year EFS of FLT3 wild-type, but not FLT3-ITD mutated patients (HR: 0.72, 95% CI: 0.56–0.95 vs. HR: 1.53, 95% CI: 0.95–2.48, respectively; interaction test, $p = 0.002$).

FLT3-ITD mutations are found in approximately 20% of AML patients, and are associated with high expression of CD33 and impaired outcome [79]. The addition of GO has demonstrated improved OS, EFS and RFS in adult AML patients with FLT3-ITD mutations [32,56]. In a retrospective analysis of FLT3-ITD mutated patients from the COG AAML03P1 and AAML0531 trials, the addition of GO was associated with a decreased RR (37% vs. 59%, $p = 0.02$) [81]. Among the subset of patients who underwent hematopoietic stem cell transplantation

(HSCT) in first CR, this effect was even stronger, prior exposure to GO was associated with a reduced cumulative incidence of relapse (22% vs. 56%, $p = 0.003$). Patients displaying a high allelic ratio (> 0.4) experienced a lower RR of relapse when GO was administered prior to HSCT (15% vs. 53%, $p = 0.007$). By contrast, in the adult cohorts from the MRC AML15 and NCRI AML16 trials, GO did not improve clinical outcome of FLT3-ITD mutated AML patients. However, in these trials GO was administered as a single dose while fractionated doses of GO were administered in the ALFA-0701 and the COG AAML03P1 and AAML0531 trials.

Mutational profile of AML has been widely deciphered by high-throughput sequencing technologies over the past decade [82]. Mutations have become strong prognostic factors and have been integrated in the latest European LeukemiaNet (ELN) 2017 risk stratification [83]. A retrospective analysis from the ALFA-0701 showed a benefit of the addition of GO on EFS in patients from the ELN favorable-risk (HR: 0.54, 95% CI: 0.30–0.98, $p = 0.04$) and intermediate-risk groups (HR: 0.57, 95% CI: 0.33–1.00, $p = 0.05$), but not in patients from the ELN adverse-risk group (HR: 0.93, 95% CI: 0.61–1.43, $p = 0.74$) [84]. In particular, considering mutations by functional group as previously described [82], GO predominantly improved EFS of patients harboring signaling mutations, (HR: 0.43, 95% CI: 0.28–0.65) [84]. These mutations were associated with higher CD33 expression levels.

3.4. Prognostic Impact of Minimal Residual Disease (MRD)

AML prognosis highly depends on pretreatment markers such as cytogenetic and molecular alterations. These prognostic factors have been integrated in the latest ELN 2017 risk classification and guide HSCT decision [83]. Growing evidence has suggested the prognostic impact of persisting leukemic cells assessed by the minimal disease monitoring after induction even in patients achieving morphological CR [85,86,87,88,89,90,91]. Different cytometric or molecular markers have been evaluated to monitor MRD [92]. In the pediatric AML02 trial, patients were allocated to either chemotherapy alone, chemotherapy plus GO, or GO alone depending on MRD levels, assessed by flow cytometry [93]. Among patients with positive MRD, 13 out of 17 reached MRD negativity after GO administration alone, and 13 out of 29 had negative MRD after GO plus chemotherapy [94]. In the NCRI-AML16 trial, MRD measured by flow cytometry accounted for an independent prognostic factor for patient outcome. However, this trial failed to demonstrate a significantly higher proportion of MRD negativity measured by

flow cytometry among patients receiving GO compared to the control arm (57% vs. 48%, $p = 0.18$) [85].

NPM1 mutation and Wilms' tumor 1 (WT1) gene overexpression represent valuable prognostic molecular markers to assess MRD by real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) [89,95,96,97,98,99,100,101]. In the ALFA-0701 study, the addition of GO to standard induction regimen increased NPM1 MRD negativity proportion both at the end of induction and at the end of treatment (39% vs. 7%, $p = 0.006$; and 91% vs. 61% $p = 0.028$, respectively) [97]. By contrast, no impact on WT1 MRD has been observed when adding GO to standard induction regimen neither after induction nor after end of treatment (MRD negativity: 75% vs. 65%, $p = 0.29$; 82% vs. 80%, $p = 1$, respectively). The lower sensitivity of WT1 MRD compared to NPM1 MRD may have accounted for this discrepancy [97].

These encouraging results of MRD monitoring in patients treated with GO gave rise to consider MRD as a surrogate endpoint for patient outcome. To date, several MRD-directed trials are currently investigating GO benefit [102].

3.5. GO and Stemness Signature

Different studies support the critical role of leukemic stem cells (LSC) in AML maintenance. LSC are characterized by intrinsic properties of cell cycle quiescence, self-renewal and increased drug efflux which confer chemotherapy resistance [8,103,104]. A recent study based on five independent AML cohorts ($n = 908$ patients) set up the LSC17 score, derived from a 17-gene expression signature for LSC [105]. This score stands for a strong prognostic factor in AML. Interestingly, in the ALFA-0701 trial, the addition of GO correlated with improved outcome in patients with low but not high LSC17 score (EFS: HR: 0.42, $p = 0.001$; RFS: HR: 0.53, $p = 0.03$). Hence, the LSC17 score appears as relevant biomarker to predict GO benefit in AML patients [105].

Patients harboring normal karyotype and NPM1 mutations without FLT3-ITD are assimilated to a low molecular risk (LMR). Interestingly, the GO12 score, derived from 12 GO pathway genes accurately identified LMR/LMR-like patients that may benefit from GO across 5 independent AML cohorts ($n = 1188$ patients; area under the curve: 80.8%) [106].

3.5.1. CD33 Single Nucleotide Polymorphisms

Recent studies have addressed the relationship between CD33 genotype and GO efficacy. A pivotal retrospective study from the St Jude (AML02 trial) found out a single nucleotide polymorphism (SNP) in the splice enhancer region of the CD33 gene exon 2, rs12459419 (C > T; Ala14Val) that affected response to GO, as measured by flow cytometric MRD [107]. This SNP resulted in CD33 exon 2 skipping, leading to a shorter CD33 isoform lacking the immunoglobulin-like V-set domain which is the epitope for GO and for the P67.6-CD33 antibody, used for CD33-expression determination by immunophenotyping [108,109]. In patients displaying TT genotype, median CD33 expression was significantly lower than those with CT or CC genotype (TT vs. CT vs. CC: 44.8% vs. 97.4% vs. 152.2%, $p < 0.001$) [110]. These first results were further confirmed in AML patients aged 0 to 29 years from the AAML0531 trial [111]. Among the 816 patients genotyped for the SNP rs12459419, 51%, 39% and 10% of the patients had CC, CT, TT genotype, respectively. A benefit of the addition of GO was demonstrated on both RR and RFS only in patient with CC genotype. A recent similar study undertaken in younger adults with AML (13–69 years) from the randomized MRC AML15 and NCRI AML17 trials showed a similar distribution of CC, CT and TT genotypes (47%, 44%, 9%, respectively). However, this study failed to demonstrate any benefit of GO on OS and on RFS in the different genotype subgroups [112]. Likewise, the prognostic value of the CD33 splice site genotype was evaluated in patients receiving an alternative CD33-targeting antibody-drug conjugate, the vadastuximab talirine (SGN-CD33A) administered as monotherapy or in combination with hypomethylating agents, in a cohort of 20 adult patients (mean age: 69.8 years, range: 27.5–82.6 years) with AML [113]. Genotyping analysis of CD33 SNP rs12459419 revealed the following distribution of the CC/CT/TT genotypes: 50%/40%/10%. Similarly to the previous study led in adult patients, CD33 splice site genotype did not impact patient outcome neither in OS ($p = 0.923$) nor in EFS ($p = 0.683$). Differences in trial designs including age range of inclusion and GO dosing may explain these discrepancies. The ABCB1-mediated drug efflux, which is higher in older patients, may have encountered for such differences between pediatric and adult populations [51,113,114,115].

Genotyping studies of CD33 SNPs have identified five other SNP such as rs1803254(G > C; 3'UTR), rs35112940(G > A; Arg304Gly), rs2455069(A > G; Arg69Gly), rs61736475(Ser305Pro) and rs201074739 (CCGG deletion) which may modulate GO anti-leukemic effect [116]. A reduced RR in GO recipients was observed in patients displaying the following genotypes:

rs1803254 GG (p = 0.009), rs35112940 GG (p < 0.001), rs2455069 GG (p = 0.005), rs61736475 TT (p = 0.002), and rs201074739 CCGG/CCGG (p = 0.002).

Interestingly, the CD33_PGx6_Score—a composite score derived from six CD33 SNP of prognostic significance (rs12459419, rs2455069, rs201074739, rs35112940, rs61736475 and rs1803254)—has been recently set up to assess the impact of CD33 genotype on CD33 expression and GO response among 938 patients with de novo AML, aged 0–29 years [116]. CD33_PGx6_Score of 0 or higher was associated with higher CD33 expression levels and improved RFS and reduced RR in patients treated in GO arm (GO vs. no-GO arm, 5-year RFS: 62.5% vs. 46.8%, p = 0.008; 5-year RR: 28.3% vs. 49.9%, p < 0.001). By contrast, the addition of GO showed no improvement on patient outcome when the score was less than 0.

3.5.2. Prognostic Impact of ABCB1

Despite its pro-apoptotic effects, free calicheamicin may also be a substrate of the ABCB1 transporter (also known as permeability glycoprotein (Pgp) and multi-drug resistance protein (MDR1)) and to a lesser degree, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1 or ABCC1), but not the breast cancer resistance protein (BCRP) [117,118,119]. Hence, ABCB1 and MRP1 may pump calicheamicin out of the cell before exerting its cytotoxic activity and ultimately compromise GO efficacy.

ABCB1 is expressed in 58% of AML patients and its expression on blasts cells varies from 19% to 75% [118,120]. ABCB1 expression strongly correlates with response to GO, and higher expression level of ABCB1 stands for an independent poor prognostic factor in OS and EFS [51,117,120,121]. Importantly, in a retrospective study from three phase II trials [25,42,117], the expression of CD33 was inversely correlated with the ABCB1 drug efflux activity. However, after adjusting for CD33 expression, ABCB1 was still associated with outcome (p < 0.001) [51].

Interestingly, a comprehensive analysis of ABCB1 demonstrated that ABCB1 expression was shown to correlate with low white blood cell count and high expression of the following genes: CD34, BAALC, CD7 and CD200 [120]. Additionally, ABCB1 activity seems to be linked to the absence of FLT3-ITD and NPM1 mutations.

A recent study has assessed the clinical impact of ABCB1 genotype among 942 patients from the COG-AAML0531 trial [122]. GO recipients displaying CT or TT genotype for the SNP rs1045642 (C > T; Ile1145Ile) had improved outcomes compared to those with CC genotype (CT

or TT vs. CC, 5-year EFS: $p = 0.022$; 5-year RR: $p = 0.007$) as a result of an increased accumulation of calicheamicin.

3.5.3. SOCS3 Methylation

By binding to the CD33, SOCS3 induces the proteasomal degradation of the CD33-SOCS3 complex [6]. SOCS3 expression was suggested to modulate anti-CD33 antibodies response [123]. Analysis of the methylation status of the SOCS3 CpG islands was associated with a trend of improved response rate and OS in patients with SOCS3 hypermethylation (ORR: 86% vs. 56%, $p = 0.17$; OS: 25.1 months vs. 10.3 months; HR: 0.29%, 95% CI: 0.06–1.32, $p = 0.09$) [124].

3.5.4. HFE Mutations

HFE mutations are associated with higher risk of cancer. Interestingly, GO improved patient outcome among heterozygote HFE mutated patients compared to wild type patients, probably related to an impaired CD33 internalization [125].

4. Conclusions

Given its high expression on AML blasts, CD33 antigen represents an attractive target in AML. Different clinical trials have confirmed the anti-leukemic activity of GO in CD33-positive AML cells and have shown improved outcome in AML patients. Over the past years, flow cytometry, cytogenetics, and molecular approaches, including sequencing technologies, MRD monitoring, and genotyping studies of CD33 and ABCB1 SNPs have offered a comprehensive analysis of promising biomarkers for GO response. Collectively, these improvements have helped to refine the subset of patients that may benefit from GO and improve patient management. Increasing knowledge of the molecular alterations in AML paves the way to new combinatory regimens that may enhance GO efficacy. Hence, ongoing trials are evaluating the feasibility and the efficacy of combining GO to FLT3-ITD inhibitors (NCT03900949, NCT04385290, NCT04293562) and Bcl-2 inhibitors (NCT04070768, NCT04070768).

Author Contributions

L.F., E.F., M.C., T.B., F.G., S.C., N.B., J.L., H.D., C.P. and N.D. equally contributed to the manuscript writing and revision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

Laurène Fenwarth has received grants from Association Action Leucémies and Fondation Initiatives-Science–Innovation–Territoires–Economie, Université Lille Nord-Europe (I-SITE ULNE). This review was supported by the French National Cancer Institute (PRTK: TRANSLA10-060 and PHRC 2007/1911).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the writing of the manuscript.

Abbreviations

ABC	ATP-Binding Cassette
ABCB1	ATP-Binding Cassette Subfamily B Member 1
ALFA	Acute Leukemia French Association
AML	Acute Myeloid Leukemia
AMLSG	Acute Myeloid Leukemia Study Group
APL	Acute Promyelocytic Leukemia
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia-Telangiectasia and Rad3-Related
ATRA	All-Trans Retinoic Acid
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2
BSC	Best Supportive Care
CBF	Core-Binding Factor
CD	Cluster Of Differentiation
COG	Children’s Oncology Group
CR	Complete Remission
CRp	Complete Remission Without Platelet Recovery
DA	Daunorubicin Plus Cytarabine
DAE	Cytarabine, Daunorubicin, And Etoposide
ECS	Elongin B/C-Cul2/Cul5-Socs-Box Protein
EFS	Event-Free Survival

ELN	European LeukemiaNet
EMA	European Medicines Agency
EORTC	European Organization For Research And Treatment Of Cancer
FADD	Fas-Associated Protein With Death Domain
FDA	Food And Drug Administration
FLAG-Ida	Fludarabine, Cytarabine, Granulocyte Colony-Stimulating Factor, and Idarubicin
FLT3-ITD	FMS-Like Tyrosine Kinase 3 Internal Tandem Duplication
GIMEMA	Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne Dell'adulto
GO	Gemtuzumab Ozogamicin
HR	Hazard Ratio
HSCT	Hematopoietic Stem Cell Transplantation
KMT2A	Lysine Methyltransferase 2A
KMT2A-r	Lysine Methyltransferase 2A Rearrangement
LMR	Low Molecular Risk
LSC score	Leukemic Stem Cell Score
MACE	Amsacrine, Cytarabine and Etoposide
MDS	Myelodysplastic Syndrome
MICE	Mitoxantrone, Cytarabine, and Etoposide
MidAC	Mitoxantrone and Cytarabine
MRC	Medical Research Council
MRD	Minimal Residual Disease
MRP1	Multidrug Resistance-Associated Protein 1
NCRI	National Cancer Research Institute
NPM1	Nucleophosmin 1 gene
NS	Not Significant
ORR	Overall Response Rate
OS	Overall Survival
Pgp	Permeability Glycoprotein
Q	Quartile
RFS	Relapse-Free Survival
RQ-PCR	Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
RR	Risk Of Relapse
SHP	Src Homology-2 Domain-Containing Tyrosine Phosphatases
Siglec	Sialic-Acid-Binding Immunoglobulin-Like Lectins Family
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOCS3	Suppressor Of Cytokine Signaling 3
SWOG	Southwest Oncology Group
TP53	Tumor Protein 53
Vs	Versus
WT1	Wilms' Tumor 1 Gene

References

1. Othus, M.; Kantarjian, H.; Petersdorf, S.; Ravandi, F.; Godwin, J.; Cortes, J.; Pierce, S.; Erba, H.; Faderl, S.; Appelbaum, F.R.; et al. Declining rates of treatment-related mortality in patients with newly diagnosed AML given “intense” induction regimens: A report from SWOG and MD anderson. *Leukemia* **2014**, 28, 289–292. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
2. Cowan, A.J.; Laszlo, G.S.; Estey, E.H.; Walter, R.B. Antibody-based therapy of acute myeloid leukemia with gemtuzumab ozogamicin. *Front. Biosci.* **2013**, 18, 1311–1334. [[Google Scholar](#)]
3. Paul, S.P.; Taylor, L.S.; Stansbury, E.K.; McVicar, D.W. Myeloid specific human CD33 is an inhibitory receptor with differential ITIM function in recruiting the phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Blood* **2000**, 96, 483–490. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
4. Godwin, C.D.; Gale, R.P.; Walter, R.B. Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **2017**, 31, 1855–1868. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
5. Taylor, V.C.; Buckley, C.D.; Douglas, M.; Cody, A.J.; Simmons, D.L.; Freeman, S.D. The myeloid-specific sialic acid-binding receptor, CD33, associates with the protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 11505–11512. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
6. Orr, S.J.; Morgan, N.M.; Elliott, J.; Burrows, J.F.; Scott, C.J.; McVicar, D.W.; Johnston, J.A. CD33 responses are blocked by SOCS3 through accelerated proteasomal-mediated turnover. *Blood* **2007**, 109, 1061–1068. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
7. Andrews, R.G.; Takahashi, M.; Segal, G.M.; Powell, J.S.; Bernstein, I.D.; Singer, J.W. The L4F3 antigen is expressed by unipotent and multipotent colony-forming cells but not by their precursors. *Blood* **1986**, 68, 1030–1035. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
8. Dick, J.E. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* **2008**, 112, 4793–4807. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
9. Walter, R.B.; Appelbaum, F.R.; Estey, E.H.; Bernstein, I.D. Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. *Blood* **2012**, 119, 6198–6208. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
10. Welch, J.S.; Ley, T.J.; Link, D.C.; Miller, C.A.; Larson, D.E.; Koboldt, D.C.; Wartman, L.D.; Lamprecht, T.L.; Liu, F.; Xia, J.; et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* **2012**, 150, 264–278. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

11. Griffin, J.D.; Linch, D.; Sabbath, K.; Larcom, P.; Schlossman, S.F. A monoclonal antibody reactive with normal and leukemic human myeloid progenitor cells. *Leuk. Res.* **1984**, *8*, 521–534. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
12. Dinndorf, P.A.; Andrews, R.G.; Benjamin, D.; Ridgway, D.; Wolff, L.; Bernstein, I.D. Expression of normal myeloid-associated antigens by acute leukemia cells. *Blood* **1986**, *67*, 1048–1053. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
13. Hamann, P.R.; Hinman, L.M.; Hollander, I.; Beyer, C.F.; Lindh, D.; Holcomb, R.; Hallett, W.; Tsou, H.-R.; Upešlaciš, J.; Shochat, D.; et al. Gemtuzumab ozogamicin, a potent and selective anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 47–58. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
14. van Der Velden, V.H.; te Marvelde, J.G.; Hoogeveen, P.G.; Bernstein, I.D.; Houtsmuller, A.B.; Berger, M.S.; van Dongen, J.J. Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg (CMA-676) in acute myeloid leukemia: In vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells. *Blood* **2001**, *97*, 3197–3204. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
15. Hamann, P.R.; Hinman, L.M.; Beyer, C.F.; Lindh, D.; Upešlaciš, J.; Flowers, D.A.; Bernstein, I. An anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. Choice of linker. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 40–46. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
16. Elmroth, K.; Nygren, J.; Mårtensson, S.; Ismail, I.H.; Hammarsten, O. Cleavage of cellular DNA by calicheamicin gamma1. *DNA Repair* **2003**, *2*, 363–374. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
17. Linenberger, M.L. CD33-directed therapy with gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: Progress in understanding cytotoxicity and potential mechanisms of drug resistance. *Leukemia* **2005**, *19*, 176–182. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
18. Amico, D.; Barbui, A.M.; Erba, E.; Rambaldi, A.; Introna, M.; Golay, J. Differential response of human acute myeloid leukemia cells to gemtuzumab ozogamicin in vitro: Role of Chk1 and Chk2 phosphorylation and caspase 3. *Blood* **2003**, *101*, 4589–4597. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
19. Mårtensson, S.; Nygren, J.; Osheroff, N.; Hammarsten, O. Activation of the DNA-dependent protein kinase by drug-induced and radiation-induced DNA strand breaks. *Radiat. Res.* **2003**, *160*, 291–301. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

20. Sullivan, N.; Lyne, L. Sensitivity of fibroblasts derived from ataxia-telangiectasia patients to calicheamicin γ II. *Mutat. Res. Lett.* **1990**, *245*, 171–175. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
21. Prokop, A.; Wrasidlo, W.; Lode, H.; Herold, R.; Lang, F.; Henze, G.; Dörken, B.; Wieder, T.; Daniel, P.T. Induction of apoptosis by enediyne antibiotic calicheamicin thetaII proceeds through a caspase-mediated mitochondrial amplification loop in an entirely Bax-dependent manner. *Oncogene* **2003**, *22*, 9107–9120. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
22. Haag, P.; Viktorsson, K.; Lindberg, M.L.; Kanter, L.; Lewensohn, R.; Stenke, L. Deficient activation of Bak and Bax confers resistance to gemtuzumab ozogamicin-induced apoptotic cell death in AML. *Exp. Hematol.* **2009**, *37*, 755–766. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
23. Moore, J.; Seiter, K.; Kolitz, J.; Stock, W.; Giles, F.; Kalaycio, M.; Zenk, D.; Marcucci, G. A Phase II study of Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) combined with gemtuzumab ozogamicin in older patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *Leuk. Res.* **2006**, *30*, 777–783. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
24. Sievers, E.L.; Appelbaum, F.R.; Spielberger, R.T.; Forman, S.J.; Flowers, D.; Smith, F.O.; Shannon-Dorcy, K.; Berger, M.S.; Bernstein, I.D. Selective Ablation of Acute Myeloid Leukemia Using Antibody-Targeted Chemotherapy: A Phase I Study of an Anti-CD33 Calicheamicin Immunoconjugate Presented in part at the 1997 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Denver, CO; the 1997 European Cancer Conference, Hamburg, Germany; and the 1997 Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, CA. *Blood* **1999**, *93*, 3678–3684. [[Google Scholar](#)]
25. Sievers, E.L.; Larson, R.A.; Stadtmauer, E.A.; Estey, E.; Löwenberg, B.; Dombret, H.; Karanes, C.; Theobald, M.; Bennett, J.M.; Sherman, M.L.; et al. Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2001**, *19*, 3244–3254. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
26. Taksin, A.-L.; Legrand, O.; Raffoux, E.; de Revel, T.; Thomas, X.; Contentin, N.; Bouabdallah, R.; Pautas, C.; Turlure, P.; Reman, O.; et al. High efficacy and safety profile of fractionated doses of Mylotarg as induction therapy in patients with relapsed acute myeloblastic leukemia: A prospective study of the alfa group. *Leukemia* **2007**, *21*, 66–71. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

27. Farhat, H.; Reman, O.; Raffoux, E.; Berthon, C.; Pautas, C.; Kammoun, L.; Chantepie, S.; Gardin, C.; Rousselot, P.; Chevret, S.; et al. Fractionated doses of gemtuzumab ozogamicin with escalated doses of daunorubicin and cytarabine as first acute myeloid leukemia salvage in patients aged 50–70-year old: A phase 1/2 study of the acute leukemia French association. *Am. J. Hematol.* **2012**, *87*, 62–65. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
28. Burnett, A.K.; Hills, R.K.; Milligan, D.; Kjeldsen, L.; Kell, J.; Russell, N.H.; Yin, J.A.L.; Hunter, A.; Goldstone, A.H.; Wheatley, K. Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: Results of the MRC AML15 trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 369–377. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
29. Petersdorf, S.H.; Kopecky, K.J.; Slovak, M.; Willman, C.; Nevill, T.; Brandwein, J.; Larson, R.A.; Erba, H.P.; Stiff, P.J.; Stuart, R.K.; et al. A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **2013**, *121*, 4854–4860. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
30. Burnett, A.K.; Russell, N.H.; Hills, R.K.; Kell, J.; Freeman, S.; Kjeldsen, L.; Hunter, A.E.; Yin, J.; Craddock, C.F.; Dufva, I.H.; et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy improves survival in older patients with acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 3924–3931. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
31. Delaunay, J.; Recher, C.; Pigneux, A.; Witz, F.; Vey, N.; Blanchet, O.; Lefebvre, P.; Luquet, I.; Guillerme, I.; Volteau, C.; et al. Addition of gemtuzumab ozogamycin to chemotherapy improves event-free survival but not overall survival of AML patients with intermediate cytogenetics not eligible for allogeneic transplantation. results of the GOELAMS AML 2006 IR study. *Blood* **2011**, *118*, 79. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
32. Castaigne, S.; Pautas, C.; Terré, C.; Raffoux, E.; Bordessoule, D.; Bastie, J.-N.; Legrand, O.; Thomas, X.; Turlure, P.; Reman, O.; et al. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): A randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Lond. Engl.* **2012**, *379*, 1508–1516. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
33. Lambert, J.; Pautas, C.; Terré, C.; Raffoux, E.; Turlure, P.; Caillot, D.; Legrand, O.; Thomas, X.; Gardin, C.; Gogat-Marchant, K.; et al. Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia: Final efficacy and safety updates from the open-label, phase III ALFA-0701 trial. *Haematologica* **2019**, *104*, 113–119. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

34. Burnett, A.; Cavenagh, J.; Russell, N.; Hills, R.; Kell, J.; Jones, G.; Nielsen, O.J.; Khwaja, A.; Thomas, I.; Clark, R.; et al. Defining the dose of gemtuzumab ozogamicin in combination with induction chemotherapy in acute myeloid leukemia: A comparison of 3 mg/m² with 6 mg/m² in the NCRI AML17 trial. *Haematologica* **2016**, 101, 724–731. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
35. Amadori, S.; Suci, S.; Stasi, R.; Salih, H.R.; Selleslag, D.; Muus, P.; De Fabritiis, P.; Venditti, A.; Ho, A.D.; Lübbert, M.; et al. Sequential combination of gemtuzumab ozogamicin and standard chemotherapy in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: Results of a randomized phase III trial by the EORTC and GIMEMA consortium (AML-17). *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2013**, 31, 4424–4430. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
36. Amadori, S.; Suci, S.; Selleslag, D.; Aversa, F.; Gaidano, G.; Musso, M.; Annino, L.; Venditti, A.; Voso, M.T.; Mazzone, C.; et al. Gemtuzumab ozogamicin versus best supportive care in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia unsuitable for intensive chemotherapy: Results of the randomized phase III EORTC-GIMEMA AML-19 trial. *J. Clin. Oncol.* **2016**, 34, 972–979. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
37. Arceci, R.J.; Sande, J.; Lange, B.; Shannon, K.; Franklin, J.; Hutchinson, R.; Vik, T.A.; Flowers, D.; Aplenc, R.; Berger, M.S.; et al. Safety and efficacy of gemtuzumab ozogamicin in pediatric patients with advanced CD33+ acute myeloid leukemia. *Blood* **2005**, 106, 1183–1188. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
38. Aplenc, R.; Alonzo, T.A.; Gerbing, R.B.; Lange, B.J.; Hurwitz, C.A.; Wells, R.J.; Bernstein, I.; Buckley, P.; Krimmel, K.; Smith, F.O.; et al. Safety and efficacy of gemtuzumab ozogamicin in combination with chemotherapy for pediatric acute myeloid leukemia: A report from the children’s oncology group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2008**, 26, 2390–2395. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
39. Cooper, T.M.; Franklin, J.; Gerbing, R.B.; Alonzo, T.A.; Hurwitz, C.; Raimondi, S.C.; Hirsch, B.; Smith, F.O.; Mathew, P.; Arceci, R.J.; et al. AAML03P1, a pilot study of the safety of gemtuzumab ozogamicin in combination with chemotherapy for newly diagnosed childhood acute myeloid leukemia: A report from the children’s oncology group. *Cancer* **2012**, 118, 761–769. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

40. Gamis, A.S.; Alonzo, T.A.; Meshinchi, S.; Sung, L.; Gerbing, R.B.; Raimondi, S.C.; Hirsch, B.A.; Kahwash, S.B.; Heerema-McKenney, A.; Winter, L.; et al. Gemtuzumab ozogamicin in children and adolescents with de novo acute myeloid leukemia improves event-free survival by reducing relapse risk: Results from the randomized phase III children's oncology group trial AAML0531. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 3021–3032. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
41. Bross, P.F.; Beitz, J.; Chen, G.; Chen, X.H.; Duffy, E.; Kieffer, L.; Roy, S.; Sridhara, R.; Rahman, A.; Williams, G.; et al. Approval summary: Gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 1490–1496. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
42. Larson, R.A.; Sievers, E.L.; Stadtmauer, E.A.; Löwenberg, B.; Estey, E.H.; Dombret, H.; Theobald, M.; Voliotis, D.; Bennett, J.M.; Richie, M.; et al. Final report of the efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first recurrence. *Cancer* **2005**, *104*, 1442–1452. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Amadori, S.; Suci, S.; Selleslag, D.; Stasi, R.; Alimena, G.; Baila, L.; Rizzoli, V.; Borlenghi, E.; Gaidano, G.; Magro, D.; et al. Randomized trial of two schedules of low-dose gemtuzumab ozogamicin as induction monotherapy for newly diagnosed acute myeloid leukaemia in older patients not considered candidates for intensive chemotherapy. A phase II study of the EORTC and GIMEMA leukaemia groups (AML-19). *Br. J. Haematol.* **2010**, *149*, 376–382. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
44. Kell, W.J.; Burnett, A.K.; Chopra, R.; Yin, J.A.L.; Clark, R.E.; Rohatiner, A.; Culligan, D.; Hunter, A.; Prentice, A.G.; Milligan, D.W. A feasibility study of simultaneous administration of gemtuzumab ozogamicin with intensive chemotherapy in induction and consolidation in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **2003**, *102*, 4277–4283. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Pilorge, S.; Rigau, S.; Rabian, F.; Sarkozy, C.; Taksin, A.L.; Farhat, H.; Merabet, F.; Ghez, S.; Ragueneau, V.; Terré, C.; et al. Fractionated gemtuzumab ozogamicin and standard dose cytarabine produced prolonged second remissions in patients over the age of 55 years with acute myeloid leukemia in late first relapse. *Am. J. Hematol.* **2014**, *89*, 399–403. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

46. Hills, R.K.; Castaigne, S.; Appelbaum, F.R.; Delaunay, J.; Petersdorf, S.; Othus, M.; Estey, E.H.; Dombret, H.; Chevret, S.; Ifrah, N.; et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: A meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, 986–996. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
47. Pollard, J.A.; Alonzo, T.A.; Loken, M.; Gerbing, R.B.; Ho, P.A.; Bernstein, I.D.; Raimondi, S.C.; Hirsch, B.; Franklin, J.; Walter, R.B.; et al. Correlation of CD33 expression level with disease characteristics and response to gemtuzumab ozogamicin containing chemotherapy in childhood AML. *Blood* **2012**, *119*, 3705–3711. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
48. Pollard, J.A.; Loken, M.; Gerbing, R.B.; Raimondi, S.C.; Hirsch, B.A.; Aplenc, R.; Bernstein, I.D.; Gamis, A.S.; Alonzo, T.A.; Meshinchi, S. CD33 expression and its association with gemtuzumab ozogamicin response: Results from the randomized phase III children’s oncology group trial AAML0531. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 747–755. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
49. Dinndorf, P.A.; Buckley, J.D.; Nesbit, M.E.; Lampkin, B.C.; Piomelli, S.; Feig, S.A.; Kersey, J.H.; Hammond, G.D.; Bernstein, I.D. Expression of myeloid differentiation antigens in acute nonlymphocytic leukemia: Increased concentration of CD33 antigen predicts poor outcome—A report from the childrens cancer study group. *Med. Pediatr. Oncol.* **1992**, *20*, 192–200. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
50. Walter, R.B.; Raden, B.W.; Kamikura, D.M.; Cooper, J.A.; Bernstein, I.D. Influence of CD33 expression levels and ITIM-dependent internalization on gemtuzumab ozogamicin-induced cytotoxicity. *Blood* **2005**, *105*, 1295–1302. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
51. Walter, R.B.; Gooley, T.A.; van der Velden, V.H.J.; Loken, M.R.; van Dongen, J.J.M.; Flowers, D.A.; Bernstein, I.D.; Appelbaum, F.R. CD33 expression and P-glycoprotein-mediated drug efflux inversely correlate and predict clinical outcome in patients with acute myeloid leukemia treated with gemtuzumab ozogamicin monotherapy. *Blood* **2007**, *109*, 4168–4170. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
52. Khan, N.; Hills, R.K.; Virgo, P.; Couzens, S.; Clark, N.; Gilkes, A.; Richardson, P.; Knapper, S.; Grimwade, D.; Russell, N.H.; et al. Expression of CD33 is a predictive factor for effect of gemtuzumab ozogamicin at different doses in adult acute myeloid leukaemia. *Leukemia* **2017**, *31*, 1059–1068. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. De Propriis, M.S.; Raponi, S.; Diverio, D.; Milani, M.L.; Meloni, G.; Falini, B.; Foà, R.; Guarini, A. High CD33 expression levels in acute myeloid leukemia cells carrying the nucleophosmin (NPM1) mutation. *Haematologica* **2011**, *96*, 1548–1551. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Ehninger, A.; Kramer, M.; Röllig, C.; Thiede, C.; Bornhäuser, M.; von Bonin, M.; Wermke, M.; Feldmann, A.; Bachmann, M.; Ehninger, G.; et al. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* **2014**, *4*, e218. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Olombel, G.; Guerin, E.; Guy, J.; Perrot, J.-Y.; Dumezy, F.; de Labarthe, A.; Bastie, J.-N.; Legrand, O.; Raffoux, E.; Plesa, A.; et al. The level of blast CD33 expression positively impacts the effect of gemtuzumab ozogamicin in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **2016**, *127*, 2157–2160. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Renneville, A.; Abdelali, R.B.; Chevret, S.; Nibourel, O.; Cheok, M.; Pautas, C.; Duléry, R.; Boyer, T.; Cayuela, J.-M.; Hayette, S.; et al. Clinical impact of gene mutations and lesions detected by SNP-array karyotyping in acute myeloid leukemia patients in the context of gemtuzumab ozogamicin treatment: Results of the ALFA-0701 trial. *Oncotarget* **2014**, *5*, 916–932. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
57. Wiemels, J.L.; Xiao, Z.; Buffler, P.A.; Maia, A.T.; Ma, X.; Dicks, B.M.; Smith, M.T.; Zhang, L.; Feusner, J.; Wiencke, J.; et al. In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood* **2002**, *99*, 3801–3805. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
58. Jourdan, E.; Boissel, N.; Chevret, S.; Delabesse, E.; Renneville, A.; Cornillet, P.; Blanchet, O.; Cayuela, J.-M.; Recher, C.; Raffoux, E.; et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood* **2013**, *121*, 2213–2223. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
59. Appelbaum, F.R.; Bernstein, I.D. Gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia. *Blood* **2017**, *130*, 2373–2376. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
60. Borthakur, G.; Cortes, J.E.; Estey, E.E.; Jabbour, E.; Faderl, S.; O'Brien, S.; Garcia-Manero, G.; Kadia, T.M.; Wang, X.; Patel, K.; et al. Gemtuzumab ozogamicin with fludarabine, cytarabine, and granulocyte colony stimulating factor (FLAG-GO) as front-line regimen in patients with core binding factor acute myelogenous leukemia. *Am. J. Hematol.* **2014**, *89*, 964–968. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

61. Borthakur, G.M.; Cortes, J.E.; Ravandi, F.; Garcia-Manero, G.; Kadia, T.M.; Jabbour, E.; Patel, K.; Issa, G.C.; Daver, N.G.; Ohanian, M.N.; et al. Fludarabine, cytarabine, G-CSF and gemtuzumab ozogamicin (FLAG-GO) regimen results in better molecular response and relapse-free survival in core binding factor acute myeloid leukemia than FLAG and idarubicin (FLAG-Ida). *Blood* **2019**, *134*, 290. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
62. Lo-Coco, F.; Avvisati, G.; Vignetti, M.; Thiede, C.; Orlando, S.M.; Iacobelli, S.; Ferrara, F.; Fazi, P.; Cicconi, L.; Di Bona, E.; et al. Retinoic Acid and Arsenic Trioxide for Acute Promyelocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 111–121. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Sanz, M.A.; Fenaux, P.; Tallman, M.S.; Estey, E.H.; Löwenberg, B.; Naoe, T.; Lengfelder, E.; Döhner, H.; Burnett, A.K.; Chen, S.-J.; et al. Management of acute promyelocytic leukemia: Updated recommendations from an expert panel of the European leukemianet. *Blood* **2019**, *133*, 1630–1643. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Michieli, M.; Damiani, D.; Ermacora, A.; Geromin, A.; Michelutti, A.; Masolini, P.; Baccarani, M. P-glycoprotein (PGP), lung resistance-related protein (LRP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) expression in acute promyelocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **2000**, *108*, 703–709. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
65. Takeshita, A.; Shinjo, K.; Naito, K.; Matsui, H.; Sahara, N.; Shigeno, K.; Horii, T.; Shirai, N.; Maekawa, M.; Ohnishi, K.; et al. Efficacy of gemtuzumab ozogamicin on ATRA- and arsenic-resistant acute promyelocytic leukemia (APL) cells. *Leukemia* **2005**, *19*, 1306–1311. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
66. Breccia, M.; Lo-Coco, F. Gemtuzumab ozogamicin for the treatment of acute promyelocytic leukemia: Mechanisms of action and resistance, safety and efficacy. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2011**, *11*, 225–234. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
67. Estey, E.H.; Giles, F.J.; Beran, M.; O'Brien, S.; Pierce, S.A.; Faderl, S.H.; Cortes, J.E.; Kantarjian, H.M. Experience with gemtuzumab ozogamycin (“mylotarg”) and all-trans retinoic acid in untreated acute promyelocytic leukemia. *Blood* **2002**, *99*, 4222–4224. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
68. Lo-Coco, F.; Cimino, G.; Breccia, M.; Noguera, N.I.; Diverio, D.; Finolezzi, E.; Pogliani, E.M.; Di Bona, E.; Micalizzi, C.; Kropp, M.; et al. Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) as a

- single agent for molecularly relapsed acute promyelocytic leukemia. *Blood* **2004**, 104, 1995–1999. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
69. Breccia, M.; Cimino, G.; Diverio, D.; Gentilini, F.; Mandelli, F.; Lo Coco, F. Sustained molecular remission after low dose gemtuzumab-ozogamicin in elderly patients with advanced acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* **2007**, 92, 1273–1274. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
70. Burnett, A.K.; Russell, N.H.; Hills, R.K.; Bowen, D.; Kell, J.; Knapper, S.; Morgan, Y.G.; Lok, J.; Grech, A.; Jones, G.; et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid treatment for acute promyelocytic leukaemia in all risk groups (AML17): Results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2015**, 16, 1295–1305. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
71. Takeshita, A.; Shinjo, K.; Naito, K.; Matsui, H.; Sahara, N.; Shigeno, K.; Suzumura, T.; Horii, T.; Shirai, N.; Maekawa, M.; et al. Two patients with all-trans retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia treated successfully with gemtuzumab ozogamicin as a single agent. *Int. J. Hematol.* **2005**, 82, 445–448. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Ravandi, F.; Estey, E.; Jones, D.; Faderl, S.; O'Brien, S.; Fiorentino, J.; Pierce, S.; Blamble, D.; Estrov, Z.; Wierda, W.; et al. Effective treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid, arsenic trioxide, and gemtuzumab ozogamicin. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2009**, 27, 504–510. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Abaza, Y.; Kantarjian, H.; Garcia-Manero, G.; Estey, E.; Borthakur, G.; Jabbour, E.; Faderl, S.; O'Brien, S.; Wierda, W.; Pierce, S.; et al. Long-term outcome of acute promyelocytic leukemia treated with all-trans-retinoic acid, arsenic trioxide, and gemtuzumab. *Blood* **2017**, 129, 1275–1283. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
74. Lancet, J.E.; Moseley, A.B.; Coutre, S.E.; DeAngelo, D.J.; Othus, M.; Tallman, M.S.; Litzow, M.R.; Komrokji, R.S.; Erba, H.P.; Appelbaum, F.R. A phase 2 study of ATRA, arsenic trioxide, and gemtuzumab ozogamicin in patients with high-risk APL (SWOG 0535). *Blood Adv.* **2020**, 4, 1683–1689. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
75. Muñoz, L.; Nomdedéu, J.F.; Villamor, N.; Guardia, R.; Colomer, D.; Ribera, J.M.; Torres, J.P.; Berlanga, J.J.; Fernández, C.; Llorente, A.; et al. Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: Clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells. *Leukemia* **2003**, 17, 76–82. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

76. Tamai, H.; Shioi, Y.; Yamaguchi, H.; Okabe, M.; Wakita, S.; Mizuki, T.; Nakayama, K.; Inokuchi, K.; Tajika, K.; Dan, K. Treatment of relapsed acute myeloid leukemia with MLL/AF6 fusion after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with gemtuzumab ozogamicin with a long interval followed by donor lymphocyte infusion. *Leukemia* **2008**, *22*, 1273–1274. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
77. Asano, H.; Yamamoto, G.; Hosoi, M.; Takahashi, T.; Hangaishi, A.; Kurokawa, M. Complete molecular remission in refractory acute myeloid leukemia with MLL/AF9 treated with gemtuzumab ozogamicin. *Leuk. Res.* **2010**, *34*, e152–e153. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
78. Pollard, J.; Alonzo, T.A.; Gerbing, R.B.; Raimondi, S.C.; Hirsch, B.A.; Sung, L.; Aplenc, R.; Guest, E.M.; Bernstein, I.D.; Loken, M.R.; et al. Treatment of 11q23/MLL + AML with gemtuzumab ozogamicin: Results from the randomized phase III children’s oncology group trial AAML0531. *Blood* **2015**, *126*, 799. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
79. Döhner, H.; Weisdorf, D.J.; Bloomfield, C.D. Acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1136–1152. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
80. Schlenk, R.F.; Paschka, P.; Krzykalla, J.; Weber, D.; Kapp-Schwoerer, S.; Gaidzik, V.I.; Leis, C.; Fiedler, W.; Kindler, T.; Schroeder, T.; et al. Gemtuzumab ozogamicin in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: Early results from the prospective randomized AMLSG 09-09 phase III study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 623–632. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
81. Tarlock, K.; Alonzo, T.A.; Gerbing, R.B.; Raimondi, S.C.; Hirsch, B.A.; Sung, L.; Pollard, J.A.; Aplenc, R.; Loken, M.R.; Gams, A.S.; et al. Gemtuzumab ozogamicin reduces relapse risk in FLT3/ITD acute myeloid leukemia: A report from the children’s oncology group. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2016**, *22*, 1951–1957. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Papaemmanuil, E.; Gerstung, M.; Bullinger, L.; Gaidzik, V.I.; Paschka, P.; Roberts, N.D.; Potter, N.E.; Heuser, M.; Thol, F.; Bolli, N.; et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 2209–2221. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Döhner, H.; Estey, E.; Grimwade, D.; Amadori, S.; Appelbaum, F.R.; Büchner, T.; Dombret, H.; Ebert, B.L.; Fenaux, P.; Larson, R.A.; et al. Diagnosis and management of AML in adults:

- 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **2017**, 129, 424–447. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Fournier, E.; Duployez, N.; Ducourneau, B.; Raffoux, E.; Turlure, P.; Caillot, D.; Thomas, X.; Marceau-Renaut, A.; Chantepie, S.; Malfuson, J.-V.; et al. Mutational profile and benefit of gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia. *Blood* **2020**, 135, 542–546. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
85. Freeman, S.D.; Virgo, P.; Couzens, S.; Grimwade, D.; Russell, N.; Hills, R.K.; Burnett, A.K. Prognostic relevance of treatment response measured by flow cytometric residual disease detection in older patients with acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2013**, 31, 4123–4131. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
86. Freeman, S.D.; Hills, R.K.; Virgo, P.; Khan, N.; Couzens, S.; Dillon, R.; Gilkes, A.; Upton, L.; Nielsen, O.J.; Cavenagh, J.D.; et al. Measurable residual disease at induction redefines partial response in acute myeloid leukemia and stratifies outcomes in patients at standard risk without NPM1 mutations. *J. Clin. Oncol.* **2018**, 36, 1486–1497. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
87. Chen, X.; Xie, H.; Wood, B.L.; Walter, R.B.; Pagel, J.M.; Becker, P.S.; Sandhu, V.K.; Abkowitz, J.L.; Appelbaum, F.R.; Estey, E.H. Relation of clinical response and minimal residual disease and their prognostic impact on outcome in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **2015**, 33, 1258–1264. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
88. Walter, R.B.; Gyurkocza, B.; Storer, B.E.; Godwin, C.D.; Pagel, J.M.; Buckley, S.A.; Sorror, M.L.; Wood, B.L.; Storb, R.; Appelbaum, F.R.; et al. Comparison of minimal residual disease as outcome predictor for AML patients in first complete remission undergoing myeloablative or nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Leukemia* **2015**, 29, 137–144. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
89. Balsat, M.; Renneville, A.; Thomas, X.; de Botton, S.; Caillot, D.; Marceau, A.; Lemasle, E.; Marolleau, J.-P.; Nibourel, O.; Berthon, C. Postinduction minimal residual disease predicts outcome and benefit from allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia with NPM1 mutation: A study by the acute leukemia french association group. *J. Clin. Oncol.* **2017**, 35, 185–193. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
90. Jongen-Lavrencic, M.; Grob, T.; Hanekamp, D.; Kavelaars, F.G.; al Hinai, A.; Zeilemaker, A.; Erpelinck-Verschueren, C.A.J.; Gradowska, P.L.; Meijer, R.; Cloos, J.; et al. Molecular

- minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2018**, 378, 1189–1199. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
91. Hourigan, C.S.; Dillon, L.W.; Gui, G.; Logan, B.R.; Fei, M.; Ghannam, J.; Li, Y.; Licon, A.; Alyea, E.P.; Bashey, A.; et al. Impact of conditioning intensity of allogeneic transplantation for acute myeloid leukemia with genomic evidence of residual disease. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2020**, 38, 1273–1283. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Schuurhuis, G.J.; Heuser, M.; Freeman, S.; Béné, M.-C.; Buccisano, F.; Cloos, J.; Grimwade, D.; Haferlach, T.; Hills, R.K.; Hourigan, C.S.; et al. Minimal/measurable residual disease in AML: A consensus document from the European leukemianet MRD working party. *Blood* **2018**, 131, 1275–1291. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Rubnitz, J.E.; Inaba, H.; Dahl, G.; Ribeiro, R.C.; Bowman, W.P.; Taub, J.; Pounds, S.; Razzouk, B.I.; Lacayo, N.J.; Cao, X.; et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: Results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncol.* **2010**, 11, 543–552. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
94. O'Hear, C.; Inaba, H.; Pounds, S.; Shi, L.; Dahl, G.; Bowman, W.P.; Taub, J.W.; Pui, C.-H.; Ribeiro, R.C.; Coustan-Smith, E.; et al. Gemtuzumab ozogamicin can reduce minimal residual disease in patients with childhood acute myeloid leukemia. *Cancer* **2013**, 119, 4036–4043. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
95. Lapillonne, H.; Renneville, A.; Auvrignon, A.; Flamant, C.; Blaise, A.; Perot, C.; Lai, J.-L.; Ballerini, P.; Mazingue, F.; Fasola, S.; et al. High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2006**, 24, 1507–1515. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
96. Cilloni, D.; Renneville, A.; Hermitte, F.; Hills, R.K.; Daly, S.; Jovanovic, J.V.; Gottardi, E.; Fava, M.; Schnittger, S.; Weiss, T.; et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European Leukemianet study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2009**, 27, 5195–5201. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
97. Lambert, J.; Lambert, J.; Nibourel, O.; Pautas, C.; Hayette, S.; Cayuela, J.-M.; Terré, C.; Rousselot, P.; Dombret, H.; Chevret, S.; et al. MRD assessed by WT1 and NPM1 transcript levels identifies distinct outcomes in AML patients and is influenced by gemtuzumab ozogamicin. *Oncotarget* **2014**, 5, 6280–6288. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

98. Ivey, A.; Hills, R.K.; Simpson, M.A.; Jovanovic, J.V.; Gilkes, A.; Grech, A.; Patel, Y.; Bhudia, N.; Farah, H.; Mason, J.; et al. Assessment of minimal residual disease in standard-risk AML. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 422–433. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
99. Kayser, S.; Benner, A.; Thiede, C.; Martens, U.; Huber, J.; Stadtherr, P.; Janssen, J.W.G.; Röllig, C.; Uppenkamp, M.J.; Bochtler, T.; et al. Pretransplant NPM1 MRD levels predict outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* **2016**, *6*, e449. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
100. Candoni, A.; De Marchi, F.; Zannier, M.E.; Lazzarotto, D.; Filì, C.; Dubbini, M.V.; Rabassi, N.; Toffoletti, E.; Lau, B.W.; Fanin, R. High prognostic value of pre-allogeneic stem cell transplantation minimal residual disease detection by WT1 gene expression in AML transplanted in cytologic complete remission. *Leuk. Res.* **2017**, *63*, 22–27. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
101. Dillon, R.; Hills, R.; Freeman, S.; Potter, N.; Jovanovic, J.; Ivey, A.; Kanda, A.S.; Runglall, M.; Foot, N.; Valganon, M.; et al. Molecular MRD status and outcome after transplantation in NPM1-mutated AML. *Blood* **2020**, *135*, 680–688. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
102. Ball, B.; Stein, E.M. Which are the most promising targets for minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia prior to allogeneic stem cell transplant? *Haematologica* **2019**, *104*, 1521–1531. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
103. Bonnet, D.; Dick, J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 730–737. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
104. Thomas, D.; Majeti, R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood* **2017**, *129*, 1577–1585. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
105. Ng, S.W.K.; Mitchell, A.; Kennedy, J.A.; Chen, W.C.; McLeod, J.; Ibrahimova, N.; Arruda, A.; Popescu, A.; Gupta, V.; Schimmer, A.D.; et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature* **2016**, *540*, 433–437. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
106. Ng, S.W.K.; Erwin, S.E.; Mitchell, A.; Minden, M.D.; Bullinger, L.; Döhner, H.; Dombret, H.; Preudhomme, C.; Cheok, M.; Dick, J.E.; et al. A novel predictor of response to gemtuzumab ozogamicin therapy in AML provides strategies for sensitization of leukemia stem cells in individual patients. *Blood* **2018**, *132*, 2765. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

- 107.Lamba, J.K.; Pounds, S.; Cao, X.; Downing, J.R.; Campana, D.; Ribeiro, R.C.; Pui, C.-H.; Rubnitz, J.E. Coding polymorphisms in CD33 and response to gemtuzumab ozogamicin in pediatric patients with AML: A pilot study. *Leukemia* **2009**, *23*, 402–404. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- 108.Raj, T.; Ryan, K.J.; Replogle, J.M.; Chibnik, L.B.; Rosenkrantz, L.; Tang, A.; Rothamel, K.; Stranger, B.E.; Bennett, D.A.; Evans, D.A.; et al. CD33: Increased inclusion of exon 2 implicates the Ig V-set domain in alzheimer’s disease susceptibility. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 2729–2736. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- 109.Malik, M.; Chiles, J.; Xi, H.S.; Medway, C.; Simpson, J.; Potluri, S.; Howard, D.; Liang, Y.; Paumi, C.M.; Mukherjee, S.; et al. Genetics of CD33 in alzheimer’s disease and acute myeloid leukemia. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 3557–3570. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- 110.Mortland, L.; Alonzo, T.A.; Walter, R.B.; Gerbing, R.B.; Mitra, A.K.; Pollard, J.A.; Loken, M.R.; Hirsch, B.; Raimondi, S.; Franklin, J.; et al. Clinical significance of CD33 nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms in pediatric patients with acute myeloid leukemia treated with gemtuzumab-ozogamicin-containing chemotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2013**, *19*, 1620–1627. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- 111.Lamba, J.K.; Chauhan, L.; Shin, M.; Loken, M.R.; Pollard, J.A.; Wang, Y.-C.; Ries, R.E.; Aplenc, R.; Hirsch, B.A.; Raimondi, S.C.; et al. CD33 splicing polymorphism determines gemtuzumab ozogamicin response in de novo acute myeloid leukemia: Report from randomized phase III children’s oncology group trial AAML0531. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 2674–2682. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- 112.Gale, R.E.; Popa, T.; Wright, M.; Khan, N.; Freeman, S.D.; Burnett, A.K.; Russell, N.H.; Hills, R.K.; Linch, D.C. No evidence that CD33 splicing SNP impacts the response to GO in younger adults with AML treated on UK MRC/NCRI trials. *Blood* **2018**, *131*, 468–471. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- 113.Stanchina, M.; Pastore, A.; Devlin, S.; Famulare, C.; Stein, E.; Taylor, J. CD33 splice site genotype was not associated with outcomes of patients receiving the anti-CD33 drug conjugate SGN-CD33A. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, *12*, 85. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- 114.Leith, C.P.; Kopecky, K.J.; Chen, I.M.; Eijdens, L.; Slovak, M.L.; McConnell, T.S.; Head, D.R.; Weick, J.; Grever, M.R.; Appelbaum, F.R.; et al. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in

- acute myeloid leukemia: A southwest oncology group study. *Blood* **1999**, 94, 1086–1099. [[Google Scholar](#)]
- 115.Laszlo, G.S.; Beddoe, M.E.; Godwin, C.D.; Bates, O.M.; Gudgeon, C.J.; Harrington, K.H.; Walter, R.B. Relationship between CD33 expression, splicing polymorphism, and in vitro cytotoxicity of gemtuzumab ozogamicin and the CD33/CD3 BiTE[®] AMG 330. *Haematologica* **2019**, 104, e59–e62. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- 116.Chauhan, L.; Shin, M.; Wang, Y.-C.; Loken, M.; Pollard, J.; Aplenc, R.; Hirsch, B.A.; Raimondi, S.; Ries, R.E.; Bernstein, I.D. CD33_PGx6_score predicts gemtuzumab ozogamicin response in childhood acute myeloid leukemia: A report from the children's oncology group. *JCO Precis. Oncol.* **2019**, 3, 1–15. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- 117.Linenberger, M.L.; Hong, T.; Flowers, D.; Sievers, E.L.; Gooley, T.A.; Bennett, J.M.; Berger, M.S.; Leopold, L.H.; Appelbaum, F.R.; Bernstein, I.D. Multidrug-resistance phenotype and clinical responses to gemtuzumab ozogamicin. *Blood* **2001**, 98, 988–994. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- 118.Walter, R.B.; Raden, B.W.; Hong, T.C.; Flowers, D.A.; Bernstein, I.D.; Linenberger, M.L. Multidrug resistance protein attenuates gemtuzumab ozogamicin-induced cytotoxicity in acute myeloid leukemia cells. *Blood* **2003**, 102, 1466–1473. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- 119.Walter, R.B.; Raden, B.W.; Thompson, J.; Flowers, D.A.; Kiem, H.-P.; Bernstein, I.D.; Linenberger, M.L. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) does not confer resistance to gemtuzumab ozogamicin and calicheamicin-gamma1 in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* **2004**, 18, 1914–1917. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- 120.Boyer, T.; Gonzales, F.; Barthélémy, A.; Marceau-Renaut, A.; Peyrouze, P.; Guihard, S.; Lepelley, P.; Plesa, A.; Nibourel, O.; Delattre, C.; et al. Clinical significance of ABCB1 in acute myeloid leukemia: A comprehensive study. *Cancers* **2019**, 11, 1323. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- 121.Van Den Heuvel-Eibrink, M.M.; Van Der Holt, B.; Te Boekhorst, P.A.; Pieters, R.; Schoester, M.; Löwenberg, B.; Sonneveld, P. MDR 1 expression is an independent prognostic factor for response and survival in de novo acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **1997**, 99, 76–83. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- 122.Rafiee, R.; Chauhan, L.; Alonzo, T.A.; Wang, Y.-C.; Elmasry, A.; Loken, M.R.; Pollard, J.; Aplenc, R.; Raimondi, S.; Hirsch, B.A.; et al. ABCB1 SNP predicts outcome in patients with

- acute myeloid leukemia treated with gemtuzumab ozogamicin: A report from children's oncology group AAML0531 trial. *Blood Cancer J.* **2019**, 9, 51. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
123. Ball, E.D. Pairing SOCS with CD33. *Blood* **2007**, 109, 852. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
124. Middeldorf, I.; Galm, O.; Osieka, R.; Jost, E.; Herman, J.G.; Wilop, S. Sequence of administration and methylation of SOCS3 may govern response to gemtuzumab ozogamicin in combination with conventional chemotherapy in patients with refractory or relapsed acute myelogenous leukemia (AML). *Am. J. Hematol.* **2010**, 85, 477–481. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
125. Paubelle, E.; Marceau, A.; Zylbersztejn, F.; Dussiot, M.; Moura, I.C.; Cornillet-Lefebvre, P.; Delaunay, J.; Burnett, A.K.; Castaigne, S.; Guardiola, P.; et al. HFE gene mutation status predicts response to gemtuzumab ozogamicin in AML. *Blood* **2015**, 126, 1307. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

CONCLUSION

Les techniques de biologie moléculaire de haute résolution ont contribué à une meilleure caractérisation des altérations génomiques à l'origine des LAM et à l'identification de nouveaux marqueurs pronostiques et théranostiques. Ce travail a permis d'approfondir la compréhension du profil moléculaire des LAM par l'analyse en SNP-array des patients randomisés dans l'étude CLARA du protocole ALFA-0702. Nous avons ainsi caractérisé un nouveau groupe de patients de pronostic défavorable, dit patients avec « caryotype micro-complexe », défini par la présence d'au moins quatre altérations en SNP-array. Ces résultats semblent ainsi confirmer l'impact défavorable des altérations en SNP-array suggéré dans une précédente étude (Parkin et al. 2010). L'effet de ces altérations dans la cohorte ALFA-0702 reflète possiblement des modifications d'expression des ARNm de gènes impliqués dans la leucémogénèse des LAM (Walter et al. 2009). L'impact défavorable des caryotypes « micro-complexes » pourrait également être le reflet d'une instabilité génomique, souvent corrélée à un profil de maladie plus agressive et une résistance au traitement (Suela et al. 2007).

D'autres biomarqueurs associés aux LAM émergent avec le développement des différentes techniques de biologie moléculaire. Les analyses transcriptomiques permettent ainsi l'identification de nouveaux transcrits de fusion mais également d'évaluer le profil d'expression génique (Bullinger et al. 2004; Metzeler et al. 2008; Ng et al. 2016; Stengel et al. 2020). Des scores d'expression génique ont ainsi été développés et semblent constituer de nouveaux marqueurs pronostiques (Bullinger et al. 2004; Metzeler et al. 2008; Ng et al. 2016).

Les nouvelles technologies de haute résolution contribuent ainsi à mieux appréhender l'hétérogénéité des LAM. Le développement d'approches prédictives intégrant un nombre important de variables cliniques et biologiques telle que l'approche « banque de connaissance » développée par Gerstung et al (Gerstung et al. 2017) ouvrent la voie à une prise en charge personnalisée des LAM. En dépit de l'absence de 27 paramètres sur les 100 inclus dans l'approche « banque de connaissance », nous avons confirmé que cette approche était plus performante pour prédire le pronostic des patients que la classification ELN 2017, avec un index de concordance de 68,9 vs 63,0 pour la prédiction de la survie globale.

Un enjeu majeur dans la prise en charge des LAM est l'indication d'HSCT en RC1. Dans notre étude, l'intégration de la MRD *NPM1* à la classification ELN n'était pas assez robuste pour définir le sous-groupe de patients bénéficiant réellement de l'HSCT en RC1. L'approche « banque de connaissance » permet de prédire le risque de rechute et de mortalité non liée à la rechute à tout moment et pourrait donc capturer les risques et bénéfices de l'HSCT en RC1. Dans la cohorte initiale, l'approche « banque de connaissance » prédisait qu'en réalisant l'HSCT en RC1, 12% des patients avaient une survie globale à 5 ans augmentée de plus de 10%. En appliquant cette règle à la cohorte des patients du protocole ALFA-0702, 111 patients (20,4%) parmi les 545 patients éligibles à l'HSCT semblaient bénéficier de l'HSCT en RC1. En analyse bivariée, en considérant l'HSCT en RC1 comme une variable temps-dépendante, la réalisation de l'HSCT en RC1 n'améliorait pas le pronostic de ces 111 patients en comparaison aux 343 autres patients (test d'interaction, $P=0,27$). Néanmoins l'approche prédictive développée par Gerstung et al. était basée sur des données de patients allogreffés entre 1993 et 2004, ce qui ne rend peut être pas compte d'une évaluation bénéfice-risque valide pour des patients allogreffés plus récemment étant donné l'amélioration des procédures d'HSCT (Cornelissen and Blaise 2016). En établissant un score dérivé de l'approche « banque de connaissance » ou « KB score », codé de 0 à 100, les valeurs basses correspondant à un pronostic péjoratif, nous avons pu identifier un seuil de 40% en deçà duquel les patients bénéficiaient d'une HSCT en RC1. En combinant la classification ELN 2017, la MRD *NPM1* et le score KB aux 545 patients en RC1, 278 candidats à l'allogreffe, soit 51% des patients en RC1 avaient une survie globale significativement améliorée par l'allogreffe alors que cette procédure était délétère chez les candidats à la chimiothérapie. L'intégration de ces différents paramètres semble donc prédire plus précisément le sous-groupe de patients bénéficiant de l'allogreffe en RC1, mais nécessite d'être validée de façon prospective dans de nouveaux essais cliniques. Le modèle banque de connaissance constitue ainsi une approche dynamique bénéficiant de l'intégration de nouveaux paramètres.

Par ailleurs, la prise en charge de LAM a évolué de façon substantielle au cours des dernières années avec l'arrivée des thérapies ciblées qui ont permis une prise en charge plus personnalisée des LAM. Ces nouveaux traitements offrent de nouvelles options thérapeutiques non seulement dans le traitement des LAM inéligibles à la chimiothérapie intensive mais

également en combinaison à la chimiothérapie intensive. En particulier, le gemtuzumab ozogamicine a montré son efficacité dans certains sous-types de LAM. La revue sur le gemtuzumab ozogamicine illustre la diversité des biomarqueurs potentiels pour prédire la réponse au traitement. De façon analogue, des études sont actuellement en cours pour évaluer les facteurs de résistance aux inhibiteurs de FLT3 par exemple. Ainsi, des mutations dans les voies de signalisations ont été identifiées comme facteurs de résistance aux inhibiteurs de FLT3. La compréhension des mécanismes de résistance à ces traitements ouvre ainsi la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'identification de nouveaux marqueurs dans les LAM permet donc de mieux appréhender les caractéristiques de la maladie. Ces marqueurs peuvent revêtir d'un intérêt pronostique ou théranostique, et leur intégration dans les nouveaux modèles de prédiction multifactoriels, représente une approche prometteuse pour optimiser la prise en charge des patients, selon une approche personnalisée.

De nouvelles études prospectives sont nécessaires pour confirmer l'intérêt de l'approche « banque de connaissance » dans l'indication d'HSCT en RC1 et évaluer sa faisabilité en pratique clinique. D'autre part, l'intégration de nouveaux marqueurs tels que le suivi de la MRD sur des marqueurs autres que *NPM1* ou encore l'utilisation de données issues d'analyses transcriptomiques, pourrait contribuer à améliorer les prédictions de l'approche « banque de connaissance » et notamment les indications d'allogreffe en RC1. D'autre part, les prédictions établies par ce modèle multifactoriel nécessitent d'être validées sur des données plus récentes tenant compte de la modification de prise en charge des patients avec l'émergence des thérapies ciblées (inhibiteurs de FLT3 ou d'IDH1/2).

Enfin, la médecine personnalisée connaît un réel essor avec l'arrivée de nouvelles approches pangénomiques à très haut débit tels que le séquençage de l'exome ou du génome entier, ou encore le RNA-seq, dans le cadre du plan France médecine génomique 2025. Concernant les LAM, ces approches sont proposées aux adultes en rechute de leur maladie et aux enfants, quel que soit le stade de la maladie. L'identification de nouveaux marqueurs pronostiques ou théranostiques par ces nouvelles technologies offre l'opportunité d'une meilleure connaissance des LAM et d'une amélioration de la prise en charge et donc du pronostic de ces patients.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, et al. ASXL1 Mutations Promote Myeloid Transformation through Loss of PRC2-Mediated Gene Repression. *Cancer Cell*. 2012 Aug 14;22(2):180–93.
- Akalin A, Garrett-Bakelman FE, Kormaksson M, Busuttill J, Zhang L, Khrebtukova I, et al. Base-pair resolution DNA methylation sequencing reveals profoundly divergent epigenetic landscapes in acute myeloid leukemia. *PLoS Genet*. 2012;8(6):e1002781.
- Angenendt L, Röllig C, Montesinos P, Martínez-Cuadrón D, Barragan E, García R, et al. Chromosomal Abnormalities and Prognosis in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia: A Pooled Analysis of Individual Patient Data From Nine International Cohorts. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2019 10;37(29):2632–42.
- 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.
- Badar T, Patel KP, Thompson PA, DiNardo C, Takahashi K, Cabrero M, et al. Detectable FLT3-ITD or RAS mutation at the time of transformation from MDS to AML predicts for very poor outcomes. *Leuk Res*. 2015 Dec;39(12):1367–74.
- Basheer F, Giotopoulos G, Meduri E, Yun H, Mazan M, Sasca D, et al. Contrasting requirements during disease evolution identify EZH2 as a therapeutic target in AML. *J Exp Med*. 2019 01;216(4):966–81.
- Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*. 2011 Apr;25(4):567–74.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976 Aug;33(4):451–8.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. 1985 Oct;103(4):620–5.
- Bezerra MF, Lima AS, Piqué-Borràs M-R, Silveira DR, Coelho-Silva JL, Pereira-Martins DA, et al. Co-occurrence of DNMT3A, NPM1, FLT3 mutations identifies a subset of acute myeloid leukemia with adverse prognosis. *Blood*. 2020 Mar 12;135(11):870–5.
- Bogenberger JM, Delman D, Hansen N, Valdez R, Fauble V, Mesa RA, et al. Ex vivo activity of BCL-2 family inhibitors ABT-199 and ABT-737 combined with 5-azacytidine in myeloid malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2015 Jan;56(1):226–9.
- Boissel N, Leroy H, Brethon B, Philippe N, de Botton S, Auvrignon A, et al. Incidence and prognostic

- impact of c-Kit , FLT3 , and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia*. 2006 Jun;20(6):965–70.
- Boissel N, Renneville A, Leguay T, Lefebvre PC, Recher C, Lecerf T, et al. Dasatinib in high-risk core binding factor acute myeloid leukemia in first complete remission: a French Acute Myeloid Leukemia Intergroup trial. *Haematologica*. 2015 Jun;100(6):780–5.
- Bowen D, Groves MJ, Burnett AK, Patel Y, Allen C, Green C, et al. TP53 gene mutation is frequent in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype, and is associated with very poor prognosis. *Leukemia*. 2009 Jan;23(1):203–6.
- Büchner T, Heinecke A. The role of prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10:S28–9.
- Bullinger L, Döhner K, Bair E, Fröhling S, Schlenk RF, Tibshirani R, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;350(16):1605–1616.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013 30;368(22):2059–74.
- Challen GA, Sun D, Jeong M, Luo M, Jelinek J, Berg JS, et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet*. 2011 Dec 4;44(1):23–31.
- Chong C-E, Venugopal P, Stokes PH, Lee YK, Brautigan PJ, Yeung DTO, et al. Differential effects on gene transcription and hematopoietic differentiation correlate with GATA2 mutant disease phenotypes. *Leukemia*. 2018 Jan;32(1):194–202.
- Cluzeau T, Sebert M, Rahmé R, Cuzzubbo S, Walter-petrich A, Lehmann che J, et al. APR-246 Combined with Azacitidine (AZA) in TP53 Mutated Myelodysplastic Syndrome (MDS) and Acute Myeloid Leukemia (AML). a Phase 2 Study By the Groupe Francophone Des Myélodysplasies (GFM). *Blood*. 2019 Nov 13;134(Supplement_1):677–677.
- Cornelissen JJ, Blaise D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. *Blood*. 2016 Jan 7;127(1):62–70.
- Cornelissen JJ, Gratwohl A, Schlenk RF, Sierra J, Bornhäuser M, Juliusson G, et al. The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012 Oct;9(10):579–90.
- Cortes J, Perl AE, Döhner H, Kantarjian H, Martinelli G, Kovacsovics T, et al. Quizartinib, an FLT3 inhibitor, as monotherapy in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2018a;19(7):889–903.
- Cortes JE, Heidel FH, Hellmann A, Fiedler W, Smith BD, Robak T, et al. Randomized comparison of low dose cytarabine with or without glasdegib in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2019a;33(2):379–89.

- Cortes JE, Khaled S, Martinelli G, Perl AE, Ganguly S, Russell N, et al. Quizartinib versus salvage chemotherapy in relapsed or refractory FLT3-ITD acute myeloid leukaemia (QuANTUM-R): a multicentre, randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019b Jul 1;20(7):984–97.
- Cortes JE, Tallman MS, Schiller GJ, Trone D, Gammon G, Goldberg SL, et al. Phase 2b study of 2 dosing regimens of quizartinib monotherapy in FLT3-ITD-mutated, relapsed or refractory AML. *Blood*. 2018b 09;132(6):598–607.
- Creutzig U, Büchner T, Sauerland MC, Zimmermann M, Reinhardt D, Döhner H, et al. Significance of age in acute myeloid leukemia patients younger than 30 years: a common analysis of the pediatric trials AML-BFM 93/98 and the adult trials AMLCG 92/99 and AMLSG HD93/98A. *Cancer*. 2008 Feb 1;112(3):562–71.
- Creutzig U, van den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, Dworzak MN, Adachi S, de Bont E, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2012 Oct 18;120(16):3187–205.
- Cuartero S, Innes AJ, Merkenschlager M. Towards a Better Understanding of Cohesin Mutations in AML. *Front Oncol* [Internet]. 2019 Sep 9 [cited 2020 Jul 29];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6746210/>
- Daver N, Garcia-Manero G, Basu S, Boddu PC, Alfayez M, Cortes JE, et al. Efficacy, Safety, and Biomarkers of Response to Azacitidine and Nivolumab in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia: A Nonrandomized, Open-Label, Phase II Study. *Cancer Discov*. 2019a Mar 1;9(3):370–83.
- Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*. 2019b Feb;33(2):299–312.
- Daids MS, Kim HT, Bachireddy P, Costello C, Liguori R, Savell A, et al. Ipilimumab for Patients with Relapse after Allogeneic Transplantation. *N Engl J Med*. 2016 Jul 14;375(2):143–53.
- DiNardo CD, Cortes JE. Mutations in AML: prognostic and therapeutic implications. *Hematology*. 2016 Dec 2;2016(1):348–55.
- DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, Thirman MJ, Garcia JS, Wei AH, et al. Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2020 Aug 13;383(7):617–29.
- DiNardo CD, Pratz K, Pullarkat V, Jonas BA, Arellano M, Becker PS, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naïve, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2019 03;133(1):7–17.
- DiNardo CD, Pratz KW, Letai A, Jonas BA, Wei AH, Thirman M, et al. Safety and preliminary efficacy of venetoclax with decitabine or azacitidine in elderly patients with previously untreated acute myeloid leukaemia: a non-randomised, open-label, phase 1b study. *Lancet Oncol*. 2018a;19(2):216–28.
- DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, Roboz GJ, Altman JK, Mims AS, et al. Durable Remissions with Ivosidenib in *IDH1* -Mutated Relapsed or Refractory AML. *N Engl J Med*. 2018b Jun

21;378(25):2386–98.

Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 26;129(4):424–47.

Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015 Sep 17;373(12):1136–52.

Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005 Dec 1;106(12):3740–6.

Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016 Jan 7;127(1):53–61.

Duployez N, Marceau-Renaut A, Boissel N, Petit A, Bucci M, Geffroy S, et al. Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2451–9.

Dvinge H, Kim E, Abdel-Wahab O, Bradley RK. RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(7):413–30.

Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*. 2002 Aug;21(35):5400–13.

Eriksson A, Lennartsson A, Lehmann S. Epigenetic aberrations in acute myeloid leukemia: Early key events during leukemogenesis. *Exp Hematol*. 2015 Aug;43(8):609–24.

Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008 Mar 13;358(11):1148–59.

Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*. 2005 Jan 20;352(3):254–66.

Fasan A, Eder C, Haferlach C, Grossmann V, Kohlmann A, Dicker F, et al. GATA2 mutations are frequent in intermediate-risk karyotype AML with biallelic CEBPA mutations and are associated with favorable prognosis. *Leukemia*. 2013 Feb;27(2):482–5.

Fathi AT, DiNardo CD, Kline I, Kenvin L, Gupta I, Attar EC, et al. Differentiation Syndrome Associated With Enasidenib, a Selective Inhibitor of Mutant Isocitrate Dehydrogenase 2: Analysis of a Phase 1/2 Study. *JAMA Oncol*. 2018 Aug 1;4(8):1106–10.

Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983 Jan 6;301(5895):89–92.

Fenwarth L, Thomas X, de Botton S, Duployez N, Bourhis J-H, Lesieur A, et al. A Personalized Approach to Guide Allogeneic Stem Cell Transplantation in Younger Adults with Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2020 Sep 1;

Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005 Sep 10;23(26):6285–95.

- Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, Weber D, Paschka P, Hahn J, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia*. 2016;30(11):2160–8.
- Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2776–84.
- Gao X, Johnson KD, Chang Y-I, Boyer ME, Dewey CN, Zhang J, et al. Gata2 cis-element is required for hematopoietic stem cell generation in the mammalian embryo. *J Exp Med*. 2013 Dec 16;210(13):2833–42.
- Gerstung M, Papaemmanuil E, Martincorena I, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, et al. Precision oncology for acute myeloid leukemia using a knowledge bank approach. *Nat Genet*. 2017;49(3):332.
- Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002 Sep 1;100(5):1532–42.
- Greenblatt SM, Nimer SD. Chromatin modifiers and the promise of epigenetic therapy in acute leukemia. *Leukemia*. 2014 Jul;28(7):1396–406.
- Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010 Jul 22;116(3):354–65.
- Grimwade D, Ivey A, Huntly BJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016;127(1):29–41.
- Guillamot M, Cimmino L, Aifantis I. The Impact of DNA Methylation in Hematopoietic Malignancies. *Trends Cancer*. 2016 Feb 1;2(2):70–83.
- Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*. 2008 Aug;22(8):1539–41.
- Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI, Schimmer AD. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia*. 2017 Apr;31(4):798–807.
- Hirsch P, Zhang Y, Tang R, Joulin V, Boutroux H, Pronier E, et al. Genetic hierarchy and temporal variegation in the clonal history of acute myeloid leukaemia. *Nat Commun [Internet]*. 2016 Aug 18 [cited 2020 Oct 14];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4992157/>
- Hou H-A, Huang T-C, Lin L-I, Liu C-Y, Chen C-Y, Chou W-C, et al. WT1 mutation in 470 adult patients with acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and implication of its incorporation into a survival scoring system. *Blood*. 2010 Jun 24;115(25):5222–31.
- Hourigan CS, Gale RP, Gormley NJ, Ossenkoppele GJ, Walter RB. Measurable residual disease testing in

- acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2017 Jul;31(7):1482–90.
- Huet S, Paubelle E, Lours C, Grange B, Courtois L, Chabane K, et al. Validation of the prognostic value of the knowledge bank approach to determine AML prognosis in real life. *Blood*. 2018;132(8):865–867.
- Ishikawa Y, Kawashima N, Atsuta Y, Sugiura I, Sawa M, Dobashi N, et al. Prospective evaluation of prognostic impact of KIT mutations on acute myeloid leukemia with RUNX1-RUNX1T1 and CFBF-MYH11. *Blood Adv*. 2020 Jan 3;4(1):66–75.
- Jacoby MA, Walter MJ. Detection of copy number alterations in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Expert Rev Mol Diagn*. 2012 Apr;12(3):253–64.
- Jain N, Curran E, Iyengar NM, Diaz-Flores E, Kunnavakkam R, Popplewell L, et al. Phase II Study of the Oral MEK Inhibitor Selumetinib in Advanced Acute Myelogenous Leukemia: A University of Chicago Phase II Consortium Trial. *Clin Cancer Res*. 2014 Jan 15;20(2):490–8.
- Jin S, Cojocari D, Purkal JJ, Popovic R, Talaty NN, Xiao Y, et al. 5-Azacytidine Induces NOXA to Prime AML Cells for Venetoclax-Mediated Apoptosis. *Clin Cancer Res*. 2020 Jul 1;26(13):3371–83.
- Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, Kavelaars FG, al Hinai A, Zeilemaker A, et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2018 Mar 29;378(13):1189–99.
- Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Möllgård L, Stockelberg D, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*. 2009 Apr 30;113(18):4179–87.
- Kats LM, Reschke M, Taulli R, Pozdnyakova O, Burgess K, Bhargava P, et al. Proto-oncogenic role of mutant IDH2 in leukemia initiation and maintenance. *Cell Stem Cell*. 2014 Mar 6;14(3):329–41.
- Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of Myeloid Leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002;3(1):179–98.
- Kern W, Bacher U, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010 Sep 1;23(3):379–90.
- Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, Shikami M, Cabreira-Hansen M, McQueen T, et al. MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy. *Blood*. 2005 Nov 1;106(9):3150–9.
- Konopleva M, Pollyea DA, Potluri J, Chyla B, Hogdal L, Busman T, et al. Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov* [Internet]. 2016 Aug 12 [cited 2020 Jun 22]; Available from: <https://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/early/2016/08/09/2159-8290.CD-16-0313>
- Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, Honda S, Sierra J, Djulbegovic BJ, et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA*. 2009 Jun 10;301(22):2349–61.

- Lambert JMR, Gorzov P, Veprintsev DB, Söderqvist M, Segerbäck D, Bergman J, et al. PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell*. 2009 May 5;15(5):376–88.
- Le Guyader-Peyrou S, Defossez G, Dantony E, Mounier M, Cornet E, Uhry Z, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. *Hémopathies Malignes Étude À Partir Regist Cancers Réseau Francim*. 2019;2:169.
- Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010 Dec 16;363(25):2424–33.
- Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman PV, Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 2015 Feb 26;125(9):1367–76.
- Lund K, Adams PD, Copland M. EZH2 in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia*. 2014;28(1):44–49.
- Majhail NS, Farnia SH, Carpenter PA, Champlin RE, Crawford S, Marks DI, et al. Indications for Autologous and Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2015 Nov;21(11):1863–9.
- Marcucci G, Geyer S, Laumann K, Zhao W, Bucci D, Uy GL, et al. Combination of dasatinib with chemotherapy in previously untreated core binding factor acute myeloid leukemia: CALGB 10801. *Blood Adv*. 2020 Feb 25;4(4):696–705.
- Marcucci G, Haferlach T, Döhner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Feb 10;29(5):475–86.
- Martignoles J-A, Delhommeau F, Hirsch P. Genetic Hierarchy of Acute Myeloid Leukemia: From Clonal Hematopoiesis to Molecular Residual Disease. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec;19(12):3850.
- Maslah N, Salomao N, Drevon L, Verger E, Partouche N, Ly P, et al. Synergistic effects of PRIMA-1Met (APR-246) and 5-azacitidine in TP53-mutated myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2020 Jun 1;105(6):1539–51.
- Mazumdar C, Shen Y, Xavy S, Zhao F, Reinisch A, Li R, et al. Leukemia-Associated Cohesin Mutants Dominantly Enforce Stem Cell Programs and Impair Human Hematopoietic Progenitor Differentiation. *Cell Stem Cell*. 2015 Dec 3;17(6):675–88.
- Medeiros BC, Fathi AT, DiNardo CD, Pollyea DA, Chan SM, Swords R. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. *Leukemia*. 2017 Feb;31(2):272–81.
- Metzeler KH, Becker H, Maharry K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Mrózek K, et al. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood*. 2011 Dec 22;118(26):6920–9.
- Metzeler KH, Hummel M, Bloomfield CD, Spiekermann K, Braess J, Sauerland M-C, et al. An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008 Nov 15;112(10):4193–201.

- Milne TA, Briggs SD, Brock HW, Martin ME, Gibbs D, Allis CD, et al. MLL Targets SET Domain Methyltransferase Activity to Hox Gene Promoters. *Mol Cell*. 2002 Nov 1;10(5):1107–17.
- Moarii M, Papaemmanuil E. Classification and risk assessment in AML: integrating cytogenetics and molecular profiling. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2017 Dec 8;2017(1):37–44.
- Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res MCR*. 2003 Dec;1(14):1001–8.
- Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res*. 1998 Aug 1;26(15):3453–9.
- Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, Abdel-Wahab O, Ndiaye-Lobry D, Lobry C, et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell*. 2011 Jul 12;20(1):11–24.
- Ng SWK, Mitchell A, Kennedy JA, Chen WC, McLeod J, Ibrahimova N, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature*. 2016 15;540(7633):433–7.
- Niu X, Zhao J, Ma J, Xie C, Edwards H, Wang G, et al. Binding of released Bim to Mcl-1 is a mechanism of intrinsic resistance to ABT-199 which can be overcome by combination with daunorubicin or cytarabine in AML cells. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016 Sep 1;22(17):4440–51.
- Pabst T, Eyholzer M, Fos J, Mueller BU. Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis. *Br J Cancer*. 2009 Apr 21;100(8):1343–6.
- Pabst T, Mueller BU. Transcriptional dysregulation during myeloid transformation in AML. *Oncogene*. 2007 Oct;26(47):6829–37.
- Pan R, Ruvolo VR, Wei J, Konopleva M, Reed JC, Pellicchia M, et al. Inhibition of Mcl-1 with the pan-Bcl-2 family inhibitor (-)BI97D6 overcomes ABT-737 resistance in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015 Jul 16;126(3):363–72.
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016 Jun 9;374(23):2209–21.
- Parkin B, Erba H, Ouilllette P, Roulston D, Purkayastha A, Karp J, et al. Acquired genomic copy number aberrations and survival in adult acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2010 Dec 2;116(23):4958–67.
- Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Herzig JK, Aulitzky T, Bullinger L, et al. ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: a study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *Haematologica*. 2015 Mar;100(3):324–30.
- Paschka P, Schlenk RF, Weber D, Benner A, Bullinger L, Heuser M, et al. Adding dasatinib to intensive treatment in core-binding factor acute myeloid leukemia—results of the AMLSG 11-08 trial. *Leukemia*. 2018;32(7):1621–30.

- Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012 Mar 22;366(12):1079–89.
- Perl AE. The role of targeted therapy in the management of patients with AML. *Blood Adv*. 2017 Nov 14;1(24):2281–94.
- Perl AE, Martinelli G, Cortes JE, Neubauer A, Berman E, Paolini S, et al. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML. *N Engl J Med*. 2019 Oct 31;381(18):1728–40.
- Pollyea DA, Amaya M, Strati P, Konopleva MY. Venetoclax for AML: changing the treatment paradigm. *Blood Adv*. 2019 Dec 23;3(24):4326–35.
- Pratcorona M, Abbas S, Sanders MA, Koenders JE, Kavelaars FG, Erpelinck-Verschueren CAJ, et al. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Haematologica*. 2012 Mar;97(3):388–92.
- Pratcorona M, Mieloblásticas on behalf of the GCP el E y T de las LA, Brunet S, Mieloblásticas on behalf of the GCP el E y T de las LA, Nomdedéu J, Mieloblásticas on behalf of the GCP el E y T de las LA, et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood*. 2013 Apr 4;121(14):2734–8.
- Ragon BK, Odenike O, Baer MR, Stock W, Borthakur G, Patel K, et al. Oral MEK 1/2 Inhibitor Trametinib in Combination With AKT Inhibitor GSK2141795 in Patients With Acute Myeloid Leukemia With RAS Mutations: A Phase II Study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2019;19(7):431-440.e13.
- Ravandi F, Walter RB, Freeman SD. Evaluating measurable residual disease in acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 2018 Jun 12;2(11):1356–66.
- Ribeiro AFT, Pratcorona M, Erpelinck-Verschueren C, Rockova V, Sanders M, Abbas S, et al. Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012 Jun 14;119(24):5824–31.
- Roboz GJ, DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, Mims AS, Prince GT, et al. Ivosidenib induces deep durable remissions in patients with newly diagnosed IDH1-mutant acute myeloid leukemia. *Blood*. 2020 Feb 13;135(7):463–71.
- Rücker FG, Schlenk RF, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, et al. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood*. 2012;119(9):2114–2121.
- Russler-Germain DA, Spencer DH, Young MA, Lamprecht TL, Miller CA, Fulton R, et al. The R882H DNMT3A mutation associated with AML dominantly inhibits wild-type DNMT3A by blocking its ability to form active tetramers. *Cancer Cell*. 2014 Apr 14;25(4):442–54.
- Sallman DA, DeZern AE, Garcia-Manero G, Steensma DP, Roboz GJ, Sekeres MA, et al. Phase 2 Results of APR-246 and Azacitidine (AZA) in Patients with TP53 mutant Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Oligoblastic Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood*. 2019 Nov 13;134(Supplement_1):676–

676.

- Scheuermann JC, de Ayala Alonso AG, Oktaba K, Ly-Hartig N, McGinty RK, Fraterman S, et al. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature*. 2010 May;465(7295):243–7.
- Schlenk RF. Post-remission therapy for acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2014 Nov 1;99(11):1663–70.
- Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2008 May 1;358(18):1909–18.
- Schnittger S, Dicker F, Kern W, Wendland N, Sundermann J, Alpermann T, et al. RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis. *Blood*. 2011 Feb 24;117(8):2348–57.
- Schnittger S, Eder C, Jeromin S, Alpermann T, Fasan A, Grossmann V, et al. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia*. 2013a Jan;27(1):82–91.
- Schnittger S, Eder C, Jeromin S, Alpermann T, Fasan A, Grossmann V, et al. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia*. 2013b Jan;27(1):82–91.
- Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 2005 Dec 1;106(12):3733–9.
- Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné M-C, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018 Mar 22;131(12):1275–91.
- Sengsayadeth S, Savani BN, Blaise D, Malard F, Nagler A, Mohty M. Reduced intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult acute myeloid leukemia in complete remission - a review from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Haematologica*. 2015 Jul 1;100(7):859–69.
- Sievers EL, Larson RA, Stadtmauer EA, Estey E, Löwenberg B, Dombret H, et al. Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2001 Jul 1;19(13):3244–54.
- Solary E, Bernard OA, Tefferi A, Fuks F, Vainchenker W. The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. *Leukemia*. 2014 Mar;28(3):485–96.
- Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufirin D, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet*. 1999 Oct;23(2):166–75.

- Sood R, Kamikubo Y, Liu P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood*. 2017 13;129(15):2070–82.
- Stein EM, DiNardo CD, Fathi AT, Mims AS, Pratz KW, Savona MR, et al. Ivosidenib or enasidenib combined with intensive chemotherapy in patients with newly diagnosed AML: a phase 1 study. *Blood*. 2020 Sep 5;
- 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 10;130(6):722–31.
- Stengel A, Shahswar R, Haferlach T, Walter W, Hutter S, Meggendorfer M, et al. Whole transcriptome sequencing detects a large number of novel fusion transcripts in patients with AML and MDS. *Blood Adv*. 2020 Nov 10;4(21):5393–401.
- Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*. 2017 03;377(5):454–64.
- Stone RM, Wang ES, Goldberg AD, Sweet KL, Fathi AT, Liu H, et al. Crenolanib versus midostaurin combined with induction and consolidation chemotherapy in newly diagnosed FLT3 mutated AML. *J Clin Oncol*. 2019 May 20;37(15_suppl):TPS7068–TPS7068.
- Suela J, Álvarez S, Cifuentes F, Largo C, Ferreira BI, Blesa D, et al. DNA profiling analysis of 100 consecutive de novo acute myeloid leukemia cases reveals patterns of genomic instability that affect all cytogenetic risk groups. *Leukemia*. 2007 Jun;21(6):1224–31.
- Suzuki T, Shimizu Y, Furuhashi E, Maeda S, Kishima M, Nishimura H, et al. RUNX1 regulates site specificity of DNA demethylation by recruitment of DNA demethylation machineries in hematopoietic cells. *Blood Adv*. 2017 Sep 12;1(20):1699–711.
- Svedberg H, Richter J, Gullberg U. Forced expression of the Wilms tumor 1 (WT1) gene inhibits proliferation of human hematopoietic CD34 + progenitor cells. *Leukemia*. 2001 Dec;15(12):1914–22.
- Tang J-L, Hou H-A, Chen C-Y, Liu C-Y, Chou W-C, Tseng M-H, et al. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood*. 2009 Dec 17;114(26):5352–61.
- Tawana K, Wang J, Renneville A, Bödör C, Hills R, Loveday C, et al. Disease evolution and outcomes in familial AML with germline CEBPA mutations. *Blood*. 2015 Sep 3;126(10):1214–23.
- Thol F, Bollin R, Gehlhaar M, Walter C, Dugas M, Suchanek KJ, et al. Mutations in the cohesin complex in acute myeloid leukemia: clinical and prognostic implications. *Blood*. 2014 Feb 6;123(6):914–20.
- Thomas X, De Botton S, Chevret S, Caillot D, Raffoux E, Lemasle E, et al. Randomized phase II study of clofarabine-based consolidation for younger adults with acute myeloid leukemia in first remission. *J Clin Oncol*. 2017;35(11):1223–1230.
- Vicente C, Conchillo A, García-Sánchez MA, Odero MD. The role of the GATA2 transcription factor in

- normal and malignant hematopoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012a Apr 1;82(1):1–17.
- Vicente C, Vazquez I, Conchillo A, García-Sánchez MA, Marcotegui N, Fuster O, et al. Overexpression of GATA2 predicts an adverse prognosis for patients with acute myeloid leukemia and it is associated with distinct molecular abnormalities. *Leukemia*. 2012b Mar;26(3):550–4.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000 Nov;408(6810):307–10.
- Walter MJ, Payton JE, Ries RE, Shannon WD, Deshmukh H, Zhao Y, et al. Acquired copy number alterations in adult acute myeloid leukemia genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 4;106(31):12950–5.
- Wei AH, Montesinos P, Ivanov V, DiNardo CD, Novak J, Laribi K, et al. Venetoclax plus LDAC for newly diagnosed AML ineligible for intensive chemotherapy: a phase 3 randomized placebo-controlled trial. *Blood*. 2020 Jun 11;135(24):2137–45.
- Wei AH, Strickland SA, Hou J-Z, Fiedler W, Lin TL, Walter RB, et al. Venetoclax Combined With Low-Dose Cytarabine for Previously Untreated Patients With Acute Myeloid Leukemia: Results From a Phase Ib/II Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2019 20;37(15):1277–84.
- Wellbrock J, Latuske E, Köhler J, Wagner K, Stamm H, Vettorazzi E, et al. Expression of Hedgehog Pathway Mediator GLI Represents a Negative Prognostic Marker in Human Acute Myeloid Leukemia and Its Inhibition Exerts Antileukemic Effects. *Clin Cancer Res*. 2015 May 15;21(10):2388–98.
- Williams P, Basu S, Garcia-Manero G, Hourigan CS, Oetjen KA, Cortes JE, et al. The distribution of T-cell subsets and the expression of immune checkpoint receptors and ligands in patients with newly diagnosed and relapsed acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2019 01;125(9):1470–81.
- Wlodarski MW, Collin M, Horwitz MS. GATA2 deficiency and related myeloid neoplasms. *Semin Hematol*. 2017 Apr;54(2):81–6.
- Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CAJ, van Putten WLJ, Valk PJM, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood*. 2009 Mar 26;113(13):3088–91.
- Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim S-H, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*. 2011 Jan 18;19(1):17–30.
- Yee K, Martinelli G, Vey N, Dickinson MJ, Seiter K, Assouline S, et al. Phase 1/1b Study of RG7388, a Potent MDM2 Antagonist, in Acute Myelogenous Leukemia (AML) Patients (Pts). *Blood*. 2014 Dec 6;124(21):116–116.
- Zhang Q, Bykov VJN, Wiman KG, Zawacka-Pankau J. APR-246 reactivates mutant p53 by targeting cysteines 124 and 277. *Cell Death Dis*. 2018 01;9(5):439.

Etude des altérations génomiques des leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte : vers une approche thérapeutique personnalisée ?

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) de l'adulte jeune représentent des entités hétérogènes avec un pronostic contrasté. La classification pronostique de l'*European LeukemiaNet* (ELN) révisée en 2017 intègre un nombre restreint d'altérations cytogénétiques et moléculaires. Néanmoins, le développement notable des techniques de biologie moléculaire au cours des dernières années a permis l'identification de nouveaux marqueurs d'intérêt pronostique potentiel. La prise en compte d'un nombre plus exhaustif de paramètres cliniques et biologiques pourrait aider à mieux évaluer le pronostic des LAM et a conduit au développement d'approches prédictives personnalisées multi-étapes.

Ce projet de recherche était centré sur les adultes jeunes diagnostiqués pour une LAM inclus dans le protocole ALFA-0702. Au sein de la cohorte randomisée de l'étude, l'analyse en SNP-array a permis la caractérisation d'un nouveau groupe de patients avec un pronostic défavorable, caractérisé par la présence d'au moins 4 anomalies. Nous avons montré que ces patients bénéficiaient d'un régime alternatif de consolidation par clofarabine.

Par ailleurs, à partir de l'analyse par séquençage haut débit de 656 patients inclus dans le protocole ALFA-0702, nous avons confirmé que l'approche « banque de connaissance » développée par Gerstung et al. était plus performante pour prédire le pronostic des patients que la classification pronostique de l'ELN 2017. Nous avons montré que l'intégration de la classification ELN 2017 et le suivi de la maladie résiduelle sur le marqueur *NPM1* à l'approche « banque de connaissance » permettait de prédire de façon personnalisée le sous-groupe de patients susceptible de bénéficier de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques en première rémission complète.

Enfin, les altérations cytogénétiques et moléculaires constituent de nouveaux marqueurs théranostiques d'intérêt à l'heure du développement des thérapies ciblées dans les LAM.

Ainsi, ce projet offre de nouvelles perspectives dans la prise en charge des LAM, selon une approche plus personnalisée, par l'identification et l'intégration de multiples marqueurs pré- et post-thérapeutiques.

Genomic alterations in younger adults with acute myeloid leukemia: toward a personalized molecular-based management?

Acute myeloid leukemia (AML) represents a heterogeneous disease with dismal outcome. The current European LeukemiaNet (ELN) 2017 AML risk stratification integrates limited cytogenetic and molecular alterations. However, over the past years, outstanding advances in molecular technologies have pointed out new alterations of potential clinical significance and refined the genomic profile of AML in younger adults. Growing evidence that integrating both clinical and biological parameters may help to refine AML prognostic led to multi-stage models development.

This research project focused on younger AML patients included in the ALFA-0702 trial. In the randomized cohort of this study, SNP-array analysis revealed a new subset of patients with adverse prognostic, from at least 4 and more alterations. Interestingly, such patients benefited from alternative consolidation regimen such as the clofarabine.

Secondly, we confirmed that applying the knowledge bank (KB) algorithm developed by Gerstung et al in the 656 patients from the ALFA-0702 trial provided more accurate outcome predictions than the current ELN 2017 risk stratification. Notably, we have shown that the decision to perform hematopoietic stem cell transplantation in first complete remission could be personalized by integrating ELN 2017 risk stratification, *NPM1* minimal residual disease and KB simulations.

Interestingly, cytogenetic and molecular alterations stand for new theranostic biomarkers in the era of new drugs for AML treatment. These biomarkers offer new hope to improve AML management.

This research project offered the opportunity to identify new prognostic biomarkers, and to personalize and improve patient management through the integration of numerous pre- and post-treatment biomarkers in the treatment decision-making.