Université de Strasbourg

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire

THÈSE présentée par :

Pierre BORIES

soutenue le : **26 octobre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire

Identification de Biomarqueurs de Réponse à l'Azacitidine dans les Leucémies Aigues Myéloïdes du Sujet Agé

THÈSE dirigée par :

M. Hinrich GRONEMEYER

RAPPORTEURS :

M. Stéphane de BOTTON,
Mme. Meyling CHEOK,

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. Eric DELABESSE
M. Raoul HERBRECHT
M. Philippe KASTNER

Remerciements

Aux membres du Jury,

A M. Hinrich Gronemeyer, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et avoir accepté de diriger ce travail de thèse avec rigueur et bienveillance

A M. Eric Delabesse, pour m'avoir également accueilli dans son laboratoire, m'avoir guidé dans la conduite de ce travail, pour son ouverture d'esprit

A M. Raoul Herbrecht, pour m'avoir enseigné l'hématologie, m'avoir donné l'envie de l'exercer avec rigueur et curiosité et pour sa compréhension des orientations données à ma carrière

A Mme. Meyling Cheok et M. Stéphane De Botton, pour avoir accepté la charge de lire ce manuscrit et de l'évaluer

Au Mr Philippe Kastner, pour avoir accepté de participer à mes jurys de thèse de mi-parcours et de thèse de science

A toute l'équipe Génomique fonctionnelle et Cancer de l'IGBMC,

A toute l'équipe d'Onco-hématologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg,

Au laboratoire de biologie moléculaire de l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse,

Naïs, Stéphanie, merci. Non mais vraiment : merci beaucoup. Ne changez rien.

Cyrille, pour m'avoir encadré sur d'autres projets un peu en sommeil. On relance CRISPR-Cas9 ?

A toute l'équipe du service d'Hématologie de l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse,

A M. Christian Récher, pour son enseignement des LAM, sa rigueur et son goût pour l'innovation

A tous les acteurs du réseau de cancérologie ONCO-OCCITANIE,

A l'unité de biostatistique de l'institut Claudius Régaud de Toulouse

Un très grand merci Bastien pour tes analyses de haut vol et ta disponibilité !

A l'unité bioinformatique de l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopôle

Julien, Manon un grand merci pour votre contribution à ces travaux

A l'équipe d'épidémiologie sociale de l'unité INSERM 1027 de Toulouse

Merci Sébastien pour tes analyses et ton expertise

A M. Antoine Nebout, pour son gout de l'innovation, de la chose bien faite et sa gestion de la BDE. Un très grand merci.

Et bien sûr, à toute ma famille. Ma mère et mes deux sœurs.

Ma femme Agnès et mes deux trésors Mona et Juliette.

Table des matières

Remerciements ... 3

Liste des figures ... 6

Liste des tableaux ... 7

PARTIE I - SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES LEUCEMIES AIGUES MYELOIDES DU SUJET AGE ... 8

I. INTRODUCTION ... 9

II. EPIDEMIOLOGIE ... 9

III. ETIOLOGIES ... 10

IV. PHYSIOPATHOLOGIE ... 10

a. Organisation de la leucémogènese ... 10

b. Génétique des LAM du sujet âgé ... 12

c. Epigénétique des LAM du sujet âgé ... 21

d. Hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé ... 26

V. CLASSIFICATIONS DIAGNOSTIQUES DES LAM ... 27

a. Classification de FAB ... 27

b. Classification OMS ... 28

VI. FACTEURS PRONOSTIQUES VALIDES CHEZ LES SUJETS AGES ... 28

a. Facteurs pronostiques liés aux patients ... 29

b. Facteurs liés à la pathologie ... 29

VII. TRAITEMENTS DES LAM DU SUJET AGE ... 33

VIII. FACTEURS PREDICTIFS DE LA REPONSE AUX AGENTS HYPOMETHYLANTS ... 37

PARTIE II – PROBLEMATIQUE ET PROJET DE THESE ... 46

PARTIE III - RESULTATS ... 50

Article 1. Intensive chemotherapy, azacitidine, or supportive care in older acute myeloid leukemia patients: an analysis from a regional healthcare network. ... 51

Article 2: Physician uncertainty aversion impacts medical decision making for older patients with acute myeloid leukemia: results of a national survey ... 78

Article 3*: TP53* mutations negatively impact survival of acute myeloid leukemia patients treated with standard doses of azacitidine ... 98

PARTIE IV - CONCLUSIONS - DISCUSSION ... 136

Références bibliographiques de la partie I ... 140

Listes des abréviations : ... 157

Annexes ... 160

Liste des figures

Figure 1:Incidence des Leucémies Aiguës Myéloïdes par âge en 2012 .....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 2: La cellule d'origine dans les LAM .....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 3: architecture clonale des LAM secondaires à un syndrome myélodysplasique ..**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 4: Organisation des mutations des LAM en catégories fonctionnelles de gènes reliés.....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 5: Evolution de la prévalence des mutations somatiques des LAM avec l'âge**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 6: Les domaines de p53.....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 7: Distribution des mutations somatiques de TP53 selon la base de données du IARC version R16 avril 2016.....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 8: Isoformes de MDS1-EVI1 (gris) et EVI1 (rouge) .....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 9: Rôles des protéines codées par les gènes de la méthylation de l'ADN, altérés dans les LAM et les SMD.....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 10: Fonctions de dnmt1 et dnmt3a/b dans la maintenance de méthylation et la méthylation de novo de l'ADN.....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 11: Rôles de DNMT1 : méthylation de l'adn et interactions protéiques ..... **Erreur ! Signet non défini.**

Figure 12: Impact des mutations de dnmt3a et des évènements oncogénique secondaires sur le phénotype de l'hémopathie induite .....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 13: Réactions d'oxydation de la 5-methylcytosine (5-mC) médiées par TET2 **Erreur ! Signet non défini.**

Figure 14: Coopération entre WT1 et TET2 pour la régulation de gènes cibles et la suppression de prolifération cellulaire.....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 15: Localisation et fréquence des mutations des gènes IDH1 et IDH2 **Erreur ! Signet non défini.**

Figure 16: rôle des h3K9me 1 methyltransferase prdm3 et prdm16 sur l'integrité chromatinienne .....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 17: Survie globale en fonction du risque cytogénétique chez les patients d'âge ≥60ans .**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 18: Survie globale des patients d'âge inférieur à 80ans (a) selon le nombre d'anomalies des chromosomes 5, 7 et 17 ; et (b) selon la présence d'un caryotype monosomique incluant ou non une anomalie de ces chromosomes.....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 19: Survie relative à 5ans selon 5 périodes calendaires de 1973 à 2011..... **Erreur ! Signet non défini.**

Figure 20: Mécanismes d'actions des analogues de la cytosine..... 35

Liste des tableaux

Tableau 1: Proposition de classification fonctionnelle des LAM .....**Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 2: Distribution des altérations génétiques selon la classe d'âge (< ou ≥60ans) dans une cohorte de patients sélectionnés pour une chimiothérapie intensive .....**Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 3: Classification du French-American-British co-operative Group..... 28

Tableau 4: Classification OMS 2016 des LAM .....**Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 5: Taux de rémission complète, de survie globale et risque de rechute selon la classification cytogénétique du MRC.....**Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 6: Stratification du risque génétique selon l'ELN 2017 .....**Erreur ! Signet non défini.**

PARTIE I - SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES LEUCEMIES AIGUES MYELOIDES DU SUJET AGE

I. INTRODUCTION

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) constituent un groupe hétérogène d'hémopathies myéloïdes caractérisées par une prolifération monoclonale de progéniteurs hématopoïétiques et par une insuffisance médullaire. Bien que ne représentant qu'un faible pourcentage des cas incidents de cancers de l'adulte, les LAM sont responsables d'un taux de décès annuel élevé. Chez le sujet âgé, les caractéristiques biologiques particulières des LAM (formes secondaires, cytogénétique défavorable) combinées aux caractéristiques cliniques des patients âgés (comorbidités, fragilités) se traduisent par un effondrement des résultats qui justifie le développement de nouvelles thérapies et l'identification de nouveaux biomarqueurs permettant d'améliorer la sélection et le devenir des patients.

II. EPIDEMIOLOGIE

Les données Françaises des registres des cancers du réseau Francim[1,2], estiment l'incidence annuelle des LAM en France à 2800 nouveaux cas, avec un âge médian au diagnostic de 71 ans et un sexe ratio hommes/femmes de 1,1. Le taux d'incidence en France est superposable à celui observé en Europe[3,4] (3,9 pour 100 000 habitants chez l'homme et 3,35 pour 100 000 habitants chez la femme) et supérieur au taux d'incidence standardisé sur la population mondiale où il est de 2,6 pour 100 000 chez l'homme et de 2,3 pour 100 000 chez la femme. Entre 1980 et 2012, on observe en France une augmentation régulière du nombre de nouveaux cas estimés, passant de 1104 cas incident en 1980 à 2791 cas en 2012. Cette augmentation du nombre de cas a 4 causes principales s'appliquant dans des proportions variables : l'augmentation des procédures diagnostiques chez des patients qui n'auraient précédemment pas été explorés, le vieillissement de la population, une possible majoration de l'exposition à des facteurs de risque génotoxiques, et enfin l'abaissement du seuil de blastes définissant les LAM à partir de la classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) de 2001. L'incidence est relativement basse avant 40 ans puis augmente lentement jusqu'à 60 ans et beaucoup plus rapidement au-delà de 60 ans (figure 1). A partir de 70 ans le taux d'incidence devient en effet supérieur à 15/100 000 habitants chez l'homme et 10/ 100 000 habitants chez la femme. Le taux d'incidence selon l'âge est similaire dans les deux sexes jusqu'à 60 ans, puis il devient plus élevé chez l'homme que chez la femme avec un écart maximum au-delà de 85ans (30 cas *versus* 15 cas/100 000 habitants, respectivement).

Les LAM du sujet âgé sont fréquemment secondaires à un syndrome myélodysplasique (SMD) et l'augmentation majeure de leur incidence avec l'âge doit être vue en regard de l'épidémiologie des SMD dont on dénombre 4000 cas incidents par an en France avec un âge médian au diagnostic autour de 80 ans[2].

III. ETIOLOGIES

Les LAM survenant dans le contexte d'un traitement anticancéreux (agents alkylants, inhibiteurs de topo-isomérase II, rayonnements ionisants), de l'évolution d'un SMD ou d'une néoplasie myéloprolifération (NMP) sont communément appelées secondaires. Ces formes secondaires de LAM sont plus fréquentes chez le sujet âgé[5], où elles représentent de 25 à plus de 40% des diagnostics selon les séries[6,7]. La terminologie secondaire est relativement imparfaite puisqu'elle regroupe plusieurs types de LAM de présentation et de pronostic différents. La classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) 2016[8] décrit l'entité « LAM avec modifications reliées à une myélodysplasie », incluant les LAM secondaires à un SMD et conserve l'entité « LAM reliée à un traitement » comme une catégorie distincte. Le caractère secondaire est un facteur pronostique défavorable indépendant qui s'ajoute aux caractéristiques défavorables de cette population (âge élevé, cytogénétique défavorable)[6,7]. Les LAM liées à un traitement sont le plus souvent observées après le traitement d'un cancer du sein[6] ou d'un syndrome lymphoprolifératif[9,10]. Dans ces contextes, les données de registres populationnels Américains et Suédois ont montré que le risque de LAM était 4,7 plus élevé que dans la population générale[7,11]. Les agents alkylants peuvent favoriser la survenue d'une LAM, souvent précédée d'un état myélodysplasique. Les anomalies cytogénétiques caractéristiques de ces formes sont des délétions partielles ou des monosomies des chromosomes 5, 7 et 17. Le délai de survenue entre l'exposition à l'agent alkylant et la LAM est de l'ordre de 3 à 5 ans. Les inhibiteurs de topoisomérase II dont les épipodophyllotoxines (Etoposide) sont associés à un risque accru de LAM généralement plus précoce, le délai entre l'exposition et la LAM étant de l'ordre de 2 ans. Les inhibiteurs de topoisomérase II ont été associés aux inversions du chromosome 16 inv(16), translocation t(8,21), et translocations t(15,17). Les épipodophyllotoxines sont plus spécifiquement associées aux réarrangements du gène *MLL* (mixed lineage leukemia).

IV. PHYSIOPATHOLOGIE

a. Organisation de la leucémogènese

i. Two hit model

Le modèle physipathologique historique de la leucémogénèse des LAM de novo correspond au « two-hit model » qui énonce que deux types différents de mutations sont requis pour la transformation oncogénique d'un précurseur myéloïde. Les mutations de classe I sont associées à une prolifération cellulaire incontrôlée et un échappement à l'apoptose. Elles incluent les mutations conférant une activation constitutive de protéines kinases ou une dérégulation des voies de signalisation en aval (BCR-ABL, FLT-3, c-KIT et RAS). Les mutations de classe II, comme les translocations associées aux LAM du Core Binding Factor (CBF) ou les mutations des gènes codant pour les enzymes isocitrate déshydrogénase 1 et 2 (*IDH 1* et *2*) sont associées à une inhibition de la différenciation.

Ce two-hit model qui ne décrit que partiellement la physiopathologie des LAM a été considérablement complété par l'amélioration des connaissances sur la génétique moléculaire des LAM. En outre il n'intègre pas des composantes physiopathologiques prépondérantes chez le sujet âgé où les formes secondaires sont fréquentes, comme l'instabilité génétique, les modifications épigénétiques, l'échappement à la réponse immune, la biologie des cellules souches et les relations avec le microenvironnement au sein de la niche hématopoïétique qui ont également un rôle important dans la leucémogenèse et la réponse aux agents génotoxiques.

ii. Organisation clonale

L'hématopoïèse leucémique présente une organisation hiérarchique pyramidale comparable à celle de l'hématopoïèse normale[12]. Le clone leucémique est schématiquement organisé en trois compartiments distincts :

- au sommet de cette pyramide, un clone minoritaire de cellules souches leucémiques (CSL), majoritairement quiescentes, sont caractérisées par une capacité d'auto-renouvèlement infini in vitro. Par analogie avec les cellules souches hématopoïétiques (CSH) elles sont capables d'initier, de maintenir et de propager la leucémie dans des modèles de xénogreffes murines[13] ;

- le deuxième compartiment de cellules leucémiques est constitué par les progéniteurs leucémiques, engagés dans le processus de maturation : ils sont plus nombreux que les CSL, et gardent un potentiel de prolifération important mais ont perdu la capacité d'auto-renouvèlement ;

-le troisième compartiment est constitué de l'ensemble des blastes plus matures que l'on observe dans le sang et la moelle. C'est ce dernier compartiment qui est le plus sensible à la chimiothérapie intensive.

L'origine des CSL reste débattue. L'événement oncogénique initial pourrait avoir lieu dans une CSH ou dans un progéniteur déjà engagé dans le processus de différentiation hématopoïétique normale qui retrouverait alors la capacité d'auto-renouvèlement. La mise en évidence de populations multiples de CSL co-existantes chez un même patient suggère que cette population n'est ni uniforme ni statique et peut évoluer au grès de l'acquisition d'évènements oncogéniques additionnels ou d'altérations épigénétiques[14].

Dans le cas des LAM secondaires à un SMD, l'acquisition séquentielle de mutations dans un clone ancestral, permet l'émergence, la sélection clonale et la progression de sous-clones pouvant donner lieu à différents types d'organisations clonales linéaires ou ramifiées. Ces organisations ont été mises en évidence par des études de séquençage de génomes de patients au stade MDS et au stade LAM[15–18]. Si un évènement oncogénique survenant dans le clone ancestral lui confère un gain prolifératif

suffisant alors ce sous-clone peut « éteindre » le clone ancestral et devenir le clone majoritaire dans une forme d'évolution linéaire. A l'inverse, dans un mode d'évolution clonale ramifié, plusieurs sous-clones caractérisés par des mutations différentes peuvent coexister ou entrer en compétition jusqu'à l'avènement éventuel d'un clone majoritaire.

La grande hétérogénéité des syndromes myélodysplasiques est liée non seulement à la variété des évènements oncogéniques fondateurs ou secondaires mais aussi à l'ordre d'apparition des mutations des gènes concourant à l'établissement du phénotype dysplasique. Cet effet de l'ordre d'apparition des mutations serait similaire à celui décrit dans les NMP où dans la majorité des cas l'évènement initial est une mutation de *TET2* ou *JAK2* avec dans chacun des cas des phénotypes spécifiques associés. L'étude du clone dominant dans un modèle de xenogreffe dérivé de cellules primaires de patients ayant un SMD avec une mutation d'un gène du splicéosome (*SF3B1 ou SRSF2)* et une mutation d'un gène épigénétique (*DNMT3A ou TET2*) montre l'acquisition d'un phénotype différent selon l'ordre d'apparition des mutations. Dans 2 cas sur 3, la mutation *SF3B1* survient en premier, le clone de CSH *SF3B1*^{mut} est dominant et donne des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes mutés. En revanche, lorsque la mutation de *SF3B1* survient après la mutation d'un gène épigénétique (*DNMT3A* ou *TET2*), cette séquence résulte en la formation d'un clone myéloïde mineur, y compris lorsque la mutation *SF3B1* est acquise par le clone dominant[20].

b. Génétique des LAM du sujet âgé

i. Catégorisation des LAM en classes fonctionnelles

Les progrès des techniques de séquençage de nouvelle génération, ont considérablement amélioré la caractérisation moléculaire des LAM. Les programmes internationaux de séquençage du consortium The Cancer Genome Atlas (TCGA) et du Sanger Institute ont été réalisé à partir d'échantillons de LAM *de novo* de sujets âgés de moins de 65ans. Les équipes du TCGA ont décrit en 2013 le panorama des mutations récurrentes observées dans une cohorte de 200 patients diagnostiqués avec une LAM *de novo*, via le séquençage de 50 génomes complets et 150 exomes complets[21]. L'âge médian de cette cohorte était de 55ans. Les catégories de risque cytogénétique selon le Medical Research Council (MRC) favorable, intermédiaire et défavorable était de 18%, 58% et 22%, respectivement. Il doit être précisé que le taux médian de leucocytes de cette cohorte de 200 patients était de 16 G/L ce qui est significativement plus élevé que le taux médian de leucocytes des LAM décrit dans les registres populationnels et en particulier chez les sujets âgés[22,23]. Au total, le séquençage de ces 200 patients a permis d'identifier 2585 mutations validées (2315 SNV [90%] et 270 insertions/délétions [10%]). Au moins une mutation était décrite chez plus de 99% des patients. Le nombre moyen de mutations par patient était de 13, incluant 5 mutations dans des gènes myéloïdes. La catégorisation fonctionnelle de ces mutations a permis d'individualiser 9 groupes (figure 4) : les translocations impliquant un facteur

transcriptionel (18%), les LAM avec mutation de *NPM1* (27%), les altérations des gènes suppresseurs de tumeurs (16%), des gènes de la méthylation de l'ADN (44%), des gènes de la signalisation

Intracellulaire (59%), des gènes modifiant la chromatine (30%), des facteurs transcriptionnels myéloïdes (22%), des gènes du complexe des cohésines (13%) et du splicéosome (14%).

En 2016, l'équipe du Sanger Institute a publié les résultats du séquençage ciblé sur 111 gènes myéloïdes d'une cohorte de 1540 patients de 18 à 65 ans traités dans le cadre des essais de chimiothérapie intensive du groupe Allemand AML-SG. Au moins une mutation « driver » était identifiée chez 96% des patients et au moins 2 mutations chez 86% des patients. Ce travail de séquençage de grande échelle a permis d'affiner la catégorisation fonctionnelle avec la création de 3 nouvelles classes homogènes : les LAM avec altération des gènes modifiant la chromatine et/ou du splicéosome et/ou le facteur transcriptionel *RUNX1* (18% des patients), les LAM avec mutation de *TP53* et/ou aneuploïdie chromosomique (13% des patients) et les LAM avec mutation de *IDH2*^{R172} (1% des patients).

La description de la génomique des LAM des sujets âgés a longtemps été faite par extrapolation à partir de ces études mais repose également sur quelques études spécifiques aux sujets âgés[25,26]. Sur la base de ces études le spectre des mutations retrouvées chez le sujet âgé semble différer de celui des sujets jeunes. Ainsi avec l'âge, on observe un changement des classes fonctionnelles les plus fréquentes avec une plus forte représentation des LAM avec anomalies des gènes *TET2, TP53, ASXL1, RUNX1, DNMT3a, IDH2* et une plus faible représentation des patients présentant un profil cytogénétique et moléculaire décrit comme favorable comme les LAM avec réarrangement chromosomique équilibré : t(15;17)(q22;q21); PML-RARA , t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 et inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 ou les LAM avec mutation bi allélique de C*EBPa*.

Récemment, l'équipe dirigée par Klaus Metzeler à l'Université de Munich a publié les résultats du séquençage ciblé sur 64 gènes d'une cohorte de 151 patients d'âge ≥ 75 ans traités dans le cadre du protocole AMLCG-1999[25]. Dans cette cohorte de patients sélectionnés pour la chimiothérapie intensive, on notait 81% de LAM de novo, 16% de LAM secondaires (post SMD ou NMP) et 3% de t-LAM. Le risque cytogénétique selon le MRC était intermédiaire chez 82% des patients incluant 52% de caryotype normaux sur l'ensemble de la cohorte. Au total, le séquençage ciblé a identifié un nombre médian de 4 mutations par patients. Les gènes les plus fréquemment altérés étaient par ordre

décroissant : *TET2* (42%), *DNMT3a* (35%), *NPM1* (32%) *FLT3* (30%), *SRSF2* (25%) *ASXL1* (21%), *RUNX1* (19%) et *TP53* (14%). Vingt-trois patients présentaient une mutation du gène *IDH2* (15,2%) et 13 patients une mutation du gène *IDH1* (8,6%).

Tsai et al, ont évalué le statut mutationnel de 21 gènes sur une cohorte de 462 patients atteints de LAM non-M3 traités par chimiothérapie intensive dont 177 patients âgés de 60 ans et plus, et 285 de moins de 60ans[27]. Dans la cohorte des sujets âgés, on notait une incidence significativement plus élevée des mutations de *NPM1* (28,2%), *RUNX1*(19.8%), *ASXL1* (17,6%), *TET2* (24,3%), *DNMT3A* (20,9%), *TP53* (13%) et *PTPN11* (6,2%) et une incidence plus faible des mutations des gènes *CEBPA* (10,2%) et *WT1* (3,4%).

Sans entreprendre de description exhaustive des 11 groupes décrits dans la proposition de classification basée sur la génomique moléculaire par Papaemmanuil et al, nous décrivons ici les catégories fonctionnelles et les mutations de gènes les plus fréquemment observées dans le contexte des LAM du sujet âgé.

ii. Les LAM avec mutation de NPM1

Nucleophosmin 1 *(NPM1).* Les LAM avec mutation de *NPM1* correspondent à une entité de la classification OMS 2016 et représentent 25-30% des LAM de l'adulte et 45-60% des LAM à caryotype normal. Dans les LAM du sujet âgé, il reste parmi les gènes les plus souvent altérés au-delà de 60ans[25,28,29]. Les caractéristiques clinico-biologiques des LAM avec mutation de *NPM1* sont : taux de leucocytes, de blastes médullaires et de plaquettes élevés[30], sous-types M4 et M5 de la classification de FAB[31,32], caryotype normal dans 85% des cas[33], faible expression du CD34 et forte expression du CD33[34] et localisations extra-médullaires fréquentes[32]. La Nucléophosmine (NPM1) qui appartient à la famille des nucleophosmine/nucleoplasmine est codée par le gène *NPM1*, localisé sur le chromosome 5q35, constitué de 12 exons. Cette protéine est exprimée de façon ubiquitaire et sa localisation physiologique est majoritairement nucléolaire. On peut résumer ses fonctions en 4 grandes classes : biosynthèse des ribosomes, maintenance de la stabilité du génome en régulant la duplication du centrosome durant le cycle cellulaire, modulation de la croissance cellulaire par son interaction avec le suppresseur de tumeur Arf (Alternate reading frame) au niveau nucléolaire et régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. Cette dernière fonction repose sur le lien fonctionnel fort entre l'intégrité du nucléole et la stabilité de la protéine p53. Sous l'action du stress cellulaire, NPM1 est redistribué vers le nucléoplasme où il interagit avec p53 et induit un arrêt de prolifération. Les mutations de *NPM1*

de type « décalage du cadre de lecture » ont été mises en évidence suite à la constatation d'une localisation cytoplasmique majoritaire anormale de NPM1. Le rôle des mutations de *NPM1* dans la leucémogènese n'est pas complètement élucidé, mais il repose en partie sur la délocalisation et la déstabilisation de la protéine Arf induisant la prolifération cellulaire[35,36] et la dérégulation de l'arrêt du cycle cellulaire dépendant de p53[37]. Si l'impact pronostique positif des mutations de *NPM1*, en l'absence de mutation *FLT3*-ITD est bien établi et participe à la décision thérapeutique du traitement de post rémission chez les sujets jeunes, leur impact sur le devenir des sujets âgés est beaucoup plus débattu. Environ 40% des patients de cette entité présentent une mutation du gène *FLT3* et 75% d'entre eux une mutation d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la méthylation ou l'hydroxymethylation de l'ADN (*DNMT3a, TET2, IDH1* et *IDH2*)[24].

Fms-like tyrosine-kinase 3 (*FLT3*). Les mutations du gène *FLT3* sont identifiées dans environ 30-40% des cas de LAM de l'adulte et l'incidence reste constante chez le sujet de plus de 60 ans. Le gène *FLT3* localisé sur le chromosome 12q13, code pour une protéine ayant une activité de récepteur de tyrosine kinase de classe III (RTK), appartenant à la famille du PDGFR (platelet derived growth factor receptor). Elle est exprimée à la surface des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes normaux et stimule la croissance des cellules myéloïdes immatures via l'activation de cascades de signalisation intracellulaires. Son expression diminue normalement au cours de la différenciation[38]. La majorité des LAM surexpriment FLT3 y compris en l'absence de mutation. Dans environ 30% des cas de LAM, il est activé constitutivement par des mutations, dont les plus fréquentes impliquent une duplication de séquence dans le domaine juxtamembranaire (Internal Tandem Duplication, ou ITD). Plus rarement il est affecté par une mutation ponctuelle dans le domaine tyrosine kinase (D835, 7% des cas). Ces mutations entrainent une activation constitutive des voies de transduction situées en aval de FLT3 impliquant notamment JAK2/STAT5 et PI3K/AKT/PKB. Les mutations de *FLT3* ont été mises en évidence dans la fraction de cellules CD34+/CD38-, capable d'induire dans des modèles murins NOD/SCID une LAM avec mutation de *FLT3*, évoquant leur présence dans la CSL[39]. Sur le plan clinique, les LAM avec mutation de *FLT3* se présentent volontiers sur un mode hyperleucocytaire, avec différenciation monocytaire. Elles sont classiquement associées à un caryotype normal à l'exception des LAM3 avec t(15,17) où la mutation *FLT3*-ITD est retrouvée dans 20% des cas[40] et des LAM avec translocation t(6,9). Leur présence confère un pronostic péjoratif à la LAM, associant une moins bonne réponse au chimiothérapie conventionnelle et un risque accru de rechute[41].

iii. Les LAM avec mutation de RUNX1 et/ou altérations du splicéosome

Dans la classification en catégories fonctionnelles proposées par Papaemmanuil et al[24], ce groupe comporte le facteur transcriptionel myéloïde RUNX1, les gènes du splicéosome (*SRSF2, SF3B1, U2AF1* et *ZRSR2*) et les gènes régulant la chromatine (*ASXL1, STAG2, BCOR, KMT2A, EZH2* et *PHF6*).
Ce regroupement de mutations est comparable aux précédentes descriptions des classifications moléculaires des syndromes myélodysplasiques de haut risque[15,42–44], et apparait concordant avec les caractéristiques cliniques communes de cette classe : patients plus âgés, taux médian de leucocytes plus bas, antécédents fréquents de cytopénies, et/ou présence de dysplasie multi-lignée. La description des altérations des gènes régulant la chromatine sera effectuée dans le chapitre sur l'épigénétique des LAM.

Runt related transcription factor 1 (*RUNX1*). Les LAM avec mutation de *RUNX1* représentent 40% des cas de cette classe fonctionnelle. RUNX1 est un facteur transcriptionel indispensable à l'hématopoïèse normale[45–47], régulant des gènes impliqués dans la différentiation myéloïde. Ce gène est affecté par deux types d'altérations : des translocations chromosomiques récurrentes dans les LAM comme la t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1* et la t(3;21)(q26.2;q22); *MECOM*(EVI1)-*RUNX1* et des mutations intragéniques qui sont retrouvées chez environ 20% des LAM des sujets âgés de plus de 60 ans[25,27]. Elles présentent des caractéristiques cliniques et biologiques spécifiques[48] : sexe masculin, âge élevé, LAM secondaires à un SMD, cytogénétique intermédiaire, un taux de plaquettes plus élevé et un taux de lactates déshydrogénases (LDH) plus bas. Les co-mutations les plus fréquemment observées dans ce contexte sont les mutations d'*ASXL1* et moins fréquemment de *FLT3* et *IDH1/2*[49]*.* La signature génomique des LAM avec mutation de *RUNX1* implique une surexpression de gènes normalement exprimés dans les progéniteurs hématopoïétiques ou cellules lymphoïdes et l'activation de voies de signalisation oncogéniques comme celle du BCR, de TLR-4 et de NOTCH-1[50,51].
Le complexe du spliceosome : c'est la machinerie cellulaire qui régule l'épissage des précurseurs de l'ARN messager (pré-ARNs) en ARN codant. Des données récentes ont montré sur plusieurs cohortes indépendantes que près de 30% des gènes exprimés chez les patients atteints de LAM présentaient des épissages aberrants comparés à des cellules médullaires CD34+ provenant d'individus sains [52]. La régulation de cet épissage alternatif est sous la dépendance de plusieurs facteurs comme des mutations du spliceosome[53], une modification des protéines histones (acétylation/méthylation) ou une méthylation aberrante de l'ADN[54]. Les mutations des gènes du spliceosome (*SF3B1, SRSF2, U2AF1*) ont été décrites en premier dans les syndromes myélodysplasiques où elles peuvent être identifiées chez près de 20% des patients comme dans les anémies réfractaires avec sidéroblastes en couronne[55–57]. Dans les LAM de novo de l'adulte jeune, elles sont décrites chez 10-15 % des patients[21,24,57,58] mais

leur fréquence dans les LAM du sujet âgés, où les formes secondaires au SMD sont plus fréquentes, peut atteindre 25-30%[25]. L'analyse des profils d'expression génique et des profils de méthylation de l'ADN des MDS et LAM avec mutation d'un gène du splicéosome montre des similitudes importantes qui sous-tendent une même physiopathologie de ces entités[43]. L'épissage alternatif de l'ARNm est un des mécanismes de régulation de l'hématopoïèse normale, nécessaire pour la différentiation cellulaire et la réponse aux stimuli du microenvironnement[59]. Un déséquilibre de la machinerie cellulaire d'épissage de l'ARNm modifie le programme d'expression génique et contribue à la physiopathologie des SMD et des LAM[60].

iv. Les LAM avec aneuploïdie chromosomique et/ou mutation de TP53

Comme le groupe précédent, cette classe n'est pas définie par une altération génétique unique mais par des altérations multiples incluant les anomalies chromosomiques comme –5/5q–, –7/7q–, –17/17p–, –12/12p– qui sont très fortement reliées entre-elles et à la présence d'une mutation de *TP53*. Ce groupe inclut virtuellement tous les patients ayant un caryotype complexe et/ou monosomique et comprend donc une population plus âgée ayant fréquemment des formes secondaires de LAM au pronostic très sombre.

Aneuploïdie chromosomique. Les patients âgés de plus de 60 ans atteints de LAM présentent des anomalies cytogénétiques associées à un pronostique défavorable dans 20 à 40% des cas[61], proportion significativement plus élevée que les sujets de moins de 60 ans où on retrouve une cytogénétique défavorable dans 10% des cas environ[62]. Ces anomalies de risque cytogénétique défavorable regroupent les caryotypes complexes chez environ 60% des patients, très souvent associés aux anomalies des chromosomes 5, 7 et 17[63] et moins souvent à une trisomie 8 ou une délétion du chromosome 9q.

Si les translocations chromosomiques sont l'apanage des LAM de novo, la perte de matériel chromosomique témoin d'une instabilité chromosomique est caractéristique de la classe des LAM avec modification en lien avec une myélodysplasie (LAM-MRC). Ces délétions chromosomiques, accumulées sur plusieurs années, suggèrent une perte progressive de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs[64] et une dérégulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. Ces anomalies semblent correspondre à des évènements secondaires liés à la progression de la maladie plus qu'à son initiation puisqu'elles sont absentes au diagnostic des SMD dans près de 60% des cas. La délétion du chromosome 5q observée dans les syndromes 5q- s'accompagne d'une haploinsuffisance de gènes comme *RPS14, HSPA9, CTNNA1, EGR1* qui participent à la dysérythropoïèse alors que les délétions plus larges observées au

stade de SMD de haut risque ou de LAM impliquent des gènes comme *APC* ou *NPM1*[65]. La délétion du chromosome 7 correspond à la monosomie la plus fréquente dans les LAM, où elle est classiquement associée à un pronostic défavorable. L'impact physiopathologique des délétions -7/7q- est longtemps resté incertain malgré d'importants efforts de recherche[66–69]. Dans des modèles murins, l'haploinsuffisance unique d'un gène suppresseur de tumeur situé sur la région minimale délétée du chromosome 7q est insuffisante pour entrainer un phénotype de SMD ou LAM. Cette observation suggère que d'autres mécanismes oncogéniques sont nécessaires pour obtenir un phénotype pathologique. A titre d'exemple, Chen et al ont montré que l'haploinsuffisance du gène MLL3 (localisé sur le chromosome 7q) par délétion ou mutation inactivatrice était fortement corrélée à la délétion monoallélique du gène de la neurofibrine 1 (*NF1*) et à l'inactivation de *TP53*[70]. Les délétions du chromosome 17/17p sont retrouvés chez 30-40% des LAM du sujet âgé[24,61], leur principal impact physiopathologique étant lié à la délétion du gène suppresseur de tumeur *TP53*[71].

Tumor protein 53 (*TP53*). La protéine p53 est décrite comme la « gardienne du génome », et les altérations de *TP53* sont les altérations génétiques les plus fréquemment observées en cancérologie puisqu'on estime qu'elles affectent globalement près de 50% des cancers[72–75]. Ce gène localisé sur le chromosome 17p13, est composé de 10 exons. Il code pour la protéine p53, facteur transcriptionnel suppresseur de tumeur qui régule l'expression de nombreux gènes. Composée de 393 acides aminés, la protéine p53 est constituée d'un domaine N-terminal, d'un domaine riche en proline, d'un domaine de liaison à l'ADN, d'un domaine de tétramérisation et d'un domaine C-terminal. Sa structure active est relativement complexe sous une forme tétramérique.

Les modèles murins d'inactivation de *TP53*, développent un syndrome proche du Syndrome de Li-Fraumeni, dans lequel les individus décèdent rapidement de tumeurs spontanées. Les gènes régulés par p53 sont impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la senescence et l'apoptose. Par ces mécanismes, p53 facilite la réparation et la survie des cellules en réponse à une large gamme de stress intrinsèques ou extrinsèques à la cellule ou participe à l'élimination des cellules trop sévèrement endommagées. Sous l'action de ces signaux, l'activation de p53 est un processus multi-étape complexe impliquant de multiples modifications post-traductionnelles. La phosphorylation de p53 est classiquement décrite comme la première étape cruciale pour sa stabilisation. De nombreuses kinases sont responsables de sa phosphorylation dont notamment ataxia-telangiectasia mutated (Atm) kinase, Chk1/Chk2, Jnk, p38. L'acétylation et l'ubiquitination des résidus Lysine de p53 sont deux modifications post-traductionnelles mutuellement exclusives. La forme acétylée de p53 ne peut pas être ubiquitinée par son répresseur spécifique mouse double

minute-2 (Mdm-2). La stabilité et l'activation transcriptionnelle de p53 sont également régulées par des processus de méthylation, sumoylation et neddylation.

L'incidence des altérations de *TP53* est hétérogène dans les hémopathies malignes, où elles sont toujours décrites comme associées à un pronostic défavorable[77]. Dans les LAM , *TP53* est affecté par deux types d'évènements oncogéniques directs: des délétions du bras court du chromosome 17 ou monosomies 17[78] et des mutations ponctuelles qui impliquent principalement les exons 4 à 8. Une dysfonction de la forme sauvage de p53 est également décrite dans les LAM avec mutation de *NPM1* via la séquestration de Arf entrainant une dégradation de p53 dépendante de Mdm-2[79] ou dans les LAM avec mutation *FLT3*^{ITD} via l'hyperexpression de SIRT1 induisant une déacétylation de p53 ou l'activation de la voie PI3K/AKT favorisant la dégradation de p53[80].

Les mutations de *TP53* sont retrouvées dans 8-10% des LAM de novo de l'adulte jeune[81], mais leur incidence augmente avec l'âge autour de 15-20% chez les sujets d'âge ≥ 60 ans[25,26] et de façon considérable dans le groupe des LAM secondaires à un traitement et à caryotype complexe[82,83]. Elles correspondent à un évènement précoce, initiateur de la leucémogénèse comme en témoigne leur mise en évidence dans le clone leucémique fondateur chez les patients porteurs d'hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé (CHIP), et ceux atteints de SMD ou LAM à caryotype complexe ou t-AML[15,84,85]. La prévalence importante de ces mutations dans les LAM reliées à un traitement a longtemps fait penser qu'elles étaient induites par l'exposition à un génotoxique. Pourtant leur mise en évidence dans le sang de patients longtemps avant le diagnostic de LAM secondaire et avant l'exposition à toute chimiothérapie suggère que ces mutations ne sont pas induites par le traitement mais sélectionnées dans une CSH où elles confèrent un avantage prolifératif et une chimiorésistance[86]. Trois quarts des mutations de *TP53* sont des mutations faux-sens dont 80% affectent le domaine de liaison à l'ADN entre les codons 102 à 292 ce qui met en lumière l'importance de la liaison à l'ADN et des fonctions trans-actrivatrices de p53 pour son rôle de suppresseur de tumeur.

Bien que les mutations de *TP53* aient historiquement été décrites comme des mutations de type perte de fonction, certains mutants présentent des propriétés oncogéniques indépendantes des fonctions de p53 sauvage. Ces mutations sont dites gain de fonction. Si cette distinction entre mutation perte et gain de fonction est prouvée expérimentalement pour certains variants comme R248Q, R172H ou R270H[87], la classification systématique de toutes les mutations faux-sens de TP53 reste plus débattue. Une première approche simple repose sur la localisation de la mutation et de l'impact potentiel de la substitution d'acide aminé selon la modification de polarité, permettant de distinguer les mutations altérant la liaison à l'ADN (mutation de haut risque) de celle ne l'altérant pas (mutation de bas risque). Cette classification pronostique simple a été validée chez des patients traités pour un cancer des voies aéro-digestives supérieures (VADS)[88] et dans une série de patients avec un lymphome B diffus à

grandes cellules[89], bien qu'elle n'ait encore jamais eu d'application clinique. Pour quantifier cette relation structure-fonction des variants de *TP53*, une autre approche repose sur l'établissement d' un score prédictif de l'impact des mutations faux-sens sur la fonction transactivationelle de p53 (EAp53), déterminé *in silico* et corrélé au devenir de patients atteints de cancers des VADS sur plusieurs cohortes indépendantes[90]. Plus récemment Kotler et al[91] ont approfondi la relation séquence-structure-fonction des variants de *TP53* en établissant un catalogue exhaustif du potentiel de croissance in vitro de 9 833 clones de cellules HEK transduites avec toutes les mutations faux-sens possibles de *TP53* sous la forme d'un score nommé relative fitness score allant de -11 à 3 sur une échelle logarithmique de base 2. Ce type de catalogue exhaustif pourrait conceptuellement permettre une prédiction plus fine de l'impact fonctionnel des mutations de *TP53* mais n'a pour l'instant été appliqué dans le contexte des LAM.

v. Les LAM avec inv(3)(q21.3 ; q26.2) ou t(3 ;3)(q21.3 ; q26.2) GATA2, MECOM (i.e. EVI1)

Cette entité qui a été introduite dans la classification OMS 2008 représente 1 à 2% des LAM de l'adulte[24]. Elle est caractérisée par l'inversion du chromosome 3 ou une translocation (3 ; 3) [dénommées ci-après inv(3)/t(3 ;3)] mettant le locus *MECOM* (MDS1 et EVI1 complex locus) sous la dépendance d'une séquence régulatrice amplificatrice distale du gène *GATA2*, entrainant l'hyperexpression d'EVI1 et l'haplo-insuffisance du facteur transcriptionnel GATA2. Cette entité est caractérisée par un pronostic très défavorable et des caractéristiques clinico-biologiques singulières (mégacaryocytes atypiques, dysplasie multilignée, taux de plaquettes normal ou élevé). Les anomalies cytogénétiques accompagnant le plus fréquemment les réarrangements de *MECOM* sont la monosomie 7 retrouvée dans 33% à 66% des cas et un caryotype complexe dans environ 20% des cas[92–94]. Sur le plan moléculaire, l'inv(3)/t(3 ;3) est associée à des mutations des oncogènes *NRAS, KRAS, RUNX1* et *NF1* dans 20 à 30% des cas[95], des gènes du splicéosome (*SF3B1* 20% et *U2AF1* 16%), d'*IKZF1* (25%) et de *TP53* (25%)[96]. L'hyperexpression du proto-oncogène *EVI1* est possible en l'absence de réarrangement du chromosome 3q, observée dans 6-10% des LAM[97], elles ne sont pas alors classées dans ce groupe fonctionnel mais restent associées à pronostique défavorable pour la réponse thérapeutique et la survie.

EVI1 est une des protéines isoformes codées par *MECOM* localisé en 3q26. Le gène *MECOM* code pour différents transcrits alternatifs MDS1-EVI1, MSD1 et EVI1, donnant les isoformes protéiques MDS1-EVI1 (1232 acide aminés [AA]), MDS1 (188AA) et EVI1 (1051AA). Sur le plan structurel, EVI1 est une protéine de liaison à l'ADN incluant de multiples répétitions de 28 AA codant pour 2 domaines en doigt de zinc : un domaine en N-terminal contenant 7 doigts de zinc (ZF1) et un domaine en C-terminal

contenant 3 doigts de zinc (ZF2). Ces 2 domaines ZF1 et ZF2 sont capables de reconnaitre et de se lier à l'ADN de façon spécifique en particulier sur des séquences incluant des répétitions GATA.

EVI1 est un facteur transcriptionnel impliqué dans de nombreuses fonctions comme le remodelage chromatinien, la régulation de voies de signalisation et la maintenance des cellules souches hématopoiétiques où il est normalement exprimé à un haut niveau uniquement dans les cellules les plus immatures CD34+ CD38- [98]. Sa capacité à se lier à l'ADN et à recruter de nombreux régulateurs transcriptionnels et épigénétiques, tels que C-terminal–binding protein (CTBP), CREB-binding protein (CBP/p300), histone deacetylase (HDAC), DNA methyltransferase (DNMT) and Methyl-CpG binding domain protein 3 (MBD3) lui confèrent un rôle de régulateur clé de l'expression génique.

c. Epigénétique des LAM du sujet âgé

Le phénotype cellulaire est le résultat de l'expression de gènes dans la cellule, dépendant de la séquence de l'ADN, de facteurs transcriptionnels se fixant spécifiquement à l'ADN et de la structure chromatinienne. Les changements phénotypiques qui ne sont pas liés à une modification de la séquence de l'ADN sont dit épigénétiques. Les modifications épigénétiques sont essentielles pour de multiples processus biologiques normaux comme le développement embryonnaire, la différentiation, la réplication de l'ADN, l'assemblage et la ségrégation des chromosomes, le cycle cellulaire, la prolifération, ou la réponse au microenvironnement. L'hématopoïèse normale est régulée par des modifications épigénétiques et des variations d'expression des régulateurs épigénétiques au cours de la différentiation myéloïde sont décrites. Deux formes majeures de régulations épigénétiques sont reconnues : la méthylation de l'ADN (et son hydroxymethylation) et la modification des protéines histones de l'ADN. Dans les LAM, une importante dérégulation des mécanismes épigénétiques participent à la leucémogénèse [99–101] et il a été démontré que plus de 70% de LAM présentaient une mutation d'un gène impliqué dans la méthylation de l'ADN ou dans la régulation des protéines histones[21,24].

i. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN correspond à l'addition d'un groupe methyl en position C5 de l'anneau pyrimidine d'une base cytosine au niveau d'un dinucléotide CpG, produisant une 5-methylcytosine (5-mC). Les modèles de méthylation aberrante de l'ADN ont été initialement décrits au niveau de régions riches en cytosine et guanine dite « ilots CpG » dans les régions promotrices des gènes, affectant l'ouverture chromatinienne et l'expression des gènes, sans modifier la séquence de l'ADN. Il est maintenant prouvé que la méthylation aberrante de l'ADN en dehors des ilots CpG jouait aussi un rôle dans la leucemogénèse des LAM, au niveau de région dite « CpG shore » située de part et d'autre des ilots CpG à une distance de 2kb ou au niveau de région amplificatrice (enhancers) à distance du

promoteur des gènes. Figueroa et al. ont étudié les profils de méthylation de l'ADN de 344 patients avec une LAM nouvellement diagnostiquée[102]. La médiane d'âge de cette cohorte était de 48ans, 50 patients (15%) étaient âgés de plus de 60 ans et le risque cytogénétique était favorable, intermédiaire ou défavorable chez 53 patients (15%), 231 patients (67%) et 47 patients (14%), respectivement. L'analyse des profils de méthylation était réalisée par la méthode HELP (HpaII tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR), sur 50000 dinucleotides CpG contenu dans les loci de 14000 gènes. La classification hiérarchique de ces profils de méthylation a permis de séparer les patients en 16 classes différentes, dont certaines se recoupaient partiellement avec des anomalies cytogénétiques ou moléculaires spécifiques comme les transcrits PML-RARA, CBFb-MYH11, RUNX1-ETO ou les mutations des gènes *NPM1*, *CEBPA*^{dm}. La possibilité d'une catégorisation des LAM a depuis été confirmée sur plusieurs cohortes indépendantes, démontrant également l'impact pronostique de certains profils de méthylation[103,104]. La méthylation de l'ADN est régulée par les enzymes de la famille des DNA-methyltransferases (DNMTs).

Cette famille compte 3 enzymes : DNA-methyltransferase-1 (DNMT1) est la méthyltransferase en charge de la maintenance de la méthylation de l'ADN. Après la réplication de l'ADN, le brin parental peut avoir des nucléotides CpG méthylés alors que le brin néoformé présente le GpC complémentaire initialement sans groupe méthyl qui est apporté par l'enzyme DNMT1. DNMT1 joue également un rôle dans la stabilité du génome, en se co-localisant sur un site de « DNA damage » avec la protéine MBD4 et MLH11 entrainant l'apoptose via l'activation de Fas-associated death domain protein (FADD).

Les enzymes DNMT3a et DNMT3b sont les méthyltransférases de l'ADN de novo. Elles ont un rôle majeur dans l'embryogénèse et le développement des cellules souches et progénétrices en élaborant le programme transcriptionnel conduisant à leur différentiation. Seul *DNMT3A* est affecté par des mutations récurrentes dans les LAM.

1. LAM avec mutation de *DNMT3A*

Les mutations récurrentes de *DNMT3A* ont été décrites pour la première fois en 2010 avec le premier séquençage d'un génome entier de leucémie aiguë myéloïde[106]. Leur fréquence dans les LAM est estimée entre 15 et 25%[107,108], avec une augmentation au-delà de 60ans entre 25 et 35%[25,109]. Ces mutations constituent des évènements précoces dans la leucémogénèse, comme en atteste d'une part leur identification dans des lymphocytes T de patients atteints de LAM avec mutation *DNMT3A*[110] et d'autre part leur mise en évidence chez des individus âgés porteurs d'hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé (CHIP)[111]. Les mécanismes par lesquels les mutations de *DNMT3A* contribuent à la leucémogénèse ne sont pas complètement élucidés. Il a été démontré que la mutation *DNMT3A*-R882H, la plus fréquemment identifiée, avait un effet dominant négatif sur la forme sauvage de l'enzyme en bloquant sa capacité à former des tétramères actifs[112]. Les modèles murins de xenogreffes

de CSP *DNMT3A*^{null} ne sont pas viables avec un décès rapide des individus par aplasie médullaire. L'analyse du méthylome de ces souris a mis en évidence des effets contradictoires sur la méthylation de l'ADN selon les loci, entrainant une hyperexpression des gènes de la multipotence des CSP et une sous-expression des gènes liés à la différentiation[113]. Dans un autre modèle de xénogreffe murine hétérogygote *DNMT3A*$^{R882H/wt}$, les souris développent des tableaux de syndromes myéloprolifératifs[114], l'acquisition d'une seconde mutation, fréquemment sur les gènes *NPM1, FLT3* ou *IDH1*, entrainant la progression vers une LAM[115]. L'impact pronostique des mutations de *DNMT3A* n'est pas consensuel et varie selon les séries et les co-mutations identifiées au niveau des gènes *NPM1, FLT3, IDH1, IDH2*^{R172}.

2. LAM avec mutation de *TET2*

TET2 appartient à la famille des protéines ten-eleven-translocation (TET), qui inclut TET1, TET2 et TET3. Cette enzyme catalyse trois réactions d'oxydation séquentielles : conversion de la 5-methylcytosine (5mC) initialement en 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), puis en 5-formylcytosine (5fC), et finalement en 5-carboxylcytosine (5caC)[116–118]. Une dernière réaction de decarboxylation soit par une thymine-DNA glycosylase (TDG) ou une autre enzyme de réparation de l'ADN conduit à la déméthylation de l'ADN par excision de base, convertissant la cytosine modifiée en sa forme non méthylée[119]. Une autre forme de déméthylation de l'ADN repose sur les enzymes de la famille APOBEC qui transforment la 5-h-mC en 5-hydroxymethyluracil (5hmU) ensuite déméthylé par TDG. TET2 est aussi impliqué dans une réaction de déméthylation passive de l'ADN où la 5hmC sert de substrat à DNMT1 conduisant à une dilution des marques de 5mC à chaque cycle de réplication de l'ADN et de division cellulaire.

Le gène *TET2*, localisé en 4q24, code pour une protéine de 2002 acides aminés et 223 kDa comprenant un domaine catalytique C-terminal et un domaine N-terminal peu conservé. La fonction enzymatique de TET2 repose sur un domaine de 807 acides aminés (1129-1936) contenant une région riche en cystéine et un feuillet béta entourant un site catalytique fait de 2 domaines en doigt de zinc. Les modèles murins de souris avec mutation d'un gène *TET* ont permis d'identifier des rôles dans le développement embryonnaire et périnatal, et dans la différentiation hématopoïétique[121–123]. Le décryptage des mécanismes de dérégulation de la protéine TET2 a été accéléré par la découverte des mutations affectant les enzymes isocitrate deshydrogénase 1 et 2 (IDH1 et IDH2). Ces mutations entrainent une production accrue de 2-hydroxyglutarate[124,125] (2HG) qui inhibe la fonction enzymatique de TET2 (dépendante de l'alpha-KG) et entraine un blocage de la différentiation[126]. La constatation d'un profil hyperméthylé de l'ADN dans les LAM avec mutation des gènes *IDH1* et *2* [126] fait le lien entre l'inhibition de TET2 par le 2-HG et le rôle connu de TET2 dans la déméthylation de l'ADN[117,121]. La protéine sauvage TET2 collabore également via la protéine IDAX ou via WT1 avec la voie de signalisation WNT (i.e. voie de la béta-caténine), jouant un rôle dans la programmation des cellules souches vers la différentiation ou la prolifération. En conditions normales le facteur transcriptionel

WT1, dont les mutations dans les LAM sont mutuellement exclusives des mutations de *TET2*, interagit et recrute TET2 sur des gènes cibles suppresseurs de tumeurs activant ainsi leur expression[127].

En 2009, une série de publications a identifié des mutations récurrentes de *TET2* dans les SMP[128], les SMD[129,130], les LAM[131] et les lymphomes de type Lymphome T angio-immunoblastique[132]. Une mutation de *TET2*, est identifiée dans 7-23% des LAM[133] de l'adulte avec une augmentation nette de l'incidence de ces mutations jusqu'à 42% au-delà de 70ans[25] et dans le groupe de patients avec un caryotype normal et/ou une mutation de *NPM1*. Ces mutations correspondent à un évènement précoce du processus de leucémogénèse comme en attestent d'une part, le devenir des modèles murins d'haploinsuffisance pour *TET2* associant une capacité accrue de renouvellement des cellules souches hématopoïétique et une myéloprolifération, et d'autre part la découverte de mutation de *TET2* chez les individus sains porteurs de CHIP. Dans les LAM elles sont fréquemment observées avec des mutations affectant *FLT3,* entrainant un profil de méthylation de l'ADN différent et un pronostic plus défavorable comparativement aux individus n'ayant qu'un seul de ces gènes mutés[134]. En l'absence de co-mutation spécifique, l'impact pronostique des mutations de *TET2* reste débattu. Dans plusieurs études rétrospectives, elles étaient associées à un pronostic défavorable chez les patients ayant un caryotype normal[135].

3. LAM avec mutation *IDH1* et *IDH2*

Les enzymes isocitrate déshydrogénase 1 et 2 catabolisent l'interconversion entre l'alpha-KG et l'isocitrate. Les protéines IDH 1 et 2 mutées partagent un même profil enzymatique « néomorphique » capable de réduire l'alpha-KG en 2-HG. Le 2-HG est un oncométabolite qui contribue à l'oncogénèse en inhibant de façon compétitive l'activité enzymatique des dioxygénases qui utilisent normalement l'alpha-KG comme co-facteur[126], dont notamment les protéines de la famille TET. Toutes les mutations des gènes *IDH* décrites sont localisées dans le site d'activité catalytique participant à la liaison avec l'isocitrate, les hotspots étant R132 pour *IDH1* et R140 et R172 pour *IDH2*[136].

L'inhibition des fonctions catalytiques de TET2 entraine un profil d'hyperméthylation de l'ADN[138] et altère la différentiation hématopoïétique, comme en témoigne l'augmentation de l'expression de marqueur d'immaturité comme c-KIT dans des modèles murins avec mutation *IDH1/2* ou répression de *TET2* par shRNA[126]. L'incidence globale des mutations *IDH1/2* est de 20% dans les LAM, celles affectant *IDH 1* de 6-10% et *IDH2*^{R172} de 1-4%, sont stables avec l'âge, alors que les mutations *IDH2*^{R140} augmentent avec l'âge de 5-10% avant 60ans à 10-15% au-delà de 60ans. Elles sont mutuellement exclusives avec les mutations de *TET2*, ce qui confirme un mécanisme physiopathologique commun, via l'inactivation de TET2[139]. L'activité enzymatique néomorphique des protéines IDH mutées a également un impact sur d'autre enzymes dépendantes de l'alpha-KG comme la famille des histones

lysine déméthylase Jumonji résultant en un profil d'hyperméthylation des marques histones H3K9 et H3K36[140].

ii. LAM avec altérations des gènes modifiant la chromatine

La seconde forme majeure de régulation épigénétique correspond aux modifications des protéines histones. L'organisation de la chromatine est importante pour contrôler le programme d'expression des gènes. On distingue schématiquement l'euchromatine associée à l'expression active des gènes et l'hétérochromatine associée à la répression d'expression des gènes. L'architecture chromatinienne est contrôlée par des complexes protéiques de remodelage responsables de l'assemblage et la maintenance de repliements d'ordre supérieur formant ce que l'on appelle l'organisation à grande échelle de la chromatine, facilitant sa compaction et permettant au génome entier de résider dans le noyau. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome correspondant à un octamère d'histones (1 tétramère H3/H4 et 2 dimères H2A/H2B) entouré par 146 paires de bases. Localement, la capacité de fixation à l'ADN des facteurs transcriptionnels est largement dépendante du degré de modification des protéines histones sur certains sites. Le « code histone » est une combinaison complexe de plus de 100 modifications distinctes des histones ou marques d'histone incluant méthylation, acétylation, ubiquitination, phosphorylation, sumoylation. La modification post traductionnelle des histones la plus étudiée est la méthylation sous l'action de 80 méthyltransferases et démethylases différentes. Les histones méthyltransférases sont capables d'ajouter un groupe méthyl sur une lysine (protéine lysine méthyltrasferase) ou une arginine (protéine arginine méthyltransferase), essentiellement sur les protéines histones H3 et H4. Dans la physiopathologie des LAM, ces marques d'histones peuvent respectivement être activatrices pour l'expression d'oncogènes ou répressives pour l'expression de gènes répresseurs de tumeurs. Elles peuvent être modifiées par trois mécanismes. (1) L'altération directe des enzymes catalysant les modifications post traductionnelles des histones, observée dans les mutations et translocations impliquant MLL. (2) Le recrutement d'histone acétyltransférase (HAT) ou d'histone désacétylase (HDAC) par des protéines de fusion, tel le recrutement d'HDAC par le transcrit de fusion AML1/ETO. (3) Les modifications des histones induites par la méthylation de l'ADN. Ces altérations des histones constituent le rationnel pour l'utilisation des inhibiteurs des HDAC dans les LAM (Vorinostat, Panabinostat, Acide Valproïque).

ASXL1. Les LAM avec mutation de ASXL1 (Additional sex comb-like 1) représentent 3-5% des LAM de l'adulte mais jusqu'à 16% des LAM des sujets de 60 ans et plus[141]. Les mutations d'ASXL1 sont présentes dans de nombreuses hémopathies myéloïdes. Elles sont identifiées dans environ 50% des leucémies myélo-monocytaires chroniques[142], 20% des syndromes myélodysplasiques[143–145], 10% des syndromes myéloprolifératifs[146,147]. Elles font également partie des mutations récurrentes chez les sujets âgés présentant une CHIP[111,148]. Dans les LAM, elles sont associées à des caractéristiques cliniques et

biologiques spécifiques : âge élevé, sexe masculin, trisomie 8 isolée, mutation de *RUNX1* et inversement corrélées à la présence d'un caryotype complexe et des mutations *NPM1, FLT3-ITD* et *WT1*. Les mutations d'*ASXL1* affectent le plus souvent le dernier exon et résultent en une protéine tronquée (mutation non-sens ou décalage du cadre de lecture). Chez la Drosophile, ce gène code pour un amplificateur du groupe Polycomb-Trithorax acteur majeur du remodelage chromatinien. Des données récentes suggèrent que les mutations du domaine C-terminal d'*ASXL1* codent pour une protéines tronquée (ASXL1aa1-587), responsable du recrutement de BDR4 aboutissant via la phosphorylation de RNA pol II à une activation transcriptionnelle entrainant une altération de la différentiation érythroïde et une dysfonction de la cellule souche hématopoïétique[149]. Il s'agit de mutation « gain de fonction » avec un effet dominant négatif sur la forme sauvage d'ASXL1[150] Dans toutes les hémopathies où elles sont décrites, elles sont associées à un pronostic défavorable[147,151].

MECOM L'isoforme MDS1-EVI1 (alias PRDM3) est une protéine de la famille PRDM ayant pour caractéristique l'association d'un domaine riche en proline (PR) et d'un domaine SET. Le domaine SET est un domaine conservé retrouvé chez tous les eucaryotes, correspondant à une séquence de 130 AA. L'acronyme SET est issu de la description de ce domaine chez la drosophile pour **S**uppressor of variegation 3-9 (Su[var]3-9), **E**nhancer of zeste (E[z]) et **T**rithorax (Trx). Les protéines ayant un domaine SET possèdent une activité catalytique lysine méthyl-transférase utilisant la S-adenosyl-méthionine (SAM) comme co-facteur. La protéine MDS1-EVI1 présente spécifiquement une activité de lysine mono-méthyltransférase sur la marque histone H3K9. Sur le plan fonctionnel la mono-méthylation de H3K9 par MDS1-EVI1 est la première étape cytoplasmique du processus de tri-méthylation de cette marque histone, poursuivie au niveau nucléaire par l'action d'une autre lysine méthyltransférase Suv39h. La triméthylation de H3K9 est une marque histone répressive c'est à dire favorisant le maintien de la chromatine sous forme d'hétérochromatine associée à la répression transcriptionnelle. La déplétion simultanée de MDS1-EVI1 et de son paralogue PRDM16 conduit à la désintégration des foci d'hétérochromatine et à la dégradation de la lamina nucléaire, ce qui démontre un rôle majeur de ces histones méthyltransférases dans le maintien de l'intégrité de l'hétérochromatine[152].

d. Hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé

Des études récentes portant sur de larges cohortes populationnelles ont identifié des mutations récurrentes dans plusieurs gènes régulateurs épigénétiques (*DNMT3A, TET2, ASXL1*) et moins fréquemment dans des gènes du splicéosome (*SF3B1, SRSF2*) dans le sang de patients âgés ayant une expansion hématopoïétique clonale[111,148,153]. Ces mutations pré-leucémiques sont présentes dans des clones ancestraux ayant conservé leur capacité de différentiation multi-lignée. Dans un modèle de xénogreffe dérivé de cellules primaires de patients, les CSH pré-leucémiques ayant une mutation de

DNMT3A présentaient un avantage sur les CSH ayant la forme sauvage de *DNMT3A* en terme de prise de greffe et de repopulation multilignée[110]. La détection de ces clones pré-leucémiques chez des patients en rémission complète (RC) démontre leur capacité à résister à la chimiothérapie, et potentiellement à croitre durant la période de rémission et conduire à la rechute[110,154,155]. Le terme d'hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé a été proposé pour décrire la présence de mutations somatiques associées aux hémopathies malignes dans le sang ou la moelle en l'absence de critère formel pour une hémopathie[84]. La prévalence de cette entité augmente avec l'âge pour atteindre 10-15% chez les sujets entre 70 et 80 ans chez qui le risque de développer une hémopathie est significativement accru[111,148]. Si on estime que le taux annuel de transformation en MDS ou LAM est globalement de 0,5 à 1%, le devenir de ces individus est hétérogène, certaines mutations comme celles de *TET2* conférant un gain de prolifération plus important au clone pré-leucémique[156,157].

V. CLASSIFICATIONS DIAGNOSTIQUES DES LAM

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) représentent un groupe d'hémopathies malignes résultant de la transformation oncogénique et de la prolifération clonale d'un progéniteur hématopoïétique. L'hétérogénéité de ce groupe de pathologies explique les difficultés rencontrées pour l'établissement de classifications clinique et biologique.

a. Classification de FAB

Le groupe coopératif Franco-Américano-Britanique (FAB) a formalisé en 1976 une classification cytologique des LAM les divisant en huit sous-groupes selon le degré de différenciation et de maturation des cellules soit de type granulocytaire, monocytaire, érythrocytaire ou mégacaryocytaire[158]. La valeur seuil de blastes médullaires utilisée dans la classification FAB pour le diagnostic de LAM est de 30 %. Si cette classification a longtemps été la seule caractérisation possible des LAM, le manque de pertinence clinique et biologique de cette approche uniquement descriptive, attesté par son faible impact pronostique et par l'imprécision des corrélations cytogénétiques et moléculaires qu'elle autorise, explique sa remise en cause. La catégorisation cytologique a été conservée dans la classification OMS uniquement pour décrire les LAM sans autre spécification cytogénétique ou moléculaire.

	Classification de FAB	**Fréquence**
LAM 0	LAM sans différenciation	2% des LAM
LAM 1	LAM peu différenciée	20% des LAM
LAM 2	LAM avec différenciation	30% des LAM
LAM 3	LA promyélocytaire	10% des LAM

LAM 4	LA myélo-monocytaire	15% des LAM
LAM 5	LA monoblastique	15% des LAM
LAM 6	Erythroleucémie	5% des LAM

TABLEAU 1: CLASSIFICATION DU FRENCH-AMERICAN-BRITISH CO-OPERATIVE GROUP

D'après Bennett et al, British Journal of Hematology, 1976

b. Classification OMS

Avant la publication de la classification OMS des LAM, il avait semblé important de modifier les critères gouvernant la séparation des patients en sous-groupes les plus homogènes possibles. En 1991 une nouvelle classification proposait d'introduire une distinction entre les LAM *de novo* et les LAM reliées à un syndrome myélodysplasique (Myelodysplasia Related Changes - MRC) illustrant ainsi leurs différences physiopathologiques, épidémiologiques, biologiques et pronostiques[159]. Ce groupe des LAM-MRC correspond à une population généralement plus âgée, l'incidence de ce type de leucémie étant exponentielle avec l'âge. Cette distinction était conservée par la classification OMS de 2001. Elle comportait ainsi 4 groupes : (1) les LAM de novo sans anomalie cytogénétique récurrente, (2) les LAM secondaires à une myélodysplasie ou un syndrome myéloprolifératif, (3) les LAM secondaires à un traitement cytotoxique et (4) les LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes. Ce dernier groupe comprenait les LAM avec translocations t(8;21)(q22;q22), *RUNX1-RUNX1T1* ; t(16;16)(p13.1;q22) ou inv(16)(p13.1q22), *CBF-MYH11* ; t(15;17), *PML-RARA* et les LAM avec anomalies en 11q23 (*MLL*). Deux révisions successives de cette classification ont été faite en 2008[160] et 2016[8], conservant la même structure mais accroissant le nombre des entités validées ou provisionnelles au grès des identifications d'altérations génétiques définissant des groupes homogènes de patients.

Les principales modifications effectuées en 2016 sont la suppression de la del9q comme critère de LAM-MRC, la modification de la définition des LAM6 (érythroïde) ne se basant plus sur le pourcentage de blastes parmi uniquement les cellules non-érythroïdes mais sur le décompte cellulaire total, et la création d'une entité « hémopathie myéloïde avec prédisposition germinale » qui ne concerne pas ou exceptionnellement les sujets âgés. L'entité LAM avec mutation bi-allélique de *CEBPA* provisionnelle en 2008, a été validée en 2016 et deux entités provisionnelles ont été ajoutées en 2016 : LAM avec *BCR-ABL1* et LAM avec mutation de *RUNX1.*

VI. FACTEURS PRONOSTIQUES VALIDES CHEZ LES SUJETS AGES

Les LAM du sujet âgé sont globalement de mauvais pronostic. Les données de survie issues des études cliniques sont par définition biaisées du fait de la sélection des patients. Au-delà de 60ans, les registres populationnels américains et suédois montrent une survie globale à 3 ans de 5-15%[161,162] mais le

devenir des patients dans cette catégorie d'âge est hétérogène. Parmi les facteurs pronostiques au diagnostic, on distingue ceux liés au patient qui déterminent la capacité à recevoir un traitement intensif et ceux liés à la maladie qui sont corrélés au risque de chimiorésistance et de rechute précoce. Il est classiquement admis que l'âge et la cytogénétique sont les facteurs pronostiques les plus puissants.

a. Facteurs pronostiques liés aux patients

L'âge avancé est un facteur indépendant de mauvais pronostic. Au sein de la population âgée de 60 ans et plus, l'âge chronologique est statistiquement relié à un devenir défavorable, mais jusqu'à 75-80 ans, il ne constitue pas en soit un critère d'exclusion pour un traitement intensif. Avec l'âge, s'accroît le nombre de comorbidités des patients pris en charge pour une LAM. Ces patients se présentent régulièrement avec un indice de performance (ECOG) altéré. Différents scores de comorbidités ont été validés dans les LAM et peuvent aider à la décision thérapeutique. Parmi eux l'indice de comorbidité de Charlson (CCI)[163] et l'adaptation faite par Sorror[164,165] sont validés dans les LAM pour la prédiction du taux de décès précoces et pour la survie globale mais uniquement chez les patients traités par chimiothérapie intensive. Plus récemment, un score composite[166] intégrant les comorbidités, l'âge, la cytogénétique, et les taux sériques de plaquettes, d'albumine, et de lactate deshydrogénase (LDH) était pronostique pour la survie à 1 an d'une cohorte rétrospective de patients traités par chimiothérapie intensive ou par traitement de faible intensité (agents hypométhylants et cytarabine à faible dose). Si cette approche composite est conceptuellement intéressante pour aider à la prise de décision thérapeutique initiale, elle manque de précision pour guider le choix entre un traitement intensif et un traitement de faible intensité pour un patient donné. La survenue d'une LAM chez le sujet âgé peut être l'occasion d'une décompensation fonctionnelle qui s'explique par l'appauvrissement des réserves physiologiques liées à l'âge, la multiplicité des comorbidités et des facteurs de décompensation aiguë liés à la maladie et son traitement. Une évaluation onco-gériatrique est recommandée pour tout patient de 75 ans et plus et peut aider à la prise de décision bien qu'aucune étude prospective ne l'ait validée dans ce contexte.

b. Facteurs liés à la pathologie

i. La cytogénétique

Le caryotype est l'élément fondamental du pronostic d'une LAM. Son utilisation chez le sujet âgé dérive des classifications pronostiques établies chez le sujet jeune, la plus utilisée étant la classification anglaise du MRC [62]. Elle permet d'identifier schématiquement 3 groupes pronostiques (favorable, intermédiaire, défavorable) dont les définitions sont globalement partagées par les autres groupes coopérateurs. Ces définitions reposent sur des cohortes de patients traités par chimiothérapie intensive et le poids de certains facteurs pronostiques peut varier selon le contexte thérapeutique, ce qui pourrait leur conférer un rôle prédictif [167].

Chez le sujet âgé, le pourcentage de patients avec une cytogénétique favorable est plus faible, et réciproquement celui avec une cytogénétique défavorable plus élevé que chez le sujet jeune[61,168]. A l'échelle populationnelle la répartition des patients dans ces trois catégories de risque est incertaine. Les essais cliniques ne sont pas représentatifs du fait de la sélection des patients. Dans le registre populationnel Suédois des LAM, de 1997 à 2006, 63% des patients entre 60 et 80 ans avaient eu une analyse cytogénétique au diagnostic et seulement 25% au-delà de 80ans[61]. Le même groupe a montré que les patients pour lesquels il n'y avait pas de caryotype au diagnostic (échec cytogénétique ou examen non réalisé) traités de façon intensive, avaient un moins bon pronostic en termes de décès précoce, de taux de réponse et de survie globale[169].

Le groupe de cytogénétique favorable comprend les LAM3 avec t(15 ;17) et les LAM CBF avec t(8 ;21) ou inv(16)/t(16 ;16). Ces entités sont très différentes dans leur physiopathologie et leur prise en charge, et si elles partagent des taux de réponse élevés de près de 90%, les taux de rechute dans le groupe des LAM CBF est plus élevé, expliquant une survie globale à 5ans des LAM CBF d'âge ≥ 60ans ne dépassant pas les 30%[(ref170,171)].

Le groupe de cytogénétique intermédiaire est constitué des patients ayant un caryotype normal, ou des caryotypes anormaux n'entrant pas dans les catégories favorable ou défavorable. A l'instar des sujets jeunes, c'est conceptuellement dans ce groupe de patients au devenir hétérogène que la génétique moléculaire aura à l'avenir la plus grande importance pronostique.

Le groupe de cytogénétique défavorable regroupe les LAM à caryotype complexe (≥3 anomalies) ou ayant des anomalies de mauvais pronostic comme les monosomies ou délétions affectant les chromosomes 5, 7, 17, la translocation t(6;9)(p23;q34), les remaniements du chromosome 3q ou de la région 11q23 (hormis la t(9;11)(p22;q23) considérée de pronostic intermédiaire). Cette classe de risque cytogénétique représente environ 50% des LAM âgées de 60 ans ou plus, chez qui la probabilité d'obtention d'une RC est de 50% entre 60-69ans et 25% entre70-79ans[61], la survie globale de ce groupe à 3 ans du diagnostic étant inférieure à 10%.

Au sein de ce groupe, on individualise un sous-groupe de patient au caryotype monosomique, défini par la présence de deux monosomies ou d'une monosomie associée à une anomalie de structure [173,174], de pronostic très défavorable avec une survie globale à 2 ans aux alentours de 5%. Dans le registre Suédois des LAM, seuls les patients ayant un caryotype monosomique incluant une anomalie du chromosome 5, 7 ou 17 (caryotype monosomique classique) avaient un désavantage par rapport aux autres patients du groupe de cytogénétique défavorable. Le nombre d'anomalies affectant ces chromosomes 5, 7 et 17 étaient également corrélé à la survie en analyse univariée et à la limite de la significativité en analyse multivariée.

Les LAM avec anomalies du chromosome 3q représentent moins de 5% des sujets âgés[92] et parmi eux seuls les patients ayant une inv(3)/t(3;3) impliquant les gènes *MECOM* et *GATA2*, définissent une entité de la classification OMS au pronostic très sombre. Du fait de sa faible incidence, l'impact pronostique de cette anomalie n'a pas été étudié spécifiquement dans le groupe des patients d'âge > 60ans traités par chimiothérapie intensive, mais la survie à 5 ans des LAM de l'adulte appartenant à cette entité n'excède pas 5%[92].

ii. La génétique moléculaire

Les données de génétique moléculaire, initialement restreinte aux gènes *NPM1, FLT3* et *CEBPA* ont été intégrées à la classification pronostique de l'European Leukemia Network (ELN) depuis sa première version en 2010(ref175). Le nombre de mutations utilisées par cette classification a été étoffé lors de l'actualisation des recommandations de 2017(ref176). Si la génétique moléculaire pourrait à l'avenir avoir un impact pronostique chez les sujets âgés, les données issues des cohortes de sujets jeunes traités par chimiothérapie intensive ne sont à l'heure actuelle pas encore toutes transposables chez le sujet âgé.

Les sujets âgés jusqu'à 75 voire 80 ans, appartenant aux catégories favorable et intermédiaire peuvent se voir proposer un traitement intensif en l'absence de comorbidité limitante. Utiles pour leur impact pronostique, les mutations de *NPM1* le sont également pour le suivi de la maladie résiduelle, puisque la plupart d'entre elles peuvent être suivies en RT-qPCR sur le sang et la moelle en RC.

Dans l'étude Taiwanaise sur 177 LAM d'âge ≥ 60 ans traitées intensivement, rapportée par Tsai et al, comme chez les sujets jeunes, le statut mutationnel *NPM1*^{mut}/*FLT-ITD*^{neg} était associé à une meilleure survie globale. Dans cette étude, les mutations bi-alléliques de *CEBPA* étaient protectrices pour la survie chez les sujets jeunes (HR= 0,434 ; 95IC% [0,215-0,876], p=0,02), mais n'avaient pas d'impact chez les sujets âgés (HR= 0,570 ; 95IC% [0,130-2,489], p=0,454). Parmi les 21 gènes étudiés, seules les mutations de *DNMT3A* (HR= 3,396 ; 95IC% [1.471-7.840], p=0,004) et *TP53* (HR= 4,306 ; 95IC% [1,069-17,347], p=0,04) étaient défavorables pour la survie globale des sujets âgés en analyse multivariée.

L'actualisation de 2017 de la classification du risque génétique de l'ELN a donné lieu à l'ajout de 3 gènes dans la catégorie défavorable : *RUNX1, ASXL1* et *TP53*. La plupart des groupes coopérateurs ont décrit les mutations de *RUNX1*[48,177] et *ASXL1*[178,179] comme ayant un impact pronostique défavorable sur la survie des adultes atteints de LAM, ce qui est cohérent avec leur plus forte incidence relevée dans les LAM secondaires et du sujet âgé. Dans certaines études cet effet péjoratif était constaté uniquement chez les patients ayant un caryotype normal[50,141]. Les LAM avec mutation de *TP53* sont décrites dans les recommandations de l'ELN 2017 comme une entité au pronostic très défavorable ce qui s'appuie sur des cohortes de patients traités par chimiothérapie intensive[82,180,181]. Plusieurs séries

indépendantes ont montré que l'allogreffe de moelle ne supprimait pas cet effet péjoratif des mutations de *TP53*. Il est précisé dans la classification de l'ELN que le pronostic des mutations référencées peut varier selon le contexte thérapeutique, ce qui pourrait éventuellement être le cas pour *TP53* dans le contexte des agents hypométhylants (cf. chapitre VIII).

Les résultats de l'essai Allemand AMLCG-199919[25] portant sur 151 patients d'âge ≥75 ans traités par chimiothérapie intensive ne confirment pas l'impact favorable du statut *NPM1*^{mut}*/FLT-ITD*^{neg} sur la survie globale, bien qu'une tendance vers la significativité soit décrite. A noter que dans cette étude les mutations de *IDH1* étaient péjoratives pour l'obtention de la RC et sur la survie puisque parmi les 13 patients mutés *IDH1*^{R132} aucun n'a obtenu de RC ce qui se traduisait par une diminution de la survie sans évènement (p<0,001) et de la survie globale (p<0,001). Cet effet n'a pas été confirmé par d'autres cohortes, et l'impact pronostique des mutations de *IDH1* et *IDH2* reste discuté. Leur intérêt est actuellement plus théranostique que pronostique puisque les protéines IDH mutées sont actionnables pas des inhibiteurs sélectifs[182,183].

iii. Le caractère secondaire

Le caractère secondaire est également un facteur pronostique défavorable dans les LAM du sujet âgé. Les LAM secondaires à un syndrome myélodysplasique et LAM-MRC sont associées à un risque accru de chimiorésistance. Chez les patients qui obtiennent une RC, il y a généralement persistance de signes de dysplasie sur le myélogramme et un risque de rechute accru. De plus si le clone leucémique apparait plus chimiorésistant que dans les LAM de novo, l'hématopoïèse dysplasique est plutôt hypersensible à la chimiothérapie, ce qui se traduit par des cytopénies prolongées[184].Le caractère secondaire à un traitement anticancéreux (t-AML) est un facteur indépendant de mauvais pronostic. Chez le sujet âgé ce mauvais pronostic s'explique surtout par un risque de rechute accru, alors que chez le sujet jeune, il serait un facteur de risque de décès en RC mais pas de rechute[185].

iv. Autres facteurs pronostiques

L'hyperleucocytose est un facteur pronostique associé au risque de décès précoce. Les formes de LAM hyperleucocytaires sont associées à un risque de leucostase pulmonaire et cérébrale, de coagulopathie de consommation et de syndrome de lyse tumorale. A l'exception de la LAM3, ce facteur pronostique ne conditionne pas la stratégie de traitement de post rémission. D'autres facteurs biologiques ont été décrits comme pronostiques sur le devenir des LAM du sujet âgé comme le taux d'albumine ou le taux de lactate déshydrogénase.

VII. TRAITEMENTS DES LAM DU SUJET AGE

La décision thérapeutique est souvent complexe chez le sujet âgé. Elle doit considérer l'ensemble des facteurs pronostiques et être le fruit d'une discussion entre les soignants, les patients et leurs proches[186]. L'éventail des possibilités thérapeutiques validées est large allant d'une chimiothérapie intensive suivie d'une éventuelle allogreffe de moelle à une prise en charge palliative seule. Il est d'usage de distinguer les patients aptes à recevoir une chimiothérapie intensive de ceux jugés inéligibles pour un traitement intensif, ce choix thérapeutique reposant sur les facteurs pronostiques précédemment décrit liés au patient et à sa maladie.

Au cours des quatre dernières décennies, l'amélioration des traitements de support (anti-microbiens, transfusionnels) et des stratégies de post-rémission, incluant l'allogreffe de moelle, se basant sur le risque cytogénétique a permis une amélioration significative de la survie des sujets jeunes traités de façon intensive[187,188]. Une amélioration du devenir des sujets âgés a également été constatée mais de façon plus tardive et hétérogène[189,190]. Selon les données du registre Suédois des LAM, elle ne concerne en effet que les patients âgés de 60 à 70 ans ; le pronostic de ceux âgés de plus de 70 ans restant inchangé. Dans cette tranche d'âge, une meilleure sélection des patients aptes à recevoir une chimiothérapie d'induction est requise de même que le développement de traitements de faible intensité et de thérapies ciblées permettant une approche plus personnalisée.

L'autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis en 2017 et 2018 de 5 nouvelles molécules soit 4 thérapies ciblées : Gemtuzumab Ozogamycine (anticorps monoclonal anti-CD33), midostaurine (inhibiteur de FLT3), ivosidenib et enasidenib (inhibiteur des protéines IDH 1 et 2 mutées, respectivement) ainsi que du CPX-351 (association liposomale de daunorubicine et cytarabine), laisse néanmoins entrevoir des progrès dont devraient bénéficier les sujets âgés.

a. Chimiothérapie intensive

Si l'ensemble des facteurs de mauvais pronostic caractéristiques des sujets âgés sont associés à un risque important de décès précoce, l'âge en lui-même n'est pas une contre-indication à une chimiothérapie d'induction[22]. Chez les patients considérés aptes, cette chimiothérapie comprend classiquement l'association d'une anthracycline (daunorubicine ou idarubicine) et cytarabine selon un schéma proche du schéma classique « 3+7 » du sujet jeune. C'est la seule option potentiellement curative, mais le taux de patients guéris par cette approche reste faible de l'ordre de 10-15%. Bien que la chimiothérapie d'induction permette l'obtention d'une RC chez 60-70% des patients, la majorité d'entre eux rechutent, le plus souvent dans la 1ere année après la rémission et décèdent de leur maladie[191]. Aucune étude n'a pu démontrer de supériorité d'une anthracycline sur les autres. Une

augmentation de la dose journalière de daunorubicine à 90mg/m² pendant 3 jours a été comparée dans une étude phase III chez le sujet âgé. Le bras de traitement intensifié était associé à un taux de RC plus élevé (64% versus 54% p=0.002), qui se traduisait chez les sujets de 60 à 65 ans en un allongement du taux de survie globale et sans événement à 2 ans (respectivement 38% versus 23% [p<0.001] et 29% versus 14% [p=0.002])[174]. Plusieurs groupes ont testé l'adjonction d'une troisième molécule. L'étude ALFA-0701 a évalué l'ajout du gemtuzumab-ozogamycin un anticorps monoclonal couplé à une drogue ciblée sur le CD33, selon un schéma fractionné à 3mg/m²/jour à J1, J4, J7 d'un schéma de chimiothérapie classique par daunorubicine et cytarabine chez des patients de 50 à 70ans. Cet essai était positif pour son critère principal de survie sans évènement et sur le critère secondaire de la survie globale. Cette drogue a désormais une AMM européenne dès la première ligne dans les LAM de novo à cytogénétique favorable ou intermédiaire. Le groupe FILO (French Innovative Leukemia Organization) a évalué l'ajout de la lomustine, alkylant appartenant aux nitroso-urées à l'association idarubicine et cytarabine chez les sujets âgés ayant un caryotype intermédiaire. L'essai LAMSA-2007 a montré que l'ajout de la lomustine améliorait significativement la réponse (85% avec Idarubicine-Cytarabine-Lomustine [ICL] versus 75% avec Idarubicine Cytarabine [IC]; p=0,01), diminuait l'incidence des rechutes (41,2% avec ICL versus 60,9% avec IC ; p=0,003) et améliorait la survie globale à 2ans (41% avec ICL versus 26% avec IC ; P=0,01). Ce schéma représente le standard des centres français du groupe FILO. Parmi les innovations les plus récentes, le CPX-351 correspond à une formulation liposomale encapsulée d'une association de cytarabine et daunorubicine à un ratio molaire de 5:1. Dans un essai de phase III Nord-Américain, le CPX-351 a été comparé à un schéma de chimiothérapie intensive de type 3+7 standard. Cet essai a inclus 309 patients de 60 à 75 ans, nouvellement diagnostiqués avec une LAM de haut risque (cytogénétique défavorable, LAM secondaire ou LAM-MRC). L'essai était positif pour son critère principal de survie globale médiane (9,56 mois avec CPX-351 versus 5,95 avec chimiothérapie de type 3+7 ; p=0,003), ce qui a permis à cette molécule d'obtenir une AMM par la FDA en 2017 et un programme d'autorisation temporaire d'utilisation a débuté en France en 2018.

b. Agents hypométhylants

i. Développement et pharmacologie des agents hypomethylants (HMA)

Synthétisées dans les années 1960, parmi d'autres analogues nucléotidiques, les azanucléotides 5-azacitidine ou azacytidine et 5-aza-2'- deoxycytidine ou decitabine sont des analogues pyrimidiques. Toutes deux sont analogues de la cytosine qui ont la même structure en anneau attaché à un sucre pentose, ribose dans le cas de l'azacitidine et desoxyribose dans le cas de la décitabine. Les mécanismes de captation cellulaire ne sont pas encore complètement élucidés mais cette captation est au moins en partie sous la dépendance du niveau d'expression du transporter human equilibrative nucleoside transporter 1 (*hENT1/SLC29A*)[192,193]. La concentration en azacitidine et décitabine est sous

la dépendance de la cytidine deaminase (CDA) qui en condition normale est l'enzyme de sauvetage de la voie des pyrimidines en catalysant la déamination hydrolytique de la cytidine et de la deoxycytidine respectivement en uridine et en deoxyuridine[194], un haut niveau d'expression et d'activité de cette enzyme diminue la demi-vie de l'azacitidine et de la decitabine. Après le passage intracellulaire, ces deux drogues sont converties en leur formes métaboliquement actives via la phosphorylation respectivement par la deoxycytidine kinase (DCK) et la uridine-cytidine kinase[195] (UCK). Du fait de sa composition en desoxyribose, 100% de la décitabine est incorporé à l'ADN alors que seulement 10-20% de l'azacitidine est converti en desoxyribonucléotide et se lie à l'ADN, cette étape étant limitée par la ribonucléotide réductase[196]. Les 80-90% restant d'azacitidine sont incorporés dans l'ARN où il serait capable de fixer et séquestrer DNMT2 et d'inhiber la synthèse protéique[197]. Après l'incorporation des azanucléotides dans l'ADN, l'enzyme DNMT1 se lie de manière irréversible à l'atome Carbone 6 de l'anneau cytosine, ce qui inhibe son activité méthyltransférase, induit sa dégradation par le protéasome et *in fine* diminue sa concentration cellulaire[198]. Ce mécanisme d'action principal est dépendant de la phase S du cycle cellulaire et ne peut conceptuellement affecter que des cellules en cycle. D'autres mécanismes d'action ont été proposés, qui ne reposeraient pas sur la dégradation de DNMT1 mais sur sa phosphorylation médiée par la protéine kinase C (PKC)[199].

Lors de leur développement dans les années 1960-70, les premiers essais à avoir tester la décitabine et l'azacitidine utilisaient des fortes doses (1000-1500 mg/m²) dont le rapport efficacité/toxicité était défavorable justifiant leur abandon pendant près de 20ans. Puis la découverte des mécanismes épigénétiques impliqués dans la leucémogénèse et de l'effet hypométhylant des azanucléosides à faible dose[200] ont finalement relancé leur développement dans les syndromes myélodysplasiques et les LAM.

ii. Les agents hypométhylants dans les SMD de haut risque et les LAM

Azacitidine. Le développement de l'azacitidine à faibles doses, selon son schéma standard actuel à 75mg/m²/jour 7 jours consécutifs par cycle de 28 jours, a été conduit dans les années 90, dans les SMD de haut risque. Les essais de phase 2 du CALGB ont démontrés la supériorité de l'azacitidine sur les soins de support exclusifs[201,202]. L'étude d'enregistrement AZA-MDS-001 a comparé l'azacitidine (n=179) contre un bras comparateur (n=179) au choix de l'investigateur parmi les soins de support, la cytarabine faible dose et la chimiothérapie intensive. Cet essai était positif pour son critère principal puisqu'il a démontré une amélioration de la survie globale médiane dans le bras azacitidine (24,5mois versus 15 mois, HR 0,58 ; 95%CI [0,43-0,77] ; p=0,0001)[203]. Il doit néanmoins être souligné que cette amélioration de la survie globale médiane était significative pour la comparaison azacitidine versus soins de support (21,1 mois versus 11,5 mois, respectivement ; p=0,0045) et azacitidine versus cytarabine faible dose (24,5 mois

FIGURE 1: MECANISMES D'ACTIONS DES ANALOGUES DE LA CYTOSINE

versus 15,3 mois p=0,0006) mais la cohorte de patients traités par chimiothérapie intensive est insuffisante pour observer une différence statistique. L'étude avait inclus 113 patients classés LAM selon la classification OMS (taux de blastes entre 20 et 30%) ce qui lui a permis d'obtenir une autorisation de mise sur le marché dans cette indication[204]. L'étude AZA-AML-001 conduite selon le même schéma a inclus 488 patients âgés de 65ans et plus, ayant une LAM nouvellement diagnostiquée, avec un taux de blastes médullaires ≥30% et un taux de leucocytes ≤ 15 G/L. Cette étude était également positive sur le critère principal de la survie globale pour la comparaison azacitidine versus traitement comparateur, et l'AMM de l'azacitidine a été étendue aux LAM du sujet âgé non éligible pour une allogreffe de moelle, quel que soit le pourcentage de blastes médullaires. De façon similaire à l'étude AZA-MDS-001, seuls 18% des patients étaient pré-sélectionnés pour la randomisation azacitidine versus chimiothérapie intensive, et l'étude n'apportait pas de réponse statistique sur la comparaison directe entre ces deux stratégies.

Décitabine Après une tentative infructueuse de développement dans les années 1980 dans les LAL de l'enfant, la décitabine a ensuite été testée dans les SMD selon un schéma à 45mg/m² sur 3 jours, toutes les 6 semaines. Les résultats décevant des essais de phase 3 utilisant ce schéma[205], ont justifié le développement d'un schéma alternatif par le MD Anderson Cancer Center à 20mg/m²/jour pendant 5 jours toutes les 4 semaines. C'est ce schéma qui a été autorisé par la FDA pour les SMD de haut risque en 2006, incluant les LAM selon la classification OMS ayant un taux de blastes médullaire entre 20 et 30%. Dans les LAM, l'essai d'enregistrement DACO 16 a comparé la décitabine (n=242) à un traitement de référence au choix du patient et de l'investigateur parmi la cytarabine à faible dose (n=215) ou les soins de support seuls (n=28). Le taux de réponse (RC/RCp) était significativement plus élevé dans le bras décitabine versus traitement de référence (17,8% versus 7,8%, respectivement ; OR 2,5 ; 95% CI[1,4-4,8], p=0,001) ce qui ne se traduisait néanmoins pas par une amélioration significative de la survie globale médiane, estimée à 7,7 mois dans le bras decitabine versus 5,0 mois dans le bras de référence (HR 0,85; 95% CI [0.69-1.04]. Ce résultat négatif sur le critère de jugement principal de l'étude n'a pas permis à la décitabine d'obtenir une AMM aux Etats-Unis, mais cette molécule reste largement utilisée hors AMM et constitue avec l'azacitidine un des traitements de référence dans la majorité des essais de 1ere ligne ouverts pour les patients inéligibles pour une chimiothérapie intensive.

Guadecitabine. C'est une prodrogue de la décitabine n'étant pas éliminée par la CDA permettant une meilleure biodisponibilité de la drogue et une demi-vie augmentée[206]. Les essais de phase 3 ASTRAL-1 (NCT02348489) et ASTRAL-2 (NCT02920008) l'ont testé respectivement en 1ere ligne dans les LAM non éligibles pour une chimiothérapie intensive et dans les LAM en rechute. Si les résultats de ces essais n'ont pas encore été communiqués, le promoteur (laboratoire Astex) a annoncé en septembre

2018 que ces essais étaient négatifs pour leur critère de jugement principal (survie globale), interrompant le développement de cette drogue dans cette indication. Un autre essai de phase 3 testant cette molécule dans les SMD de haut risque (NCT02907359) est toujours en cours.

Associations thérapeutiques incluant un agent hypométhylant

Si les associations thérapeutiques d'un HMA avec le Lenalidomide[207] ou les inhibiteurs d'histone deacetylase[208–210] se sont révélées décevantes, d'autres associations prometteuses sont en cours d'essai notamment avec l'ivosidenib et l'enasidenib, respectivement inhibiteurs des protéines mutées IDH1 (NCT03173248) et IDH2 (NCT02677922), les inhibiteurs de FLT3 tels que le crenolanib (NCT02400281) et le gilteritinib (NCT02752035) et le venetoclax (inhibiteurs de BCL2, NCT02993523), ce qui pourrait rapidement permettre l'établissement de nouveaux traitements de référence chez les patients jugés inéligibles pour une chimiothérapie intensive.

VIII. FACTEURS PREDICTIFS DE LA REPONSE AUX AGENTS HYPOMETHYLANTS

La recherche de facteurs prédictifs de réponse aux agents hypométhylants a fait l'objet de nombreuses études, dans le domaine des SMD ou des LAM traitées par azacitidine ou décitabine. L'intérêt particulier apporté à ce champ de la recherche translationnelle dans les LAM s'explique par la volonté de guider la décision thérapeutique concernant le traitement d'induction, notamment pour le choix entre une chimiothérapie intensive et un agent hypométhylant. Identifier au diagnostic les candidats les plus à même de répondre aux agents hypomethylants est déterminant car il s'agit de traitements contraignants et dont la réponse est longue à se dessiner. La prédiction entre bons et mauvais répondeurs potentiels doit conduire à une meilleure sélection des patients pour un agent hypométhylant en proposant une stratégie alternative aux patients ayant les plus faibles chances de réponse.

a. Facteurs prédictifs cliniques

Le programme Français d'Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) de l'azacitidine, qui a concerné 282 patients atteints de SMD de haut risque et LAM, a permis la description d'un score basé sur des facteurs pronostiques classiques, incluant l'indice de performance (ECOG), la cytogénétique, la présence de blastes circulants, la dépendance transfusionnelle et un antécédent de traitement par cytarabine faible dose[211]. Ce score pronostique, ensuite validé sur deux cohortes indépendantes, est certes bien corrélé à la survie globale et permet de stratifier les patients au diagnostic pouvant apporter une aide à la décision thérapeutique. Il faut cependant noter que parmi les paramètres inclus

dans le modèle statistique, l'antécédent de traitement par cytarabine faible dose est devenu obsolète depuis de l'autorisation de mise sur le marché de l'azacitidine. Par ailleurs, ces paramètres de routine manquent de précision pour distinguer individuellement les patients susceptibles d'obtenir une RC sous azacitidine des non-répondeurs. Dans la leucémie myélomonocytaire chronique, Adès et al ont évalués les facteurs cliniques et biologiques de routine associés au devenir d'une cohorte multicentrique de 76 patients traités par azacitidine. En analyse multivariée, seuls la présence d'une splénomégalie palpable et d'un taux de blastes médullaires >10% étaient associés à la survie globale[212]. Le doublement du taux plaquettaire à la fin du premier cycle d'azacitidine a été décrit comme un marqueur précoce et indépendant, prédictif de la réponse à l'azacitidine sur la cohorte de 90 patients atteints de LAM et LMMC traités dans le cadre du programme d'ATU Hollandais[213]. Ce résultat n'a néanmoins pas été confirmé par d'autres groupes et il ne peut évidemment pas être utilisé comme outil de prise de décision pré-thérapeutique.

b. Facteurs pharmacologiques

Human nucleoside transporters (HNT). La captation cellulaire est cruciale pour l'efficacité des azanucleosides. Il a été démontré in vitro que l'azacitidine et la decitabine utilisaient différents HNT, comme hENT1 et que leur cytotoxicité était dépendante de l'expression de ces HNT[214–216]. Bien que prometteurs, ces résultats précliniques n'ont pas été confirmés cliniquement. Valencia et al. n'ont pas trouvé d'impact de l'expression d'hENT1 sur la réponse thérapeutique chez une cohorte de 57 patients (MDS et LAM) traités par azacitidine[217].

Uridine Cytidine kinase (UCK) et déoxycytidine kinase (DCK). L'étape cruciale suivante dans le métabolisme des inhibiteurs de DNMT est la mono-phosphorylation de l'azacitidine et de la décitabine respectivement par l'uridine cytidine kinase (UCK1 et UCK2) et la désoxycytidine kinase (DCK). Dans l'étude menée par Valencia et al., un haut niveau d'expression de UCK1 était associé à une meilleure survie globale en analyse multivariée (HR 0,23 ; p=0,049)[217]. Il a été démontré in vitro par l'équipe de J.P. Issa au MD Anderson, que le niveau d'expression de la protéine dCK dans un panel de lignées cellulaires de LAM, naturellement résistante à la décitabine, était corrélé à la concentration inhibitrice à 50% de la décitabine. Ce résultat était confirmé dans un modèle de résistance secondaire à la décitabine de la lignée HL60, qui corrélait la perte d'expression de la protéine dCK à une perte d'hétérozygotie et l'acquisition d'une mutation localisée au niveau d'une Arginine du codon 98[216].

Cytidine Deaminase (CDA). Le niveau d'expression et d'activité enzymatique de la CDA peuvent influencer le devenir des patients sous inhibiteur de DNMT en influant sur la demi-vie de ces molécules. Les individus de sexe masculin ont un niveau d'expression et d'activité enzymatique de la CDA plus élevé ce qui a été corrélé à un meilleur devenir des sujets de sexe féminin dans une cohorte de 90

patients traités par agent hypométhylant pour une myélodysplasie[194]. Cette tendance pour une efficacité de l'azacitidine dépendante du genre était aussi évoquée par l'essai international de phase III AZA-AML-001[218] dont l'analyse bi-variée montrait que les patientes avaient une meilleure survie globale sous azacitidine vs traitements conventionnels (HR 0,69 ; 95%CI [0,50-0,95]; p=0,021) que les hommes (HR 0,99 ; 95%CI [0,77-1,27]; p=0,916). La variable genre n'avait néanmoins pas été testée en analyse multivariée et d'autres essais prospectifs n'ont pas confirmé ce résultat[204]. Vu le métabolisme de la guadecitabine ne dépendant pas de la CDA, il sera intéressant d'observer si cette tendance est effacée dans les essais prospectifs testant cette molécule dont les résultats sont en attente.

c. Facteurs cytogénétiques

Anomalies du chromosome 7. Si globalement les patients de risque cytogénétique défavorable ont des durées de réponse et de survie plus courtes, certaines études un peu anciennes ont suggéré que les patients de ce groupe lorsqu'ils étaient traités par agents hypométhylants pouvaient avoir un devenir équivalent aux patients ayant un risque cytogénétique intermédiaire[219,220]. Cette discordance peut résulter d'une relative hétérogénéité du groupe de cytogénétique défavorable. Il a été décrit que les patients ayant une délétion partielle ou une monosomie du chromosome 7 avaient un meilleur taux de réponse et une meilleure survie[203,211]. Les explications pour cet avantage conféré par les anomalies du chromosome 7 ne sont pas encore claires mais pourraient impliquer le gène *EZH2* qui encode pour le complexe histone méthyl-transférase/polycomb repressive complexe 2 (PRC2). Une étude a démontré par co-immunoprécipitation que cet enzyme était capable de recruter spécifiquement les trois DNMT sur les promoteurs de gènes cibles, participant à la répression de ces gènes. In vitro, l'addition d'azacitidine permettait de restaurer l'expression des gènes cibles d'EZH2[221]. Ces données précliniques n'ont pas eu de traduction clinique et aucune étude n'a fait de lien entre les mutations somatiques d'*EZH2* et la réponse aux HMA. D'autres gènes candidats localisés sur la région minimale délétée du bras long du chromosome 7 pourraient être impliqués comme *MLL3* appartenant à la famille des histones méthyltransférases MLL ou *Dock4* (dedicator of cytokinesis-4) localisé en 7q31 dont l'expression est altérée dans les SMD du fait d'une hyperméthylation de son promoteur et dont la répression d'expression in vitro dans des cellules souches hématopoïétiques est associée à une augmentation de l'apoptose et une croissance altérée des colonies myéloïdes et érythroïdes[222]. Ces corrélations in vitro n'ont pas été étudiées in vivo.

Caryotype monosomique. Dans un essai de phase II incluant 227 patients LAM de plus de 60 ans traités par décitabine, au sein du groupe de patients de risque cytogénétique défavorable, la présence d'un caryotype monosomique a été associée à un meilleur taux de réponse et de survie sans progression comparé aux caryotypes non-monosomiques[223]. Si cet effet était ensuite confirmé, notamment pour les patients présentant 2 monosomies, par un essai de phase III de l'EORTC comparant la décitabine

aux soins de support dans les SMD de haut risque[224], il n'a jamais été mis en évidence chez les patients traités par azacitidine[203,218].

Anomalie du chromosome 3q Le devenir des patients ayant un SMD ou une LAM avec une anomalie du chromosome 3q ou une hyperexpression d'EVI1 a fait l'objet d'une étude rétrospective sur plusieurs centres français[225]. Cette étude a concerné 157 patients traités par azacitidine tous porteurs d'une anomalie en 3q, incluant 39% de LAM et 61% de caryotypes complexes et une cohorte contrôle de patient sans anomalie cytogénétique en 3q mais avec une hyperexpression d'EVI1. Le taux de réponse globale était de 50% incluant 29% de réponse complète ou partielle et 21% d'amélioration hématologique. La caractérisation des anomalies du chromosome 3q en 4 catégories : (1) inv3/t(3 ;3), (2) altération en 3q26 (impliquant *EVI1*), (3) altération en 3q21 (impliquant *GATA2*) et (4) autres altérations a permis d'identifier les anomalies en 3q21 comme étant associées à une survie globale médiane allongée à 73,8 mois contre 10 mois dans les 3 autres groupes (HR 0,0388 95CI% [0,005-0,303], p=0,004). Les auteurs suggèrent que les patients ayant une altération chromosomique en 3q avec implication d'EVI1 pourraient tirer un bénéficie de l'azacitidine, possiblement vu le rôle d'EVI1 sur la dérégulation de l'épigénétique. Il doit être cependant noté que ce groupe était constitué de 8 individus seulement dont 3 en vie à 36 mois. En outre il n'y avait pas dans cette étude de cohorte contrôle de patients traités par chimiothérapie intensive. Ce marqueur n'ayant pas été confirmé sur une cohorte indépendante, il n'est pas utilisé en pratique courante. Une étude récente de la European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT)[226] a montré le très mauvais pronostic des patients ayant une LAM avec inv3/t(3 ;3) dans le contexte de l'allogreffe de moelle avec un taux de long survivant à 2 ans de 26% (95% CI, 17–35%), s'expliquant par un fort taux de rechute à 2 ans à 64% (95% CI, 10–24%). Il n'y avait pas d'analyse en sous-groupe évaluant l'impact des différents types d'anomalies du chromosome 3q.

d. Influence des mutations somatiques

i. Gènes de l'épigénétique

TET2. Une étude menée par le Groupe Francophone des Myélodysplasies (GFM) sur 86 patients traités pour un SMD par azacitidine suggérait un impact positif des mutations de *TET2* sur le devenir des patients[227]. Dans cette cohorte, la présence d'une mutation de *TET2* était significativement associée à un taux de réponse global plus élevé (69% vs 31%, p = 0,01), bien que seuls 13 patients (15%) de cette cohorte présentaient une mutation de *TET2*. Un essai de phase 2 également mené par le GFM[228], concernant 39 patients atteints de leucémie myélomonocytaire chronique traités par décitabine ne rapportait aucune différence sur le devenir des patients selon le statut mutationnel de *TET2*. Si plusieurs groupes n'ont pas réussi à confirmer cet effet protecteur des mutations de *TET2* sur le devenir des patients atteints de SMD traités par HMA[229–232], Bejar et al[233] ont reproduit ce résultat sur

une cohorte de 213 SMD traités par azacitidine (n=42) ou decitabine (n=171), restreignant leurs analyses aux mutations ayant une charge allélique >10%, avec des taux de réponse chez les patients *TET2* mutés versus non-mutés de 60 et 43%, respectivement (OR 1,99 IC95%[1,05-3,80], P = 0,036). Cet effet des mutations de *TET2* était plus marqué dans le sous-groupe des patients n'ayant pas de mutation du gène *ASXL1* (74% de réponse chez les patients *TET2*wt/*ASXL1*wt versus 44% chez les patients *TET2*mut/*ASXL1*wt, p=0,009). Bien que les mutations de *TET2* aient été décrites comme associées à la réponse des patients sous HMA, aucune de ces études n'a mis en évidence d'impact sur la survie. L'impact des mutations de *TET2* demeure ainsi incertain et ce marqueur n'est pas utilisé en pratique courante, d'autant plus que son séquençage est complexe du fait de l'absence de « hotspot » mutationnel et de la nécessité de séquençage du gène entier très consommatrice de ressources pour une utilisation en routine.

IDH1/2. Peu d'étude ont évalué l'impact spécifique des mutations des *IDH* dans le contexte des agents hypométhylants. Une série monocentrique sur 42 patients a montré en 2015 un potentiel avantage en terme de réponse chez les patients IDH^{mut} vs IDH^{wt} 5 (71,4% contre 20%, respectivement; p=0,01), sans traduction sur la survie sans maladie ou la survie globale[234]. Une étude plus récente a montré un désavantage en survie globale chez les patients atteints de SMD traités par azacitidine présentant une mutation *IDH1*[235].

DNMT3A. Une première étude positive pour *DNMT3A* a été publiée en 2012 par Metzeler et al[231]. Il s'agissait d'une cohorte de 46 patients traités dans un essai de phase II randomisé, par decitabine seule (n=39) ou décitabine et bortézomib (n=7). Parmi ces 46 patients, 8 (17,4%) avaient une mutation de *DNMT3A* dont 6 au niveau du hotspot R882. Six patients du groupe $DNMT3A^{mut}$ ont obtenu une RC (75%) vs 13 réponses dans le groupe des 38 patients $DNMT3A^{wt}$ (34% ; p=0,05), ce qui ne se traduisait pas en avantage sur la survie globale médiane (15,2 mois versus 11 mois, respectivement, p>0,05). A noter que dans cette cohorte les autres mutations somatiques identifiées sur les gènes *TET2* (n=8 ; 17,4%) et *IDH1/2* (n=7 ; 14,6%) n'avaient aucun impact sur la réponse et la survie. Dans une autre cohorte de 92 patients traités pour un SMD, SMD/SMP ou une LAM secondaire, par azacitidine (n=55), decitabine (n=26) ou les 2 (n=11), Traina et al[229] ont montré l'absence d'impact indépendant des mutations de *DNMT3A, TET2, IDH1/2.* Seuls les patients ayant un génotype $DNMT3A^{mut}$ et/ou $TET2^{mut}$ avaient un meilleur devenir en termes de réponse (p=0,03) et de survie sans progression (p=0,04). Ainsi l'effet des mutations de *DNMT3A* sur la réponse aux agents hypométhylants n'est est pas clairement établi et ce gène ne peut pas être utilisé comme aide à la prise de décision thérapeutique.

ASXL1. Dans l'étude rapportée par Traina et al, la réponse au traitement n'était pas corrélée au génotypage d'*ASXL1* (29% de RC chez les patients $ASXL1^{mut}$ versus 22% de RC chez ceux $ASXL1^{wt}$,

p=0.58) mais cette étude a montré un impact négatif des mutations d'ASXL1 sur la survie globale (HR 0,48 ; IC 95%[0,28-0,82], p= 0,008). Cet effet n'était pas confirmé par l'étude de Bejar et al[233].

Combinaison de gènes Ces études menées sur des cohortes relativement limitées (50-100 patients) évaluant l'impact des gènes de l'épigénétique indépendamment, présentent une puissance statistique assez faible et apportent des conclusions non confirmées voire contradictoires. Récemment, Cedena et al[236], ont décrit une approche plus globale évaluant l'impact des mutations des gènes de l'épigénétique dans leur ensemble. Ainsi à partir du séquençage ciblé de 34 gènes myéloïdes sur une cohorte de 84 patients traités par azacitidine pour un SMD, ils démontrent que si le nombre médian de mutations par patient est directement corrélé à une moins bonne réponse au traitement (HR 0,56 ; 95%IC [0.33–0.94]; p=0.028), la présence d'une mutation d'un gène de l'épigénétique parmi *TET2, DNMT3A, IDH1* et *IDH2* était associée à une meilleure réponse à l'azacitidine en analyse multivariée (HR 4,76 ; 95%CI[1,31–17,27], p=0,017). Cet effet positif sur la réponse n'avait pas de traduction sur la survie globale qui était influencée en multivariée par la présence d'une mutation de *TP53* (HR 3,88 ; 95%IC [1,94–7,75]) et d'*EZH2* (HR 2,50 ; 95%IC [1.23–5.09] p=0,012), indépendamment de la réponse à l'azacitidine.

ii. Anomalies de *TP53*

L'impact des altérations génétiques de *TP53* sur le devenir des patients traités par HMA pour un SMD ou une LAM est controversé. Chez les patients atteints de LAM traités de façon conventionnelle par chimiothérapie intensive[82,237] plus ou moins allogreffe de moelle[238,239], le statut *TP53*mut au même titre que les délétions du chromosome 17p confèrent un pronostique péjoratif sur la réponse, la survie sans rechute et la survie globale. Chez les patients jugés non éligibles pour une chimiothérapie intensive, plusieurs études ont montré sur des cohortes de patients traités par agent hypométhylant pour un SMD de haut risque ou une LAM, des taux de réponse équivalents voire supérieurs dans le groupe de risque cytogénétique défavorable[219,220] où les mutations/délétions de *TP53* sont les plus nombreuses, suggérant un potentiel mécanisme d'action des agents hypométhylants indépendant de *TP53.* Cette hypothèse est sous-tendue par des données précliniques qui ont démontré sur des cellules fibroblastiques et néoplasiques une efficacité supérieure de la décitabine sur les cellules *TP53*$^{-/-}$ versus les cellules *TP53*wt, via l'induction d'une réponse apoptotique[240,241]. Le concept d'hypersensibilité à l'apoptose induite par l'absence de p53 est relativement ancien et préalablement à sa description avec les agents hypomethylants, il avait été décrit en réponse au sels de platine[242], aux radiations par UV[243,244] et aux radiations ɣ [245]. Dans la cohorte de 213 patients atteints de SMD décrite par Bejar et al[233], incluant 39 patients (18,3%) porteur d'une mutation de *TP53*, on ne retrouvait pas d'impact du statut mutationnel de *TP53* sur la réponse thérapeutique mais sur un impact péjoratif sur la survie globale (HR 2,01 ; p = 0,002). Plus récemment, un essai clinique monocentrique[246] conduit par la

Washington University School of Medicine a apporté des résultats contradictoires et décrit un lien entre la détection d'une mutation de *TP53* dans les LAM du sujet âgé et la réponse à la décitabine administrée selon un schéma intensifié de 20mg/m²/jour pendant 10 jours sur des cycles de 28. Le critère d'évaluation était la réponse médullaire en fin de 1er cycle défini par l'obtention au minimum d'une clairance blastique médullaire quelle que soit la reconstitution hématologique. Cent seize patients ont été évalués dans cette étude soit une cohorte initiale de 84 patients atteints de LAM ou SMD nouvellement diagnostiqués et une cohorte d'extension de 32 patients incluant 24 LAM en rechute après chimiothérapie intensive. Au total, 53 patients (46%) ont obtenu une réponse médullaire après le 1er cycle. Les taux de réponse étaient supérieurs dans le groupe de patients avec une cytogénétique défavorable vs le groupe de risque cytogénétique intermédiaire ou favorable (29 patients/43 [67%] vs 24 patients /71 [34%], p<0.001) et chez les patients ayant une mutation de *TP53* comparés aux patients *TP53*wt (21 patients sur 21[100%] vs 32 patients sur 78 [41%], p<0,001). Ces résultats n'ont pas été confirmé par le séquençage d'un sous-groupe de 45 patients inclus dans un essai de phase II testant la décitabine à la dose de 135 mg/m² par cycle de 28 jours et l'impact des mutations de *TP53* n'a pas été évalué chez les patients atteints de LAM traités par azacytidine. Bien que le critère de réponse utilisé par Welch et al (réponse médullaire en fin de 1er cycle) soit discutable, cette étude soulève plusieurs questions sur le choix thérapeutique à faire chez les LAM avec mutation de *TP53* jugée inéligible pour une chimiothérapie intensive : azacitidine versus décitabine ; dose d'agent hypométhylant standard versus intensifiée.

e. Influence des profils de méthylation de l'ADN

Plusieurs groupes ont évalués si la réponse aux inhibiteurs de DNMT peut être prédite par le niveau pré-thérapeutique de méthylation à l'échelle du promoteur d'un gène ou d'une famille de gènes ou à l'échelle globale de l'ADN. Les variations des profils de méthylation per-thérapeutique ont également été corrélées à la réponse au traitement.

***CDKN2B*.** La relation entre la réponse au traitement et le niveau de méthylation du gène suppresseur de tumeur *CDKN2B* codant pour l'inhibiteur du cycle cellulaire $p15^{INK4B}$ a été décrite dans plusieurs études[247–249], apportant des résultats parfois contradictoires. Certaines études comme celle de Fandy et al.[247], portant sur 30 patients atteints de SMD et LAM n'ont pas réussi à mettre en évidence in vivo de lien entre le profil de méthylation des promoteurs de quatre gènes sélectionnés pour leur profil de méthylation élevé dans les SMD et/ou LAM et leur potentiel biologique: *p15INK4B* (inhibiteur de CDK), *CDH-1* (molécule d'adhésion), *SOCS-1* (signalement cytokinique), and *DAPK-1* (apoptose). La variation du profil de méthylation de ces gènes en cours de traitement n'était pas non plus corrélée à la réponse. D'autres études comme celle de Raj et al[248], ont soutenu qu'un plus faible niveau pré-thérapeutique de méthylation du promoteur de CDKN2B était corrélé à une meilleure réponse. Ce résultat n'était pas

confirmé par Gore et al[250] qui montrait chez 6 patients répondeurs à l'azacitidine sur 6, la réversion du profil hyperméthylé de *CDKN2B* au cours du premier cycle versus aucune réversion chez les 6 patients non répondeurs. Ces résultats très hétérogènes peuvent s'expliquer par l'hétérogénéité des méthodes utilisées pour la mesure de la méthylation de l'ADN, des schémas thérapeutiques utilisés et des populations étudiées.

BCL2L10. Le degré de méthylation du gène *BCL2L10* membre de la famille de des protéines anti-apoptotique BCL-2, mesuré avant traitement dans deux cohortes de 38 et 27 patients atteints de SMD de haut risque, a été corrélé négativement à la réponse à l'azacitidine et associé à une survie globale plus courte chez les patients ayant un taux de méthylation de *BCL2L10* ≥50%[232]. A l'inverse une autre étude a montré que les patients résistants à l'azacitidine avaient un taux plus important de cellules exprimant BCL2L10 dans la moelle osseuse et qu'une faible expression de BCL2L10 prédisait une meilleure survie globale[251].

Profil de méthylation multigénique. Pour tenter d'identifier des profils de méthylation aberrants sur de multiples locus, Shen et al[252] ont étudié le degré de méthylation de 24 gènes candidats dans une première cohorte de 89 patients traités par décitabine dans le cadre d'un essai de phase III. Sur cette cohorte d'entrainement le taux de méthylation déterminé par séquençage bisulphite allait de 7% à 70% et permettait la description d'un z-score de méthylation avant traitement, calculé sur 10 gènes hyperméthylés. Ce z-score était inversement corrélé à la survie sans progression et la survie sans rechute sur deux cohortes de validation indépendantes de 75 et 153 patients. La variation du z-score en cours de traitement par décitabine était significativement plus forte comparée à celle observée dans une cohorte de patients traités par soins de support seuls (-11,2% vs +20,1%, respectivement, p=0,04). Si la variation du z-score de méthylation sous traitement était bien corrélée avec la réponse thérapeutique, ce score de méthylation avant traitement ne permettait pas de prédire la réponse thérapeutique.

Profil global de methylation de l'ADN. Une autre approche a été d'examiner le statut de méthylation de séquences répétitives d'ADN pendant le traitement, qui correspond à un marqueur indépendant de la présence de cellules leucémiques. Les long interspersed nuclear elements (LINE-1) correspondent à des séquences répétitives d'ADN non codantes décrites comme un proxy du degré global de méthylation de l'ADN. Plusieurs études ont montré in vivo des variations du degré de méthylation de LINE1 pendant les premiers cycles d'agent hypométhylant, mais aucune n'a démontré d'impact pronostique de ce marqueur[247,253,254]. Avec l'avènement des technologies de séquençage à haut débit, d'autres études plus récentes ont poursuivi ces recherches utilisant une approche pangénomique par methyl-cap sequencing. A partir d'une cohorte de 16 patients traités par décitabine pour une LAM, Yan et al[255] ont montré une tendance pour un plus haut niveau de méthylation au diagnostic et une

plus forte diminution de cette méthylation chez les patients répondeurs à la décitabine. Cette tendance n'était pas confirmée par l'étude de Welch et al[246] qui avait évalué les méthylomes (Illumina Human Methylation 450 Bead Chip) de 84 patients LAM ou MDS traités par Decitabine à forte dose, sans parvenir à distinguer un profil de méthylation ou de variation de méthylation chez les patients répondeurs.

Au final, peu d'études évaluant les profils de méthylation de patients atteints d'hémopathies myéloïdes traitées par HMA se sont révélées positives et/ou reproductibles. L'analyse seule de la méthylation des promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur est probablement une approche trop restrictive et à l'avenir l'analyse des méthylomes devra également être corrélée aux génotypes des patients sur les gènes clés de la méthylation de l'ADN comme *TET2, IDH1/2, DNM*T3A[256].

f. Influence de l'expression des genes

Amplification de *DNMT3B.* L'hyperexpression de l'ARNm de DNMT3B et de sa protéine est décrite dans les LAM. Niederwieser et al[257] ont démontré que cette hyperexpression était associée à un devenir défavorable sur une cohorte de 210 patients LAM *de novo* de plus de 60 ans traités par chimiothérapie intensive. Si des données *in vitro*[258] suggèrent également un impact négatif sur la réponse de lignées cellulaires aux agents hypométhylants, cet effet n'a jamais été testé *in vivo*.

CJUN* et *CMYB. La faible expression des proto-oncogènes CJUN et CMYB a été décrite par Braun et al[228] comme un potentiel biomarqueur associé à une meilleure survie globale dans une cohorte de 36 patients atteints de LMMC traités par décitabine. L'hyperexpression de cJUN est associée à la différentiation monocytaire[259] et dans l'étude de Braun et al, on notait une diminution de l'expression de cJUN dans les monocytes des patients répondeurs. Dans cette série, l'hyperexpression de CMYB récurrente dans les LAM[260], était également associée à une diminution de la survie globale[228].

Expression de *Fas*. La répression d'expression de la protéine pro-apoptotique Fas en lien avec l'hyperméthylation du promoteur de *FAS/TNFRSF6/APO1* est décrite dans les hémopathies méyloïdes[261]. Ettou et al, ont évalué par cytométrie en flux l'expression de Fas au diagnostic chez 169 patients SMD et LAM et ont montré une corrélation positive avec la réponse à l'azacitidine, qui était liée à une augmentation d'expression de Fas[262].

miR-29b. Les microARNs (miRNAs) sont des séquences d'ARN non codantes qui participent à la régulation de l'expression des gènes en ciblant certains ARN messagers. miR-29b est impliqué dans la régulation de la méthylation de l'ADN en ciblant les trois enzymes DNMT[263,264]. Dans un essai de phase II testant la décitabine sur 10 jours chez 53 patients atteints de LAM, Blum et al[265] ont corrélé chez les 33 patients évaluables, le haut niveau d'expression de miR-29b avant traitement et la réponse thérapeutique (p=0,02). Le niveau d'expression de miR-29b n'était pas corrélé avec celui des DNMT.

PARTIE II – PROBLEMATIQUE ET PROJET DE THESE

Les patients âgés atteints de LAM représentent une population hétérogène au pronostic très défavorable. Le développement de l'azacitidine comme traitement de faible intensité proposé aux patients jugés inéligible pour une chimiothérapie intensive a représenté un progrès et l'azacitidine constitue désormais le bras de référence le plus fréquemment utilisé dans les essais randomisés ouverts pour cette population non éligible pour une chimiothérapie conventionnelle. Néanmoins le choix entre une approche intensive et un traitement de faible intensité par agent hypométhylant reste controversé en particulier pour les patients jugés physiquement aptes à recevoir une chimiothérapie mais dont les caractéristiques de la maladie laissent entrevoir un haut niveau de chimiorésistance et pour les patients avec un risque génétique intermédiaire ou favorable mais dont l'aptitude à recevoir une chimiothérapie est incertaine.

A l'initiation de ce projet de thèse l'azacitidine n'avait pas encore d'AMM pour les LAM ayant un taux de blastes > 30% dans la moelle osseuse, ce qui a justifié la réalisation d'une étude rétrospective de vie réelle sur les patients du réseau de cancérologie Oncomip au sein duquel cette thérapeutique était largement utilisée quel que soit le pourcentage de blastes médullaire dès 2008. Une importante variation des pratiques est connue, sans avoir jamais été spécifiquement étudiée. L'absence de biomarqueur moléculaire prédictif du devenir des patients majore l'incertitude quant à la stratégie optimale à proposer à un patient donné. Dans ce contexte nous avons mené une étude en lien avec des spécialistes en sciences comportementales et en épidémiologie sociale afin de caractériser les déterminants de ces variations liées au praticiens et en particulier leurs attitudes vis-à-vis du risque et de l'incertitude.

Le gène *TP53* fréquemment altéré dans les LAM du sujet âgé est l'objet d'une controverse quant à une possible utilisation comme biomarqueur prédictif du devenir des patients sous HMA. Son impact péjoratif dans les LAM traitées intensivement est bien connu. Récemment un essai prospectif monocentrique a montré une association des mutations de *TP53* avec un meilleur taux de réponse sous décitabine. Son impact pronostique dans les LAM traitées par azacitidine n'a jamais été spécifiquement évalué. De plus toutes les mutations de *TP53* n'ont pas le même impact fonctionnel, certaines étant des mutations perte de fonction, et d'autres gain de fonction. La caractérisation fonctionnelle des mutants de p53 a permis la description de classifications pronostiques dans certains cancers solides. Ces classifications n'ont jamais été évaluées dans les LAM et il n'est pas établi si les LAM avec mutations de *TP53* représentent une entité homogène.

Enfin si les progrès des techniques de séquençage de nouvelle génération ont permis une meilleure caractérisation des LAM dans différents contextes thérapeutiques, la plupart de ces études s'appuient sur des connaissances préalables sur le modèle du gène candidat. Les mécanismes d'actions des HMA étant imparfaitement connus, il est possible que ce type d'étude ne soient pas complètement adaptés

à la recherche de biomarqueur prédictif dans ce contexte. Nous avons conçu un plan expérimental original ne se fondant pas sur des hypothèses mais basé sur la comparaison d'exomes entiers de patients bons et mauvais répondeurs (phénotypes extrêmes) à l'azacitidine pour tenter d'identifier de nouveaux marqueurs.

QUESTIONS ABORDEES EXPERIMENTALEMENT DANS CE MANUSCRIT

Projet de thèse
Le choix thérapeutique dans le cadre des LAM du sujet âgé, entre traitement intensif et traitement de faible intensité par agent hypométhylant, soulèvent plusieurs questions que nous abordons expérimentalement dans ce manuscrit : 1. Les résultats en vie réelle de l'azacitidine permettent-ils d'identifier des marqueurs disponibles en routine prédisant la réponse et/ou la survie des patients ? La comparaison avec une cohorte appariée de patients traités par chimiothérapie intensive démontre-t-elle la supériorité d'une stratégie sur l'autre ? (Article #1, p.64) 2. Une variation des pratiques médicales entre traitement intensif et semi-intensif est connue, sous-tendue par l'importante incertitude concernant la stratégie de traitement optimale pour un patient donné atteint de LAM du sujet âgé. Les déterminants de ces variations liés au praticien lui-même n'ont jamais été explorées. Les caractéristiques comportementales des praticiens et en particulier leur attitude vis-à-vis de l'incertitude ont-elles un impact sur leurs choix thérapeutiques, ce qui constituerait un argument supplémentaire pour la description de biomarqueurs guidant un choix rationnel entre ces options ? (Article #2, p91) 3. Les mutations de *TP53* ont récemment été décrites comme prédictives de la réponse à la décitabine sur une cohorte de 116 patients atteints de MDS et LAM. Quel est l'impact de ces mutations chez les patients traités par azacitidine ? La caractérisation fonctionnelle des mutations de *TP53* permet-elle d'identifier un sous-groupe de patients mutés pour *TP53* qui auraient un meilleur devenir ? (Article #3, p111) 4. La comparaison des séquençages d'exomes complets de patients atteints de LAM, bon et mauvais répondeurs à l'azacitidine, permet-elle d'identifier de nouveaux marqueurs prédictifs du devenir de ces patients ? (Article #4, p129)

PARTIE III - RESULTATS

Article 1. Intensive chemotherapy, azacitidine, or supportive care in older acute myeloid leukemia patients: an analysis from a regional healthcare network.

Bories P, Bertoli S, Bérard E, Laurent J, Duchayne E, Sarry A, Delabesse E, Beyne-Rauzy O, Huguet F, Récher C.

American Journal of Hematology 2014 Dec;89(12) : E244-52

L'azacitidine a obtenu en 2008 une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour les patients atteints de LAM non éligibles pour une allogreffe de moelle osseuse, ayant un taux de blastes médullaires entre 20 et 30%. Cette AMM a été étendue en 2015 à tous les patients non éligibles pour une allogreffe de moelle quel que soit le pourcentage de blastes médullaires. Entre 2008 et 2015, de nombreux centres ont utilisé cette molécule hors AMM pour les patients jugés inéligibles pour une chimiothérapie intensive, avant que les résultats de l'essai de phase III AZA-AML-001 randomisant l'azacitidine contre les traitements conventionnels ne soient disponibles pour les patients ayant un taux de blastes >30%. Sur la période entre 2007 et 2010 nous avons évalué la distribution des traitements administrés (chimiothérapie intensive, azacitidine et soins de support exclusifs) à une cohorte de 334 patients atteint de LAM nouvellement diagnostiquée dans le cadre du réseau de cancérologie Oncomip. L'originalité de cette étude repose sur la description de toutes les thérapeutiques proposées à une population hétérogène de patients dans une approche de vraie vie à l'échelle populationnelle de l'ex-région Midi-Pyrénées. Les étapes de la décision thérapeutique pour les LAM du sujet âge dans le cadre de la réunion de concertation pluridisciplinaire des leucémies aiguës Oncomip sont décrites. Parmi les 334 patients recensés, 115 étaient traités par chimiothérapie intensive (34%), 95 par azacitidine (28,4%) et 114 par les meilleurs soins de support (34,1%). Nous décrivons le devenir en termes de réponse et de survie globale, et les facteurs pronostiques pour la réponse et la survie dans chacun de ces 3 groupes. Pour tenter de comprendre le positionnement et les résultats de l'azacitidine vis-à-vis de la chimiothérapie intensive et des soins de support, nous avons ensuite effectué un appariement par la méthode du score de propension. Ces données issues de la pratique courante sont complémentaires des essais cliniques randomisés qui incluent des patients sélectionnés sur des critères très stricts souvent peu représentatifs de la vie réelle.

Intensive chemotherapy, azacitidine or supportive care in older acute myeloid leukemia patients: an analysis from a regional healthcare network

Pierre Bories,[1,6*] Sarah Bertoli,[1*] Emilie Bérard,[2,3] Julie Laurent,[2] Eliane Duchayne,[4] Audrey Sarry,[1] Eric Delabesse,[4,5] Odile Beyne-Rauzy,[1,5] Françoise Huguet,[1] and Christian Récher[1,5]

[1]Département d'Hématologie-Médecine Interne, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Institut Universitaire du Cancer Toulouse Oncopole, Toulouse, F-31059, France

[2]Service d'Epidémiologie, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, F-31073, France.

[3]UMR 1027, INSERM-Université de Toulouse III, Toulouse, F-31062, France.

[4]Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Hôpital Purpan, F-31059 Toulouse, France.

[5]Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France.

[6]Service d'Hématologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, F-67098, Strasbourg,

Corresponding author: Pr Christian Récher, Département d'Hématologie-Médecine Interne Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Institut Universitaire du Cancer Toulouse Oncopole, 1 Avenue Irène Joliot-Curie - IUCTO - 31059 Toulouse cedex 9 - France; phone : +33(0)5 31 15 62 49; fax : +33 (0)5.31.15.65.87 ; email : recher.christian@iuct-oncopole.fr

***** PB and SB equally contributed to the work

Abstract word count: 200

Text word count: 4516

Number of tables: IV

Number of figures: 4

Key words: leukemia, azacitidine, supportive care, healthcare network

Running title: Frontline treatments in older AML patients

Abstract

We assessed in a French regional healthcare network the distribution of treatments, prognostic factors and outcome of 334 newly diagnosed acute myeloid leukemia patients aged 60 years or older over a 4-year period of time (2007-2010). Patients were selected in daily practice for intensive chemotherapy (n=115), azacitidine (n=95) or best supportive care (n=124). In these three groups, median overall survival was 18.9, 11.3 and 1.8 months, respectively. In the azacitidine group, multivariate analysis showed that overall survival was negatively impacted by higher age (p=0.010 for one unit increase), unfavorable cytogenetics (p=0.001), lymphocyte count < 0.5 G/L (p=0.015) and higher lactate dehydrogenase level (p=0.005 for one unit increase). We compared the survival of patients treated by azacitidine *versus* intensive chemotherapy and best supportive care using time-dependent analysis and propensity score matching. Patients treated by intensive chemotherapy had a better overall survival compared to those treated by azacitidine from 6 months after diagnosis, whereas patients treated by azacitidine had a better overall survival compared to those treated by best supportive care from 1 day after diagnosis. This study of "real life" practice shows that there is a room for low intensive therapies such as azacitidine in selected elderly acute myeloid leukemia patients.

Introduction

In acute myeloid leukemia (AML) patients over the age of 60 years, the combination of host factors making cytotoxic agents poorly tolerated and disease factors making chemotherapy less efficient causes a global poor prognosis [1]. Intensive chemotherapy, low-dose cytarabine (LDAC) and best supportive care summarized conventional care regimen in that setting [2]. Intensive chemotherapy is the only potential curative option, but is reserved to highly selected patients and has perfectible results even in this population, as evidenced by long-term survival rate below 15-20% [2,3]. For patients unlikely to benefit from standard induction therapy, LDAC offers a low complete response rate and virtually no patient alive at two years underlying the need for novel low intensity therapies[4]. Among them, hypomethylating agents such as azacitidine or decitabine have become first line reference treatments for high-risk myelodysplastic syndrome including patients with bone marrow blasts between 20 and 30%

now best classified as AML in the 2008 WHO classification. In the AZA-001 phase III study, azacitidine improved outcome in patients with myelodysplastic syndrome compared with conventional care regimens in all cytogenetic groups[5]. Treatment with azacitidine, unlike treatment with LDAC, was also beneficial for patients achieving only an incomplete (CRi, CRp) or partial remission (PR) as best response. In a subsequent analysis of this study regarding only patients with AML having 20-30% bone marrow blasts, the median OS with azacitidine was 24.5 months versus 16 months in the conventional care regimen group[6], even though only 16 patients were randomized between azacitidine and intensive chemotherapy. Recently, a compilation of two prospective phase II studies evaluating epigenetic therapies in newly diagnosed older AML has shown comparable results with hypomethylating agents over historical cohort of patients treated with intensive chemotherapy[7]. Taken together these studies tend to allocate a place for hypomethylating agents in older patients with AML considered unfit for intensive chemotherapy irrespective of the bone marrow blast percentage, but the identification of patients being the most likely to benefit from frontline hypomethylating agents is still a critical issue. Moreover, how patients are selected for intensive chemotherapy (*i.e*, judged "fit for chemo") or hypomethylating agents remains matter of debate, although regarding intensive chemotherapy, scoring systems have been proposed to rationalize the clinical decision-making[8-10]. It is also noteworthy that most studies dealing with hypomethylating agents and intensive chemotherapy do not report the selection criteria and outcome of AML patients for which no specific treatment has been proposed (the so-called "best supportive care") [11,12].

Here we report the distribution of treatments, prognostic factors and outcome of 334 older newly diagnosed AML patients selected in daily practice for intensive chemotherapy, azacitidine or best supportive care within a French regional healthcare network over a 4-year period of time (2007-2010). The first aim was to compare overall survival in intensive chemotherapy and azacitidine groups. We also compared overall survival in best supportive care and azacitidine groups.

Methods

Study Population

The oncology healthcare network of the Midi Pyrenees region (ONCOMIP) located in the south west of France covers 2.9 million inhabitants, including 0.72 million inhabitants aged 60 years or more. Patients are referred by personal physicians, primary care centers or directly in the Leukemia unit of the Toulouse University Hospital (TUH) [13]. Data are centralized at the University Hospital and recorded each week according to guidelines from the Oncomip network (http://www.oncomip.org). Patients yielded written inform consent allowing the collection of personal clinical and biological data in an anonymized database in accordance to the declaration of Helsinki. All registered patients aged 60y or older diagnosed with an untreated non-M3 AML from Jan 1st 2007 to Dec 31st 2010 were included in this study.

Patients previously treated with hypomethylating agent for myelodysplastic syndrome (MDS) that preceded the AML were not included. This study was approved by the institutional review board (n° 21-0314). Clinical data encompass demography, performance status, concomitant illness, history of cancer and previous cytotoxic therapy, antecedent of MDS or myeloproliferative neoplasm. Whenever possible prognosis scoring using modified Charlson comorbidity scoring system was performed[14]. Biological data included biochemistry, blood and bone marrow cell count, cytogenetics and molecular genetics (*NPM1,* and *FLT3* mutational status when available). Cytogenetic prognosis was defined according to the refined British MRC classification[15]. Favorable genotype was defined as *NPM1* mutation in the absence of *FLT3-ITD*. Based on initial characteristics such as white blood cell count (WBC), cytogenetics, age, secondary AML, performance status and comorbidities, the therapeutic decision was proposed by three leukemia specialists (FH, OBR and CR). Briefly, the first issue was to judge if patients could benefit from intensive chemotherapy (ICT). If not, the second issue was to determine if patients could benefit from azacitidine (regardless of the bone marrow blast percentage) with a special attention paid to proliferative AML since high WBC was already described as a poor prognostic factor in patients treated by azacitidine [16-18]. In our center, patients with good performance status, intermediate or favorable karyotype, 75y or younger and limited comorbidities are generally selected for ICT whereas

patients older than 80y with high WBC or comorbidities are selected for best supportive care (BSC). The flow chart of patients is shown in figure 1.

Treatments

Azacitidine was administered subcutaneously within two schedules: 75 mg/m²/d for 7 days of every 28-day cycle or a less intensive schedule (75 mg/m²/d) for 5 days of every 28-day cycle in patients considered too frail to receive the 7-day schedule. Azacitidine was administered until disease progression, unacceptable toxicity, or patient decision to withdraw. Patients could receive growth factors (Erythropoiesis Stimulating Agent [ESA] or Granulocyte Colony Stimulating Factor [G-CSF]) at the physician discretion. Chemotherapy regimens administered to patients of the ICT group have been detailed elsewhere[13,19]. Patients in the best supportive care (BSC) group received blood product transfusions, antimicrobial agents and hydroxyurea sufficient to keep WBC below 50 G/L. All patients treated by ICT were admitted at the TUH. In the azacitidine group, 43 patients (45.3%) were diagnosed at the TUH whereas 52 patients (54.7%) were diagnosed in primary centers among whom 40 (42.1%) subsequently seen by a leukemia specialist at the TUH for decision-making. Overall, 41 (43.2%) and 54 (56.8%) patients received azacitidine at the TUH or primary centers, respectively.

Assessment of safety and efficacy

Adverse events were graded according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (version 4.0; National Cancer Institute, Bethesda, Md). Early death was defined as death occurring during the first 60 days after diagnosis. The response was assessed according to the International Working Group (IWG) on AML [20]. BM assessment in patients treated with ICT was performed after blood recovery or in case of delayed recovery between day 35 to 45. In the azacitidine group, BM aspiration was carried out after 3 to 6 cycles of treatment. Patient harboring a stable or a progressive disease were classified as failure following AML Cheson criteria. In patient with stable disease, hematological improvement (HI) either on erythroid, neutrophil or platelet lineage (HI-E, HI-N and HI-P, respectively) was assessed according to the 2006 IWG–MDS response criteria [21]. Disease-free survival was defined as the time from remission occurrence to relapse, death from any cause or the date

of last contact, event-free survival was defined as the time from diagnosis to failure, relapse, death from any cause or the date of last contact and overall survival was defined as the time from diagnosis to death from any cause or the date of last contact. For patients receiving BSC, only overall survival was assessed.

Statistical analysis

Before doing any analysis, we assessed the power of the study for the assessment of the first objective: 154 deaths (76 treated by azacitidine and 78 by ICT) provide a power greater than 80% to detect a Hazard Ratio (HR) of death > 1.5 (for azacitidine versus ICT) with two sided type 1 error rate of 5% (α=0.05) for the comparison of two exponential survival distributions [22]. Statistical analysis was performed on STATA statistical software, release 11.2 (STATA Corp., College Station, TX). We described patients' characteristics using number and frequency for qualitative data, and median, inter-quartile range (IQR) and range (minimum-maximum) for quantitative data. Comparisons of patient characteristics were performed using Student's t-test (or Mann-Whitney's test when distribution departed from normality or when homoscedasticity was rejected) for continuous variable and the χ^2-test (or Fisher's exact test in case of small expected numbers) for categorical variable. In case of multiple comparisons (azacitidine versus ICT and azacitidine versus BSC), p-values were corrected using Bonferroni method. In each subgroup of patients (azacitidine, ICT and BSC) differences in response rate and early death were compared between groups using the χ^2-test (or Fisher's exact test in case of small expected numbers); differences in survival functions were tested using the Log-Rank test. Independent prognostic factors for response in ICT and azacitidine groups were assessed using a logistic regression model. Independent prognostic factors for OS in azacitidine, ICT and BSC groups, were assessed using a Cox model. Variables initially introduced in the model were all variables associated with response or OS in univariate analysis with a p-value < 0.20. A backward analysis was then applied until only variables significantly and independently associated with response or OS (p-value < 0.05) remained. The proportional-hazard assumption was tested for each covariate of the Cox model by the "log-log" plot method curves ((-ln{-ln(survival)}), for each category of nominal covariate, *vs.* ln(analysis time)) and was always met. When the linearity hypothesis was not respected, continuous variables were transformed into ordered data. Interactions between independent covariates were tested

in final models. Comparing OS with azacitidine *vs.* ICT (or with azacitidine *vs.* BSC), the Log-Rank test was used in univariate analysis and multivariate analysis was initially conducted using a Cox model taking into account the starting date of the treatment. Since the proportional-hazard assumption was not respected for treatments, we finally used a Royston and Parmar survival model [23]. Covariates were all variables associated with OS in azacitidine and/or ICT subgroup (or in azacitidine and/or BSC subgroup) in univariate analysis with a p-value < 0.20 who remained significantly and independently associated with OS (p-value < 0.05) after a backward analysis. To better appreciate the impact of azacitidine (*vs.* ICT or BSC) on OS, we used the propensity score method to more extensively take into account potential baseline differences between azacitidine and ICT (or BSC) subjects. A multivariate logistic regression model was generated to estimate for each patient a propensity score to receive azacitidine (*vs.* ICT or BSC). Covariates were all variables known to be associated with azacitidine (*vs.* ICT or BSC) in clinical practice (age, performance status, WBC, cytogenetics and prior cancer history) that remained significantly and independently associated with azacitidine (p-value < 0.05) after a backward analysis. The performance of the model was appreciated with the χ^2-Hosmer-Lemeshow statistic and the C-statistic. The propensity score was used to match subjects treated with azacitidine with subjects treated with ICT (or BSC) and OS was compared between azacitidine and ICT (or BSC) in the subgroups of propensity score matched subjects using a Royston and Parmar survival model. All reported p-values were two-sided and the significance threshold was < 0.05.

Results

Patients and treatments

From Jan 1st 2007 to Dec 31st 2010, 385 patients were diagnosed with a non-M3 AML within the ONCOMIP Oncology Network, which represents in this age category a mean annual incidence rate of 13.4 cases per 10^5 inhabitants. Fifty-one patients were excluded from the analysis because of early death occurring before therapy decision in 20 patients or missing data in 31 patients. Thus, 334 patients (86.7%) were evaluable including 115 patients treated with ICT (34.4%), 95 patients treated with azacitidine (28.4%) and 124 patients treated with BSC (37.1%) (Figure 1). The median follow-up was 35 months. During the period of the study, the rate of older AML patients treated with a non-palliative

strategy has increased from 48.2% to 75.0%. The proportion of patients treated with azacitidine has increased from 5.4% to 40.9% and conversely, the rate of patients receiving BSC has decreased from 51.8% to 25.0% (Supplementary figure 1). The characteristics of the three populations are summarized in Table I. Briefly, overall median age was 75 years (ICT, 68 years; azacitidine, 76 years and BSC, 80.5 years; $p<0.001$). Twenty percent of the entire population had prior history of MDS (ICT 6.7%, azacitidine 29.5%, and BSC 25%; $p<0.01$ for azacitidine *vs.* ICT and $p=0.017$ for azacitidine vs. BSC), median WBC was 4.25 G/L (ICT 9.5 G/L, azacitidine 2.3 G/L and BSC 5.3 G/L, $p<0.001$) and cytogenetics were adverse in 28.4% (ICT 17.4%, azacitidine 45.3% and BSC 25.8%, $p<0.001$ for azacitidine *vs.* ICT and $p=1$ for azacitidine *vs.* BSC). There were no significant differences between the ICT and azacitidine groups in terms of comorbidities and Charlson scoring (Supplementary table I). The median time from diagnosis to initiation of azacitidine was 28 days (range 1 to 234) and patients have received a median number of 6 cycles (range 1 to 34) (Table II). Azacitidine was administered using the standard 7-day scheme in 79 patients (83.2%) and using the less intensive 5-day scheme in 16 patients (16.8%). During azacitidine treatment, 11 patients (11.6%) received ESA only, 13 patients (13.7%) received G-CSF only, and 15 patients (15.8%) received both ESA and G-CSF. Of the 115 patients in the ICT arm, 106 patients (92.2%) received an induction with idarubicin and cytarabine, 73 of them receiving CCNU as a third agent (63.5%).

Outcome of the entire cohort

Early death occurred in 89 patients (26.6%), mainly observed in the BSC group, due to disease progression in 66 patients (74.2%) and infection in 9 patients (10.1%). Ninety-six patients (28.7%) have reached CR or CRi. The median OS was 7 months and 3-year OS was 18% (Supplementary Figure 2A). Overall, 23 patients have been lost to follow-up, 21 of them being in the BSC group.

Outcome of patients treated with frontline azacitidine

Among the 95 patients treated with azacitidine, early death occurred in 11 patients (11.6%) as a consequence of disease progression in eight cases (72.7%) or infection in three cases (27.3%). We identified 56 patients (59%) requiring hospitalization for infection (median number of hospitalization

per patient, 1; range 1 to 7). From the 79 patients who received the 7-day scheme, a dose reduction was applied in 19 patients due to grade III/IV hematological toxicity in seven patients (36.8%), grade III/IV non-hematological toxicity in four patients (21.1%) and as maintenance therapy in 7 (36.8%) patients. Overall response rate (CR + CRi) was 18.9% and six additional patients (6.3%) achieved partial response (PR) (Table III). Twenty-four patients (25.3%) classified as failure with AML criteria experienced major hematological improvement on at least one lineage, including seven patients who have normalized their peripheral blood count but were not evaluated with BM aspiration. Median number of cycles was 3 (IQR 2-3) and 4.5 (IQR 3-6) before first or best response (CR, CRi or PR), respectively. Univariate analysis of factors influencing response to azacitidine showed that age < 80 years (p=0.035), intermediate cytogenetics (p=0.028) and use of G-CSF (p=0.042) had a positive impact on response, the latter two remaining significant in multivariate analysis (Supplementary Table III). Of the 18 CR/CRi patients (median follow-up, 30 months; IQR, 22-33), 13 relapsed or died, median DFS being 17.3 months (IQR, 9.3-21.7). None of these relapsed patients received ICT as salvage therapy. Only two patients refractory to azacitidine were salvaged with ICT. Median OS with azacitidine was 11.3 months (IQR, 5.2-28.5) (Figure 2A) and was negatively impacted in multivariate analysis by higher age (95% Confidence Interval, 1.01-1.10, HR 1.05 for one year increase, p=0.010), adverse cytogenetics (95% CI, 1.44-4.49, HR 2.55, p=0.001), lymphocyte count < 0.5 G/L at diagnosis (95% CI, 1.19-5.26, HR 2.5, p=0.015) and higher LDH level (95% CI, 1.0002-1.0012, HR 1.0007 for one unit increase, p=0.005) (Table IV and Figure 2B-E).

Outcome of patients treated with intensive chemotherapy

Among the 115 patients treated by ICT, early death occurred in 18 (15.7%). Overall response (CR+CRi) was documented in 78 patients (67.8%) (Table III). The only factor that positively influenced response to ICT in multivariate analysis was *de novo* status of AML (95% CI, 1.89-14.28, OR 5, p=0.001). As post-remission treatment, ten patients (8.7%) underwent allogeneic-stem cell transplantation, seven received intermediate or high dose cytarabine (1 or 2 cycles), and 57 received maintenance therapy. With a median follow-up of 36 months (IQR, 23-50), 42 patients relapsed (53.8%), the median DFS being 16.5 months (IQR, 8.3-53.9). Median OS was 18.9 months (IQR, 5.0-45.9) (Supplementary Figure

2B). Univariate analyses showed that age < 80 years, *de novo* AML status, WBC < 30 G/L, no infection at diagnosis, and non-adverse cytogenetics positively impacted OS, while only age (95% CI, 0.04-0.47, HR 0.13, p=0.002) and *de novo* AML (95% CI, 0.20-0.64, HR 0.36, p<0.001) remained significant in multivariate analysis.

Outcome of patients receiving best supportive care only

In this group, early death occurred in 60 patients out of 124 (48.4%). With patients lost to follow-up censored as survivors at the last follow-up, median OS in this group was 1.8 months (IQR, 0.7-4.1) (Supplementary Figure 2C). In multivariate analysis, platelet count lower than 50 G/L at diagnosis was the only factor that significantly impacted early death (95% CI, 1.35-8.3, OR 3.33, p=0.009) and OS (95% CI, 1.14-2.86, HR 1.78, p=0.012).

Overall survival comparison between ICT and azacitidine arms

When comparing OS in ICT and azacitidine groups, univariate analysis showed a time-dependent survival advantage for ICT, which was significant from 3 months after diagnosis (Figure 3A and 3B). After adjustment, OS was significantly better after ICT from 6.5 months after diagnosis compared to azacitidine (Figure 3C). The propensity score to receive azacitidine (*vs.* ICT) included age (<70 *vs.* ≥70 years), AML status (de novo *vs.* secondary), BM blasts (0-19%, 20-29%, 30-49% and ≥ 50%), platelets count (< 100 G/L *vs.* ≥ 100 G/L) and cytogenetics (intermediate *vs.* adverse) and was assessed for 188 patients (azacitidine, n=88; ICT, n=100). The c-statistic for the logistic regression model assessing the propensity score was 0.94 (95% CI: 0.90-0.97) and the χ^2-Hosmer-Lemeshow statistic reached 0.81. Mean propensity score was 0.1905 (±0.2359) in ICT and 0.7835 (±0.2615) in azacitidine. According to propensity score, 26 patients of the ICT group were matched with 26 patients of the azacitidine group (25 with a precision of 0.0001 and the last with a precision of 0.1). Mean propensity score was equivalent in both treatment groups (0.4884 ± 0.2592) in the matched sample. In this subgroup of 52 patients matched for propensity score, OS was significantly better in the ICT group from 6 months after diagnosis as compared to azacitidine (Figure 3D).

Overall survival comparison between azacitidine and BSC

BSC and azacitidine OS comparison in univariate analysis showed a time-dependent survival advantage for azacitidine, which was significant from 2 days after diagnosis (Figure 4A and 4B). After adjustment, OS was significantly better for azacitidine from one day after diagnosis compared to BSC (Figure 4C). The propensity score to receive azacitidine (*vs.* BSC) included age (60-69, 70-79 and ≥80 years) and WBC count (< 10 G/L *vs.* ≥ 10 G/L) and was assessed for 193 patients (azacitidine, n=95; BSC, n=98). The c-statistic for the logistic regression model assessing the propensity score was 0.70 [95% CI: 0.63-0.77] and the χ^2-Hosmer-Lemeshow statistic reached 0.70. Mean propensity score was 0.4218 (±0.1920) and 0.5649 (±0.1590) in BSC and azacitidine groups, respectively. According to propensity score, 66 patients of the BSC group were matched with 66 patients of the azacitidine group (64 with a precision of 0.0001 and two with a precision of 0.1). Mean propensity score was equivalent in both groups (0.5097 ± 0.1599) in the matched sample. In this subgroup of 132 patients matched for propensity score, OS was significantly better in the azacitidine group from one day after diagnosis as compared to BSC (Figure 4D).

Discussion

We described a cohort of unselected newly diagnosed AML patients aged 60 or older treated with three different approaches over a 4-year period of time in a cancer healthcare network. The overview of this unselected cohort allowed us to identify three distinct populations of patients according to the treatment assigned in daily practice. The intensive chemotherapy group included the “youngest” patients with proliferative, *de novo* AML and non-adverse cytogenetics whereas the “oldest” patients with proliferative AML were in the BSC group. In between, the azacitidine group included patients with low WBC count, secondary AML and adverse cytogenetics. Interestingly, we did not observe any difference in terms of performance status or comorbidities between patients having received intensive chemotherapy or azacitidine. For these two groups, the main decision-making criteria used for the selection of patients in routine were WBC count, age, AML status and cytogenetics. Only two patients treated with azacitidine (*i.e.* considered initially not likely to benefit from intensive treatments) received intensive chemotherapy as salvage therapy after azacitidine failure, which remains lower than the 10%

rescue rate with intensive chemotherapy after decitabine failure reported in the DACO-16 trial [24]. This finding, meaning that a patient "judged unfit" for intensive chemotherapy at diagnosis remains unfit at the time of azacitidine failure, underlines the accuracy of patient selection for low intensive therapy *vs.* intensive chemotherapy. Conversely, we much more often offered azacitidine in patients who failed intensive chemotherapy as 19 patients having failed intensive chemotherapy received azacitidine as salvage therapy in our series. Regarding the BSC group compared to the azacitidine group, the main differences concerned age and WBC count. Interestingly, we observed that the gradual introduction of azacitidine as frontline therapy during the study period led to slightly reduce the number of patients treated by intensive chemotherapy while the proportion of patients with BSC more significantly decreased. Thus, the advent of low intensive therapy such as azacitidine in older AML patients is of importance, since this approach may constitute a new middle path that can be proposed to patients who would have been previously treated with intensive chemotherapy even though their predictable outcome was poor or alternatively, with BSC even though their characteristics would have allowed a non-palliative low intensive therapy. Indeed, unlike previous report from Pulsoni et al., who did not find any survival difference between aggressive and non-aggressive therapy in 1005 older AML patients recorded in a national registry, our study shows a clear survival stratification between intensive, low-intensive and supportive treatment, with median OS of 18.9, 11.3 and 1.8 months, respectively [25].

Although the superiority of azacitidine over conventional care regimens has been shown in patients with 20-30% bone marrow blasts, limited data are currently available in patients with more than 30% bone marrow blasts [6, 26]. Of note the 11.3 months median OS in patients treated with azacitidine in our cohort compares favorably with other series dealing with hypomethylating agents [7,16,24]. Moreover, reminiscent of the results of the AZA-001 study in myelodysplastic syndromes, we observed that not only AML patients having achieved CR but also PR or even HI, had an improved survival compared to patients who failed azacitidine treatment (Figure 2F). Interestingly, the characteristics of patients achieving a complete response with azacitidine were somewhat different than those who responded after intensive chemotherapy, especially regarding the AML status. Indeed, 66.7% of responding patients in the azacitidine group had secondary AML compared to only 10% in the intensive chemotherapy group (supplementary table II). However, the outcome of AML patients treated with azacitidine remains poor,

we identified three factors that could be used to improve results. Not surprisingly, adverse cytogenetics remains the main prognostic factor with a strong impact on response and survival. In those patients, clinical trials combining azacitidine with other drugs such as lenalidomide currently trialed in patients with 5q- chromosomal abnormality, are warranted. Additionally, we described for the first time that the use of G-CSF is associated with a better response to azacitidine. This finding should deserve further investigation since G-CSF is usually not mandatory in this setting. Curik et al., showed a synergistic effect between myeloid colony-stimulating cytokines and azacitidine[27]. Alternatively, G-CSF could have improved the dose intensity of azacitidine allowing a better impact on methylation status of leukemic cells. However, we were not able to assess the interval of time between azacitidine courses in patients having received or not G-CSF to support this hypothesis. We also showed that low baseline lymphocyte counts negatively impacted survival suggesting that immune response could be a major component of response to azacitidine. It has been shown that azacitidine up-regulates the expression of epigenetically silenced tumor antigens such as MAGE-A1 or WT-1 and induces a specific CD8+ T-cell response in AML patients, suggesting that novel therapies modulating immune response such as anti-PD-L1 or anti-PD1 could improve azacitidine activity [28,29].

The lack of prognosis value of BM blast percentage in patients treated by azacitidine suggests that a substantial proportion of patients with more than 30% BM blasts could benefit from it. We believe that WBC count is a more relevant prognostic factor even though baseline WBC had no prognostic impact in our study, likely because only 14 patients treated with azacitidine had WBC above 10 G/L[18]. However, another marker of cell proliferation, LDH level, was strongly associated with OS in patients treated with azacitidine. Although LDH level is classically correlated with response and survival in patients treated with intensive chemotherapy, it has not yet been described in the setting of hypomethylating agents [30].

To date, there is no clear evidence that azacitidine treatment is associated with a similar outcome compared to intensive chemotherapy. Although our study cannot adequately address this issue because of patient selection, we compared the survival of patients treated by azacitidine *vs.* intensive chemotherapy or best supportive care using time-dependant analysis (Royston and Parmar survival model) and propensity score matching. After adjustment for main prognostic factors or matching

patients on the propensity score, AML patients treated by intensive chemotherapy had a better survival than those treated by azacitidine from six months after diagnosis. It is noteworthy that roughly 25% of patients treated by intensive chemotherapy were alive at 48 months whereas we did not identify a significant proportion of long-term survivors after azacitidine treatment. This should be kept in mind when choosing treatment between these two therapeutic options in older AML patients. Indeed observational data should be considered complementary to that provided by randomized clinical trials[31]. They provide data collected in a non-selected general population, while participants in clinical trials are generally under very restrictive eligibility criteria. Moreover, using propensity score analyses[32] to take into account potential indication bias (i.e. baseline differences between subjects with ICT vs. azacitidine) did not change the results. Conversely, the overall survival of propensity score matched patients treated by azacitidine was significantly better than those treated by BSC indicating that azacitidine likely improves outcome in a significant proportion of those patients deemed unfit for intensive chemotherapy.

This study of "real life" practice in a regional healthcare network shows that there is a room for low intensive therapies such as azacitidine in selected elderly AML patients. An international randomized phase III trial (ClinicalTrials.gov, NCT01074047) comparing azacitidine *versus* intensive chemotherapy, low-dose cytarabine or best supportive care has been recently completed in AML patients 65 years or older with WBC count less than 15 G/L and will help to better define the issues of patient selection and therapeutic stratification in elderly AML patients.

Acknowledgements

The authors thank all the clinicians of the ONCOMIP network who referred their patients (Dr Y. Botreau, CH Cahors; Dr M. Carreiro, CH Montauban; Dr C. Dingremont, CH Tarbes; Dr MH. Gaspard, clinique C. Bernard Albi; Dr P. Montané de Laroque, CH Foix; Dr L. Mosser, CH Rodez; Dr C. Sarda, CH Castres-Mazamet; Dr D. Schlaifer, clinique de l'Ormeau Tarbes; Dr W. Vaillant, CH Auch; Dr E. Bauvin, ONCOMIP; Dr X. Carles, ONCOMIP), all the nurses and other health care providers from the Hematology Department of Toulouse University Hospital and all the members of the G.A.E.L (*Gaël*

Adolescent Espoir Leucémie) and A.G.M.O.M.P (*Association des Greffés de Moelle Osseuse de Midi-Pyrénées*) associations for their kind support to patients.

Conflict of Interest

CR received research funding from Celgene.

Funding source: This work has been approved by the National Research Agency (ANR) and granted by the French government under the «*Investissement d'avenir* " program (ANR-11-PHUC-001).

References

1. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, et al. Age and acute myeloid leukemia. Blood 2006; 107: 3481-3485.
2. Burnett A, Wetzler M, Lowenberg B. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 2011; 29: 487-494.
3. Goldstone AH, Burnett AK, Wheatley K, Smith AG, Hutchinson RM, Clark RE. Attempts to improve treatment outcomes in acute myeloid leukemia (AML) in older patients: the results of the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. Blood 2001; 98:1302-1311.
4. Burnett AK, Milligan D, Prentice AG, Goldstone AH, McMullin MF, Hills RK, et al. A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment. Cancer 2007; 109: 1114-1124.
5. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. Lancet Oncol 2009; 10: 223-232.
6. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 2010; 28: 562-569.
7. Quintas-Cardama A, Ravandi F, Liu-Dumlao T, Brandt M, Faderl S, Pierce S, et al. Epigenetic therapy is associated with similar survival compared with intensive chemotherapy in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. Blood 2012; 120: 4840-4845.
8. Krug U, Rollig C, Koschmieder A, Heinecke A, Sauerland MC, Schaich M, et al. Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: a web-based application for prediction of outcomes. Lancet 2010; 376: 2000-2008.
9. Malfuson JV, Etienne A, Turlure P, de Revel T, Thomas X, Contentin N, et al. Risk factors and decision criteria for intensive chemotherapy in older patients with acute myeloid leukemia. Haematologica 2008; 93: 1806-1813.
10. Kantarjian H, Ravandi F, O'Brien S, Cortes J, Faderl S, Garcia-Manero G, et al. Intensive chemotherapy does not benefit most older patients (age 70 years or older) with acute myeloid leukemia. Blood 2010; 116: 4422-4429.
11. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Mollgard 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; 113: 4179-4187.
12. Latagliata R, Bongarzoni V, Carmosino I, Mengarelli A, Breccia M, Borza PA, et al. Acute myelogenous leukemia in elderly patients not eligible for intensive chemotherapy: the dark

side of the moon. Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 2006; 17: 281-285.
13. Bertoli S, Berard E, Huguet F, Huynh A, Tavitian S, Vergez F, et al. Time from diagnosis to intensive chemotherapy initiation does not adversely impact the outcome of patients with acute myeloid leukemia. Blood 2013; 121: 2618-2626.
14. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. J Chronic Dis 1987; 40: 373-383.
15. 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; 116 :354-365.
16. Maurillo L, Venditti A, Spagnoli A, Gaidano G, Ferrero D, Oliva E, et al. Azacitidine for the treatment of patients with acute myeloid leukemia: report of 82 patients enrolled in an Italian Compassionate Program. Cancer 2012; 118: 1014-1022.
17. Raffoux E, Cras A, Recher C, Boelle PY, de Labarthe A, Turlure P, et al. Phase 2 clinical trial of 5-azacitidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in patients with high-risk acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. Oncotarget 2010; 1: 34-42.
18. Thepot S, Itzykson R, Seegers V, Recher C, Raffoux E, Quesnel B, et al. Azacitidine In untreated Acute Myeloid Leukemia. A Report On 149 Patients. Am J Hematol . 2014 Apr; 89:410-6
19. LaRochelle O, Bertoli S, Vergez F, Sarry JE, Mansat-De Mas V, Dobbelstein S, et al. Do AML patients with DNMT3A exon 23 mutations benefit from idarubicin as compared to daunorubicin? A single center experience. Oncotarget 2011 Nov; 2: 850-861.
20. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Buchner T, Willman CL, Estey EH, 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: 4642-4649.
21. Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, Lowenberg B, Wijermans PW, Nimer SD, et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. Blood 2006; 108: 419-425.
22. Machin D CM, Tan SB (eds). Sample size tables for clinical studies, 3rd edn. Wiley-Blackwell: Oxford, UK, 2009.
23. Royston P, Lambert P. Flexible Parametric Survival Analysis Using Stata: Beyond the Cox Model. StataCorp LP: Stata Press books, 2011.
24. Kantarjian HM, Thomas XG, Dmoszynska A, Wierzbowska A, Mazur G, Mayer J, et al. Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 2012; 30: 2670-2677.
25. Pulsoni A, Pagano L, Latagliata R, Casini M, Cerri R, Crugnola M, et al. Survival of elderly patients with acute myeloid leukemia. Haematologica 2004; 89: 296-302.
26. Estey EH. Epigenetics in clinical practice: the examples of azacitidine and decitabine in myelodysplasia and acute myeloid leukemia. Leukemia 2013; 27: 1803-1812.
27. Curik N, Burda P, Vargova K, Pospisil V, Belickova M, Vlckova P, et al. 5-azacitidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity. Leukemia 2012; 26: 1804-1811.
28. Goodyear O, Agathanggelou A, Novitzky-Basso I, Siddique S, McSkeane T, Ryan G, et al. Induction of a CD8+ T-cell response to the MAGE cancer testis antigen by combined treatment with azacitidine and sodium valproate in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. Blood 2010; 116: 1908-18.
29. Berthon C, Driss V, Liu J, Kuranda K, Leleu X, Jouy N, et al. In acute myeloid leukemia, B7-H1 (PD-L1) protection of blasts from cytotoxic T cells is induced by TLR ligands and interferon-gamma and can be reversed using MEK inhibitors. Cancer Immunol Immunother 2010; 59: 1839-1849.

30. Kantarjian H, O'Brien S, Cortes J, Giles F, Faderl S, Jabbour E, et al. Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: predictive prognostic models for outcome. Cancer 2006; 106: 1090-1098.
31. Booth CM and Tannock IF. Randomised controlled trials and population-based observational research: partners in the evolution of medical evidence. Br J Cancer 2014; 110: 551-555

Table I: Patients characteristics

	All patients N=334 (100)	ICT N=115 (34.4)	AZA N=95 (28.4)	BSC N=124 (37.1)	AZA *vs.* ICT p value	AZA *vs.* BSC p value
Age (years)					<0.001	<0.001
N	334	115	95	124		
Median (IQR)	75 (69-81)	68 (63-72)	76 (71-81)	80.5 (77-84)		
Range	60-95	60-83	61-89	60-95		
Male gender-n (%)	204 (61.1)	77 (67.0)	56 (58.9)	71 (57.3)	0.461	1
Prior cancer history-n (%)					<0.001	0.017
No	183 (54.8)	91 (79.1)	48 (50.5)	44 (35.5)		
MDS	67 (20)	8 (6.7)	28 (29.5)	31 (25)		
MPN	21 (6.3)	2 (1.7)	5 (5.3)	14 (11.3)		
Cytotoxic therapy	28 (8.4)	11 (9.6)	14 (14.7)	3 (2.4)		
Unknown	35 (10.5)	3 (2.6)	0 (0)	32 (25.8)		
Performance status-n (%)					0.452	0.622
0-1	165 (49.4)	73 (63.5)	63 (66.3)	29(23.4)		
2-4	61 (18.3)	19 (16.5)	25(26.3)	17(13.7)		
Unknown	108 (32.3)	23 (20)	7 (7.4)	78 (62.9)		
Infection at diagnosis-n (%)				NA	0.451	NA
Yes	37 (11.1)	15 (13.0)	22 (23.2)			
No	151 (45.2)	78 (67.8)	73 (76.8)			
Unknown	146 (43.7)	22 (19.1)	0 (0)			
WBC (G/L)					<0.001	<0.001
N	308	115	95	98		
Median (IQR)	4.25 (1.8-19.2)	9.5 (2.9-42.3)	2.3 (1.5-4.6)	5.3 (2-23)		
Range	0.3-433	0.4-433	0.8-62	0.3-215		
WBC ≥ 10 G/L-n (%)					<0.001	<0.001
Yes	110 (32.9)	56 (48.7)	14 (14.7)	40 (32.3)		
No	198 (59.3)	59 (51.3)	81 (85.3)	58 (46.8)		
Unknown	26 (7.8)	0 (0)	0 (0)	26 (21.0)		
Bone marrow blasts (%)					<0.001	0.044
N	323	109	94	120		
Median (IQR)	44 (28-72)	69 (40-86)	34.5 (24-52)	41 (28-64.5)		
Range	0-98	0-98	10-85	4-92		
Cytogenetics - n (%)					<0.001	1
Favorable	5(1.5)	4 (3.5)	0 (0)	1(0.8)		
Intermediate	176 (52.7)	90 (78.3)	46(48.4)	40(32.3)		
Unfavorable	95 (28.4)	20(17.4)	43(45.3)	32(25.8)		
Undetermined	58 (17.4)	0 (0)	6 (6.3)	51(41.1)		
Genotype –n (%)					0.002	1
-NPM1mut/FLT3wt	28 (8.4)	21 (18.3)	3 (3.1)	4 (3.2)		
-NPM1mut/FLT3-ITD	17 (5.1)	17 (14.8)	0 (0)	0 (0)		
-NPM1wt/FLT3-ITD	11 (3.3)	8 (7.0)	1 (1.1)	2 (1.6)		
-NPM1wt/FLT3wt	110 (32.9)	49 (42.6)	31 (32.6)	30 (24.2)		
-Undetermined	168 (50.3)	20 (17.4)	60 (63.2)	88 (71.0)		
Serum albumin (grams/L)				NA	0.470	NA
N	173	92	81			
Median (IQR)	39 (36-43)	39 (35-43)	40 (37-43)			
Range	20-49	26-48	20-49			
Serum albumin-n (%)				NA	0.123	NA
Normal*	144 (43.1)	72 (62.6)	72 (75.8)			
Low	29 (8.7)	20 (17.4)	9 (9.5)			
Unknown	161 (48.2)	23 (20)	14 (14.7)			

ICT: intensive chemotherapy, AZA: azacitidine, BSC: best supportive care, IQR: interquartile range, MDS: Myelodysplastic syndrome, MPN: Myeloproliferative neoplasm, NA: not available, WBC: white blood cell count, wt: wild type.
* according to laboratory standards.

Table II: Azacitidine cohort: dose exposure, modifications and associated treatments

	AZA N=95
Median time from diagnosis to treatment -days Median (IQR) Range	 28 (14-50) 1-234
Median no. of cycles Median (IQR) Range	 6 (3-17) (1-34)
No. of subjects who received ≥ 3 cycles - n (%)	73 (76.84)
No. of subjects who received ≥ 6 cycles - n (%)	55(57.9)
No. of subjects with dose modifications - n (%)	35(36.8)
SAE as reason for dose modification - n (%)	11(11.6)
Concomitant treatment with ESA only- n (%)	11(11.6)
Concomitant treatment with G-CSF only- n (%)	13(13.7)
Concomitant treatment with ESA and G-CSF- n (%)	15(15.8)

Table III: Response rates after intensive chemotherapy and azacitidine

	ICT N=115	AZA N=95	p value
Overall response (CR+CRi) –n (%)	78 (67.8)	18 (18.9)	<0.001
CR-n (%)	66 (57.4)	14 (14.7)	<0.001
CRi-n (%)	12 (10.4)	4 (4.2)	0.091
PR-n (%)	NA	6 (6.3)	
HI-n (%) -Overall -1 lineage -2 lineages -3 lineages	NA	 24(25.3) 10(10.5) 9(9.5) 5(5.3)	
Failure (following AML criteria*)	37 (32.2)	71 (74.7)	<0.001
Failure (following AML and MDS criteria**)	NA	47(49.4)	
Early deaths‡-n (%)	18 (15.7)	11 (11.6)	0.394
Early deaths causes –n(%) -AML progression -Infection -Cardiac event -Hemorrhage -Unknown	 4 (22.2) 6 (33.3) 2 (11.1) 1 (5.6) 5 (27.8)	 8 (72.7) 3 (27.3) 0 0 0	
AlloSCT-n (%)	10 (8.7)	2 (2.1)	0.041

ICT: intensive chemotherapy, AZA: azacitidine, CR: complete response, CRi: complete response with incomplete blood recovery, PR: partial response, HI: Hematological improvement, Failure encompasses death in aplasia and blastic failure (*patients without CR and CRi in ICT and without CR, CRi and PR in AZA; ** patients without CR, CRi, PR and HI), ‡ Early death within 2 months from diagnosis, NA: Not available, AlloSCT: allogeneic stem-cell transplantation.

Table IV: Prognosis factors for overall survival in patients treated by azacitidine

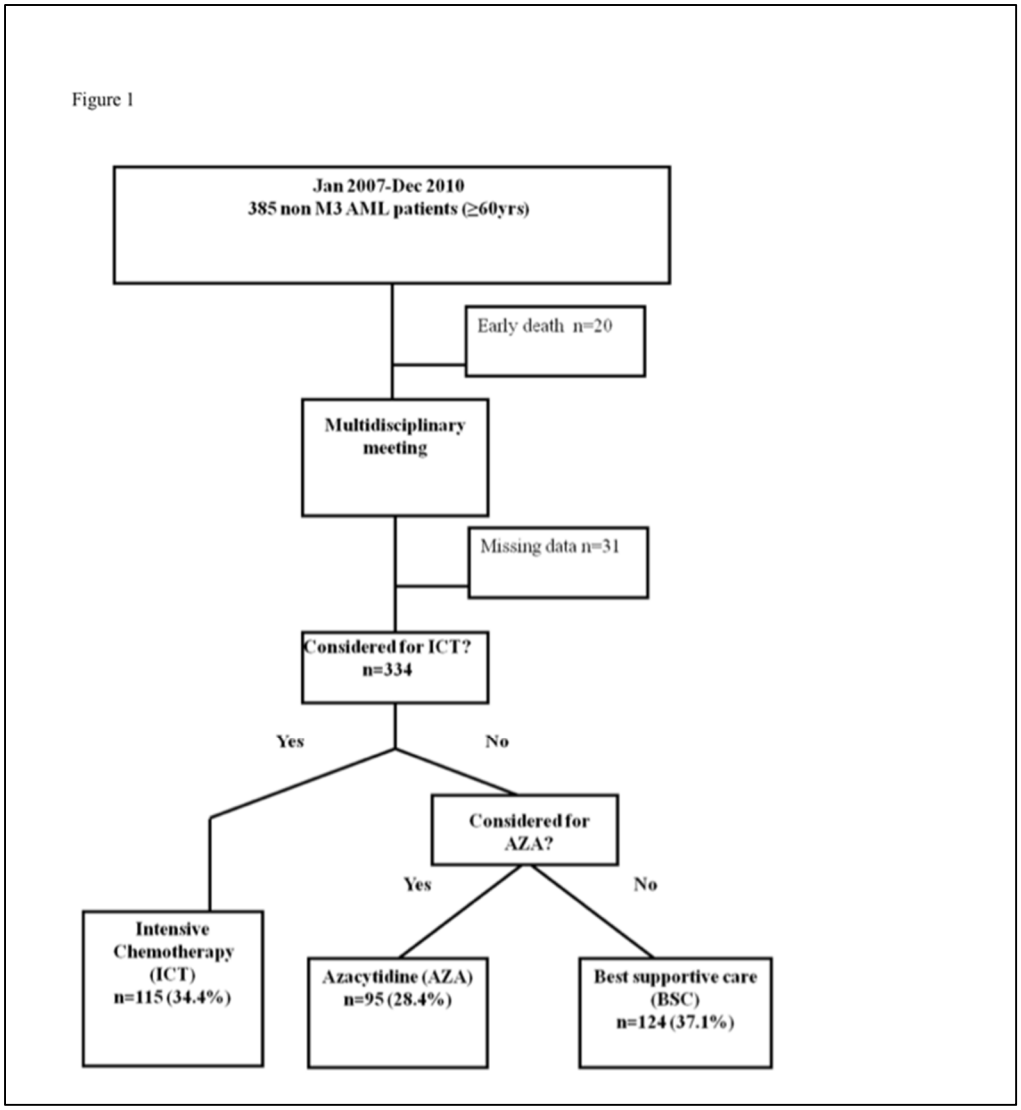
	Univariate analysis		**Multivariate analysis**		
	OS (months) Median [IQR] or HR [95% CI] for one unit increase (for continuous variable)	p-value*	HR	[95% CI]	p
Age (years) <80 ≥80	 15.1 [5.9; 33.4] 8.1 [2.8; 19.0]	0.047			
Age (years, continuous variable)	1.048 [1.009 ; 1.089]	0.016	1.054	[1.01 ; 1.10]	0.010
Performance status 0-1 2-4	 15.1 [6.5; 31.3] 7.4 [1.8; 20.9]	0.024			NS
Infection at diagnosis No Yes	 15.1 [6.5; 31.3] 8.0 [1.5; 17.1]	0.003			NS
White Blood Cell count ≤ 20 G/L > 20 G/L	 13.6 [5.2; 29.9] 6.7 [6.5; 10.3]	0.101			NS
Platelets count ≥ 50 G/L < 50 G/L	 18.5 [7.4; 34.6] 8.0 [2.2; 17.6]	0.002			NS
Bone marrow blasts % < 30% ≥ 30%	 19.0 [9.7; 31.3] 9.1 [5.2; 27.7]	0.179			NS
Lymphocytes count ≥ 0.5 G/L <0.5 G/L	 13.6 [6.7; 30.2] 2.9 [2.4; 5.2]	0.010	1 2.50	 [1.19 ; 5.26]	0.015
LDH (U/L) Normal** Raised	 19.0 [8.0; 31.3] 9.7 [2.8; 19.0]	0.0834			
LDH (U/L, Continuous variable)	1.0009 [1.0005 ; 1.0014]	<0.001	1.0007	[1.0002 ; 1.0012]	0.005
Cytogenetics Intermediate Unfavorable	 19.7 [10.9; 34.5] 6.7 [2.2; 13.6]	<0.001	1 2.55	. [1.44 ; 4.49]	0.001

* p-value for log-rank test (p-value for univariate Cox model if continuous variable). LDH: Lactate dehydrogenase concentration.

** according to laboratory standards.

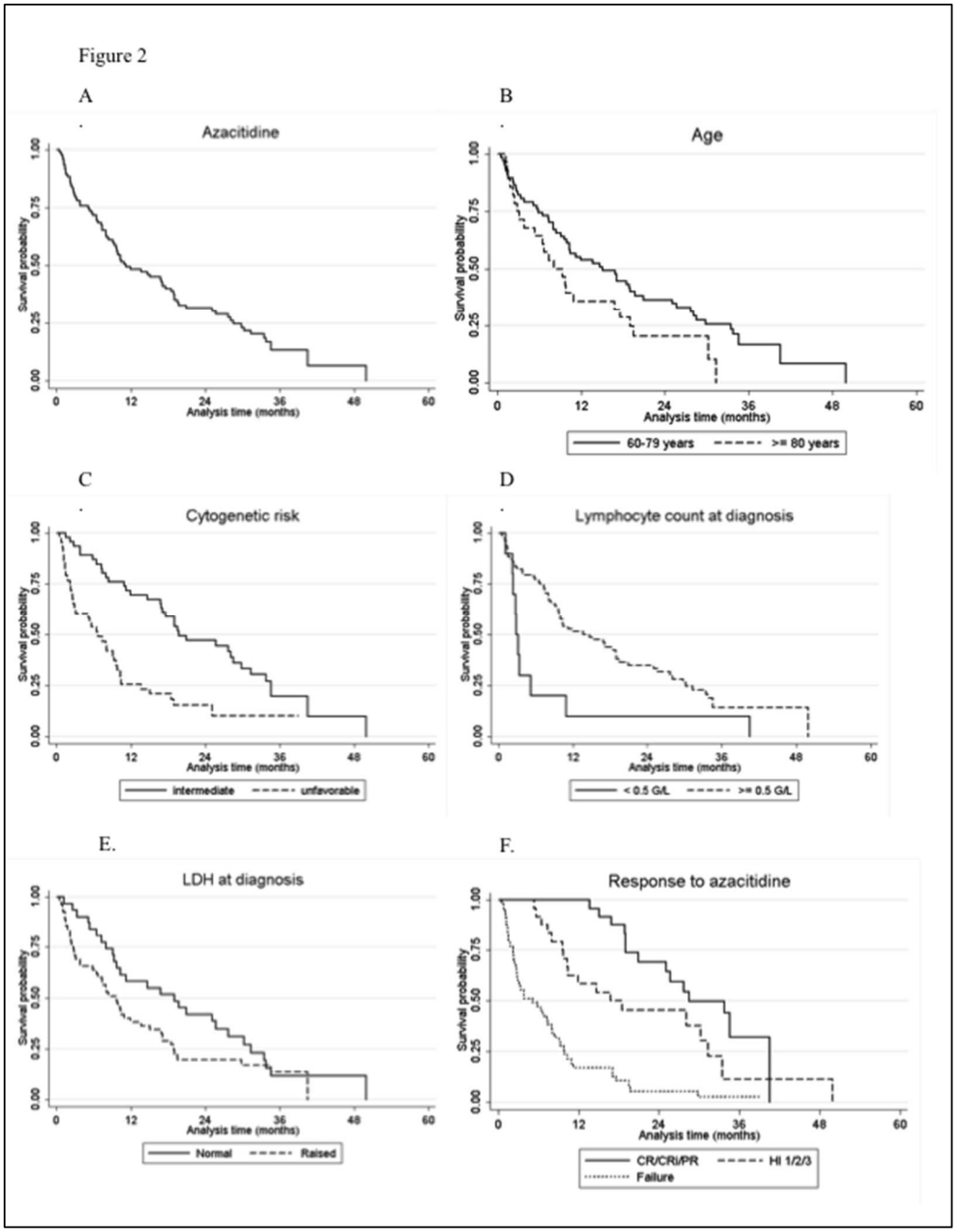
Figure legends

Figure 1: Flowchart of the AML population 60 years of age or older treated in the ONCOMIP Cancer Healthcare Network from January 2007 to December 2010.



This diagram includes all patients diagnosed with an untreated AML (≥ 60y) from Jan 1st 2007 to Dec 31st 2010 (n=385) within the ONCOMIP Oncology Network. Twenty patients died very quickly after diagnosis and did not have any therapeutic decision in the multidisciplinary meeting. We did not collect sufficient follow-up data for 31 additional patients who have had a therapeutic decision. In general, these patients are very old and treated outside the reference center. Thus, after excluding these 31 patients, 334 patients have been evaluated for the present study. Some patients (especially those with high WBC treated by ICT) were treated very quickly and subsequently registered in multidisciplinary meeting.

Figure 2: Overall survival in patients treated with azacitidine

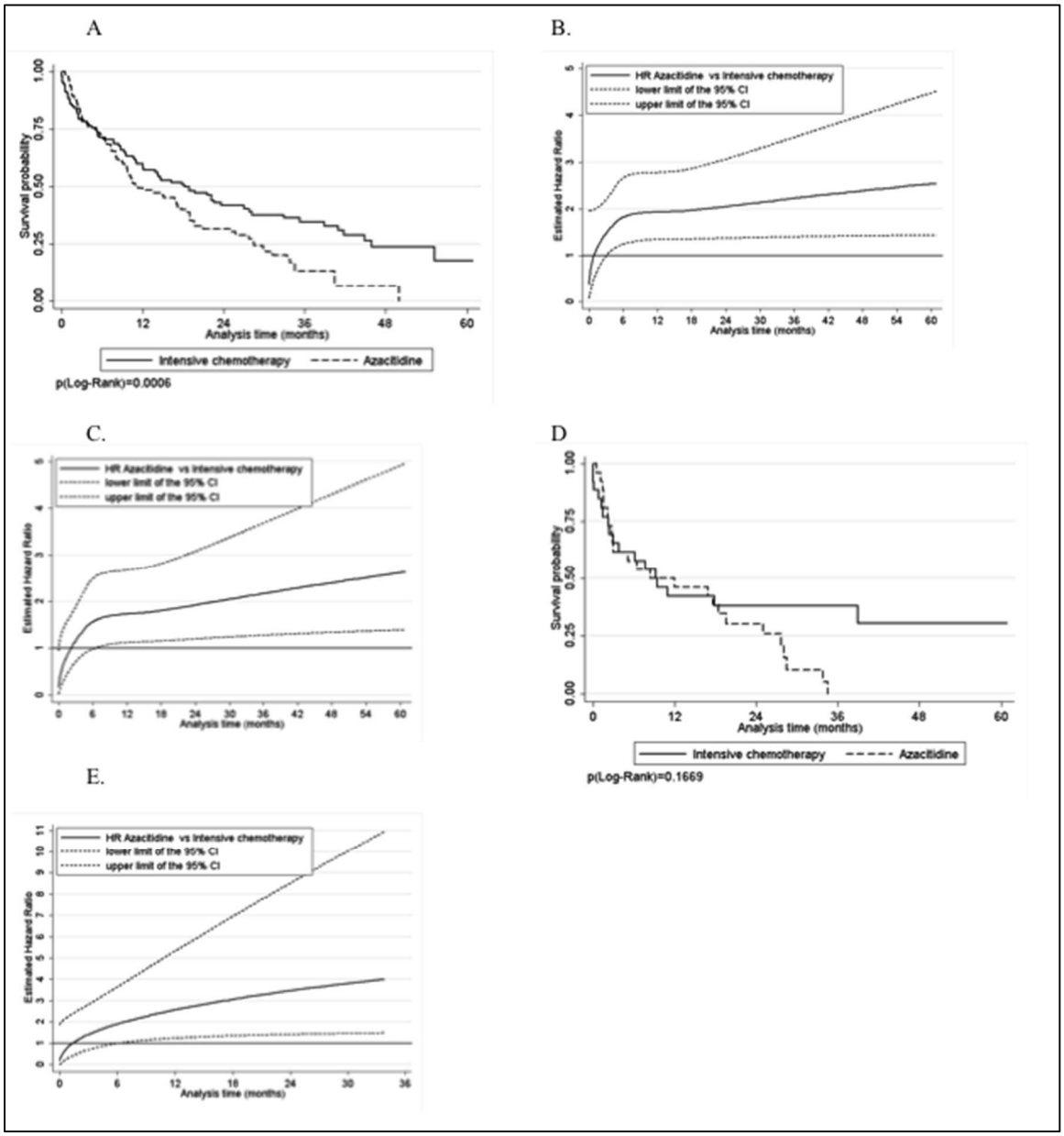


A. Overall survival (OS) of patients treated with azacitidine. **B.** OS according to age (< vs. ≥ 80 years). **C.** OS according to the cytogenetic risk (intermediate *vs.* unfavorable). D. OS according to lymphocyte count at diagnosis (<*vs.* ≥ 0.5G/L). E. OS according to LDH at diagnosis (Normal* vs. raised). F**.** OS according to the response to azacitidine.

* according to laboratory standards.

CR: complete response, CRi: complete response with incomplete blood recovery, PR: partial response, HI: Hematological improvement, Failure encompasses death in aplasia and blastic failure.

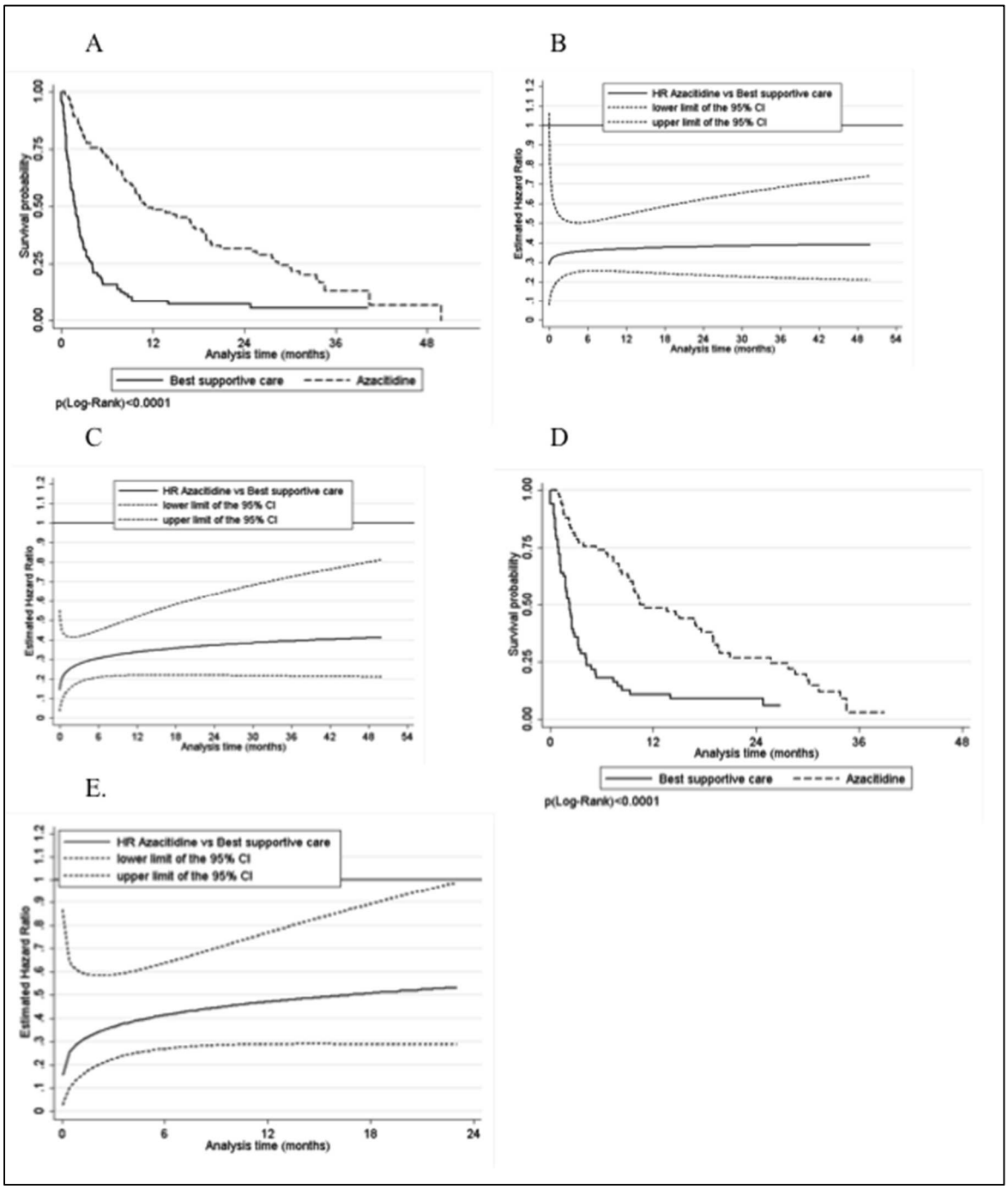
Figure 3: Overall survival in patients treated by azacitidine *versus* intensive chemotherapy.



A. Kaplan-Meier curve for OS in azacitidine (AZA) *vs.* intensive chemotherapy (ICT) groups. **B.** Royston and Parmar non-adjusted Hazard Ratio for OS in AZA *vs.* ICT for each month from diagnosis (n=210). From 3 months from diagnosis the non-adjusted OS is significantly better for ICT compared to AZA (HR:1.48; 95% Confidence Interval: 1.00-2.20 for AZA *vs.* ICT). **C.** Royston and Parmar adjusted* HR for OS in AZA *vs.* ICT for each month from diagnosis (n=210). From 6.5 months from diagnosis, adjusted OS is significantly better for ICT compared to AZA (HR=1.60; 95% CI: 1.01-2.54 for AZA *vs.* ICT). **Adjusted for age (HR:1.35; 95% CI: 0.92-1.98; p=0.122 for patients 70-79 years vs.<70; HR:2.53; 95% CI: 1.43-4.49; p=0.001 for patients ≥ 80 years vs. <70), cytogenetics (HR:1.85, 95% CI: 1.03-3.34, p=0.041 for unfavorable vs. favorable), and serum albumin (HR:1.65, 95% CI: 1.02-2.67, p=0.040 for low vs. normal).* **D.** Kaplan-Meier curve for OS in AZA *vs.* ICT groups in propensity score matched patients (n=52). **E.** Royston and Parmar HR for OS in AZA *vs.* ICT for each month from

diagnosis in propensity score matched patients (n=52). From 6 months from diagnosis, OS is significantly better for ICT compared to AZA (HR: 1.93; 95% CI: 1.01-3.70 for AZA *versus* ICT). The graph was limited to patients with time from diagnosis lower than 34 months because the small number of deaths with time from diagnosis ≥ 34 months (n=2/41) conducted to an unstable evaluation of the treatment effect beyond 34 months.

Figure 4: Overall survival in patients treated by azacitidine *versus* best supportive care.



A. Kaplan-Meier curve for OS in azacitidine (AZA) *vs.* best supportive care (BSC) groups. **B.** Royston and Parmar non-adjusted Hazard Ratio for OS in AZA *vs.* BSC for each month from diagnosis (n=219). The non-adjusted OS is significantly better for AZA compared to BSC from 2 days from diagnosis (HR: 0.30; 95% Confidence Interval: 0.09-0.93 for AZA *vs.* BSC). **C.** Royston and Parmar adjusted* HR for

OS in AZA *vs.* BSC for each month from diagnosis (n=219). Adjusted OS is significantly better for AZA compared to BSC from 1 day from diagnosis (HR: 0.15; 95% CI: 0.04-0.55 for AZA *vs.* BSC).

Adjusted for WBC count (HR: 1.87; 95% CI: 1.20-2.89,p=0.005 for WBC count ≥ 20 G/L vs. <20 G/L), platelets count (HR: 0.65, 95% CI: 0.46-0.90, p=0.010 for platelets count ≥ 50 G/L vs. <50 G/L), lymphocyte count (HR: 0.38; 95% CI: 0.23-0.63, p<0.001 for lymphocyte count ≥0.5 G/L vs. <0.5G/L) and cytogenetics (HR: 1.85; 95% CI: 1.30-2.64, p=0.001 for unfavorable vs. intermediate).* **D. Kaplan-Meier curve for OS in AZA *vs.* BSC groups in propensity score matched patients (n=132). **E.** Royston and Parmar HR for OS in AZA *vs.* BSC for each month from diagnosis in propensity score matched patients (n=132). From 1 day from diagnosis, OS is significantly better for AZA compared to BSC (HR: 0.16; 95% CI: 0.03-0.87 for AZA *vs.* BSC). The graph was limited to subjects with time from diagnosis lower than 24 months because the small number of deaths with time from diagnosis ≥ 24 months (n=10/112) conducted to an unstable evaluation of the treatment effect beyond 24

Article 2: Physician uncertainty aversion impacts medical decision making for older patients with acute myeloid leukemia: results of a national survey

Bories P, Lamy S, Simand C, Bertoli S, Delpierre C, Malak S, Fornecker L, Moreau S, Récher C, Nebout A.

Haematologica. 2018 Jul 13 [epub ahead of print]

Dans le cadre des LAM du sujet âgé le choix thérapeutique entre une chimiothérapie intensive et un traitement de faible intensité repose sur les caractéristiques de la LAM et du patient. Bien qu'il existe quelques scores permettant de rationaliser ce choix, leur précision est imparfaite et une importante hétérogénéité de pratique est connue. Les études évaluant les variations de pratiques se focalisent généralement sur les déterminants liés au patient et son hémopathie et très peu sur les déterminants liés au médecin. En science comportementale, l'attitude vis-à-vis du risque et de l'incertitude sont des traits psychologiques cruciaux dont il a été prouvé qu'ils influençaient le comportement médical. Ces traits sont reliés à des modèles théoriques de prise de décision en situation d'incertitude.

Nous avons conduit une étude nationale sous l'égide de la commission éthique de la société Française d'Hématologie évaluant l'impact des caractéristiques comportementales du praticien sur sa prise de décision vis-à-vis de cas cliniques complexes mais représentatifs de la vie réelle. Cette étude s'appuyait sur un questionnaire en ligne comportant 6 vignettes cliniques de LAM du sujet âgé et 4 outils explorant les attitudes des praticiens, validés en sciences comportementales.

A partir des 230 réponses évaluables obtenues, un modèle multivarié a démontré que les praticiens averses à l'incertitude et les praticiens de sexe masculin ne se conformant pas au modèle normatif de prise de décision en économie comportementale, recommandaient significativement plus souvent une chimiothérapie intensive. Parmi les caractéristiques professionnelles, seul le volume annuel de patients âgés atteints de LAM pris en charge par praticien était inversement corrélé à l'intensité du traitement.

Cette étude expérimentale démontre qu'en situation d'incertitude, les attitudes des praticiens peuvent avoir un impact sur le devenir des patients âgés atteints de LAM, ce qui constitue une justification supplémentaire pour la description de biomarqueurs prédictifs du devenir de ces patients.

Physician uncertainty aversion impacts medical decision making for older patients with acute myeloid leukemia: results of a national survey

Pierre Bories,[1,2] Sébastien Lamy,[3-4] Célestine Simand,[5] Sarah Bertoli[2], Cyrille Delpierre,[3] Sandra Malak,[6] Luc Fornecker,[5] Stéphane Moreau,[7] Christian Récher,[2] Antoine Nebout[8]

[1]Regional Cancer Network Onco-occitanie, Toulouse University Institute of Cancer-Oncopole, Toulouse, France

[2]Department of Hematology, Toulouse University Institute of Cancer-Oncopole, Toulouse, France

[3]INSERM Unit 1027, Faculty of Medicine, Toulouse, France

[4]Department of Clinical Pharmacology, Toulouse University Hospital, Toulouse, France

[5]Department of Hematology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

[6]Department of Hematology of the Rene Huguenin Hospital, Curie Institute, Saint-Cloud, France

[7]Department of Hematology, Limoges University Hospital, Limoges, France

[8]INRA, UR 1303 ALISS, Ivry-sur-Seine, France

Corresponding author : Dr. Pierre Bories, Regional Cancer Network Onco Occitanie, Toulouse University Institute of Cancer-Oncopole, 1 Avenue Irène Joliot Curie 31059 Toulouse Cedex 9, FRANCE; phone: +33531156514; fax: +33531156523; email : pierre.bories@onco-occitanie.fr

Abstract word count: 299
Manuscript word count: 3209
Number of figures: 3
Number of tables: 3
Number of supplementary file: 1
Running title: Dealing with treatment uncertainty in elderly AML patients

ABSTRACT

Elderly patients with acute myeloid leukemia can be treated with intensive chemotherapy, low-intensity therapy such as low-dose aracytine or hypomethylating agents, or best supportive care. The choice between these treatments is a function of many patient-related and physician-related factors. We investigated how physicians' behavioral characteristics affect medical decision-making between intensive and non-intensive therapy in this setting. A nationwide cross-sectional online survey of hematologists collected data on medical decision-making for six clinical vignettes involving older acute myeloid leukemia patients that were representative of routine practice. Questionnaires elicited physicians' demographic and occupational characteristics along with their individual behavioral characteristics according to decision theory framework. From the pattern of responses to the vignettes, a K-means clustering algorithm was used to distinguish those who were likely to prescribe more intensive therapy and those who were likely to prescribe less intensive or no therapy. Multivariate analyses were used to identify physician characteristics predictive of medical decision-making. We obtained 230 assessable answers, which represented an adjusted response rate of 45.4%. A multivariate model (n=210) revealed that uncertainty averse physicians recommend significantly more intensive chemotherapy (OR [95% CI] = 1.15 [1.01;1.30], p=0.039), and that male physicians who do not conform to the expected utility model (assumed as economically irrational) recommend more intensive chemotherapy (OR [95% CI] = 3.45 [1.34; 8.85], p=0.01). Patient volume per physician also correlated with therapy intensity (OR [95% CI] = 0.98 [0.96; 0.99], p=0.032). The physicians' medical decision-making was not affected by their age, years of experience, or hospital facility. The significant association between medical decision and individual behavioral characteristics of the physician identifies a novel non-biological factor that may affect acute myeloid leukemia patient's outcomes and explain practice variations. It should also encourage the use of validated predictive models and the description of novel biomarkers to best select patients for intensive chemotherapy or low-intensity therapy.

INTRODUCTION

Outside clinical trials, therapy options offered to elderly acute myeloid leukemia (AML) patients are limited[1,2]. They can be summarized as intensive chemotherapy (IC), low-intensity therapy (LIT) or best supportive care (BSC) depending on patient-specific[3] and AML-related[4] prognosis factors. Although scoring systems have been proposed to rationalize the medical decision-making (MDM) between intensive and non-intensive approaches[5,6], large variations in clinical practice remain[7], which underlines the paucity of evidence supporting medical decisions. International guidelines define available intensive or low-intensity options, but in most cases they give the physician the responsibility of determining which option should be recommended for a particular patient. The AZA-AML-001[8] and DACO 16[9] phase III studies failed to demonstrate the superiority of hypomethylating agents (azacitidine and decitabine, respectively) over intensive chemotherapy for patients over 65 years with non-proliferative AML, which increases the uncertainty regarding the optimum strategy for any individual patient. In the AZA-AML-001 trial, only 18% of patients were allocated to AZA vs IC as compared to 82% to AZA vs low-dose aracytine (LDAC) or BSC suggesting that physicians' decisions were already biased toward LIT. Additionally, when physician-investigators in the United Kingdom National Cancer Research Institute's AML-14 trial[10,11] were offered the possibility of an optional randomization between intensive and non-intensive therapy, they preferred to bypass this randomization and allocate their patients directly into the intensive or non-intensive arms. Multivariate comparison of the characteristics of the patients treated intensively or non-intensively in this AML trial revealed that the physician was a strong determinant of the choice, which clearly demonstrates a physician effect in this setting. Previous studies have investigated the impact of physician professional characteristics on their decision-making for hematological malignancies, particularly in the setting of allogeneic stem cell transplantation[12,13], but these studies mostly focused on age, specialty, hospital facility. Much less attention has been given to an individual physician's non-professional characteristics.

Uncertainty is a crucial, multifaceted component of the therapeutic decision for older patients with AML[14]. Intensive chemotherapy offers the greatest chance of complete remission (CR) but is associated with a significant risk of early death (ED), while hypomethylating agents yield lower chance of CR but

lower risk of ED. Thus, for physicians treating an older AML patient, uncertainty is a precondition for the decision itself, which underscores the need to investigate how physicians deal with it[15,16].

In behavioral economics and decision sciences, attitudes towards risk and uncertainty are crucial psychological traits that may explain medical choices and practices[17,18]. They aim to describe individual decisions in situations where choices have uncertain consequences. Risk- or uncertainty-averse individuals prefers a safer option (with greater chances of a smaller gain) than risk- or uncertainty-seeking individuals who will choose a riskier option (with lower chances of a larger gain). The difference between risk and uncertainty is that, for an uncertain option, the probability of success (or gain) is unknown. In economics, the gold standard of rationality is the expected utility model[19] (EU) although many experimental evidences in behavioral sciences shows departures from EU[20]. The Allais paradoxes[21,22] are decision tasks used to classify individuals as conforming to EU or not (non-EU). The most popular non-EU model is prospect theory[23]. Investigating the association between practice variations in AML therapy and physician behavioral characteristics (such as risk or uncertainty aversion) and types (EU versus non–EU) may help define new determinants of these variations and to propose corrective measures to improve the quality of care[24,25]. We hypothesized that individual physician's attitudes towards risk and uncertainty have an impact on their decision-making process for elderly patients with AML.

METHODS

Survey Design

We conducted a national cross-sectional online survey of French hematologists to evaluate the impact of demographic, occupational and behavioral characteristics on medical decision making for selected clinical cases of older patients with AML presented as clinical vignettes. As compared with other tools such as chart abstraction or standardized patients, clinical vignettes have been validated as a simple case-mix adjusted method for measuring quality of care and practice variations[26].

All the hematologist-oncologists practicing in France who provide direct patient care for adults with AML were eligible. A first draft of the questionnaire was developed and subsequently modified after

pilot testing with 20 hematologists. Overall the survey contained 27 questions and took 10–15 minutes to complete. The questionnaire is available in supplementary file section I.

Survey Instrument

Physician demographic and occupational characteristics encompass age, gender, medical specialty, subspecialty, hospital facility, hierarchical position, year of graduation, patient volume (number of AML patients aged 60 years or older each physician treated annually), and self-evaluation of expertise in the field of AML.

Four hypothetical AML patients 60 years of age or older were selected as representative of clinical practice and summarized by three local specialists (P.B., S.B. and C.R.) as vignettes #1 to #4 (Table 1). Each of these cases highlighted distinct and difficult representative situations regarding their age, comorbidity, family environment or AML biology. Vignettes #5 and #6 were similar to vignette #4 but included a unique variation related to age (increased from 63 to 73-years old in vignette #5) or WBC count (increased from 2.5 to 40 G/L in vignette #6). For each of these six vignettes, the close-ended treatment options were: (1) intensive chemotherapy, (2) low-intensity therapy, or (3) best supportive care.

To measure physician attitudes towards risk and uncertainty, we used four different elicitation methods (Figure 1) that have been validated in national representative surveys[27]. The first two measures are certainty equivalent elicitation and the third one consisted of two binary lottery choices. These tasks involve risky choices with monetary consequences. The fourth method is a Likert scale that measures willingness to take risks in four different domains (supplementary file, section II).

Survey Implementation

The Ethics committee of the French Society of Hematology approved the study and provided an incentive email accompanying the online survey invitation. Physicians identified from the French Society of Hematology mailing list received a unique link to enter the survey or opt out. After duplicate names were removed, the panel of potentially eligible subjects contained 1337 physicians, including 220 residents with an email address. On November 30, 2015, we emailed the survey link; non-responders

received three subsequent reminders every 8 weeks. Before entering the survey, physicians were informed they would not be compensated for their participation. Consent was implied based on reading the survey goals and participating. Assessable respondents included those who answered the six vignettes. Data were collected from November 30, 2015 to June 6, 2016 and analyzed at the Toulouse University Cancer Institute, and Toulouse Faculty of Medicine.

Statistical Analysis

We described physician characteristics using counts and frequency for qualitative data, and mean and standard deviation for quantitative data.

To assess the clinician pattern of decision-making for the six clinical vignettes, we used K-means clustering to define clinician groups with homogeneous patterns of responses to the clinical cases[28]. The aim of this method was to define clusters of subjects by maximizing the between-cluster differences in the subjects' medical choices and by minimizing the within-cluster differences in subjects' medical choices. This allowed us to define two clusters: clinician more likely to choose IC, i.e. the "intensive treatment group" (IC group), and those who were more likely to choose less intensive therapy, i.e. the "non-intensive treatment group" (Non-IC group). Only the K-means analyses are presented in this paper. A 6–18 point MDM-score was also calculated for each physician, assigning 1 point for IC, 2 points for LIT and 3 points for BSC from the responses in the six vignettes. The results of this score and its association with the K-means clustering are given in supplementary table S3. We first tested the physicians' demographic, occupational and behavioral characteristics associated with belonging to the IC group in bivariate analyses at the threshold of 0.2. These variables were then included in a multivariate model systematically adjusted for age and gender. From this step, the variables to keep in the final parsimonious model were determined using a stepwise backward selection based on log-likelihood tests between nested models. All analyses were done by using STATA release 14 (Stata Corp LP, College Station, TX, USA).

RESULTS

Of the 1,337 invitations sent out to complete the questionnaire, 1295 were eligible and 230 completed questionnaires were received (response rate: 17.20%). According to American Association of Public Opinion Reporting standard definitions and by taking the characteristics of the mailing list and the interrogated population into account, the adjusted response rate was 45.4% (see supplementary file, section III). No differences were found by gender or by geographical area between respondents and non-respondents (See supplementary table S2).

Respondents' demographic and occupational characteristics

The median age of the respondent cohort was 42 years [standard deviation (SD) ± 11.2], 123 were male (54%), 160 were attending physicians or professors (70%), 166 worked in an academic center (72%), 197 were specialized in hematology (86%), and the mean patient volume per physician was 20.7 (SD ± 17.1).

Medical decision making among clinical vignettes

The physicians' decisions about the six clinical vignettes assessing frontline therapy for older AML patient are summarized in Figure 2. The most controversial case was vignette #4 for which 50.8% of respondents recommended IC versus 49.2% opting for a non-intensive approach. Increasing the age of this patient in vignette #5 resulted in a marked decrease (from 50.8% to 6.9%) in the proportion of respondents choosing IC. Alternatively, increasing the WBC in vignette #6 increased the proportion of physicians who recommended an IC from 50.8% to 64.7%. These practice variations induced by modifying classical AML prognosis factors were expected, thus provide internal quality control of non-random responses to the online survey (internal coherence criteria).

Aversion towards risk and uncertainty

The mean certainty equivalent under risk was 277 Euros (SD ± 130). This was significantly different from the expected value of the lottery (250 Euros), revealing global risk-seeking among our sample

(unpaired t-test, p=0.03). Under uncertainty conditions, the mean certainty equivalent was 241 Euros (SD ± 136). This was significantly lower than under risk (paired t-test, p<0,001) and reveals an overall ambiguity aversion among our sample. More specifically, of the 212 respondents, 110 are ambiguity averse, 52 are ambiguity neutral and 50 are ambiguity seeking. Regarding the Allais paradox, the AC, BD, AD and BC choice patterns were found in 90 (42.9%), 11 (5.2%), 102 (48.6%), and 7 (3.3%) assessable subjects, respectively, which represents 101 EU respondents (48.1%) and 109 non-EU respondents (51.9%). Mean self-reported willingness to take risks is 4.1 (SD ± 2.4) in the financial domain, 5.1 (SD ± 2.1) in their personal life, 5.3 (SD ± 2.1) for a patient's health and 5.7 (SD ± 2.1) for their own health.

K-means clustering identifies two populations of physicians

From the pattern of responses to the six clinical vignettes, the K-means clustering (see Supplementary file, section IV for details) allowed us to separate two groups of physicians: one group of clinicians with lower MDM-scores, i.e. more likely to choose intensive therapy (IC group), and another group of clinicians with higher MDM-scores, i.e. more likely to choose non-intensive therapy (Non-IC group).

IC-physicians harbor specific behavioral characteristics compared with non-IC-physicians

A bivariate comparison of the characteristics of physicians in the IC and Non-IC groups is summarized in Table 2. We detected significantly more aversion toward uncertainty within the IC cluster (mean certainty equivalents of 228 Euros for the Non-IC group vs 276 Euros for the IC group, p=0.031) (Table 2). For the Allais paradox, we detected a trend toward significance (p=0.086) with more EU subjects in the Non-IC group (57%) than in the IC group (44%). Among the demographical and occupational characteristics, only the patient volume was associated with these clusters with a mean number of older AML patients treated annually of 19.1 in the IC group versus 24.5 in the non-IC group (p=0.03). Although we found more male and risk-averse physicians in the IC group, these differences were not significant (p=0.06 and p=0.131, respectively).

The logistic regression of the IC vs non-IC groups, on individual characteristics that were significant with a p-value < 0.20 in the bivariate analysis, is presented in Table 3. This analysis confirmed that

aversion towards uncertainty increases the probability of belonging to the IC group (OR [95% CI] =1.17 [1.01;1.37], p=0.043) and that higher patient volume increases the probability of being in the non-IC group (OR [95% CI] =0.98 [0.96;0.99], p=0.032). We found an interaction between gender and the Allais paradox resulting in a statistically significant increase in the probability of being pro IC among men who do not conform to the Expected Utility model (OR [95% CI] =3.45 [1.34;8.85], p=0.01), but such effect was not found among women.

DISCUSSION

In this cross-sectional national survey, we evaluated the impact of physicians' behavioral characteristics on their medical decision-making in older patients with AML. We hypothesized that physicians' behavioral traits such as risk and uncertainty aversion or rationality could be correlated with their choice between intensive and less-intensive therapy. To our knowledge, this is the first piece of evidence that physicians belonging to the uncertainty-tolerant group recommend IC significantly less often than uncertainty-averse physicians, and that male physicians considered as "economically irrational" prescribe more IC.

Several non-biological factors (NBF) are known to be associated with a patient's health-related outcomes such as socioeconomic status (SES), area of residence or marital status[29,30]. In the spectrum of NBFs affecting cancer patient outcomes, physician characteristics have been described as therapy determinants in the setting of allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies[12] and solid tumors[31]. In our study, neither age, hierarchical status or years of experience influenced the tendency of physicians to belong to the IC or Non-IC group, while individual uncertainty aversion was a strong determinant of practice variations in multivariate analysis. Volume-outcome relationships at treatment facility level[32,33] and at physician level[34] are well described NBF affecting the outcome of patient with cancer. It is notable that our study gets behind the volume-outcome relationship in AML, while connecting physician's patient volume with medical decision making and more precisely with therapy intensity.

Verma et al[35] stated that physicians should learn about the individual behavioral mechanisms underpinning choices under uncertainty. Our findings go one step further and show that a behavioral

characteristic such as uncertainty aversion is directly correlated with the clinician's therapeutic choice. We evaluated physician behavioral characteristics with tools validated in behavioral economics. Although such tasks may be incentivized (paid for real) in experimental economics, we decided to use hypothetical incentives following Kahneman and Tversky (1979) who claimed that: "the method of hypothetical choices emerges as the simplest procedure by which a large number of theoretical questions can be investigated. The use of the method relies on the assumption that people often know how they would behave in actual situations of choice, and on the further assumption that the subjects have no special reason to disguise their true preferences". Concerns have been raised about the correlation between a clinician's medical behavior and their uncertainty aversion as measured by economical tools in a non-domain-specific manner[36]. Our study confirms, as previously reported[17,18], that economic behavior and its underlying psychological traits can predict medical behavior. Our cohort was globally risk-seeking and ambiguity-averse; 109 (51.9%) of the physicians did not conform with the EU model, which is in line with evidence in behavioral economics[37,38]. Mean self-reported willingness to take risks was consistent with previous results but higher for the patient's health domain[39]. This finding may be explained by the toxicity related to the intensive therapy that physicians are used to prescribe. We detected an interaction between physician's gender and the Allais paradox, with an impact of departures from of the EU model on decision-making, in male physicians. Gender effect for risk and uncertainty attitudes is a well-established stylized fact in behavioral economics[40,41], albeit the impact of the interaction between gender and Allais paradox on MDM has, to our knowledge, never been documented empirically.

Although our findings provide novel insights into the clinical debate pitting intensive vs low-intensity approaches for older patients with AML, we acknowledge that our study has limitations. The respondent panel was representative of the surveyed French hematologist population in terms of gender, hierarchical status and geographical area. Respondents more often belonged to academic centers than surveyed physicians, which can be explained by the French healthcare system's organization for AML patients being usually oriented towards academic centers. Physicians were asked to recommend how to treat AML patient in an experimental framework. We deliberately proposed clinical situation where patients had announced they would accept medical decisions, and patient choices did not appear in the vignettes.

Since informed decision-making has emerged as the new normative standard for health care[42], concerns about the increase of complexity provided by this mode of decision making have been raised[43]. To encompass this increase of complexity and presumably of uncertainty, physicians were asked to state which therapy they would ideally recommend, irrespective of the patient's choice. We also evaluated individual clinician choices, whereas multidisciplinary team (MDT) decision-making is currently the standard of care in cancer. Even though a treatment plan devised by an MDT may differ from that of a single physician, it is noteworthy that the MDT constitutes an area of exchange between healthcare professionals where they may clearly state which treatment they consider to be appropriate in any clinical situation. Another limitation is the construction of the clinical vignettes. We focused the proposed treatments on intensive, low-intensity therapy and best supportive care, and did not propose any investigational drug or therapeutic strategy through clinical trial enrollment. We anticipated this would have swayed the physicians' answers in favor of trial participation. Even though clinical trial enrollment remains an ideal scenario for all AML patients, real-life data provided by the Netherland registry show that only a small number of patients above the age of 60 years could benefit from such innovative strategy[44]. We did not provide any potentially druggable molecular markers such as *FLT3-*^{ITD}, *NPM1* or *IDH1/2* in the clinical scenarios, because to date, a large proportion of French centers do not have access to these markers at the time of frontline therapeutic decision-making. The increasing use of next generation sequencing (NGS) technologies in AML will soon provide the identification of molecular markers in almost all patients, which will have various consequence. For patients with an actionable molecular marker[45], or with accurate genomics-based outcome prediction[46], NGS technologies will presumably reduce treatment uncertainty. Alternatively, for patient with a non-actionable marker or markers with unknown prognostic significance, NGS will likely add another level of uncertainty. Even though the MDM process cannot be restricted to a computational process, novel methods such as decision-making tools supported by knowledge banks of matched genomic-clinical data[47] are warranted. They will help physicians absorb large amounts of complex information and likely act as moderators of uncertainty. Pending the validation of such tools in daily practice, our study—which found a strong physician-effect on treatment decisions—should encourage the use of validated

prognostic scores to rationalize the decision-making process in this setting48. It should also encourage further exploration of the role of physician attitudes in decision-making.

Acknowledgment Section

We would like to thank the members of the Ethics Comity of the French Society of Hematology for their support

Contributions: PB, SB, CR and AN participated in the study design, SL, CS, SMa, LF and SM reviewed the design of the study, PB, CS and AN collected the data, PB, SL and AN performed statistical analysis, PB and AN wrote the manuscript, SL, CS, SB, SMa, LF, SMo, and CR reviewed the manuscript

Disclosure of potential conflicts of interest: PB, SL, CS, SB, CD, SMa, LF, SMo and AN have nothing to disclose. CR has received research funding from Celgene, Novartis and served as consultant for Novartis, Celgene

References

1. Döhner 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.
2. Bories P, Bertoli S, Bérard E, et al. Intensive chemotherapy, azacitidine, or supportive care in older acute myeloid leukemia patients: an analysis from a regional healthcare network. Am J Hematol. 2014;89(12):E244-252.
3. Klepin HD, Rao AV, Pardee TS. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older adults. J Clin Oncol. 2014;32(24):2541–2552.
4. Tsai C-H, Hou H-A, Tang J-L, et al. Genetic alterations and their clinical implications in older patients with acute myeloid leukemia. Leukemia. 2016;30(7):1485–1492.
5. Krug U, Röllig C, Koschmieder A, et al. Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: a web-based application for prediction of outcomes. Lancet. 2010;376(9757):2000–2008.
6. Klepin HD, Geiger AM, Tooze JA, et al. Geriatric assessment predicts survival for older adults receiving induction chemotherapy for acute myelogenous leukemia. Blood. 2013;121(21):4287–4294.
7. Loberiza FR, Cannon AC, Cannon AJ, Bierman PJ. Insights on practice variations in the management of lymphoma and leukemia. Leuk Lymphoma. 2014;55(11):2449–2456.
8. Dombret H, Seymour JF, Butrym A, et al. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. Blood. 2015;126(3):291–299.
9. Kantarjian HM, Thomas XG, Dmoszynska A, et al. Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either

supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2012;30(21):2670–2677.
10. Burnett AK, Milligan D, Goldstone A, et al. The impact of dose escalation and resistance modulation in older patients with acute myeloid leukaemia and high risk myelodysplastic syndrome: the results of the LRF AML14 trial. Br J Haematol. 2009;145(3):318–332.
11. Burnett AK, Milligan D, Prentice AG, et al. A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment. Cancer. 2007;109(6):1114–1124.
12. Lee SJ, Joffe S, Artz AS, et al. Individual physician practice variation in hematopoietic cell transplantation. J Clin Oncol. 2008;26(13):2162–2170.
13. Lee SJ, Astigarraga CC, Eapen M, et al. Variation in supportive care practices in hematopoietic cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2008;14(11):1231–1238.
14. Dhawale T, Steuten LM, Deeg HJ. Uncertainty of Physicians and Patients in Medical Decision Making. Biol Blood Marrow Transplant. 2017;23(6):865–869.
15. Hunter DJ. Uncertainty in the Era of Precision Medicine. N Engl J Med. 2016;375(8):711–713.
16. Simpkin AL, Schwartzstein RM. Tolerating Uncertainty - The Next Medical Revolution? N Engl J Med. 2016;375(18):1713–1715.
17. Michel-Lepage A, Ventelou B, Nebout A, Verger P, Pulcini C. Cross-sectional survey: risk-averse French GPs use more rapid-antigen diagnostic tests in tonsillitis in children. BMJ Open. 2013;3(10):e003540.
18. Massin S, Ventelou B, Nebout A, Verger P, Pulcini C. Cross-sectional survey: risk-averse French general practitioners are more favorable toward influenza vaccination. Vaccine. 2015;33(5):610–614.
19. von Neumann J, Morgenstern O. Theory of Games and Economic Behavior. Princeton, N J: Princeton University Press; 1947. 625 p.
20. Starmer C. Developments in Non-expected Utility Theory: The Hunt for a Descriptive Theory of Choice under Risk. J Econ Lit. 2000;38(2):332–382.
21. Kahneman D, Tversky A. Prospect Theory: An Analysis of Decision under Risk. Econometrica. 1979;47(2):263–291.
22. Allais M. Le Comportement de l'Homme Rationnel devant le Risque: Critique des Postulats et Axiomes de l'Ecole Americaine. Econometrica. 1953;21(4):503–546.
23. Wakker PP. Prospect Theory: For Risk and Ambiguity. 1st ed. Cambridge University Press; 2010. 518 p.
24. Lipitz-Snyderman A, Sima CS, Atoria CL, et al. Physician-Driven Variation in Nonrecommended Services Among Older Adults Diagnosed With Cancer. JAMA Intern Med. 2016;176(10):1541–1548.
25. Sikkens JJ, van Agtmael MA, Peters EJG, et al. Behavioral Approach to Appropriate Antimicrobial Prescribing in Hospitals: The Dutch Unique Method for Antimicrobial Stewardship (DUMAS) Participatory Intervention Study. JAMA Intern Med. 2017;177(8):1130–1138.
26. Peabody JW, Luck J, Glassman P, Dresselhaus TR, Lee M. Comparison of vignettes, standardized patients, and chart abstraction: a prospective validation study of 3 methods for measuring quality. JAMA. 2000;283(13):1715–1722.
27. Dohmen T, Falk A, Huffman D, Sunde U, Schupp J, Wagner GG. Individual risk attitudes: Measurement, determinants, and behavioral consequences. J Eur Econ Assoc. 2011;9(3):522–550.
28. Selim SZ, Ismail MA. K-means-type algorithms: a generalized convergence theorem and characterization of local optimality. IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell. 1984;6(1):81–87.

29. Kristinsson SY, Derolf AR, Edgren G, Dickman PW, Björkholm M. Socioeconomic differences in patient survival are increasing for acute myeloid leukemia and multiple myeloma in sweden. J Clin Oncol. 2009;27(12):2073–2080.
30. Borate UM, Mineishi S, Costa LJ. Nonbiological factors affecting survival in younger patients with acute myeloid leukemia. Cancer. 2015;121(21):3877–3884.
31. Luo R, Giordano SH, Zhang DD, Freeman J, Goodwin JS. The role of the surgeon in whether patients with lymph node-positive colon cancer see a medical oncologist. Cancer. 2007;109(5):975–982.
32. Giri S, Pathak R, Aryal MR, Karmacharya P, Bhatt VR, Martin MG. Impact of hospital volume on outcomes of patients undergoing chemotherapy for acute myeloid leukemia: a matched cohort study. Blood. 2015;125(21):3359–3360.
33. Go RS, Bartley AC, Crowson CS, et al. Association Between Treatment Facility Volume and Mortality of Patients With Multiple Myeloma. J Clin Oncol. 2017;35(6):598–604.
34. Hillner BE, Smith TJ, Desch CE. Hospital and physician volume or specialization and outcomes in cancer treatment: importance in quality of cancer care. J Clin Oncol. 2000;18(11):2327–2340.
35. Verma AA, Razak F, Detsky AS. Understanding choice: why physicians should learn prospect theory. JAMA. 2014;311(6):571–572.
36. Han PKJ, Reeve BB, Moser RP, Klein WMP. Aversion to ambiguity regarding medical tests and treatments: measurement, prevalence, and relationship to sociodemographic factors. J Health Commun. 2009;14(6):556–572.
37. Nebout A, Dubois D. When Allais meets Ulysses: Dynamic axioms and the common ratio effect. J Risk Uncertain. 2014;48(1):19–49.
38. Trautmann ST, van de Kuilen G. Ambiguity Attitudes. In: The Wiley Blackwell Handbook of Judgment and Decision Making. Ltd, Chichester, UK: G. Keren and G. Wu; p.
39. Nebout A, Cavillon M, Ventelou B. Comparing GPs' risk attitudes for their own health and for their patients' : a troubling discrepancy? BMC Health Serv Res. 2018;18(1):283.
40. Eckel CC, Grossman PJ. Chapter 113 Men, Women and Risk Aversion: Experimental Evidence. In: Handbook of Experimental Economics Results. Elsevier; p1061–1073.
41. Croson R, Gneezy U. Gender Differences in Preferences. J Econ Lit. 2009;47(2):448–474.
42. Gattellari M, Voigt KJ, Butow PN, Tattersall MHN. When the treatment goal is not cure: are cancer patients equipped to make informed decisions? J Clin Oncol. 2002;20(2):503–513.
43. Han PKJ, Klein WMP, Lehman T, Killam B, Massett H, Freedman AN. Communication of uncertainty regarding individualized cancer risk estimates: effects and influential factors. Med Decis Mak Int J Soc Med Decis Mak. 2011;31(2):354–366.
44. Dinmohamed AG, Visser O, van Norden Y, et al. Treatment, trial participation and survival in adult acute myeloid leukemia: a population-based study in the Netherlands, 1989-2012. Leukemia. 2016;30(1):24–31.
45. Medeiros BC, Fathi AT, DiNardo CD, Pollyea DA, Chan SM, Swords R. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. Leukemia. 2017;31(2):272–281.
46. Welch JS, Petti AA, Miller CA, et al. TP53 and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. N Engl J Med. 2016;375(21):2023–2036.
47. 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.
48. Sorror ML, Storer BE, Fathi AT, et al. Development and Validation of a Novel Acute Myeloid Leukemia-Composite Model to Estimate Risks of Mortality. JAMA Oncol. 2017;3(12):1675–1682.

Table 1 : Clinical Vignettes of older AML patients derived from real life activity

General instructions:

- Six clinical cases of AML patients derived from real life activity are presented.
- **You are not alone to decide but we are asking you to state which treatment option would you recommend for each of this patients among:**
    1. **Intensive chemotherapy**
    2. **Low-intensity therapy (hypomethylating agent or low-dose cytarabine)**
    3. **Best supportive care**
- These patients have announced they would accept medical treatment decision
- You do not have any clinical trial to offer them.
- You have unlimited possibilities of hospitalization as inpatient or outpatient

Vignette#1: A 72-year-old female, with no comorbidity. Normal cardiac function. Untreated low-risk myelodysplastic syndrome for 3 years (refractory anemia, IPSS 0.5).
CBC: WBC 1G/L incl. neutrophils count 0.3G/L and PB count 5%, Hgb 110g/L, Platelet count 120G/L
BMA: FAB1 AML with 40 % marrow blast infiltrate, and adverse karyotype (monosomy 7).

Vignette#2: A 75-year-old male, coronary artery disease with anterior interventricular artery stenting in 2010, controlled ischemic cardiopathy with medication (LVEF 52%), ECOG 2, recent weight loss 4kg
CBC: WBC count 75 G/L, PB blast count 40%, Hgb 100 g/L, platelet count 50G/L
BMA: FAB2 AML (marrow blast infiltrate 60%) with normal karyotype

Vignette#3: A 77-year-old female, with an 8-year history of hypertension controlled with angiotensin-converting-enzyme inhibitor, a recent echocardiogram showed a LVEF of 55%
She is natural helper of her husband affected by Alzheimer's disease.
CBC: WBC 18G/L incl. 25% peripheral blast, Hgb 100g/L, platelet count 80 G/L,
BMA: FAB4 AML with favorable karyotype (inv16)

Vignette#4: A 63-year-old-male, with a 5-year-history of asymptomatic Parkinson disease and recently diagnosed with an asymptomatic carotid artery stenosis (90%).
CBC: WBC 2G/L incl. 5% PB blast count, Hgb 80g/L, Platelet 35 G/L
BMA: FAB2 AML (marrow blast infiltrate 30%, tri-lineage dysplasia) with complex Karyotype incl. inv3, -5q, -7

Vignette#5: Patient from the Vignette#4 but **73-year-old**

Vignette#6: Patient from the Vignette#4 but **with WBC count 40 g/L incl. PB blast count of 25%**

Foot note: IPSS: International prognosis scoring system, CBC: Complete Blood Count, WBC: white blood cell count, BMA: Bone marrow aspirate, PB peripheral blast, LVEF: Left Ventricular Ejection Fraction, ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group Performans Status

Table 2: Panel Description (n=230), and Bivariate Comparison of the Physicians from IC and non-IC Groups

		overall sample		non-IC group		IC group		global p-value of the bivariate analysis of the characteristics related with belonging to IC group [a]
		n	%	n	%	n	%	
demographical characteristics								
gender	men	123	53	31	*44*	92	*57*	*0.064*
	women	107	47	39	*56*	68	*43*	
age (n=230) (mean± SD)		42.0 ±11.2		42.3 ±11.1		41.8 ±11.3		*0.792*
occupational characteristics								
clinical speciality	other than hematology	64	*28*	18	*26*	46	*29*	*0.636*
	hematology	166	*72*	52	*74*	114	*71*	
workplace	non-academic centers	64	*28*	18	*26*	46	*29*	*0.636*
	academic centers	166	*72*	52	*74*	114	*71*	
region	North	34	*15*	6	*9*	28	*18*	*0.227*
	East	38	*17*	8	*11*	30	*19*	
	West	30	*13*	11	*16*	19	*12*	
	South-west	45	*20*	13	*19*	32	*20*	
	South Méditerranée	27	*12*	9	*13*	18	*11*	
	Rhone-Alpes/Auvergne	24	*10*	9	*13*	15	*9*	
	Ile de France	32	*14*	14	*20*	18	*11*	
status	few or no decision-making role	70	*30*	23	*33*	47	*29*	*0.597*
	decision-making role	160	*70*	47	*67*	113	*71*	
occupational experience (n=210) (means ± SD)		16.9 ±10.9		17.3 ±10.8		16.8 ±11		*0.772*
activity in AML pts≥60y, a year (n=210) (means ± SD)		20.7 ±17.1		24.5 ±18.5		19.1 ±16.2		*0.034*
behavioral characteristics								
attitude towards uncertainty (n=213) (means ± SD)		242 ±136		276 ±149		228 ±127		*0.031*[b]
attitude towards risks (n=212) (means ± SD)		277 ±130		296 ±150		269 ±120		*0.131*[b]
expected utility	yes (n=101)	101	*48*	36	*57*	65	*44*	*0.086*
	no (n=109)	109	*52*	27	*43*	82	*56*	
general attitude towards the risk (means ± SD)	regarding their personal life (n=221)	5.1 ± 2.1		4.8 ± 2.1		5.2 ± 2.1		*0.194*
	regarding their money (n=220)	4.1 ± 2.4		4.1 ± 2.6		4.2 ± 2.3		*0.922*
	regarding their patients' health (n=220)	5.3 ± 2.1		5.2 ± 2.4		5.3 ± 2.0		*0.630*
	regarding their own health (n=219)	5.7 ± 2.1		5.5 ± 2.2		5.8 ± 2.0		*0.243*
responses to the vignettes								
MDM score (mean ± SD)		10.2±1.6		11.7 ±*1.4*		9.6 ±*1.3*		*<0.001*

Footnote: Student a or Wilcoxon b tests for continuous variables; Chi2 test for categorial variables, MDM: medical decision-making

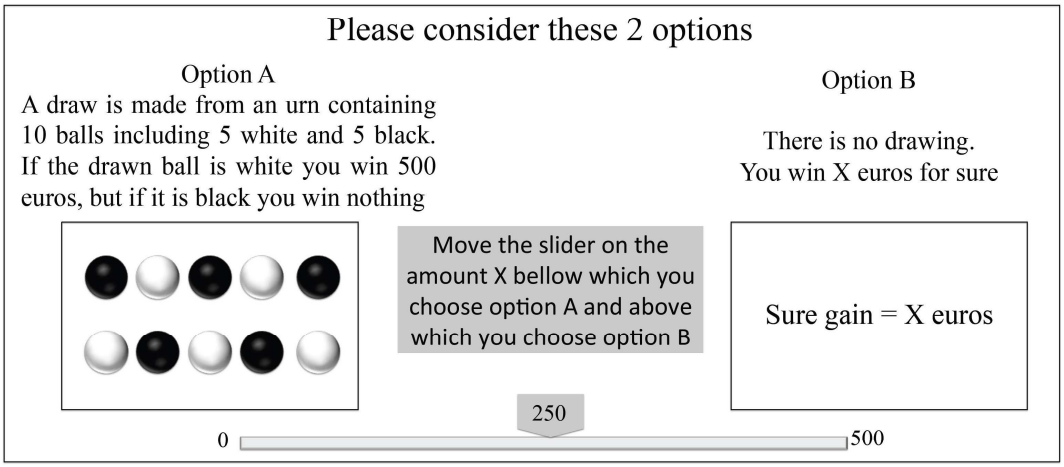
Table 3: Characteristics Associated with Belonging to the IC group. Results from the Multivariate Logistic Regression among the 210 Clinicians for who Complete data of Variable Selected Based on the Bivariate Analysis*

		OR	[95% Confidence Interval]		*p-value*
Age (per additional year)		1.00	[0.97 ;	1.03]	0.757
Aversion towards risks		1.00	[0.99 ;	1.01]	0.875
Aversion towards uncertainty (for each 50euros-decrease)		1.17	[1.01 ;	1.37]	0.043
General attitude towards the risk regarding personal life		1.10	[0.95 ;	1.29]	0.208
Activity in AML pts≥60y, per year		0.98	[0.96 ;	0.99]	0.032
Gender among rational	men	ref.			
	women	0.93	[0.39 ;	2.20]	0.865
Expected utility among men	yes	ref.			
	no	3.45	[1.34 ;	8.85]	0.010
Interaction term = difference between irrational effect among women and men		0.253	[0.07 ;	0.91]	0.035

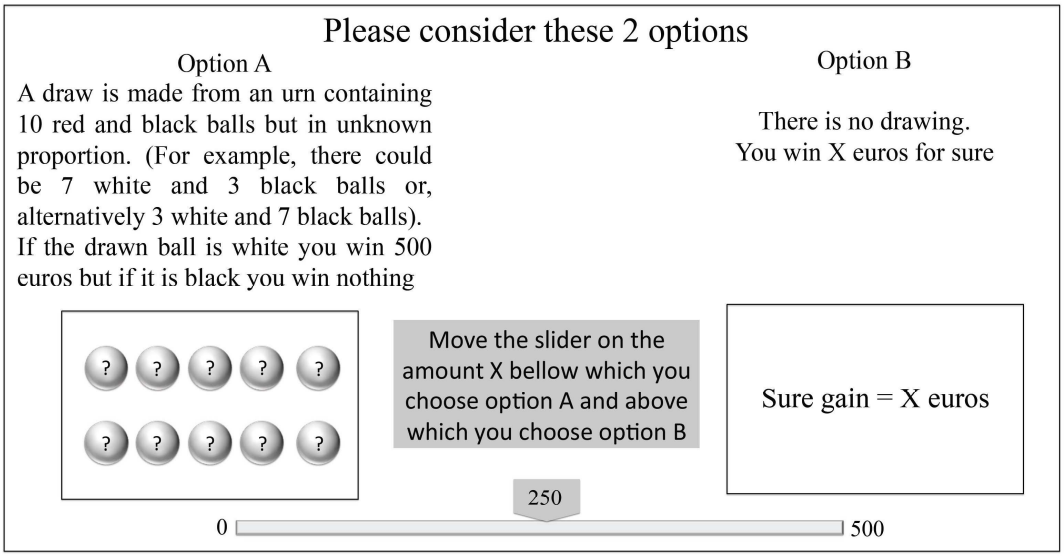
*This is the results of the parsimonious model constructed from a backward-stepwise-procedure (see the method section for details) which was initially additionally adjusted for clinicians' general attitude regarding their own health and aversion towards risks

Figure 1: Behavioral Tasks

A



B



C

In the next two questions we are asking you to make choices between two options. There is no wrong answer. You just have to choose as if you were really facing these choice tasks

- **Choice 1 Which option do you prefer?**
  - Option A gives you 100% of chance to win 2000 euros
  - Option B gives you 80% of chance to win 3000 euros and 20% of chance to win 0 euro
- **Choice 2 Which option do you prefer?**
  - Option C gives you 25% of chance to win 2000 euros and 75% of chance to win 0 euro
  - Option D gives you 20% of chance to win 3000 euros and 80% of chance to win 0 euro

D

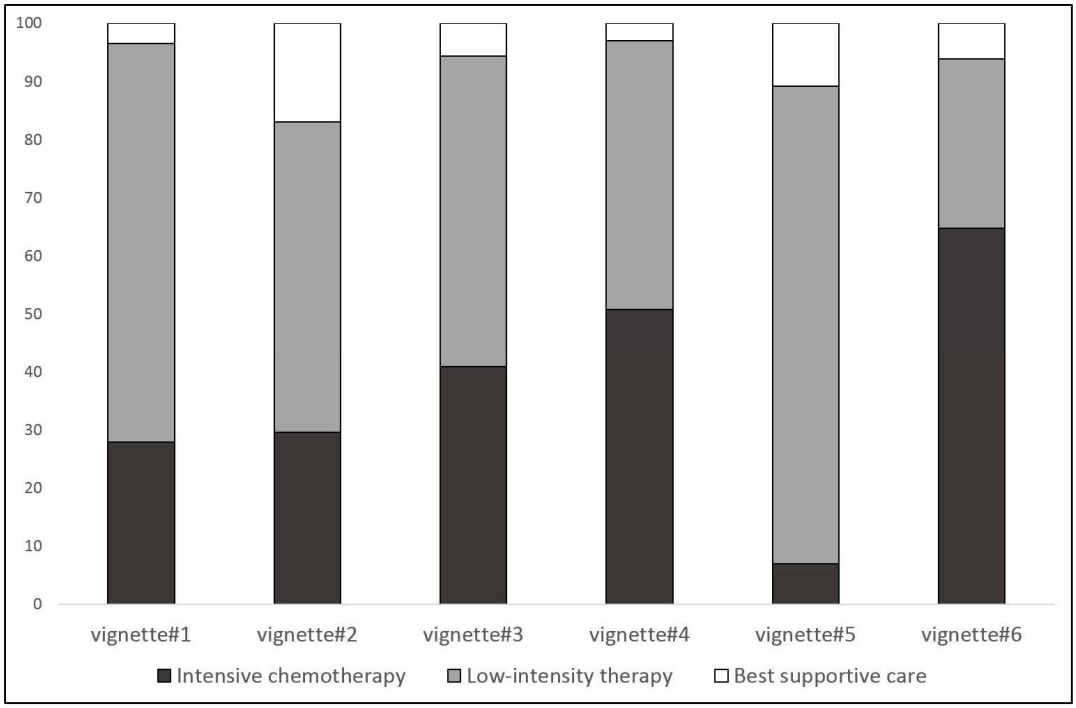
In this question you have to self-estimate your willingness to take risk in different domains:
(0 being « not at all willing to take risk and » 10 « fully-prepared to take risk »)

- **In your daily life:** □0 □1 □2 □3 □4 □5 □6 □7 □8 □9 □10
- **For your personal finances:** □0 □1 □2 □3 □4 □5 □6 □7 □8 □9 □10
- **For your patients' health:** □0 □1 □2 □3 □4 □5 □6 □7 □8 □9 □10
- **For your own health:** □0 □1 □2 □3 □4 □5 □6 □7 □8 □9 □10

A. Physician individual risk aversion evaluation. The closer the scroll bar is to 500 Euros the more risk-seeking the behavior, and the lower the score bar, the greater the aversion to risk. If,

for example, the scroll bar is at 200 Euros this means someone prefers a 50% chance of winning 500 Euros to a 100% chance of winning 190 Euros, while if the scroll bar is at 300 Euros this means someone prefers a 50% chance of winning 500 Euros to a 100% chance of winning 290 Euros. The latter is riskier since you are giving up more certain money (290 vs190) for a chance to win the same amount (500). B. Physician individual uncertainty aversion evaluation. The same line of reasoning applies to the uncertainty aversion evaluation except that for option A, the probability of gain is unknown. The closer the scroll bar is to 500 Euros the more uncertainty-seeking the behavior, and the lower the scroll bar, the greater the aversion to uncertainty. C. Classic binary choices from Kahneman and Tversky. Choice patterns AC and BD conform with the expected utility theory. Choice patterns AD and BC do not conform to expected utility theory (for further details see supplementary file section 2). D. Self-evaluation of the willingness to take risk in four different domains.

Figure2: Medical Decision Making among the Six Clinical Vignettes



This figure presents the proportion of physicians choosing intensive chemotherapy, low-intensity therapy or best supportive care for each of the 6 clinical vignettes

Article 3*: TP53* mutations negatively impact survival of acute myeloid leukemia patients treated with standard doses of azacitidine

Manuscrit en cours de soumission - Leukemia

Les anomalies de *TP53* constituent un évènement oncogénique majeur, observé chez près de 50% des patients atteints de cancer. Dans les LAM, si cette anomalie est relativement rare chez les adultes jeunes, leur incidence augmente considérablement avec l'âge en particulier chez les patients présentant un caryotype complexe ou une LAM reliée à un traitement génotoxique. L'impact pronostique des altérations de *TP53* est défavorable dans la grande majorité des cancers et des hémopathies où elles sont observées. Dans les SMD et les LAM, elles correspondent à un facteur de risque péjoratif puissant et indépendant pour la réponse et la survie des patients traités par chimiothérapie conventionnelle et/ou allogreffe de moelle. Une étude récente menée par l'Université de Washington sur une cohorte de 116 patients âgés traités par un schéma intensifié de decitabine pour un SMD ou une LAM a décrit un impact pronostique positif des mutations de *TP53* sur l'obtention d'une réponse. L'impact des mutations de *TP53* n'a jamais été évalué dans le contexte des LAM traitées par azacitidine seul. Sur le plan fonctionnel, les mutations de *TP53* sont hétérogènes avec des mutations « perte de fonction » ou « gain de fonction » et plusieurs classifications pronostiques se basant sur cet impact ont été validées en cancérologie solide mais aucune n'a été testée dans le contexte des LAM.

A partir du séquençage d'une cohorte de 224 patients dont 55 (24,6%) avaient une mutation de *TP53*, nous montrons l'absence d'impact des mutations de *TP53* sur l'obtention de la réponse à l'azacitidine mais un impact négatif sur la survie globale, indépendant en analyse multivariée. L'analyse des caractéristiques fonctionnelles de ces mutations se basant sur 3 classifications pronostiques récentes n'a pas permis d'identifier un groupe de patients qui auraient un meilleur devenir sous azacitidine. L'utilisation des mutations de *TP53* comme marqueur prédictif du devenir sous azacitidine est incertaine. Néanmoins leur caractérisation fonctionnelle bien que non-concluante sur nos données dans le contexte de l'azacitidine devra être reproduite sur des cohortes de patients traités par chimiothérapie intensive et dans le contexte des nouvelles thérapies ciblant p53 et MDM2, pour tenter d'identifier un sous-groupe de patients *TP53*mut qui bénéficieraient d'une approche personnalisée.

TP53 mutations negatively impact survival of acute myeloid leukemia patients treated with standard doses of azacitidine

Pierre Bories[1,2,3], Naïs Prade[1], Stéphanie Lagarde[1], B. Cabarrou[4], Julien Plenecassagnes[5], Isabelle Luquet[1], Véronique De Mas[1], T. Filleron[4], M. Cassou[5], Audrey Sarry[2], L. Fornecker[6], C. Simand[6], Sarah Bertoli[2], Hinrich Gronemeyer[7], Christian Recher[2], Eric Delabesse[1]

1. Laboratory of Haematology, Toulouse University Institute of Cancer-Oncopole, Centre of Research on Cancer of Toulouse (CRCT), Toulouse, France,
2. Department of Hematology, Toulouse University Institute of Cancer-Oncopole, Toulouse, France,
3. Onco-Occitanie regional cancer network, Toulouse University Institute of Cancer-Oncopole, Toulouse, France,
4. Biostatistic Unit, Institut Claudius Regaud, Toulouse University Institute of Cancer-Oncopole, Toulouse, France,
5. Bioinformatics Unit, Institut Claudius Regaud, Toulouse University Institute of Cancer-Oncopole, Toulouse, France,
6. Department of Hematology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France,
7. Unité Génomique fonctionnelle et cancer, Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, Illkirch-Graffenstaden, France.

Corresponding author: Professor Eric Delabesse, Laboratory of Haematology, Toulouse University Institute of Cancer-Oncopôle, CHU de Toulouse, 1 avenue Irène Joliot-Curie, Toulouse cedex 9 31059 France; email: delabesse.eric@iuct-oncopole.fr

Abstract word count: 181

Manuscript word count: 2650

Number of tables: 5

Number of figures: 2

Number of supplementary files: 2

Running title: *TP53* mutants in AML patients treated by azacitidine

Key words
Elderly AML, Hypomethylating Agent, TP53, Biomarker, phenotype-genotype relationship

ABSTRACT

Azacitidine has become a classical frontline low-intensity therapy for older patients with acute myeloid leukemia, but patient selection between intensive and low-intensity therapy still remains controversial. In patients treated with decitabine, mutations of *TP53* have been described as a potential predictive biomarker of improved outcome, although functional characteristics of p53 mutant are heterogeneous, as reflected in multiple functional p53 classifications. We analyzed the therapeutic course and outcome of 279 patients treated with azacitidine between 2007 and 2016. By screening 224 of them, we detected *TP53* mutations in 55 patients (24.6%), including 53 patients (96.4%) harboring high-risk cytogenetics. The identification of any *TP53* mutation was associated with worse overall survival but not with response to azacitidine in the whole cohort and in the subgroup of patients with adverse karyotype. Stratification of patients relying on three recent validated functional classifications did not allowed to distinguish *TP53* mutated acute myeloid leukemia patients who most benefit from azacitidine. Systematic p53 mutant classification will deserve further exploration in the setting of patient treated with conventional therapy and in the emerging field of therapies targeted p53 pathway.

INTRODUCTION

Older patients with acute myeloid leukemia (AML) harbor dismal prognosis despite improvement in their overall survival (OS) over the last decade[1,2]. Validated therapeutic options are currently limited[3,4]. Inter-physician practice variations are frequent, that rely on the uncertainty of the optimal strategy for elderly AML patient[5]. Patient selection for intensive chemotherapy remains controversial[6,7].

Azacitidine compared to intensive chemotherapy (IC) for patients older than 65 years with non-proliferative AML failed to demonstrate its superiority in the AZA-AML-001 [8] although several studies have found that patients with myelodysplastic syndrome (MDS) or AML with adverse-risk cytogenetics (CG) treated with hypomethylating agents (HMA) may obtain similar or even higher response rates than patients with intermediate-risk CG[9–11], suggesting a different mechanism of action, presumably

linked to the increased frequency of *TP53* mutations in adverse risk CG (up to 50-70% in complex karyotype[12–14]).

Alteration of p53 function is a well-known negative prognostic factor for MDS and AML patients treated with conventional chemotherapy[12,15] and allogeneic stem cell transplantation[16–18], and it has also been associated with poor OS for patients with MDS treated with azacitidine[19]. In preclinical studies, primary fibroblastic and neoplastic cells deficient for *TP53* exhibit hypersensitivity to decitabine treatment compared to wild type cells, through apoptotic response[20,21], illustrating the previously described concept of sensitization to apoptosis by the absence of *TP53*[22,23] and extending this concept to HMA. A recent single-institution trial has described a protective effect of *TP53* mutations in AML patients treated frontline with an intensified regimen of decitabine[24]. However, only 21 patients (18%) harboring a *TP53* mutation were included in this trial, rendering critical a confirmation of these interesting results.

Although mutations in *TP53* have traditionally been considered functionally equivalent leading to a lack of function due the loss of the DNA-binding domain or mediated by a dominant-negative effect on the remaining functional wild-type allele, recently, some TP53 mutants were shown to display a gain of function (GOF) independent of wild-type TP53 (*TP53*^{wt}) function*25*. Several classifications of *TP53* mutants have been proposed with a correlation to the patient outcome in solid tumors and diffuse large B cell lymphoma[26–28]. Their clinical usefulness has never been questioned in AML patients, although it might be highly important in the context of novel therapy targeting TP53 and/or MDM2.

We took advantage of our prospective regional AML registry previously extensively analyzed [1,4,29] to investigate the impact of *TP53* mutations in a very large cohort of AML patients treated frontline with azacitidine. We further assessed the usefulness of *TP53* mutation classifications as a biomarker with the aim to eventually identify a sub-group of patients with *TP53* mutations who might specifically benefit from azacitidine.

PATIENTS AND METHODS

Regional cancer network ONCOMIP registry

AML patients (excluding M3) treated frontline with azacitidine were enrolled in the regional cancer network ONCOMIP registry between 2007 and 2016[1,4,29]. Patient's bone marrow samples were obtained following standard ethical procedures (Helsinki principles), after informed written consent, and stored at the HIMIP collection. According to the French law, the HIMIP collection was declared to the Ministry of Higher Education and Research (DC 2008-307 collection 1). Cytogenetic risk was assessed according to the MRC classification[30].

TP53 next generation sequencing

Genomic DNA (gDNA) was extracted from baseline bone marrow sample using a Qiagen DNA extraction kit (Qiagen). *TP53* status was derived from exome sequencing for 49 patients or using a Next Generation Sequencing multiplex PCR for the 179 patients.

Exome capture was performed using Sureselect All-Exome V4 kit (Agilent). Exome libraries were then sequenced using a NextSeq500 sequencer (Illumina) and a SureSelect QXT Reagent kit (paired-end, 150bp, sequencing 2 x 150 cycles).

TP53 Next Generation Sequencing was performed using a multiplex *TP53* PCR covering the complete coding sequences of exons 4 to 10 (primers listed in supplementary Table 1). TP53 libraries were then sequenced using a Miseq Reagent kit V2(paired-end, 150bp, sequencing 2 x 150 cycles) and MiSeq sequencer (Illumina).

Alignment and variant calling were performed using NextGene software (SoftGenetics). *TP53* variants with a variant allele frequency (VAF) higher than 10%, were filtered using the *TP53* International Agency for Research on Cancer R18 database released in April 2016 (IARC) (http://www-p53.iarc.fr/)[31].

TP53 mutation classifications

Each *TP53* mutation was classified using 3 different classifications. For patients with more than one *TP53* mutation, we selected the mutation with the predicted highest impact[32].

(1) **Disruption classification**. This classification is based on the consequences of the TP53 mutation on protein folding, segregating disruptive versus non-disruptive mutations. This clustering was validated

as a prognosis factor for overall survival of head and neck carcinoma patients by Poeta *et al.*[26]. It relies on the location of the mutation and the predicted amino acid alterations. Disruptive mutations are composed of (i) stop codons in any region or (ii) non-conservative mutations (i.e. change of category of the mutated amino-acid [non-polar as F, M, W, I, V, L, A and P; polar non charged as C, N, Q, T, Y, S and G; polar negatively charged as D and E and polar positively charged as H, K and R]) inside the key DNA-binding domains (L2–L3 region, corresponding to codons 163 to 195 and 236 to 251). All other mutations are classified as non-disruptive.

(2) **Evolutionary Action TP53 Score classification**. Computational approach with the calculation of an evolutionary action score summarizing the phenotype to genotype relationship for each *TP53* missense mutation reliably stratified patients with head and neck cancers or metastatic colon cancers harboring *TP53* mutations as high or low risk[27,33]. The score was calculated for each *TP53* missense mutation identified in our cohort[27] *(http://mammoth.bcm.tmc.edu/EAp53)*. A threshold of 75 derived from the work of Neskey *et al*. was used to separate high risk from low risk *TP53* mutations.

(3) **Relative fitness score (RFS) classification**. Kotler *et al.* used a massively parallel proliferation assay deciphering the sequence to structure and function relationship of *TP53* mutations in human cells, leading to the establishment of a comprehensive catalogue of 9,833 unique *TP53* DNA-binding domain variants (DBD, corresponding to amino-acids 102 to 292) with their functions evaluated in human cells *in vitro* and *in vivo*[34] giving a relative fitness score for each of these *TP53* mutant.

Statistical analyses

The analysis date for the clinical evaluation of the database was June 1, 2017. Clinical response was assessed using ELN criteria[3] after 3 and 6 cycles of azacitidine as indicated. For patient who failed to achieve at least partial clinical remission, we also assessed hematological improvement using the MDS IWG 2006 response criteria[35]. Baseline characteristics were compared between patients with or without *TP53* mutation by non-parametric tests (Fisher exact test for qualitative variables, Wilcoxon rank-sum test for quantitative variables). Censored endpoints were estimated using the non-parametric Kaplan-Meier method. Overall survival (OS) was defined as the time between diagnosis

date and death or last contact. Univariate analyses for OS were performed using log-rank test and Cox model for dichotomic and continuous variables, respectively. Variables identified from these 2 univariate analyses were included in a multivariate logistic regression for OS, performed by a Cox model, after accounting for interactions. Statistical analysis was performed on STATA version.

RESULTS

Azacitidine AML ONCOMIP regional registry

From January 1st 2007 to December 31st 2016, the regional cancer network ONCOMIP registry enrolled 279 AML treated frontline with AZA. Patients received a median of 6 cycles of Azacitidine (range: 1 to 67) with a median follow-up of 58 months. Median age was 76 years (range: 45 to 93). AML was secondary to a previous myeloid malignancy in 34% of the cases as MDS in 71 patients (25%) or myeloproliferative neoplasms in 24 patients (9%). AML was therapy-related in 46 patients (17%). Karyotype was adverse in 135 pts (49%), including 54 patients with complete (-17) or partial (del17p) deletion of chromosome-17, chromosome containing the *TP53* locus (19%). *TP53* status was available before AZA treatment for 224 patients. One quarter of them has *TP53* mutations (55 patients). Patient characteristics and general outcome according to *TP53* mutational status are summarized in Table 1.

Prognosis factors for overall survival under azacitidine

A younger age (hazard ratio [HR] 1.02 [95% CI, 1.00-1.04]; p=0.010), a low level of LDH (HR 1.08 [95% CI, 1.04-1.11]; p<0.0001), a non-adverse karyotype (HR 1.79 [95% CI, 1.35-2.37]; p<0.0001) and/or an absence of *TP53* mutation (HR 2.22 [95% CI, 1.60-3.08]; p<0.0001) or alteration (*TP53* mutation and/or -17/17p-; HR 2.53 [95% CI, 1.85-3.45]; p<0.0001) were associated with a better 6-months overall survival in univariate analysis (Table 2).

These factors were also significant in a multivariate Cox model derived from the univariate analysis: age (hazard ratio [HR] 1.04 [95% CI, 1.01-1.06]; p=0.040), LDH (HR 1.06 [95% CI, 1.03-1.10]; p=0.0006), karyotype (HR 1.64 [95% CI, 1.15-2.34]; p=0.006) and TP53 mutation (HR 1.54 [95% CI, 1.03-2.32]; p=0.037) (Table 3).

Patient outcome according to the *TP53* status

The 55 patients with *TP53* mutations had a significantly lower overall survival compared to wild-type *TP53* patients (Figure 1A; median OS: 7.9 months with TP53 mutation *vs*. 12.6 months without; HR 2.2 [95% CI, 1.6 to 3.1]; p<0.0001). Patients with *TP53* alteration (Figure 1B) had the worst overall survival compared to patients without (median OS: 5.4 vs. 14.0 months, respectively, HR 2.5 [95% CI, 1.85-3.45]; p=<0.0001).

Within the group of 109 patients with adverse karyotype (Figures 1C and 1D), *TP53* mutation remained associated with poorer OS compared to wild type *TP53* (7.9 months *vs.* 9.6 months, respectively; p=0.01).

In contrast to overall survival, response rates (CR/CRi) did not differ according to the presence of *TP53* mutation (22% with TP53 mutations *vs*. 18% without; p=0.52) or alteration *(*19% with *vs*. 19% without; p=0.41). Extending the clinical response to partial responses (PR) or hematologic improvement (HI) didn't modify the impact of *TP53* mutation on response to AZA (CR, CRi and PR: 24% with *vs*. 24% without, p=0.92; CR, CRi, PR and HI: 36% with *vs*. 42% without, p= 0.59).

Similarly, within the group of 109 patients with adverse karyotype, *TP53* mutation did not impact response achievement (21% RC/RCi with *TP53* mutation *vs.* 14% RC/RCi without; p=0.37).

Patient outcome according to TP53 mutation classifications

Among the 55 patients with a *TP53* mutation, we identified 49 cases (89%) with a unique *TP53* mutation (42 missenses [86%], 3 nonsenses [6%], and 4 frameshifts [8%]) and 6 cases (11%) with 2 mutations (2 patients with missense and frameshift mutations and 4 with 2 missense mutations).

As the impact of the *TP53* mutations is heterogeneous, we may assume that a specific sub-group of variants might be sensitive to HMA. We evaluated their impact on AZA response using three recent classifications of TP53 mutations[26,27,34]. Twelve of these patients were classified as responders and 43 as non-responders.

Disruptive mutations were detected in 15 patients (27%), classification based on the consequences of the TP53 mutations relying on the location of the mutation and the predicted amino acid alterations. A TP53 Evolutionary Action Score was assessable for 48 patients (87%) and a relative flexible score

derived from Kotler *et al.* for 53 patients (96.4%). Functional categorization of *TP53* variant is summarized in table S2. Comparison of these 3 different classifications of *TP53* mutations is summarized in tables 4 and 5. None of these classifications efficiently predict a difference to AZA treatment regarding clinical response or overall survival.

DISCUSSION

Our study of 224 patients constitutes, to our knowledge, the largest cohort of elderly AML patients treated with HMA analyzed for *TP53* mutations so far. We identified 60 *TP53* mutations in 55 patients, for an overall prevalence of 24.6%. Among them, 30% were localized in the main *TP53* hotspots for single base substitutions, which is in line with previous descriptions in solid tumors[31] and in AML[14]. The percentage of patients with *TP53* mutation in our cohort is higher than previously reported in elderly AML patients[36-38], which could be easily explained by the high proportion of adverse cytogenetics and secondary AML in this group of patient deemed unfit for intensive chemotherapy. Our findings show no impact of *TP53* alterations (including mutation and deletion) on the clinical response to azacitidine but a strong and independent impact on overall survival in multivariate analysis. We could not reproduce result from Welch et al[24] who reported *TP53* mutation as a positive prognosis factor for response to decitabine which did not translate in survival advantage. This raises the question whether decitabine should be preferred to azacitidine in *TP53* mutated AML patients. We assessed the impact of *TP53* mutation on response rate as defined by CR/CRi, while Welch et al compared *TP53* mutational status and response defined by morphological leukemia free state (MLFS) rate after the first treatment cycle but it was not clear in their description of responders whether patient achieving MLFS after first cycle of decitabine eventually converted to a complete remission. The endpoint analyzed is of importance, as blast clearance may not be a perfect surrogate marker of survival in the setting of HMA therapy, where survival improvements can be observed despite significant decrease of bone marrow blasts. Of note, we did not find any impact of *TP53* mutation on overall response rate when response was defined with less stringent criteria and responders included patient achieving at least HI. One might presume that the differences could also rely on the doses of the HMA used in both studies.

Welch et al used decitabine at a 200mg/m² divided daily dose for 10 days every 4 weeks, i.e. twice the dose of the current FDA approved scheme for high risk MDS and more than twice the monthly dose of the regimen tested by Lübbert et al in elderly patients with AML[9]. Although, Blum et al[39] reported improved CR rate in a phase II trial of elderly AML patients with this intensified scheme, the preferred dose and schedule of decitabine remains uncertain and is mainly limited by the myelotoxicity of the drug. The impact of *TP53* mutation on the outcome of patients treated with azacitidine has been studied only in high-risk MDS and limited cohorts of AML patients with 20–30% marrow blasts[19,40], providing the same conclusions as ours: it has no impact on response rate but strongly affects OS. Even though decitabine and azacitidine are both cytosine analogs with identical ring structure, it differs by the sugar attached to this ring. The deoxyribose in decitabine allowed 100% of the metabolite to be incorporated into DNA, whereas only 10-20% of azacitidine is converted into a deoxyribonucleotide, the remaining 80-90% of the drug being incorporated into RNA. The mechanism of action of both drugs is not fully understood and differences of outcome with decitabine versus azacitidine for patient with specific genotype could presumably give more insight into precise mechanisms of action of these drugs.

The increasing knowledge of mutant forms of TP53, has provided detailed insights into the functional consequences of *TP53* mutations and supports the hypothesis that all *TP53* mutations are not functionally equivalent[25]. The majority of these mutations are missense mutations in the DBD and therefore lead to loss of target gene transactivation[41]. In addition to this loss of function, mutant TP53 may exhibit dominant negative effect on wild-type TP53[32] or gain-of-function properties with capacity of transactivating noncanonical target genes that confer selective growth advantage, migratory potential, and drug resistance[42]. Different approaches have been used to systematically categorize various mutant TP53 forms based on their functionality in tumor suppression. We selected 3 different classification systems[26,27,34] able to characterize *TP53* mutations and we compared this predicted phenotype with patient outcome under azacitidine. Although none of these predictive methods succeed in identifying *TP53* mutated AML patient who best benefit from azacitidine, it remains

unknown whether this lack of reliability could be system-related, disease-related or therapy-related. It would be of great interest to investigate the accuracy of these phenotype-genotype tools in predicting the outcome of AML patients treated with decitabine or with intensive chemotherapy. With the growing field of TP53-activating compounds[43] and targeted therapy against *TP53* pathway genes[44] (eg, *MDM2*), a better characterization of mutational and non-mutational TP53 alterations will become inevitable in the initial workup of each AML patient[45].

Acknowledgements: ED thanks the support of the research in his laboratory: 111 des Arts, Association Laurette Fugain, Société Française des Cancers des Enfants, Ligue Régionale contre le Cancer

PB thanks the association L'Alsace Contre le Cancer for their support.

Disclosure of potential conflict of interest: PB, NP, SL, BC, IL, VD, JP, MC, AS, LF, CS, SB, HG and ED have nothing to disclose. CR has received research funding from Celgene and served as consultant for Celgene.

Supplementary information is available at Leukemia's website

References

1 Bertoli S, Tavitian S, Huynh A, Borel C, Guenounou S, Luquet I et al. Improved outcome for AML patients over the years 2000-2014. Blood Cancer J 2017; 7: 635.
2 Derolf AR, Kristinsson SY, Andersson TM-L, Landgren O, Dickman PW, Björkholm M. Improved patient survival for acute myeloid leukemia: a population-based study of 9729 patients diagnosed in Sweden between 1973 and 2005. Blood 2009; 113: 3666–3672.
3 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; 129: 424–447.
4 Bories P, Bertoli S, Bérard E, Laurent J, Duchayne E, Sarry A et al. Intensive chemotherapy, azacitidine, or supportive care in older acute myeloid leukemia patients: an analysis from a regional healthcare network. Am J Hematol 2014; 89: E244-252.
5 Bories P, Lamy S, Simand C, Bertoli S, Delpierre C, Malak S et al. Physician uncertainty aversion impacts medical decision making for older patients with acute myeloid leukemia: results of a national survey. Haematologica 2018. doi:10.3324/haematol.2018.192468.
6 Juliusson G, Swedish AML Group. Most 70- to 79-year-old patients with acute myeloid leukemia do benefit from intensive treatment. Blood 2011; 117: 3473–3474.
7 Kantarjian H, Ravandi F, O'Brien S, Cortes J, Faderl S, Garcia-Manero G et al. Intensive chemotherapy does not benefit most older patients (age 70 years or older) with acute myeloid leukemia. Blood 2010; 116: 4422–4429.

8 Dombret H, Seymour JF, Butrym A, Wierzbowska A, Selleslag D, Jang JH et al. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. Blood 2015; 126: 291–299.
9 Lübbert M, Rüter BH, Claus R, Schmoor C, Schmid M, Germing U et al. A multicenter phase II trial of decitabine as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia judged unfit for induction chemotherapy. Haematologica 2012; 97: 393–401.
10 Ravandi F, Issa J-P, Garcia-Manero G, O'Brien S, Pierce S, Shan J et al. Superior outcome with hypomethylating therapy in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome and chromosome 5 and 7 abnormalities. Cancer 2009; 115: 5746–5751.
11 Ritchie EK, Feldman EJ, Christos PJ, Rohan SD, Lagassa CB, Ippoliti C et al. Decitabine in patients with newly diagnosed and relapsed acute myeloid leukemia. Leuk Lymphoma 2013; 54: 2003–2007.
12 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; 23: 203–206.
13 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; 22: 1539–1541.
14 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: 2114–2121.
15 Kadia TM, Jain P, Ravandi F, Garcia-Manero G, Andreef M, Takahashi K et al. TP53 mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia: Clinicomolecular characteristics, response to therapy, and outcomes. Cancer 2016. doi:10.1002/cncr.30203.
16 Middeke JM, Herold S, Rücker-Braun E, Berdel WE, Stelljes M, Kaufmann M et al. TP53 mutation in patients with high-risk acute myeloid leukaemia treated with allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Br J Haematol 2016; 172: 914–922.
17 Ciurea SO, Chilkulwar A, Saliba RM, Chen J, Rondon G, Patel KP et al. Prognostic factors influencing survival after allogeneic transplantation for AML/MDS patients with TP53 mutations. Blood 2018; 131: 2989–2992.
18 Bejar R, Stevenson KE, Caughey B, Lindsley RC, Mar BG, Stojanov P et al. Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation. J Clin Oncol 2014; 32: 2691–2698.
19 Bejar R, Lord A, Stevenson K, Bar-Natan M, Pérez-Ladaga A, Zaneveld J et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. Blood 2014; 124: 2705–2712.
20 Nieto M, Samper E, Fraga MF, González de Buitrago G, Esteller M, Serrano M. The absence of p53 is critical for the induction of apoptosis by 5-aza-2'-deoxycytidine. Oncogene 2004; 23: 735–743.
21 Yi L, Sun Y, Levine A. Selected drugs that inhibit DNA methylation can preferentially kill p53 deficient cells. Oncotarget 2014; 5: 8924–8936.
22 McKay BC, Becerril C, Ljungman M. P53 plays a protective role against UV- and cisplatin-induced apoptosis in transcription-coupled repair proficient fibroblasts. Oncogene 2001; 20: 6805–6808.
23 Gudkov AV, Komarova EA. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. Nat Rev Cancer 2003; 3: 117–129.
24 Welch JS, Petti AA, Miller CA, Fronick CC, O'Laughlin M, Fulton RS et al. TP53 and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. N Engl J Med 2016; 375: 2023–2036.
25 Sabapathy K, Lane DP. Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others. Nat Rev Clin Oncol 2018; 15: 13–30.
26 Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA et al. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med 2007; 357: 2552–2561.

27 Neskey DM, Osman AA, Ow TJ, Katsonis P, McDonald T, Hicks SC et al. Evolutionary Action Score of TP53 Identifies High-Risk Mutations Associated with Decreased Survival and Increased Distant Metastases in Head and Neck Cancer. Cancer Res 2015; 75: 1527–1536.
28 Young KH, Weisenburger DD, Dave BJ, Smith L, Sanger W, Iqbal J et al. Mutations in the DNA-binding codons of TP53, which are associated with decreased expression of TRAILreceptor-2, predict for poor survival in diffuse large B-cell lymphoma. Blood 2007; 110: 4396–4405.
29 Dumas P-Y, Bertoli S, Bérard E, Médiavilla C, Yon E, Tavitian S et al. Azacitidine or intensive chemotherapy for older patients with secondary or therapy-related acute myeloid leukemia. Oncotarget 2017; 8: 79126–79136.
30 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; 116: 354–365.
31 Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, Hollstein M, Byrnes G, Zavadil J et al. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. Hum Mutat 2016; 37: 865–876.
32 Willis A, Jung EJ, Wakefield T, Chen X. Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. Oncogene 2004; 23: 2330–2338.
33 Chun YS, Passot G, Yamashita S, Nusrat M, Katsonis P, Loree JM et al. Deleterious Effect of RAS and Evolutionary High-risk TP53 Double Mutation in Colorectal Liver Metastases. Ann Surg 2017. doi:10.1097/SLA.0000000000002450.
34 Kotler E, Shani O, Goldfeld G, Lotan-Pompan M, Tarcic O, Gershoni A et al. A Systematic p53 Mutation Library Links Differential Functional Impact to Cancer Mutation Pattern and Evolutionary Conservation. Mol Cell 2018; 71: 178-190.e8.
35 Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, Lowenberg B, Wijermans PW, Nimer SD et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. Blood 2006; 108: 419–425.
36 Prassek VV, Rothenberg-Thurley M, Sauerland MC, Herold T, Janke H, Ksienzyk B et al. Genetics of acute myeloid leukemia in the elderly: mutation spectrum and clinical impact in intensively treated patients aged ≥ 75 years. Haematologica 2018. doi:10.3324/haematol.2018.191536.
37 Stengel A, Kern W, Haferlach T, Meggendorfer M, Fasan A, Haferlach C. The impact of TP53 mutations and TP53 deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL: an analysis of 3307 cases. Leukemia 2017; 31: 705–711.
38 Tsai C-H, Hou H-A, Tang J-L, Liu C-Y, Lin C-C, Chou W-C et al. Genetic alterations and their clinical implications in older patients with acute myeloid leukemia. Leukemia 2016; 30: 1485–1492.
39 Blum W, Garzon R, Klisovic RB, Schwind S, Walker A, Geyer S et al. Clinical response and miR-29b predictive significance in older AML patients treated with a 10-day schedule of decitabine. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107: 7473–7478.
40 Bally C, Adès L, Renneville A, Sebert M, Eclache V, Preudhomme C et al. Prognostic value of TP53 gene mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia treated with azacitidine. Leuk Res 2014; 38: 751–755.
41 Lee MK, Teoh WW, Phang BH, Tong WM, Wang ZQ, Sabapathy K. Cell-type, dose, and mutation-type specificity dictate mutant p53 functions in vivo. Cancer Cell 2012; 22: 751–764.
42 Blandino G, Levine AJ, Oren M. Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. Oncogene 1999; 18: 477–485.
43 Bykov VJN, Wiman KG. Mutant p53 reactivation by small molecules makes its way to the clinic. FEBS Lett 2014; 588: 2622–2627.
44 Andreeff M, Kelly KR, Yee K, Assouline S, Strair R, Popplewell L et al. Results of the Phase I Trial of RG7112, a Small-Molecule MDM2 Antagonist in Leukemia. Clin Cancer Res 2016; 22: 868–876.
45 Prokocimer M, Molchadsky A, Rotter V. Dysfunctional diversity of p53 proteins in adult acute myeloid leukemia: projections on diagnostic workup and therapy. Blood 2017; 130: 699–712.

Table 1: Patient characteristics according to TP53 status

	Azacitidine cohort N=279	*TP53*wt N=169	*TP53*mut N=55	*TP53* unknown N=55	*TP53*mut vs *TP53*wt Univariate p value
Baseline characteristics					
Median Age– years (range)	76 (45-93)	76 (45-90)	75 (50-86)	76 (57-93)	0.088
Male gender -n (%)	155 (55.6)	100 (59.2)	29 (52.7)	26 (47.3)	0.400
AML status					
De novo **-**n (%)	138 (49.5)	92 (54.4)	26 (47.3)	20 (36.4)	
Secondary to MDS - n (%)	71 (25.5)	43 (25.5)	9 (16.4)	19 (34.5)	0.084
Secondary to MPN - n (%)	24 (8.6)	10 (5.9)	7 (12.7)	7 (12.7)	
Therapy related AML - n (%)	46 (16.5)	24 (14.2)	13 (23.6)	9 (16.4)	
Performance status-n (%)					
0-1 **-** n (%)	168 (69.7)	109 (73.6)	29 (58)	30 (54.5)	
2-4 **-** n (%)	73 (30.3)	39 (26.4)	21(42)	13 (45.5)	0.037
Unknown	38	21	5	12	
Median WBC count- G/L (range)	2.7 (0.4 – 271)	2.4 (0.7 – 122.7)	2.3 (0.5 – 85.0)	3.4 (0.4-271)	0.439
Median platelet count –G/L (range)	67 (3 – 1271)	74 (7 – 771)	46 (3 – 1271)	71.5 (5-736)	0.001
Median LDH - U/L (range)	505,5 (135-3525)	502 (135 – 3525)	569 (163-3175)	662.5 (168-3703)	0.149
Median BM blast count – % (range)	34 (0-85)	35 (0-83)	29.5 (9-85)	28 (2-78)	0.075
Cytogenetics (MRC)					
Non adverse- n (%)	140 (50.9)	113 (66.9)	2 (3.6)	25 (45.4)	<0.0001
Adverse- n (%)	135 (49.1)	56 (33.1)	53(96.4)	26 (54.6)	<0.0001
Monosomal caryotype- n (%)	66 (23.7)	14 (8.4)	37 (67.3)	15 (27.3)	<0.0001
Del17p or monosomy 17- n (%)	54 (19.4)	13 (7.7)	32 (41.8)	9 (16.4)	<0.0001
Unknown	4	0	0	4	
Outcome					
Response					0.502
RC/RCi- n (%)	54 (19.4)	30 (17.8)	12 (21.8)	12 (21.8)	
Failure- n (%)	225 (80.6)	139 (82.2)	43 (78.2)	43 (78.2)	
Median OS – months (95%IC)	10.6 (9.7-12.1)	12.6 (10.3-15.6)	7.9 (3.1-9.8)	9.74 (9.02-10.37)	<0.0001

MDS myelodysplastic syndrome, MPN myeloproliferative neoplasm, WBC white blood cell, LDH lactate deshydrogenase, MRC Medical Research Council, CR complete response, RCi complete response with incomplete hematologic recovery, OS overall survival

Table 2: Prognosis factors for overall survival in univariate analysis

		Event/N	6 mos-OS (%)	HR [IC95%]	*p-value*
Age (continuous variable)				1.02 [1.00 ; 1.04]	*0.040*
Gender	Male	120/129	69	1.00	
	Female	65/68	71	0.86 [0.65;1.14]	*0.299*
AML status	De novo	101/118	74	1.00	
	Secondary	102/106	65	1.09 [0.82 ; 1.43]	*0.558*
Performans status	0-1	125/138	72	1.00	
	>1	54/60	60	1.35 [0.97 ; 1.86]	*0.071*
Charlson score	0-1	123/140	70	1.00	
	>1	44/47	72	0.97 [0.68 ; 1.38]	*0.852*
Tumor	No	168/186	71	1.00	
	Yes	21/24	58	1.15 [0.73 ; 1.81]	*0.554*
WBC count (continuous variable)				1.01 [1.00 ; 1.02]	*0.088*
Lymphocytes count (continuous variable)				1.06 [0.93 ; 1.22]	*0.375*
Platelets count (continuous variable)				0.87 [0.73 ; 1.04]	*0.117*
LDH (continuous variable)				1.08 [1.04 ; 1.11]	*<0.0001*
Albumin	Normal	124/138	72	1.00	
	< Normal	27/30	53	1.02 [0.67 ; 1.56]	*0.099*
Cytogenetic risk	Non-adverse	101/115	82	1.00	
	Adverse	102/109	57	1.79 [1.35 ; 2.37]	*<0.0001*
TP53 mutation	No	150/169	75	1.00	
	Yes	53/55	53	2.22 [1.60 ; 3.08]	*<0.0001*
TP53 alteration	No	138/156	79	1.00	
	Yes	65/68	49	2.53 [1.85 ; 3.45]	*<0.0001*
Use of G-CSF	No	37/46	70	1.00	
	Yes	52/57	77	1.02 [0.67 ; 1.56]	*0.935*

Table 3 Prognosis factors for overall survival in multivariate analysis

		HR [IC95%]	*p-value*
Age (continuous variable)		1.04 [1.01 ; 1.06]	*0.040*
WBC count (continuous variable)		1.00 [0.99 ; 1.01]	*0.899*
LDH (continuous variable/100)		1.06 [1.03 ; 1.10]	*0.0006*
Cytogenetic risk	Non-adverse Adverse	1.00 1.64 [1.15 ; 2.34]	*0.006*
TP53 mutation	No Yes	1.00 1.54 [1.03 ; 2.32]	*0.037*

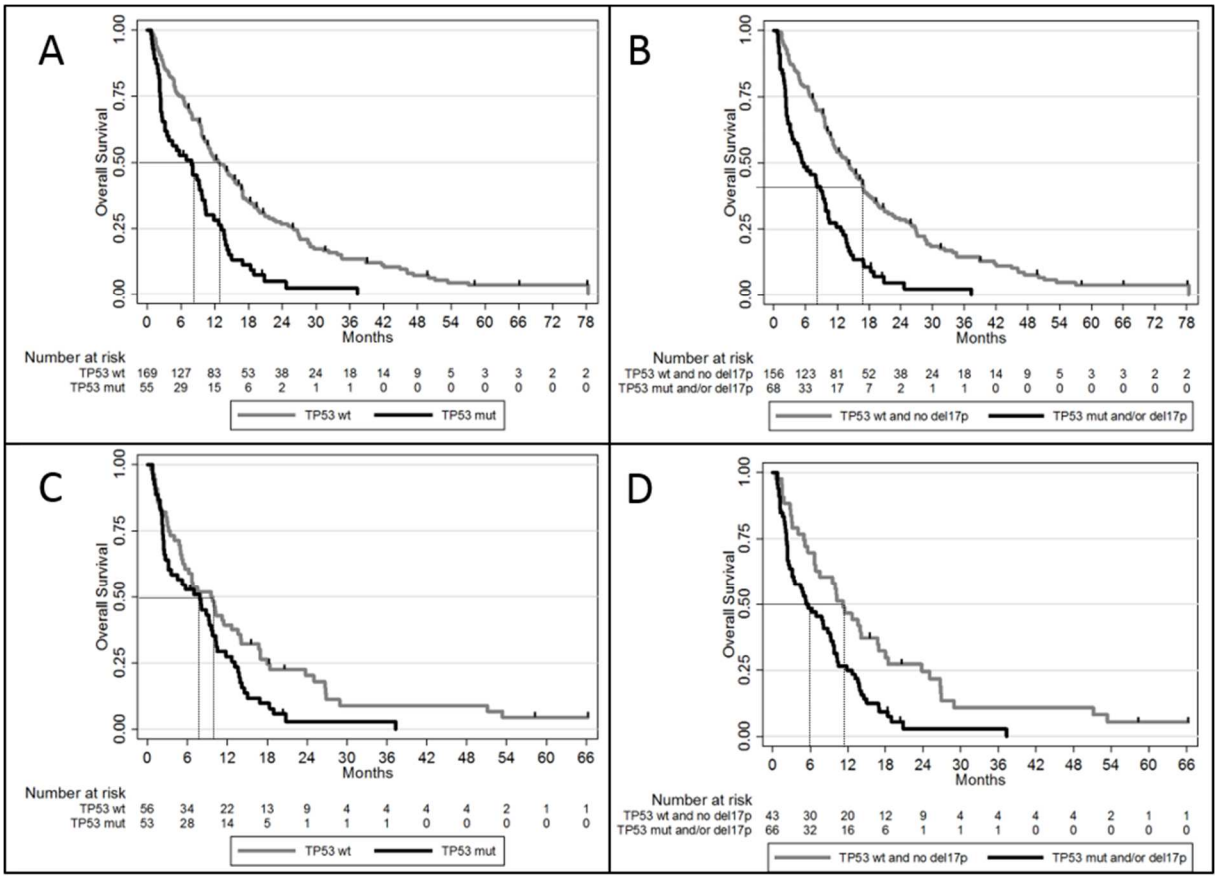
Table 4: Univariate comparison of *TP53* mutation functional characterization and response to azacitidine

		Overall sample n=55	**Responders N=12**	**Non responders N=43**	**p-value**
Disruptive mutation	Yes n (%) No n (%)	15 (27.3) 40 (72.7)	3 (25) 9 (75)	12 (27.9) 31 (72.1)	*1.00*
Evolutionary Action score (continuous variable, 0-100)	Median (range)	73.9 (28.1:95.7)	79.3 (28.1-89.8)	73.3 (48.5-95.7)	*1.00*
Evolutionary Action score (0-100)	<75 n (%) ≥75 n (%) missing	25 (52.1) 23 (47.9) 7	5 (45.5) 6 (54.5) 1	20 (54.1) 17 (45.9) 6	*0.61*
Relative Flexible score on a log2 scale	Median (range)	0.094 (-2.525;0.838)	0.094 (-0.789;0.579)	0.094 (-2.525;0.838)	*0.67*

Table 5: Univariate comparison of *TP53* mutation functional characterization and overall survival

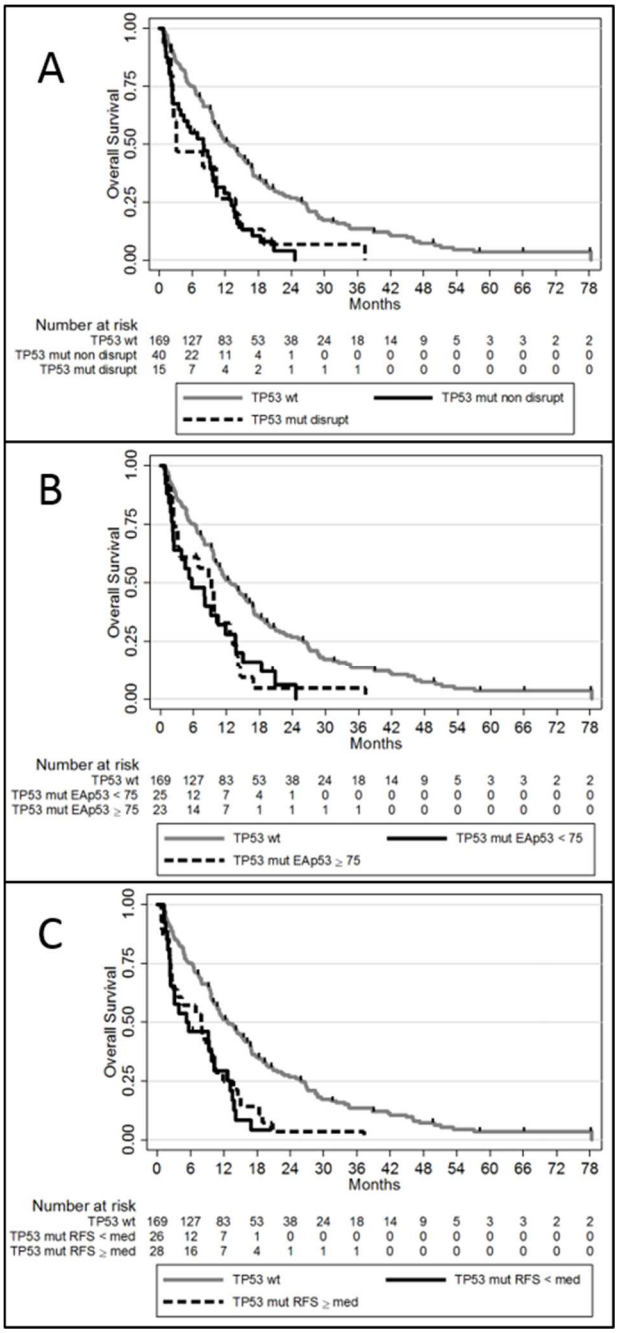
		Event/ N	6 mos-OS (%)	HR [IC95%]	*p-value*
Disruptive TP53 mutation	No	38/40	55	1.00	
	Yes	15/15	47	0.92 [0.50 ; 1.71]	*0.798*
Evolutionary Action score (0-100)	<75	24/25	48	1.00	
	≥75	22/23	61	0.97 [0.54 ; 1.75]	*0.923*
Evolutionary Action score (continuous, 0-100)				1.01 [0.99 ; 1.03]	*0.515*
Relative Flexible score on a log2 scale (continuous)				0.75 [0.45 ; 1.22]	*0.244*

Figure 1: Overall survival according to *TP53* alterations



A. OS in patient with *TP53* mutation versus *TP53*^{wt}. B. OS in patient with *TP53* mutation and/or deletion versus patient without TP53 alteration. C. OS in patient with *TP53* mutation versus *TP53*^{wt} in the subgroup of adverse karyotype. D. OS in patient with *TP53* mutation and/or deletion versus patient without *TP53* alteration in the sub-group of adverse karyotype.

Figure 2: Overall survival according to TP53 mutations classifications



A. OS according to *TP53* disruptive classification: disruptive *TP53* mutation versus non-disruptive *TP53* mutation versus *TP53*^{wt}

B. OS according to evolutionary action score: EAp53 < 75 versus EAp53≥ 75 versus *TP53*^{wt}

C. OS according to relative flexible score: RFS < median versus ≥ median versus *TP53*^{wt}

Article 4: Exome sequencing identifies MECOM missense variant as a prognostic marker for overall survival of elderly acute myeloid leukemia patients treated with azacitidine

Manuscrit en cours de finalisation

La recherche de biomarqueur moléculaire prédictif du devenir des patients atteints de LAM traités par agent hypométhylant n'a pour l'instant pas permis l'identification de facteur utilisable en pratique courante. Les facteurs pronostiques classiques (âge, cytogénétique, indice de performance, scores de comorbidité) bien que corrélés au devenir des patients âgés atteints de LAM, manquent de précision pour déterminer la stratégie optimale pour un patient donné. Les études portant sur le degré de méthylation de l'ADN avant l'instauration d'un agent hypométhylant n'ont pas permis d'identifier de profil de méthylation associé au devenir des patients. L'impact des mutations somatiques des gènes de l'épigénétique (*DNMT3A/TET2/IDH1/2*) s'est révélé contradictoire selon les séries de même que l'impact des mutations de *TP53*. Il doit être noté une importante hétérogénéité des cohortes étudiées quant à la pathologie (MDS et SMD) et aux traitements reçus (azacitidine et/ou decitabine), ce qui pourrait expliquer ces résultats contradictoires. A ce jour, les mécanismes d'action des agents hypométhylants restent imparfaitement connus ce qui pourrait également expliquer l'échec de ces études testant des hypothèses issues des connaissances préalables.

Nous décrivons ici une étude au schéma expérimental innovant associant le séquençage d'exome complet d'une cohorte d'entrainement composée de patients atteints de LAM, ayant un phénotype extrême défini par leur réponse à l'azacitidine en 1ère ligne (26 bons et 23 mauvais répondeurs à l'azacitidine), suivi du séquençage ciblé des variants sélectionnés sur une cohorte de validation de 175 patients. Le séquençage ciblé des 4 variants identifiés à partir de la cohorte d'entrainement a permis de montrer, en analyse temps-dépendante, un impact significatif du variant rs7622799 du gène *MECOM (*alias *MDS1-EVI1)* sur la survie globale des patients traités par azacitidine et laisse entrevoir une utilisation comme biomarqueur prédictif.

Exome sequencing identifies a *MECOM* missense variant as a prognostic marker for overall survival of elderly acute myeloid leukemia patients treated with azacitidine

P. Bories[1,2,3], N. Prade[1], B. Cabarrou[4], S. Lagarde[1], J. Plenecassagnes[5], I. Luquet[1], V. De Mas[1], T. Filleron[4], M. Cassou[5], A. Sarry[2], L. Fornecker[6], C. Simand[6], S. Bertoli[2], H. Gronemeyer[7], C. Recher[2], E. Delabesse[1]

1. Laboratory of Haematology, Toulouse University Institute of Cancer-Oncopole, Centre of Research on Cancer of Toulouse (CRCT), Toulouse, France,

2. Department of Hematology, Toulouse University Institute of Cancer-Oncopole, Toulouse, France,

3. Onco-Occitanie regional cancer network, Toulouse University Institute of Cancer-Oncopole, Toulouse, France,

4. Biostatistic Unit, Institut Claudius Regaud, Toulouse University Institute of Cancer-Oncopole, Toulouse, France,

5. Bioinformatics Unit, Institut Claudius Regaud, Toulouse University Institute of Cancer-Oncopole, Toulouse, France,

6. Department of Hematology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France,

7. Unité Génomique fonctionnelle et cancer, Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, Illkirch-Graffenstaden, France.

Corresponding author : Professor Eric Delabesse, Laboratory of Haematology, Toulouse University Institute of Cancer-Oncopole, CHU de Toulouse, 1 avenue Irène Joliot-Curie, Toulouse cedex 9 31059 France; email : delabesse.eric@iuct-oncopole.fr

Manuscript word count: 2659

Number of tables: 4

Number of figures: 4

Number of supplementary files: 2

Running title: *MECOM* SNP rs7622799 and response to azacitidine

Key words

Elderly AML, Hypomethylating Agent, Predictive Biomarker, Extreme Phenotype Selection, Exome Sequencing, *MECOM*

INTRODUCTION

Hypomethylating agents (HMA) azacitidine (AZA) and decitabine (DEC) are approved low-intensity frontline therapies for patients with acute myeloid leukemia (AML)[1]. They constitute the reference arm of most randomized studies currently testing novel frontline therapy for older patients with AML jugged ineligible for intensive chemotherapy (IC). The selection between intensive versus low-intensity therapy remains matter of debate, in particular in cases with low comorbidity scores and adverse ELN cytogenetics/molecular genetics where the benefit of IC may not outweigh the risk and those with intermediate or favorable AML risk but with equivocal comorbidity scores. About 50% of patients with AML treated with AZA may achieve an hematologic response including 20-25% of complete response (CR/CRi)[2], but in contrast to IC, responses may take several months after the initiation of treatment to occur, which underlines the need for identification of pretreatment molecular predictors[3].

To date, description of biomarkers of response to AZA has brought few convincing results. Among pharmacologic factors with potential impact on AZA resistance, in vitro data suggest that human nucleoside transporters (hNT) expression could correlate with DNA demethylation[4] but clinical data are lacking. Activation of AZA is mediated by uridine-cytidine kinase (UCK) whose expression level has been associated with overall survival (OS) but not with response rate of MDS patients treated with AZA[5]. Although the expression level and enzymatic activity of cytidine deaminase (CDA), which inactivates AZA, could potentially influence OS in a gender-specific manner due to higher CDA expression in male subjects[6], this gender effect is not a hallmark of patient outcome under AZA[7]. Several genes with prognosis impact in AML have been tested for their power to predict response to HMA. Mutations in genes involved in the methylation machinery such as *TET2, IDH1/2* and *DNMT3A* have been associated with response to HMA in some retrospective cohorts of MDS/AML patients[8-10], but not in others[11,12] nor in the biomarker sub-study of the phase III AZA-AML-001 trial[13]. Mutations of *TP53* have been positively associated with blast clearance under DEC[14], but this effect did not translate in survival advantage and was not reproduced with AZA (Bories, manuscript in process).

Importantly, mechanisms of action (MOA) of AZA remain partially understood. AZA affect DNA methylation through DNA methyltransferase inhibition and induces re-expression of silenced genes but the correlations between this effects and clinical response under AZA remains elusive[15-17]. Beside its impacts on DNA methylation, an impact of AZA on histone modifications have also been describe with heterogeneous changes in histone marks[18,19], which even insufficient to explain gene expression variations, suggest a more complex effect of AZA on the epigenome.

Advances in next-generation sequencing (NGS) now provide a unique opportunity to understand mechanisms of sensitivity or resistance to specific agents. Candidate-gene sequencing studies present limitation because they require prior knowledge of the genetic marker and its role in the therapy MOA. Alternatively, hypothesis-free genome-wide association studies (GWAS), which investigate the impact of multiple genetic variants on therapy efficacy usually require extremely large numbers of case and control samples to be genotyped.

Multistage study design using a discovery set of extreme phenotypes patients (extreme responders and non-responders to a given therapy) and a validation set represent a valuable alternative to enrolling very large random cohort of patients. To identify genetic markers predictive of outcome of AML patients treated with azacitidine, we conducted an hypothesis-free genetic study, using exome sequencing of responders versus non-responders patients, followed by targeted sequencing in a validation cohort.

PATIENTS AND METHODS

Patients treatment and samples

The IUCT-O AML study is a prospective longitudinal registry including all patients diagnosed with an AML within the ONCOMIP multicentric oncology network in the Midi-Pyrénées region in South-West of France (about 2.8 million of inhabitants). The IUCT-O AML database is registered at the Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) under N°1778920. From Jan 2007 to Dec 2016, 279 newly diagnosed patients with an AML defined with WHO criteria, excluding M3-subtype were treated with AZA in the regional cancer network ONCOMIP. AZA was administered subcutaneously following

standard scheme of 75mg/m²/d for 7days of every 28-day cycles. This patient sample represent an extension of a previously reported study[20], and its characteristics have been described elsewhere (ref Bories/TP53). Among them, 224 patients had a frozen baseline DNA sample which constitute our study sample aiming to describe genomic biomarker. Bone marrow (BM) samples were obtained at the time of diagnosis, before treatment initiation and genomic DNA was extracted with Qiagen kit (Qiagen). All patients provided signed consent for these genetic analyses in accordance with the Declaration of Helsinki. Patient clinical information was collected at the reference date June 1, 2017.

Study design and endpoints definition

As shown in figure 1, we design a multistage sequencing study with a discovery and a validation cohort. Patients of the discovery cohort were selected as extreme phenotype of marked sensitivity or resistance to AZA as defined by their clinical response after 3 to 6 cycles. Selection criteria for responders relies on complete remission achievement with or without hematological recovery according to ELN criteria[1] (CR and CRi, respectively). Among the 42 patients achieving CR or CRi, we randomly selected 26 patients for the discovery set. Selection criteria for non-responders patients encompass (1) progressive or stable disease[1], (2) absence of hematological improvement according to MDS IWG criteria[21] and (3) having received at least 3 cycles of AZA. Among the 113 patients fulfilling this 3 criteria, we randomly selected 23 patients for the discovery cohort. The 175 remaining patients constituted the biomarker validation cohort. Candidate biomarker identified in the discovery cohort were secondly tested for their association with OS of this validation cohort.

OS of the patients included in the sequencing study was compared with that of patient lacking DNA sample with log rank test of Kaplan-Meier estimates. Characteristics of patients from discovery and validation cohorts were compared with Chi-2 or Fisher tests for categorial variable and Mann-Withney test for numerical variable.

Exome sequencing of the discovery cohort

Libraries were captured using 50ng of gDNA with the Sureselect all-exome V4 kit (Agilent) followed by paired-end, 150bp reads sequencing on a NextSeq sequencer (Illumina). Sequences were aligned on the reference genome hg19 (GRCh37) with Nextgene and after PCR-duplicate read and sequencing

errors removal, only non-synonymous single-nucleotide variant (SNV) and Insertions/deletions (Indels) with a read-depth (RD) ≥10 and a variant allele frequency (VAF) ≥10 were kept. Before statistical selection of genomic variants, we defined 4 different filtering models depending on genes classifications, read depth, variant allele frequency (table 1). Depending on the model, analyses were carried-on per-SNV or per-genes. Gene-list included in each model are provided in table S1.

Variants selection via the elastic net regularization

As the number of variants identified in exome sequencing is much higher than the number of observations, stepwise selection produces estimates that are biased and unstable, leading to arbitrary selection of variable. An elastic-net regularization combining LASSO (least absolute shrinkage and selection operator) and Ridge penalties simultaneously[22], was used to identify association between variants and clinical response in each model of gene. Each significant association was determined by an effect size coefficient proportionally correlated to the variant effect on response. Using a resampling approach on 1000 replications, bootstrap stability selection (BSS) were computed for each variant and only those with a BSS≥75% were selected. The elastic-net regularization ultimately selects only a few variables among a set of variables highly correlated.

Sequencing of the validation cohort and analyses

The limited number of variants identified in the discovery set were then tested in the validation cohort for their impact on patients' OS. A multiplex PCR (using primers provided in table S2) covering the selected variant was performed to generate the libraries, which were sequenced using a MiSeq sequencer (Illumina), and a Miseq Reagent kit V2 (paired-end, 150bp, sequencing 2 x 150 cycles). Alignment and variant calling were performed using NextGene software (SoftGenetics). Associations between SNPs and OS with Kaplan-Meier and log-rank test. We further tested the proportional hazards assumption of Kaplan-Meier estimates and if not respected, conducted time dependent-analysis using a piece-wise cox model.

RESULTS

Cohorts characteristics and outcome

As presented in figure S1, median OS of the 55 patients excluded due to missing sample was not different from the study cohort of 224 patients (10.1 months vs 10.8 months, respectively; HR 1.009, 95%CI= [0.7299-1.394]). Median follow-up of the study cohort was 58.2 months (95%CI= [49.5-78.1]). As shown in table 2, compared to the validation cohort, patients of the discovery cohort were less frequently of male gender, had significantly higher baseline WBC count and more often intermediate cytogenetics. In line with our study design, selection of extreme phenotype resulted in an enrichment in responders (CR/CRi) patients in the discovery cohort compared to the validation cohort (53.1% versus 9.1%, respectively, p<0.0001) which translated into a survival advantage with a median OS of 14.3 months in the discovery set versus 9.7 months in the validation set (p<0.0001).

Exome sequencing of the training cohort

The exon capture baits targeted 98% of genes in the Consensus CDS database. A mean coverage depth of 85× per sample was achieved, with 92.5% of targets covered at ≥ 20× depth.

As shown in figure 2, the model 1 of exome-sequencing analysis which included recurrent AML genes, identified 171 mutations affecting 33 genes with a median number of 3 mutated genes per patient (range 1-11 mutations). The most frequently mutated genes were *DNMT3A* in 13 pts (26.5%), *RUNX1* in 12 pts (24.5%), *TET2* in 12 pts (24.5%), *ASXL1* in 11 patients (22.5%), *STAG2* in 11 patients (22.5%) and *SRSF2* in 10 patients (20.4%). Overall, 36 patients (73.4%) had at least one mutation in epigenetic genes, 21 patients (42.9%) in tumor suppressors, 20 patients (40.8%) in the signaling, 19 patients (38.8%) in transcriptional factors, 16 patients (32.7%) in cohesion complex and 16 patients (32.7%) in the spliceosome.

Results of the elastic-net regularization with bootstrapping of the data from the model 2 and 3 are provided in table 3. Although model 2 was a per-gene model, inspection of the exome-seq data for the gene MECOM (MDS1 And EVI1 Complex Locus) revealed that 8 of the 26 responders (30.8%) versus 1 of the 23 non-reponders (4.3%) had an heterozygous missense variant in the SET domain of *MECOM* at position 169098992 (rs7622799; encoding p.Pro120Ser; MAF = 0.13 in the Exome Aggregation

Consortium [ExAC]). Accordingly, instead of the whole gene sequence, only this SNV of *MECOM* was selected for validation. Model 2 also identified *ARHGEF12* gene as a potential candidate but it wasn't kept for validation because inspection of the exome-seq data revealed multiple scattered SNV among the gene either in responders and in non-responders patients (figure 3). Model 4 which included pharmacogenes referenced in the KEGG data base for nucleoside analogues metabolism did not identified any candidate. Overall, we selected for validation four candidates SNPs including *MECOM* rs7622799, *TOBP6L* rs777851038, *DZIP* rs11070136, and *ZNF543* rs10410649.

MECOM rs7622799 is associated with OS in time-dependent analysis

Among the 175 patients of the validation cohort, we tested the association between OS and the presence of one of the 4 selected SNV by targeted genotyping. As shown in the table 4, we didn't detect any association with OS for the SNPs affecting *TOBP6L, DZIP and ZNF543*. Regarding *MECOM* rs7622799, identified in 34 patients/ 175 (19.4%), log-rang test of Kaplan-Meier estimates detected a trend for significance for its impact on OS. Since the proportional hazards assumption was not respected, a piecewise Cox model was used to investigate time dependent impact of this SNV on OS (figure 4) and showed that, patient with *MECOM* rs7622799 had improved OS from 3 months after diagnosis compared with non-rs7622799 patient (HR 0.56; 95%CI= [0.34;0.93]; p=0.024).

DISCUSSION

Predicting sensitivity to AZA remains a major challenge to best select and accordingly improve outcome of older AML patients treated with AZA. By analyzing the exome sequencing of a series of 49 AML patients selected for their sensitivity to azacytidine as frontline therapy, we identified *MECOM* SNP rs7622799 as a predictive biomarker of patient outcome and further validate it for its association with OS in time-dependent analysis of a cohort of 175 AML patients.

We took advantage of our well documented[20,23,24], multicentric and prospective AML registry to design a multistage sequencing study. We characterized an homogeneous cohort of WHO-defined AML patients treated with frontline AZA, while HMA biomarker studies often relied on heterogeneous

cohorts newly diagnosed or relapse/refractory, high risk MDS and/or AML, treated with AZA and/or DEC. Extreme phenotype selection of a discovery cohort is an innovative design process[25] which has shown increased efficiency to identify the molecular features underlying therapy sensitivity or resistance in a broad range of solid tumors[26-28], but has never been tested in hematological malignancies. Such study design is markedly relevant when the study endpoint is a rare event as is the case for complete response achievement in the setting of AML treated with HMA. Exome sequencing provides a large influx of somatic mutations data along with germline variations which could both potentially affect AZA sensitivity. Accordingly, we defined 4 different filtering model dedicated to the preselection of somatic or germinal variants. For the statistical selection of this large amount of data, the elastic-net regularization has proved to be a robust method which aims to select only a few variables among a set of highly correlated variables and thus allowing the selection of a sparser model. Although, response rate was an adequate endpoint to identify extreme responders and non-responders of the discovery set, we rather validate biomarker regarding the association with OS because it represents the gold-standard longer-term endpoint in AML. Indeed, response is not a perfect surrogate marker of survival in the setting of AZA, and survival improvements can be observed despite complete or partial response achievement [29].

Our exploratory findings identify MECOM rs7622799 as significantly associated with OS of a large sample of AML patients treated with AZA, however we acknowledge that further definition as a predictive biomarker usable as a decision-making tool will deserve further testing in a control cohort of patients treated with intensive chemotherapy.

MECOM gene, located at locus 3q26, encodes EVI1, a crucial gene for hematopoietic stem cell regulation and a powerful oncogene in AML and MDS1-EVI1 (ME, alias PRDM3) an histone lysine methyltransferase (KMT). These 2 isoforms proteins are produced via alternative transcription start sites; and differ by the presence of a PR/SET[30] domain which carry the KMT activity in the ME isoform[31]. Thus, ME acts as a H3K9me1-specific KMT that direct cytoplasmic H3K9me1 methylation, then triggers further conversion to H3K9me3 in the nucleus by Suv39h, reinforcing heterochromatin and

establishing a lasting transcription repression. *MECOM* rs7622799 is a common non-synonymous SNP encoding a proline-to-serine substitution at protein position 120 in the PR/SET domain of isoform ME. Although functional characterization of rs7622799 has never been explored, the reported impact of AZA on histone modifications with pronounced but heterogeneous changes in the repressive mark H3K9me3[18] and the identification of this SNP in baseline DNA samples of patients responders to AZA should encourage further exploration. In patients with MDS and AML treated with AZA, Wanquet et al[32], describe improved outcome of patients with chromosome 3q abnormalities involving *MECOM* strengthened the need for further functional investigations.

This study opens new avenues for a better patient selection to AZA and a better understanding of AZA mechanisms of action on epigenetics. It should also encourage to investigate the role of non-mutational abnormalities of *MECOM* gene in AML pathogenesis[33,34].

Acknowledgements: ED thanks the support of the research in his laboratory: 111 des Arts, Association Laurette Fugain, Société Française des Cancers des Enfants, Ligue Régionale contre le Cancer, PB thanks the association L'Alsace Contre le Cancer for their support.

Disclosure of potential conflict of interest: PB, NP, SL, BC, IL, VD, JP, MC, AS, LF, CS, SB, HG and ED have nothing to disclose. CR has received research funding from Celgene and served as consultant for Celgene.

Supplementary information is available at Journal's website

References

1. Döhner 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.
2. Dombret H, Seymour JF, Butrym A, et al. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. Blood 2015;126(3):291–299.

3. Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 2010;28(4):562–569.
4. Rius M, Stresemann C, Keller D, et al. Human concentrative nucleoside transporter 1-mediated uptake of 5-azacytidine enhances DNA demethylation. Mol Cancer Ther 2009;8(1):225–231.
5. Valencia A, Masala E, Rossi A, et al. Expression of nucleoside-metabolizing enzymes in myelodysplastic syndromes and modulation of response to azacitidine. Leukemia 2014;28(3):621–628.
6. Mahfouz RZ, Jankowska A, Ebrahem Q, et al. Increased CDA expression/activity in males contributes to decreased cytidine analog half-life and likely contributes to worse outcomes with 5-azacytidine or decitabine therapy. Clin Cancer Res 2013;19(4):938–948.
7. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. Lancet Oncol 2009;10(3):223–232.
8. Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. Leukemia 2011;25(7):1147–1152.
9. Emadi A, Faramand R, Carter-Cooper B, et al. Presence of isocitrate dehydrogenase mutations may predict clinical response to hypomethylating agents in patients with acute myeloid leukemia. Am J Hematol 2015;90(5):E77-79.
10. Metzeler KH, Walker A, Geyer S, et al. DNMT3A mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia. Leukemia 2012;26(5):1106–1107.
11. DiNardo CD, Patel KP, Garcia-Manero G, et al. Lack of association of IDH1, IDH2 and DNMT3A mutations with outcome in older patients with acute myeloid leukemia treated with hypomethylating agents. Leuk Lymphoma 2014;55(8):1925–1929.
12. Kuendgen A, Müller-Thomas C, Lauseker M, et al. Efficacy of azacitidine is independent of molecular and clinical characteristics - an analysis of 128 patients with myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia and a review of the literature. Oncotarget 2018;9(45):27882–27894.
13. Tang L, Dolnik A, MacBeth KJ, et al. Impact of Gene Mutations on Overall Survival in Older Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) Treated with Azacitidine (AZA) or Conventional Care Regimens (CCR). Blood 2016;128(22):2859.
14. Welch JS, Petti AA, Miller CA, et al. TP53 and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. N Engl J Med 2016;375(21):2023–2036.
15. Klco JM, Spencer DH, Lamprecht TL, et al. Genomic impact of transient low-dose decitabine treatment on primary AML cells. Blood 2013;121(9):1633–1643.
16. Fandy TE, Herman JG, Kerns P, et al. Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies. Blood 2009;114(13):2764–2773.
17. Shen L, Kantarjian H, Guo Y, et al. DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. J Clin Oncol 2010;28(4):605–613.
18. Tobiasson M, Abdulkadir H, Lennartsson A, et al. Comprehensive mapping of the effects of azacitidine on DNA methylation, repressive/permissive histone marks and gene expression in primary cells from patients with MDS and MDS-related disease. Oncotarget 2017;8(17):28812–28825.
19. Grövdal M, Karimi M, Tobiasson M, et al. Azacitidine induces profound genome-wide hypomethylation in primary myelodysplastic bone marrow cultures but may also reduce histone acetylation. Leukemia 2014;28(2):411–413.
20. Bories P, Bertoli S, Bérard E, et al. Intensive chemotherapy, azacitidine, or supportive care in older acute myeloid leukemia patients: an analysis from a regional healthcare network. Am J Hematol 2014;89(12):E244-252.
21. Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. Blood 2006;108(2):419–425.

22. Zou H, Hastie T. Regularization and variable selection via the elastic net. Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology) 2005;67(2):301–320.
23. Bertoli S, Tavitian S, Huynh A, et al. Improved outcome for AML patients over the years 2000-2014. Blood Cancer J 2017;7(12):635.
24. Dumas P-Y, Bertoli S, Bérard E, et al. Azacitidine or intensive chemotherapy for older patients with secondary or therapy-related acute myeloid leukemia. Oncotarget 2017;8(45):79126–79136.
25. Perez-Gracia JL, Gloria Ruiz-Ilundain M, Garcia-Ribas I, Maria Carrasco E. The role of extreme phenotype selection studies in the identification of clinically relevant genotypes in cancer research. Cancer 2002;95(7):1605–1610.
26. Iyer G, Hanrahan AJ, Milowsky MI, et al. Genome sequencing identifies a basis for everolimus sensitivity. Science 2012;338(6104):221.
27. Wagle N, Grabiner BC, Van Allen EM, et al. Response and acquired resistance to everolimus in anaplastic thyroid cancer. N Engl J Med 2014;371(15):1426–1433.
28. Van Allen EM, Mouw KW, Kim P, et al. Somatic ERCC2 mutations correlate with cisplatin sensitivity in muscle-invasive urothelial carcinoma. Cancer Discov 2014;4(10):1140–1153.
29. Itzykson R, Thépot S, Quesnel B, et al. Prognostic factors for response and overall survival in 282 patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. Blood 2011;117(2):403–411.
30. Herz H-M, Garruss A, Shilatifard A. SET for life: biochemical activities and biological functions of SET domain-containing proteins. Trends Biochem Sci 2013;38(12):621–639.
31. Pinheiro I, Margueron R, Shukeir N, et al. Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 methyltransferases required for mammalian heterochromatin integrity. Cell 2012;150(5):948–960.
32. Wanquet A, Prebet T, Berthon C, et al. Azacitidine treatment for patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with chromosome 3q abnormalities. Am J Hematol 2015;90(10):859–863.
33. Bindels EMJ, Havermans M, Lugthart S, et al. EVI1 is critical for the pathogenesis of a subset of MLL-AF9-rearranged AMLs. Blood 2012;119(24):5838–5849.
34. Zhang Y, Owens K, Hatem L, et al. Essential role of PR-domain protein MDS1-EVI1 in MLL-AF9 leukemia. Blood 2013;122(16):2888–2892.

Table 1: Description of the 4 filtering models used for discovery cohort sequencing analysis

Model	**Category**	**PASS Filter**	**RD**	**VAF**	***Analyses conducted on***
1	Somatic	Non-synonymous non-intronic SNV Genes recurrently mutated in AML	≥10	≥10	*Genes*
2	Somatic	Non-synonymous, non intronic SNV Genes from the cosmic census	≥10	≥10	*Genes*
3	Germline	Non-synonymous, non intronic SNV identified in ≥5 samples	≥20	≥30	*SNV*
4	Germline	Non-synonymous, non intronic SNV of KEGG azanucleotides metabolism pharmacogenes	≥10	≥10	*Genes*

Table 2: Cohorts description

	Azacitidine cohort N=224	Discovery cohort N=49	Validation cohort N=175	*Discovery* vs *validation cohort* univariate p value
Median Age– years (range)	76 (45-93)	77 (50-90)	75 (45-89)	0.7766
Male gender -n (%)	155 (55.6)	22 (44.9)	107 (61.1)	0.040
AML status				
De novo **-**n (%)	138 (49.5)	26 (53.1)	92 (52.6)	
Secondary to MDS - n (%)	71 (25.5)	13 (26.5)	39 (22.3)	0.8807
Secondary to MPN - n (%)	24 (8.6)	3 (6.1)	14 (8)	
Therapy related AML - n (%)	46 (16.5)	7 (14.3)	30 (17.1)	
Performance status-n (%)				
0-1 **-** n (%)	168 (69.7)	28 (70)	110 (69.6)	
2-4 **-** n (%)	73 (30.3)	12 (30)	48(30.4)	0.918
Unknown	38	9	17	
Charlson comorbidity score				
0-1	176 (76.5)	34 (87.2)	106 (71.6)	0.111
>1	54 (23.5)	5 (12.8)	42 (28.4)	
Unknown	49	10	27	
Median WBC count- G/L (range)	2.7 (0.4 – 271)	3.1 (0.7 – 91.4)	2.1 (0.5 – 122.7)	0.004
Median platelet count –G/L (range)	67 (3 – 1271)	60 (12 – 271)	69 (3 – 1271)	0.873
Median LDH - U/L (range)	505,5 (135-3525)	587 (169-2858)	467 (163-3525)	0.361
Median BM blast count – % (range)	33 (0-85)	42 (11-83)	33 (0-85)	0.178
Cytogenetics (MRC)				
Favorable	1(0.4)	0	0	
Intermediate- n (%)	139 (50.5)	34 (69.4)	81 (46.3)	<0.007
Adverse- n (%)	135 (49.1)	15(30.6)	94 (53.7)	
Unknown	4	0	0	
Response				<0.0001
RC/RCi- n (%)	54 (19.4)	26 (53.1)	16 (9.1)	
Failure- n (%)	225 (80.6)	23 (46.9)	159(90.9)	
Median OS – months (95%IC)	10.8 (9.7-13.1)	14.3 (11.9-18.4)	9.7 (7.9-11.2)	<0.0001

MDS myelodysplastic syndrome, MPN myeloproliferative neoplasm, WBC white blood cell, LDH lactate deshydrogenase, MRC Medical Research Council, CR complete response, CRi complete response with incomplete hematologic recovery, OS overall survival. Percentages may not add to 100 because of rounding

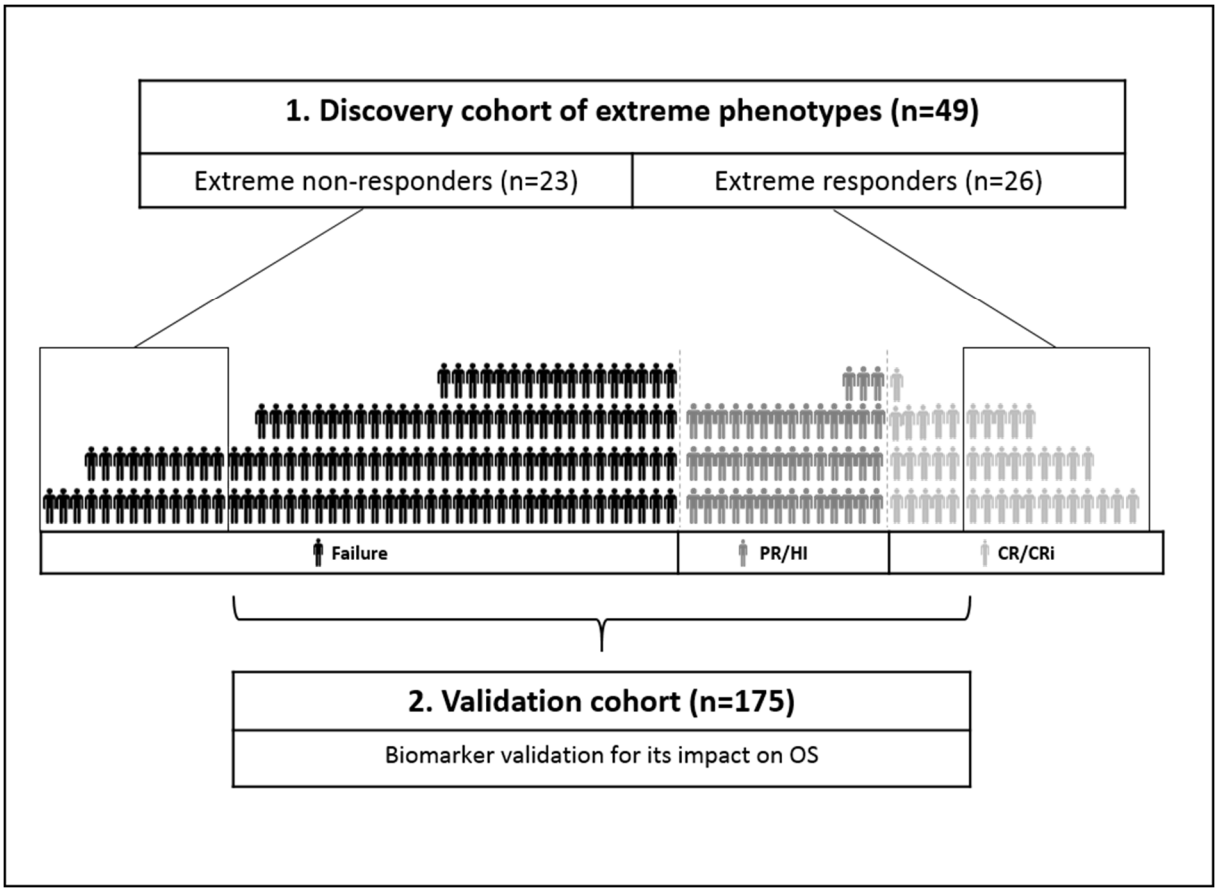
Table3: Elastic-net regularization among exome sequencing of responders versus non responders patients to azacitidine

Gene, SNV	Occurrence among the 26 responders (n, %)	Occurrence among the 23 non-responders (n, %)	Frequency in the bootstrapping (1000x replication)	Effect size
Model 1				
No gene with a frequency >75% in the bootstrapping				
Model 2				
MECOM	9 (34.8)	1 (4.3)	89.7	0.012
ARHGEF12	12 (46.2)	3 (13.0)	98.5	0.155
Model 3				
TOP6BL**,** rs777851038	21 (80.8)	6 (26.1)	91.2	0.3
DZIP1, rs11070136	24 (92.3)	9 (39.1)	86.4	0.267
ZNF543, rs10410649	18 (69.2)	4 (17.4)	76.8	0.206
Model 4				
No gene with a frequency >75% in the bootstrapping				

Table 4: Overall survival according to the 4 SNV genotyping

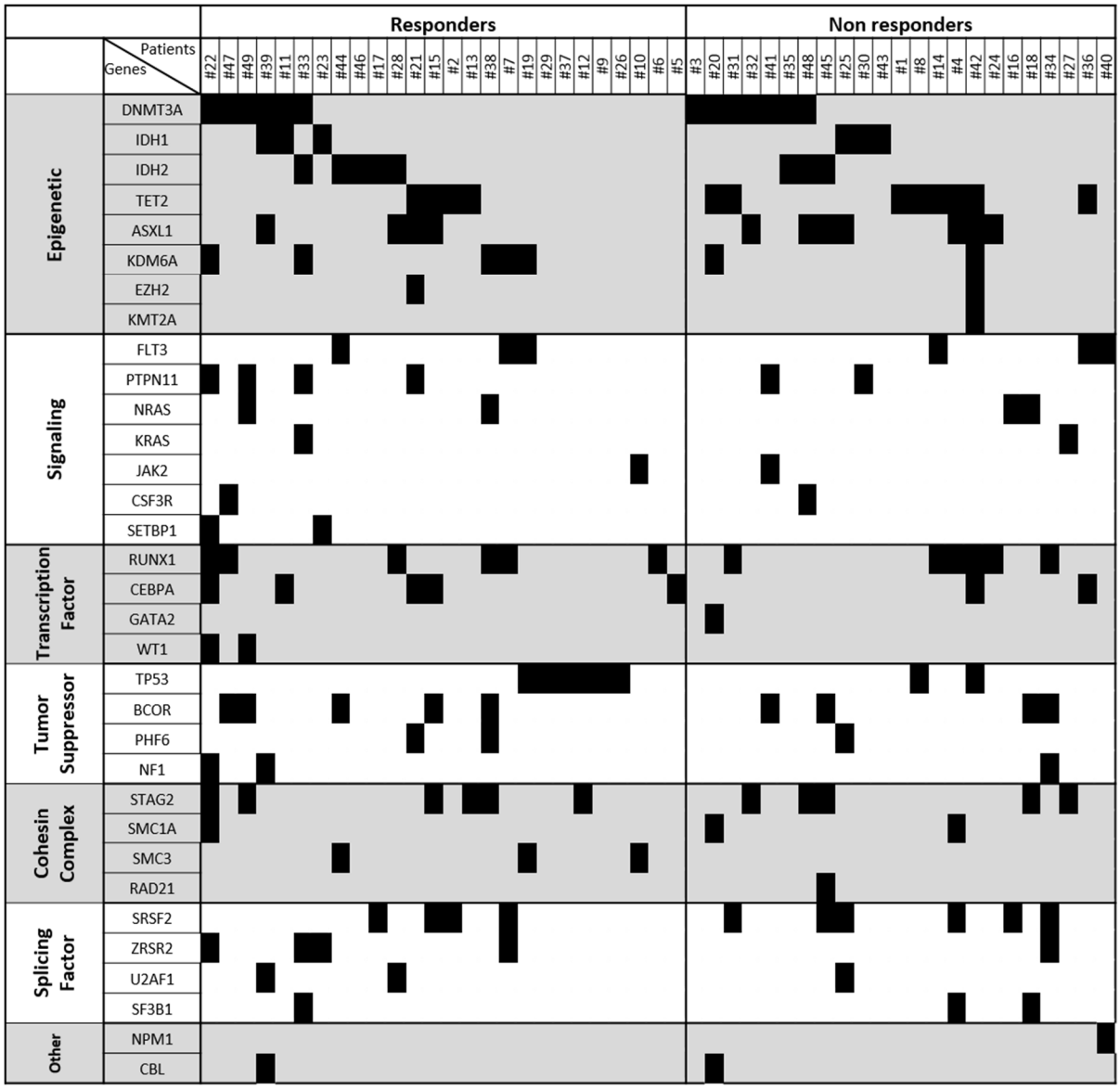
		Event/N	medianOS [IC95%] (months)	*p-value*
MECOM **rs7622799**	No	133/143	9.6 [7.9; 11.2]	*0.0592*
	Yes	30/36	10.3 [4.8; 27.0]	
TOBP6L **rs777851038**	No	18/20	9.6 [3.9; 19.0]	
	Yes	145/159	9.7 [7.9; 11.3]	*0.9771*
DZIP1 **rs777851038**	No	69/72	8.0 [5.2; 10.3]	
	Yes	94/107	10.6 [8.0; 15.0]	*0.0836*
ZNF543 **rs10410649**	No	91/99	9.7 [7.7; 11.8]	*0.9200*
	Yes	72/80	9.7 [5.6; 12.6]	

Figure 1: Study design



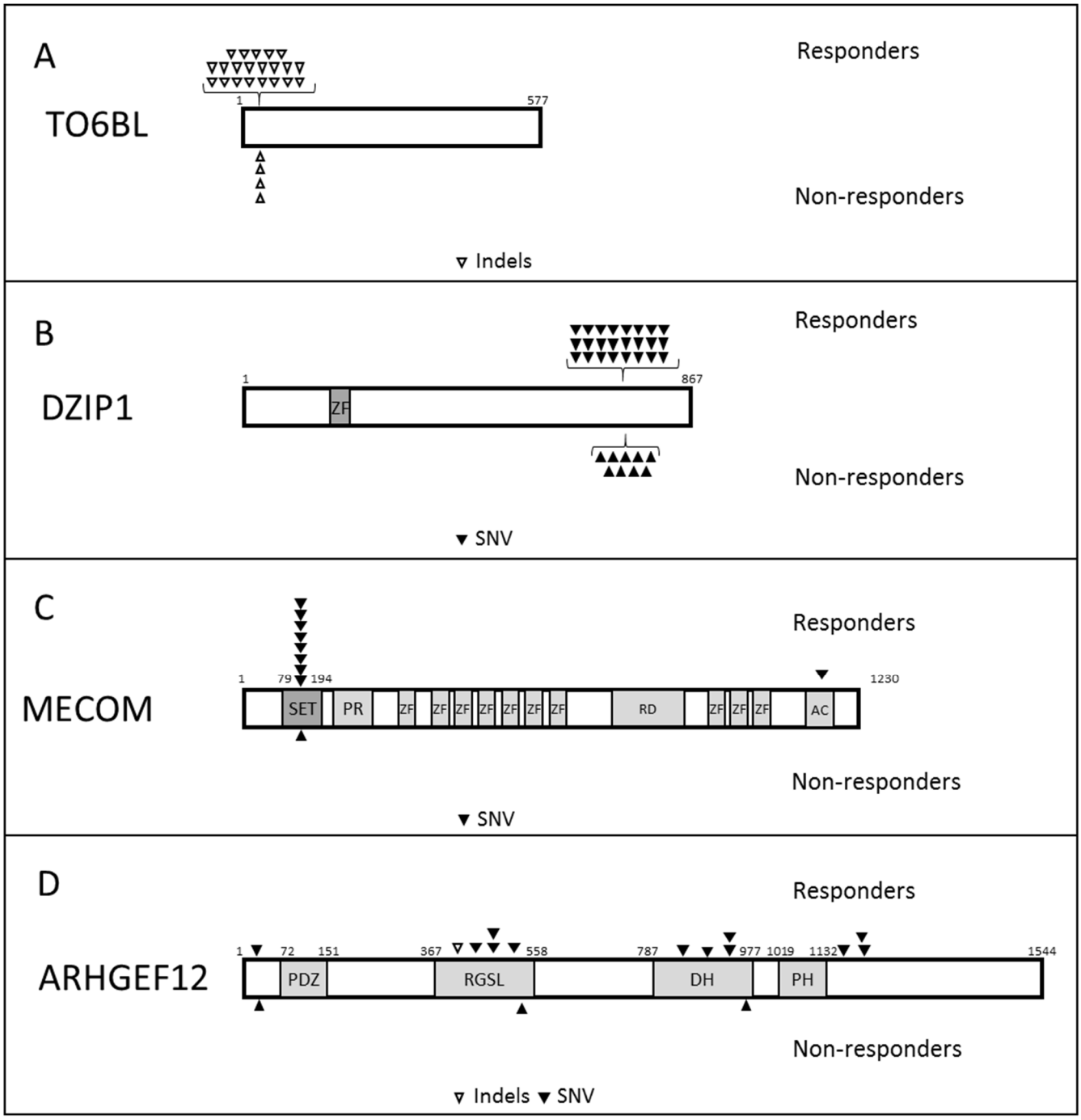
Design of a multistage sequencing study: (1) discovery of predictive biomarker relied on the exome sequencing comparison of patient with extreme phenotypes for their sensitivity to azacitidine: 26 patients (53.1%) in CR or CRi and 23 patients (46,9%) in failure despite at least 3 AZA cycles (2) biomarker validation relied on its association with OS of the 175-patients validation cohort (112 patients in failure [64%], 47achieving PR/HI [26.8%] and 16 achieving CR/CRi [9,1%]).
CR: complete remission, CRi: complete remission with incomplete hematological recovery, PR: partial remission, HI: hematological improvement, OS: overall survival.

Figure 2: AML mutational landscape among responders and non-responders patients to azacitidine



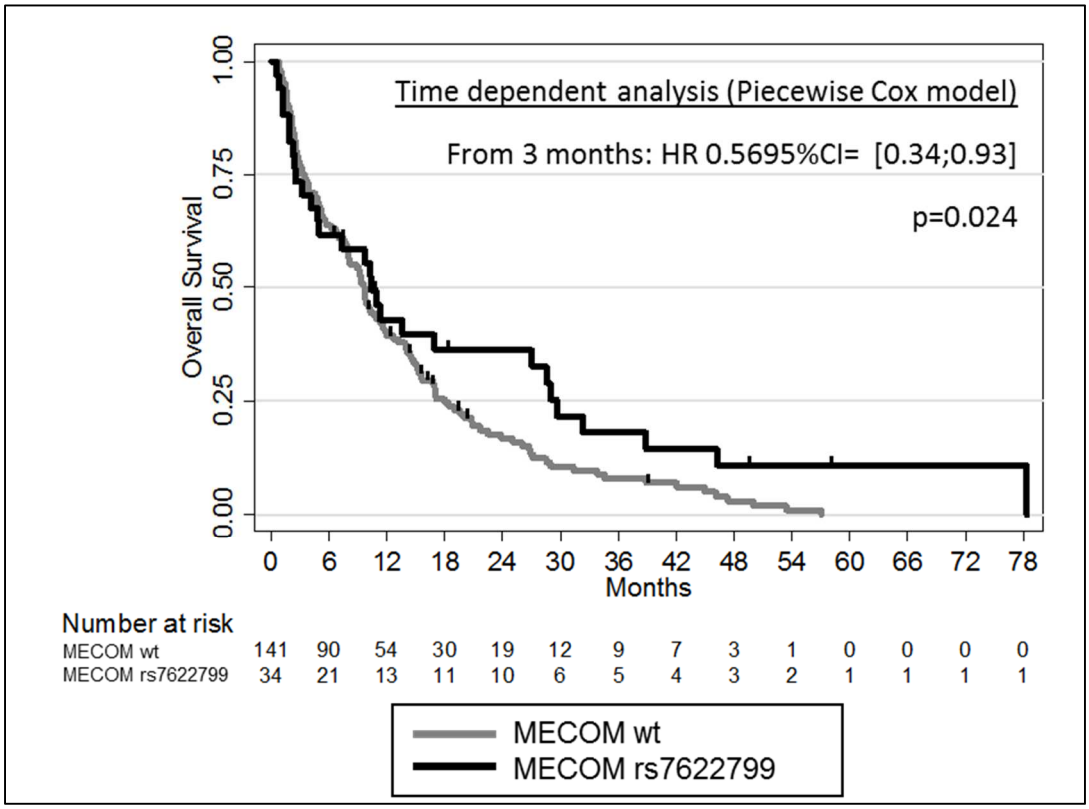
The rows in the graph represent individual genomic lesions, the XX genes in which at least one mutation have been identified are segregated across 7 functional classes: Epigenetic, Signaling, transcription factors, tumor suppressor, cohesion complex, splicing factors and others. The columns represent patients in the study, divided as responders on the left-on-site and non-responders on the right-on-site. Vertical black lines indicate the presence of a specified driver mutation in a patient.

Figure 3: Localization of variants identified in analyzes models 2 and 3



Schematic of encoded protein by genes A. TO6BL (Type 2 DNA Topoisomerase 6 Subunit B-Like), B. DZIP1 (DAZ Interacting Zinc Finger Protein 1), C. MECOM (MDS1 and EVI1 complex locus) and D. ARHGEF12 (Rho guanine nucleotide exchange factor12) and localization of SNV and Indels identified in the model 1 and 3 with elastic-net regularization among responders versus non-responders patients.
ZF: zinc finger; SET: Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax domain; PR: Proline rich domain; domain; RD: Repression domain; AC: Acidic domain; PDZ: Post synaptic density protein; RGSL: regulator of G protein signalling-like domain; DH: Dbl homology domain; PH: Pleckstrin homology domain.

Figure 4: time-dependent OS estimate according to *MECOM* rs7622799



PARTIE IV - CONCLUSIONS - DISCUSSION

Idéalement, l'identification de biomarqueurs prédictifs du devenir des patients devraient permettre des choix thérapeutiques personnalisés et adaptés au risque. Malgré l'amélioration des connaissances sur la biologie des leucémies aiguës myéloïdes et la démocratisation de technologies de séquençage à haut débit, la recherche de biomarqueurs permettant de prédire spécifiquement la réponse ou la survie des patients sous azacitidine est pour l'instant restée infructueuse. Il peut y avoir plusieurs explications potentielles à ces résultats. La plupart des études décrites ont concerné des cohortes relativement faibles (50-100 patients le plus souvent) et dont la composition est régulièrement hétérogène associant des SMD de bas risque, de haut risque et des LAM, mais aussi des patients nouvellement diagnostiqués ou en rechute/réfractaire. Ces études sont aussi hétérogènes vis-à-vis des traitements étudiés. Certaines utilisaient l'azacitidine, d'autres la décitabine et certaines les 2 thérapies successivement ce qui ne permet pas toujours de délivrer un message clair et reproductible. Bien que de structures et de fonction assez proches, ces 2 drogues n'ont pas exactement le profil pharmacologique et le même mécanisme d'action. La décitabine est incorporée à l'ADN et l'azacitidine majoritairement à l'ARN et il a été démontré que leurs effets in vitro et in vivo n'étaient pas strictement identiques. La recherche de biomarqueur doit ainsi se concevoir pour chaque drogue individuellement. En pratique quotidienne, le choix entre une chimiothérapie intensive et un traitement de faible intensité se pose pour une proportion non négligeable de patients âgés atteints de LAM. L'analyse populationnelle réalisée entre 2007 et 2010 sur une cohorte de 334 patients traités de façon intensive, semi-intensive et par soins de support a permis de décrire des facteurs pronostiques différents dans chaque sous-groupes de patients. Ainsi dans le groupe des patients traités par azacitidine, un âge élevé, une cytogénétique défavorable, un taux de LDH élevé et un taux de lymphocytes bas, étaient significativement associés à une survie globale raccourcie alors dans le groupe de patients traités par chimiothérapie intensive, seuls l'âge élevé et le statut secondaire de la LAM avaient un impact négatif sur la survie globale en analyses multivariées. Il faut noter qu'il s'agissait de populations sélectionnées sur leurs caractéristiques initiales empêchant toute comparaison directe. S'appuyant sur un appariement des patients entre le groupe chimiothérapie intensive et le groupe azacitidine et entre le groupe azacitidine et le groupe soins de support, nous montrons en analyse temps dépendante une supériorité de la chimiothérapie intensive sur l'azacitidine à partir de 6 mois après le diagnostic et une supériorité de l'azacitidine sur les soins de support dès le diagnostic. Depuis la publication de cette étude, les résultats de l'essai prospectif AZA-AML-001 ont montré un gain en survie globale du groupe azacitidine comparé aux traitements de référence (chimiothérapie intensive, cytarabine faible dose et soins de support). Le bras de référence était dépendant d'une présélection par l'investigateur et il doit être noté que seuls 18% des patients avaient été inclus dans la randomisation de l'azacitidine versus chimiothérapie intensive, appauvrissant cette comparaison sur le plan statistique. Cet essai d'enregistrement a permis à la molécule d'obtenir une AMM quel que soit le pourcentage de blastes

médullaires, mais n'a pas permis de limiter l'incertitude sur la meilleure stratégie entre la chimiothérapie intensive et l'azacitidine pour un patient donné.

Pour explorer les attitudes des praticiens dans cette situation de risque et d'incertitude, et leur impact sur les variations de pratiques médicales dans ce contexte, nous avons mis en place une collaboration transdisciplinaire entre hématologie clinique, sciences comportementales et épidémiologie sociale. A partir de cas cliniques complexes issus de la vie réelle, l'étude nationale que nous avons conduite montre une variation de pratiques déclarées importante entre une approche intensive et une approche de faible intensité. En analyse multivariée, les caractéristiques individuelles comportementales des praticiens étaient directement associées à ces variations de pratique et en premier lieu nous montrons un impact de l'aversion pour l'incertitude des praticiens sur ce choix témoignant de la nécessité de poursuivre la recherche de biomarqueur prédictif pour limiter l'incertitude thérapeutique.

S'appuyant sur la description récente d'un impact positif des mutations de *TP53* dans le contexte de la décitabine, nous avons tenté de confirmer ce résultat avec l'azacitidine. Si le séquençage du gène *TP53* sur une cohorte de 224 patients traités par azacitidine n'a pas permis de montrer de lien avec l'obtention d'une réponse à l'azacitidine, nous montrons un impact défavorable fort et indépendant sur la survie globale concordant avec les données connues dans le contexte de la chimiothérapie intensive et de la greffe de moelle. Nos résultats ne confirment pas l'impact décrit avec la décitabine et ne permettent d'envisager l'utilisation des mutations de *TP53* comme biomarqueur prédictif du devenir sous azacitidine. La caractérisation fonctionnelle des mutations de *TP53* n'a pas permis d'individualiser un groupe de patients qui auraient un meilleur devenir sous azacitidine mais cette approche systématique s'appuyant sur des classifications fonctionnelles et pronostiques devra être reproduite sur des cohortes de LAM traités par chimiothérapie intensive et dans le contexte émergeant des nouvelles thérapies agonistes de p53 et antagonistes de MDM2, pour tenter d'identifier un sous-groupe de patients *TP53*mut qui bénéficieraient le plus de telles stratégies innovantes.

L'approche génomique se basant sur la recherche de mutations de gènes candidats récurrentes dans les LAM ou de gènes impliqués dans le métabolisme des analogues nucléotidiques est pour l'instant restée infructueuse pour la description reproductible de biomarqueur. Les mécanismes d'action des agents hypométhylants restent imparfaitement décrits et la réponse thérapeutique peut s'appuyer sur différents types de modifications épigénétiques, comme la modification de la méthylation de l'ADN ou des protéines histones, l'induction d'une immunogénicité ou d'une différentiation hématopoïétique. A l'inverse des thérapies ciblées sur des récepteurs comme les récepteurs de tyrosine kinase ou des voies de signalisations, la multiplicité des mécanismes d'action de l'azacitidine complexifie la recherche de biomarqueur de réponse. Pour aborder cette question sans se fonder sur des hypothèses sur les

gènes potentiellement impliqués, le séquençage d'exomes entiers d'une cohorte de patients au phénotype extrême pour leur réponse à l'azacitidine suivi du séquençage ciblé d'une cohorte de validation de 175 patient nous a permis d'identifier une association entre le polymorphisme de *MECOM* rs7622799 et la survie globale en analyse temps dépendante. Nous pensons que ce variant de *MECOM* pourrait constituer un biomarqueur du devenir des patients traités par azacitidine. Son étude sur une cohorte de LAM traitée par chimiothérapie sera nécessaire pour déterminer s'il s'agit d'un facteur pronostique (indépendant du contexte thérapeutique) ou prédictif c'est à dire spécifiquement associé au devenir des patients sous azacitidine. Cette étude ouvre une nouvelle voie de recherche pour ce gène majeur de la leucémogénèse. Le gène *MECOM* est réarrangé dans 1-2% des LAM et surexprimé dans 8-10% des cas de LAM. Il code pour plusieurs isoformes protéiques correspondant à *EVI1* un oncogène très agressif dans les LAM et *MDS1-EVI1 (PRDM3)* ayant une activité histone mono-methyltransférase spécifique de H3K9. Ces 2 isoformes ont des interactions fortes avec des modificateurs épigénétiques clés comme HDAC, DNMT3A. Des analyses fonctionnelles seront nécessaires pour mieux comprendre l'impact fonctionnel de ce variant de *MECOM.*

Les années 2017-2018 ont marqué un tournant dans la prise en charge des LAM avec l'obtention de 5 nouvelles AMM au Etats-Unis dont 4 thérapies ciblées. Il est néanmoins probable que la question du choix entre une chimiothérapie intensive ou de faible intensité reste prégnante à l'heure des thérapies ciblées personnalisées. La chimiothérapie intensive ou l'agent hypométhylant demeurant le socle de la prise en charge sur lequel viendront se greffer ces thérapies ciblées. L'identification de biomarqueur de réponse à l'azacitidine restera cruciale dans ce contexte.

Références bibliographiques de la partie I

1. ©Les cancers en France, Les Données, INCa, édition 2015.
2. Monnereau A, Remontet L, Maynadié M, et al. Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012. *Institut de veille sanitaire*, 2013, 88p.
3. Visser O, Trama A, Maynadié M, et al. Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. Eur J Cancer 2012;48(17):3257–3266.
4. Sant M, Allemani C, Tereanu C, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. Blood 2010;116(19):3724–3734.
5. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, et al. Age and acute myeloid leukemia. Blood 2006;107(9):3481–3485.
6. Granfeldt Østgård LS, Medeiros BC, Sengeløv H, et al. Epidemiology and Clinical Significance of Secondary and Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia: A National Population-Based Cohort Study. J Clin Oncol 2015;33(31):3641–3649.
7. Hulegårdh E, Nilsson C, Lazarevic V, et al. Characterization and prognostic features of secondary acute myeloid leukemia in a population-based setting: a report from the Swedish Acute Leukemia Registry. Am J Hematol 2015;90(3):208–214.
8. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood 2016;127(20):2391–2405.
9. Bertoli S, Sterin A, Tavitian S, et al. Therapy-related acute myeloid leukemia following treatment of lymphoid malignancies. Oncotarget 2016;7(52):85937–85947.
10. Schaapveld M, Aleman BMP, van Eggermond AM, et al. Second Cancer Risk Up to 40 Years after Treatment for Hodgkin's Lymphoma. N Engl J Med 2015;373(26):2499–2511.
11. Morton LM, Dores GM, Tucker MA, et al. Evolving risk of therapy-related acute myeloid leukemia following cancer chemotherapy among adults in the United States, 1975-2008. Blood 2013;121(15):2996–3004.
12. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med 1997;3(7):730–737.
13. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature 1994;367(6464):645–648.
14. Horton SJ, Huntly BJP. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology. Haematologica 2012;97(7):966–974.
15. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. Blood 2013;122(22):3616–3627; quiz 3699.
16. Walter MJ, Shen D, Ding L, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2012;366(12):1090–1098.

17. Mossner M, Jann J-C, Wittig J, et al. Mutational hierarchies in myelodysplastic syndromes dynamically adapt and evolve upon therapy response and failure. Blood 2016;128(9):1246–1259.
18. Makishima H, Yoshizato T, Yoshida K, et al. Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. Nat Genet 2017;49(2):204–212.
19. da Silva-Coelho P, Kroeze LI, Yoshida K, et al. Clonal evolution in myelodysplastic syndromes. Nat Commun 2017;815099.
20. Chesnais V, Arcangeli M-L, Delette C, et al. Architectural and functional heterogeneity of hematopoietic stem/progenitor cells in non-del(5q) myelodysplastic syndromes. Blood 2017;129(4):484–496.
21. Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2013;368(22):2059–2074.
22. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. Blood 2009;113(18):4179–4187.
23. Lazarevic VL, Bredberg A, Lorenz F, et al. Acute myeloid leukemia in very old patients. Haematologica [Epub ahead of print].
24. 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.
25. Prassek VV, Rothenberg-Thurley M, Sauerland MC, et al. Genetics of acute myeloid leukemia in the elderly: mutation spectrum and clinical impact in intensively treated patients aged ≥ 75 years. Haematologica [Epub ahead of print].
26. Bullinger L, Döhner K, Döhner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. J Clin Oncol 2017;35(9):934–946.
27. Tsai C-H, Hou H-A, Tang J-L, et al. Genetic alterations and their clinical implications in older patients with acute myeloid leukemia. Leukemia 2016;30(7):1485–1492.
28. Ostronoff F, Othus M, Lazenby M, et al. Prognostic significance of NPM1 mutations in the absence of FLT3-internal tandem duplication in older patients with acute myeloid leukemia: a SWOG and UK National Cancer Research Institute/Medical Research Council report. J Clin Oncol 2015;33(10):1157–1164.
29. Daver N, Liu Dumlao T, Ravandi F, et al. Effect of NPM1 and FLT3 mutations on the outcomes of elderly patients with acute myeloid leukemia receiving standard chemotherapy. Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2013;13(4):435–440.
30. Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). Blood 2006;107(10):4011–4020.
31. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. N Engl J Med 2005;352(3):254–266.
32. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, 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;106(12):3740–3746.

33. Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. Blood 2009;114(14):3024–3032.
34. De Propris MS, Raponi S, Diverio D, et al. High CD33 expression levels in acute myeloid leukemia cells carrying the nucleophosmin (NPM1) mutation. Haematologica 2011;96(10):1548–1551.
35. Falini B, Bolli N, Liso A, et al. Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications. Leukemia 2009;23(10):1731–1743.
36. den Besten W, Kuo M-L, Williams RT, Sherr CJ. Myeloid leukemia-associated nucleophosmin mutants perturb p53-dependent and independent activities of the Arf tumor suppressor protein. Cell Cycle 2005;4(11):1593–1598.
37. Bonetti P, Davoli T, Sironi C, Amati B, Pelicci PG, Colombo E. Nucleophosmin and its AML-associated mutant regulate c-Myc turnover through Fbw7 gamma. J Cell Biol 2008;182(1):19–26.
38. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood 2002;100(5):1532–1542.
39. Levis M, Murphy KM, Pham R, et al. Internal tandem duplications of the FLT3 gene are present in leukemia stem cells. Blood 2005;106(2):673–680.
40. Chillón MC, Santamaría C, García-Sanz R, et al. Long FLT3 internal tandem duplications and reduced PML-RARα expression at diagnosis characterize a high-risk subgroup of acute promyelocytic leukemia patients. Haematologica 2010;95(5):745–751.
41. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. Blood 2001;98(6):1752–1759.
42. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia 2014;28(2):241–247.
43. Taskesen E, Havermans M, van Lom K, et al. Two splice-factor mutant leukemia subgroups uncovered at the boundaries of MDS and AML using combined gene expression and DNA-methylation profiling. Blood 2014;123(21):3327–3335.
44. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. Nature 2011;478(7367):64–69.
45. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. Cell 1996;84(2):321–330.
46. Ichikawa M, Asai T, Saito T, et al. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. Nat Med 2004;10(3):299–304.
47. Sakurai M, Kunimoto H, Watanabe N, et al. Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. Leukemia 2014;28(12):2344–2354.

48. Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. Leukemia 2016;30(11):2160–2168.

49. Khan M, Cortes J, Kadia T, et al. Clinical Outcomes and Co-Occurring Mutations in Patients with RUNX1-Mutated Acute Myeloid Leukemia. Int J Mol Sci;18(8):.

50. Mendler JH, Maharry K, Radmacher MD, et al. RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and with distinct gene and MicroRNA expression signatures. J Clin Oncol 2012;30(25):3109–3118.

51. Greif PA, Konstandin NP, Metzeler KH, et al. RUNX1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia are associated with a poor prognosis and up-regulation of lymphoid genes. Haematologica 2012;97(12):1909–1915.

52. Adamia S, Haibe-Kains B, Pilarski PM, et al. A genome-wide aberrant RNA splicing in patients with acute myeloid leukemia identifies novel potential disease markers and therapeutic targets. Clin Cancer Res 2014;20(5):1135–1145.

53. Mohamed AM, Thénoz M, Solly F, Balsat M, Mortreux F, Wattel E. How mRNA is misspliced in acute myelogenous leukemia (AML)? Oncotarget 2014;5(20):9534–9545.

54. Luco RF, Allo M, Schor IE, Kornblihtt AR, Misteli T. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. Cell 2011;144(1):16–26.

55. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultwood J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. N Engl J Med 2011;365(15):1384–1395.

56. Visconte V, Makishima H, Jankowska A, et al. SF3B1, a splicing factor is frequently mutated in refractory anemia with ring sideroblasts. Leukemia 2012;26(3):542–545.

57. Malcovati L, Karimi M, Papaemmanuil E, et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. Blood 2015;126(2):233–241.

58. Hou H-A, Liu C-Y, Kuo Y-Y, et al. Splicing factor mutations predict poor prognosis in patients with de novo acute myeloid leukemia. Oncotarget 2016;7(8):9084–9101.

59. Grech G, Pollacco J, Portelli M, et al. Expression of different functional isoforms in haematopoiesis. Int J Hematol 2014;99(1):4–11.

60. Larsson CA, Cote G, Quintás-Cardama A. The changing mutational landscape of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Mol Cancer Res 2013;11(8):815–827.

61. Lazarevic V, Hörstedt A-S, Johansson B, et al. Incidence and prognostic significance of karyotypic subgroups in older patients with acute myeloid leukemia: the Swedish population-based experience. Blood Cancer J 2014;4e188.

62. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, 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;116(3):354–365.

63. Creutzig U, Zimmermann M, Reinhardt D, et al. Changes in cytogenetics and molecular genetics in acute myeloid leukemia from childhood to adult age groups. Cancer 2016;122(24):3821–3830.

64. Horrigan SK, Westbrook CA, Kim AH, Banerjee M, Stock W, Larson RA. Polymerase chain reaction-based diagnosis of del (5q) in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome identifies a minimal deletion interval. Blood 1996;88(7):2665–2670.

65. Adema V, Bejar R. What lies beyond del(5q) in myelodysplastic syndrome? Haematologica 2013;98(12):1819–1821.

66. Döhner K, Brown J, Hehmann U, et al. Molecular cytogenetic characterization of a critical region in bands 7q35-q36 commonly deleted in malignant myeloid disorders. Blood 1998;92(11):4031–4035.

67. Kere J, Ruutu T, Lahtinen R, de la Chapelle A. Molecular characterization of chromosome 7 long arm deletions in myeloid disorders. Blood 1987;70(5):1349–1353.

68. Le Beau MM, Espinosa R, Davis EM, Eisenbart JD, Larson RA, Green ED. Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 7 commonly deleted in malignant myeloid diseases. Blood 1996;88(6):1930–1935.

69. Zhou L, Opalinska J, Sohal D, et al. Aberrant epigenetic and genetic marks are seen in myelodysplastic leukocytes and reveal Dock4 as a candidate pathogenic gene on chromosome 7q. J Biol Chem 2011;286(28):25211–25223.

70. Chen C, Liu Y, Rappaport AR, et al. MLL3 is a haploinsufficient 7q tumor suppressor in acute myeloid leukemia. Cancer Cell 2014;25(5):652–665.

71. Soenen V, Preudhomme C, Roumier C, Daudignon A, Laï JL, Fenaux P. 17p Deletion in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Analysis of breakpoints and deleted segments by fluorescence in situ. Blood 1998;91(3):1008–1015.

72. Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, et al. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. Hum Mutat 2016;37(9):865–876.

73. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. Nature 2000;408(6810):307–310.

74. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. Science 1991;253(5015):49–53.

75. Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. Nat Rev Cancer 2009;9(10):701–713.

76. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. Science 1994;265(5170):346–355.

77. Stengel A, Kern W, Haferlach T, Meggendorfer M, Fasan A, Haferlach C. The impact of TP53 mutations and TP53 deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL: an analysis of 3307 cases. Leukemia 2017;31(3):705–711.

78. Seifert H, Mohr B, Thiede C, et al. The prognostic impact of 17p (p53) deletion in 2272 adults with acute myeloid leukemia. Leukemia 2009;23(4):656–663.

79. Chen D, Yoon J-B, Gu W. Reactivating the ARF-p53 axis in AML cells by targeting ULF. Cell Cycle 2010;9(15):2946–2951.

80. Sasca D, Hähnel PS, Szybinski J, et al. SIRT1 prevents genotoxic stress-induced p53 activation in acute myeloid leukemia. Blood 2014;124(1):121–133.

81. Peller S, Rotter V. TP53 in hematological cancer: low incidence of mutations with significant clinical relevance. Hum Mutat 2003;21(3):277–284.

82. Bowen D, Groves MJ, Burnett AK, 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;23(1):203–206.

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;22(8):1539–1541.

84. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. Blood 2015;126(1):9–16.

85. Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. Nat Rev Cancer 2017;17(1):5–19.

86. Wong TN, Ramsingh G, Young AL, et al. Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. Nature 2015;518(7540):552–555.

87. Sabapathy K, Lane DP. Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others. Nat Rev Clin Oncol 2018;15(1):13–30.

88. Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, et al. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med 2007;357(25):2552–2561.

89. Young KH, Weisenburger DD, Dave BJ, et al. Mutations in the DNA-binding codons of TP53, which are associated with decreased expression of TRAILreceptor-2, predict for poor survival in diffuse large B-cell lymphoma. Blood 2007;110(13):4396–4405.

90. Neskey DM, Osman AA, Ow TJ, et al. Evolutionary Action Score of TP53 Identifies High-Risk Mutations Associated with Decreased Survival and Increased Distant Metastases in Head and Neck Cancer. Cancer Res 2015;75(7):1527–1536.

91. Kotler E, Shani O, Goldfeld G, et al. A Systematic p53 Mutation Library Links Differential Functional Impact to Cancer Mutation Pattern and Evolutionary Conservation. Mol Cell 2018;71(1):178-190.e8.

92. Lugthart S, Gröschel S, Beverloo HB, et al. Clinical, molecular, and prognostic significance of WHO type inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2) and various other 3q abnormalities in acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 2010;28(24):3890–3898.

93. Rogers HJ, Vardiman JW, Anastasi J, et al. Complex or monosomal karyotype and not blast percentage is associated with poor survival in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome patients with inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2): a Bone Marrow Pathology Group study. Haematologica 2014;99(5):821–829.

94. Sun J, Konoplev SN, Wang X, et al. De novo acute myeloid leukemia with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2): a clinicopathologic and cytogenetic study of an entity recently added to the WHO classification. Mod Pathol 2011;24(3):384–389.

95. Haferlach C, Bacher U, Haferlach T, et al. The inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) is frequently accompanied by alterations of the RUNX1, KRAS and NRAS and NF1 genes and mediates adverse prognosis both in MDS and in AML: a study in 39 cases of MDS or AML. Leukemia 2011;25(5):874–877.

96. Lavallée V-P, Gendron P, Lemieux S, D'Angelo G, Hébert J, Sauvageau G. EVI1-rearranged acute myeloid leukemias are characterized by distinct molecular alterations. Blood 2015;125(1):140–143.

97. Hinai AA, Valk PJM. Review: Aberrant EVI1 expression in acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 2016;172(6):870–878.

98. Bindels EMJ, Havermans M, Lugthart S, et al. EVI1 is critical for the pathogenesis of a subset of MLL-AF9-rearranged AMLs. Blood 2012;119(24):5838–5849.

99. Abdel-Wahab O, Levine RL. Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. Blood 2013;121(18):3563–3572.

100. Fong CY, Morison J, Dawson MA. Epigenetics in the hematologic malignancies. Haematologica 2014;99(12):1772–1783.

101. Greenblatt SM, Nimer SD. Chromatin modifiers and the promise of epigenetic therapy in acute leukemia. Leukemia 2014;28(7):1396–1406.

102. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. Cancer Cell 2010;17(1):13–27.

103. Akalin A, Garrett-Bakelman FE, Kormaksson M, et al. Base-pair resolution DNA methylation sequencing reveals profoundly divergent epigenetic landscapes in acute myeloid leukemia. PLoS Genet 2012;8(6):e1002781.

104. Bullinger L, Ehrich M, Döhner K, et al. Quantitative DNA methylation predicts survival in adult acute myeloid leukemia. Blood 2010;115(3):636–642.

105. Meng HX, Hackett JA, Nestor C, et al. Apoptosis and DNA methylation. Cancers (Basel) 2011;3(2):1798–1820.

106. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2010;363(25):2424–2433.

107. Ribeiro AFT, Pratcorona M, Erpelinck-Verschueren C, et al. Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. Blood 2012;119(24):5824–5831.

108. Yan X-J, Xu J, Gu Z-H, et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. Nat Genet 2011;43(4):309–315.

109. Marcucci G, Metzeler KH, Schwind S, et al. Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 2012;30(7):742–750.

110. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. Nature 2014;506(7488):328–333.

111. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. N Engl J Med 2014;371(26):2488–2498.

112. Russler-Germain DA, Spencer DH, Young MA, 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;25(4):442–454.

113. Challen GA, Sun D, Jeong M, et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. Nat Genet 2011;44(1):23–31.

114. Celik H, Mallaney C, Kothari A, et al. Enforced differentiation of Dnmt3a-null bone marrow leads to failure with c-Kit mutations driving leukemic transformation. Blood 2015;125(4):619–628.

115. Yang L, Rau R, Goodell MA. DNMT3A in haematological malignancies. Nat Rev Cancer 2015;15(3):152–165.

116. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. Science 2009;324(5929):930–935.

117. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. Nature 2010;466(7310):1129–1133.

118. He Y-F, Li B-Z, Li Z, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. Science 2011;333(6047):1303–1307.

119. Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. Nature 2013;502(7472):472–479.

120. Bowman RL, Levine RL. TET2 in Normal and Malignant Hematopoiesis. Cold Spring Harb Perspect Med;7(8):.

121. Ko M, Bandukwala HS, An J, et al. Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. Proc Natl Acad Sci USA 2011;108(35):14566–14571.

122. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. Cancer Cell 2011;20(1):11–24.

123. Quivoron C, Couronné L, Della Valle V, et al. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. Cancer Cell 2011;20(1):25–38.

124. Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. Nature 2009;462(7274):739–744.

125. Ward PS, Patel J, Wise DR, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. Cancer Cell 2010;17(3):225–234.

126. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. Cancer Cell 2010;18(6):553–567.

127. Wang Y, Xiao M, Chen X, et al. WT1 recruits TET2 to regulate its target gene expression and suppress leukemia cell proliferation. Mol Cell 2015;57(4):662–673.

128. Tefferi A, Pardanani A, Lim K-H, et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. Leukemia 2009;23(5):905–911.

129. Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, et al. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. Blood 2009;113(25):6403–6410.

130. Langemeijer SMC, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. Nat Genet 2009;41(7):838–842.

131. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. N Engl J Med 2009;360(22):2289–2301.

132. Couronné L, Bastard C, Bernard OA. TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma. N Engl J Med 2012;366(1):95–96.

133. Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. Nat Rev Cancer 2012;12(9):599–612.

134. Shih AH, Jiang Y, Meydan C, et al. Mutational cooperativity linked to combinatorial epigenetic gain of function in acute myeloid leukemia. Cancer Cell 2015;27(4):502–515.

135. Gaidzik VI, Paschka P, Späth D, et al. TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group. J Clin Oncol 2012;30(12):1350–1357.

136. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. N Engl J Med 2009;361(11):1058–1066.

137. Im AP, Sehgal AR, Carroll MP, et al. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. Leukemia 2014;28(9):1774–1783.

138. Sasaki M, Knobbe CB, Munger JC, et al. IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. Nature 2012;488(7413):656–659.

139. Weissmann S, Alpermann T, Grossmann V, et al. Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia. Leukemia 2012;26(5):934–942.

140. Xu W, Yang H, Liu Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α-ketoglutarate-dependent dioxygenases. Cancer Cell 2011;19(1):17–30.

141. Metzeler KH, Becker H, Maharry 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;118(26):6920–6929.

142. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. Br J Haematol 2009;145(6):788–800.

143. Boultwood J, Perry J, Pellagatti A, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. Leukemia 2010;24(5):1062–1065.

144. Boultwood J, Perry J, Zaman R, et al. High-density single nucleotide polymorphism array analysis and ASXL1 gene mutation screening in chronic myeloid leukemia during disease progression. Leukemia 2010;24(6):1139–1145.

145. Chen T-C, Hou H-A, Chou W-C, et al. Dynamics of ASXL1 mutation and other associated genetic alterations during disease progression in patients with primary myelodysplastic syndrome. Blood Cancer J 2014;4e177.

146. Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, et al. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. Leukemia 2009;23(11):2183–2186.

147. Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, et al. Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. Genes Chromosomes Cancer 2012;51(8):743–755.

148. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. N Engl J Med 2014;371(26):2477–2487.

149. Nagase R, Inoue D, Pastore A, et al. Expression of mutant Asxl1 perturbs hematopoiesis and promotes susceptibility to leukemic transformation. J Exp Med 2018;215(6):1729–1747.

150. Yang H, Kurtenbach S, Guo Y, et al. Gain of function of ASXL1 truncating protein in the pathogenesis of myeloid malignancies. Blood 2018;131(3):328–341.

151. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Roquain J, et al. ASXL1 mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukaemia. Br J Haematol 2010;151(4):365–375.

152. Pinheiro I, Margueron R, Shukeir N, et al. Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 methyltransferases required for mammalian heterochromatin integrity. Cell 2012;150(5):948–960.

153. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. Nat Genet 2012;44(11):1179–1181.

154. Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. Nature 2012;481(7382):506–510.

155. Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. Cell 2012;150(2):264–278.

156. Buscarlet M, Provost S, Zada YF, et al. DNMT3A and TET2 dominate clonal hematopoiesis and demonstrate benign phenotypes and different genetic predispositions. Blood 2017;130(6):753–762.

157. Cargo CA, Rowbotham N, Evans PA, et al. Targeted sequencing identifies patients with preclinical MDS at high risk of disease progression. Blood 2015;126(21):2362–2365.

158. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol 1976;33(4):451–458.

159. Head DR. Revised classification of acute myeloid leukemia. Leukemia 1996;10(11):1826–1831.

160. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood 2009;114(5):937–951.

161. Krok-Schoen JL, Fisher JL, Stephens JA, et al. Incidence and survival of hematological cancers among adults ages ≥75 years. Cancer Med [Epub ahead of print].

162. Andersson TM-L, Lambert PC, Derolf AR, et al. Temporal trends in the proportion cured among adults diagnosed with acute myeloid leukaemia in Sweden 1973-2001, a population-based study. Br J Haematol 2010;148(6):918–924.

163. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. J Chronic Dis 1987;40(5):373–383.

164. Sorror ML, Sandmaier BM, Storer BE, et al. Comorbidity and disease status based risk stratification of outcomes among patients with acute myeloid leukemia or myelodysplasia receiving allogeneic hematopoietic cell transplantation. J Clin Oncol 2007;25(27):4246–4254.

165. Giles FJ, Borthakur G, Ravandi F, et al. The haematopoietic cell transplantation comorbidity index score is predictive of early death and survival in patients over 60 years of age receiving induction therapy for acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 2007;136(4):624–627.

166. Sorror ML, Storer BE, Fathi AT, et al. Development and Validation of a Novel Acute Myeloid Leukemia-Composite Model to Estimate Risks of Mortality. JAMA Oncol 2017;3(12):1675–1682.

167. Ballman KV. Biomarker: Predictive or Prognostic? J Clin Oncol 2015;33(33):3968–3971.

168. 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.

169. Lazarevic V, Hörstedt A-S, Johansson B, et al. Failure matters: unsuccessful cytogenetics and unperformed cytogenetics are associated with a poor prognosis in a population-based series of acute myeloid leukaemia. Eur J Haematol 2015;94(5):419–423.

170. Prébet T, Boissel N, Reutenauer S, et al. Acute myeloid leukemia with translocation (8;21) or inversion (16) in elderly patients treated with conventional chemotherapy: a collaborative study of the French CBF-AML intergroup. J Clin Oncol 2009;27(28):4747–4753.

171. Mosna F, Papayannidis C, Martinelli G, et al. Complex karyotype, older age, and reduced first-line dose intensity determine poor survival in core binding factor acute myeloid leukemia patients with long-term follow-up. Am J Hematol 2015;90(6):515–523.

172. Ossenkoppele G, Löwenberg B. How I treat the older patient with acute myeloid leukemia. Blood 2015;125(5):767–774.

173. Perrot A, Luquet I, Pigneux A, et al. Dismal prognostic value of monosomal karyotype in elderly patients with acute myeloid leukemia: a GOELAMS study of 186 patients with unfavorable cytogenetic abnormalities. Blood 2011;118(3):679–685.

174. Löwenberg B, Ossenkoppele GJ, van Putten W, et al. High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2009;361(13):1235–1248.

175. Döhner 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.

176. Döhner 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.

177. Tang J-L, Hou H-A, Chen C-Y, 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;114(26):5352–5361.

178. Pratcorona M, Abbas S, Sanders MA, et al. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. Haematologica 2012;97(3):388–392.

179. Schnittger S, Eder C, Jeromin S, et al. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. Leukemia 2013;27(1):82–91.

180. Rücker FG, Schlenk RF, Bullinger L, 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.

181. Devillier R, Mansat-De Mas V, Gelsi-Boyer V, et al. Role of ASXL1 and TP53 mutations in the molecular classification and prognosis of acute myeloid leukemias with myelodysplasia-related changes. Oncotarget 2015;6(10):8388–8396.

182. DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, et al. Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. N Engl J Med 2018;378(25):2386–2398.

183. Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, et al. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. Blood 2017;130(6):722–731.

184. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, et al. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. Blood 1997;89(9):3323–3329.

185. Kayser S, Döhner K, Krauter J, et al. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. Blood 2011;117(7):2137–2145.

186. Sekeres MA, Stone RM, Zahrieh D, et al. Decision-making and quality of life in older adults with acute myeloid leukemia or advanced myelodysplastic syndrome. Leukemia 2004;18(4):809–816.

187. Pulte D, Gondos A, Brenner H. Improvements in survival of adults diagnosed with acute myeloblastic leukemia in the early 21st century. Haematologica 2008;93(4):594–600.

188. Burnett A, Wetzler M, Löwenberg B. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 2011;29(5):487–494.

189. Bertoli S, Tavitian S, Huynh A, et al. Improved outcome for AML patients over the years 2000-2014. Blood Cancer J 2017;7(12):635.

190. Bower H, Andersson TM-L, Björkholm M, Dickman PW, Lambert PC, Derolf ÅR. Continued improvement in survival of acute myeloid leukemia patients: an application of the loss in expectation of life. Blood Cancer J 2016;6e390.

191. Yanada M, Garcia-Manero G, Borthakur G, Ravandi F, Kantarjian H, Estey E. Relapse and death during first remission in acute myeloid leukemia. Haematologica 2008;93(4):633–634.

192. Hubeek I, Stam RW, Peters GJ, et al. The human equilibrative nucleoside transporter 1 mediates in vitro cytarabine sensitivity in childhood acute myeloid leukaemia. Br J Cancer 2005;93(12):1388–1394.

193. Huang Y, Anderle P, Bussey KJ, et al. Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. Cancer Res 2004;64(12):4294–4301.

194. Mahfouz RZ, Jankowska A, Ebrahem Q, et al. Increased CDA expression/activity in males contributes to decreased cytidine analog half-life and likely contributes to worse outcomes with 5-azacytidine or decitabine therapy. Clin Cancer Res 2013;19(4):938–948.

195. Lee T, Karon M, Momparler RL. Kinetic studies on phosphorylation of 5-azacytidine with the purified uridine-cytidine kinase from calf thymus. Cancer Res 1974;34(10):2482–2488.

196. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. Cell 1980;20(1):85–93.

197. Jasielec J, Saloura V, Godley LA. The mechanistic role of DNA methylation in myeloid leukemogenesis. Leukemia 2014;28(9):1765–1773.

198. Li LH, Olin EJ, Buskirk HH, Reineke LM. Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia. Cancer Res 1970;30(11):2760–2769.

199. Datta J, Ghoshal K, Motiwala T, Jacob ST. Novel Insights into the Molecular Mechanism of Action of DNA Hypomethylating Agents: Role of Protein Kinase C δ in Decitabine-Induced Degradation of DNA Methyltransferase 1. Genes Cancer 2012;3(1):71–81.

200. Taylor SM, Jones PA. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. Cell 1979;17(4):771–779.

201. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. J Clin Oncol 2002;20(10):2429–2440.

202. Silverman LR, McKenzie DR, Peterson BL, et al. Further analysis of trials with azacitidine in patients with myelodysplastic syndrome: studies 8421, 8921, and 9221 by the Cancer and Leukemia Group B. J Clin Oncol 2006;24(24):3895–3903.

203. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. Lancet Oncol 2009;10(3):223–232.

204. Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 2010;28(4):562–569.

205. Becker H, Suciu S, Rüter BH, et al. Decitabine versus best supportive care in older patients with refractory anemia with excess blasts in transformation (RAEBt) - results of a subgroup analysis of the randomized phase III study 06011 of the EORTC Leukemia Cooperative Group and German MDS Study Group (GMDSSG). Ann Hematol 2015;94(12):2003–2013.

206. Issa J-PJ, Roboz G, Rizzieri D, et al. Safety and tolerability of guadecitabine (SGI-110) in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: a multicentre, randomised, dose-escalation phase 1 study. Lancet Oncol 2015;16(9):1099–1110.

207. Pollyea DA, Kohrt HE, Gallegos L, et al. Safety, efficacy and biological predictors of response to sequential azacitidine and lenalidomide for elderly patients with acute myeloid leukemia. Leukemia 2012;26(5):893–901.

208. Soriano AO, Yang H, Faderl S, et al. Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Blood 2007;110(7):2302–2308.

209. Raffoux E, Cras A, Recher C, et al. Phase 2 clinical trial of 5-azacitidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in patients with high-risk acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. Oncotarget 2010;1(1):34–42.

210. Prebet T, Sun Z, Figueroa ME, et al. Prolonged administration of azacitidine with or without entinostat for myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes: results of the US Leukemia Intergroup trial E1905. J Clin Oncol 2014;32(12):1242–1248.

211. Itzykson R, Thépot S, Quesnel B, et al. Prognostic factors for response and overall survival in 282 patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. Blood 2011;117(2):403–411.

212. Adès L, Sekeres MA, Wolfromm A, et al. Predictive factors of response and survival among chronic myelomonocytic leukemia patients treated with azacitidine. Leuk Res 2013;37(6):609–613.

213. van der Helm LH, Alhan C, Wijermans PW, et al. Platelet doubling after the first azacitidine cycle is a promising predictor for response in myelodysplastic syndromes (MDS), chronic myelomonocytic leukaemia (CMML) and acute myeloid leukaemia (AML) patients in the Dutch azacitidine compassionate named patient programme. Br J Haematol 2011;155(5):599–606.

214. Rius M, Stresemann C, Keller D, et al. Human concentrative nucleoside transporter 1-mediated uptake of 5-azacytidine enhances DNA demethylation. Mol Cancer Ther 2009;8(1):225–231.

215. Damaraju VL, Mowles D, Yao S, et al. Role of human nucleoside transporters in the uptake and cytotoxicity of azacitidine and decitabine. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 2012;31(3):236–255.

216. Qin T, Jelinek J, Si J, Shu J, Issa J-PJ. Mechanisms of resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine in human cancer cell lines. Blood 2009;113(3):659–667.

217. Valencia A, Masala E, Rossi A, et al. Expression of nucleoside-metabolizing enzymes in myelodysplastic syndromes and modulation of response to azacitidine. Leukemia 2014;28(3):621–628.

218. Dombret H, Seymour JF, Butrym A, et al. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. Blood 2015;126(3):291–299.

219. Ravandi F, Issa J-P, Garcia-Manero G, et al. Superior outcome with hypomethylating therapy in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome and chromosome 5 and 7 abnormalities. Cancer 2009;115(24):5746–5751.

220. Ritchie EK, Feldman EJ, Christos PJ, et al. Decitabine in patients with newly diagnosed and relapsed acute myeloid leukemia. Leuk Lymphoma 2013;54(9):2003–2007.

221. Viré E, Brenner C, Deplus R, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. Nature 2006;439(7078):871–874.

222. Honda H, Nagamachi A, Inaba T. -7/7q- syndrome in myeloid-lineage hematopoietic malignancies: attempts to understand this complex disease entity. Oncogene 2015;34(19):2413–2425.

223. Lübbert M, Rüter BH, Claus R, et al. A multicenter phase II trial of decitabine as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia judged unfit for induction chemotherapy. Haematologica 2012;97(3):393–401.

224. Lübbert M, Suciu S, Hagemeijer A, et al. Decitabine improves progression-free survival in older high-risk MDS patients with multiple autosomal monosomies: results of a subgroup analysis of the randomized phase III study 06011 of the EORTC Leukemia Cooperative Group and German MDS Study Group. Ann Hematol 2016;95(2):191–199.

225. Wanquet A, Prebet T, Berthon C, et al. Azacitidine treatment for patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with chromosome 3q abnormalities. Am J Hematol 2015;90(10):859–863.

226. Halaburda K, Labopin M, Houhou M, et al. AlloHSCT for inv(3)(q21;q26)/t(3;3)(q21;q26) AML: a report from the acute leukemia working party of

the European society for blood and marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 2018;53(6):683–691.

227. Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. Leukemia 2011;25(7):1147–1152.

228. Braun T, Itzykson R, Renneville A, et al. Molecular predictors of response to decitabine in advanced chronic myelomonocytic leukemia: a phase 2 trial. Blood 2011;118(14):3824–3831.

229. Traina F, Visconte V, Elson P, et al. Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms. Leukemia 2014;28(1):78–87.

230. Jung S-H, Kim Y-J, Yim S-H, et al. Somatic mutations predict outcomes of hypomethylating therapy in patients with myelodysplastic syndrome. Oncotarget 2016;7(34):55264–55275.

231. Metzeler KH, Walker A, Geyer S, et al. DNMT3A mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia. Leukemia 2012;26(5):1106–1107.

232. Voso MT, Fabiani E, Piciocchi A, et al. Role of BCL2L10 methylation and TET2 mutations in higher risk myelodysplastic syndromes treated with 5-azacytidine. Leukemia 2011;25(12):1910–1913.

233. Bejar R, Lord A, Stevenson K, et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. Blood 2014;124(17):2705–2712.

234. Emadi A, Faramand R, Carter-Cooper B, et al. Presence of isocitrate dehydrogenase mutations may predict clinical response to hypomethylating agents in patients with acute myeloid leukemia. Am J Hematol 2015;90(5):E77-79.

235. Kuendgen A, Müller-Thomas C, Lauseker M, et al. Efficacy of azacitidine is independent of molecular and clinical characteristics - an analysis of 128 patients with myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia and a review of the literature. Oncotarget 2018;9(45):27882–27894.

236. Cedena MT, Rapado I, Santos-Lozano A, et al. Mutations in the DNA methylation pathway and number of driver mutations predict response to azacitidine in myelodysplastic syndromes. Oncotarget 2017;8(63):106948–106961.

237. Kadia TM, Jain P, Ravandi F, et al. TP53 mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia: Clinicomolecular characteristics, response to therapy, and outcomes. Cancer [Epub ahead of print].

238. Middeke JM, Herold S, Rücker-Braun E, et al. TP53 mutation in patients with high-risk acute myeloid leukaemia treated with allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Br J Haematol 2016;172(6):914–922.

239. Ciurea SO, Chilkulwar A, Saliba RM, et al. Prognostic factors influencing survival after allogeneic transplantation for AML/MDS patients with TP53 mutations. Blood 2018;131(26):2989–2992.

240. Yi L, Sun Y, Levine A. Selected drugs that inhibit DNA methylation can preferentially kill p53 deficient cells. Oncotarget 2014;5(19):8924–8936.

241. Nieto M, Samper E, Fraga MF, González de Buitrago G, Esteller M, Serrano M. The absence of p53 is critical for the induction of apoptosis by 5-aza-2'-deoxycytidine. Oncogene 2004;23(3):735–743.

242. Hawkins DS, Demers GW, Galloway DA. Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. Cancer Res 1996;56(4):892–898.

243. Smith ML, Ford JM, Hollander MC, et al. p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. Mol Cell Biol 2000;20(10):3705–3714.

244. McKay BC, Becerril C, Ljungman M. P53 plays a protective role against UV- and cisplatin-induced apoptosis in transcription-coupled repair proficient fibroblasts. Oncogene 2001;20(46):6805–6808.

245. Lips J, Kaina B. DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. Carcinogenesis 2001;22(4):579–585.

246. Welch JS, Petti AA, Miller CA, et al. TP53 and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. N Engl J Med 2016;375(21):2023–2036.

247. Fandy TE, Herman JG, Kerns P, et al. Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies. Blood 2009;114(13):2764–2773.

248. Raj K, John A, Ho A, et al. CDKN2B methylation status and isolated chromosome 7 abnormalities predict responses to treatment with 5-azacytidine. Leukemia 2007;21(9):1937–1944.

249. Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, et al. Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. Blood 2002;100(8):2957–2964.

250. Gore SD, Baylin S, Sugar E, et al. Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. Cancer Res 2006;66(12):6361–6369.

251. Cluzeau T, Robert G, Mounier N, et al. BCL2L10 is a predictive factor for resistance to azacitidine in MDS and AML patients. Oncotarget 2012;3(4):490–501.

252. Shen L, Kantarjian H, Guo Y, et al. DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. J Clin Oncol 2010;28(4):605–613.

253. Yang AS, Doshi KD, Choi S-W, et al. DNA methylation changes after 5-aza-2'-deoxycytidine therapy in patients with leukemia. Cancer Res 2006;66(10):5495–5503.

254. Kantarjian H, Oki Y, Garcia-Manero G, et al. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. Blood 2007;109(1):52–57.

255. Yan P, Frankhouser D, Murphy M, et al. Genome-wide methylation profiling in decitabine-treated patients with acute myeloid leukemia. Blood 2012;120(12):2466–2474.

256. Voso MT, Santini V, Fabiani E, et al. Why methylation is not a marker predictive of response to hypomethylating agents. Haematologica 2014;99(4):613–619.

257. Niederwieser C, Kohlschmidt J, Volinia S, et al. Prognostic and biologic significance of DNMT3B expression in older patients with cytogenetically normal primary acute myeloid leukemia. Leukemia 2015;29(3):567–575.

258. Simó-Riudalbas L, Melo SA, Esteller M. DNMT3B gene amplification predicts resistance to DNA demethylating drugs. Genes Chromosomes Cancer 2011;50(7):527–534.

259. Yang Z, Kondo T, Voorhorst CS, et al. Increased c-Jun expression and reduced GATA2 expression promote aberrant monocytic differentiation induced by activating PTPN11 mutants. Mol Cell Biol 2009;29(16):4376–4393.

260. Ramsay RG, Gonda TJ. MYB function in normal and cancer cells. Nat Rev Cancer 2008;8(7):523–534.

261. Ghanim V, Herrmann H, Heller G, et al. 5-azacytidine and decitabine exert proapoptotic effects on neoplastic mast cells: role of FAS-demethylation and FAS re-expression, and synergism with FAS-ligand. Blood 2012;119(18):4242–4252.

262. Ettou S, Audureau E, Humbrecht C, et al. Fas expression at diagnosis as a biomarker of azacitidine activity in high-risk MDS and secondary AML. Leukemia 2012;26(10):2297–2299.

263. Garzon R, Liu S, Fabbri M, et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. Blood 2009;113(25):6411–6418.

264. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104(40):15805–15810.

265. Blum W, Garzon R, Klisovic RB, et al. Clinical response and miR-29b predictive significance in older AML patients treated with a 10-day schedule of decitabine. Proc Natl Acad Sci USA 2010;107(16):7473–7478.

Listes des abréviations :

5mC : 5-methylcytosine

5hmC : 5-hydroxymethylcytosine

5hmU : 5-hydroxymethyluracil

ALFA : Acute leukemia french association

Arf : Alternate reading frame

AMLCG : (German) Acute myeloid leukemia cooperative group

APOBEC : Apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide-like

ASXL1 : Additional sex comb-like 1

ATM : Ataxia-telangiectasia mutated kinase

BCOR : BCL6 Corepressor

BCR : B cell receptor

CALGB : Cancer and leukemia group B

CBP : CREB-binding protein

CDA : Cytidine deaminase

CEBPA : CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha

CHIP : Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (ie Hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé)

CHK1 : Checkpoint Kinase 1

(Îlot) CpG : (îlot) riche en cytosine et guanine

CSL – Cellule souche leucémique

CSH - Cellule souche hématopoïétique

CTBP : C-terminal-binding protein

DCK : deoxycytidine kinase

DNMT : DNA methyltransferase

Dokc4 : dedicator of cytokinesis-4

ELN : European leukemia network

EVI1 : Ecotropic Viral Integration Site 1

EZH2 : Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit

FAB - French-American-British

FADD : Fas-associated death domain protein

FDA : Food and drugs administration

FILO : French inovative leukemia organization

FLT3 - Fms-like tyrosine-kinase 3

GATA2 : GATA Binding Protein 2

GFM : Groupe Francophone de myélodysplasies

HDAC : Histone deacetylase

HMA : Hypomethylating agent (agent hypométhylant)

hENT : Human equilibrative nucleoside transporter

IDH : Isocytrate deshydrogenase

IKZF1 : IKAROS Family Zinc Finger 1

JAK2 : Janus Kinase 2

KIT : KIT Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase

KMT2A : Lysine Methyltransferase 2A (ie MLL1)

LDH : Lactates déshydrogénases

LAM : Leucémie aiguë myéloïde

LINE-1 : Long interspersed nuclear elements 1

MBD : Methyl-CpG binding domain protein 3

MDM2 : Mouse double minute-2

MDS1 : Myelodysplasia syndrome-associated protein 1

MLL : Mixed lineage leukemia

MRC : Modification en lien avec une myélodysplasie

MRC : Medical research council

NMP : Néoplasie myéloprolifération

NPM1 : Nucleophosmin 1

OMS : Organisation mondiale de la santé

MECOM : MDS1 et EVI1 complex locus

NF1 : Neurofibrine 1

PDGFR : Platelet derived growth factor receptor

PI3K : phosphoinositide-3 kinase

PKC : Protéine kinase C

PTPN11 : Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 11

RTK : Récepteur à activité tyrosine kinase

RUNX1 : Runt related transcription factor 1

SIRT1 : Sirtuin 1

SF3B1 : Splicing Factor 3b Subunit 1

SMD : Syndrome myélodysplasique

SNV : Single nucleotide variant

SRSF2 : Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2

STAG2 : Stromal Antigen 2

STAT5 : Signal Transducer And Activator Of Transcription 5A

t-AML: LAM reliée à un traitement

TCGA : The cancer genome atlas

TDG : Thymine-DNA glycosylase

TET : Ten-eleven-translocation

TLR-4 : Toll like receptor-4

TP53 : Tumor Protein P53

U2AF1 : U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1

UCK : uridine-cytidine kinase

WT1 : Wilms tumor 1

ZF : Zinc finger

ZRSR2 : Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif And Serine/Arginine Rich 2

Annexes

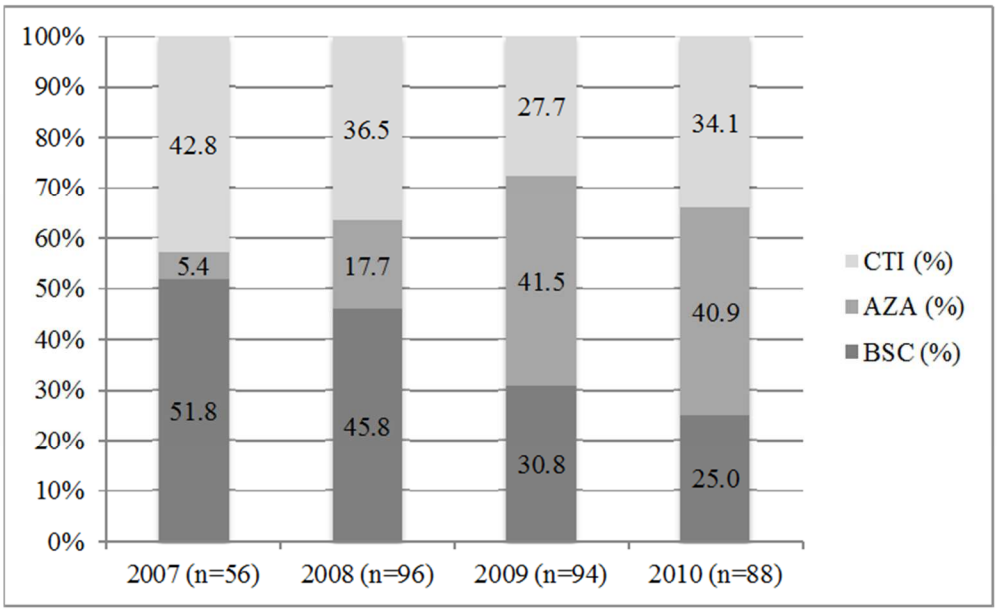
Matériel supplémentaire article#1, Bories et al, Am J of hemato 2014……174

Matériel supplémentaire article#2, Bories et al, Haematologica, 2018……179

Matériel supplémentaire article#3, Bories et al, soumis Blood Cancer Journal…… 193

Matériel supplémentaire article#4, Bories et al, manuscrit en préparation……196

Supplementary Figure 1: Evolution of treatment distribution over the 4-years study period



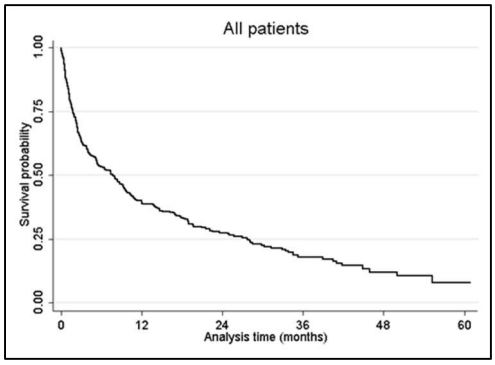
Supplementary Figure 2: Overall survival according to treatment group

A. Overall survival of the 334 patients cohort

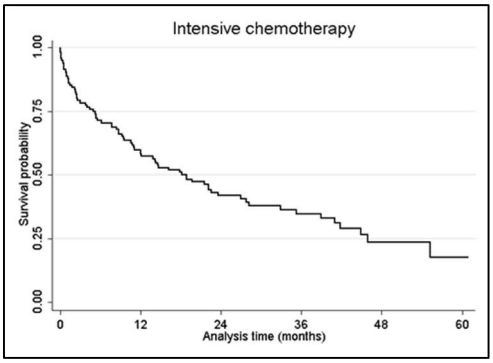
B. Overall survival in the intensive chemotherapy group

C. Overall survival in the best supportive care group

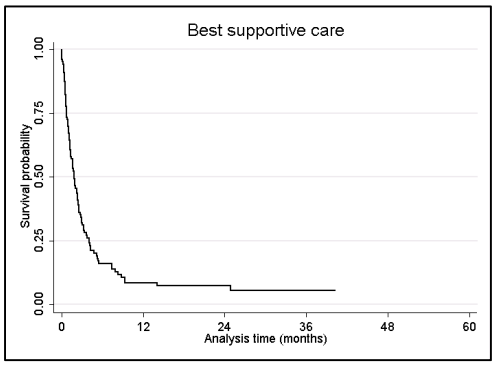
A



B



C



Supplementary Table I: Charlson comorbidity (CCI) scoring and comorbidities of patients from intensive chemotherapy and azacitidine groups

	ICT+AZA N=210	ICT N=115	AZA N=95	p value
Missing data*	22 (10.5)	21 (18.3)	1 (1.0)	
CCI score§-n (%)				0.419
0-2	173 (82.4)	88 (76.5)	85 (89.5)	
3-7	15 (7.1)	6 (5.2)	9 (9.5)	
Comorbidity- n (%)	136 (64.8)	62 (53.9)	74 (77.9)	0.050
Arterial Hypertension- n (%)	74 (35.2)	32 (27.8)	42 (44.2)	0.135
Arrhythmia- n (%)	29 (13.8)	10 (8.7)	19 (20)	0.069
Myocardial Infarction- n (%)	15 (7.1)	8 (7)	7 (7.4)	0.788
Cardiac insufficiency- n (%)	8 (3.8)	1 (0.9)	7 (7.4)	0.064
Cerebral stroke- n (%)	10 (4.8)	4 (3.5)	6 (6.3)	0.747
Diabetes- n (%)	28 (13.3)	10 (8.7)	18 (18.9)	0.101
Complicated diabetes –n (%)	5 (2.4)	3 (2.6)	2 (2.1)	1
Pulmonary disease –n (%)	18 (8.6)	8 (7)	10 (10.5)	0.620
GI disease –n (%)	11 (5.2)	4 (3.5)	7 (7.4)	0.351
Cancer < 5y- n (%)	24 (11.4)	10 (8.7)	14 (14.7)	0.382
Metastatic cancer < 5y – n (%)	1 (0.5)	0 (0)	1 (1.0)	1
Systemic AI disease – n (%)	12 (5.7)	6 (5.2)	6 (6.3)	1

ICT: intensive chemotherapy, AZA: azacitidine.

* Missing data for CCI score and all comorbidities, §CCI score: Cardiac insufficiency or myocardal infarctus 1point, Cerebral stroke 1 point, Mild pulmonary disease 1point, Peptic ulcer 1point, Systemic disease 1 point, Diabetes uncomplicated 1 point, with vascular complication 2 points, Chronic hepatitis without cirrhosis 1 point, Cirrhosis 3 points, Severe renal insufficiency or recipient of renal graft 2 points, cancer (excluding localized skin carcinoma) without metastasis 2 point or with metastasis 6 points. GI gastrointestinal, AI autoimmune, y years,

Supplementary Table II: Characteristics of complete responders according to treatment groups

	Total **N=96**	**AZA responders** **N=18**	**ICT responders** **N=78**	**AZA vs CTI** **p value**
Age (years)				<0.001
N	96	18	78	
median (IQR)	68 (63.5-73)	75 (71-78)	67 (63-72)	
range	(60-81)	(63-81)	(60-77)	
AML status, n (%)				<0.001
De novo	75 (78.1)	6 (33.3)	69 (88.4)	
Secondary	20 (20.8)	12 (66.7)	8 (10.3)	
Unknown	1 (1.1)	0 (0)	1 (1.3)	
Performance status, n (%)				0.082
< 2	67 (69.8)	10 (55.6)	57 (73.1)	
≥ 2	17(17.7)	6 (33.3)	11(14.1)	
Unknown	12 (12.5)	2 (11.1)	10 (12.8)	
White Blood Cell count (G/L)				0.030
N	96	18	78	
median (IQR)	5.7 (2.5-28.6)	3.2 (1.6-11.3)	8.6 (2.8-37.6)	
range	0.4-327	1.3-29	0.4-327	
Bone marrow blasts (%)				0.001
N	95	18	77	
median (IQR)	57 (31-80)	29.5 (21-50)	65 (37-83)	
range	0-98	20-83	0-98	
Cytogenetics, n (%)				0.356
Favorable	3 (3.1)	0 (0)	3 (3.8)	
Intermediate	76 (79.2)	13 (72.2)	63 (80.8)	
Unfavorable	16 (16.7)	5 (27.8)	11 (14.1)	
Unknown	1 (1.0)	0 (0)	1 (1.3)	

Supplementary Table III: Prognosis factors of response (CR or CRi or PR) with AZA

	Univariate Analysis		**Multivariate analysis**	
	Response rate (%)	***p***	**OR [95%CI]**	***p***
Age (years) < 80 ≥ 80	 21/67 (31.3) 3/28 (10.7)	0.035		NS
AML status *de novo* Secondary	 9/48 (18.7) 15/47 (31.9)	0.140		NS
WBC count (G/L) ≤ 10 > 10	 19/81 (23.4) 5/14 (35.7)	0.092		NS
Lymphocytes count (G/L) ≥ 1 G/L < 1 G/L	 14/42 (33.3) 9/46 (19.6)	0.142		NS
LDH (U/L) Normal Raised	 10/31 (32.3) 11/55 (20)	0.204		NS
Cytogenetics Intermediate Unfavorable	 17/46 (37) 7/43 (16.3)	0.028	4 [1.33 ; 12.5] 1	0.013
G-CSF Yes No	 11/28 (39.3) 13/67 (19.4)	0.042	3.55 [1.21 ; 10.46] 1	0.021
Bone marrow blasts (%) < 30% ≥ 30%	 11/37 (29.7) 13/57 (22.8)	0.452	Not included in cox model	

CR: complete response, CRi: complete response with incomplete blood recovery, PR: partial response.

SUPPLEMENTARY ONLINE CONTENT

Section I : web survey questionnaire.

The questionnaire send to physicians was in French. For the purpose of publication, it has been translated in English.

DUEL Study: Dealing with Uncertainty in Elderly Leukemia patients

You are invited to participate to a web survey which analyzes mechanisms of medical decision under uncertainty

This is a non-commercial, unpaid study, with scientific purposes.

Data analyzes will be entirely anonymized

Mean survey duration:10-15 minutes

There are 27 questions in this survey

1.What is your sex *

Please choose only one of the following:

- ○ **Male**
- ○ **Female**

2.What is your age?

Please write your answer here: --

3.What is your medical speciality?

Please choose all that apply:

- ☐ **Hematology**
- ☐ **Oncology and Hematology**
- ☐ **Medical Oncology**
- ☐ **Oncogeriatry**
- ☐ **Internal Medicine**
- ☐ **General Medicine**
- ☐ **Other:**

4. What is (or are) your main field(s) of interest?

Please choose all that apply:

- ☐ **Acute Leukemia**
- ☐ **Myelodysplastic syndroms**
- ☐ **Myeloproliferative Neoplasms**
- ☐ **Lymphoma / Chronic Lymphocytic Leukemia**
- ☐ **Myeloma**
- ☐ **Bone Marrow Transplantation**
- ☐ **General Hematology**
- ☐ **Other:**

5. In what kind of hospital facility do you mainly practice?

- ☐ **Academic/Research Program**
- ☐ **Comprehensive Community Cancer Program**
- ☐ **Community Cancer Program**
- ☐ **Private Hospital**
- ☐ **Other:**

6 In which hospital do you practice? (optional question)

Please write your answer here: ---

7.What is your current position?

- ○ **Head of department, professor or assistant professor**
- ○ **Attending physician**
- ○ **Hospitalist**
- ○ **Fellow**
- ○ **Resident/Intern**
- ○ **Other**

In the next 2 questions we are asking you to make a choice between 2 options

There is no wrong answer. You just have to decide as if you were really facing this choice task

8. Choice 1: Which option do you prefer?

Please choose only one of the following:

- ○ **Option A gives you 100% of chance to win 2000$**

- ○ **Option B gives you 80% of chance to win 3000$ and 20% of chance to win 0$**

9.Choice 2: Which option do you prefer?

Please choose only one of the following:

- ○ **Option C which gives you 25% of chance to win 2000$ and 75% of chance to win 0$**
- ○ **Option D which gives you 20% of chance to win 3000$ and 80% of chance to win 0$**

Eight clinical cases of AML patients are presented in the hematology decision board of your department.

You are not alone to decide but we are asking you to state which treatment option would you recommend for each of this patients among:

1. Intensive chemotherapy
2. Low-intensity therapy (hypomethylating agent or low-dose cytarabine)
3. Best supportive care

Please note that:

-These patients have announced they would accept medical treatment decision

-You do not have any clinical trial to offer them.

-You have unlimited possibilities of hospitalization as inpatient or outpatient

10. Vignette#1:

A 72-year-old woman, with no comorbidity. Normal cardiac function. She has an history of untreated low-risk MDS since 2013 (IPSS 0.5). Worsening of cytopenias in 2016.

Complete Blood Count (CBC): WBC 1G/L incl. neutrophils count 0.3G/L and 5% peripheral blood (PB) blasts, Hgb 100g/L, Platelet count 120G/L.

Bone marrow aspiration: FAB1 AML with BM blast count 40 %, and adverse karyotype (monosomy 7).

Which therapeutic option would you recommend?

- ○ **1. Intensive chemotherapy**
- ○ **2. Low-intensity therapy (hypomethylating agent or low-dose cytarabine)**
- ○ **3. Best supportive care**

11. Vignette#2:

A 75-year-old man, with an history of coronary artery disease with anterior interventricular artery stenting in 2010. He as controlled ischemic cardiopathy with medication (LVEF 52%), ECOG 2, recent weight loss 4kg.

CBC: WBC count 75 G/L, PB blast count 40%, Hgb 100 g/L, platelet count 50G/L.

Bone marrow aspiration: FAB2 AML (BM blast 60%) with normal karyotype

Which therapeutic option would you recommend?

- ○ **1. Intensive chemotherapy**
- ○ **2. Low-intensity therapy (hypomethylating agent or low-dose cytarabine)**
- ○ **3. Best supportive care**

12. Vignette#3:

A 77-year-old woman, with an 8-year history of hypertension controlled with angiotensin-converting-enzyme inhibitor, a recent echocardiogram showed a LV ejection fraction of 55%

She is natural helper of her husband affected by Alzheimer's disease.

CBC: WBC 18G/L incl. 25% peripheral blast, Hgb 100g/L, platelet count 80 G/L,

Bone marrow aspiration: FAB4 AML with favorable karyotype (inv16)

Which therapeutic option would you recommend?

- ○ **1. Intensive chemotherapy**
- ○ **2. Low-intensity therapy (hypomethylating agent or low-dose cytarabine)**
- ○ **3. Best supportive care**

13. Vignette#4:

A 63-year-old-man, with a 5-year-history of asymptomatic Parkinson disease and recently diagnosed with an asymptomatic carotid artery stenosis (90%).

CBC: WBC 2G/L incl. 5% PB blast count, Hgb 80g/L, Platelet 35 G/L

Bone marrow aspiration: FAB2 AML (30% BM blast, tri-lineage dysplasia) with complex Karyotype incl. inv3, -5q, -7

Which therapeutic option would you recommend?

- ○ **1. Intensive chemotherapy**
- ○ **2. Low-intensity therapy (hypomethylating agent or low-dose cytarabine)**
- ○ **3. Best supportive care**

14.Vignette#5: Patient from the Vignette#4 but 73-year-old

A 73-year-old-man, with a 5-year-history of asymptomatic Parkinson disease and recently diagnosed with an asymptomatic carotid artery stenosis (90%).

CBC: WBC 2G/L incl. 5% PB blast, Hgb 80g/L, Platelet 35 G/L

Bone marrow aspiration: FAB2 AML (30% BM blast, tri-lineage dysplasia) with complex Karyotype incl. inv3, -5q, -7

Which therapeutic option would you recommend?

- ○ **1. Intensive chemotherapy**
- ○ **2. Low-intensity therapy (hypomethylating agent or low-dose cytarabine)**
- ○ **3. Best supportive care**

15. Vignette#6: Patient from Vignette#4 but with WBC count 40 g/L incl. PB blast count of 25%

A 63-year-old-man, with a 5-year-history of asymptomatic Parkinson disease and recently diagnosed with an asymptomatic carotid artery stenosis (90%).

CBC: WBC 40G/L incl. 25% PB blast, Hgb 80g/L, Platelet 35 G/L

Bone marrow aspiration: FAB2 AML (30% BM blast, tri-lineage dysplasia) with complex Karyotype incl. inv3, -5q, -7

Which therapeutic option would you recommend?

- ○ **1. Intensive chemotherapy**
- ○ **2. Low-intensity therapy (hypomethylating agent or low-dose cytarabine)**
- ○ **3. Best supportive care**

16. Vignette#7: patient from Vignette#4 in complete remission after intensive chemotherapy

A 63-year-old-man, with a 5-year-history of asymptomatic Parkinson disease and recently diagnosed with an asymptomatic carotid artery stenosis (90%).

CBC: WBC 2G/L incl. 5% PB blast count, Hgb 80g/L, Platelet 35 G/L

Bone marrow aspiration: FAB2 AML (30% BM blast, tri-lineage dysplasia) with complex Karyotype incl. inv3, -5q, -7

He is in CR after an induction regimen with idarubicin (8mg/m²/d, 5 days) combined with cytarabine (100mg/m², 7days). No significant complication during aplasia. He as an HLA-identical sibling donor.

Which therapeutic option would you recommend?

- ○ **1. Allogeneic Stem Cell Transplantation with reduced-intensity conditioning**
- ○ **2. Consolidation with 2 courses of intermediate-dose cytarabine (1,5g/m²/12h, 3d)**
- ○ **3. Consolidation with 6 courses of low-dose cytarabine (50mg/m² /12h, S/C, 5d)**

17.Vignette#8: patient from Vignette#4 in complete remission after 6 courses of azacitidine

A 63-year-old-man, with a 5-year-history of asymptomatic Parkinson disease and recently diagnosed with an asymptomatic carotid artery stenosis (90%).

CBC: WBC 2G/L incl. 5% PB blast count, Hgb 80g/L, Platelet 35 G/L

Bone marrow aspiration: FAB2 AML (30% BM blast, tri-lineage dysplasia) with complex Karyotype incl. inv3, -5q, -7

He is in CR after 6 cycles of azacitidine. He has an HLA-identical sibling donor.

Which therapeutic option would you recommend?

- ○ **1. Allogeneic Stem Cell Transplantation with reduced-intensity conditioning**
- ○ **2. Azacitidine until disease progression**
- ○ **3. Consolidation with 2 courses of intermediate-dose cytarabine (1,5g/m²/12h, 3d)**

In the next four questions, we are asking you a self-evaluation of your willingness to take risks on a 0-10 scale where:

- 0 means «not at all willing to take risks»
- 10 means «fully prepared to take risks»

18.Are you generally a person who is fully prepared to take risks or do you try to avoid taking risks?

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
In your daily life	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

19. For the management of your personal finances, how would you rate your willingness to take risks, from 0 to 10?

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Your personal finances	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

20. Regarding your medical behaviour involving the health of your patients, how would you rate your willingness to take risks, from 0 to 10?

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Your patient's health	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

21. Regarding your medical behaviour involving your own health, how would you rate your willingness to take risks, from 0 to 10?

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Your own health	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

22. In which year did you start residency? *

Please write your answer here:

23. Approximately how many older AML patients do you personnaly manage per year?

Please write your answer here: __

24. Do you consider yourself as an expert in the field of acute myeloid leukemia?

Please choose only one of the following:

- ○ **Yes**
- ○ **No**

25. In general, do medical decisions for AML patients of your center follow specific guidelines?

Please choose only one of the following:

- ○ **Yes**
- ○ **No**

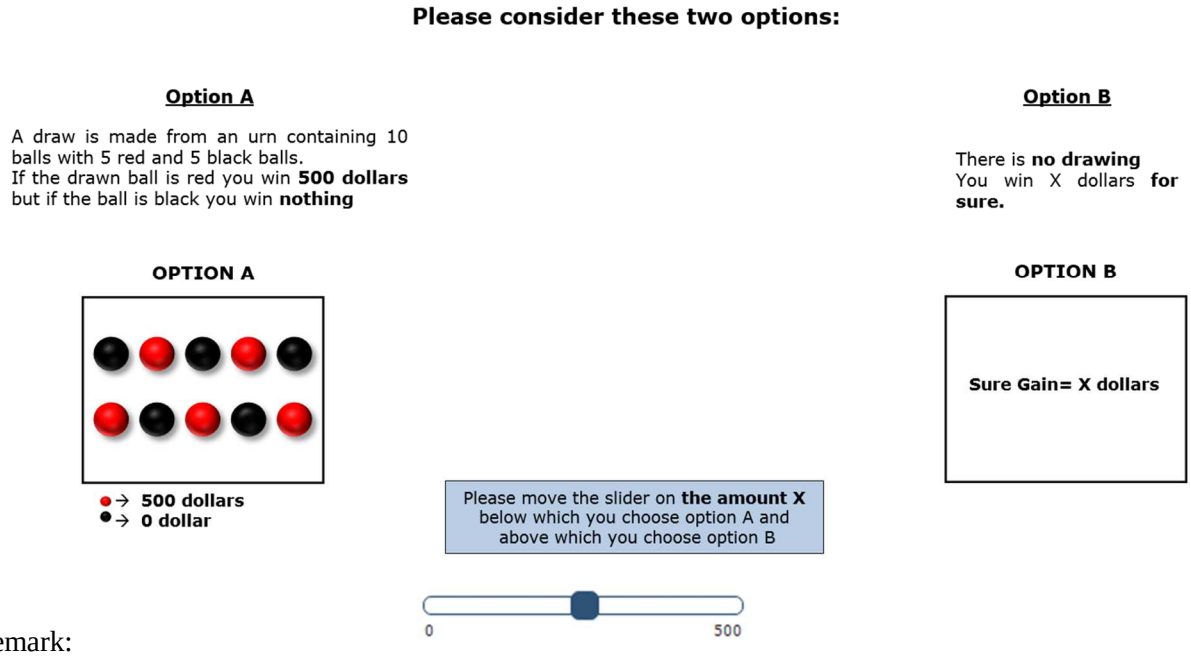
In the next two questions, there are two options: Option A is a gain of X dollars for sure and option B is lottery that gives 500 dollars or nothing depending on the drawing of a ball in an urn.

In each question, you must provide the amount of money X above which you prefer to keep the sure gain and below which you prefer the lottery.

In other words, we are asking you to determine the amount of money X that makes you indifferent between getting it for sure or playing the lottery (with a superior but uncertain gain)

For example, if you choose X=250 this means that you prefer to have 260 dollars for sure rather than to play the lottery and you prefer to play the lottery rather than to have 240 dollars for sure.

26.

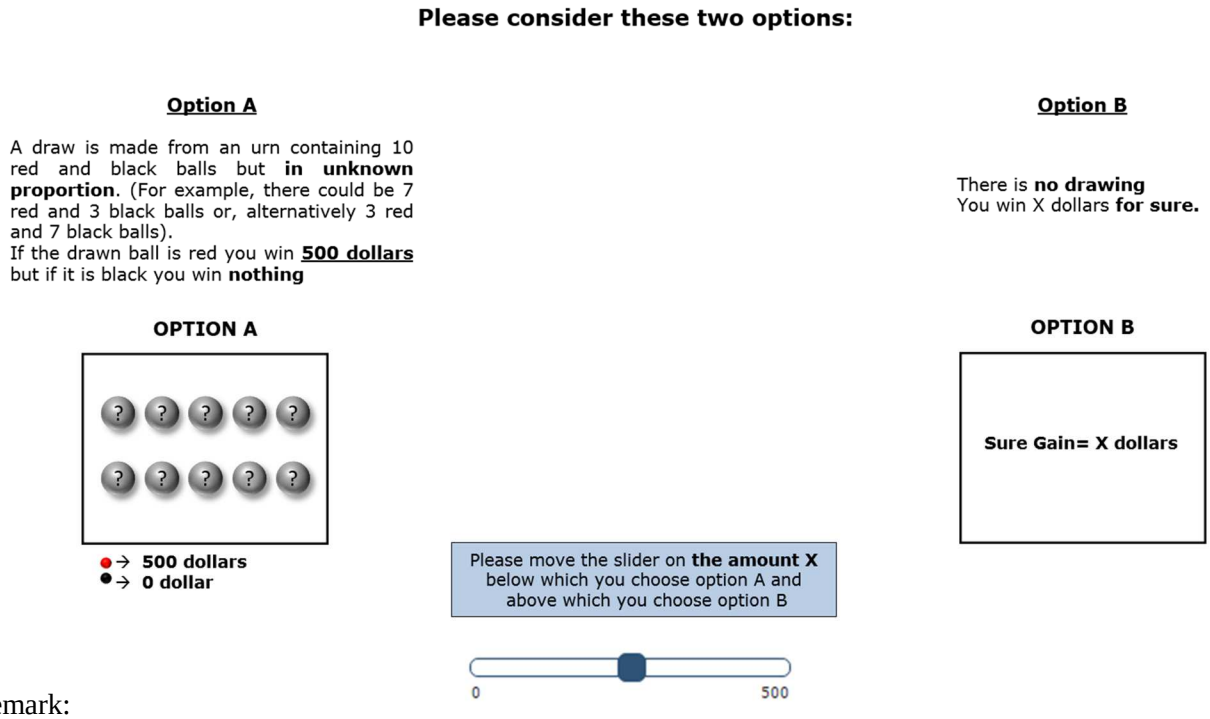


Remark:

It is unlikely that you will choose X=500 dollars because it would mean that you would rather play the lottery (and potentially win nothing) instead of getting 499 dollars for sure.

Similarly, it is unlikely that you will choose X=0 dollar because it would mean that you rather accept 1 dollar for sure instead of playing the lottery (and potentially win 500 dollars).

27.



Remark:

It is unlikely that you will choose X=500 dollars because it would mean that you would rather play the lottery (and potentially win nothing) instead of getting 499 dollars for sure.

Similarly, it is unlikely that you will choose X=0 dollar because it would mean that you rather accept 1 dollar for sure instead of playing the lottery (and potentially win 500 dollars).

Thank you for your precious participation

Section II: Description of the risk and uncertainty attitudes measurement tools

Risk attitude: individual attitudes toward risk were obtained through certainty equivalent elicitation of a lottery. Using a scrollbar (Figure 1A), respondents were asked to provide the amount of money that makes them indifferent between gaining it for sure or playing the lottery giving them 500 euros with half a chance and nothing otherwise. The expected gain of this lottery is 250 euros, so when the elicited certainty equivalent is inferior (equal/superior) to 250 euros, the respondent is considered as risk averse (neutral/seeking).

Uncertainty attitude: individual attitudes towards uncertainty were obtained through certainty equivalent elicitation of a lottery where the probability of gain is unknown. Using the same scrollbar (Figure 1B), respondents were asked to provide the amount of money that makes them indifferent between gaining it for sure or playing the lottery giving them 500 euros with an unknown probability and nothing with an unknown probability.

EU versus non-EU: The expected utility theory is an axiomatic model of decision under uncertainty and is often considered as a normative model of rationality. Allais and Kahneman and Tversky proposed a set of two binary choices that allow to test the independence axiom of the expected utility theory under risk and therefore the adequacy of an individual to the model. These tasks are summarized in Figure1C.

Hereafter, we show why choice patterns AD and BC reveal violation of EU (*irrational*) and why AC and BD are consistent with EU (*rational*): Under EU, a lottery (x,p;0) which gives x with probability p and 0 with probability is evaluated as the expected value of the utilities obtained with each possible gain, i.e. pU(x)+(1-p)U(0). Therefore in the first decision task, choosing A over B reveals that the expected utility of option A is higher than the expected utility of option B, i.e. U(2000)>0.8*U(3000) where U is the utility function of the respondent and U(0)=0. Similarly choosing D over C in the second decision task reveals that 0.25*U(2000)<0.2*U(3000) and therefore that U(2000)<0.8*U(3000) which contradicts the first inequality. Consequently, choice pattern AD indicates a violation of EU. Same line of reasoning applies for the choice pattern BC.

Willingness to take risk (Figure 1D): respondents were asked to self-evaluate their propensity to take risk using a 11-point Likert scale ranging from «not at all willing to take risks» to «fully prepared to take risks» in 4 different domains including their daily life, their personal finances, their patient's health and their own health.

Section III: Response rate analysis and sample representativeness

According to the American Association of Public Opinion Research guidelines[1], the unadjusted response rate of our survey (Response rate 2) is 18.8% (Table S1). Our target population (eligible) was French physicians who treat AML patients, mainly composed of hematologist physicians. This population is known to have very low response rates to mail or internet surveys. In the 2014 Canadian National Physician Survey, response rate among hematologists was 8.9% only, while it was 16% among the entire panel of surveyed physicians[2].

However, given the target population and the characteristics of our mailing list, the adjusted response rate (AAPOR, response rate 4), which takes into account the estimated proportion of cases of unknown eligibility that are eligible, is 45.4%. We detailed hereafter the calculation of this adjusted response rate.

[1] http://www.aapor.org/AAPOR_Main/media/publications/Standard-Definitions20169theditionfinal.pdf

[2] http://nationalphysiciansurvey.ca/wp-content/uploads/2014/10/NPS-2014-Demographics-Internal-Medicine-EN.pdf

Over our 1337 internet invitation of specifically-named persons for answering the survey, about one half are hematologists[3]. Two third of these physicians are expected to be involved in AML (and therefore to be eligible). The other half of the sample is composed of internists and oncologists, among which 10% are expected to be eligible. This gives us an estimated eligibility rate of 38% in our sample (i.e. 508 eligible physicians total). We obtained 230 interviewed and 41 eligible non-interviewed physicians (category 1+2, table S1) and 42 non-eligible (category 4). On the remaining 1024 unknown eligibility non-interviewed physicians (Category 3), we expect 237 (508-271) eligible physicians (applying our eligibility rate of 38 % on the whole sample). This gives us and estimated e (proportion of cases of unknown eligibility that are eligible) equal to the ratio 237/1024= 0.23. Using this value for the calculation of response rate 4, we obtain a value of 45.4% (table S1).

One strategy to enhance the response rate would have been to narrow the mailing list to AML specialized hematologists (and thus increase the eligibility rate of the sample). However, in order to reach the largest participation of clinicians producing direct care for AML patients, we decided to enlarge the mailing list to others medical specialties such as oncology and internal medicine, being aware this would automatically reduce the number of surveyed eligible physicians and conversely the response rate.

Beside response rates, the responder's population displays characteristics of physicians who treat AML patients, confirming the effectiveness of our eligibility condition. In fact, 86 % of them were specialist in hematology, 72% were practicing in academic centers and the median number of older AML pts treated a year per physician was 20.7. Comparison of respondents versus non-respondents' characteristics showed no differences in term of gender and geographical area. (table S2).

Table S1: AAPOR Outcome Rate Calculator (Internet specifically named persons)

	Final Disposition Codes	
Interview (Category 1)		**230**
Complete (all versions)	1.0/1.10	211
Partial (all versions)	1,2000	19
Eligible, non-interview (Category 2)	**2,0000**	**41**

[3] http://www.data.drees.sante.gouv.fr

Refusal (phone, IPHH, mail, web)	2,1100	12
Household-level refusal (phone, IPHH, mail, web)	2,1110	0
Known-respondent refusal (phone, IPHH, mail, web)	2,1120	0
Logged on to survey, did not complete any item (web)	2,1121	4
Read receipt confirmation, refusal (web)	2,1122	0
Break off/ Implicit refusal (phone, mail, web, mail_U)	2,1200	20
Non-contact (phone, IPHH, mail, web, mail_U)	2,2000	0
Respondent unavailable during field period (web)	2,2600	5
Completed questionnaire, but not returned during field period (mail, web, mail_U)	2,2700	0
Other, non-refusals (phone, IPHH, mail, web, mail_U)	2,9000	0
Unknown eligibility, non-interview (Category 3)	**3,0000**	**1024**
Unknown if housing unit/unknown about address (phone, IPHH, mail, web, mail_U)	3,1000	0
Not attempted or worked/not mailed/No invitation sent (phone, IPHH, mail, web, mail)U)	3,1100	0
Nothing returned (mail, web, mail_U)	3,1900	1024
Housing unit, unknown if eligible respondent (phone, IPHH, mail, mail_U)	3,2000	0
No screener completed (phone, IPHH, mail, mail_U)	3,2100	0
Unknown if person is a HH resident/ mail returned undelivered (phone, mail, web, mail_U)	3,3000	0
Other (phone, IPHH, web)	3,9000	0
Returned from an unsampled email address (web)	3,9100	0
Not eligible (Category 4)	**4,0000**	**42**
Out of sample - other strata than originally coded (phone, IPHH, mail, web, mail_U)	4,1000	19
Not eligible - duplicate listing (phone, IPHH, mail, web, mail_U)	4,8100	17
Other	4,9000	6
Total sample used		**1337**
I=Complete Interviews (1.1)		211

P=Partial Interviews (1.2)		19
R=Refusal and break off (2.1)		36
NC=Non Contact (2.2)		
O=Other (2.0, 2.3)		0
e is the estimated proportion of cases of unknown eligibility that are eligible.		0.23
UH=Unknown Household (3.1)		904
UO=Unknown other (3.2-3.9)		0
Response rates		
Response Rate 1 = I/(I+P) + (R+NC+O) + (UH+UO)		0.163
Response Rate 2 = (I+P)/(I+P) + (R+NC+O) + (UH+UO)		0.178
Response Rate 3 =I/((I+P) + (R+NC+O) + e(UH+UO))		0.417
Response Rate 4 = (I+P)/((I+P) + (R+NC+O) + e(UH+UO))		0.454
Cooperation rates		
Cooperation Rate 1= I/(I+P)+R+O)		0.793
Cooperation Rate 2 = (I+P)/((I+P)+R+O))		0.865
Cooperation Rate 3 = I/((I+P)+R))		0.793
Cooperation Rate 4 = (I+P)/((I+P)+R))		0.865
Refusal rates		
Refusal Rate 1 = R/((I+P)+(R+NC+O) + UH + UO))		0.028
Refusal Rate 2 = R/((I+P)+(R+NC+O) + e(UH + UO))		0.071
Refusal Rate 3 = R/((I+P)+(R+NC+O))		0.133
Contact rates		
Contact Rate 1 = (I+P)+R+O / (I+P)+R+O+NC+ (UH + UO)		0.205
Contact Rate 2 = (I+P)+R+O / (I+P)+R+O+NC + e(UH+UO)		0.525
Contact Rate 3 = (I+P)+R+O / (I+P)+R+O+NC		0.982

Table S2: Characteristics of French Physicians to Whom the Survey Was Mailed, Including Respondents and Nonrespondents

		Overall sample (n=1337)		Respondents (n=230)		Non respondents (n=1107)		p-value
		n	%	n	%	n	%	
gender	men	670	50.1	123	53.5	547	49.5	0.346
	women	667	49.9	107	46.5	560	50.5	
workplace	academic centers	857	64.1	166	72.2	691	62.4	0.017
	non-academic centers	480	35.9	64	27.8	416	37.6	
geographical area	north	160	12	34	14.8	126	11.4	0.340
	east	187	14	38	16.5	149	13.5	
	west	216	16.2	30	13	186	16.8	
	south-west	222	16.6	45	19.6	177	16	
	south méditerranée	166	12.4	27	11.7	139	12.6	
	rhône-alpes/Auvergne	139	10.4	24	10.4	115	10.4	
	île de France	248	18.5	32	13.9	216	19.5	

Section IV: K-means clustering description

The table below shows the results of the k-means clustering with a constraint of k=3 in order to identify groups of clinicians rather homogeneous regarding their therapeutic choices across the clinical scenarii. As we described in the method section, we computed an overall score by summing the modalities of each scenario resulting in a score between 6 and 18, which aimed at translating the global individual choice in the study. The higher the score, the higher the propensity to choose best supportive care. Conversely, the lower the score, the higher the propensity to choose intensive chemotherapy.

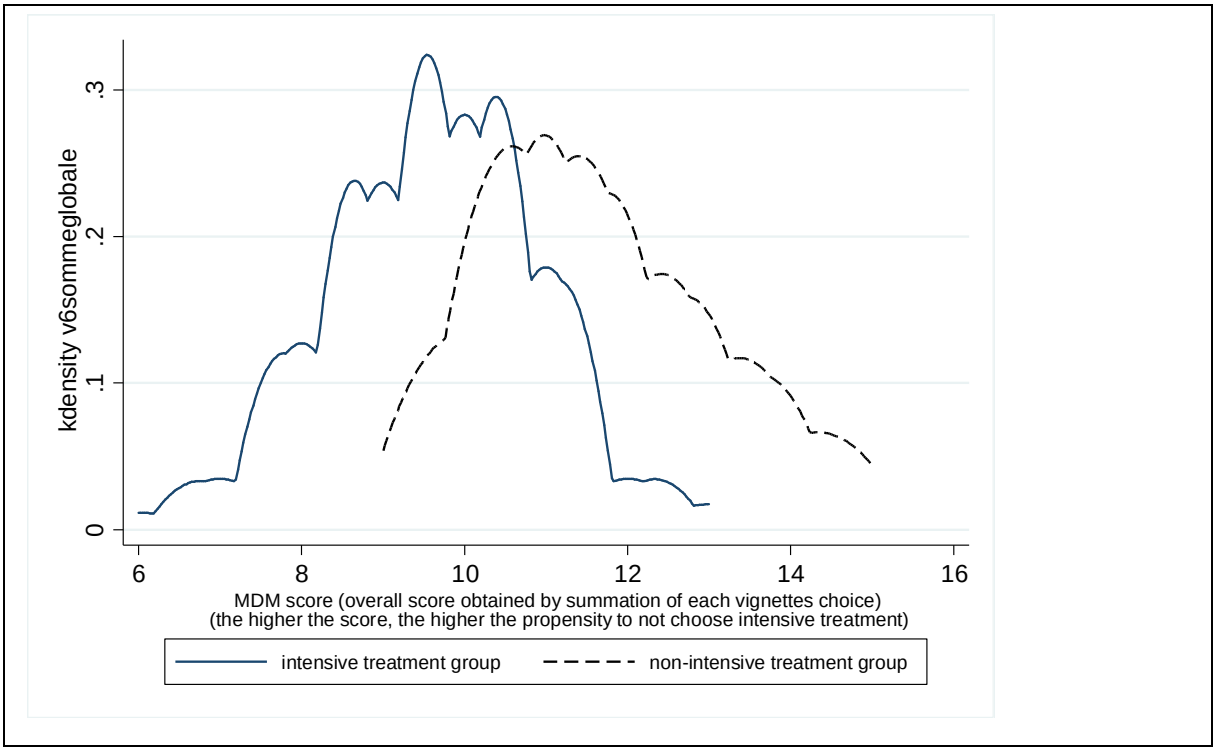
Thus, we obtained two groups with an overall score means of 9.63 [9.43; 9.84] and 11.67 [11.33; 12.01] we identified respectively as a group with clinician more inclined to choose intensive chemotherapy “IC group” and a group with clinician more inclined to not choose intensive chemotherapy “non-IC group”.

Table S3: description of the groups of homogeneous patterns of decision (n=230)

	clinicians who are more inclined to propose:	
	intensive chemotherapy (group “IC”)	best supportive care (group “non-IC”)
number of clinician	160	70
overall score* (mean [95% confidence interval])	9.63 [9.43; 9.84]	11.67 [11.33; 12.01]

* The higher the score, the higher the propensity to choose best supportive care. Conversely, the lower the score, the higher the propensity to choose intensive chemotherapy.

Supplementary figure 1: Kernel Density of the Groups of Homogeneous Patterns of Decision to the 6 Clinical Vignettes (n=230)



Annexe III : Matériel supplémentaire article#3, ***TP53* mutations negatively impact survival of acute myeloid leukemia patients treated with standard doses of azacitidine (in process)**

Table S1: Primers used for TP53 targeted sequencing

Exon	Primer
TP53_X04_F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTGCACCAGCAGCTCCTACA
TP53_X04_R22	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCAGGCATTGAAGTCTCATGGAA
TP53_X05_F12	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAACTCTGTCTCCTTCCTCTTCCTAC
TP53_X05_R22	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGTCGTCTCTCCAGCCCCAGC
TP53_X06_F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTCTGATTCCTCACTGATTGC
TP53_X06_R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTTAACCCCTCCTCCCAGAG
TP53_X07_F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTGGGCCTGTGTTATCTCCT
TP53_X07_R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGGCAAGTGGCTCCTGAC
TP53_X08_F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTGCTTCTCTTTTCCTATCCTGA
TP53_X08_R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCTTCTTGTCCTGCTTGCTT
TP53_X09_F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTTTCCTTGCCTCTTTCCT
TP53_X09_R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCACTTGATAAGAGGTCCCAAG
TP53_X10_F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAACCATCTTTTAACTCAGGTACTGTGTAT
TP53_X10_R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGAAGGGGCTGAGGTCACTC

Table S2: TP53 mutation functional characterization and patient outcome

Case	Codon	AA change	Disruptive mutation	EA TP53 score	RFS (log2)	Response	Follow up status (months)
11	154	Gly>Val	Non-disruptive	89.76	-0.7895	CRi	Dead(9.9)
15	248	Arg>Trp	Disruptive	84.11	0.0740	CR	Dead(14)
17	103	Tyr>FS	Disruptive	-	0.2865	Failure	Dead(2.7)
20	282	Arg>Trp	Non-disruptive	73.21	0.0160	Failure	Dead(1.9)
21	143	Val>Met	Non-disruptive	51.72	-1.3307	Failure	Dead(1.2)
25	248	Arg>Trp	Disruptive	84.11	0.0740	Failure	Dead(3.1)
31	280	Arg>Gly	Non-disruptive	95.71	-0.5223	Failure	Dead(1.3)
34	273	Arg>His	Non-disruptive	66.12	0.2503	Failure	Dead(0.9)
37	234	Tyr>Cys	Disruptive	-	0.7908	Failure	Dead(10.6)
42	220	Tyr>Cys	Non-disruptive	72.52	0.0944	CR	Dead(18.5)
48	175	Arg>His	Non-disruptive	78.51	-0.1449	Failure	Dead(2.2)
55	250	Pro>Leu	Non-disruptive	89	-0.2583	Failure	Dead(9.4)
56	276	Ala>Gly	Non-disruptive	60	-0.0626	Failure	Dead(9.3)
58	59	Pro>FS	Disruptive	-	-	CR	Dead(19.1)
69	220	Tyr>Cys	Non-disruptive	72.52	0.0943	HI	Dead(9.7)
70	91	Trp>X	Disruptive	48.46	0.8378	Failure	Dead(2.1)
90	158	Arg>His	Non-disruptive	80.98	-0.5980	CR	Dead(12.8)
94	273	Arg>His	Non-disruptive	66.12	0.2503	Failure	Dead(4.6)
101	273	Arg>Cys	Non-disruptive	84.52	-0.1254	Failure	Dead(2.4)
104	360	Gly>Ala	Non-disruptive	28.06	-	CR	Dead(24.8)
109	179	His>Tyr	Disruptive	77.78	0.6499	PR	Dead(14.7)
111	273	Arg>His	Non-disruptive	66.12	0.2503	HI	Dead(11.9)
123	144	Gln>FS	Disruptive	-	0.4349	Failure	Dead(2.6)
124	232	Ile>Ser	Non-disruptive	67.76	-0.0234	CR	Alive (20.4)
130	273	Arg>Cys	Non-disruptive	84.52	-0.1254	CR	Dead(14.3)
133	236	Tyr>Cys	Non-disruptive	62.93	0.0888	HI	Dead(13.7)
135	216	Val>Met	Non-disruptive	73.3	-1.9189	Failure	Dead(2.3)
138	253	Thr>Ala	Disruptive	89.56	-0.2070	Failure	Dead(2.5)
139	273	Arg>His	Non-disruptive	66.12	0.2503	Failure	Dead(8.2)
140	275	Cys>Tyr	Non-disruptive	93.47	0.4055	HI	Dead(7)
152	135	Cys>Tyr	Non-disruptive	79.31	0.1868	CRi	Dead(8.9)
154	272	Val>Met	Non-disruptive	63.49	0.2274	CR	Dead(15.1)
158	127	Ser>Thr	Non-disruptive	64	0.5790	CR	Dead(13.9)
160	273	Arg>Leu	Non-disruptive	87.45	0.0445	Failure	Dead(13.2)
161	238	Cys>Tyr	Non-disruptive	92.66	0.2148	Failure	Dead(0.8)
163	245	Gly>Ser	Non-disruptive	89.56	0.2621	Failure	Dead(3.6)
174	215	Ser>Arg	Non-disruptive	89.07	0.0033	Failure	Dead(1.9)
181	136	Gln>X	Disruptive	-	0.1405	Failure	Dead(10.4)
182	136	Gln>Glu	Non-disruptive	50.94	-0.0856	Failure	Dead(1.6)
189	136	Gln>Glu	Non-disruptive	50.94	-0.0856	HI	Dead(5.7)
195	241	Ser>FS	Disruptive	-	0.5295	Failure	Dead(7.9)
197	220	Tyr>Asn	Non-disruptive	74.47	0.1565	Failure	Dead(1)
200	150	Thr>FS	Disruptive	-	0,3863	Failure	Dead(2.2)
202	248	Arg>His	Disruptive	84.11	0.0739	CR	Dead(37.6)
217	175	Arg>His	Non-disruptive	78.51	-0.1449	Failure	Dead(10.4)
227	213	Arg>X	Disruptive	-	0.5642	Failure	Dead(0.8)

240	283	Arg>Cys	Non-disruptive	69.69	-1.5004	Failure	Dead(3.9)
243	135	Cys>Thr	Non-disruptive	69.53	-2.5250	Failure	Dead(5.3)
248	220	Tyr>Cys	Non-disruptive	72.52	0.0944	HI	Dead(21)
249	280	Arg>Lys	Non-disruptive	71.18	0.1868	Failure	Dead(8.1)
251	215	Ser>Asn	Non-disruptive	68.04	0.2742	Failure	Dead(2.4)
269	273	Arg>Cys	Non-disruptive	84.52	-0.1254	Failure	Alive (6.3)
271	234	Tyr>Cys	Non-disruptive	62.94	0.5111	Failure	Dead(2.5)
276	248	Arg>Trp	Disruptive	84.11	0.0740	Failure	Dead(3.1)
285	273	Arg>Ser	Non-disruptive	85.17	0.0550	HI	Dead(17.1)

Disruptive mutation affected L2/L3 loops of the DNA binding domain or were truncative mutations, EA TP53 score: evolutionary action score calculated with http://mammoth.bcm.tmc.edu/cgi-bin/panos/EAp53.cgi; RFS: relative flexible score, CR complete remission, CRi complete remission with incomplete hematological recovery, HI hematological improvement.

Annexe IV : Matériel supplémentaire article#4, **Exome sequencing identifies *MECOM* missense variant as a prognostic marker for overall survival of elderly acute myeloid leukemia patients treated with azacitidine (in process)**

Table S2: Primers used for the 4 selected SNP targeted sequencing

Gene	SNP	Strand	Primer
MECOM	rs7622799	F1	TGTGGATGCTTAAACAATCTCTTCT
		R1	CCTGCTGAGTTTGAACTTCGA
TOBP6L	rs777851038	F1	GCACTGGCGGAGTTCCAA
		R1	AACTTCGCGGTCTCCTCACA
DZIP1	rs11070136	F1	GCTGCATCTGTTCCTTGCA
		R1	CTTCGGGAAGAACACAGTGA
ZNF543	rs10410649	F1	TATGAATGCAGTGAGTGTGGAA
		R1	GATGTTCCCTTTCACCACAGA

Pierre BORIES

Identification de biomarqueurs de réponse à l'azacitidine dans les leucémies aigues myéloïdes du sujet âgé

Résumé

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) du sujet âgé sont les plus fréquentes des leucémies aiguës. Bien que de physiopathologie hétérogène, elles partagent un pronostic défavorable. L'azacitidine est devenue un des traitements de référence pour les patients jugés inéligibles pour une chimiothérapie intensive mais les critères de sélection des patients entre ces deux approches sont controversés. L'identification de biomarqueur prédictif de réponse à l'azacitidine doit permettre de rationnaliser ce choix thérapeutique. Les facteurs pronostiques classiques d'une cohorte de 334 patients atteints de LAM manquent de précision pour guider la meilleure stratégie pour un patient donné. A partir du séquençage de 224 patients traités par azacitidine, nous montrons un impact défavorable des mutations de *TP53* sur la survie globale, quel que soit leur caractérisation fonctionnelle. Le séquençage des exomes de 49 patients selon leur réponse à l'azacitidine (26 répondeurs et 23 non répondeurs), suivi du re-séquençage ciblé de 4 polymorphismes chez 175 patients a montré un impact positif du polymorphisme rs7622799 de *MECOM* sur la survie globale sous azacitidine.

Mots-clés : Leucémies aiguës myéloïdes, agent hypométhylant, biomarqueur prédictif, séquençage de nouvelle génération, *TP53*, *MECOM*

Résumé en anglais

Elderly patients with acute myeloid leukemias (AML) represent the most frequent acute leukemias. Although they differ in their pathophysiology, they all share an adverse prognosis. Azacitidine has become one of the reference low-intensity frontline therapy for patients deemed unfit for intensive chemotherapy. Patients selection between these 2 options remains controversial. Predictive biomarkers of response to azacitidine should allowed to rationalize this decision making. Classical prognosis factors of a cohort of 334 newly diagnosed AML lack of precision to determine the optimum strategy for any individual patient. By sequencing of a 224-patients series of azacitidine-treated AML patients, we demonstrate an adverse impact of *TP53* mutation on overall survival, irrespective of the functional characterization of p53 mutants. Exome sequencing of 49 patients with extreme phenotype as defined by their response under azacitidine (26 responders versus 23 non-responders), followed by targeted sequencing of 4 common polymorphisms in a validation set of 175 patients, showed a positif impact of *MECOM* rs7622799 on overall survival.

Key-words: Acute myeloid leukemia, hypomethylating agent, predictive biomarker, next-generation sequencing, *TP53*, *MECOM*