

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

Yann Ferret
09/06/2017



Introduction

- ▷ Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par la prolifération incontrôlée de cellules myéloïdes immatures dont la différenciation est bloquée (blastes).
- ▷ Age médian au diagnostic 71 ans en France
- ▷ Guérison possible dans 30 à 50% des cas, mais **taux et durées de rémission très divers**
- ▷ Traitement : Essentiellement chimiothérapie +/- allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH)
Fonction du **pronostic de la maladie** et de la **capacité du patient à supporter la toxicité**.
- **Classement indispensable des patients en groupes de pronostic** conditionnant la prise en charge.
Intègre divers facteurs pronostiques liés au patient et à la pathologie.

Maladie résiduelle (MRD)

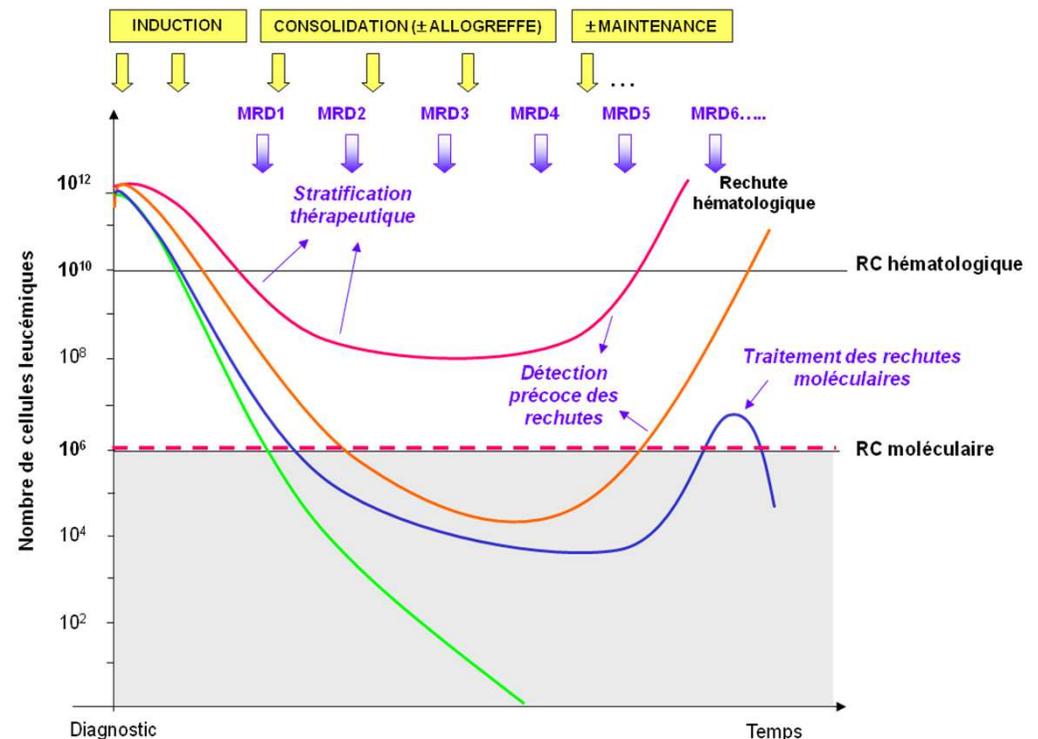
▷Contingent de cellules pathologiques encore présentes à un stade donné du traitement

▷Quantifiable par des techniques sensibles (CMF, Biologie moléculaire)

▷Impact pronostique prouvé mais hétérogénéité des marqueurs
Impact pronostic variable
Perte au cours de l'évolution clonale

▷Absence de marqueur chez certains patients

▷Attitude thérapeutique à l'étude
Intensification guidée par la réponse moléculaire
Traitement pré-emptif de la rechute



Mutations d'*IDH 1/2*

▷ Marqueurs potentiels de MRD:

Précocité dans la leucémogénèse

Simplicité d'analyse (3 codons : *IDH1* R132, *IDH2* R140 et R172)

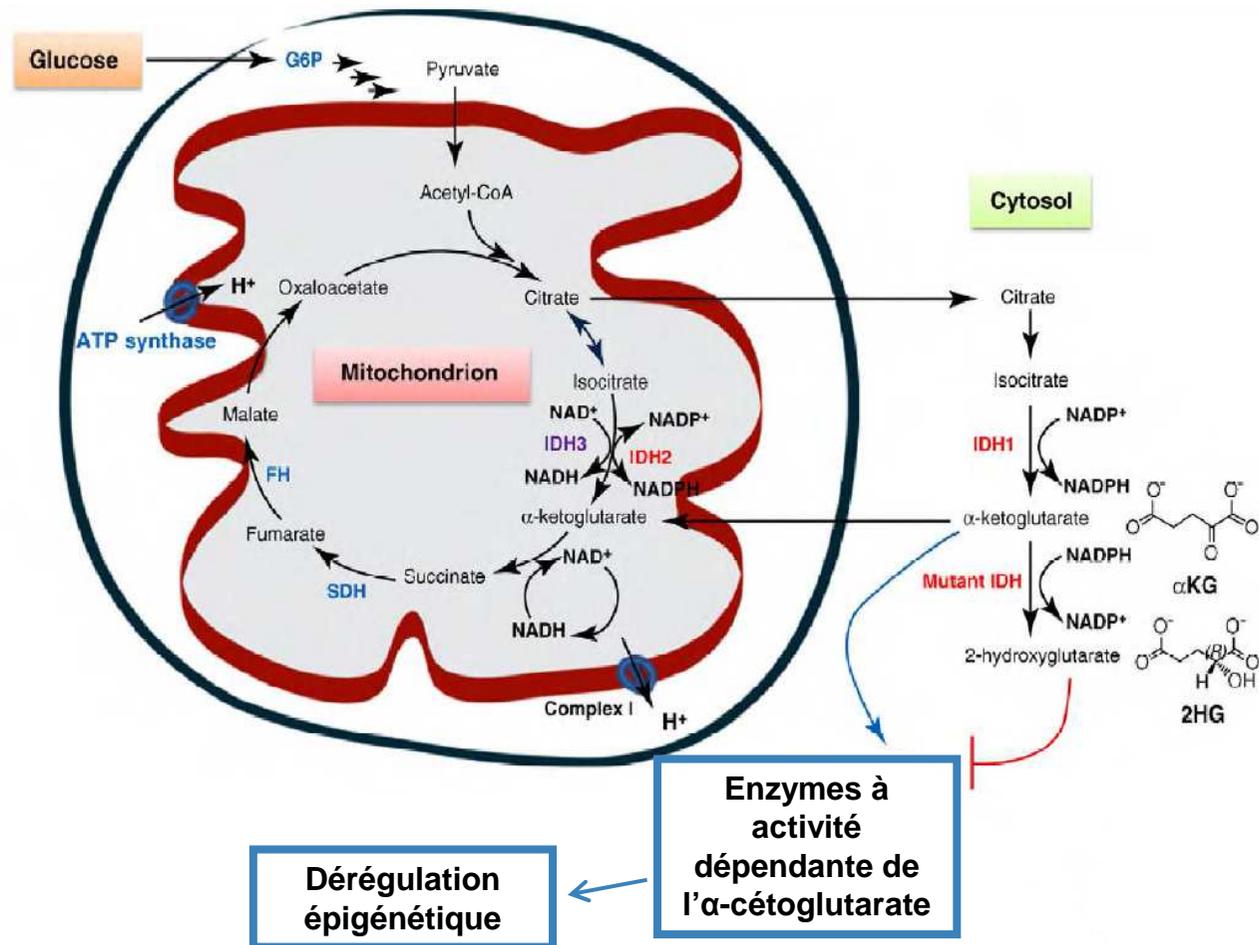
Fréquence : 15% LAM, préférentiellement caryotype normal, *NPM1m*

Nouveau statut de cible thérapeutique

▷ *IDH2* R172 entité biologique et clinique distincte, taux de RC plus faibles*

*Marcucci G, et al. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2010 May 10;28(14):2348–55./Green CL, et al. Blood. 2011 Jul 14;118(2):409–12./Boissel N, et al. J Clin Oncol. 2010 Oct 8;28(23):3717–23.

Mutations d'*IDH* 1/2



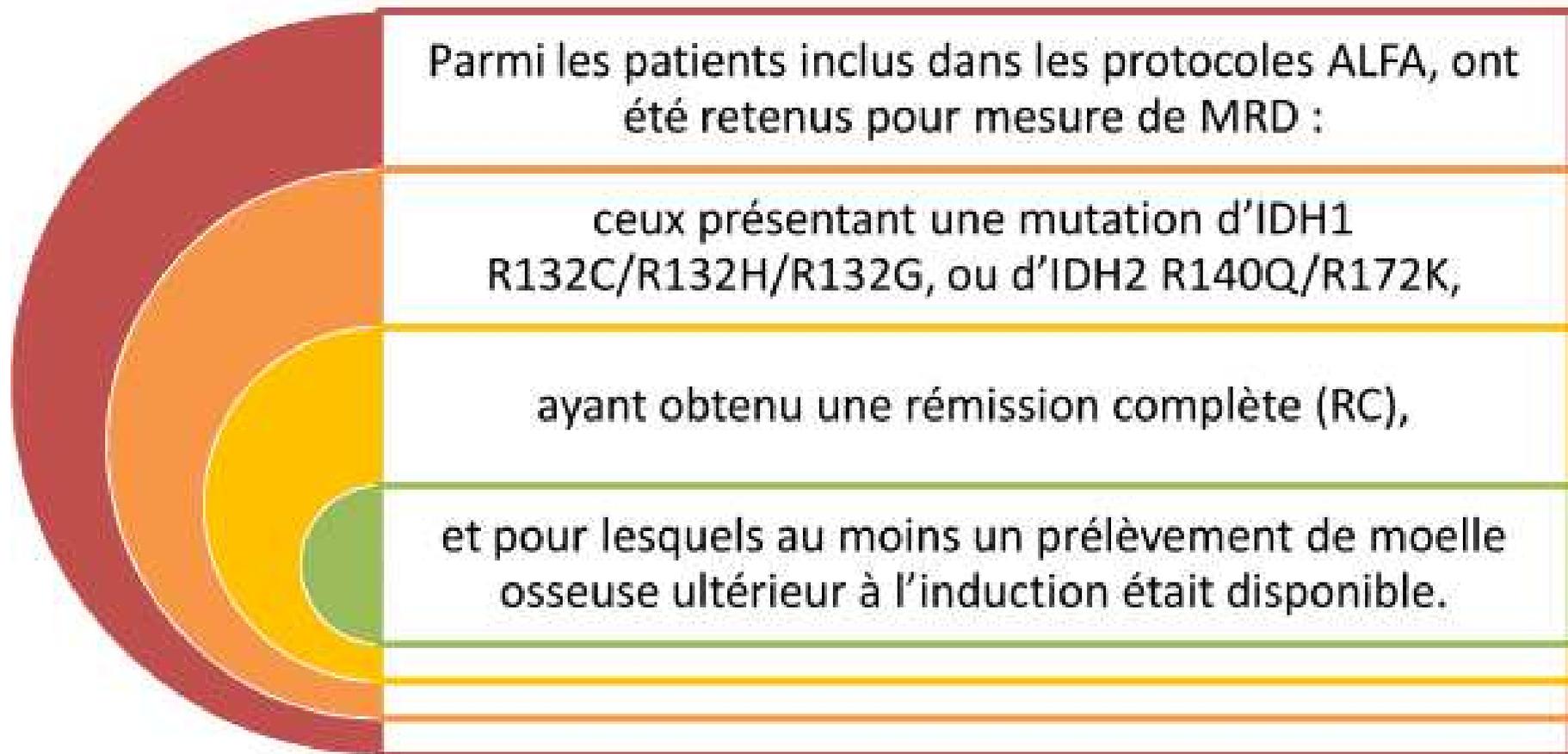
▷ Mutations hétérozygotes gain de fonction

▷ Oncométabolite : 2-hydroxyglutarate

Objectifs

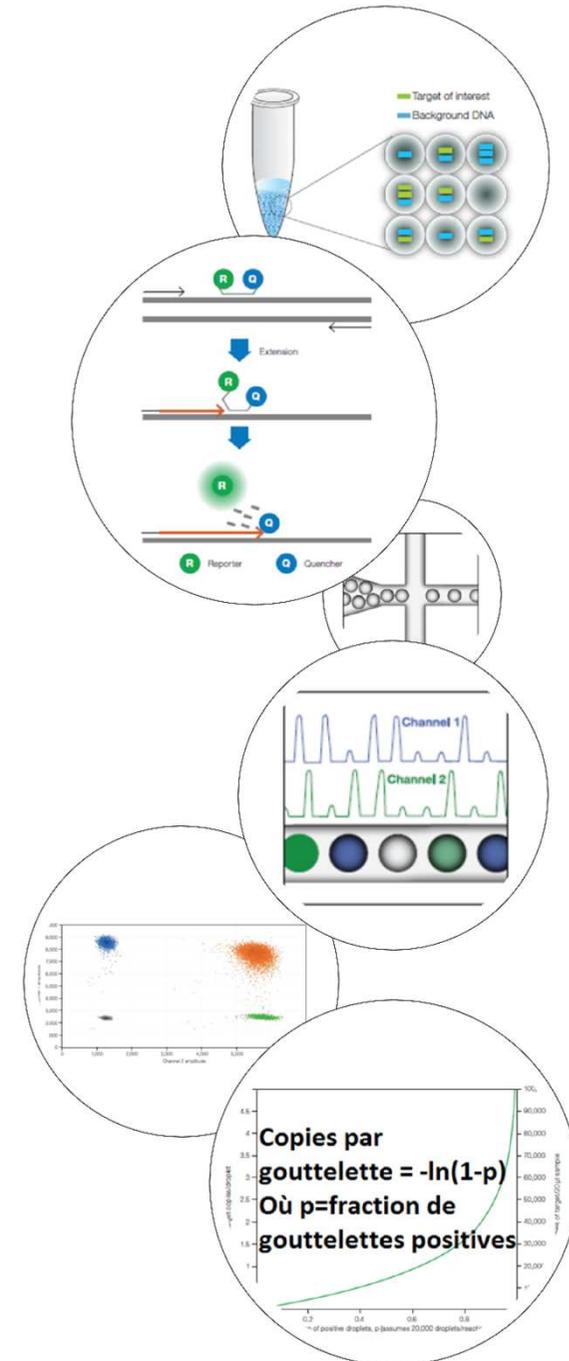
- ▷ Evaluer la faisabilité et les performances de la **PCR** digitale dans cette application
- ▷ Sensibilité analytique meilleure qu'en séquençage haut débit (0,1%)
- ▷ Evaluation de impact pronostique de la MRD *IDH1/2* dans les LAM sur une large cohorte

Matériel et méthodes : Patients

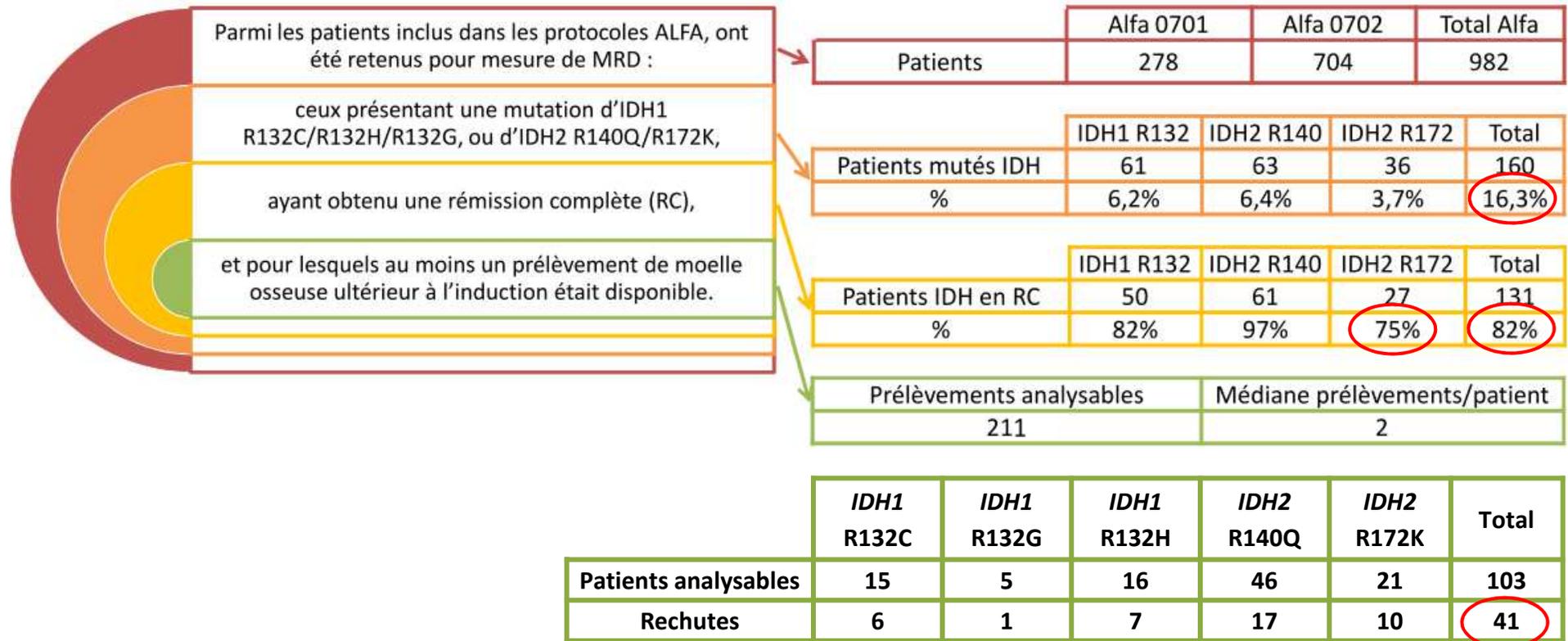


Matériel et méthodes : PCR digitale

- ▷ Fractionnement de l'échantillon en milliers de compartiments distincts, distribution aléatoire des cibles
- ▷ Amplification PCR des cibles
- ▷ Comptage en point final des compartiments contenant initialement au moins un exemplaire de la cible, et des compartiments vides
- ▷ Calcul des quantités absolues de cibles dans l'échantillon (loi de poisson)

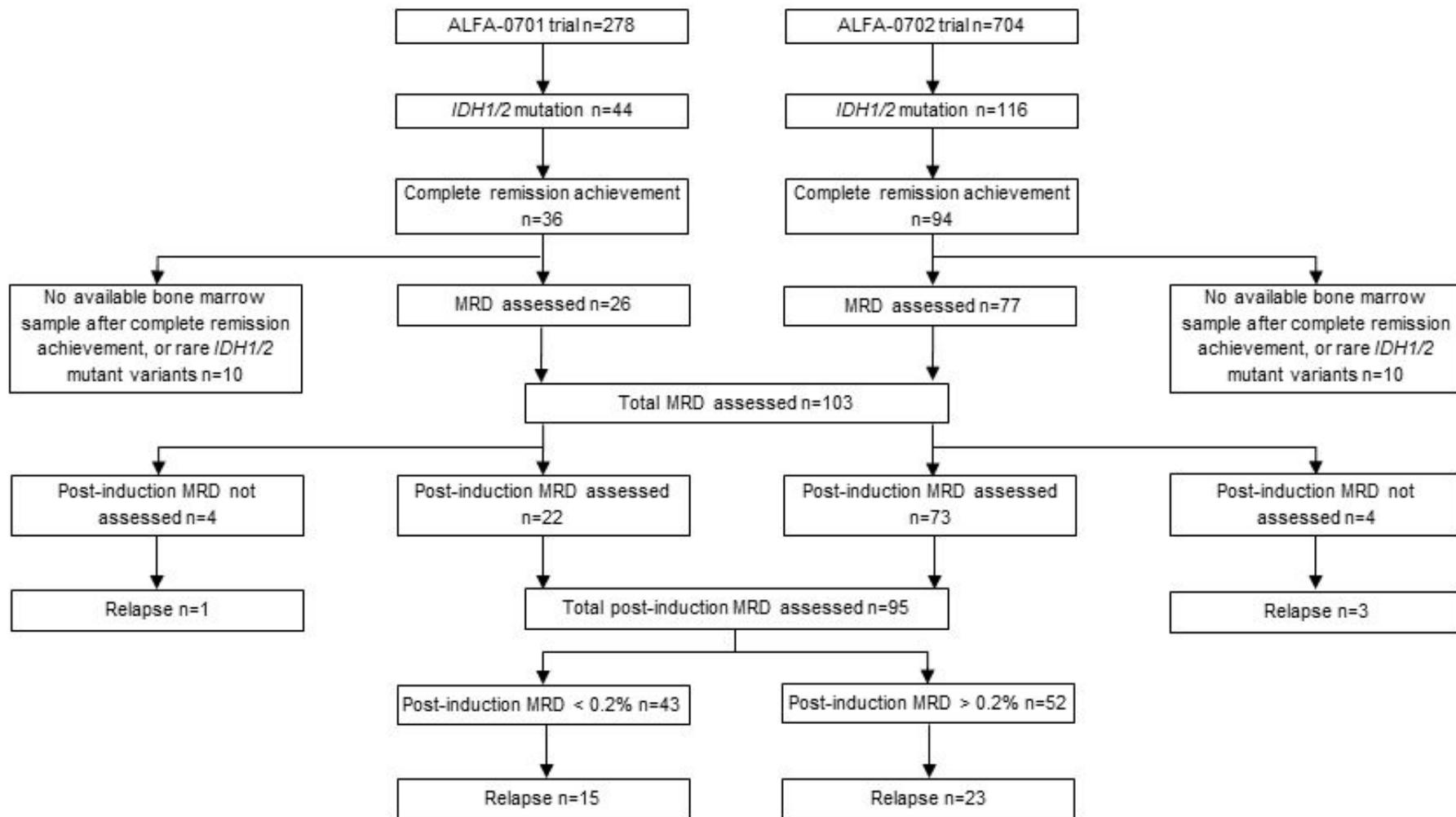


Résultats : Patients



► Au diagnostic les prélèvements de moelle (60) ou à défaut de sang (37) de 97 des 103 patients ont également été analysés

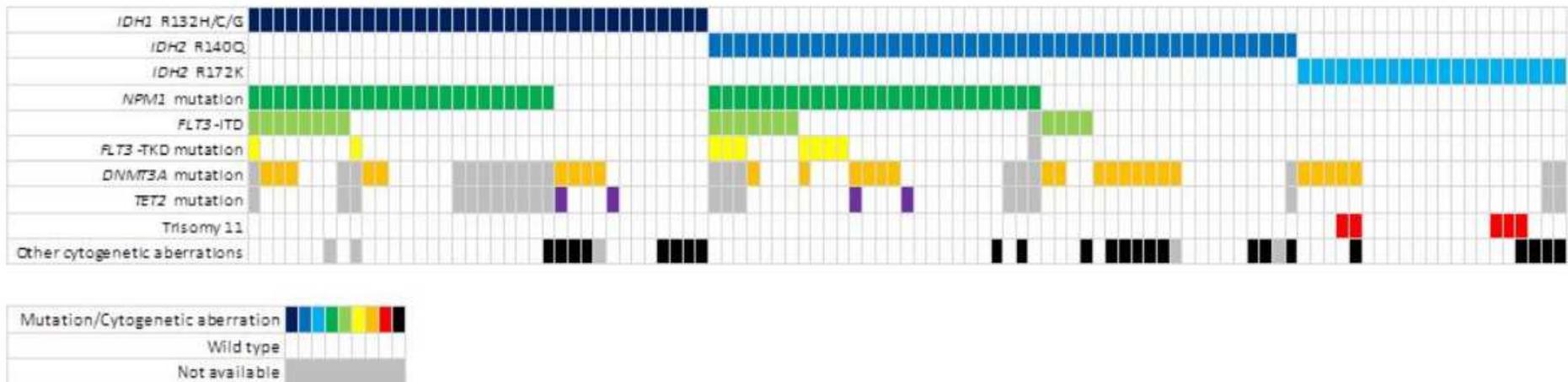
Résultats : Patients



Résultats : Caractéristiques des patients inclus

		ALFA 0701	ALFA 0702	Total général	%
Effectif	Patients	26	77	103	
	Femmes	16	39	55	53,4%
	Hommes	10	38	48	46,6%
Age (années)	Age median	61,8	50,5	54,1	
	Age min	51,2	22,1	22,1	
	Age max	69,6	60,0	69,6	
Leucocytose au diagnostic (G/L)	Leucocytose diag médiane	18,4	5,5	7,5	
	Leucocytose diag min	0,8	0,76	0,76	
	Leucocytose diag max	157	377,4	377,4	

Résultats : Profil cytogénétique et mutationnel



Résultats : Profil cytogénétique

▷ Pas de LAM-CBF

▷ 75% caryotypes normaux

▷ 8% cytogénétique de pronostique ELN défavorable

▷ 25% IDH2 R172K associée à trisomie 11

	<u>IDH1</u>	IDH R140Q	<u>IDH R172K</u>	<u>IDH2 total</u>
5q-, 11q-		2,4%		1,6%
7q-, complexe	3,0%			
9q-		2,4%		1,6%
complexe	3,0%			
del7q/+8, +10			5,0%	1,6%
Echec				
monosomie 7	3,0%	4,9%		3,3%
<u>Normal</u>	<u>75,8%</u>	80,5%	65,0%	<u>75,4%</u>
t(1;16),+der(1)t(1;1)	3,0%			
t(1;7)		2,4%		1,6%
t(3;5)		2,4%		1,6%
t(6;9)	3,0%			
t(8;22)	3,0%			
tétraploïde		2,4%	5,0%	3,3%
<u>trisomie 11</u>			<u>25,0%</u>	8,2%
trisomie 13		2,4%		1,6%
trisomie 4	3,0%			
trisomie 8	3,0%	6,8%	4,8%	6,2%

Résultats : Profil mutationnel

		<u>IDH1</u>	<u>IDH2 R140Q</u>	<u>IDH2 R172K</u>	IDH2 Total
Mutation de <i>NPM1</i>	<i>NPM1wt</i>	33,3%	43,5%	100,0%	61,2%
	<u><i>NPM1m</i></u>	66,7%	56,5%	0,0%	38,8%
Duplication interne en tandem de <i>FLT3</i>	<i>FLT3-ITD</i> Négatif	77,8%	75,6%	100,0%	83,3%
	<u><i>FLT3-ITD</i></u>	22,2%	24,4%	0,0%	16,7%
Autre mutation de <i>FLT3</i>	<i>FLT3m</i> Négatif	94,4%	84,4%	100,0%	89,4%
	<i>FLT3m</i>	5,6%	15,6%	0,0%	10,6%
Mutation de <i>CEBPA</i>	<i>CEBPAwt</i>	97,1%	95,5%	95,2%	95,4%
	<i>CEBPAm</i>	2,9%	4,5%	4,8%	4,6%
Mutation de <i>DNMT3A</i>	<i>DNMT3Awt</i>	64,0%	61,5%	73,7%	65,5%
	<u><i>DNMT3Am</i></u>	36,0%	38,5%	26,3%	34,5%
Mutation de <i>DNMT3A</i> R882	<i>DNMT3A</i> R882 Négatif	92,0%	69,2%	89,5%	75,9%
	<i>DNMT3A</i> R882	8,0%	30,8%	10,5%	24,1%
Mutation de <i>TET2</i>	<i>TET2wt</i>	92,0%	94,9%	94,7%	94,8%
	<i>TET2m</i>	8,0%	5,1%	5,3%	5,2%

▷ 29% LAM-CN, *NPM1m*, *FLT3wt*

Résultats : Limites de détection

▷ Approximation

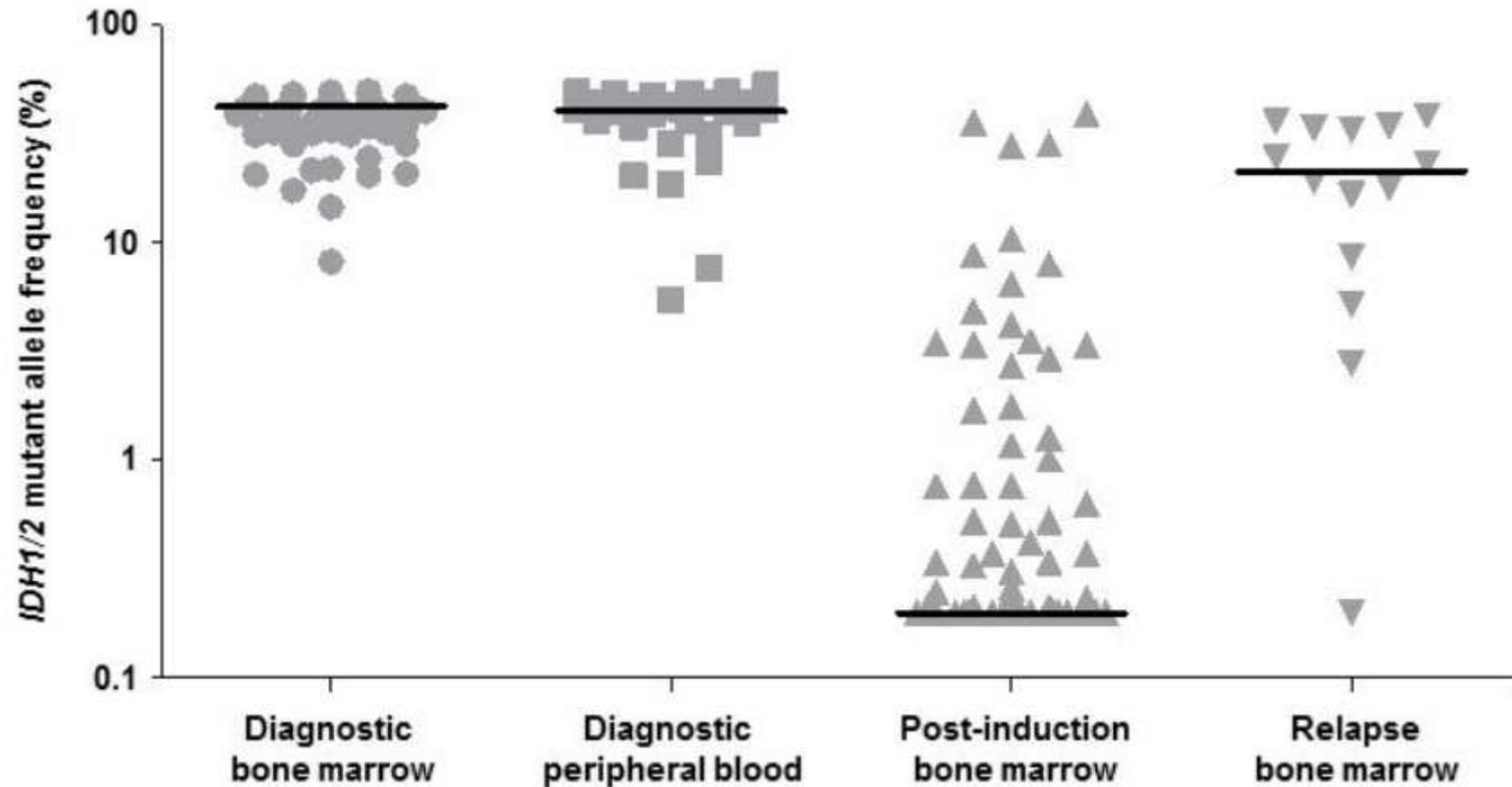
LOD= moyenne échantillons contrôles WT+3 écart-types

	LOD
<i>IDH2</i> R140Q	0,090
<i>IDH2</i> R172K	0,044
<i>IDH1</i> R132C	0,176
<i>IDH1</i> R132H	0,090
<i>IDH1</i> R132G	0,018

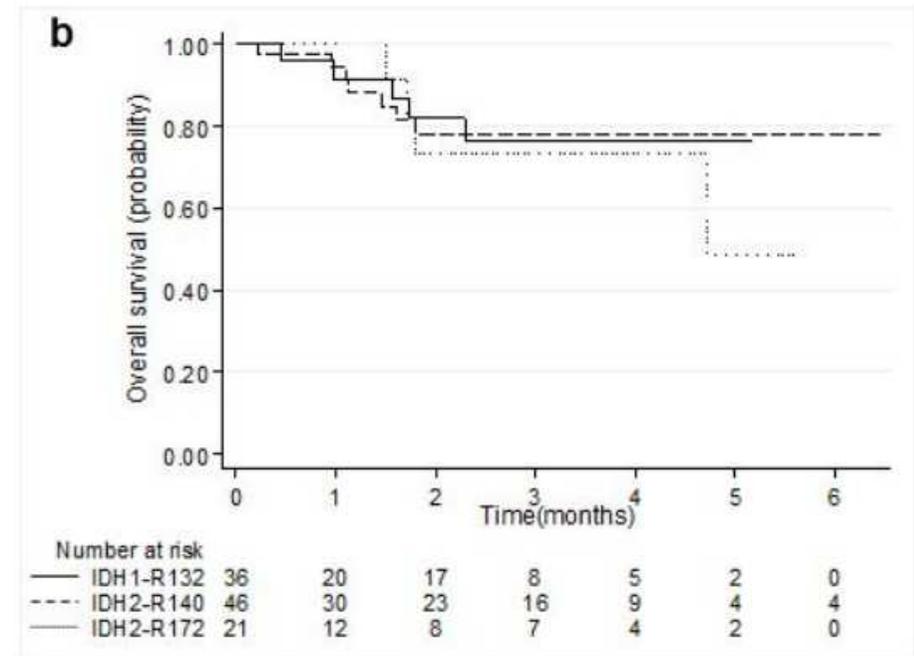
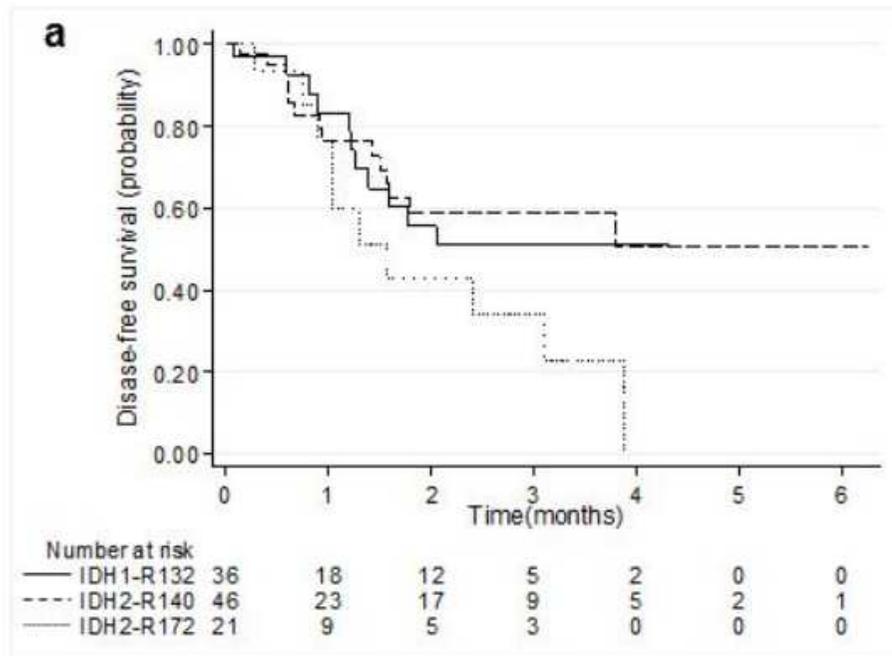
▷ Objectif 10^{-4} non atteint, seuils proches de 10^{-3}

▷ Seuil retenu pour analyse proche de la LOD la plus élevée → 0,2%

Abondance fractionnelle au diagnostic et au cours du suivi



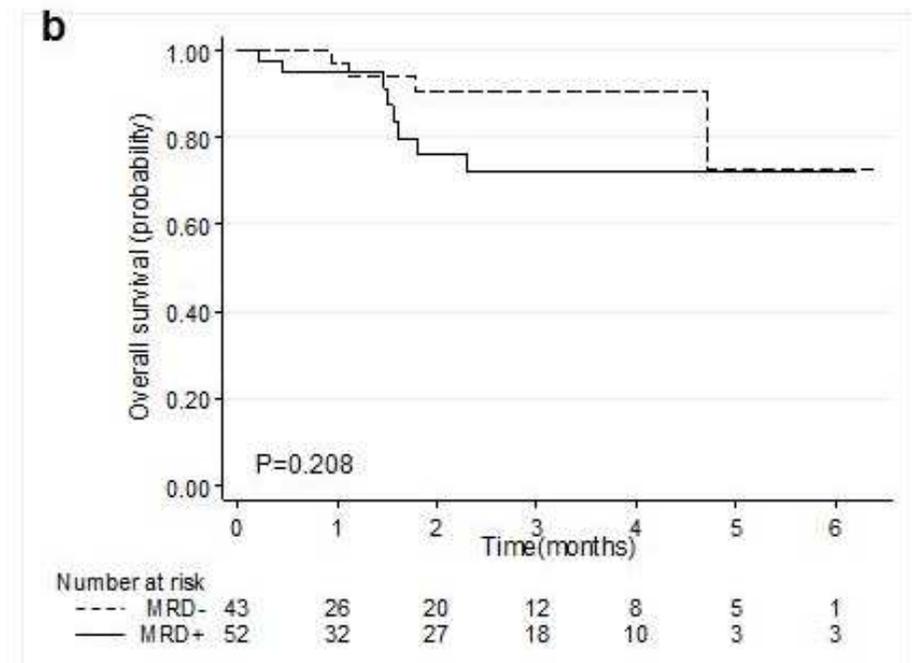
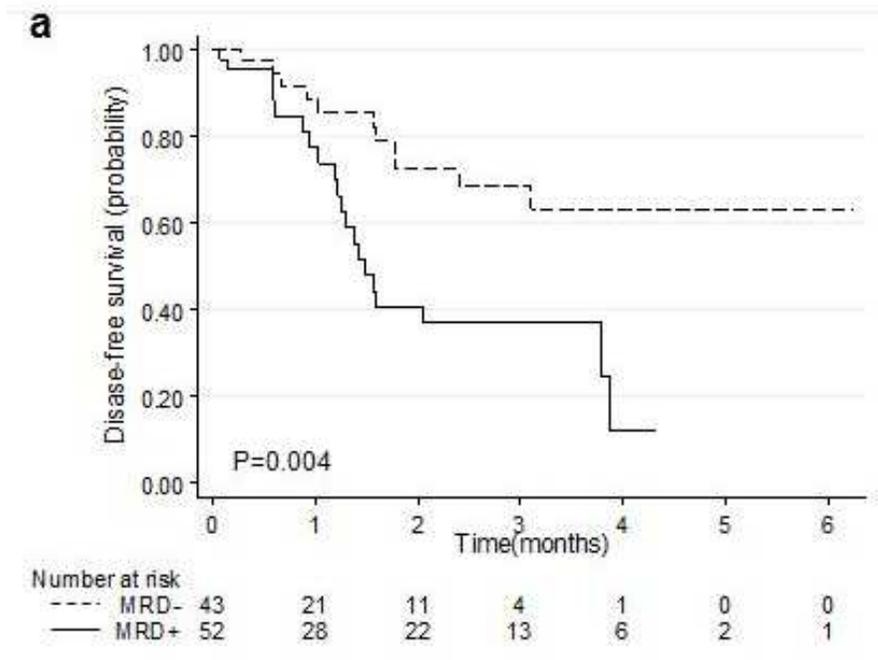
Résultats : DFS et OS en fonction de la mutation



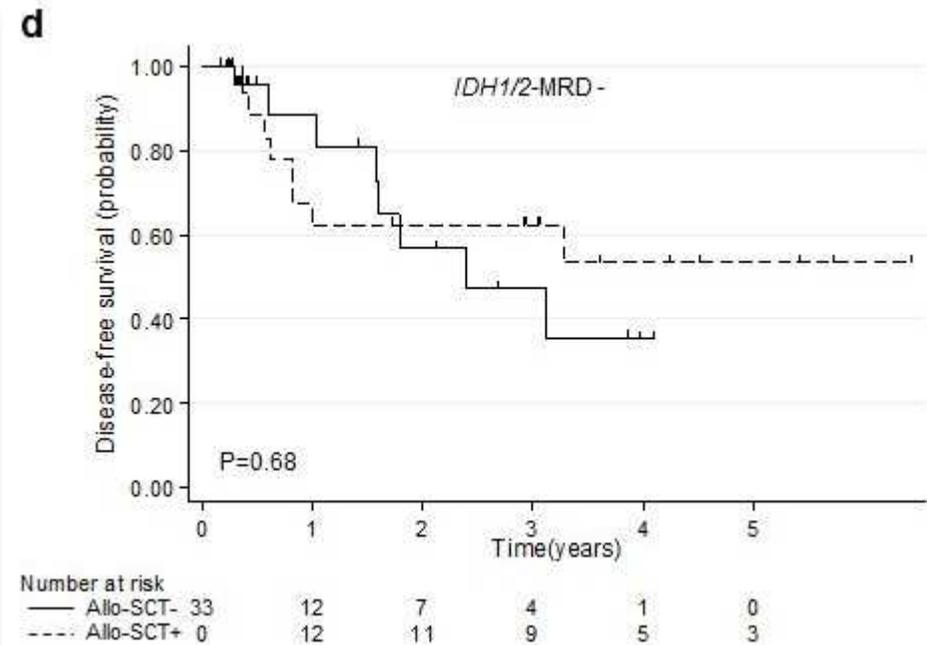
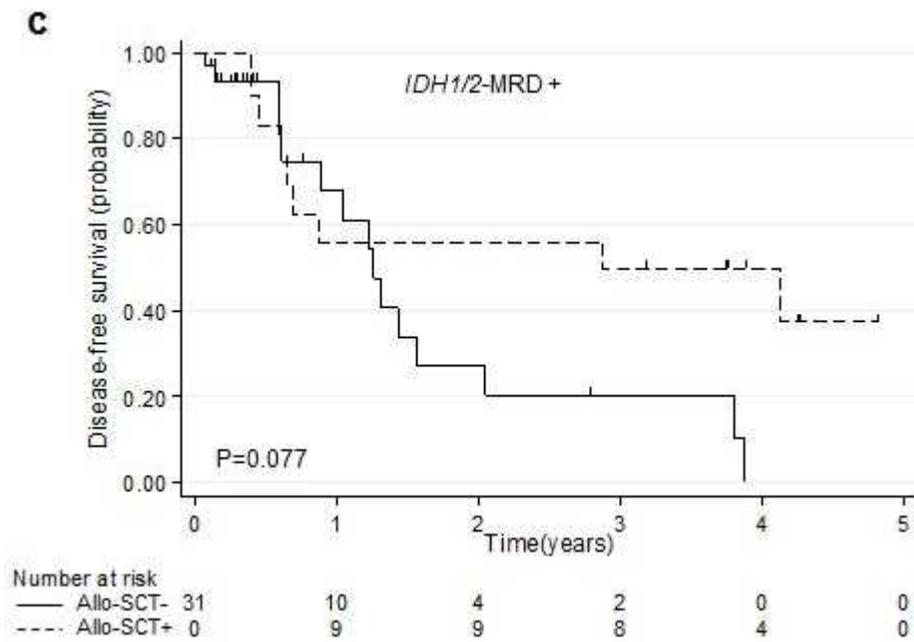
▷DFS et OS censurées à la greffe et ajustées sur le protocole, par mutation

▷Cox univarié

Résultats : DFS et OS en fonction de la MRD1



Résultats : Bénéfice de la greffe en fonction de la réponse moléculaire



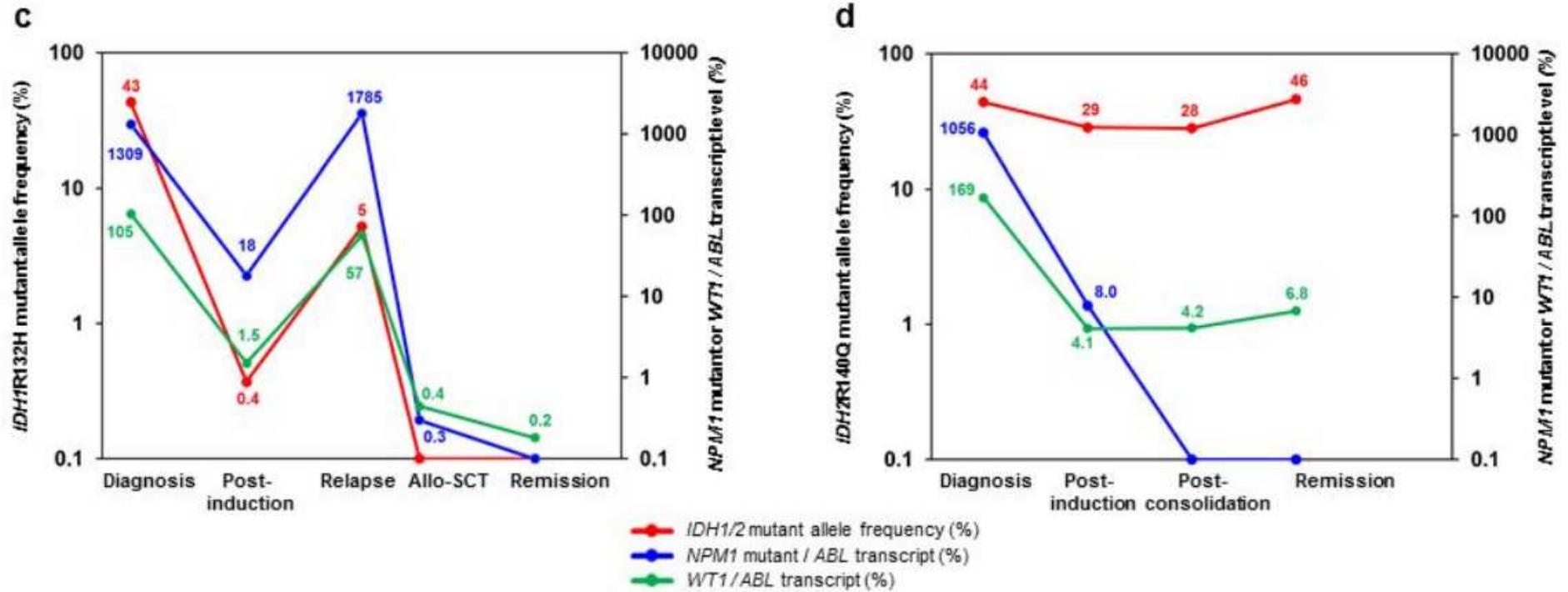
▷Analyse temps dépendante Mantel Byar, DFS

Résultats : Analyse uni et multivariée

Variable	Disease-free survival							Overall survival				
	Univariate				Multivariate			Univariate				
	HR	95% CI		P	HR	95% CI		P	HR	95% CI		P
Age*	1,04	0,98	1,10	0,202	-	-	-	-	1,13	1,00	1,27	0,047
Log ₁₀ (white blood cell count)*	1,00	0,99	1,01	0,537	-	-	-	-	1,00	0,99	1,01	0,698
<i>NPM1</i> mutation	0,23	0,11	0,50	<0,001	0,32	0,12	0,88	0,027	0,19	0,05	0,72	0,014
Normal karyotype	0,26	0,12	0,59	0,001	0,41	0,17	0,99	0,046	0,24	0,07	0,76	0,016
<i>FLT3</i> internal tandem duplication	1,11	0,33	3,70	0,865	-	-	-	-	1,00	0,12	8,08	1,000
<i>FLT3</i> tyrosine kinase domain mutation	0,20	0,03	1,48	0,115	-	-	-	-	-	-	-	0,078
<i>DNMT3A</i> mutation	1,42	0,61	3,31	0,413	-	-	-	-	2,42	0,64	9,15	0,192
<i>TET2</i> mutation	2,66	0,58	12,30	0,209	-	-	-	-	12,59	1,68	94,62	0,014
<i>IDH2</i> R172K mutation	2,04	0,90	4,61	0,088	0,85	0,31	2,32	0,751	1,44	0,39	5,34	0,586
<i>IDH1/2</i> -MRD after induction < 0,2%	0,32	0,15	0,69	0,004	0,40	0,18	0,90	0,026	0,46	0,14	1,54	0,208

▷ Test de Cox ajusté sur le protocole

Résultats : Courbes de suivi

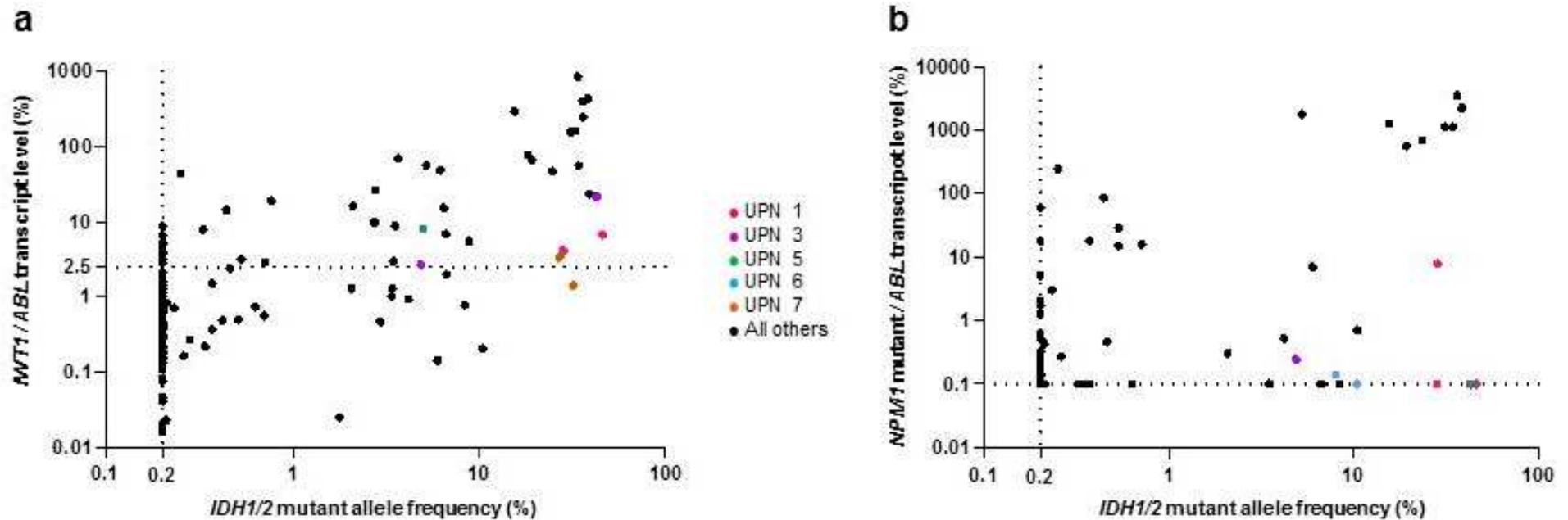


Résultats : Persistance de taux *IDH1/2m* élevés en RC

	UPN 1	UPN 2	UPN 3	UPN 4	UPN 5	UPN 6	UPN 7
Age (years)	50	55	55	50	68	60	63
Gender	F	M	M	M	F	F	F
WBC count, x 10 ⁹ /L	28	2,4	4,7	43	34	100	3,2
Cytogenetics	Normal	Trisomy 8	Normal	Normal	Failure	Normal	Normal
<i>NPM1</i> mutation	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Positive	Negative
<i>FLT3</i> -ITD	Positive	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative	Negative
<i>FLT3</i> -TKD mutation	Positive	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
<i>CEBPA</i> mutation	Negative	NA	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
<i>DNMT3A</i> mutation	NA	Positive	NA	Positive	Negative	Negative	Negative
<i>TET2</i> mutation	NA	Negative	NA	Negative	Negative	Negative	Negative
<i>IDH1/2</i> mutation	R140Q	R140Q	R140Q	R140Q	R132G	R132C	R132C
Clinical outcome	Alive in CR1 2 years after AML diagnosis	Relapse 4 years after AML diagnosis	MDS 1 year after AML diagnosis	Relapse 1.5 year after AML diagnosis	Death after allo-SCT	Relapse 1.5 years after AML diagnosis	MDS 2.5 years after AML diagnosis

Abbreviations: UPN, unique patient number; F, female; M, male; WBC, white blood cell; ITD, internal tandem duplication; TKD, tyrosine kinase domain; NA, not available; CR, complete remission; AML, acute myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; allo-SCT, allogeneic stem cell transplantation.

Résultats : Concordance IDH1/2, WT1, NPM1



MRD-WT1 vs IDH1/2

- ▷ Coefficient de concordance **k=0.433**; 95%CI, 0.280-0.587
- ▷ Concordance « **modérée** »
- ▷ 138 prélèvements
 - 100 concordances (72%)
 - 25 IDH1/2 +, WT1 -
 - 13 IDH1/2 -, WT1 +

▷a. MRD-NPM1 vs IDH1/2

- ▷ Coefficient de concordance **k= 0.255**; 95%CI, 0.060-0.451
- ▷ Concordance « **faible** »
- ▷ 94 prélèvements
 - 58 concordances (62%)
 - 15 IDH1/2 +, NPM1 -
 - 21 IDH1/2 -, WT1 +

Discussion : Performances de la PCR digitale

- ▷ Reproductibilité et répétabilité, simplicité d'utilisation
- ▷ L'objectif $LOD < 0,01\%$ non atteint : bruit de fond des contrôles sur ADN wt limitant la sensibilité analytique
Erreurs de la polymérase induites par des séquences particulières ou des dommages de l'ADN
→ Tester une polymérase plus fidèle?
- ▷ Limite de détection suffisante au regard du seuil décisionnel de 0,2% retenu, au moins pour la MRD de fin d'induction.
- ▷ Qu'en est-il en fin de consolidation, au long cours?
- ▷ Sensibilité analytique équivalente en NGS

Discussion : Association trisomie 11- IDH2 R172K

- ▷25% (5/21)
- ▷Trisomie 11 : 1% des LAM*
- ▷Association décrite aussi récemment dans la littérature**
- ▷Les trisomies 11 sont traditionnellement associées à des anomalies de *KMT2A* (amplification ou duplication partielle en tandem) ***
- ▷Mais les mutations d'*IDH2* R172K sont presque exclusives des mutations de *KMT2A*.
- ▷Intérêt pour l'exploration de la leucémogénèse de ces LAM?

Discussion : Persistance de taux *IDH1/2m* élevés en RC

▷ Pas rare 6 à 24% des LAM *IDH1/2m**

▷ Anomalies précoces, pré-leucémiques?

▷ Impact incertain sur le devenir des patients

sur 15 cas décrits: 7 rechutes dont 5 en moins d'1,5 ans

3 évolutions sous forme de SMD

3 rémissions toujours en cours (1>2 ans et 3>4 ans)

Mutation constitutionnelle d'*IDH1/2* sans risque oncologique associé? (Chez patients jeunes**)

▷ Pas de profil génétique particulier décelé, étudier plus de gènes?

▷ Pas décrit pour *IDH2* R172K, hasard ou particularité?

*Chou et al. Leukemia. (2012) 26, 527–562./ Jeziskova et al. Leukemia & Lymphoma. April 2013; 54(4): 867–870/ Debarri et al. Oncotarget. 2015 Dec 8;6(39):42345–53./**Kranendijk M et al. Science 2010; 330: 336.

Discussion : Limites

▷ Faible nombre de prélèvements de suivi par patient, et répartition irrégulière:

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

Pas d'évaluation possible de la MRD post-consolidation

Données insuffisantes au long cours : seuil de rechute moléculaire, cinétique de la rechute

Conclusion

- ▷ Données à valider sur une cohorte indépendante
- ▷ Définition du prélèvement le plus pertinent, sang ou moelle.
- ▷ Comparaison MRD moléculaire et quantification du 2-HG en HPLC/sang-urine.
- ▷ Enjeu majeur: indication de l'allogreffe dans les groupes de pronostic intermédiaire
- ▷ Evaluation de la réponse au traitement par inhibiteur d'*IDH1/2m*?

Merci de votre attention

Remerciements

-Laboratoire d'hématologie
CHRU Lille

Pr Claude Preudhomme
Pr Aline Renneville
Nathalie Helevaut
Dr Olivier Nibourel
Dr Alice Marceau
Dr Nathalie Gardel
Sandrine Geffroy
Et toute l'équipe

-ALFA

Dr Nicolas Boissel
Karine Celli-Lebras
Cécile Frimat

-Laboratoire d'oncobiologie moléculaire
CHRU Lille

Dr Clotilde Descarpentries

-IRCL, Plateforme de génomique
fonctionnelle

Martin Figeac

-Institut Curie

Jordan Madic

-Bio-Rad®

Joël Paronnaud

