



UNIVERSITE DE LILLE

FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2019 - 2020

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

5-azacytidine en prévention de la rechute post-allogreffe de LAM,

SMD et LMMC de haut-risque :

Résultats d'une étude comparative et rétrospective.

Présentée et soutenue à huit clos le 19 juin 2020 à 14 h
au Pôle Recherche

Par Kevin James WATTEBLED

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Thierry Facon

Asseseurs :

Monsieur le Professeur Ibrahim Yakoub-Agha

Monsieur le Professeur Bruno Quesnel

Madame le Docteur Hélène Demarquette

Directeur de Thèse :

Monsieur le Docteur David Beauvais

AVERTISSEMENT

« La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs. »

“Here’s to the ones who see things differently. Because the people who are crazy enough to think they can change the world, are the ones who do”.

Steve Jobs

LISTE DES ABREVIATIONS

AMM: Autorisation de mise sur le marché
APC : Cellule présentatrice de l'antigène
AZA : 5-azacytidine
CAR : *Chimeric antigen receptor*
CIBMTR : *Center for International Blood and Marrow Transplant Research*
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CPSS : *CMML-specific prognostic scoring system*
CRR: Risque de rechute cumulée (*cumulative risk of relapse*)
CSH: Cellules souches hématopoïétiques
CTA : *Cancer/testis antigens*
CTLA4 : *Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*
CTL : Lymphocyte T cytotoxique
DAMP : *Damage Associated Molecular Pattern*
DC : Cellule dendritique
DLI : Injection de lymphocytes du donneur (*donor lymphocyte infusion*)
EBMT : *European Society for Blood and Marrow Transplantation*
EFS : Survie sans évènement
ELN : *European LeukemiaNet*
FAS : *Fragment Apoptosis Stimulating*
FLT3 : *FMS like tyrosine kinase 3*
FOXP3 : *Foxhead box P3*
G-CSF : *Granulocyte-colony stimulating factor*
GVH : Réaction du greffon contre l'hôte (*graft-versus-host*)
GVL : Réaction du greffon contre la leucémie (*graft-versus-leukemia*)
HCT-CI : *Hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index*
HDACi : Inhibiteur d'histone deacetylase
HERV : Rétrovirus endogène humain (*human endogenous retrovirus*)
HLA : *Human leucocyte antigens*
HR : *Hazard ratio*
IFN : Interferon
IL : Interleukine
ITD : *Internal tandem duplication*

KIR : *Killer cell Ig-like receptor*
LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique
LAM : Leucémie aiguë myéloïde
LMMC : Leucémie myélomonocytaire chronique
mHA : Antigène du complexe mineure d'histocompatibilité
MRD : Maladie résiduelle détectable (*minimal residual disease*)
NK : *Natural killer*
NRM : Mortalité non liée à la rechute (*Non-relapse mortality*)
OMS : Organisation mondiale de la santé
OS : Survie globale
PD : *Programmed death*
PVRIG : *Poliovirus receptor-related immunoglobulin domain-containing protein*
RC : Réponse complète
RP : Réponse partielle
R-IPSS : *Revised International Prognostic Scoring System*
SMD : Syndrome myélodysplasique
TACTIL : *T cell activation, increased late expression*
TCR : *T-cell receptor*
TGF : *Tumor growth factor*
TIGIT : *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*
TKD : *Tyrosine kinase domain*
TNF : *Tumor necrosis factor*
TRM : Mortalité liée au traitement (*treatment-related mortality*)
VPA : Valproate de sodium

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	4
TABLE DES MATIERES	6
RESUME	7
INTRODUCTION	8
1. Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques	8
1.1. Généralités	8
1.2. Indications principales dans les hémopathies myéloïdes	12
1.2.1. LAM	12
1.2.2. SMD et LMMC	15
1.3. L'effet GVL et la GVH, son pendant négatif	19
1.3.1. Aspect historique	19
1.3.2. Aspect physiopathologique	20
1.3.3. Aspect clinique	22
1.4. Rechute post-allogreffe	24
1.4.1. Épidémiologie	24
1.4.2. Mécanismes d'échappement immunologique	27
1.4.3. Facteurs de risques et approches de prévention	28
2. Traitements prophylactiques post-allogreffe des LAM, SMD et LMMC	31
2.1. Stratégies médicamenteuses	31
2.1.1. 5-azacytidine (AZA)	31
2.1.1.1. Généralités	31
2.1.1.2. Mécanismes d'action supposés	32
2.1.1.3. Traitement de la rechute	38
2.1.1.4. Stratégie préemptive	40
2.1.1.5. Stratégie prophylactique	41
2.1.2. Inhibiteurs de FLT3	47
2.1.2.1. Généralités	47
2.1.2.2. Indications actuelles	47
2.2. Stratégie immunologique : DLI	49
2.2.1. Généralités	49
2.2.2. Traitement de la rechute	50
2.2.3. Stratégie préemptive	50
2.2.4. Stratégie prophylactique	51
2.2.5. Perspectives	52
2.3. Autres	53
3. Contexte de l'étude	54
4. Objectifs de l'étude	56
ARTICLE	57
DISCUSSION	82
BIBLIOGRAPHIE	89

RESUME

Contexte : La rechute post-allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) reste un défi majeur, particulièrement pour les hémopathies malignes myéloïdes présentant des caractéristiques de haut risque. Le 5-azacytidine (AZA) a fait l'objet d'études comme traitement de maintenance en prévention de la rechute post-greffe mais son efficacité reste incertaine du fait de l'absence d'étude prospective contrôlée-randomisée. Notre objectif était principalement d'évaluer, de manière comparative, l'impact de la maintenance par AZA à deux ans sur le risque cumulé de rechute (CRR) post-allogreffe.

Méthode : Les receveurs d'allogreffe de CSH éligibles à une maintenance par AZA entre le 1er janvier 2014 et le 1er septembre 2019 dans le service d'hématologie du CHRU de Lille ont été identifiés à partir de la base de données PROMISE. Les patients inclus étaient majeurs, à haut risque de rechute, vivant et en rémission à J60 de la greffe. Le CRR à deux ans a été estimé suivant un modèle à risques compétitifs. Son association aux variables d'intérêts a été réalisée par un modèle de Fine-Grey. Secondairement, la même approche a été adoptée pour la mortalité non liée à la rechute (NRM). La survie globale (OS) et sans progression (EFS) ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier. Un modèle à risque proportionnel de Cox a été utilisé pour évaluer l'association aux variables d'intérêts.

Résultats : 255 patients ont été inclus d'âge médian 58 ans, parmi lesquels 72 ont reçu une maintenance par AZA, définie par la réalisation d'au moins un cycle. Celle-ci n'a pas influencé le CRR à deux ans entre les deux groupes (HR=1,27 [95%CI=0,77-2,11], p=0,35), ni la survie globale (HR=0,64 [95%CI=0,38-1,10], p=0,11) ou sans évènement (HR=0,89 [95%CI=0,57-1,40], p=0,62). En revanche, elle était corrélée positivement à la mortalité non liée à la rechute (3,2% vs 15,6%, HR=0,19 [95%CI=0,05-0,77], p=0,02).

Conclusion : Une stratégie de maintenance par AZA ne semble pas diminuer le risque de rechute post-greffe en monothérapie, ni apporter de bénéfice de survie globale ou sans évènement, mais pourrait avoir un impact positif sur la mortalité non liée à la rechute, sans que l'incidence de GVH aigue n'ait pu être évaluée du fait de la nature rétrospective de l'étude.

1. Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

1.1. Généralités

A l'ère de l'immunothérapie et des thérapies cellulaires, l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), ou greffe de moelle osseuse, occupe toujours une place importante dans la stratégie thérapeutique de certaines hémopathies, au premier rang desquelles les hémopathies malignes dont les indications d'allogreffes sont bien définies. Plus d'un million d'allogreffes ont été réalisées dans le monde entier depuis 1968, soit actuellement environ 50000 par an (1).

Son principe repose sur la réinjection de cellules souches hématopoïétiques prélevées chez un donneur sain à un patient malade avec réalisation, au préalable, d'un conditionnement à visée anti-tumorale et immunosuppressive, ayant pour but la reconstitution d'une hématopoïèse fonctionnelle.

Il s'agit de la seule possibilité thérapeutique curative de nombreuses hémopathies malignes, en particulier en situation de rechute, où l'objectif est alors la clairance du clone tumoral via sa reconnaissance par les cellules immunitaires allogéniques. L'allogreffe de CSH est également utilisée en traitement d'hémopathies bénignes (déficits immunitaires constitutionnels, aplasies médullaires ou hémoglobinopathies) pour lesquelles le principal effet attendu est de retrouver une fonction hématopoïétique normale, sans effet anti-tumoral dans ce cas.

Sa réalisation nécessite trois éléments fondamentaux :

- un receveur (le patient malade) chez qui une évaluation exhaustive des facteurs pouvant compromettre l'efficacité et la tolérance de la greffe, sera réalisée,
- un donneur sain et volontaire comportant un degré de compatibilité variable avec le receveur,

- et enfin un greffon, à savoir la source de CSH provenant du donneur (cellules souches périphériques recueillies par apherèse ou CSH issues d'un prélèvement médullaire au bloc opératoire).

Si on doit la première greffe de moelle osseuse chez l'homme à E.D Thomas en 1957 (2), le paysage actuel de l'allogreffe a depuis connu de nombreux bouleversements conduisant à une amélioration des effets attendus et une réduction de la toxicité (1,3,4). La principale découverte ayant permis de faire de la greffe de moelle osseuse une thérapie davantage utilisée fut la compréhension du système d'histocompatibilité (human leucocyte antigen, HLA), par Jean Dausset (5) dont les travaux lui ont valu le prix Nobel de médecine en 1980, en déterminant les mécanismes physiologiques qui sous-tendent la compatibilité entre le donneur et le receveur. Avant leur précision, les tentatives de greffe de moelle se soldaient souvent par des échecs en raison d'une importante mortalité liée au traitement.

Ceci s'explique probablement par le fait que les études *in vivo* menées sur des animaux, notamment la souris, ont été appliquées trop rapidement vers l'homme, sans en avoir compris toute la physiopathologie, ce d'autant que souris et hommes ne partagent pas la même diversité de compatibilité.

Ainsi, l'obstacle principal lors des premières greffes menées chez l'homme était l'absence de prise de greffe ou le rejet différé après obtention d'un chimérisme partiel, au prix d'une toxicité inacceptable (6–8). Actuellement, le facteur limitant est davantage représenté par la rechute (9).

Par la suite, les dernières décennies ont connu une nette augmentation de son utilisation du fait de l'expansion du pool de donneur (10), des sources de CSH (11), de l'utilisation de conditionnements moins toxiques en association à la déplétion

lymphocytaire *in vivo* (12,13), du perfectionnement de l'immunosuppression post-greffe (14) et enfin de l'amélioration des soins de support.

Il s'agit d'une procédure plus sûre avec un taux de mortalité chutant de 50% dans les années 1970 jusqu'à 10%, au mieux, actuellement (3,4). Toutefois, il persiste une morbi-mortalité liée au traitement non négligeable, raison pour laquelle l'indication d'allogreffe n'est jamais posée sans un rapport bénéfice/risque favorable.

Le parcours de l'allogreffe commence d'abord, pour le patient receveur, par la recherche d'un donneur compatible 10/10 au sein de la fratrie pour les locus HLA-A, -B, -C, DQB1, DRB1, appelé alors donneur géno-identique. A défaut d'un donneur géno-identique, le fichier international des donneurs, comportant environ 250 millions de volontaires sains, est consulté à la recherche d'un donneur non apparenté compatible 10/10, appelé alors donneur phéno-identique, ou avec un mismatch toléré (9/10). En l'absence d'un donneur identifié sur le fichier, la meilleure connaissance de la prophylaxie de la GVH avec notamment la découverte du cyclophosphamide post-greffe a également permis la réalisation de greffe haplo-identique (5/10) avec recrutement d'autres donneurs familiaux (parents, frères/sœurs, enfants) (11). Le don de sang placentaire ou de cordon à la naissance constitue également une source de CSH, pour lesquelles il est possible de s'affranchir davantage de la comptabilité HLA stricte du fait de l'immaturité du système immunitaire fœtal.

Il s'effectue parallèlement une évaluation de la faisabilité de la greffe de moelle osseuse, comportant :

- le recueil des comorbidités à l'aide du HCT-CI ou score de Sorrow (15,16),

- le recueil des complications éventuelles liées au traitement instauré depuis le diagnostic initial,
- le choix du conditionnement
- la prévention de la maladie du greffon contre l'hôte,
- un éventuel schéma de prévention de la rechute post-greffe.

L'objectif est de tendre à un rapport bénéfice/risque le plus favorable possible soit :

- une survie globale (OS) et sans progression (EFS) plus importante
- en diminuant le risque de rechute sans pour autant majorer la toxicité.

Même dans le cas de greffe urgente, il s'agit d'un processus qui suppose un délai incompressible de plusieurs semaines pour lequel l'ensemble des mesures nécessaires au maintien de l'état général du patient, du contrôle de la maladie, doivent être mises en œuvre par l'hématologue référent.

Il s'en suit une hospitalisation de 4 à 6 semaines dans un secteur protégé afin de prendre en charge les complications infectieuses éventuelles et suppléer à l'insuffisance médullaire chimio-induite jusqu'à la prise de greffe mettant un terme à la période d'aplasie.

Par la suite, l'objectif est de prévenir au mieux et sinon de dépister précocement les complications liées à l'allogreffe comportant majoritairement les infections (notamment réactivation virale), les complications immunologiques à savoir la maladie du greffon ou « *graft versus host disease* » (GVH), les effets indésirables d'origine médicamenteuse et la rechute.

1.2. Indications principales dans les hémopathies myéloïdes

La principale indication de l'allogreffe de CSH reste les hémopathies myéloïdes malignes au premier rang desquelles la leucémie aiguë myéloïde (LAM) représente 38% et les syndromes myélodysplasiques (SMD) 11% comme le montre la **figure 1**, résumant les principales indications d'allogreffe en Europe en 2016 (17).

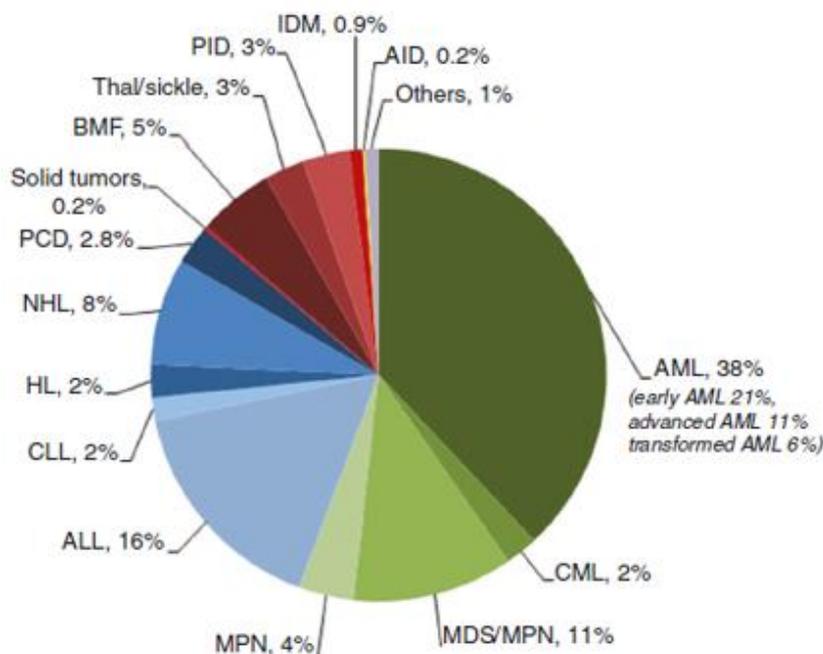


Figure 1 : Représentation des indications d'allogreffe en 2016 en Europe. D'après Passweg (17).

AML : leucémie aiguë myéloïde, CML : leucémie myéloïde chronique, MDS : syndrome myélodysplasique, MPN : syndrome myéloprolifératif, ALL : leucémie aiguë lymphoblastique, CLL : leucémie lymphoïde chronique, HL : lymphome de Hodgkin, NHL : lymphome non-hodgkinien, PCD : maladies plasmocytaires, solid tumors : tumeurs solides, BMF : aplasie médullaire, Thal/sickle : hémoglobinopathies (drépanocytose, thalassémie), PID : déficit immunitaire primitif, IDM : maladies métaboliques héréditaires, AID : maladies auto-immunes, Others : autres.

1.2.1. LAM

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) représente le type le plus fréquent de leucémie aiguë avec une incidence de 3 à 4 cas pour 100.000 habitants par an (18). Elle est caractérisée par une prolifération anormale d'un ou plusieurs sous-clones immatures dont le degré d'envahissement médullaire, puis la dissémination myélo-sanguine, est responsable de la symptomatologie clinique.

Il s'agit d'un ensemble très hétérogène faisant l'objet d'une classification OMS révisée en 2016 (19) et de recommandations de l'European LeukemiaNet (ELN) datant de 2017 (20). On distingue plusieurs groupes en fonction des données de cytogénétique, de biologie moléculaire, de signes de myélodysplasie associés, de traitement antérieur inducteur et de l'existence de mutations somatiques ; ces dernières sont dites « driver » ou inductrices dans la physiopathologie de la LAM (20).

La **figure 2** représente l'hétérogénéité du paysage de la LAM selon une classification moléculaire avec la fréquence de mutations concurrentes ou participatives.

Le pronostic de la LAM est donc fortement dépendant des caractéristiques initiales de la maladie définies selon ces modalités mais aussi du patient en lui-même comme son âge, ses comorbidités ou plus généralement de l'ensemble des facteurs qui influenceraient la tolérance et l'observance au traitement. Le taux d'obtention d'une réponse complète après le traitement de référence qu'est la chimiothérapie d'induction intensive suivie d'une consolidation classique varie de 40 à 80% selon les sous-groupes (21).

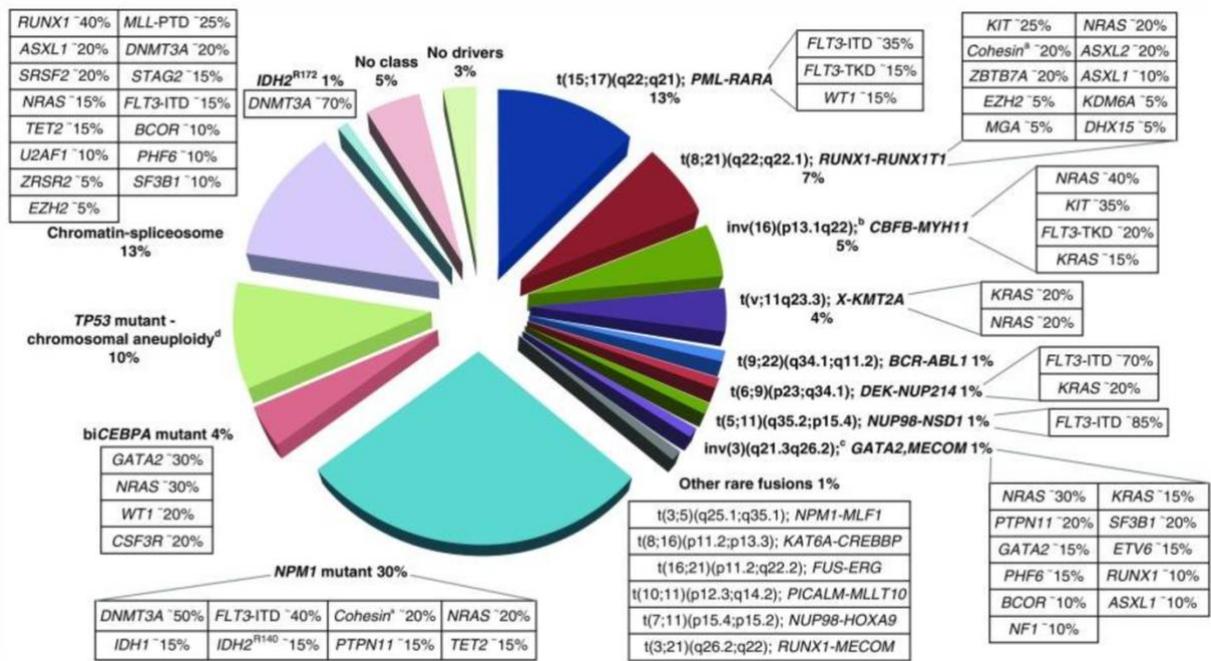


Figure 2 : Entités moléculaires des LAM avec fréquence de mutations concurrentes. D'après Döhner et al (20).

L'indication d'allogreffe dans les LAM se pose selon l'évaluation du rapport bénéfique/risque opposant la NRM, à savoir la toxicité liée à la procédure d'allogreffe, contre le taux de rechute mais aussi selon l'état général du patient, l'existence d'un donneur et les autres variables liées à l'allogreffe (compatibilité, source de CSH, prophylaxie de GVH) (22). On considère le risque de toxicité liée à la greffe comme acceptable si le taux de rechute attendu sans greffe est supérieur à 35-40% (20).

Les patients en rechute après traitement conventionnel deviennent éligibles à une allogreffe après traitement de rattrapage, indépendamment des caractéristiques initiales de la maladie. De la même manière, les LAM sans indication préalable d'allogreffe mais comportant durant le traitement une ascension de la maladie résiduelle aussi appelée rechute moléculaire, considérée comme une rechute cytologique imminente, doivent en bénéficier (22–25).

En première ligne, les LAM candidates à une allogreffe de CSH sont stratifiées selon leur risque/pronostic cytogénétique et moléculaire par les recommandations de l'ELN 2017. Ainsi, les patients du groupe favorable ne bénéficiant pas d'une allogreffe en première intention sont caractérisés par une translocation t(8 ;21), une inversion 16, une mutation isolée de NPM1 ou bi allélique de CEBPA ainsi qu'un transcrit de fusion PML-RAR α (20).

Tous les autres patients appartenant aux groupes intermédiaires et défavorables ont une indication théorique d'allogreffe en première intention.

1.2.2. SMD et LMMC

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) représentent un groupe d'hémopathie myéloïde caractérisé par une hématopoïèse qualitativement inefficace responsable de cytopénies d'origine centrales. Leur complication redoutée est un risque d'évolution clonale vers une LAM secondaire, soit une « acutisation » (26,27).

Les leucémies myélo-monocytaires chroniques sont une autre entité distincte, frontière entre syndrome myélodysplasique et myéloprolifératif, qui, bien qu'elle se distingue par des critères diagnostiques précis, partage la même évolution naturelle et défavorable de transformation en LAM.

La présentation clinique est corrélée au syndrome d'insuffisance médullaire mais peut être associée à de nombreux symptômes « satellites » non spécifiques pouvant être en rapport avec des signes d'auto-immunité.

Le diagnostic est cytologique, porté sur le myélogramme, comportant une coloration de Pearls. On y observe des signes de myélodysplasies, sur une moelle de richesse

variable (riche dans les LMMC à hypoplasique dans certains SMD), avec ou sans excès de blastes.

La cause principale de mortalité est en lien avec les cytopénies ou la transformation en LAM (27). La médiane d'âge au diagnostic est d'environ 70 ans, raison pour laquelle les patients présentent souvent des comorbidités à prendre en compte dans les choix thérapeutiques (28).

L'objectif principal de leur prise en charge, au-delà d'une approche curative, est de diminuer les plaintes fonctionnelles en lien avec le syndrome d'insuffisance médullaire du patient et de réduire le risque de progression, afin d'améliorer leur qualité de vie et la survie (29–31).

Leur physiopathologie est complexe, impliquant une accumulation d'évènements « driver » comme (32–46):

- des anomalies cytogénétiques,
- des mutations somatiques de :
 - protéines de signalisation (NRAS, KRAS, JAK2, FLT3),
 - régulation épigénétique (TET2, ASXL1, EZH2, UTX, IDH1, IDH2, DNMT3A, SETBP1),
 - spliceosome (SF3B1, SRSF2, ZRSF2, U2AF1),
 - facteurs de transcription (RUNX1, NPM1, TP53).

Ils sont également associés à un niveau important d'hyperméthylation, appelant à un rationnel thérapeutique par agent hypométhylant (47,48).

Comme leur évolution naturelle est hétérogène, le risque d'évolution est stratifié au diagnostic pour influencer la décision thérapeutique (49) à l'aide du score CPSS pour les LMMC et R-IPSS pour les SMD, révisé en 2012 (50–52). Ce dernier distingue cinq

groupes pronostiques : de faible risque (*very low, low*), intermédiaire, et de haut risque (*high, very high*) selon trois paramètres :

- la profondeur des cytopénies
- la blastose médullaire
- les anomalies cytogénétiques

Il peut être ajusté à l'âge du patient pour donner une estimation de la survie.

Les possibilités thérapeutiques sont rares, sans nouvel agent pharmacologique ayant fait l'objet d'une mise sur le marché depuis plusieurs années (53), raison pour laquelle l'algorithme de traitement est simplifié (49,54) :

- faible risque et asymptomatique : surveillance jusqu'à progression clinique
- faible risque et anémie symptomatique : lenalidomide si del (5q) ou érythropoïétine si taux sérique bas
- faible risque et autre cytopénie : agent hypométhylant ou abstention
- haut risque : allogreffe de CSH si faisable avec ou sans traitement de cytoréduction, agent hypométhylant jusqu'à progression sinon.

L'indication d'allogreffe est plus discutable pour les patients appartenant au groupe intermédiaire, où l'apport de la biologie moléculaire, absente du R-IPSS, a tout son intérêt. On distingue, effectivement, des mutations de mauvais pronostic (*TP53, NRAS, ASXL1*, et *EZH2*) (32,38,39,55,56) et de bon pronostic (*SF3B1*) (36,45).

Les SMD étant un groupe hétérogène, d'autres formes peuvent faire l'objet d'une allogreffe de CSH, parmi lesquelles on peut citer (57) :

- les SMD « secondaires » à un traitement inducteur (*therapy-related*), exclus de l'étude élaborant le R-IPSS mais comportant fréquemment des mutations de *TP53* et/ou un caryotype complexe (58)

- les SMD de forme « hypoplasique »
- les SMD avec fibrose médullaire
- les SMD congénitaux issues de mutations germinales comme GATA2
- les SMD avec une importante dépendance transfusionnelle ou après échec du traitement de première intention
- les LMMC de haut risque selon le score CPSS (intermédiaire 2 ou haut) avec une indication d'emblée, ou après cytoréduction pour les formes très prolifératives (LMMC de type 2) (59)

Le conditionnement est plus fréquemment atténué du fait de l'âge souvent avancé de ces patients et de l'absence de bénéfice d'un conditionnement myéloablatif dans ces indications (60). Le délai avant transplantation est à prendre en compte en fonction du risque de la maladie initiale, de sa cinétique de progression, et de la réponse aux traitements antérieurs. Un traitement cytoréducteur peut être proposé avant l'allogreffe, c'est-à-dire en *bridging*, en cas de blastose médullaire supérieure à 10% et en l'absence d'anomalies cytogénétiques défavorables bien qu'il n'y ait pas de consensus (61,62).

Il n'y a pas davantage de consensus sur l'utilisation des agents hypométhylants versus chimiothérapie intensive en *bridging* dans cette indication (61,63), bien que des essais prospectifs soient en cours. Pour les patients avec cytogénétique défavorable et en l'absence de progression vers une LAM, l'allogreffe de CSH est recommandée d'emblée, à visée d'épargne de toxicité et du fait d'une meilleure survie (57).

1.3. L'effet GVL et la GVH, son pendant négatif

1.3.1. Aspect historique

Le défi principal de l'allogreffe de CSH a toujours été la prévention de la maladie du greffon contre l'hôte (GVH) sans compromettre l'effet du greffon contre les cellules tumorales ou « *graft versus leukemia* » (GVL).

La première hypothèse d'un effet GVL remonte à 1956 sur un modèle animal de souris où il est apparu que les cellules leucémiques de l'hôte étaient rejetées puis éliminées après réinjection de CSH (64).

Ce n'est que dix ans plus tard que Mathé et *al.* ont appliqué cette observation à la pratique clinique en montrant une clairance des cellules leucémiques par un effet GVL après une allogreffe de CSH en traitement d'une LAL. On leur doit le terme d'immunothérapie adaptative et ils qualifièrent la GVH de « syndrome secondaire » affectant différents organes comme la peau, le foie ou le tube digestif (65).

La pratique plus fréquente de l'allogreffe à partir de la moitié des années 1960 et le perfectionnement des conditionnements myéloablatif à base de busulfan et cyclophosphamide (6–8) ont permis la caractérisation de ce syndrome et son lien avec l'absence de rechute de l'hémopathie initiale.

En effet, Weiden et *al.* ont été les premiers à démontrer un bénéfice de la survenue de GVH sur l'incidence de la rechute de leucémies (66), avec même une traduction sur la survie globale pour la GVH chronique (67).

De nos jours, l'amélioration des connaissances dans le domaine de l'immunologie et notamment du système HLA a permis d'en comprendre la physiopathologie afin d'améliorer la prévention de la GVH à travers l'utilisation de l'irradiation corporelle totale couplée au cyclophosphamide à forte dose, la lymphodéplétion *in vivo*, et d'autres agents immunosuppresseurs tels que le méthotrexate (14,68–70).

1.3.2. Aspect physiopathologique

La physiopathologie de la GVH et de l'effet GVL est complexe avec sans cesse des découvertes fondamentales amenant de nouvelles applications cliniques (71–73).

Les médiateurs en sont les lymphocytes T allo réactifs du donneur. Ils s'activent en reconnaissant, par le biais de cellules présentatrices de l'antigènes (APC) du receveur, les signaux de dangers (DAMPs), dont les molécules du complexe mineur (mHA), et majeure d'histocompatibilité (CMH) présentes de manière ubiquitaire sur les cellules hématopoïétiques normales et malignes de l'hôte (74). L'alloréactivité des lymphocytes T du donneur contre les cellules leucémiques est responsable de l'effet GVL (75), tandis que celle dirigée contre les cellules non cancéreuses du receveur se manifeste comme la GVH avec un tropisme d'atteinte pluri-systémique tel que la peau, le tube digestif, le foie, les poumons (74,76).

L'histocompatibilité est fondée sur les molécules du CMH à savoir HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1. Même dans le cas d'un donneur compatible ou « matched », l'immunogénicité contre les cellules de l'hôte est permise par les polymorphismes des mHA sur les cellules ubiquitaires du receveur et qui introduiront un « mismatch » entre donneur et receveur (77). Des mHA avec un profil d'expression plus restreint au tissu hématopoïétique ont été identifié comme étant davantage les cibles médiatrices de l'effet GVL (78,79).

Outre les mHA, d'autres peptides tumoraux permettent l'activation des APC incluant :

- des néoantigènes causés par des mutations somatiques,
- des peptides non-mutés appelés « *Cancer/testis antigens* » (CTA) (70,71).

Initialement, on observe une activation des cellules dendritiques (DC) du receveur sous l'effet de la chimiothérapie et/ou radiothérapie composant le conditionnement, puis une reconnaissance par les lymphocytes alloréactifs T CD4+ « helper » du donneur médié par le TCR et les mHA du CMH de classe II. Cette réaction est amplifiée par des molécules de co-stimulation (CD28, CD80, CD86), d'adhésion et par la sécrétion de cytokines par l'APC (TNF-alpha, IL-6) et le lymphocyte T (IFN-gamma, GM-CSF, CCR5). L'activation des DC du receveur par les cellules CD4+ helper entraîne la présentation des mHA du CMH de classe I aux lymphocytes T CD8+ et leur activation en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques de l'antigène (69,74).

La GVH et la GVL sont donc deux phénomènes intriqués et font l'objet d'un équilibre qui finit par se traduire, de manière temps dépendant, par une tolérance immunologique d'origine périphérique entre les APC du receveur et les lymphocytes T du donneur. En effet, si les cellules présentant des antigènes des cellules leucémiques permettent la clairance blastique, les APC de l'hôte subissent, quant à elles, un rétrocontrôle négatif par le biais de lymphocyte T régulateurs du donneur dits Tregs influencés par des cytokines (IL2, IL-10, IL-21, TGF beta) et co-stimulateurs inhibiteurs (CTLA4, PD-1) (69). On y observe une hyperexpression de FOXP3, un facteur de transcription, dont le niveau de méthylation de son locus est crucial au phénotype des lymphocytes Tregs (80,81).

D'autres travaux ont mis en évidence le rôle des lymphocytes T NK via leur récepteur KIR (70,82,83), des lymphocytes Tregs (82,84) et d'importantes modifications de leur régulation épigénétique (72) dans l'effet GVL et la physiopathologie de la GVH.

1.3.3. Aspect clinique

La GVH est une complication fréquente, attendue, et la principale cause de mortalité non liée à la rechute (NRM), synonyme de mortalité liée au traitement (TRM). Elle survient approximativement dans 40% des greffes géno-identiques, et entre 50% et 70% des greffes non apparentées avec ou sans mismatch (85).

Elle se définit selon son délai d'apparition par rapport à la réinjection des CSH en distinguant une présentation aiguë, en général avant 100 jours, avec une atteinte (74) :

- cutanée sous la forme d'une éruption maculo-papuleuse d'extension variable
- digestive comportant le haut (nausées, vomissements, anorexie) et le bas appareil digestif (douleurs abdominales, diarrhées, rectorragies voire iléus)
- hépatique (cholestase ictérique)

Sa sévérité s'évalue en prenant en compte le stade des trois atteintes concernées avec le score de Glucksberg : grade I (légère), II (modérée), III (sévère), IV (très sévère) (86).

Celle-ci s'oppose à une présentation chronique avec une extension possible à n'importe quel organe (ophtalmique, endo-buccale, génitale, pulmonaire, neurologique...). La sévérité de la forme chronique est distinguée selon l'atteinte de chaque organe par un score de 0 à 5, aboutissant à trois catégories (*mild, moderate, severe*) (87)

On reconnaît maintenant des formes atypiques avec des présentations de GVH aiguë tardive ou d'overlap syndrome, davantage décrit après les conditionnements d'intensité réduite (74).

Le traitement de première ligne repose sur la corticothérapie à forte dose mais ne permet l'obtention d'une réponse que dans 50% des cas, avec pour le reste un tableau d'aggravation rapide (73,88–90). Dans les formes sévères et cortico-résistantes,

l'impact de la GVH aigue est prépondérant sur la survie avec une mortalité voisine de 75% pour le grade III et 95% pour le grade IV (91).

Il existe de nombreuses alternatives thérapeutiques en deuxième ligne (88) ou encore à l'étude parmi lesquelles peuvent être citées le sérum anti-lymphocytaire (68), la photophérèse extracorporelle (92), les anticorps monoclonaux (anti-CD20 : rituximab, anti-CD52 : alemtuzumab, anti-CD-IL-2 : daclizimab, anti-TNF alpha : infliximab, etanercept, anti-CTLA4 : abatacept), les agents hypométhylants (5-azacytidine, decitabine), les inhibiteurs d'histone deacetylase (HDACi) (73), les cellules souches mésenchymateuses (93) et les inhibiteurs de tyrosine kinase comme le ruxolutinib (inhibiteur de JAK-2) (94,95) qui est à ce jour le seul traitement de 2^{ème} ligne recommandé dans cette indication.

Toutefois, les patients finalement répondeurs endurent une période prolongée d'immunosuppression marquée par de longues hospitalisations, complications infectieuses itératives entraînant perte d'autonomie et dépendance. Finalement, comme la GVH est intimement reliée à l'effet GVL, la majoration de l'immunosuppression induite par l'escalade thérapeutique peut aussi avoir un effet sur le risque de rechute et la morbidité (96).

En définitive, s'il apparait évident que l'effet curateur de l'allogreffe de CSH dans les LAM et les SMD semble reposer sur son effet GVL (70), la volonté de rendre cette pratique plus sûre et d'en étendre les indications à une population de plus en plus importante en majorant l'immunosuppression et diminuant l'intensité du conditionnement, appelle un autre constat à savoir la tendance vers une augmentation du risque de rechute (96–98).

1.4. Rechute post-allogreffe

1.4.1. Épidémiologie

Malgré les améliorations apportées au cours des dernières décennies concernant les soins de support, le choix des caractéristiques qui définissent les hémopathies myéloïdes les plus à risque de rechute (apport de la cytogénétique, de la biologie moléculaire et du suivi de la maladie résiduelle), et d'un conditionnement plus atténué permettant de proposer l'allogreffe à une population de patients plus âgés, le taux de rechute post-allogreffe reste élevé.

La mortalité liée à la rechute compte pour 40% des échecs et reste maximale dans la première année suivant l'allogreffe. Plus précisément, selon les données du CIBMTR (*Center for International Blood and Marrow Transplant Research*), la proportion de décès post-greffe liée à la rechute, en fonction de la compatibilité HLA, à savoir géno-identique, mismatch non apparenté, phéno-identique et sang de cordon, reste décevante avec respectivement 70%, 48%, 57%, 37%, et 43% (**Figure 3**).

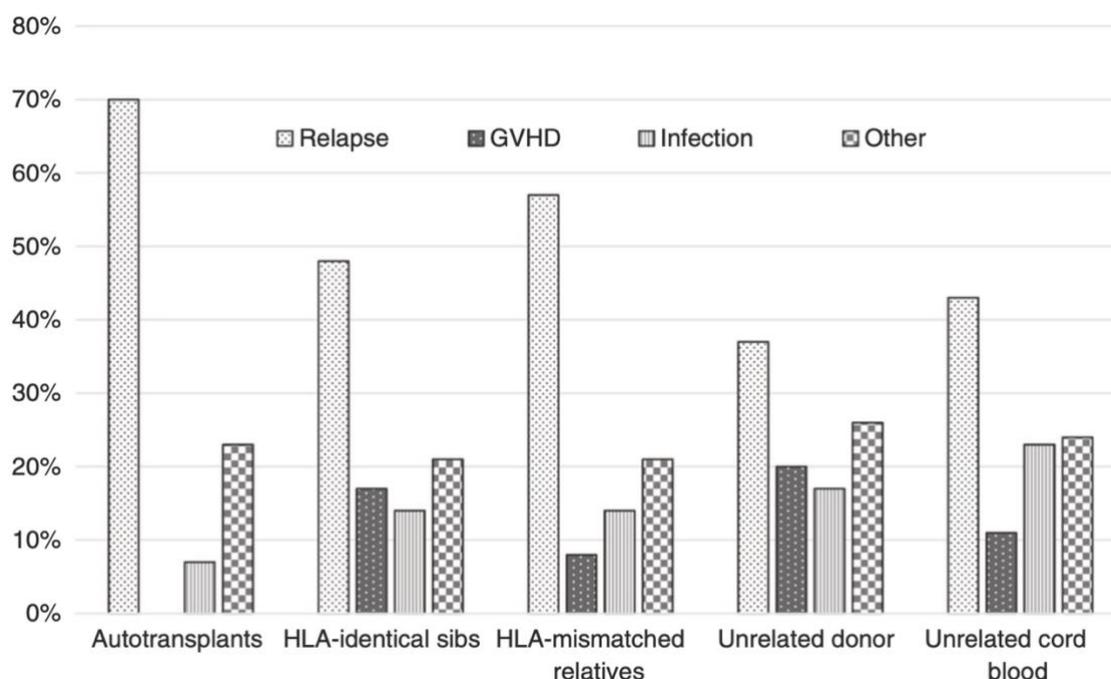


Figure 3 : Causes de décès parmi des patients ayant bénéficié d'une autogreffe (1^{ère} colonne) et allogreffe selon comptabilité HLA ou utilisation du sang de cordon) entre 2012 et 2013 (Données du CIBMTR).

Par ailleurs, Horowitz et *al.* ont publié en 2018 (99), après revue des données de 308745 patients ayant bénéficié d'une allogreffe entre 1980 et 2014 pour une hémopathie maligne, la proportion d'échec du traitement, définie comme la mortalité liée à la rechute et la TRM, relative à chaque décennie. Il apparaît, comme attendu, une diminution de la TRM jusqu'à nos jours, contrastant avec une augmentation des décès liés à la rechute, pour une relative stabilité du taux d'échec (**Figure 4a**). Cette tendance peut être expliquée en partie par l'utilisation des conditionnements d'intensité réduite, bien que leur usage n'ait été plus fréquent qu'à partir des années 2000.

On observe les mêmes constats en ne s'intéressant qu'aux patients allogreffés pour une leucémie aigue myéloblastique en 1^{ère} rémission complète mais cette fois-ci avec un conditionnement myéloablatif (**Figure 4b**). On peut l'expliquer par l'augmentation en valeur absolue du nombre d'allogreffes réalisées dans cette indication qui recrute inévitablement de plus en plus de patients de haut risque avec une probabilité de rechute post-allogreffe plus importante.

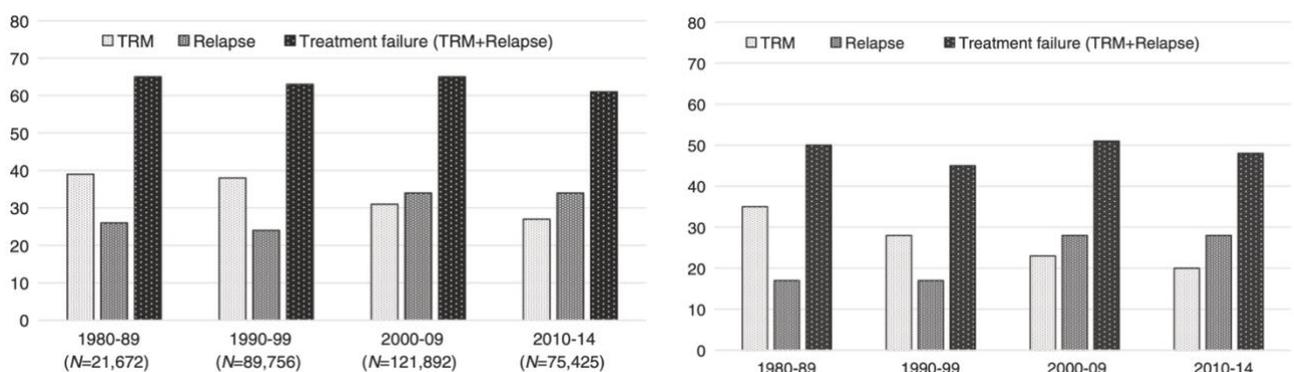


Figure 4a (gauche) et **4b** (droite) : *Échec du traitement à 5 ans post allogreffe représentée par la mortalité liée au traitement (TRM) et le taux de rechute, en fonction des décennies, respectivement pour (a) toutes hémopathies malignes confondues et (b) pour les leucémies aiguës myéloblastiques allogreffés en 1^{ère} rémission complète avec conditionnement myéloablatif. (D'après Holowitz et al) (99)*

Bien entendu, les données présentées ci-dessus concernent une population large de patients et n'ont pas été analysées en fonction des facteurs défavorables pouvant influencer la rechute. Il s'agit davantage de présenter le paysage général de l'impact de l'allogreffe au cours des dernières décennies et d'en tirer des perspectives d'amélioration. Certes l'allogreffe est une pratique plus sûre qu'au début des années 1980 mais pour autant, on peut se demander si ceci n'a pas diminué l'efficacité anti-tumorale de cette dernière. En effet, la NRM et la survenue de rechute peuvent être considérées comme deux évènements concurrents dans la mesure où diminuer la survenue d'un évènement peut augmenter la fréquence de son homologue.

Suivant ce postulat, puisqu'il ne paraît pas acceptable d'appliquer le principe des vases communicants entre NRM et rechute, la prévention de cette dernière devra passer par des stratégies spécifiques comportant la compréhension de sa physiopathologie afin d'utiliser d'autres agents pharmacologiques pour ne pas compromettre l'amélioration de la NRM.

1.4.2. Mécanismes d'échappement immunologique

Les mécanismes expliquant la rechute post-allogreffe sont multiples et celle-ci reste fréquente dans un groupe de patients aux facteurs de risques bien identifiés.

Ils illustrent la plasticité des cellules tumorales et leur capacité d'adaptation sous la pression sélective thérapeutique.

Ces mécanismes d'échappement entraînent la diminution de la réponse T effectrice du donneur mais peuvent également modifier l'action des lymphocytes T NK via leur récepteur KIR, et T régulateurs, voire de l'immunité humorale ; on cite par exemple (69,99–103) :

- Évasion vers un site sanctuaire (système nerveux central, gonades)
 - Diminution de la présentation antigéniques par perte du HLA (pour les greffons « mismatched » notamment haplo-identiques) ou rétrocontrôle négatif de l'expression des molécules HLA de classe II
 - Production directe de cytokines anti-inflammatoires (TGF- β , IL-10, IL-4) ou indirecte via sécrétion de phosphatidylserine
 - Diminution ou résistance aux cytokines pro-inflammatoires (IL-15, IL-7, TNF- α , IFN- γ , IL-2)
 - Diminution de l'expression de molécules de co-stimulation (CD80, CD83, CD86, CD40) et d'adhésion (LFA-1, ICAM)
 - Expression de FAS-L ou FAS non fonctionnel sur les cellules tumorales
 - Sécrétion d'enzyme immunosuppressive (IDO, CD73, CD39, arginase) inhibant la fonction des lymphocytes T effectrices, et modulant celle des Tregs
 - Dérégulation de checkpoints immunologiques (PD-L1, B7-H3, -H4, CD155)
- (104)

- Évasion de la réponse T NK via régulation épigénétique de l'expression des ligands du récepteur NKG2DL, ou molécules co-inhibitrices (TIGIT, TACTILE, PVRIG)
- Acquisition de mutation supplémentaire conférant un avantage comme un oncogène (KRAS, FLT3), ou gène suppresseur de tumeur (PTEN)
- Évasion de la détection par le biais du microenvironnement tumoral (105,106).

1.4.3. Facteurs de risques et approches de prévention

L'indication principale d'allogreffe étant le contrôle de la maladie, ces données relatives à la rechute ont appelé une réflexion sur des stratégies de prévention de la rechute ou de maintenance post allogreffe ainsi que sur la population de patients qui pourraient en bénéficier.

Les patients les plus à risque sont déterminés en fonction des caractéristiques initiales de l'hémopathie comme (23,24,51,107–113) :

- un risque cytogénétique (défini selon l'ELN 2017, le R-IPSS) et moléculaire (mutation de TP53, FLT3, ASXL1...) défavorable,
- un statut hématologique pré-greffe de mauvais répondeur
- ou l'existence d'une maladie résiduelle positive en pré-greffe (MRD).

Parmi les autres facteurs identifiés on peut citer de manière non exhaustive (9,98,108):

- une MRD positive en post-allogreffe (114),
- l'utilisation d'un conditionnement atténué (60),
- l'absence de GVH chronique (67),
- la perte du chimérisme (115),
- le recours à un agent lymphodéplétif *in vivo* ou *ex vivo* (13),
- et de manière plus controversée l'utilisation du cyclophosphamide à forte dose.

En partant de ce constat, de nombreuses stratégies de prévention de rechute post allogreffe ont été étudiées, à débiter si l'état du patient le permet, dans les trois à six premiers mois voire plus tôt, où le risque de rechute reste le plus prépondérant (116–118). L'intention derrière ces différentes approches est d'augmenter l'immunogénicité des lymphocytes T alloréactifs du donneur contre les cellules tumorales, soit de réactiver un effet GVL, idéalement sans pour autant majorer le risque de GVH.

Parmi les différents traitements utilisés, on peut citer les injections de lymphocytes du donneur (DLI), l'arrêt précoce de l'immunosuppression en l'absence de GVH à partir de J60, le traitement de maintenance par inhibiteur de FLT3, par inhibiteur d'histone deacetylase (HDACi), et enfin par agent hypométhylant comme le 5-azacytidine (AZA) (100,116–120).

La **figure 5** représente le parcours du patient depuis le diagnostic avec les différentes interventions thérapeutiques influençant la rechute. Elle résume les approches pouvant être adoptées pour sa prévention, en tirant partie de l'effet GVL post-greffe, à savoir (22,101) :

- Une stratification des patients qui en bénéficieront sur les caractéristiques de « haut risque »
- Un traitement de maintenance ou prophylactique sur la base de cette stratification
- Un traitement préemptif pour « rattraper » tous les autres selon les données de surveillance du chimérisme et de la MRD post-greffe.

L'objectif est de faire le pont entre l'effet anti-leucémique du conditionnement et l'installation de l'effet GVL grâce au système immunitaire du donneur.

Ceci pour ne pas avoir recours à un traitement de rattrapage post-greffe dont la perspective curative dépendrait d'une deuxième allogreffe (121).

Cette option est toujours faisable chez des patients en bon état général, bien que la toxicité cumulée expose à des complications plus fréquentes et sévères (122).

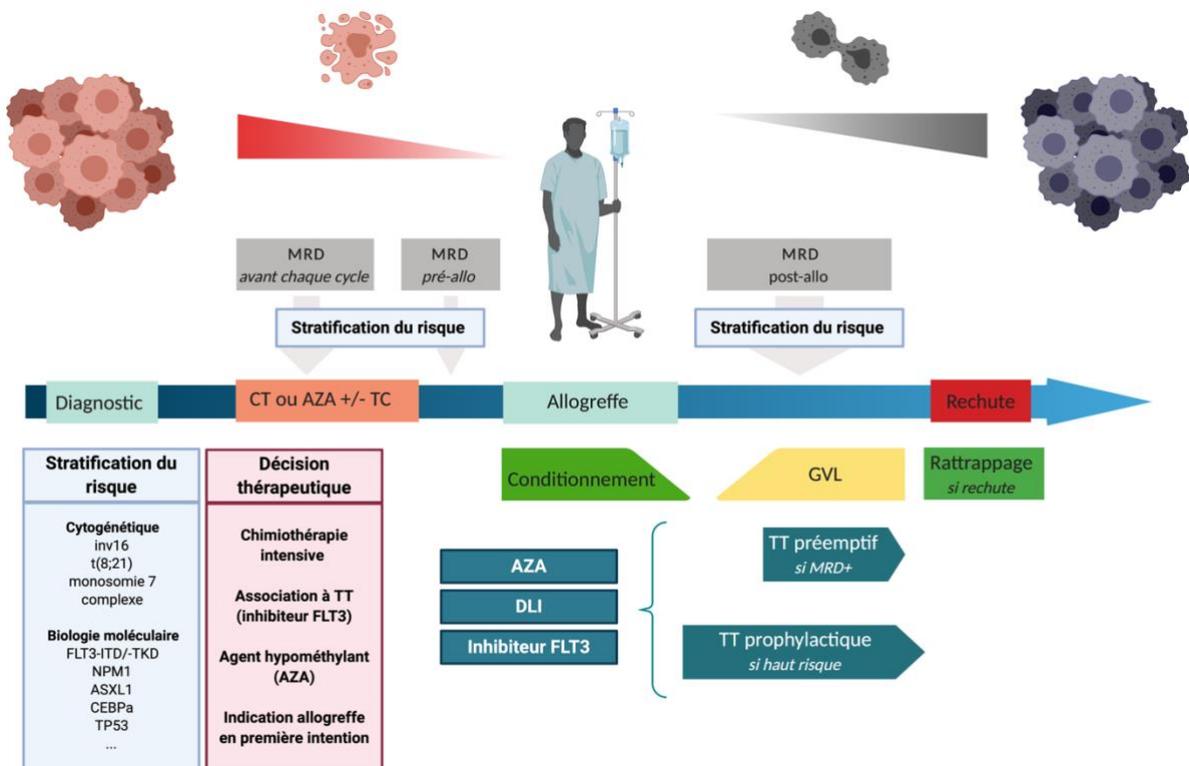


Figure 5 : Parcours du patient allogreffé et intégration de stratégies de prévention de rechute.

AZA : 5-azacytidine, **CT** : chimiothérapie, **DLI** : lymphocyte du donneur, **GVL** : « graft versus leukemia », **MRD** : maladie résiduelle détectable, **TC** : thérapie ciblée, **TT** : traitement

2. Traitements prophylactiques post-allogreffe des LAM, SMD et LMMC

2.1. Stratégies médicamenteuses

2.1.1. 5-azacytidine (AZA)

2.1.1.1. Généralités

Le 5-azacytidine (AZA) est un agent hypométhylant dont l'efficacité a été démontrée dans de nombreuses études en première ligne du traitement des LAM du sujet âgé ou non éligible à un régime de chimiothérapie intensive ou enfin avec cytogénétique défavorable (30,31,123–125). Son rôle est également mis en avant en traitement des syndromes myélodysplasiques (SMD) de pronostic défavorable, en bridging ou non avant une allogreffe de CSH (57,62,124,126).

La posologie utilisée en traitement curatif est de 75 mg/m² pendant 7 jours en cycle de 28 jours et de 32 à 36 voire parfois 75 mg/m² pendant 5 jours en traitement prophylactique.

La decitabine, un autre agent de la même classe pharmacologique, retiré du marché à compter du 22/12/2019, a aussi été fréquemment utilisée dans ces indications, et fait l'objet d'observations similaires dans la littérature.

Bien qu'il semble exister un bénéfice de survie globale dans ces indications, il ne s'agit pas d'un traitement curatif. Ainsi, l'AZA a pu être intégré dans les stratégies thérapeutiques en *bridging* vers l'allogreffe comme une option thérapeutique non intensive chez les patients non éligibles à une induction classique (61,127,128).

Son efficacité dans ces indications a permis son étude dans le contexte de stratégie de prévention de la rechute.

2.1.1.2. Mécanismes d'action supposés

L'étendue de son action pharmacologique, non complètement élucidée, semble reposer sur un mécanisme de régulation épigénétique aboutissant à un effet immunomodulateur et pro-apoptotique (129).

En effet, il s'agit d'un analogue de la cytidine, utilisé initialement dans des études in vitro menées par Jones et Taylor (130) comme anti-métabolite, propriété propre à son utilisation à forte dose. A une posologie plus réduite, il s'agit d'un inhibiteur direct et irréversible de la DNA methyltransferase, lorsque incorporé dans le noyau durant la phase S du cycle cellulaire (129–131). Cette dernière serait responsable de l'hyperméthylation et donc l'inactivation de nombreux gènes exprimés par les cellules tumorales. Parmi eux, il existe des gènes dont le niveau de méthylation est associé à l'échappement des cellules tumorales à la réponse immunitaire innée et acquise.

En effet, il a été démontré que le traitement par AZA permet une augmentation de :

- l'expression des mêmes antigènes tumoraux spécifiques (CTA) impliqués dans l'effet GVL, comme MAGE-1 (« *Melanoma associated antigen 1* »), NY-ESO-1 et SSX (132–136),
- transcrits de rétrovirus endogènes humains (HERV) dont l'accumulation cytoplasmique entraîne l'apoptose (137,138) et ayant un rôle immunomodulateur par le biais d'une réponse interféron de type I et III puis la production de cytokines pro-inflammatoires (139,140).
- l'expression de molécules HLA du CMH (141).

Ainsi, l'expression accrue de ces antigènes tumoraux spécifiques, aboutirait à la reconnaissance de ces derniers par des lymphocytes naïfs puis une réponse immunologique acquise T CD8+ en restaurant les mécanismes de la synapse

immunologique, défailants dans les hémopathies myéloïdes ou plus généralement dans les néoplasies (135). Dans une étude *in vitro* et *in vivo* menée par Goodyear et al (135), il a été montré sur des lignées cellulaires de leucémies aiguës que le traitement par AZA et/ou par un HDACi, le valproate de sodium (VPA), pouvaient induire l'expression de CTA dont la transcription était soit silencieuse ou discrètement active, selon un facteur dix (**Figure 6a**) mais aussi d'augmenter l'expression de molécule de co-stimulation impliquée dans la synapse immunologique comme le CD86 (**Figure 6b**).

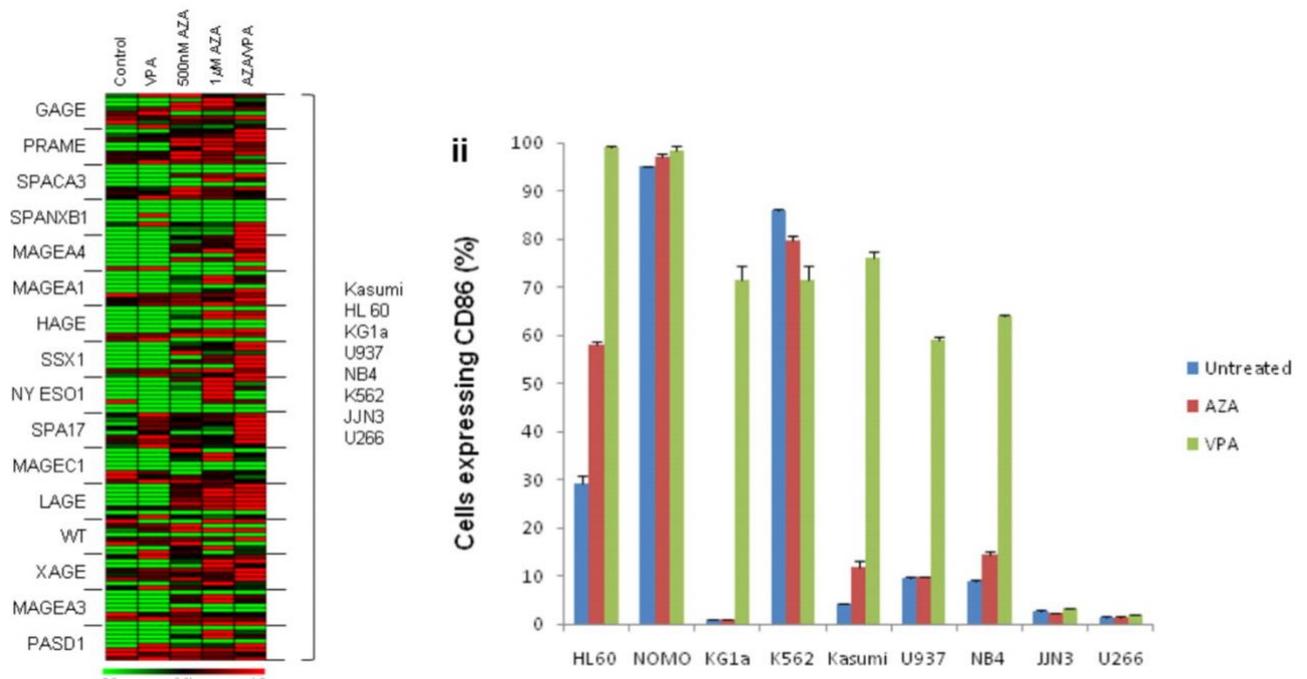


Figure 6a (gauche) et **6b** (droite) : Induction de l'expression de CTA (a) et d'une molécule de costimulation, le CD86 (b), après exposition à AZA et VPA dans des lignées cellulaires d'hémopathies malignes (LAM et SMD). (D'après Goodyear et al (135).

Par ailleurs, chez 21 patients atteints de LAM ou SMD traités par AZA, 11 patients ont présenté une réponse CTL spécifiquement dirigée contre MAGE, avec 8 patients parmi eux répondeurs dont 4 réponses complètes pour une LAM réfractaire avant traitement.

D'autres observations comparables ont par ailleurs été caractérisées concernant d'autres CTA comme WT1, PR3 et PRAME (142,143).

En outre, à l'ère de l'immunothérapie, il existe un intérêt particulier pour les inhibiteurs de checkpoint dont le mécanisme d'action suppose également une restitution de la réponse immunitaire de l'hôte contre les cellules tumorales. Par ailleurs, les molécules de checkpoints sont également impliquées dans les mécanismes d'échappement immunologique après l'allogreffe (104). Ainsi, on pourrait supposer une implication indirecte des voies de signalisation médiés par PD-1, PD-L1, PD-L2 et CTLA4 dans le mécanisme d'action des agents hypométhylants ou au contraire dans la résistance au traitement. En effet, Yang *et al* (144) ont montré *in vitro* une hyper expression aberrante de PD-1, PD-L1, PD-L2 et CTLA4 sur des lignées cellulaires de LAM, SMD et LMMC mais aussi sur les APC du patient ; suggérant un rôle dans la pathogénie de ces hémopathies myéloïdes quant à PD-1 et ses ligands.

Parallèlement, s'il s'agit de PD-L1 qui semble être surexprimé sur les cellules tumorales, c'est son récepteur PD-1 qui l'est sur les cellules stromales adjacentes, plaidant en faveur d'un rôle du microenvironnement tumoral dans les mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire (99,105,106). En ce sens, sur une cohorte de LAM, LMMC et SMD traités par agent hypométhylant, l'AZA et la decitabine, Yang *et al* ont retrouvé une expression accrue de PD-1, PD-L1, PD-L2 et CTLA4 de l'ordre d'un facteur deux dans un groupe de patients résistants au traitement comparativement à ceux en réponse, et ce de manière dose-dépendante. Ceci est corrélé à une déméthylation plus importante des gènes codants pour ces derniers notamment PD-1, une diminution de la réponse CTL et de la sécrétion de cytokines corrélées à celle-ci.

Le locus de PD-1, et son niveau de méthylation, a aussi un rôle dans la différenciation des lymphocytes T CD8 mémoires. Or, il a été montré dans un modèle d'infection virale aiguë que l'activation du TCR et de la réponse CTL était corrélée à l'hyperméthylation du promoteur de PD-1. A l'inverse, dans un modèle d'infection virale chronique (145) et chez des LAM en rechute post-allogreffe (104), la déméthylation de PD-1 semblait être corrélée à l'épuisement de la réponse CTL. Ørskov et al (146) corroboraient aussi ces résultats *in vivo* chez des SMD traités par AZA où une hyperméthylation du promoteur de PD-1 était observée chez 44% des patients et était associée à une mauvaise réponse au traitement (8% vs 60% ; p=0.014) ainsi qu'une tendance à une survie globale diminuée (p=0.11).

Par ailleurs, il a été rapporté que l'AZA inhibe la prolifération, l'activation et l'expansion de lymphocytes T effecteurs au profit de lymphocytes T régulateurs par la modulation épigénétique de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4) en (136) :

- diminuant l'expression de gènes impliqués dans l'activation du cycle cellulaire des CTL (*MAP3K5*, *MAPK14*, *IFNAR2*, *CCNG2*, *MTCP1*, *CD58*, et *ADK*)
- augmentant l'expression de gènes induisant l'arrêt de leur cycle cellulaire (*DCUN1D2*, *U2AF2*, *GADD45B*, et *P53*) ou l'inhibant via l'inhibition de NF κ B (*FOXO3a*)
- augmentant l'expression de FOXP3 dont les voies de signalisation d'aval impliquent une expansion de lymphocytes T regs (80–82,147)
- Modulant l'expression des récepteurs KIRs sur les lymphocytes T NK (148)

Ceci était corrélé *in vivo* dans un modèle de transplantation chez des souris sans « mismatch », à une diminution de la survenue de GVH. Il est intéressant de noter que l’AZA était utilisé à des doses « prophylactiques », dont la concentration n’est pas associée à un effet pro-apoptotique (136).

Ainsi, si l’AZA tire son efficacité de la régulation positive de l’expression d’antigènes de surface tumoraux, la dérégulation d’autres gènes peut, au contraire, expliquer un mécanisme de résistance dont le fondement entre en contradiction avec l’effet immunologique bénéfique et recherché de l’allogreffe de CSH (149). Ceci plaiderait donc en défaveur d’un traitement concomitant par AZA en post-allogreffe dans la prévention de la rechute, surtout à des doses infra thérapeutiques par rapport au traitement des LAM et SMD.

Cependant, la modulation de l’expression des gènes régulant le cycle cellulaire des lymphocytes T et de molécules de checkpoints immunologique peut favoriser l’expansion de lymphocytes Tregs, au détriment d’une population effectrice, et expliquer le constat d’un effet protecteur sur la GVH dans la littérature (82,136,150–154).

Les différents mécanismes d’action présumés de l’AZA, associant un effet anti-leucémique (GVL) et protecteur de GVH, sont résumés sur la **Figure 7**.



Figure 7 : Mécanismes d'action de l'AZA en post-greffe sur la GVL et GVH

Si la physiopathologie impliquant son effet thérapeutique n'est pas complètement élucidée, de nombreux travaux ont tenté de préciser sa place dans le spectre plus restreint de l'allogreffe à savoir en traitement de la rechute, préemptif ou prophylactique (155).

2.1.1.3. *Traitement de la rechute*

Sur les hémopathies myéloïdes, de nombreuses études ont démontré, en rechute post-allogreffe, tantôt un bénéfice de survie globale, tantôt de survie sans progression, en association ou non avec des DLI, avec ou sans stratégie de deuxième allogreffe de CSH.

Jabbour et *al* (156), dans une étude de phase I-II, étaient les premiers à mettre en évidence une efficacité de l'AZA à dose réduite en rechute post-allogreffe avec cinq réponses obtenues sur neuf patients. Le rationnel d'une dose plus réduite en période post-allogreffe par rapport à l'AMM de l'AZA est l'épargne de toxicité médullaire. De plus, certains auteurs plaident pour un effet déméthylant plus important à plus faible dose d'AZA, alors que son effet pro-apoptotique direct s'obtient à dose plus élevée, bien que ceci reste contesté. Les patients répondeurs ont aussi bénéficié d'un arrêt précoce de l'immunosuppression que les auteurs n'attribuent pas à la réponse obtenue. En l'occurrence, dans la littérature, le taux de réponse après l'arrêt seul de l'immunosuppression, est proche de zéro (157–159).

Lübbert et *al* (160) avaient également proposé à 26 patients en rechute post allogreffe (24 LAM et 2 LMMC) un traitement court de 3 jours d'AZA selon des cycles de 21 jours à la dose quotidienne de 100mg en association à des DLI pour 73% d'entre eux.

66% des patients ont, selon eux, tiré un bénéfice de ce traitement avec 16% (4/26) de RC d'une durée médiane de 525 jours (entre 45 et 820 jours) et 50% de maladie stable avec persistance d'un chimérisme mixte pour une durée médiane de 72 jours. Ceci contraste avec une survie à deux de 16%.

Ceci est confirmé par Schroeder et al (161) dans une étude prospective multicentrique de phase II (AZARELA), évaluant l'AZA en association à des DLI chez 30 patients atteints de LAM (n= 28) et SMD (n= 2). Les DLI ont pu être administrées chez 73% des patients. Le taux de réponse globale était de 30% (n= 9) avec 23% de RC (n= 7) et 7% de RP (n= 2). 5 patients étaient toujours en RC avec un temps médian de réponse de 777 jours (entre 461 et 888 jours). La survie globale à deux ans pour l'ensemble des patients était de 18%, corrélant avec la gravité du pronostic de ces patients, alors que les patients en RC présentaient une meilleure survie de l'ordre de 70%. Le taux de GVH aigue et chronique était quant à lui, relativement plus faible que dans d'autres séries étudiant l'association AZA-DLI, respectivement à 37% et 17%. Ces résultats sont notables, notamment au regard de la survie des patients répondeurs qui présentaient, pour 90% d'entre eux, une cytogénétique défavorable et une rechute précoce avant le J100. Le taux de réponse est comparable à celui obtenu avec la chimiothérapie conventionnelle dans la littérature de l'ordre 17-30%.

En revanche, il n'est pas aisé de déterminer l'imputabilité seule de l'AZA dans l'interprétation de ces résultats. En effet, dans la littérature, le taux de RC après traitement par DLI seul est de l'ordre de 34% avec une survie comparable à deux ans de 21% (98,158) alors que la survie globale et sans progression à 5 ans après deuxième allogreffe est de 28% dans une autre cohorte (122).

Enfin, Craddock et al (162) rapportent, chez 181 patients en rechute post allogreffe dont 116 LAM et 65 SMD, une réponse majeure (RC et RP) de l'ordre de 29,3% (15% RC et 14,3% RP) à l'AZA en dose curative, c'est-à-dire 75 mg/m² pendant 7 jours selon des cycles de 28 jours. L'obtention d'une RC est corrélée à une meilleure survie globale à 2 ans de 48% versus 12% pour la cohorte globale. Les facteurs influençant

indépendamment la survie étaient un statut prégreffe de RC, un diagnostic initial de SMD, la blastose médullaire à la rechute et l'intervalle avant la rechute.

Il s'agissait également de la 1^{ère} étude s'intéressant à l'administration concomitante de DLI avec AZA sur une large cohorte (38% des patients traités ont reçu des DLI), ce qui n'était pas corrélé à un effet bénéfique sur la survie ou le taux de rechute.

En définitive, cette stratégie de traitement en rechute post-allogreffe est souvent préférable à une chimiothérapie intensive, si un projet de deuxième allogreffe ou de DLI est faisable. Ce d'autant que l'on observe dans la littérature des taux de réponse avec l'AZA comparable à ceux du traitement de rattrapage de l'ordre de 15-30%, mais avec un profil de toxicité plus favorable chez ces patients déjà lourdement traités et pour qui la sanction en cas de toxicité trop importante serait d'être récusés à une deuxième allogreffe (98).

2.1.1.4. Stratégie préemptive

Il s'agit d'un traitement basé sur la MRD, réalisé par Platzbecker et al (163,164), dans leurs études de phase II, RELAZA puis RELAZA2.

L'objectif était de traiter la rechute non hématologique mais imminente chez les patients présentant une MRD positive soit avec un chimérisme <80% (115) ou à l'aide d'un marqueur de suivi en biologie moléculaire en post-allogreffe (114).

Une médiane de quatre cycles d'AZA à dose curative a permis une réponse de l'ordre de 80%, à savoir une augmentation du chimérisme dans 50% des cas et une stabilisation dans 30% des cas sans rechute morphologique. Finalement 65% des patients (13 sur 20) ont rechuté mais avec un délai médian de 231 jours (entre 56 et 558 jours), plaidant davantage pour un intérêt à repousser la rechute morphologique

plutôt que de la prévenir, dans l'attente d'une stratégie de deuxième allogreffe, si réalisable.

En ce sens, son efficacité en rechute post-allogreffe et des observations sur un éventuel effet protecteur de GVH, ont posé le postulat d'un intérêt en prévention de la rechute post allogreffe pour accentuer l'effet GVL tout en ne favorisant pas son pendant négatif qu'est la GVH.

2.1.1.5. *Stratégie prophylactique*

Elle consiste en un traitement prophylactique, aussi appelé de maintenance, par AZA, défini au préalable au même titre que les modalités de l'allogreffe, sur la base de critères de mauvais pronostic, prédictifs de rechute. Elle tient compte du risque de toxicité surajoutée en utilisant l'AZA à des posologies plus réduites que la stratégie préemptive (32 à 36 mg/m² pour 5 jours).

Il existe quelques observations dans la littérature étudiant la maintenance post-greffe par AZA, parmi lesquelles on peut citer (**Figure 8**) :

- **de Lima et al** (165): essai de phase I-II, étudiant plusieurs schémas thérapeutiques. Leur objectif principal était d'évaluer la tolérance de l'AZA prophylactique à faible dose, surtout aussi précocement après l'allogreffe, où le greffon est particulièrement sensible à la myelosuppression et secondairement d'évaluer son effet en termes d'OS et EFS. 45 patients ont été traités par AZA à partir de la 6^{ème} semaine suivant la réinjection, si en rémission complète à J30. Ils présentaient une LAM (n=37) ou un SMD (n=8) de « haut risque » défini comme tel :
 - non éligible à un conditionnement myéloablatif,
 - non allogreffé en 1^{ère} RC,

- avec cytogénétique défavorable,
- réfractaire

Sur les 90 patients screenés, seulement la moitié a finalement été inclus selon ces critères pour un maximum de quatre cycles. La dose de 32mg/m² a été déterminée comme étant acceptable en termes de toxicité. Un total de 24 patients (53%) a rechuté pendant l'étude, et 4 (9%) sont décédés ; l'OS et l'EFS médianes étaient respectivement de 31 mois et 18 mois soit à 2 ans 58% et 30%. L'EFS semblait indépendamment corrélée à un statut pré-greffe de RC et les facteurs qui influençaient conjointement l'OS et l'EFS favorablement étaient la blastose médullaire initiale, le nombre de comorbidités, de lignes antérieures et de cycles d'AZA. Il n'y avait pas d'association entre la dose et ces paramètres. Au contraire, l'AZA semblait diminuer significativement la survenue de GVH chronique.

Le seuil de 4 cycles n'était ici qu'arbitraire pour dégager un schéma d'administration et les auteurs supposent que le profil de tolérance pourrait permettre un traitement plus prolongé, ce qui aurait pour rationnel de couvrir une période plus longue dans la mesure où la rechute post allogreffe est maximale les six premiers mois voire la première année.

- **Craddock et al** (166): étude de phase II intitulée RICAZA, évaluant l'administration de l'AZA, à la dose de 36 mg/m² pour 12 cycles prévisionnels. 51 patients atteints de LAM de haut risque ont été screenés et finalement 37 patients inclus ayant effectivement reçu au moins un cycle d'AZA ; ils ne pouvaient pas recevoir de DLI durant la première année post-allogreffe. Le traitement était débuté à une médiane de J54 (40-194), et l'immunosuppression diminuée à partir de J60. Les investigateurs ont choisi de déterminer sur des

prélèvements sanguins l'existence d'une réponse CTL anti tumorale spécifique par cytométrie en flux, sous-tendue par le mécanisme d'action supposé de l'AZA. Le critère de jugement principal était l'EFS selon l'existence d'une réponse CTL. Il fut ainsi observé sous AZA prophylactique et si induction d'une réponse CTL, une meilleure EFS (HR= 0.29 ; p= 0.02) et une diminution du risque de rechute (HR= 0.3 ; p= 0.02), comparativement aux patients traités mais sans réponse CTL. Évaluer l'EFS paraît être approprié pour montrer un bénéfice de l'AZA en prévention de la rechute. Cependant, cette méthodologie était aussi critiquable dans la mesure où l'EFS a été comparée au sein même de tous les patients ayant reçu le traitement prophylactique selon le paramètre de détection d'une réponse CTL anti tumorale. Or celui-ci ne reflétait pas à lui seul, l'effet « ON » de l'AZA alors que son absence désignerait l'effet « OFF » et reviendrait à conclure que ce groupe de patients était extrapolable un groupe contrôle n'ayant pas reçu l'AZA. Bien qu'une tendance au bénéfice de l'AZA ait été mise en évidence, cette méthode ne permettait pas de l'affirmer.

- **El-Cheikh et al** (167): étude observationnelle menée chez 18 patients (LAM=13 ; SMD=5) comportant environ 50% de haut risque défini par le *Disease risk index* (DRI), traité par AZA à la dose de 32mg/m² (J1-J5) selon des cycles de 28 jours pour une durée maximale de 5 ans. La survie globale et sans progression à 1 an étaient respectivement de 70% et 63% avec une phase de plateau au-delà de cette période.
- **Maples et al** (168): étude rétrospective de phase II comparant un groupe de 25 patients traités par AZA (LAM et SMD) après allogreffe de CSH à une cohorte contrôle comparable, ne rapportaient aucune différence d'occurrence de rechute, survie globale, ou NRM. Les patients du groupe AZA n'étaient pas

inclus en fonction de leur haut risque de rechute post-allogreffe et avaient, au contraire, reçu un conditionnement myéloablatif, associé à un meilleur résultat en termes de rechute.

- **Oshikawa et al** (169): étude de phase II évaluant, chez des patients à haut risque de rechute, l'association de l'AZA au gemtuzumab ozogamicin (anticorps anti-CD33), utilisée dans le traitement des LAM, avec une tendance non significative à une meilleure OS et EFS à 1 an en comparaison à une cohorte contrôle (OS : 70% vs 59,8% ; $p=0.138$ – EFS : 60% vs 42,8% ; $p=0.222$).
- **Pusic et al** (170): étude de phase I-II évaluant une maintenance par decitabine comportant 22 patients. L'OS et l'EFS à deux ans étaient respectivement de 56% et 48% avec une incidence cumulée de rechute à deux ans de 28%. La GVH chronique n'était pas impactée malgré une tendance à l'augmentation de l'expression de FOXP3.
- **de Lima et al** (171) : essai de phase I-II, étudiant l'administration d'une forme orale de l'AZA (CC-486), en prévention de la rechute post-allogreffe pour LAM et SMD. Un schéma de traitement de 200mg par jour durant 14 jours selon des cycles de 28 jours a été jugé le plus favorable. Dans ce groupe, le taux de rechute cumulée à 1 an était de 13%, ce qui le comparait favorablement à celui de 53% lors de l'étude de phase I-II de de Lima et al. Cependant, les patients inclus ici ne présentaient aucun caractère pronostique défavorable pour être inclus dans l'étude. Au contraire, il s'agissait d'une cohorte de LAM et SMD avec indication d'allogreffe « standard ».
- **Guillaume et al** (172): essai prospectif de phase II évaluant l'AZA à dose prophylactique de 32 mg/m² pour un nombre théorique de 12 cycles en

association avec des DLI chez 30 patients atteints de LAM (n=20) et SMD (n=10) définit comme tel :

- cytogénétique initiale défavorable,
- non répondeur avant allogreffe
- IPSS au moins intermédiaire 2.

Tous les patients étaient en RC morphologique avant de recevoir l'AZA avec une fenêtre d'administration comprise entre J56 et 100. Les autres critères d'éligibilité étaient une prise de greffe satisfaisante, l'absence de GVH aigue (ou maximum grade 1), de défaillance hépatique, rénale ou d'infection active. Le critère de jugement principal était l'incidence cumulée de la rechute comparée à une cohorte contrôle.

L'AZA a dû être interrompue chez 20 patients (66%) pour cause de GVH ou de rechute, mais 10 patients (33%) ont complété les 12 cycles prévus. Avec un temps médian de suivi de 49 mois, l'OS et EFS étaient de 65,5%. L'incidence cumulée de la rechute à 2 ans était de 27,2% avec un temps médian avant rechute de 7 mois (entre 2,5 et 58 mois) et non significative, lorsque comparée à une cohorte contrôle (p=0,21). L'incidence cumulée de GVH aigue et chronique à 2 ans étaient respectivement de 31,5% et 53%. L'OS, l'EFS, l'occurrence de GVH et enfin la NRM comparatives n'étaient pas significatives. Les auteurs ont supposé que l'absence de différence observée sur la GVH, comparée à l'effet protecteur de l'AZA attendu, serait dû à l'effet inducteur des DLI qui gommerait un éventuel bénéfice de l'AZA. Même s'il existait une augmentation d'un contingent de lymphocytes T regs avec expression de PD-1 et FOXP3, ce résultat n'était pas statistiquement significatif. Ils n'ont pas observé d'induction de réponse CTL spécifique.

Enfin, il n'y avait pas de consensus, dans ces différentes études, sur la durée du traitement de maintenance. Si certains préconisaient un traitement d'un an, il était aussi faisable d'en étendre la durée jusqu'à cinq ans comme l'ont montré El-Cheikh et al (167). Le rationnel serait d'éradiquer de manière temps-dépendant la maladie résiduelle au niveau des niches hématopoïétiques.

	de Lima et al, 2010 - Cancer	Craddock et al, 2016 - BBMT (RICAZA)	El-Cheikh et al, 2017 - BMT	Maples et al, 2017 - BMT	Oshikawa et al, 2015 - Br J Haematol	de Lima et al, 2018 - BBMT	Guillaume et al, 2019 - BMT
Type d'étude	Phase I-II Prospective Multicentrique	Phase II Prospective Multicentrique	Phase II Prospective Unicentrique	Phase II Rétrospective Unicentrique	Phase II Prospective Unicentrique	Phase I-II Prospective Multicentrique	Phase II Prospective Multicentrique
Dose	J1-J5 /28j 8mg/m2 16mg/m2 24 mg/m2 32mg/m2 40mg/m2	J1-J5 /28j 36mg/m2 Pour un an	J1-J5 /28j 32mg/m2 Pour 5 ans	J1-J5 /28j 36mg/m2 Pour un an	J1-J7 /28j 30mg/m2 Pour 4 mois	J1-J7 ou J1-J14 300mg/j 400mg/j 600mg/j	J1-J5 /28j 32mg/m2 Pour 1 an
Population	<u>45 patients haut risque</u> LAM = 37 SMD = 8	<u>37 patients haut risque</u> LAM	<u>18 patients</u> LAM = 13 SMD = 5	<u>25 patients</u> LAM = 18 SMD = 7	<u>10 patients haut risque</u> LAM	<u>30 patients</u> LAM = 26 SMD = 4	<u>30 patients haut risque</u> LAM = 20 SMD = 10
Association	NON	NON	NON	NON	Gemtuzumab ozogamicin	NON	DLI Chez 67% des patients
Résultats	<ul style="list-style-type: none"> OS 2 ans: 58% EFS 2 ans: 30% Moins de GVH chronique 	<p>Selon réponse CTL</p> <ul style="list-style-type: none"> RFS 2 ans: 70% vs 50% Taux rechute: HR=0.3 (p=0.02) 	<ul style="list-style-type: none"> OS 2 ans 70% EFS 2 ans 63% GVHa 11% GVHch 22% 	<p>Aucune différence (OS, EFS, NRM) Comparée à cohorte contrôle</p>	<ul style="list-style-type: none"> OS 1 an: 70% vs 59,8% (p=0.138) EFS 1 an: 60% vs 42,8% ; (p=0.222) <p>Comparée à cohorte contrôle</p>	<ul style="list-style-type: none"> OS 1 an: 85% Taux rechute 1 an: 13% GVH 1 an: 50% GVHch 25-30% 	<ul style="list-style-type: none"> OS et EFS 2 ans: 65,5% Taux rechute 2 an: 27,6% vs 41,9% (p=0.21) <p>Comparée à cohorte contrôle</p>
Limites	<ul style="list-style-type: none"> Biais de sélection Non comparative Faible nb patients Faible nb cycles (4 maximum) 	<ul style="list-style-type: none"> Biais de sélection Faible nb patients Critère de jugement comparatif (CTL) non adapté 	<ul style="list-style-type: none"> Biais de sélection Faible nb patients Que 50% de haut risque Non comparative 	<ul style="list-style-type: none"> Faible nb patients Population non représentative (conditionnement myéloablatif) 	<ul style="list-style-type: none"> Biais de sélection Faible nb patients Faible nb cycles (4 maximum) 	<ul style="list-style-type: none"> Biais de sélection Faible nb patients Non comparative Population non représentative (non haut risque) 	<ul style="list-style-type: none"> Biais de sélection Faible nb patients

Figure 8 : Récapitulatif des différentes études évaluant l'AZA en stratégie prophylactique

2.1.2. Inhibiteurs de FLT3

2.1.2.1. *Généralités*

Une des mutations les plus fréquemment détectées dans la LAM et représentant une option thérapeutique prometteuse est « FMS » like tyrosine kinase 3 ou FLT3. Il s'agit d'une tyrosine kinase de classe III, jouant un rôle fondamental dans la physiologie des lignées hématopoïétiques. De manière simplifiée, elle régule la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques CD34+ par l'intermédiaire de plusieurs voies de signalisation incluant PI3-kinase-Akt, STAT5a, RAS-MAPK dont la dérégulation entraîne un signal de prolifération en excès et un retro contrôle négatif de l'apoptose (173).

La fréquence d'une mutation activatrice de FLT3 au diagnostic des LAM de novo est de l'ordre de 30% et concerne notamment une duplication en tandem au sein du domaine juxtamembranaire de FLT3 appelée ITD (internal tandem duplication) dans environ 20-30% des cas. Parallèlement, une mutation activatrice du domaine tyrosine kinase (TKD) est retrouvée dans 7-10% des cas et est associée à une résistance accrue aux inhibiteurs de FLT3 (174). La mutation FLT3-ITD est associée à un pronostic péjoratif avec, au diagnostic, une masse tumorale définie comme une hyperleucocytose sanguine et/ou une blastose médullaire plus importante, et par la suite une chimio-sensibilité diminuée avec un risque de rechute accru (112).

2.1.2.2. *Indications actuelles*

Plus de vingt inhibiteurs de FLT3 ont été étudiés dans des essais de phase II ou III dans le traitement adjuvant de la LAM parmi lesquels on peut citer le sorafenib, le quizartinib, le crenolanib ou le gilteritinib et avec en chef de file la midostaurin ayant l'AMM en traitement adjuvant des LAM de novo mutées FLT3 (175).

Si leur utilisation en traitement adjuvant est bien connue et référencée, il n'en va pas de même dans le contexte post-allogreffe. De nombreux rapports plaident en faveur d'une efficacité du sorafenib in vitro et sur des modèles animaux qui agirait en synergie avec l'allogreffe en stimulant l'effet GVL par le biais de la production d'interleukine 15 (176); mais aussi sur des patients en rechute post-allogreffe (177,178).

Puisque le taux de rechute des patients mutés FLT3, même après l'allogreffe de CSH, reste élevé entre 30 et 59%, un traitement de maintenance a été suggéré et se révèle efficace avec un profil de tolérance acceptable pour le sorafenib dans des cohortes rétrospectives comme celle d'une étude de registre de l'EBMT (179), prospectives (180) et même dans un essai contrôlé-randomisé en double aveugle récent de phase III (181). Un tel essai est également en cours concernant le gilteritinib (182).

En définitive, de récentes recommandations d'experts émanant de l'EBMT et de l'Acute Leukemia Working Group préconisent l'utilisation du sorafenib en maintenance post-allogreffe (174):

- chez les patients mutés FLT3,
- en l'absence d'essai prospectif évaluant un autre inhibiteur,
- dès reconstitution hématopoïétiques (grade B-II), à la posologie de 400mg par jour en deux prises voire 800mg par jour en cas de MRD positive (grade B-III),
- après évaluation de la MRD en post-greffe ;
- pour une durée de deux ans
- avec une stratégie d'interruption en cas de GVH nécessitant une corticothérapie, du fait des données plaidant pour un effet inducteur (grade B-III) (183)

L'obstacle principal est l'absence d'indication du sorafenib dans la LAM rendant son remboursement difficile dans certains pays, raison pour laquelle les résultats des études concernant la midostaurin, le gilteritinib en maintenance sont attendus.

Les questions restant en suspens pour prévenir la rechute sont l'utilisation concomitante de DLI préemptive ou prophylactique et d'autres agents pharmacologiques comme l'AZA. En effet, les inhibiteurs de FLT3 n'ont à ce jour pas été testés en combinaison avec les agents hypométhylants dans cette indication, mais uniquement en traitement de rattrapage (184).

2.2. Stratégie immunologique : DLI

2.2.1. Généralités

Les injections de lymphocytes du donneur (DLI) sont une possibilité thérapeutique d'immunothérapie reposant, par analogie avec la réinjection de CSH, à celle de lymphocytes T CD3+ non triés du donneur originel, ayant pour objectif de stimuler et/ou d'induire un effet GVL. Les DLI sont dérivées soit d'une aphérèse lors du don originel de CSH après mobilisation par G-CSF puis congelées, soit sont le produit d'une leucaphérèse sans stimulation (103).

Selon l'indication, la quantité de cellules requises diffère et leur administration peut s'accompagner d'un autre agent pharmacologique à des fins de potentialisation.

Leur efficacité anti tumorale a d'abord été mise en évidence dans la leucémie myéloïde chronique et les lymphomes à caractère indolent (185). Elle repose, comme l'allogreffe de CSH en général, sur la réponse lymphocytaire T induite par les lymphocytes allogéniques activés du donneur sur les cellules tumorales (69), mais aussi médiée par les lymphocytes NK (186). Le recours au DLI doit toujours être mis en parallèle de

la morbi-mortalité induite par la GVH et n'est, en ce sens, envisageable que chez des patients exempts de cette dernière.

En pratique, les DLI ne s'envisagent qu'après le J100 et au moins un mois et demi après arrêt de toute immunosuppression pour deux raisons :

- ne pas gêner leur expansion in vivo,
- et laisser un délai raisonnable de tolérance immunologique du fait du risque d'induction de GVH.

Elles peuvent être administrées dans différentes situations en post-allogreffe : traitement de la rechute, traitement préemptif ou traitement prophylactique (116,117).

2.2.2. Traitement de la rechute

Bien qu'utilisées également pour les LAM et SMD en rechute, le taux de réponse après DLI reste faible, de l'ordre de 20-40% (187). Pour les LAM, il existe une efficacité plus marquée dans le sous-groupe de cytogénétique favorable, à faible masse tumorale à la rechute, ou avec un statut de réponse complète avant la réinjection (158).

La faible efficacité au long terme des DLI dans l'indication de LAM en rechute post-allogreffe, du fait de leur action lente qui n'est pas compatible avec une cinétique de prolifération importante, appelle à leur utilisation dans des stratégies préemptives ou prophylactiques.

2.2.3. Stratégie préemptive

Une stratégie préemptive se définit comme un traitement fondé sur une maladie résiduelle positive, soit selon un chimérisme mixte partiel, soit selon des marqueurs de cytométrie en flux ou de biologie moléculaire (114,116,117). Elle se rapproche de

celle réalisée par Platzbecker et *al.* (163,164) dans les études RELAZA où l'administration de DLI et/ou d'AZA est « déclenchée » par une ascension de la maladie résiduelle, dans le cadre de l'absence de rechute morphologique avérée mais considérée comme imminente.

2.2.4. Stratégie prophylactique

Une approche préemptive contraste avec la stratégie prophylactique où les DLI sont administrées dans une situation de rémission complète avec un chimérisme 100% donneur. Celle-ci concerne donc un traitement par DLI défini au préalable, si les données du suivi post-greffe le permettent, selon des critères de LAM ou SMD dites de « haut risque » : cytogénétique défavorable, maladie réfractaire, nombre de ligne antérieures ≥ 2 , caractère secondaire.

L'efficacité et la tolérance de cette approche a été évaluée dans plusieurs études rétrospectives :

- **Jedlickova et al** (188) ont montré l'efficacité des DLI sur l'incidence de rechute, chez de tels patients, en comparaison à une cohorte contrôle de haut risque, soit 22% versus 53%, et avec une meilleure survie à 7 ans de 67% versus 31% ($p < 0.001$).
- **Legrand et al** (189) ont corroboré ces résultats avec une incidence cumulée de rechute à 2 ans de 25% après utilisation de DLI et ce sans augmenter le taux de GVH. La NRM chez ces patients était nulle, plaidant pour une stratégie prophylactique faisable dans cette indication.
- **Schimdt et al** (158) ont également rapporté des résultats similaires sur une cohorte rétrospective de patients ayant reçu des DLI et appariés à une population contrôle. Le bénéfice des DLI est observé uniquement dans le sous-

groupe de patients de haut-risque, où la survie à 5 ans est de 69,8% versus 40,2%, et l'incidence cumulée de rechute à 5 ans de 30,5% versus 46,1%. Ainsi, les patients pouvant bénéficier de DLI prophylactiques dans la LAM seraient uniquement ceux présentant des caractéristiques de haut risque, contrairement aux DLI en traitement de rechute où l'effet positif n'est visible que chez les patients de cytogénétiques favorables ou intermédiaires, en rapport avec une maladie plus proliférative dont la cinétique ne saurait être contenue par les DLI à visée « curative ».

2.2.5. Perspectives

D'autres stratégies de potentialisation ont été évoquées, mais non utilisées en pratique courante et avec une efficacité controversée, comme l'expansion ex vivo de sous-populations effectrices (sélection NK, priming activation via G-CSF et cellules sanguines périphériques du receveur, molécule de costimulation comme le CD28 (190)), traitement adjuvant par cytokine potentialisatrice comme l'interleukine-2 (191), modification génétique (gène suicide, CAR-T allogénique anti-WT1, CD123 ou CD33), ou traitement concomitant par inhibiteur de checkpoint (100,119,120).

Une meilleure compréhension des sous-populations lymphocytaires responsable de la frontière entre l'effet GVH/GVL, permettrait également une meilleure sélection des lymphocytes du donneur en fonction de l'effet positif recherché.

2.3. Autres

D'autres approches sont en cours d'investigations :

- immunothérapie comme l'interféron alpha en alternative aux DLI chez les patients ne pouvant en recevoir (114), l'injection de cellule NK du donneur (114) ou des thérapies dérivant des cellules NK (100), les inhibiteurs de checkpoints (100,102,103)
- agents pharmacologiques intervenants sur d'autres voies de signalisation comme les HDACi impliquant aussi un mécanisme centré sur la régulation épigénétique (100,119,120), les inhibiteurs d'IDH1 (ivosidenib) et IDH2 (enasidenib) ou bien les inhibiteurs d'hedgehog (119).
- stratégie combinée comme l'AZA en association à un inhibiteur de FLT3 (184), à un inhibiteur de checkpoint comme PD-1 (25,146,149) ou au lenalidomide (192,193), son utilisation en monothérapie post-allogreffe n'étant pas recommandée du fait de son effet inducteur de GVH (194,195)

3. Contexte de l'étude

La rechute post-allogreffe reste un défi majeur dans les LAM et les SMD, surtout du fait de l'avènement des conditionnements d'intensité réduite, l'utilisation plus fréquente de déplétion lymphocytaire *in vivo* et plus généralement de l'augmentation constante du nombre d'allogreffes réalisées dans ces indications.

L'identification d'un profil de patients avec un pronostic plus péjoratif en termes de rechute (98,108), avec l'apport de la cytogénétique et de la biologie moléculaire ou plus simplement avec une maladie moins chimio-sensible voire réfractaire, a permis de faire évoluer le statut de l'allogreffe comme une finalité en faisant émerger des stratégies thérapeutiques de prophylaxie de la rechute post-allogreffe (116–120).

En se basant sur son efficacité dans ses indications actuelles, un intérêt tout particulier a été montré envers l'AZA comme étant une alternative thérapeutique potentielle du fait de son mécanisme *in vitro* et *in vivo* comme promulguant l'effet GVL, sans favoriser la GVH (150–153,196).

Cependant, les études précédemment citées évaluant une maintenance par AZA, ne semblaient pas dégager un effet bénéfique significatif de l'AZA en prévention de la rechute (155,197). Il en allait de même pour la survenue de GVH.

Les raisons étaient multiples, à savoir :

- absence de comparaison,
- population à l'étude non représentative de patients « haut risque »,
- critère de jugement pas ou peu concluant,
- résultat non significatif sur la rechute, en cas de critère de jugement adapté, justifié par un faible nombre de patients.

En revanche, les auteurs insistaient régulièrement sur les limites de la stratégie prophylactique, à savoir que les patients présentés ne représentaient qu'environ la moitié de ceux qui ont initialement été screenés pour participer à l'étude. Ceux-ci n'ont pas bénéficié d'une telle stratégie car n'ont pas satisfait les critères d'éligibilités à l'AZA stipulant l'absence de GVH, et plus généralement un bon état général.

Ainsi, il est important de noter que si un bénéfice était dégagé, même non significatif, celui-ci reposait sur des patients sélectionnés, sans comparatif, et qu'il aurait été intéressant d'examiner l'incidence cumulée de rechute chez ceux n'ayant finalement pas reçu l'AZA pour une raison autre que la rechute.

Dans l'attente des résultats de l'essai *NCT00887068*, il n'existe à ce jour aucune étude contrôlée-randomisée ayant évaluée la place de l'AZA dans le paysage post-allogreffe pour prévenir la rechute.

4. Objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude était principalement d'évaluer l'effet de l'AZA prophylactique en post-allogreffe de CSH, en termes de risque cumulée de rechute (CRR) à 2 ans chez des patients atteints de LAM et SMD dits de « hauts risques » ayant survécu sans signe de rechute au-delà de J60, comparativement à ceux n'en ayant pas bénéficié.

Secondairement, une évaluation comparative de la survie globale et sans progression, ainsi que la mortalité non liée à la rechute a été réalisée entre les deux groupes.

TITLE PAGE

Title

Inefficiency of 5-azacytidine as maintenance therapy in myeloid malignancies after allogenic hematopoietic cell transplantation to prevent relapse.

Running title

5-azacytidine after allo-HCT in myeloid malignancies

Kevin James Wattebled,¹ Elodie Drumez,^{2,3} Valérie Coiteux,¹ Leonardo Magro,¹ Michal Srour,¹ Alain Duhamel,^{2,3} Ibrahim Yakoub-Agha,⁴ and David Beauvais¹

¹ Univ Lille, CHU Lille, Department of Hematology, Lille, France

² Univ. Lille, CHU Lille, ULR 2694 - METRICS: Évaluation des technologies de santé et des pratiques médicales, F-59000 Lille, France

³ CHU Lille, Department of Biostatistics, F-59000 Lille, France

⁴ Univ Lille, CHU Lille, Inserm, Infinite, U1286, F-59000 Lille, France

Word count: Abstract – 251, Text – 2880

Number of Text Pages – 24

Number of Tables – 5

Number of Figures – 1

Keywords: 5-azacytidine; maintenance therapy, myeloid malignancies

Abstract

Relapse is a major cause of treatment failure after allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT) in myeloid malignancies. Additional strategies have been devised to further maximize the immunologic effect of allo-HCT, notably through maintenance therapy with hypomethylating agents such as 5-azacytidine (AZA). However, concrete evidence pertaining to its efficacy is scarce due to numerous limitations of previous observations and absence of a controlled-randomized trial. We conducted a retrospective, observational and comparative study to evaluate the effect of AZA maintenance on patient outcome. Patients were included if transplanted for myeloid malignancies bearing high-risk features as enclosed in previous prospective trials studying maintenance therapy, and excluded if death/relapse occurred before day+60. AZA maintenance was defined as at least one cycle and outcomes were compared between AZA and control group. Two hundred and fifty-five patients were included, comprising of AZA (n=72) and control (n=183) group. Two-year overall (OS) and event-free survival (EFS) were 68.4% [95%CI, 61.8-74.1] and 60.6% [95%CI, 54.0-66.6], while comparative risk of relapse (CRR) and non-relapse mortality (NRM) were 27.6% [95% CI: 21.9-33.4] and 11.6% [95%CI, 7.9-16.0], respectively. After controlling for potential confounding factors, AZA maintenance did not impact significantly CRR (HR=1.27 [95%CI=0.77-2.11], p=0.35), nor OS (HR=0.64 [95%CI=0.38-1.10], p=0.11, and EFS (HR=0.89 [95%CI=0.57-1.40], p=0.62). AZA maintenance was however associated with a significantly lower NRM (3.2% vs 15.6%, HR=0.19 [95%CI=0.05-0.77], p=0.02).

Although an observational study cannot completely account for unmeasured confounding factors, we found no evidence of AZA maintenance benefit to prevent relapse and would not recommend its systematic use in a prophylactic manner.

Introduction

Allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT) is the only curative option for many patients presenting with acute myeloid leukemia (AML), chronic myelomonocytic leukemia (CMML) and myelodysplasia (MDS). However, relapse remains a major obstacle in the post-transplantation setting, associated with increasing morbidity/mortality (1), poorer outcome (2), and for which treatment options are scarce (3), requiring practice refinement (4). Better understanding of the immune mechanisms and molecular pathways underlying relapse after allo-HCT (5,6), the impairment of graft-versus-leukemia (GVL) effect notably through allogeneic T-cell (CTL) response exhaustion (7–9) and the growing evidence of a chance to differentiate GVL from graft-versus-host disease (GvHD) through epigenetic modulation (10–13) and mitigation of NK (14) as well as regulatory T-cells (Tregs) (15–17), have paved the way for the emergence of strategies preventing relapse after allo-HCT (18–21). The poorer prognosis of relapsed AML and MDS, low chance of acquiring a response after salvage therapy in combination with donor lymphocyte infusions (DLI) (22,23) and cumulated toxicity of second HSCT (24), support a rationale for relapse's prevention using both preemptive and prophylactic approaches. A prophylactic strategy targets a selected group of AML and MDS patients with innate high-risk factors influencing relapse (18,25), such as: adverse cytogenetic/molecular therapy-related diseases, use of more than one line of treatment to achieve remission, detectable MRD and refractory disease before transplant. The existence of one of these factors in the pre-transplant setting may be relevant enough to change the course of transplanted AML and MDS with maintenance therapy through FLT3 inhibitors (26–28), prophylactic DLI (29–31) and hypomethylating agents (18–21) including 5-azacytidine (AZA).

AZA was previously investigated as an ideal maintenance therapy because of evidence of GVL response all the while mitigating GvHD (32–35). AZA exerts an immunomodulatory and pro-apoptotic effect through irreversible inhibition of DNA methyltransferase which regulates gene promoter methylation (36,37). It is commonly used to treat AML, MDS and CMML patients with adverse cytogenetics or ineligible for intensive chemotherapy (38–41) and provides a safe, effective alternative as *bridging* therapy before allo-HCT to potentially cure frailer patients combined with reduced-intensity regimens (42–45). These observations combined with its efficacy in the treatment of relapse after HSCT have speculated an interesting role in the post-transplantation setting (46). Undoubtedly, it has been established that treatment with AZA can promote a CTL response through upregulation of normally silenced antigens in tumor cells called “*Cancer-testis antigens*” (CTA) (47–49), endogenous retroviral transcripts (ERV) (50,51), and HLA molecules (52). AZA can also temper GvHD through expansion of Tregs (32,53,54) via upregulation of *FOXP3* (12,13), NK cells (16,55) and epigenetic modulation of immune checkpoint molecules such as *PD-1* (56–59). Several studies have previously reported AZA as prophylactic treatment after allo-HCT but results are inconclusive due to small patient group, inappropriate primary outcome/patient selection and absence of comparison (60–66).

The primary objective was to retrospectively investigate the effect of AZA maintenance on disease relapse for high-risk AML, MDS and CMML after allo-HCT.

Methods

Study design

In this retrospective study, data from patients who underwent allo-HCT in the Transplant Hematology Department of Lille CHRU, France, JACIE accredited, member of the SFGM-TC (French Society of Marrow Transplantation and Cell Therapy), were extracted using the PROMISE (*Project Manager Internet Server*) European database. This study was approved by the SFGM-TC and led according to the Declaration of Helsinki. All patients provided informed consent about the retrospective use of their clinical data. Data quality was evaluated using computerized search for discrepancies and on-site active verification of each patient's file. In case of crucial missing information, further data were collected on-site using individual patient file.

Patients

Inclusion criteria were age ≥ 18 , allo-HCT performed for AML, MDS and CMML, high-risk disease features who would qualify for maintenance therapy in prospective trials, such as: AML in first complete remission (CR) with adverse cytogenetics comprising complex karyotype, autosomal monosomy, chromosome 7 abnormalities, inv(3)/t(3,3), t(6;9), t(6;11), t(11;19) or as defined by ELN 2017 risk stratification; AML with positive MRD at allo-HCT; AML requiring more than one previous line of treatment to obtain CR; AML in CR2 or further; MDS with initial R-IPSS > 4 ; adverse cytogenetic and molecular characteristics regardless of initial diagnosis and disease status at transplant (defined by ELN risk stratification for AML, R-IPSS for MDS and CPSS for CMML); refractory disease, therapy-related or secondary disease regardless of initial diagnosis. Patients were excluded if ineligible for AZA maintenance because of early death/relapse before day+60 post-HCT.

Conditioning regimens before transplant included either myeloablative (MAC), defined as busulfan \geq 8mg/kg, thiotepa \geq 10mg/kg or total body irradiation \geq 8 Gy, while others were reduced-intensity based (RIC) (67). Maintenance was defined as at least one cycle of AZA and stopped if patients completed the maximum treatment duration of 12 cycles.

Study endpoints

The outcomes of patients who received maintenance therapy were compared to those who did not. The primary endpoint was the two-year cumulative risk of relapse (CRR). Secondary endpoints were subsequently the two-year overall (OS), event-free survival (EFS) and non-relapse mortality (NRM). All events were censored at study end-point date of 01/31/2020 and follow-up was interrupted at the two-year mark.

Statistical analysis

Categorical variables are expressed as frequency (percentage). Continuous variables are reported as median (range). Normality of continuous variable are checked graphically and by using Shapiro-Wilk test. Comparisons between AZA group and control group on recipient, donor and transplant characteristics were made using Chi-square test or Fisher's exact test for categorical variables and Student t test for continuous variables. The two-year CRR was estimated using the approach of Kalbfleisch and Prentice by treating death as competing risk (68). The 2-year cumulative incidence of NRM was also estimated using the approach of Kalbfleisch and Prentice by treating relapse as competing risk. Association of recipient, donor and transplant characteristics on these two outcomes were evaluated using Fine-Gray regression models (69). The two-year OS and EFS were estimated using the Kaplan-

Meir method. Association of recipient, donor and transplant characteristics on these two outcomes were evaluated using Cox proportional-hazard regression models. For the four outcomes, factors with values of $P < 0.20$ in bivariate analyses were entered into multivariable Cox or Fine-Gray regression models. For each multivariable analysis, proportional hazards assumption was assessed by examining the Schoenfeld residuals (70). Hazard ratio (HR) and subhazard ratios (SHRs), derivate from multivariable analyses, were reported as effect size with their 95% confidence intervals (CI). All statistical tests were performed at the 2-tailed α level of 0.05. Data were analyzed using SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC).

Results

Study population

A total of 297 patients, comprising of high-risk AML (n=212), MDS (n=72) and CMML (n=13), underwent allo-HCT from January 1st 2014 to September 1st 2019. Death or relapse before day+60 occurred in 42 patients. Finally, 255 patients were included. Seventy-two patients received AZA maintenance therapy and were defined as the “AZA group”; while 183 patients did not and represent the “control group”. Median follow-up was 20 months (range, 2 to 24) in control group and 24 (range, 6 to 24) in AZA group.

Patient and disease characteristics before transplant were comparable between the two groups except for higher risk diseases in the AZA group due to more non-responding patients (47.2% vs 31.1%; $p=0.02$), and fewer FLT3 mutations (8.8% vs 22.7%; $p=0.03$) due to eligibility for maintenance therapy with FLT3 inhibitors, mainly sorafenib, instead of AZA. Donor characteristics and transplant modalities were also evenly distributed between groups apart from fewer male donors (50.0% vs 66.1%;

p=0.02), more matched related (29.2% vs 19.7%; p=0.04) as well as fewer haplo-identical donors (1.4 vs 9.8%; p=0.04) and higher CMV positive status (59.7% vs 45.9%; p=0.05) in the AZA group. Forty-three patients (16.9%) received donor lymphocyte infusions (DLI) during study follow-up with respectively 23 (31.9%) and 20 patients (20.9%) in AZA and control group. Seventeen patients (6.7%) received maintenance therapy with FLT3 inhibitors and were only represented in the control group (9.3%). All patients, donor characteristics and transplant modalities are enclosed in **Table 1**.

AZA administration and eligibility

AZA was administered for all 72 patients in the AZA group, either at the dose of 32 mg/m² in the majority of cases (n=68; 94.4%) or 75 mg/m² (n=4; 5.6%) over 5 days, repeating every 28 days. The median time-to-initiate maintenance from allo-HCT was 77 days (range 15-505) for a median of 12 cycles (range 1-12) and duration of 42 weeks (range 1-55). More than half of patients completed the 12 cycles (n=38; 52.7%), while 48 patients at least 9 cycles (66.7%). Treatment discontinuation before the 12 planned cycles occurred in 32 patients (44.4%), related to either toxicity (n=13; 18.0%) or relapse (n=19; 26.4%); while treatment was still ongoing for 2 patients (2.7%). AZA administration modalities, as well as eligibility criteria are enclosed in **Table 2**.

Table 3 summarizes eligibility and motives behind the absence of AZA maintenance for control group. There was no sensible difference between the two groups regarding AZA eligibility except for more refractory diseases in the AZA group (47.2% vs 31.1%; p=0.02), consistent with higher risk patients.

Comparative two-year CRR

The two-year CRR was 27.6% [95% CI: 21.9-33.4] with a median time to relapse of 19 months (range 2-22). Univariate analysis for CRR is shown in **Table 4**. In multivariate analysis, AZA maintenance did not significantly impact the incidence of relapse at 2 years (29.7% vs 25.3%, HR=1.27 [95%CI=0.77-2.11], p=0.35 **Figure 1A**). Factors independently associated with relapse were the use of myeloablative regimen (HR=0.52 [95%CI=0.27-0.99], p=0.04), total body irradiation (HR=0.24 [95%CI=0.06-0.95], p=0.04) and exposure to AZA before allo-HCT (HR=2.00 [95%CI=1.12-3.55], p=0.02). Detailed multivariate analysis can be found in **Table 5**.

Comparative two-year NRM, OS, EFS

The two-year NRM rate was 11.6% [95%CI, 7.9-16.0]. Univariate analysis for NRM is shown in **Table 4**. In multivariate analysis, AZA maintenance significantly impacted the NRM at 2 years (3.2% vs 15.6%, HR=0.19 [95%CI=0.05-0.77], p=0.02 **Figure 1B**). No other factors were significantly associated with NRM (**Table 5**).

The two-year OS was 68.4% [95%CI, 61.8-74.1]. Cause of death in the AZA and control group was respectively relapse (22% vs 13.1%), related to allo-HCT (4% vs 16%) and other (0% vs 0.5%). Univariate analysis for OS is shown in **Table 4**. In multivariate analysis, AZA maintenance did not significantly impact the OS at 2 years (75.5% vs 66.0%, HR=0.64 [95%CI=0.38-1.10], p=0.11 **Figure 1C**). No factors were significantly associated with OS (**Table 5**).

The two-year EFS was 60.6% [95%CI, 54.0-66.6]. Univariate analysis for EFS is shown in **Table 4**. In multivariate analysis, AZA maintenance did not significantly impact the EFS at 2 years (63.3% vs 60.6%, HR=0.89 [95%CI=0.57-1.40], p=0.62 **Figure 1D**). No factors were significantly associated with EFS (**Table 5**).

Discussion

Relapse is a major cause of treatment failure after allo-HCT in myeloid malignancies such as AML, MDS and CMML (1,2). This holds especially true for higher-risk patients with poorer relapse-related outcome in regards to adverse disease characteristics like cytogenetic/molecular features, refractory and therapy-related diseases (18,19). AZA maintenance has been demonstrated as effective in previous studies (60–66). We did not find a benefit of AZA maintenance regarding CRR after allo-HCT in eligible high-risk AML, MDS and CMML patients nor OS and EFS. However, NRM was lower when adjusting to AZA maintenance. This supports previous reports regarding the use of AZA in the post-transplantation setting with no worse outcomes when it comes to NRM (46). Evidence regarding benefit of AZA on relapse prevention in previous studies was, in our opinion, inconclusive due to small patient group (ranging from 10 to 45 patients), inadequate study population comprising of high risk patients in only half of cases (63–65), absence of comparison albeit historical cohorts, inappropriate primary end-point to conclude a decreased risk of relapse (60–62,64), and finally the absence of statistical significance (61,65,66).

Given our finding of an exclusively lower NRM and the underlying mechanism of AZA regarding expansion of regulatory T-cells, it suggests the resulting impact of AZA in the post-transplantation setting to primarily be the mitigation of GvHD, as opposed to inducing a GVL effect. Epigenetic modulation is indeed not specific and even though AZA has the potential to influence both GvHD and GVL effect, this double-edged action might not correlate as much in clinical practice. In fact, tempering GvHD through AZA maintenance is achieved mainly through expansion of Tregs and NK cells as well as modulation of PD-1/PD-L1 axis, whose effects are detrimental to the activation and expansion of CTL that mediate anti-leukemic effect. As such, the overall action of AZA

maintenance might be more related to its immunomodulatory proprieties to dampen GvHD in contrast with CTA up-regulation associated with GVL. Moreover, acute GvHD occurrence is a time-dependent event, presents usually before AZA maintenance and often constitutes a contraindication to AZA. Subsequently, this could not be evaluated in our study given its retrospective nature and the existence of this bias.

Myeloablative regimen and total body irradiation were significantly associated with CRR in our study. The former is a known factor associated with a lower risk of relapse, and the latter was mostly used in reduced-intensity conditioning. As such, the benefit of TBI in our multivariate model is to be interpreted in relation with conditioning, *i.e.* patients who received RIC with TBI fared better than those with RIC alone regarding the risk of relapse. The only factor that impacted negatively and significantly CRR was exposure to AZA before allo-HCT as bridging therapy. This could suggest the superiority of intensive chemotherapy to achieve minimal disease burden before allo-HCT, compared with AZA, given this finding was adjusted to RIC, DRI, age and adverse cytogenetics which constituted potential confusing factors.

Our study has several limitations, notably a selection bias introduced by retrospective data analysis. However, vigorous scrutiny was implemented in defining an adequate study population comprising of only high-risk patients, alive and disease-free at day+60 who would be considered eligible for AZA maintenance in a prospective trial according to the literature. Subsequently, an attrition bias may be argued. AZA maintenance was assigned according to physician's discretion despite theoretical eligibility. Reasons behind the absence of AZA maintenance could be viewed as an attrition bias. However, our primary objective of evaluating CRR, as opposed to OS or EFS (to which they could compare unfavorably), and our multivariate model controlling for multiple

confounding factors, attempted to circumvent this premise. Still, this bias could apply to the lower NRM associated with AZA maintenance, dampening its benefit.

Furthermore, our study does not evaluate the corollary effect of AZA maintenance associated with DLI, as most patients in our cohort were more frequently considered eligible for DLI first, in case of loss of donor chimerism or MRD ascension as demonstrated by, first of all, a preemptive approach and second, salvage treatment in case of disease relapse. Still, the literature suggests a benefit of DLI as a prophylactic strategy (29–31,71) and since the overall mechanism of AZA in the post-transplantation setting is supposedly achieved by boosting GVL effect without inducing GvHD (32–35); their association may very well be synergic in relapse prevention without negative impact on NRM. This has already been demonstrated in a prospective, phase II trial (66).

Interestingly, our high-risk cohort comprised the majority of AML, MDS and CMML eligible for allo-HCT. Consequently, a great number of patients undergoing allo-HCT would be eligible to receive AZA maintenance. However, in our study, as well as prospective trials evaluating AZA maintenance, it was clear that not all patients initially screened could be enrolled because fewer patients met the necessary criteria permitting AZA administration so early in the post-transplantation setting. This emphasizes the limit of prophylactic strategies to prevent disease relapse after allo-HCT. Therefore, instead of opposing a preemptive approach to a prophylactic one, both may co-exist. A preemptive approach is based on strict monitoring for loss of donor chimerism (72), and minimal residual disease (MRD) ascension (73) as imminent signs of relapse, to “trigger” further treatment and boost GVL effect before morphological relapse. This can be achieved in clinical practice through use of preemptive DLI and/or hypomethylating agent (19,74,75).

As far as prophylactic strategy is concerned, other agents like FLT3 inhibitors, mainly sorafenib, demonstrated a clear benefit as maintenance therapy and are the object of a recent position statement by the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (76). Midostaurin was evaluated in the Radius trial and associated with an improved 18-months EFS corresponding to a reduction in relapse risk of 54% and improved 24-month OS (77). Other FLT3 inhibitors are currently under investigation in clinical trials as maintenance therapy such as gilteritinib (*NCT02997202*) and crenolanib (*NCT02400255*). Single pharmacological agent as maintenance therapy may also include IDH1 (ivosidenib) and IDH2 inhibitors (enasidenib), both undergoing clinical trials at the recruitment stage in IDH-mutated AML after allo-HCT (*NCT03564821* and *NCT03515512*). Moreover, if AZA alone did not seem to effectively prevent relapse in our study, future developments may be achieved through its association with BCL inhibitors like venetoclax which is to be investigated in a prospective trial (*NCT04128501*), or checkpoint inhibitors considering its mechanism supporting a rationale for synergic activity (57,58,78,79) and previous reports of efficacy in de novo (80) and relapsed (81) AML.

In conclusion, based on this comparative retrospective study, we would not systematically recommend AZA maintenance therapy to prevent relapse after allo-HCT in high-risk myeloid malignancies. These findings, warrant further investigation pending upcoming results from controlled-randomized trial *NCT00887068* (82).

Research Support

This study was not endorsed by a research grant.

Authors contribution

KJW, IYA and DB designed the study. ED and AD were responsible for statistical analysis. KJW, IYA and DB analyzed study results. All authors read and approved the manuscript.

Disclosure and conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Bibliography:

1. Horowitz M, Schreiber H, Elder A, Heidenreich O, Vormoor J, Toffalori C, et al. Epidemiology and biology of relapse after stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2018 Nov;53(11):1379–89.
2. Schmid C, Labopin M, Nagler A, Niederwieser D, Castagna L, Tabrizi R, et al. Treatment, risk factors, and outcome of adults with relapsed AML after reduced intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2012 Feb 9;119(6):1599–606.
3. Oran B, Giralt S, Couriel D, Hosing C, Shpall EJ, de Meis E, et al. Treatment of AML and MDS relapsing after reduced-intensity conditioning and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2007 Dec 1;21(12):2540–4.
4. Medeiros BC, Chan SM, Daver NG, Jonas BA, Pollyea DA. Optimizing survival outcomes with post-remission therapy in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2019 May;ajh.25484.
5. Zeiser R, Beelen DW, Bethge W, Bornhäuser M, Bug G, Burchert A, et al. Biology-Driven Approaches to Prevent and Treat Relapse of Myeloid Neoplasia after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019 Apr;25(4):e128–40.
6. Zeiser R, Vago L. Mechanisms of immune escape after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2019 Mar 21;133(12):1290–7.
7. Kolb H-J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008 Dec 1;112(12):4371–83.
8. Dickinson AM, Norden J, Li S, Hromadnikova I, Schmid C, Schmetzer H, et al. Graft-versus-Leukemia Effect Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Leukemia. *Front Immunol*. 2017 Jun 7;8:496.
9. Sweeney C, Vyas P. The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. *Front Oncol*. 2019 Nov 19;9:1217.
10. Magenau J, Runaas L, Reddy P. Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2016 Apr;173(2):190–205.
11. Magenau J, Reddy P. Next generation treatment of acute graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2014 Dec;28(12):2283–91.
12. Floss S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, et al. Epigenetic Control of the foxp3 Locus in Regulatory T Cells. Marrack P, editor. *PLoS Biol*. 2007 Jan 30;5(2):e38.
13. Hori S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science*. 2003 Feb 14;299(5609):1057–61.
14. Benjamin JE, Gill S, Negrin RS. Biology and clinical effects of natural killer cells in allogeneic transplantation. *Curr Opin Oncol* [Internet]. 2010;22(2). Available from: https://journals.lww.com/co-oncology/Fulltext/2010/03000/Biology_and_clinical_effects_of_natural_killer.10.aspx
15. Romano M, Tung SL, Smyth LA, Lombardi G. Treg therapy in transplantation: a general overview. *Transpl Int*. 2017 Aug;30(8):745–53.
16. Schneidawind D, Pierini A, Alvarez M, Pan Y, Baker J, Kim B, et al. CD4+ Invariant Natural Killer T Cells Protect from Acute Graft-Versus-Host Disease Lethality through a Dramatic Expansion of Donor-Derived CD4+FoxP3+ Regulatory T Cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Feb 1;20:S23.
17. Janelle V, Rulleau C, Del Testa S, Carli C, Delisle J-S. T-Cell Immunotherapies Targeting Histocompatibility and Tumor Antigens in Hematological Malignancies. *Front Immunol*. 2020 Feb 21;11:276.
18. Yafour N, Beckerich F, Bulabois CE, Chevallier P, Daguindau É, Dumesnil C, et al.

Stratégies préventives et thérapeutiques de la rechute après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). Bull Cancer (Paris). 2017 Dec;104(12):S84–98.

19. Yafour N, Beckerich F, Bulabois CE, Chevallier P, Daguindau E, Dumesnil C, et al. How to prevent relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute leukemia and myelodysplastic syndrome. Curr Res Transl Med. 2017 Apr;65(2):65–9.

20. Chen Y-B, McCarthy PL, Hahn T, Holstein SA, Ueda M, Kröger N, et al. Methods to prevent and treat relapse after hematopoietic stem cell transplantation with tyrosine kinase inhibitors, immunomodulating drugs, deacetylase inhibitors, and hypomethylating agents. Bone Marrow Transplant. 2019 Apr;54(4):497–507.

21. Lee CJ, Savani BN, Mohty M, Gorin NC, Labopin M, Ruggeri A, et al. Post-remission strategies for the prevention of relapse following allogeneic hematopoietic cell transplantation for high-risk acute myeloid leukemia: expert review from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. Bone Marrow Transplant. 2019 Apr;54(4):519–30.

22. Levine JE, Braun T, Penza SL, Beatty P, Cornetta K, Martino R, et al. Prospective Trial of Chemotherapy and Donor Leukocyte Infusions for Relapse of Advanced Myeloid Malignancies After Allogeneic Stem-Cell Transplantation. J Clin Oncol. 2002 Jan 15;20(2):405–12.

23. Schmid C, Labopin M, Nagler A, Bornhäuser M, Finke J, Fassas A, et al. Donor Lymphocyte Infusion in the Treatment of First Hematological Relapse After Allogeneic Stem-Cell Transplantation in Adults With Acute Myeloid Leukemia: A Retrospective Risk Factors Analysis and Comparison With Other Strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party. J Clin Oncol. 2007 Nov 1;25(31):4938–45.

24. Eapen M, Giralt SA, Horowitz MM, Klein JP, Wagner JE, Zhang M-J, et al. Second transplant for acute and chronic leukemia relapsing after first HLA-identical sibling transplant. Bone Marrow Transplant. 2004 Oct;34(8):721–7.

25. Craddock C, Versluis J, Labopin M, Socie G, Huynh A, Deconinck E, et al. Distinct factors determine the kinetics of disease relapse in adults transplanted for acute myeloid leukaemia. J Intern Med. 2018 Apr;283(4):371–9.

26. Brunner AM, Li S, Fathi AT, Wadleigh M, Ho VT, Collier K, et al. Haematopoietic cell transplantation with and without sorafenib maintenance for patients with *FLT3* -ITD acute myeloid leukaemia in first complete remission. Br J Haematol. 2016 Nov;175(3):496–504.

27. Burchert A, Bug G, Finke J, Stelljes M, Rollig C, Wäsch R, et al. Sorafenib As Maintenance Therapy Post Allogeneic Stem Cell Transplantation for FLT3-ITD Positive AML: Results from the Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Multicentre Sormain Trial. Blood. 2018 Nov 29;132(Supplement 1):661–661.

28. Bazarbachi A, Labopin M, Battipaglia G, Djabali A, Passweg J, Socié G, et al. Sorafenib improves survival of *FLT3* -mutated acute myeloid leukemia in relapse after allogeneic stem cell transplantation: a report of the EBMT Acute Leukemia Working Party. Haematologica. 2019 Sep;104(9):e398–401.

29. Jedlickova Z, Schmid C, Koenecke C, Hertenstein B, Baurmann H, Schwerdtfeger R, et al. Long-term results of adjuvant donor lymphocyte transfusion in AML after allogeneic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2016 May;51(5):663–7.

30. Schmid C, Labopin M, Schaap N, Veelken H, Schleuning M, Stadler M, et al. Prophylactic donor lymphocyte infusion after allogeneic stem cell transplantation in acute leukaemia - a matched pair analysis by the Acute Leukaemia Working Party of EBMT. Br J Haematol. 2019 Mar;184(5):782–7.

31. Legrand F, Le Floch A-C, Granata A, Fürst S, Faucher C, Lemarie C, et al. Prophylactic donor lymphocyte infusion after allogeneic stem cell transplantation for high-risk AML. Bone

Marrow Transplant. 2017 Apr;52(4):620–1.

32. Choi J, Ritchey J, Prior JL, Holt M, Shannon WD, Deych E, et al. In vivo administration of hypomethylating agents mitigate graft-versus-host disease without sacrificing graft-versus-leukemia. *Blood*. 2010 Jul 8;116(1):129–39.

33. Mohty M, Chevallier P. Azacitidine after allo-SCT: the good without the bad? *Blood*. 2012 Apr 5;119(14):3199–200.

34. Goodyear OC, Dennis M, Jilani NY, Loke J, Siddique S, Ryan G, et al. Azacitidine augments expansion of regulatory T cells after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2012 Apr 5;119(14):3361–9.

35. Ehx G, Fransolet G, de Leval L, D'Hondt S, Lucas S, Hannon M, et al. Azacytidine prevents experimental xenogeneic graft-versus-host disease without abrogating graft-versus-leukemia effects. *OncoImmunology*. 2017 May 4;6(5):e1314425.

36. Issa J-PJ, Kantarjian HM, Kirkpatrick P. Azacitidine. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Apr 1;4(4):275–6.

37. Jones PA, Issa J-PJ, Baylin S. Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat Rev Genet*. 2016 Oct 1;17(10):630–41.

38. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, 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 May 15;20(10):2429–40.

39. 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 Mar;10(3):223–32.

40. Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, et al. Azacitidine Prolongs Overall Survival Compared With Conventional Care Regimens in Elderly Patients With Low Bone Marrow Blast Count Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 1;28(4):562–9.

41. 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 Jul 16;126(3):291–9.

42. Damaj G, Duhamel A, Robin M, Beguin Y, Michallet M, Mohty M, et al. Impact of Azacitidine Before Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Myelodysplastic Syndromes: A Study by the Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie-Cellulaire and the Groupe-Francophone des Myélodysplasies. *J Clin Oncol*. 2012 Dec 20;30(36):4533–40.

43. Gerds AT, Gooley TA, Estey EH, Appelbaum FR, Deeg HJ, Scott BL. Pretransplantation Therapy with Azacitidine vs Induction Chemotherapy and Posttransplantation Outcome in Patients with MDS. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Aug;18(8):1211–8.

44. Kim Y, Kim I-H, Kim HJ, Park S, Lee K-H, Kim SJ, et al. Multicenter study evaluating the impact of hypomethylating agents as bridging therapy to hematopoietic stem cell transplantation in myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol*. 2014 May 1;99(5):635–43.

45. Voso MT, Leone G, Piciocchi A, Fianchi L, Santarone S, Candoni A, et al. Feasibility of allogeneic stem-cell transplantation after azacitidine bridge in higher-risk myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemia: results of the BMT-AZA prospective study. *Ann Oncol*. 2017 Jul;28(7):1547–53.

46. Schroeder T, Rautenberg C, Haas R, Kobbe G. Hypomethylating agents after allogeneic blood stem cell transplantation. *Stem Cell Investig*. 2016 Nov 28;3:84–84.

47. Hambach L, Ling K-W, Pool J, Aghai Z, Blokland E, Tanke HJ, et al. Hypomethylating drugs convert HA-1–negative solid tumors into targets for stem cell–based immunotherapy.

Blood. 2009 Mar 19;113(12):2715–22.

48. Goodyear O, Agathangelou 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 Sep 16;116(11):1908–18.

49. Almstedt M, Blagitko-Dorfs N, Duque-Afonso J, Karbach J, Pfeifer D, Jäger E, et al. The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine induces expression of NY-ESO-1 and other cancer/testis antigens in myeloid leukemia cells. *Leuk Res*. 2010 Jul 1;34(7):899–905.

50. Chiappinelli KB, Strissel PL, Desrichard A, Li H, Henke C, Akman B, et al. Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell*. 2015 Aug 27;162(5):974–86.

51. Roulois D, Loo Yau H, Singhania R, Wang Y, Danesh A, Shen SY, et al. DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts. *Cell*. 2015 Aug 27;162(5):961–73.

52. Sigalotti L, Altomonte M, Colizzi F, Degan M, Rupolo M, Zagonel V, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment of hematopoietic malignancies: a multimechanism therapeutic approach? *Blood*. 2003 Jun 1;101(11):4644–6.

53. Schroeder T, Fröbel J, Cadeddu R-P, Czibere A, Dienst A, Platzbecker U, et al. Salvage therapy with azacitidine increases regulatory T cells in peripheral blood of patients with AML or MDS and early relapse after allogeneic blood stem cell transplantation. *Leukemia*. 2013 Sep;27(9):1910–3.

54. Cooper ML, Choi J, Karpova D, Vij K, Ritchey J, Schroeder MA, et al. Azacitidine Mitigates Graft-versus-Host Disease via Differential Effects on the Proliferation of T Effectors and Natural Regulatory T Cells In Vivo. *J Immunol*. 2017 May 1;198(9):3746–54.

55. Sánchez-Abarca LI, Gutierrez-Cosio S, Santamaría C, Caballero-Velazquez T, Blanco B, Herrero-Sánchez C, et al. Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting. *Blood*. 2010 Jan 7;115(1):107–21.

56. Youngblood B, Oestreich KJ, Ha S-J, Duraiswamy J, Akondy RS, West EE, et al. Chronic Virus Infection Enforces Demethylation of the Locus that Encodes PD-1 in Antigen-Specific CD8+ T Cells. *Immunity*. 2011 Sep;35(3):400–12.

57. Yang H, Bueso-Ramos C, DiNardo C, Estecio MR, Davanlou M, Geng Q-R, et al. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia*. 2014 Jun;28(6):1280–8.

58. Ørskov AD, Treppendahl MB, Skovbo A, Holm MS, Friis LS, Hokland M, et al. Hypomethylation and up-regulation of *PD-1* in T cells by azacytidine in MDS/AML patients: A rationale for combined targeting of PD-1 and DNA methylation. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Apr 20 [cited 2020 Apr 20];6(11). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/3324>

59. Wolff F, Leisch M, Greil R, Risch A, Pleyer L. The double-edged sword of (re)expression of genes by hypomethylating agents: from viral mimicry to exploitation as priming agents for targeted immune checkpoint modulation. *Cell Commun Signal*. 2017 Dec;15(1):13.

60. de Lima M, Giralt S, Thall PF, de Padua Silva L, Jones RB, Komanduri K, et al. Maintenance therapy with low-dose azacitidine after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for recurrent acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome: A dose and schedule finding study. *Cancer*. 2010 Dec 1;116(23):5420–31.

61. Oshikawa G, Kakihana K, Saito M, Aoki J, Najima Y, Kobayashi T, et al. Post-transplant maintenance therapy with azacitidine and gemtuzumab ozogamicin for high-risk acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2015 Jun;169(5):756–9.

62. Craddock C, Jilani N, Siddique S, Yap C, Khan J, Nagra S, et al. Tolerability and Clinical Activity of Post-Transplantation Azacitidine in Patients Allografted for Acute Myeloid

- Leukemia Treated on the RICAZA Trial. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Feb;22(2):385–90.
63. El-Cheikh J, Massoud R, Fares E, Kreidieh N, Mahfouz R, Charafeddine M, et al. Low-dose 5-azacytidine as preventive therapy for relapse of AML and MDS following allogeneic HCT. *Bone Marrow Transplant*. 2017 Jun;52(6):918–21.
64. de Lima M, Oran B, Champlin RE, Papadopoulos EB, Giralt SA, Scott BL, et al. CC-486 Maintenance after Stem Cell Transplantation in Patients with Acute Myeloid Leukemia or Myelodysplastic Syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018 Oct;24(10):2017–24.
65. Maples KT, Sabo RT, McCarty JM, Toor AA, Hawks KG. Maintenance azacitidine after myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for myeloid malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2018 Dec 2;59(12):2836–41.
66. Guillaume T, Malard F, Magro L, Labopin M, Tabrizi R, Borel C, et al. Prospective phase II study of prophylactic low-dose azacitidine and donor lymphocyte infusions following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Bone Marrow Transplant*. 2019 Nov;54(11):1815–26.
67. Scott BL, Pasquini MC, Logan BR, Wu J, Devine SM, Porter DL, et al. Myeloablative Versus Reduced-Intensity Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol*. 2017 Apr 10;35(11):1154–61.
68. Prentice RL, Kalbfleisch JD, Peterson AV, Flournoy N, Farewell VT, Breslow NE. The Analysis of Failure Times in the Presence of Competing Risks. *Biometrics*. 1978 Dec;34(4):541.
69. Fine JP, Gray RJ. A Proportional Hazards Model for the Subdistribution of a Competing Risk. *J Am Stat Assoc*. 1999 Jun 1;94(446):496–509.
70. Schoenfeld D. Partial Residuals for The Proportional Hazards Regression Model. *Biometrika*. 1982;69(1):239–41.
71. De Vos J, Baudoux E, Bay J-O, Calmels B, Cras A, El Cheikh J, et al. Injections de lymphocytes du donneur (DLI) : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bull Cancer (Paris)*. 2019 Jan;106(1):S35–9.
72. Bornhauser M, Oelschlaegel U, Platzbecker U, Bug G, Lutterbeck K, Kiehl MG, et al. Monitoring of donor chimerism in sorted CD34+ peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2009 Nov 1;94(11):1613–7.
73. Mo X-D, Lv M, Huang X-J. Preventing relapse after haematopoietic stem cell transplantation for acute leukaemia: the role of post-transplantation minimal residual disease (MRD) monitoring and MRD-directed intervention. *Br J Haematol*. 2017 Oct;179(2):184–97.
74. Platzbecker U, Wermke M, Radke J, Oelschlaegel U, Seltmann F, Kiani A, et al. Azacitidine for treatment of imminent relapse in MDS or AML patients after allogeneic HSCT: results of the RELAZA trial. *Leukemia*. 2012 Mar;26(3):381–9.
75. Platzbecker U, Middeke JM, Sockel K, Herbst R, Wolf D, Baldus CD, et al. Measurable residual disease-guided treatment with azacitidine to prevent haematological relapse in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia (RELAZA2): an open-label, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2018 Dec;19(12):1668–79.
76. Bazarbachi A, Bug G, Baron F, Brissot E, Ciceri F, Abou Dalle I, et al. Clinical practice recommendation on hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia patients with FLT3 internal tandem duplication: a position statement from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica*. 2020 Apr 2;haematol.2019.243410.
77. Maziarz RT, Scott BL, Mohan SR, Deol A, Patnaik MM, Haines K, et al. A phase II, randomized trial of standard of care with or without midostaurin to prevent relapse following allogeneic stem cell transplantation in patients with FLT3-ITD mutated acute myeloid

leukemia. *J Clin Oncol*. 2015 May 20;33(15_suppl):TPS7094–TPS7094.

78. Chen C, Liang C, Wang S, Chio CL, Zhang Y, Zeng C, et al. Expression patterns of immune checkpoints in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 2020 Dec;13(1):28.

79. Giannopoulos K. Targeting Immune Signaling Checkpoints in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med*. 2019 Feb 12;8(2):236.

80. Ravandi F, Daver N, Garcia-Manero G, Benton CB, Thompson PA, Borthakur G, et al. Phase 2 Study of Combination of Cytarabine, Idarubicin, and Nivolumab for Initial Therapy of Patients with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2017 Dec 7;130(Supplement 1):815–815.

81. Daver N, Garcia-Manero G, Basu S, Boddu PC, Alfayez M, Cortes JE, et al. Efficacy, Safety, and Biomarkers of Response to Azacitidine and Nivolumab in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia: A Nonrandomized, Open-Label, Phase II Study. *Cancer Discov*. 2019 Mar;9(3):370–83.

82. Schroeder T, Rautenberg C, Haas R, Germing U, Kobbe G. Do hypomethylating agents prevent relapse after Allo-HCT? *Adv Cell Gene Ther*. 2019 Jan;2(1):e30.

Annex – figures & tables

Figure 1 : Multivariate representation of comparative risk of relapse (A), non-relapse mortality (B), overall survival (C), and event-free survival (D) over time adjusted to 5-azacytidine (AZA) maintenance.

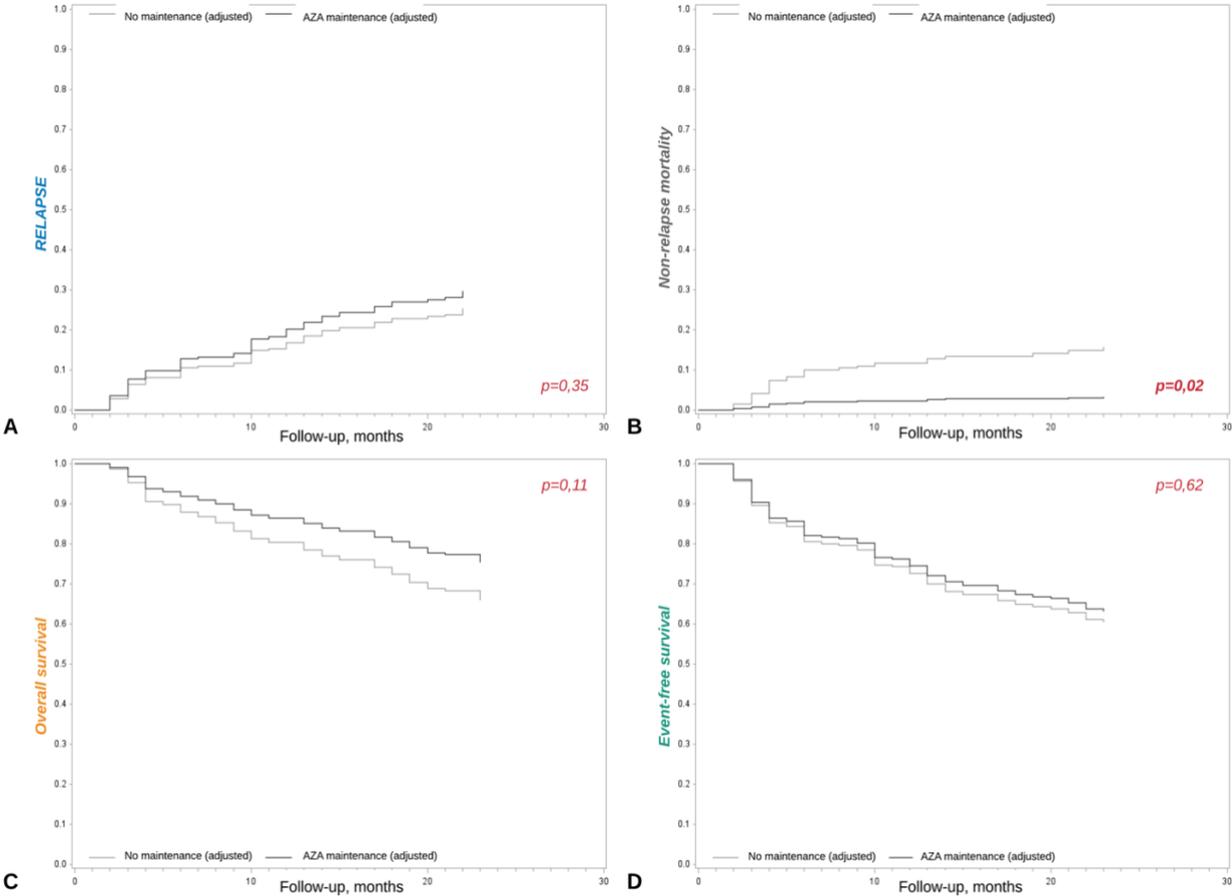


Table 1: Study population characteristics.

	Factor	Total (n=255)	AZA (n=72)	Control (n=183)	p	
Recipient	Age – years – median (range)	58 (19 – 74)	57 (20 – 70)	58 (19 – 74)	0.59	
	Male – n (%)	136 (53.3)	40 (55.6)	96 (52.5)	0.66	
	Diagnosis – n (%)				0.37	
	AML	177 (69.4)	48 (66.6)	129 (70.5)		
	<i>De novo</i>	136 (53.3)	33 (45.8)	103 (56.3)		
	<i>Therapy-related</i>	41 (16.1)	15 (20.8)	26 (14.2)		
	MDS	65 (25.5)	21 (29.2)	44 (24.0)		
	CMML	13 (5.1)	3 (4.2)	10 (5.5)		
	AML cytogenetics (ELN17) – n (%)				0.37	
	Favorable	46 (25.9)	10 (20.8)	36 (27.9)		
	Intermediate	61 (34.4)	15 (31.3)	46 (35.7)		
	Adverse	67 (37.8)	22 (45.8)	45 (34.9)		
	Unknown	3	1	2		
	MDS cytogenetics (R-IPSS) – n (%)				0.61	
	Favorable	31 (47.7)	8 (38.1)	23 (52.3)		
	Intermediate	9 (13.8)	3 (14.3)	6 (13.6)		
	Adverse	15 (23.1)	5 (23.8)	10 (22.7)		
	Very adverse	8 (12.3)	4 (19.0)	4 (9.1)		
	Unknown	2	1	1		
	MDS R-IPSS (category) – n (%)				NA	
	Intermediate	22 (33.8)	6 (28.6)	16 (36.4)		
	High	30 (46.2)	10 (47.6)	20 (45.5)		
	Very High	13 (20.0)	5 (23.8)	8 (13.2)		
Therapy-related – n (%)	58 (22.7)	21 (29.2)	37 (20.2)	0.12		
FLT3 – n (%)	46 (18.0)	6 (8.3)	40 (21.8)	0.01		
NPM1 – n (%)	43 (16.9)	10 (13.8)	33 (18.0)	0.46		
Adverse cytogenetics – n (%)	115 (45.1)	35 (48.6)	80 (43.7)	0.48		
Previous lines of treatment – n (%)				0.47		
None	39 (15.3)	14 (19.4)	25 (13.7)			
1	129 (50.6)	36 (50)	93 (50.8)			
>/ 2	87 (34.1)	22 (30.6)	65 (35.5)			
Second transplant – n (%)	15 (5.9)	4 (5.6)	11 (6.0)	1.00		
CMV (positive) – n (%)	133 (52.2)	42 (58.3)	91 (49.7)	0.22		
DRI (high-very high) – n (%)	130 (51.0)	43 (59.7)	87 (47.5)	0.08		
HCT-CI – n (%)				0.10		
0	15 (5.9)	5 (6.9)	10 (5.5)			
1-2	124 (48.6)	42 (58.3)	82 (44.8)			
>/ 2	116 (45.5)	25 (34.7)	91 (49.7)			
Disease status (refractory) – n (%)	91 (35.7)	34 (47.2)	57 (31.1)	0.02		
Positive MRD – n (%)	81 (31.8)	19 (26.4)	62 (33.9)	0.25		
AZA before transplant– n (%)	58 (22.7)	21 (29.2)	37 (20.2)	0.12		
Donor	Age – years – median (range)	34 (18 – 69)	34 (19 – 68)	33 (18 – 69)	0.35	
	Male – n (%)	157 (61.6)	36 (50.0)	121 (66.1)	0.02	
	Donor type – n (%)				0.05	
	Matched related	57 (22.4)	21 (29.2)	36 (19.7)		
	Matched unrelated	150 (58.8)	40 (55.6)	110 (60.1)		
	Haplo-identical	19 (7.5)	1 (1.4)	18 (9.8)		
	Mismatched unrelated	29 (11.4)	10 (13.9)	19 (10.4)		
	CMV (positive) – n (%)	127 (49.8)	43 (59.7)	84 (45.9)	0.05	
	Transplant	HSC source – n (%)				NA
		Bone marrow	115 (45.1)	34 (47.2)	81 (44.3)	
Peripheral blood stem cell		138 (54.1)	37 (51.4)	101 (55.2)		
Cord-blood		2 (0.8)	1 (1.4)	1 (0.5)		
Myeloablative regimen– n (%)		135 (52.9)	34 (47.2)	101 (55.2)	0.25	
Total body irradiation – n (%)		20 (7.8)	2 (2.8)	18 (9.8)	0.06	
Anti-thymoglobulin – n (%)		148 (58.0)	41 (56.9)	107 (58.5)	0.82	
GvHD prophylaxis – n (%)					-	
Calcineurin inhibitors	255 (100)	72 (100)	183 (100)			
Methotrexate	203 (79.6)	59 (81.9)	144 (78.7)	0.56		
Mycophenolate mofetil	54 (21.2)	13 (18.1)	41 (22.4)	0.44		
High-dose cyclophosphamide	36 (14.1)	11 (15.3)	25 (13.7)	0.74		

AML: acute myeloid leukemia, AZA: 5-azacytidine CMML: myelomonocytic leukemia, CMV: cytomegalovirus, DRI: disease risk index, ELN: European LeukemiaNet, GvHD: graft versus host disease, HCT-CI: hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index, HSC: hematopoietic stem-cell, MDS: myelodysplastic syndrome, MRD: minimal residual disease

Table 2: Modalities of 5-azacytidine (AZA) administration and eligibility in the AZA group.

	AZA group (n=72)
Number of cycles – n (%) – median (range)	12 (1 – 12)
Treatment duration – months – median (range)	42 (1 – 55)
Time to treatment – days – median (range)	77 (15 – 505)
Dose – n (%)	
32 mg/m ²	68 (94.4)
75 mg/m ²	4 (5.6)
Eligibility(ies) – n (%)	
Adverse cytogenetics	35 (48.6)
Positive minimal residual disease before transplant	19 (26.4)
>/ 2 lines prior transplant	22 (30.6)
Refractory disease	34 (47.2)
Secondary/Therapy-related	21 (29.2)
R-IPSS >4	22 (30.6)
AZA discontinuation – n (%)	32 (44.4)
Relapse	19 (26.4)
Toxicity	13 (18.0)

Table 3: 5-azacytidine (AZA) eligibility and maintenance obstructions in the control group.

	Control group (n=183)
AZA Eligibility(ies) – n (%)	
Adverse cytogenetics	80 (43.7)
Positive minimal residual disease before transplant	62 (33.9)
>/ 2 lines prior transplant	65 (35.5)
Refractory disease	57 (31.1)
Secondary/Therapy-related	37 (20.2)
R-IPSS >4	50 (27.3)
Reasons for no maintenance – n (%)	
Infection	56 (30.6)
Cytopenia	46 (25.1)
GvHD	63 (34.4)
Choice of preemptive approach	40 (21.8)
FLT3 inhibitor maintenance	17 (9.3)
Not fit	27 (14.7)
Before practice change	7 (3.8)
Unknown	33 (18.0)

Table 4: Univariate analysis of factors associated with patients' outcomes.

Factor		Outcome (p value)			
		CRR	OS	EFS	NRM
Recipient	Age	0.07	0.09	0.02	0.39
	Sex (male)	0.82	0.77	0.89	0.70
	Diagnosis	0.66	0.94	0.85	0.79
	Cytogenetics (ELN 2017)	0.19	0.51	0.24	0.99
	Cytogenetics (R-IPSS)	0.35	0.20	0.32	<0.01
	R-IPSS (category)	0.99	0.52	0.76	0.60
	Therapy-related	0.26	0.91	0.69	0.26
	FLT3	0.27	0.37	0.33	0.94
	NPM1	0.20	0.75	0.98	0.11
	Adverse cytogenetics	0.02	0.16	0.11	0.55
	Previous lines of treatment	0.45	0.84	0.70	0.73
	Second transplant	0.41	0.10	0.18	0.23
	Cytomegalovirus (positive)	0.89	0.26	0.43	0.88
	DRI (low-intermediate vs high/very high)	0.03	0.01	0.01	0.26
	HCT-CI	0.78	0.40	0.62	0.63
	Refractory disease before transplant	0.30	0.14	0.18	0.67
	Positive MRD before transplant	0.69	0.92	0.65	0.80
AZA before transplant	0.001	0.04	0.02	0.53	
Donor	Age	0.12	0.52	0.46	0.46
	Sex (male)	0.89	0.81	0.98	0.98
	Donor type	0.14	0.69	0.77	0.47
	Cytomegalovirus (positive)	0.54	0.93	0.80	0.32
Transplant	HSC source	0.61	0.70	0.85	0.90
	Myeloablative regimen	0.02	0.35	0.06	0.62
	Total body irradiation	0.14	0.85	0.93	0.16
	Anti-thymoglobulin	0.54	0.92	0.98	0.59
	GvHD prophylaxis				
	Calcineurin inhibitors	-	-	-	-
	Methotrexate	0.21	0.12	0.19	0.77
Mycophenolate mofetil	0.15	0.25	0.32	0.57	
High-dose cyclophosphamide	0.67	0.23	0.43	0.58	
PT	AZA maintenance	0.02	0.26	0.99	0.02

AZA: 5-azacytidine, CRR: cumulative risk of relapse, DRI: disease risk index, EFS: event-free survival, GvHD: graft versus host disease, HCT-CI: hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index, HSC: hematopoietic stem-cell, MRD: minimal residual disease, NRM: non-relapse mortality, OS: overall survival, PT: post-transplant.

Table 5: Multivariate analysis of factors associated with patients' outcomes including two-year cumulative risk of relapse (**CRR**), overall survival (**OS**), event-free survival (**EFS**) and non-relapse mortality (**NRM**).

Outcome	Factor	Hazard ratio (95%CI)	p
CRR	5-azacytidine maintenance	1.27 (0.77-2.11)	0.35
	Age (patient)	1.00 (0.97-1.03)	0.97
	Higher disease risk index vs lower	0.94 (0.49-1.79)	0.84
	Adverse cytogenetics	1.68 (0.98-2.89)	0.06
	5-azacytidine before allo-HCT	2.00 (1.12-3.55)	0.02
	Age (donor)	1.00 (0.97-1.02)	0.66
	Matched unrelated vs related	0.48 (0.22-1.08)	0.07
	Haplo-identical vs matched related	0.78 (0.17-3.52)	0.75
	Mismatch unrelated vs matched related	0.57 (0.23-1.43)	0.23
	Myeloablative vs reduced-intensity regimen	0.52 (0.27-0.99)	0.04
	Total body irradiation vs none	0.24 (0.06-0.95)	0.04
Mycophenolate mofetil	0.69 (0.29-1.63)	0.39	
OS	5-azacytidine maintenance	0.64 (0.38-1.10)	0.11
	Age (patient)	1.01 (0.99-1.03)	0.19
	Second allo-HCT vs first	1.89 (0.84-4.21)	0.13
	Higher disease risk index vs lower	1.65 (0.89-3.07)	0.11
	Disease status before allo-HCT	1.04 (0.59-1.81)	0.90
	Adverse cytogenetics	1.17 (0.71-1.92)	0.54
	AZA before allo-HCT	1.16 (0.66-2.05)	0.61
	Methotrexate	1.81 (0.89-3.71)	0.10
EFS	5-azacytidine maintenance	0.89 (0.57-1.40)	0.62
	Age (patient)	1.02 (0.99-1.04)	0.19
	Second allo-HCT vs first	1.64 (0.78-3.46)	0.19
	Higher disease risk index vs lower	1.53 (0.87-2.70)	0.14
	Disease status	1.16 (0.70-1.92)	0.58
	Adverse cytogenetics	1.17 (0.75-1.84)	0.49
	5-azacytidine before allo-HCT	1.19 (0.72-1.97)	0.49
	Myeloablative vs reduced-intensity regimen	0.90 (0.53-1.54)	0.70
Methotrexate	1.54 (0.85-2.79)	0.15	
NRM	5-azacytidine maintenance	0.19 (0.05-0.77)	0.02
	NPM1+ vs WT	1.91 (0.83-4.38)	0.13
	Total body irradiation vs none	2.21 (0.77-6.34)	0.14

DISCUSSION

Si les pratiques fondamentales de l'allogreffe de CSH ont connu de nombreux bouleversements lors des dernières décennies, permettant d'en étendre sa réalisation à un nombre accru de patients, la problématique actuelle semble liée à la prépondérance de rechute post-allogreffe (99,198). Dans le cas des LAM, SMD et LMMC, le pronostic en termes de survie n'en est que plus péjoratif (98,99,199). Les choix thérapeutiques sont limités comprenant l'immunothérapie avec le recours aux DLI ou une seconde allogreffe (101,122,157), non sans toxicité supplémentaire, et comportant un taux de réponse durable restant moindre (200).

De nombreuses stratégies de prévention de la rechute ont été proposées, avec efficacité variable, au premier rang desquelles une approche préemptive (116,117), fondée sur la détection précoce après l'allogreffe, de la maladie résiduelle, quels que soient les outils pour la mesurer (chimerisme, cytométrie en flux, biologie moléculaire). L'approche préemptive se révèle efficace en utilisant aussi bien des stratégies immunologiques (187,201–203), comme les DLI et l'arrêt précoce de l'immunodépression, que médicamenteuses, à l'aide des agents hypométhylants (116,117,119,155,204).

Concernant les inhibiteurs de FLT3, leur utilisation en traitement préemptif n'est pas aisée et n'a pas fait l'objet d'étude dans la littérature dans la mesure où la MRD liée à FLT3 est difficilement mesurable en post-allogreffe (9).

Par ailleurs, une approche prophylactique se dégage comme particulièrement adaptée à un cluster de patients de haut-risque (116–120). Ce point est crucial car la procédure d'allogreffe comporte naturellement, une toxicité non négligeable même si des précautions sont prises pour adapter les modalités de conditionnement aux patients les plus fragiles. Or, après l'allogreffe, dans un contexte d'immunodépression

profonde, soumettre d'emblée et précocement ces patients à un traitement supplémentaire potentiellement myélotoxique, se doit d'être justifié et hypothétiquement bénéfique.

Un traitement de maintenance par AZA répond à ces critères du fait :

- de son efficacité démontrée dans les hémopathies myéloïdes avant l'allogreffe de CSH (61,126–128), en post-greffe qu'il s'agisse d'une situation de rechute cytologique (147,156,160–162) ou moléculaire (163,164)
- de son profil de tolérance acceptable à dose plus réduite (116,155,166)
- de son mécanisme d'action *in vitro* et *in vivo* qui sous-tend l'amplification de l'effet immunologique de l'allogreffe (GVL), par le biais notamment de la régulation positive de CTA, exprimés uniquement sur les cellules tumorales (70,84,132–136,154)
- d'un profil d'épargne de GVH du fait de l'expansion de lymphocytes régulateurs Tregs et NK au détriment d'une population effectrice de CTL (147–152,196)
- d'une synergie d'action potentielle avec les DLI prophylactiques (187–189,202)

Si son utilisation en maintenance est déjà largement pratiquée sur la base de recommandations d'experts (116), il existe un manque de données objectives sur son efficacité en maintenance quant à la prévention de la rechute post-allogreffe (197).

Notre étude rétrospective et comparative est, à notre connaissance, la première à évaluer le risque de rechute après maintenance par AZA au sein d'une large cohorte de patients de haut risque. Celle-ci ne dégage pas de bénéfice de la maintenance par AZA quant à la réduction du risque de rechute à deux ans entre les deux groupes (29,7% vs 25,3% ; HR=1,27 [95%CI=0,77-2,11], p=0,35). Les facteurs ayant

influencés positivement l'incidence de rechute sont l'utilisation de conditionnement myéloablatif (HR=0,52 [95%CI=0,27-0,99], p=0,04) et l'irradiation corporelle totale en association à un conditionnement d'intensité réduite (HR=0,24 [95%CI=0,06-0,95], p=0,04). A l'inverse, le seul facteur associé négativement au risque de rechute est un traitement par AZA avant allogreffe (HR=2,00 [95%CI=1,12-3,55], p=0,02).

En effet, ceci s'explique par le fait que le recours à l'AZA en *bridging* traduit :

- soit une maladie de plus haut risque représenté par le DRI,
- soit une cytogénétique initiale défavorable,
- soit des comorbidités rendant les patients inéligibles à une chimiothérapie intensive mais candidats à un conditionnement d'intensité réduite, qui sont des facteurs de risques connus de rechute.

Cependant, notre modèle d'analyse multivarié est ajusté à ces facteurs de confusion. Ainsi, nous pouvons conclure que l'utilisation de l'AZA avant l'allogreffe est indépendamment associée à un taux de rechute plus élevé comparée aux patients ayant reçu un traitement d'induction standard.

Par ailleurs, la maintenance par AZA n'est pas corrélée à la survie globale (75,5% vs 66,0% ; HR=0,64 [95%CI=0,38-1,10], p=0,11), ni à la survie sans évènement (63,3% vs 60,6% ; HR=0,89 [95%CI=0,57-1,40], p=0,62) à deux ans. Aucun autre facteur étudié n'est associé à l'OS ou l'EFS en multivariée.

Cependant, nous observons une NRM à deux ans plus favorable dans le groupe AZA (3,2% vs 15,6%, HR=0,19 [95%CI=0,05-0,77], p=0,02). Nous pouvons avancer deux hypothèses pour expliquer ce résultat, à savoir :

- Le bénéfice de l'AZA sur la NRM traduirait une diminution de l'occurrence de GVH aigue bien que le design de l'étude et notamment sa nature rétrospective

n'aient pas permis de l'étudier puisque les patients pouvaient déjà en présenter au moment de l'introduction du traitement à une médiane de 77 jours.

Ainsi, ceci plaiderait en faveur d'un effet protecteur de GVH, plutôt qu'un effet GVL bénéfique sur la prévention de la rechute. Nous supposons que l'effet hypométhylant de l'AZA à dose prophylactique, est davantage corrélée à la modulation de l'axe PD-1/PD-L1 et l'expansion de lymphocytes Tregs et NK, se traduisant en pratique clinique par un effet protecteur de GVH ; plutôt qu'à l'expansion d'une population effectrice CTL responsable d'un effet GVL. Ceci a d'ailleurs été observé *in vitro* et sur des modèles animaux (136). Au contraire, l'effet anti-leucémique mis en évidence lors des études évaluant l'AZA post-allogreffe en traitement de rattrapage et en stratégie préemptive est obtenue à posologie curative, tirant parti de son effet pro-apoptotique.

- Il pourrait exister un biais de suivi concernant les patients du groupe AZA qui bénéficiaient d'un suivi médical plus rapproché. De ce fait, plus d'attention aurait pu être portée quant à l'anticipation des différentes complications post-greffes, notamment les réactivations virales, aboutissant plus généralement, à une meilleure prise en charge et diminution de la NRM liée aux infections et la GVH.

Bien entendu, notre étude comporte de nombreuses limites, au premier rang desquelles un biais de sélection introduit par sa nature rétrospective. Cependant, la définition d'une population d'étude adaptée et représentée uniquement par des patients de haut-risque, critère d'inclusion le plus prépondérant dans les essais prospectifs évaluant l'AZA en maintenance, permet de modérer l'impact d'un biais de sélection.

De plus, notre étude présente un biais d'attrition. En effet, l'absence de recours à l'AZA peut aussi traduire une population de patients plus « fragiles » pour lesquels le clinicien ne souhaitait pas alourdir le traitement et les soumettre à une iatrogénie supplémentaire.

Cependant, le biais d'attrition n'est pas une limite dans notre étude du fait de l'indépendance de la rechute face aux comorbidités du patient, contrairement à l'OS et l'EFS. Ainsi, nous avons choisi d'évaluer, uniquement chez des patients de haut-risque, le CRR à deux ans, celui-ci étant un paramètre objectif et indépendant de la mortalité corrélée à la fragilité du patient à savoir le risque compétitif lié au décès.

De surcroît, s'il existe un avantage synergique dans l'association des DLI prophylactiques à l'AZA, notre étude ne permet pas de le démontrer puisque l'indication des DLI s'inscrivait majoritairement dans le cadre d'une approche préemptive (n= 22 - 51%) ou du traitement de la rechute avérée (n=15 – 35%). Néanmoins, le mécanisme d'action de l'AZA semble sous-tendre un rationnel pour une association synergique avec les DLI prophylactiques, sans impact négatif sur la NRM, ce qui a déjà été montré précédemment (172).

De plus, dans notre cohorte, les patients sélectionnés sur des critères de haut-risque en accord avec la littérature représentent 90% des indications d'allogreffes pour LAM, SMD et LMMC. Or, un traitement de maintenance ne peut s'envisager que chez une population de patients plus restreinte, sans quoi la quasi-totalité des patients se révéleraient éligibles. Pourtant, il apparaît évident dans notre étude et les essais prospectifs, que l'éligibilité à une maintenance par AZA avant l'allogreffe, ne signifie pas que les patients soient en mesure de la recevoir si précocement après l'allogreffe.

En ce sens, ceci traduit une nouvelle limite de l'approche prophylactique par AZA, ne paraissant pas réalisable chez l'ensemble des patients éligibles.

Pour autant, d'autres agents que l'AZA sont utilisables dans le sens d'une stratégie prophylactique, sans oublier qu'une stratégie préemptive est également toujours envisageable. En ce qui concerne le choix entre une approche préemptive et prophylactique, et après revue de la littérature, il apparaîtrait que :

- les LAM mutées FLT3 puissent bénéficier d'une stratégie de maintenance médicamenteuse autre par inhibiteur de FLT3, comme le sorafenib (174) en l'absence d'inclusion à un essai thérapeutique évaluant un autre représentant. La midostaurin était associée, dans l'essai Radius, à une meilleure OS et EFS corrélée à une réduction du risque de rechute de 54%. En ce sens, des essais thérapeutiques sont en cours évaluant le gilteritinib (*NCT02997202*) et le crenolanib (*NCT02400255*).
- les LAM avec mutation d'IDH et traités par inhibiteur d'IDH1 (ivosidenib) et IDH2 (enasidenib) puissent bénéficier d'une maintenance par les mêmes agents dès reconstitution hématologique (119). Des essais thérapeutiques prospectifs, actuellement en phase de recrutement, vont prochainement évaluer l'ivosidenib (*NCT03564821*) et l'enasidenib (*NCT03515512*).
- les patients de risque « intermédiaire » et non éligibles à un traitement maintenance par AZA puissent bénéficier d'une stratégie préemptive.

Le traitement serait donc « déclenché » selon la surveillance de l'ascension la maladie résiduelle soit par une approche immunologique (DLI ou décroissance de l'immunosuppression), soit médicamenteuse (agent hypométhylant, HDACi) ou combinée.

Quant à l'AZA en tant que stratégie de maintenance, de futurs développements pourraient réaffirmer sa place dans la période post-allogreffe par le biais d'association novatrice comme à :

- un inhibiteur de BCL2, le venetoclax, pour lequel un essai prospectif de phase II est en phase de recrutement (NCT04128501),
- un inhibiteur de checkpoint, par exemple PD-1 (nivolumab), puisque le mécanisme d'action de l'AZA semble sous-tendre un rationnel pour une association à visée de potentialisation (144,205–207) et que le nivolumab a été précédemment utilisé en traitement de LAM de novo (208) et en situation de rechute (209),
- un immunomodulateur, le lenalidomide, dont l'utilisation en monothérapie en post-allogreffe n'est pas recommandée du fait de son effet inducteur de GVH (194,195). Celui-ci est effacé par son association à l'AZA et efficace pour les LAM en situation de rechute post-allogreffe (192).

En conclusion, en se fondant sur les résultats apportés par notre étude comparative, rétrospective, nous ne recommanderions pas, systématiquement, l'utilisation de l'AZA comme approche prophylactique de la rechute ou autrement dit, en maintenance post-allogreffe, pour les LAM FLT3 non mutés, SMD, et LMMC sélectionnés sur des critères de haut-risque.

Ces données relatives à l'inefficacité de l'AZA en maintenance pour prévenir la rechute post-greffe, en contradiction avec les précédentes études prospectives dans la littérature, mériteront d'être confrontées aux résultats imminents de l'essai contrôlé-randomisé *NCT00887068 (197)*.

BIBLIOGRAPHIE

1. Gratwohl A, Pasquini MC, Aljurf M, Atsuta Y, Baldomero H, Foeken L, et al. One million haemopoietic stem-cell transplants: a retrospective observational study. *Lancet Haematol.* 2015 Mar 1;2(3):e91–100.
2. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy. *N Engl J Med.* 1957 Sep 12;257(11):491–6.
3. Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, Hingorani S, Sorrow ML, Boeckh M, et al. Reduced Mortality after Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med.* 2010 Nov 25;363(22):2091–101.
4. D'Souza A, Lee S, Zhu X, Pasquini M. Current Use and Trends in Hematopoietic Cell Transplantation in the United States. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017 Sep;23(9):1417–21.
5. DAUSSET J, BRECY H. Identical nature of the leucocyte antigens detectable in monozygotic twins by means of immune iso-leuco-agglutinins. *Nature.* 1957 Dec;180(4599):1430.
6. Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, et al. Bone-Marrow Transplantation. *N Engl J Med.* 1975 Apr 17;292(16):832–43.
7. Bortin M. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation.* 1970 Jun;9(6):571–87.
8. Thomas ED. A history of haemopoietic cell transplantation. *Br J Haematol.* 1999 May 1;105(2):330–9.
9. Tsirigotis P, Byrne M, Schmid C, Baron F, Ciceri F, Esteve J, et al. Relapse of AML after hematopoietic stem cell transplantation: methods of monitoring and preventive strategies. A review from the ALWP of the EBMT. *Bone Marrow Transplant.* 2016 Nov;51(11):1431–8.
10. for the European Group for Blood and Marrow Transplantation EBMT, Baldomero H, Gratwohl M, Gratwohl A, Tichelli A, Niederwieser D, et al. The EBMT activity survey 2009: trends over the past 5 years. *Bone Marrow Transplant.* 2011 Apr;46(4):485–501.
11. Ballen KK, Koreth J, Chen Y-B, Dey BR, Spitzer TR. Selection of optimal alternative graft source: mismatched unrelated donor, umbilical cord blood, or haploidentical transplant. *Blood.* 2012 Mar 1;119(9):1972–80.
12. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, et al. Nonmyeloablative Stem Cell Transplantation and Cell Therapy as an Alternative to Conventional Bone Marrow Transplantation With Lethal Cytoreduction for the Treatment of Malignant and Nonmalignant Hematologic Diseases. :8.
13. Soiffer RJ, LeRademacher J, Ho V, Kan F, Artz A, Champlin RE, et al. Impact of immune modulation with anti-T-cell antibodies on the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Blood.* 2011 Jun 23;117(25):6963–70.
14. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, et al. Methotrexate and Cyclosporine Compared with Cyclosporine Alone for Prophylaxis of Acute Graft versus Host Disease after Marrow Transplantation for Leukemia. *N Engl J Med.* 1986 Mar 20;314(12):729–35.
15. Sorrow ML, Maris MB, Storer B, Sandmaier BM, Diaconescu R, Flowers C, et al. Comparing morbidity and mortality of HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative and myeloablative conditioning: influence of pretransplantation comorbidities. *Blood.* 2004 Aug 15;104(4):961–8.
16. Sorrow ML, Storb RF, Sandmaier BM, Maziarz RT, Pulsipher MA, Maris MB, et al. Comorbidity-Age Index: A Clinical Measure of Biologic Age Before Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *J Clin Oncol.* 2014 Oct 10;32(29):3249–56.

17. for the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Basak GW, Bonini C, et al. Is the use of unrelated donor transplantation leveling off in Europe? The 2016 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report. *Bone Marrow Transplant*. 2018 Sep;53(9):1139–48.
18. Nagel G, Weber D, Fromm E, Erhardt S, Lübbert M, Fiedler W, et al. Epidemiological, genetic, and clinical characterization by age of newly diagnosed acute myeloid leukemia based on an academic population-based registry study (AMLSG BiO). *Ann Hematol*. 2017 Dec 1;96(12):1993–2003.
19. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391–405.
20. 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*. 2016/11/28. 2017 Jan 26;129(4):424–47.
21. Burnett A, Wetzler M, Löwenberg B. Therapeutic Advances in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2011 Jan 10;29(5):487–94.
22. Loke J, Malladi R, Moss P, Craddock C. The role of allogeneic stem cell transplantation in the management of acute myeloid leukaemia: a triumph of hope and experience. *Br J Haematol*. 2020 Jan;188(1):129–46.
23. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné M-C, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018 Mar 22;131(12):1275–91.
24. Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, Kavelaars FG, al Hinai A, Zeilemaker A, et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2018 Mar 29;378(13):1189–99.
25. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2018 Oct;93(10):1267–91.
26. Tefferi A. Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med*. 2009;14.
27. Steensma DP. Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2015 Jul 1;90(7):969–83.
28. Sekeres MA. The Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes. *Myelodysplastic Syndr*. 2010 Apr 1;24(2):287–94.
29. Stone RM. How I treat patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2009 Jun 18;113(25):6296–303.
30. Fenaux P, Adès L. How we treat lower-risk myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013 May 23;121(21):4280–6.
31. Sekeres MA, Cutler C. How we treat higher-risk myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2014 Feb 6;123(6):829–36.
32. Kaneko H, Misawa S, Horiike S, Nakai H, Kashima K. W 5 3 Mutations Emerge at Early Phase of Myelodysplastic Syndrome and Are Associated With Complex Chromosomal Abnormalities. :5.
33. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Slama L, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, Quesnel B, et al. Mutations of IDH1 and IDH2 genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2010 May;24(5):1094–6.
34. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M, Grabar S, Della-Valle V, Picard F, et al. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood*. 2009 Oct 8;114(15):3285–91.
35. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, et al. Somatic *SF3B1* Mutation in Myelodysplasia with Ring Sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011 Oct 13;365(15):1384–95.

36. Patnaik MM, Lasho TL, Hodnefield JM, Knudson RA, Ketterling RP, Garcia-Manero G, et al. SF3B1 mutations are prevalent in myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts but do not hold independent prognostic value. 2012;119(2):4.
37. Damm F, Itzykson R, Kosmider O, Droin N, Renneville A, Chesnais V, et al. SETBP1 mutations in 658 patients with myelodysplastic syndromes, chronic myelomonocytic leukemia and secondary acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2013 Jun;27(6):1401–3.
38. Paquette RL, Landaw EM, Kahan J, Libbert M, Lazcano O, Isaac G, et al. N-ras Mutations Are Associated With Poor Prognosis and Increased Risk of Leukemia in Myelodysplastic Syndrome. :10.
39. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N, et al. Mutations of polycomb-associated gene *ASXL1* in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009 Jun;145(6):788–800.
40. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations of *AML1* are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation. *Blood*. 2004 Sep 1;104(5):1474–81.
41. Delhommeau F, Valle VD, Massé A, Couedic J-PL, Lécluse Y, Marzac C, et al. Mutation in *TET2* in Myeloid Cancers. *N Engl J Med*. 2009;13.
42. Thol F, Weissinger EM, Krauter J, Wagner K, Damm F, Wichmann M, et al. *IDH1* mutations in patients with myelodysplastic syndromes are associated with an unfavorable prognosis. *Haematologica*. 2010 Oct 1;95(10):1668–74.
43. Harada H, Harada Y, Niimi H, Kyo T, Kimura A, Inaba T. High incidence of somatic mutations in the *AML1/RUNX1* gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood*. 2004 Mar 15;103(6):2316–24.
44. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011 Oct 1;478(7367):64–9.
45. Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, Boultonwood J, Della Porta MG, Pascutto C, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011 Dec 8;118(24):6239–46.
46. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med*. 2011 Jun 30;364(26):2496–506.
47. Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, Mohan S, Rataul M, O’Keefe C, et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. 2009;113(6):11.
48. Shen L, Kantarjian H, Guo Y, Lin E, Shan J, Huang X, et al. DNA Methylation Predicts Survival and Response to Therapy in Patients With Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 28;28(4):605–13.
49. Steensma DP. Myelodysplastic syndromes current treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J*. 2018 May;8(5):47.
50. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 2012 Sep 20;120(12):2454–65.
51. Della Porta MG, Alessandrino EP, Bacigalupo A, van Lint MT, Malcovati L, Pascutto C, et al. Predictive factors for the outcome of allogeneic transplantation in patients with MDS stratified according to the revised IPSS-R. *Blood*. 2014 Apr 10;123(15):2333–42.
52. Gauthier J, Damaj G, Langlois C, Robin M, Michallet M, Chevallier P, et al. Contribution of Revised International Prognostic Scoring System Cytogenetics to Predict Outcome After Allogeneic Stem Cell Transplantation for Myelodysplastic Syndromes: A Study From the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy.

Transplantation. 2015 Aug;99(8):1672–80.

53. DeZern AE. Nine years without a new FDA-approved therapy for MDS: how can we break through the impasse? *Hematology*. 2015 Dec 5;2015(1):308–16.
54. Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2014 Jan;89(1):97–108.
55. Lindsley RC. Uncoding the genetic heterogeneity of myelodysplastic syndrome. *Hematology*. 2017 Dec 8;2017(1):447–52.
56. Bejar R, Papaemmanuil E, Haferlach T, Garcia-Manero G, Maciejewski JP, Sekeres MA, et al. Somatic Mutations in MDS Patients Are Associated with Clinical Features and Predict Prognosis Independent of the IPSS-R: Analysis of Combined Datasets from the International Working Group for Prognosis in MDS-Molecular Committee. *Blood*. 2015 Dec 3;126(23):907–907.
57. de Witte T, Bowen D, Robin M, Malcovati L, Niederwieser D, Yakoub-Agha I, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for MDS and CMML: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 Mar 30;129(13):1753–62.
58. Wong TN, Ramsingh G, Young AL, Miller CA, Touma W, Welch JS, et al. Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. *Nature*. 2015 Feb 1;518(7540):552–5.
59. Solary E, Itzykson R. How I treat chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2017 Jul 13;130(2):126–36.
60. Kröger N, Iacobelli S, Franke G-N, Platzbecker U, Uddin R, Hübel K, et al. Dose-Reduced Versus Standard Conditioning Followed by Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Patients With Myelodysplastic Syndrome: A Prospective Randomized Phase III Study of the EBMT (RICMAC Trial). *J Clin Oncol*. 2017 May 2;35(19):2157–64.
61. Damaj G, Duhamel A, Robin M, Beguin Y, Michallet M, Mohty M, et al. Impact of Azacitidine Before Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Myelodysplastic Syndromes: A Study by the Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie-Cellulaire and the Groupe-Francophone des Myélodysplasies. *J Clin Oncol*. 2012 Dec 20;30(36):4533–40.
62. Damaj G, Mohty M, Robin M, Michallet M, Chevallier P, Beguin Y, et al. Upfront Allogeneic Stem Cell Transplantation after Reduced-Intensity/Nonmyeloablative Conditioning for Patients with Myelodysplastic Syndrome: A Study by the Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Sep;20(9):1349–55.
63. Gerds AT, Gooley TA, Estey EH, Appelbaum FR, Deeg HJ, Scott BL. Pretransplantation Therapy with Azacitidine vs Induction Chemotherapy and Posttransplantation Outcome in Patients with MDS. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Aug;18(8):1211–8.
64. BARNES DW, CORP MJ, LOUTIT JF, NEAL FE. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J*. 1956 Sep 15;2(4993):626–7.
65. MATHE G, Amiel J, SCHWARZENBERG L, CATTAN A, Schneider M, DEVRIES M, et al. Successful Allogenic Bone Marrow Transplantation in Man: Chimerism, Induced Specific Tolerance and Possible Anti-Leukemic Effects. *Blood*. 1965 Mar 1;25:179–96.
66. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, et al. Antileukemic Effect of Graft-versus-Host Disease in Human Recipients of Allogeneic-Marrow Grafts. *N Engl J Med*. 1979 May 10;300(19):1068–73.
67. Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED. Antileukemic Effect of Chronic Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*. 1981 Jun 18;304(25):1529–33.
68. Kröger N, Solano C, Wolschke C, Bandini G, Patriarca F, Pini M, et al. Antilymphocyte Globulin for Prevention of Chronic Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*. 2016 Jan 7;374(1):43–53.

69. Kolb H-J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008 Dec 1;112(12):4371–83.
70. Sweeney C, Vyas P. The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. *Front Oncol*. 2019 Nov 19;9:1217.
71. Janelle V, Rulleau C, Del Testa S, Carli C, Delisle J-S. T-Cell Immunotherapies Targeting Histocompatibility and Tumor Antigens in Hematological Malignancies. *Front Immunol*. 2020 Feb 21;11:276.
72. Magenau J, Runaas L, Reddy P. Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2016 Apr;173(2):190–205.
73. Magenau J, Reddy P. Next generation treatment of acute graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2014 Dec;28(12):2283–91.
74. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. 2009;373:12.
75. Zilberberg J, Feinman R, Korngold R. Strategies for the Identification of T Cell–Recognized Tumor Antigens in Hematological Malignancies for Improved Graft-versus-Tumor Responses after Allogeneic Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Jun;21(6):1000–7.
76. Rowe JM. Graft-versus-disease effect following allogeneic transplantation for acute leukaemia. *Vaccine Ther Adopt Immunother Hematol Malig*. 2008 Sep 1;21(3):485–502.
77. Griffioen M, van Bergen CAM, Falkenburg JHF. Autosomal Minor Histocompatibility Antigens: How Genetic Variants Create Diversity in Immune Targets. *Front Immunol*. 2016;7:100.
78. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer*. 2004 May 1;4(5):371–80.
79. Marijt W, Heemskerk M, Kloosterboer F, Goulmy E, Kester MGD, Hoorn M, et al. Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100:2742–7.
80. Hori S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science*. 2003 Feb 14;299(5609):1057–61.
81. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, et al. Epigenetic Control of the foxp3 Locus in Regulatory T Cells. Marrack P, editor. *PLoS Biol*. 2007 Jan 30;5(2):e38.
82. Schneidawind D, Pierini A, Alvarez M, Pan Y, Baker J, Kim B, et al. CD4+ Invariant Natural Killer T Cells Protect from Acute Graft-Versus-Host Disease Lethality through a Dramatic Expansion of Donor-Derived CD4+FoxP3+ Regulatory T Cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Feb 1;20:S23.
83. Romano M, Tung SL, Smyth LA, Lombardi G. Treg therapy in transplantation: a general overview. *Transpl Int*. 2017 Aug;30(8):745–53.
84. Dickinson AM, Norden J, Li S, Hromadnikova I, Schmid C, Schmetzer H, et al. Graft-versus-Leukemia Effect Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Leukemia. *Front Immunol*. 2017 Jun 7;8:496.
85. Jagasia M, Arora M, Flowers MED, Chao NJ, McCarthy PL, Cutler CS, et al. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2012 Jan 5;119(1):296–307.
86. Cahn J-Y. Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Societe Francaise de Greffe de Moelle et Therapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood*. 2005 Aug 15;106(4):1495–500.
87. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol*

Blood Marrow Transplant. 2015 Mar;21(3):389-401.e1.

88. Martin PJ, Rizzo JD, Wingard JR, Ballen K, Curtin PT, Cutler C, et al. First- and Second-Line Systemic Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease: Recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Aug;18(8):1150–63.

89. MacMillan ML, DeFor TE, Weisdorf DJ. The best endpoint for acute GVHD treatment trials. *Blood*. 2010 Jul 1;115(26):5412–7.

90. Choi SW, Reddy P. Current and emerging strategies for the prevention of graft-versus-host disease. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014 Sep;11(9):536–47.

91. Pasquini MC. Impact of graft-versus-host disease on survival. *Graft Host Dis Pathol Prophyl Treat*. 2008 Jun 1;21(2):193–204.

92. Jagasia M, Greinix H, Robin M, Das-Gupta E, Jacobs R, Savani BN, et al. Extracorporeal Photopheresis versus Anticytokine Therapy as a Second-Line Treatment for Steroid-Refractory Acute GVHD: A Multicenter Comparative Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Jul;19(7):1129–33.

93. Munneke JM, Spruit MJA, Cornelissen AS, van Hoeven V, Voermans C, Hazenberg MD. The Potential of Mesenchymal Stromal Cells as Treatment for Severe Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease: A Critical Review of the Literature. *Transplantation* [Internet]. 2016;100(11). Available from: https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2016/11000/The_Potential_of_Mesenchymal_Stromal_Cells_as.16.aspx

94. Zeiser R, Burchert A, Lengerke C, Verbeek M, Maas-Bauer K, Metzelder SK, et al. Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: a multicenter survey. *Leukemia*. 2015 Oct;29(10):2062–8.

95. Socié G, Niederwieser D, von Bubnoff N, Szer J, Mohty M, Laughlin M, et al. Reach-2 Trial Design: A Phase 3, Randomized, Open-Label, Multicenter Study to Evaluate Ruxolitinib Compared to Best Available Therapy in Patients with Corticosteroid-Refractory Acute Graft vs Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018 Mar;24(3):S203.

96. Rubio MT, Labopin M, Blaise D, Socié G, Contreras RR, Chevallier P, et al. The impact of graft-versus-host disease prophylaxis in reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplant in acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica*. 2015 May 1;100(5):683–9.

97. Hobbs G, Perales M-A. Effects of T-Cell Depletion on Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcomes in AML Patients. *J Clin Med*. 2015 Mar 19;4(3):488–503.

98. Schmid C, Labopin M, Nagler A, Niederwieser D, Castagna L, Tabrizi R, et al. Treatment, risk factors, and outcome of adults with relapsed AML after reduced intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2012 Feb 9;119(6):1599–606.

99. Horowitz M, Schreiber H, Elder A, Heidenreich O, Vormoor J, Toffalori C, et al. Epidemiology and biology of relapse after stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2018 Nov;53(11):1379–89.

100. Bernasconi P, Borsani O. Immune Escape after Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT): From Mechanisms to Novel Therapies. *Cancers*. 2019 Dec 25;12(1):69.

101. Rautenberg C, Germing U, Haas R, Kobbe G, Schroeder T. Relapse of Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Prevention, Detection, and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 8;20(1):228.

102. Zeiser R, Vago L. Mechanisms of immune escape after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2019 Mar 21;133(12):1290–7.

103. Zeiser R, Beelen DW, Bethge W, Bornhäuser M, Bug G, Burchert A, et al. Biology-Driven Approaches to Prevent and Treat Relapse of Myeloid Neoplasia after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019 Apr;25(4):e128–40.
104. Kong Y, Zhang J, Claxton DF, Ehmann WC, Rybka WB, Zhu L, et al. PD-1hiTIM-3+ T cells associate with and predict leukemia relapse in AML patients post allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cancer J*. 2015 Jul;5(7):e330–e330.
105. Fracchiolla NS, Fattizzo B, Cortelezzi A. Mesenchymal Stem Cells in Myeloid Malignancies: A Focus on Immune Escaping and Therapeutic Implications. Franquesa M, editor. *Stem Cells Int*. 2017 Aug 21;2017:6720594.
106. Mussai F, De Santo C, Abu-Dayyeh I, Booth S, Quek L, McEwen-Smith RM, et al. Acute myeloid leukemia creates an arginase-dependent immunosuppressive microenvironment. *Blood*. 2013 Aug 1;122(5):749–58.
107. Buccisano F, Maurillo L, Del Principe MI, Del Poeta G, Sconocchia G, Lo-Coco F, et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012 Jan 12;119(2):332–41.
108. Craddock C, Versluis J, Labopin M, Socie G, Huynh A, Deconinck E, et al. Distinct factors determine the kinetics of disease relapse in adults transplanted for acute myeloid leukaemia. *J Intern Med*. 2018 Apr;283(4):371–9.
109. Fang M, Storer B, Estey E, Othus M, Zhang L, Sandmaier BM, et al. Outcome of patients with acute myeloid leukemia with monosomal karyotype who undergo hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2011 Aug 11;118(6):1490–4.
110. Middeke JM, Fang M, Cornelissen JJ, Mohr B, Appelbaum FR, Stadler M, et al. Outcome of patients with abn(17p) acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 2014;123(19):8.
111. Armand P, Kim HT, DeAngelo DJ, Ho VT, Cutler CS, Stone RM, et al. Impact of Cytogenetics on Outcome of De Novo and Therapy-Related AML and MDS after Allogeneic Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Jun;13(6):655–64.
112. Moreno I, Martín G, Bolufer P, Barragán E, Rueda E, Román J, et al. Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. 2003;88:6.
113. Cornelissen JJ, Breems D, van Putten WLJ, Gratwohl AA, Passweg JR, Pabst T, et al. Comparative Analysis of the Value of Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With Monosomal Karyotype Versus Other Cytogenetic Risk Categories. *J Clin Oncol*. 2012 May 7;30(17):2140–6.
114. Mo X-D, Lv M, Huang X-J. Preventing relapse after haematopoietic stem cell transplantation for acute leukaemia: the role of post-transplantation minimal residual disease (MRD) monitoring and MRD-directed intervention. *Br J Haematol*. 2017 Oct;179(2):184–97.
115. Bornhauser M, Oelschlaegel U, Platzbecker U, Bug G, Lutterbeck K, Kiehl MG, et al. Monitoring of donor chimerism in sorted CD34+ peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2009 Nov 1;94(11):1613–7.
116. Yafour N, Beckerich F, Bulabois CE, Chevallier P, Daguindau É, Dumesnil C, et al. Stratégies préventives et thérapeutiques de la rechute après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bull Cancer (Paris)*. 2017 Dec;104(12):S84–98.
117. Yafour N, Beckerich F, Bulabois CE, Chevallier P, Daguindau E, Dumesnil C, et al. How to prevent relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute leukemia and myelodysplastic syndrome. *Curr Res Transl Med*. 2017 Apr;65(2):65–9.
118. Rashidi A, Walter RB, Tallman MS, Appelbaum FR, DiPersio JF. Maintenance therapy

- in acute myeloid leukemia: an evidence-based review of randomized trials. *Blood*. 2016 Aug 11;128(6):763–73.
119. Lee CJ, Savani BN, Mohty M, Gorin NC, Labopin M, Ruggeri A, et al. Post-remission strategies for the prevention of relapse following allogeneic hematopoietic cell transplantation for high-risk acute myeloid leukemia: expert review from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2019 Apr;54(4):519–30.
120. Chen Y-B, McCarthy PL, Hahn T, Holstein SA, Ueda M, Kröger N, et al. Methods to prevent and treat relapse after hematopoietic stem cell transplantation with tyrosine kinase inhibitors, immunomodulating drugs, deacetylase inhibitors, and hypomethylating agents. *Bone Marrow Transplant*. 2019 Apr;54(4):497–507.
121. Culos K, Byrne M. Salvage Therapy after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Targeted and Low-Intensity Treatment Options in Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia. *Clin Hematol Int [Internet]*. 2019 [cited 2020 Apr 27]; Available from: <https://www.atlantis-press.com/article/125906450>
122. Eapen M, Giralt SA, Horowitz MM, Klein JP, Wagner JE, Zhang M-J, et al. Second transplant for acute and chronic leukemia relapsing after first HLA-identical sibling transplant. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Oct;34(8):721–7.
123. Seymour JF, Döhner H, Butrym A, Wierzbowska A, Selleslag D, Jang JH, et al. Azacitidine improves clinical outcomes in older patients with acute myeloid leukaemia with myelodysplasia-related changes compared with conventional care regimens. *BMC Cancer*. 2017 Dec;17(1):852.
124. Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, et al. Azacitidine Prolongs Overall Survival Compared With Conventional Care Regimens in Elderly Patients With Low Bone Marrow Blast Count Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 1;28(4):562–9.
125. 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 Jul 16;126(3):291–9.
126. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, 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 May 15;20(10):2429–40.
127. Voso MT, Leone G, Piciocchi A, Fianchi L, Santarone S, Candoni A, et al. Feasibility of allogeneic stem-cell transplantation after azacitidine bridge in higher-risk myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemia: results of the BMT-AZA prospective study. *Ann Oncol*. 2017 Jul;28(7):1547–53.
128. Kim Y, Kim I-H, Kim HJ, Park S, Lee K-H, Kim SJ, et al. Multicenter study evaluating the impact of hypomethylating agents as bridging therapy to hematopoietic stem cell transplantation in myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol*. 2014 May 1;99(5):635–43.
129. Issa J-PJ, Kantarjian HM, Kirkpatrick P. Azacitidine. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Apr 1;4(4):275–6.
130. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*. 1980;20(1):85–93.
131. Jones PA, Issa J-PJ, Baylin S. Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat Rev Genet*. 2016 Oct 1;17(10):630–41.
132. Almstedt M, Blagitko-Dorfs N, Duque-Afonso J, Karbach J, Pfeifer D, Jäger E, et al. The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine induces expression of NY-ESO-1 and other cancer/testis antigens in myeloid leukemia cells. *Leuk Res*. 2010 Jul 1;34(7):899–905.
133. Sigalotti L, Altomonte M, Colizzi F, Degan M, Rupolo M, Zagonel V, et al. 5-Aza-2'-

deoxycytidine (decitabine) treatment of hematopoietic malignancies: a multimechanism therapeutic approach? *Blood*. 2003 Jun 1;101(11):4644–6.

134. Hambach L, Ling K-W, Pool J, Aghai Z, Blokland E, Tanke HJ, et al. Hypomethylating drugs convert HA-1–negative solid tumors into targets for stem cell–based immunotherapy. *Blood*. 2009 Mar 19;113(12):2715–22.

135. Goodyear O, Agathangelou 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 Sep 16;116(11):1908–18.

136. Sánchez-Abarca LI, Gutierrez-Cosio S, Santamaría C, Caballero-Velazquez T, Blanco B, Herrero-Sánchez C, et al. Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting. *Blood*. 2010 Jan 7;115(1):107–21.

137. Roulois D, Loo Yau H, Singhania R, Wang Y, Danesh A, Shen SY, et al. DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts. *Cell*. 2015 Aug 27;162(5):961–73.

138. Chiappinelli KB, Strissel PL, Desrichard A, Li H, Henke C, Akman B, et al. Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell*. 2015 Aug 27;162(5):974–86.

139. Plataniotis LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*. 2005 May;5(5):375–86.

140. Grandi N, Tramontano E. Human Endogenous Retroviruses Are Ancient Acquired Elements Still Shaping Innate Immune Responses. *Front Immunol*. 2018 Sep 10;9:2039.

141. Pinto A, Maio M, Attadia V, Zappacosta S, Cimino R. MODULATION OF HLA-DR ANTIGENS EXPRESSION IN HUMAN MYELOID LEUKAEMIA CELLS BY CYTARABINE AND 5-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE. *Orig Publ Vol 2 Issue 8407*. 1984 Oct 13;324(8407):867–8.

142. Scheibenbogen C, Letsch A, Thiel E, Schmittl A, Mailaender V, Baerwolf S, et al. CD8 T-cell responses to Wilms tumor gene product WT1 and proteinase 3 in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2002 Sep 15;100(6):2132–7.

143. Ishikawa T, Fujii N, Imada M, Aoe M, Meguri Y, Inomata T, et al. Graft-versus-leukemia effect with a WT1-specific T-cell response induced by azacitidine and donor lymphocyte infusions after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy*. 2017 Apr;19(4):514–20.

144. Yang H, Bueso-Ramos C, DiNardo C, Estecio MR, Davanlou M, Geng Q-R, et al. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia*. 2014 Jun;28(6):1280–8.

145. Youngblood B, Oestreich KJ, Ha S-J, Duraiswamy J, Akondy RS, West EE, et al. Chronic Virus Infection Enforces Demethylation of the Locus that Encodes PD-1 in Antigen-Specific CD8+ T Cells. *Immunity*. 2011 Sep;35(3):400–12.

146. Ørskov AD, Treppendahl MB, Skovbo A, Holm MS, Friis LS, Hokland M, et al. Hypomethylation and up-regulation of *PD-1* in T cells by azacytidine in MDS/AML patients: A rationale for combined targeting of PD-1 and DNA methylation. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Apr 20 [cited 2020 Apr 20];6(11). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/3324>

147. Schroeder T, Fröbel J, Cadeddu R-P, Czibere A, Dienst A, Platzbecker U, et al. Salvage therapy with azacitidine increases regulatory T cells in peripheral blood of patients with AML or MDS and early relapse after allogeneic blood stem cell transplantation. *Leukemia*. 2013 Sep;27(9):1910–3.

148. Santourlidis S, Trompeter H-I, Weinhold S, Eisermann B, Meyer KL, Wernet P, et al. Crucial Role of DNA Methylation in Determination of Clonally Distributed Killer Cell Ig-like Receptor Expression Patterns in NK Cells. *J Immunol*. 2002 Oct 15;169(8):4253–61.

149. Wolff F, Leisch M, Greil R, Risch A, Pleyer L. The double-edged sword of (re)expression of genes by hypomethylating agents: from viral mimicry to exploitation as priming agents for targeted immune checkpoint modulation. *Cell Commun Signal*. 2017 Dec;15(1):13.
150. Choi J, Ritchey J, Prior JL, Holt M, Shannon WD, Deych E, et al. In vivo administration of hypomethylating agents mitigate graft-versus-host disease without sacrificing graft-versus-leukemia. *Blood*. 2010 Jul 8;116(1):129–39.
151. Cooper ML, Choi J, Karpova D, Vij K, Ritchey J, Schroeder MA, et al. Azacitidine Mitigates Graft-versus-Host Disease via Differential Effects on the Proliferation of T Effectors and Natural Regulatory T Cells In Vivo. *J Immunol*. 2017 May 1;198(9):3746–54.
152. Goodyear OC, Dennis M, Jilani NY, Loke J, Siddique S, Ryan G, et al. Azacitidine augments expansion of regulatory T cells after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2012 Apr 5;119(14):3361–9.
153. Ehx G, Fransolet G, de Leval L, D'Hondt S, Lucas S, Hannon M, et al. Azacytidine prevents experimental xenogeneic graft-versus-host disease without abrogating graft-versus-leukemia effects. *OncoImmunology*. 2017 May 4;6(5):e1314425.
154. Flotho C, Sommer S, Lübbert M. DNA-hypomethylating agents as epigenetic therapy before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukemia. *Semin Cancer Biol*. 2018 Aug;51:68–79.
155. Schroeder T, Rautenberg C, Haas R, Kobbe G. Hypomethylating agents after allogeneic blood stem cell transplantation. *Stem Cell Investig*. 2016 Nov 28;3:84–84.
156. Jabbour E, Giralt S, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Jagasia M, Kebriaei P, et al. Low-dose azacitidine after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Cancer*. 2009 May 1;115(9):1899–905.
157. Oran B, Giralt S, Couriel D, Hosing C, Shpall EJ, de Meis E, et al. Treatment of AML and MDS relapsing after reduced-intensity conditioning and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2007 Dec 1;21(12):2540–4.
158. Schmid C, Labopin M, Nagler A, Bornhäuser M, Finke J, Fassas A, et al. Donor Lymphocyte Infusion in the Treatment of First Hematological Relapse After Allogeneic Stem-Cell Transplantation in Adults With Acute Myeloid Leukemia: A Retrospective Risk Factors Analysis and Comparison With Other Strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 1;25(31):4938–45.
159. Schmid C, Schleuning M, Aschan J, Ringdén O, Hahn J, Holler E, et al. Low-dose ARAC, donor cells, and GM-CSF for treatment of recurrent acute myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2004 Aug;18(8):1430–3.
160. Lübbert M, Bertz H, Wäsch R, Marks R, Rüter B, Claus R, et al. Efficacy of a 3-day, low-dose treatment with 5-azacytidine followed by donor lymphocyte infusions in older patients with acute myeloid leukemia or chronic myelomonocytic leukemia relapsed after allografting. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Apr;45(4):627–32.
161. Schroeder T, Czibere A, Platzbecker U, Bug G, Uharek L, Luft T, et al. Azacitidine and donor lymphocyte infusions as first salvage therapy for relapse of AML or MDS after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2013 Jun;27(6):1229–35.
162. Craddock C, Labopin M, Robin M, Finke J, Chevallier P, Yakoub-Agha I, et al. Clinical activity of azacitidine in patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2016 Jul 1;101(7):879–83.
163. Platzbecker U, Wermke M, Radke J, Oelschlaegel U, Seltmann F, Kiani A, et al. Azacitidine for treatment of imminent relapse in MDS or AML patients after allogeneic HSCT: results of the RELAZA trial. *Leukemia*. 2012 Mar;26(3):381–9.
164. Platzbecker U, Middeke JM, Sockel K, Herbst R, Wolf D, Baldus CD, et al. Measurable residual disease-guided treatment with azacitidine to prevent haematological relapse in patients

- with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia (RELAZA2): an open-label, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2018 Dec;19(12):1668–79.
165. de Lima M, Giralt S, Thall PF, de Padua Silva L, Jones RB, Komanduri K, et al. Maintenance therapy with low-dose azacitidine after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for recurrent acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome: A dose and schedule finding study. *Cancer*. 2010 Dec 1;116(23):5420–31.
166. Craddock C, Jilani N, Siddique S, Yap C, Khan J, Nagra S, et al. Tolerability and Clinical Activity of Post-Transplantation Azacitidine in Patients Allografted for Acute Myeloid Leukemia Treated on the RICAZA Trial. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Feb;22(2):385–90.
167. El-Cheikh J, Massoud R, Fares E, Kreidieh N, Mahfouz R, Charafeddine M, et al. Low-dose 5-azacytidine as preventive therapy for relapse of AML and MDS following allogeneic HCT. *Bone Marrow Transplant*. 2017 Jun;52(6):918–21.
168. Maples KT, Sabo RT, McCarty JM, Toor AA, Hawks KG. Maintenance azacitidine after myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for myeloid malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2018 Dec 2;59(12):2836–41.
169. Oshikawa G, Kakihana K, Saito M, Aoki J, Najima Y, Kobayashi T, et al. Post-transplant maintenance therapy with azacitidine and gemtuzumab ozogamicin for high-risk acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2015 Jun;169(5):756–9.
170. Pusic I, Choi J, Fiala MA, Gao F, Holt M, Cashen AF, et al. Maintenance Therapy with Decitabine after Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Oct;21(10):1761–9.
171. de Lima M, Oran B, Champlin RE, Papadopoulos EB, Giralt SA, Scott BL, et al. CC-486 Maintenance after Stem Cell Transplantation in Patients with Acute Myeloid Leukemia or Myelodysplastic Syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018 Oct;24(10):2017–24.
172. Guillaume T, Malard F, Magro L, Labopin M, Tabrizi R, Borel C, et al. Prospective phase II study of prophylactic low-dose azacitidine and donor lymphocyte infusions following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Bone Marrow Transplant*. 2019 Nov;54(11):1815–26.
173. Li GX, Wang L, Yaghmour B, Ramsingh G, Yaghmour G. The role of FLT3 inhibitors as maintenance therapy following hematopoietic stem cell transplant. *Leuk Res Rep*. 2018;10:26–36.
174. Bazarbachi A, Bug G, Baron F, Brissot E, Ciceri F, Abou Dalle I, et al. Clinical practice recommendation on hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia patients with FLT3 internal tandem duplication: a position statement from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica*. 2020 Apr 2;haematol.2019.243410.
175. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a *FLT3* Mutation. *N Engl J Med*. 2017 Aug 3;377(5):454–64.
176. Mathew NR, Baumgartner F, Braun L, O’Sullivan D, Thomas S, Waterhouse M, et al. Sorafenib promotes graft-versus-leukemia activity in mice and humans through IL-15 production in FLT3-ITD-mutant leukemia cells. *Nat Med*. 2018 Mar;24(3):282–91.
177. Metzelder SK, Schroeder T, Finck A, Scholl S, Fey M, Götze K, et al. High activity of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia synergizes with allo-immune effects to induce sustained responses. *Leukemia*. 2012 Nov;26(11):2353–9.
178. Metzelder SK, Schroeder T, Lübbert M, Ditschkowski M, Götze K, Scholl S, et al. Long-term survival of sorafenib-treated FLT3-ITD-positive acute myeloid leukaemia patients relapsing after allogeneic stem cell transplantation. *Eur J Cancer*. 2017 Nov;86:233–9.
179. Bazarbachi A, Labopin M, Battipaglia G, Djabali A, Passweg J, Socié G, et al. Sorafenib

improves survival of *FLT3* -mutated acute myeloid leukemia in relapse after allogeneic stem cell transplantation: a report of the EBMT Acute Leukemia Working Party. *Haematologica*. 2019 Sep;104(9):e398–401.

180. Battipaglia G, Massoud R, Ahmed SO, Legrand O, El Cheikh J, Youniss R, et al. Efficacy and Feasibility of Sorafenib as a Maintenance Agent After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Fms-like Tyrosine Kinase 3 Mutated Acute Myeloid Leukemia: An Update. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2019 Aug 1;19(8):506–8.

181. Burchert A, Bug G, Finke J, Stelljes M, Rollig C, Wäsch R, et al. Sorafenib As Maintenance Therapy Post Allogeneic Stem Cell Transplantation for FLT3-ITD Positive AML: Results from the Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Multicentre Sormain Trial. *Blood*. 2018 Nov 29;132(Supplement 1):661–661.

182. Levis MJ, Hamadani M, Logan B, Rosales M, Perl AE, Devine SM, et al. A phase 3, trial of gilteritinib, as maintenance therapy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with FLT3-ITD+ AML. *J Clin Oncol*. 2018 May 20;36(15_suppl):TPS7075–TPS7075.

183. Yokoyama H, Lundqvist A, Su S, Childs R. Toxic effects of sorafenib when given early after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010 Oct 14;116(15):2858–9.

184. Ravandi F, Alattar ML, Grunwald MR, Rudek MA, Rajkhowa T, Richie MA, et al. Phase 2 study of azacytidine plus sorafenib in patients with acute myeloid leukemia and FLT-3 internal tandem duplication mutation. *Blood*. 2013 Jun 6;121(23):4655–62.

185. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, et al. Donor Leukocyte Transfusions for Treatment of Recurrent Chronic Myelogenous Leukemia in Marrow Transplant Patients. :4.

186. Benjamin JE, Gill S, Negrin RS. Biology and clinical effects of natural killer cells in allogeneic transplantation. *Curr Opin Oncol* [Internet]. 2010;22(2). Available from: https://journals.lww.com/co-oncology/Fulltext/2010/03000/Biology_and_clinical_effects_of_natural_killer.10.aspx

187. De Vos J, Baudoux E, Bay J-O, Calmels B, Cras A, El Cheikh J, et al. Injections de lymphocytes du donneur (DLI) : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bull Cancer (Paris)*. 2019 Jan;106(1):S35–9.

188. Jedlickova Z, Schmid C, Koenecke C, Hertenstein B, Baurmann H, Schwerdtfeger R, et al. Long-term results of adjuvant donor lymphocyte transfusion in AML after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2016 May;51(5):663–7.

189. Legrand F, Le Floch A-C, Granata A, Fürst S, Faucher C, Lemarie C, et al. Prophylactic donor lymphocyte infusion after allogeneic stem cell transplantation for high-risk AML. *Bone Marrow Transplant*. 2017 Apr;52(4):620–1.

190. Porter DL, Levine BL, Bunin N, Stadtmauer EA, Luger SM, Goldstein S, et al. A phase 1 trial of donor lymphocyte infusions expanded and activated ex vivo via CD3/CD28 costimulation. *Blood*. 2006 Feb 15;107(4):1325–31.

191. Nadal E. Adjuvant interleukin-2 therapy for patients refractory to donor lymphocyte infusions. *Exp Hematol*. 2004 Feb;32(2):218–23.

192. Craddock C, Slade D, De Santo C, Wheat R, Ferguson P, Hodgkinson A, et al. Combination Lenalidomide and Azacitidine: A Novel Salvage Therapy in Patients Who Relapse After Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2019 Mar 1;37(7):580–8.

193. Wei A, Tan P, Perruzza S, Govindaraj C, Fleming S, McManus J, et al. Maintenance lenalidomide in combination with 5-azacitidine as post-remission therapy for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2015 Apr;169(2):199–210.

194. Kneppers E, van der Holt B, Kersten M-J, Zweegman S, Meijer E, Huls G, et al. Lenalidomide maintenance after nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in

- multiple myeloma is not feasible: results of the HOVON 76 Trial. *Blood*. 2011 Sep 1;118(9):2413–9.
195. Sockel K, Bornhaeuser M, Mischak-Weissinger E, Trenscher R, Wermke M, Unzicker C, et al. Lenalidomide maintenance after allogeneic HSCT seems to trigger acute graft-versus-host disease in patients with high-risk myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia and del(5q): results of the LENAMAIN trial. *Haematologica*. 2012 Sep 1;97(9):e34–5.
196. Mohty M, Chevallier P. Azacitidine after allo-SCT: the good without the bad? *Blood*. 2012 Apr 5;119(14):3199–200.
197. Schroeder T, Rautenberg C, Haas R, Germing U, Kobbe G. Do hypomethylating agents prevent relapse after Allo-HCT? *Adv Cell Gene Ther*. 2019 Jan;2(1):e30.
198. Medeiros BC, Chan SM, Daver NG, Jonas BA, Pollyea DA. Optimizing survival outcomes with post-remission therapy in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2019 May;ajh.25484.
199. Bejanyan N, Weisdorf DJ, Logan BR, Wang H-L, Devine SM, de Lima M, et al. Survival of Patients with Acute Myeloid Leukemia Relapsing after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: A Center for International Blood and Marrow Transplant Research Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Mar;21(3):454–9.
200. Andreola G, Labopin M, Beelen D, Chevallier P, Tabrizi R, Bosi A, et al. Long-term outcome and prognostic factors of second allogeneic hematopoietic stem cell transplant for acute leukemia in patients with a median follow-up of ≥ 10 years. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Dec;50(12):1508–12.
201. Dominietto A, Pozzi S, Miglino M, Albarracin F, Piaggio G, Bertolotti F, et al. Donor lymphocyte infusions for the treatment of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*. 2007 Jun 1;109(11):5063–4.
202. Guillaume T, Porcheron S, Audat F, Bancillon N, Berceanu A, Charbonnier A, et al. Recommandations de la SFGM-TC concernant l'injection prophylactique, préemptive et curative des lymphocytes du donneur (DLI) après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. *Recomm SFGM-TC SFGM-TC - Guidel SFGM-TC*. 2014 Aug 1;62(4):193–6.
203. Yan C-H, Liu D-H, Liu K-Y, Xu L-P, Liu Y-R, Chen H, et al. Risk stratification-directed donor lymphocyte infusion could reduce relapse of standard-risk acute leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2012 Apr 5;119(14):3256–62.
204. Drozd-Sokołowska J, Gil L, Waszczuk-Gajda A, Mądry K, Piekarska A, Dutka M, et al. Azacitidine Use After Allogeneic Stem Cell Transplantation—Results From the Polish Adult Leukemia Group. *Transplant Proc*. 2016 Jun 1;48(5):1802–5.
205. Ørskov AD, Treppendahl MB, Skovbo A, Holm MS, Friis LS, Hokland M, et al. Hypomethylation and up-regulation of *PD-1* in T cells by azacytidine in MDS/AML patients: A rationale for combined targeting of PD-1 and DNA methylation. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Apr 20 [cited 2020 Apr 20];6(11). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/3324>
206. Chen C, Liang C, Wang S, Chio CL, Zhang Y, Zeng C, et al. Expression patterns of immune checkpoints in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 2020 Dec;13(1):28.
207. Giannopoulos K. Targeting Immune Signaling Checkpoints in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med*. 2019 Feb 12;8(2):236.
208. Ravandi F, Daver N, Garcia-Manero G, Benton CB, Thompson PA, Borthakur G, et al. Phase 2 Study of Combination of Cytarabine, Idarubicin, and Nivolumab for Initial Therapy of Patients with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2017 Dec 7;130(Supplement 1):815–815.
209. Daver N, Garcia-Manero G, Basu S, Boddu PC, Alfayez M, Cortes JE, et al. Efficacy,

Safety, and Biomarkers of Response to Azacitidine and Nivolumab in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia: A Nonrandomized, Open-Label, Phase II Study. *Cancer Discov.* 2019 Mar;9(3):370–83.

AUTEUR : Nom : Wattebled

Prénom : Kevin James

Date de Soutenance : 19 juin 2020

Titre de la Thèse : 5-azacytidine en prévention de la rechute post-allogreffe de LAM, SMD et LMMC de haut-risque : résultats d'une étude comparative et rétrospective.

Thèse - Médecine – Lille 2020

Cadre de classement : Hématologie

DES + spécialité : Spécialités médicales – Hématologie option maladies du sang

Mots-clés : allogreffe de cellules souche hématopoïétiques, hémopathies myéloïdes, rechute, stratégie prophylactique, maintenance, 5-azacytidine

Résumé

Contexte : La rechute post-allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) reste un défi majeur, particulièrement pour les hémopathies malignes myéloïdes présentant des caractéristiques de haut risque. Le 5-azacytidine (AZA) a fait l'objet d'études comme traitement de maintenance en prévention de la rechute post-greffe mais son efficacité reste incertaine du fait de l'absence d'étude prospective contrôlée-randomisée. Notre objectif était principalement d'évaluer, de manière comparative, l'impact de la maintenance par AZA à deux ans sur le risque cumulé de rechute (CRR) post-allogreffe.

Méthode : Les receveurs d'allogreffe de CSH éligibles à une maintenance par AZA entre le 1er janvier 2014 et le 1er septembre 2019 dans le service d'hématologie du CHRU de Lille ont été identifiés à partir de la base de données PROMISE. Les patients inclus étaient majeurs, à haut risque de rechute, vivant et en rémission à J60 de la greffe. Le CRR à deux ans a été estimé suivant un modèle à risques compétitifs. Son association aux variables d'intérêts a été réalisée par un modèle de Fine-Grey. Secondairement, la même approche a été adoptée pour la mortalité non liée à la rechute (NRM). La survie globale (OS) et sans progression (EFS) ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier. Un modèle à risque proportionnel de Cox a été utilisé pour évaluer l'association aux variables d'intérêts.

Résultats : 255 patients ont été inclus d'âge médian 58 ans, parmi lesquels 72 ont reçu une maintenance par AZA, définie par la réalisation d'au moins un cycle. Celle-ci n'a pas influencé le CRR à deux ans entre les deux groupes (HR=1,27 [95%CI=0,77-2,11], p=0,35), ni la survie globale (HR=0,64 [95%CI=0,38-1,10], p=0,11) ou sans événement (HR=0,89 [95%CI=0,57-1,40], p=0,62). En revanche, elle était corrélée positivement à la mortalité non liée à la rechute (3,2% vs 15,6%, HR=0,19 [95%CI=0,05-0,77], p=0,02).

Conclusion : Une stratégie de maintenance par AZA ne semble pas diminuer le risque de rechute post-greffe en monothérapie, ni apporter de bénéfice de survie globale ou sans événement, mais pourrait avoir un impact positif sur la mortalité non liée à la rechute, sans que l'incidence de GVH aigue n'ait pu être évaluée du fait de la nature rétrospective de l'étude.

Composition du Jury :

Président	Monsieur le Professeur Thierry Facon
Assesseurs	Monsieur le Professeur Ibrahim Yakoub-Agha Monsieur le Professeur Bruno Quesnel Madame le Docteur Hélène Demarquette
Directeur de thèse	Monsieur le Docteur David Beauvais