

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2019

Thèse N°2019/TOU3/2053

THESE

POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

le 30 septembre 2019

Par DARRIEUX Yohan

Né(e) le 11 novembre 1991 à TARBES

**Mise en place de l'évaluation de la maladie résiduelle dans les
leucémies aiguës myéloïdes par technique de cytométrie en flux au
laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges**

Thèse dirigée par le Dr Estelle GUERIN

Examineurs :

M. Jean FEUILLARD, PU-PH, laboratoire hématologie, CHU de LIMOGES

Mme Véronique DE MAS, PU-PH, laboratoire hématologie, CHU de TOULOUSE

Mme Adriana PLESA, PH, laboratoire hématologie, CHU de LYON

M. Pascal TURLURE, PH, hématologie clinique, CHU de LIMOGES

Mme Estelle GUERIN, PH, laboratoire d'hématologie, CHU de LIMOGES

M. Batiste SIMONET, PH, laboratoire polyvalent, CH de GUERET



De la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier au 1^{er} janvier 2019

PROFESSEURS EMERITES :

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SIE P.	Hématologie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES :

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie-Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie-Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie Pharmaceutique
Mme BERNADES-GÉNISSON V.	Chimie Thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie Analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie Analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

MAITRE DES CONFERENCES DES UNIVERSITES :

Hospitalo-Universitaires

M. CESTAC P. (*)	Pharmacie Clinique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique
Mme SERONIE-VIVIEN S. (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C.	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie Analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS S.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme DERAËVE C.	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MIREY G.	Toxicologie
Mme MONFERRAN S.	Biochimie
M. OLICHON A.	Biochimie
Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

ENSEIGNANTS NON TITULAIRES

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme LARGEAUD L.	Immunologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. METSU D.	Pharmacologie
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie Thérapeutique
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique

Assistant Associé des Universités

Mme MARTINI H.	Physiologie
----------------	-------------

Remerciements

A monsieur le Pr Jean Feuillard.

Pour l'honneur que vous me faites en acceptant la présidence de mon jury de thèse. Je souhaite également vous remercier pour la confiance que vous m'avez témoignée pour ce travail mais aussi pour les stages que effectués dans votre service. Soyez assuré de mon plus grand respect et de ma plus haute considération.

A madame le Pr Véronique De Mas.

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Votre présence est pour moi un honneur.

A madame le Dr Adriana Plesa.

Un grand merci pour votre disponibilité, vos conseils téléphoniques et vos réponses à mes nombreuses questions. Votre participation en tant que jury à ma thèse est un grand privilège. Soyez assurée de ma très profonde gratitude.

A monsieur le Dr Pascal Turlure.

Votre participation en tant que jury à ma thèse est pour moi un grand honneur. Votre soutien et votre implication dans ce projet ont été une grande source de motivation. Soyez assuré de mon plus profond respect.

A madame le Dr Estelle Guérin.

Merci de m'avoir inclus dans ce projet et de l'avoir dirigé. Ton énergie sans limite a été un formidable moteur ! Merci d'avoir partagé ta passion pour la cytométrie en flux. Ce fut un grand plaisir et un immense honneur de réaliser ce travail avec toi. Guéret ne se trouvant qu'à « quelques » kilomètres, peut-être n'est-ce pas le dernier.

A monsieur le Dr Batiste Simonet.

Ton habilité à manier les mots est sans pareille. Merci pour tes nombreux conseils, littéraires comme scientifiques ainsi que pour tes nombreux jeux de mots et calembours. Sois assuré que ta participation à ce jury est pour moi un grand honneur.

La biologie est un art complexe et, de ce fait, de nombreuses personnes sont impliquées dans son apprentissage. Je souhaite remercier toute l'équipe de biologistes du laboratoire d'hématologie pour leur compétence, leur gentillesse et leur disponibilité. Merci de m'avoir fait découvrir la beauté de la cytologie, ainsi que d'avoir comblé quelques lacunes cinématographiques au passage.

Je remercie également tous les techniciens, techniciennes et secrétaires que j'ai eu la chance de rencontrer durant mes différents stages d'internat. Merci d'avoir donné de votre temps pour cet apprentissage et surtout pour avoir subi mes innombrables réinterprétations de la chanson française. J'ai une pensée particulière pour Alexia qui m'aura permis d'ouvrir les yeux. Merci également aux techniciens du secteur de cytométrie en flux pour leur participation à ce travail.

A tous les co-internes et amis que j'ai eu la chance de côtoyer durant ces longues années d'études : Mouff et Malika, Jaune et Catalina, Mymy et Flo, Marine, Marie-Fleur, Virginie, son troll et son nounours (dans l'ordre que tu veux), Guigui, Max, Rémy, Théo, Sarah, Chacha et Seb, Cassandra, Camille, Marie-Céleste, Marc, marraine et Quentin, Claudia, Thibault, Marina et Ben, Thomas, Yoann, Dâ-kho, Joevin, Alix, Cyril et Guillaume et tous les autres. Chacun d'entre vous m'aura apporté quelque chose, m'aura fait grandir. Avec vous j'ai travaillé, couru, grimpé, beaucoup ri, un peu (trop) bu, trop mangé, fêté la victoire à la coupe du monde de l'Ita... euh de la France, joué de la musique, dormi dans des BnB inquiétants, dormi dans des hôtels pas mieux, joué au foot... merci d'avoir rendu ces années merveilleuses. Vous avez tous, pour moi, une place particulière.

Au Dr Pierre Gaubert, médecin et ami, pour avoir initié le rêve d'un petit garçon.

Aux familles Coatriné et Peyrou pour m'avoir transmis l'amour de la musique et pour leur amitié sans faille. *La musique est sa passion, l'accordéon son violon d'Ingres.*

A tous les musiciens et acteurs de l'orchestre pour avoir partagé ensemble notre passion pour la musique.

A Mandine ! Pour tes éternels quarts d'heure bigourdans, ton amour de la grande cuisine américaine, ton soutien inébranlable et ton amitié.

Gwendal et Coco pour votre présence à tout instant, votre bonne humeur et votre immense amitié. Dire que tout ça a commencé entre un renard bleu et un ours(on) mal léché... Bon retour dans le sud !

A ma marraine et à ma famille au complet. Pour les trajets en train, en 4x4, en camping-car, pour le bon armagnac et le moins bon, pour la rhumgria et les *Rilès*, pour les culottes et autres sous-vêtements de chez Aubade... Merci pour ces moments !

A mes grands-parents. Papi, mamie, j'espère que vous êtes fiers de moi. Vous m'avez appris la valeur du travail, à aller toujours plus loin, à m'envoler toujours plus haut. Maintenant, il ne me reste plus qu'à piloter.

A mes frères. Il peut m'arriver, parfois, d'avoir sale caractère (parfois seulement...). Malgré ça, vous avez toujours été là. Merci de m'avoir soutenu, de m'avoir suivi à travers la France pour subir ma passion. Votre présence est, et a toujours été, primordiale à mes yeux. Merci à tous les 2, mes grands frères.

A mes parents. Les mots sont difficiles à trouver quand il s'agit de remercier ceux à qui vous devez tout. La liste serait trop longue et trop peu exhaustive. Je dirai juste une chose : vous êtes, et resterez, les meilleurs parents qu'un fils puisse rêver. Ce travail est en partie le vôtre. Je vous aime.

A Adélaïde. Ma chérie. Tu as eu la lourde charge de me supporter durant ces derniers mois. Et tu l'auras encore pendant longtemps je l'espère. Merci d'avoir été là, dans les moments faciles, et ceux qui l'étaient moins. Merci de m'avoir redonnée confiance quand je doutais, merci de m'avoir secouée quand je glandais, merci de t'être occupée d'absolument tout. Et surtout, merci pour ton amour. Je t'aime ma puce.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Liste des abréviations.....	18
Introduction	20
I. GENERALITES	21
I.1. Leucémie Aigüe Myéloïdes (LAM)	21
I.1.1. Définition	21
I.1.2. Epidémiologie.....	21
I.1.3. Etiologies.....	21
I.1.4. Diagnostic	23
I.1.4.1. Circonstances de découverte et manifestations cliniques.....	23
I.1.4.2. Diagnostic biologique	23
I.1.4.2.1. Cytologie	23
I.1.4.2.1.1. Hémogramme	24
I.1.4.2.1.2. Myélogramme	24
I.1.4.2.2. Cytométrie en flux (CMF).....	24
I.1.4.2.3. Cytogénétique	24
I.1.4.2.4. Biologie moléculaire (BM).....	25
I.1.5. Classification	25
I.1.6. Pronostic	26
I.1.7. Traitement	27
I.1.8. Détection de la maladie résiduelle	28
I.1.8.1. Quelques définitions.....	28
I.1.8.2. Impact clinique	29
I.1.8.3. Techniques	31
I.1.8.3.1. Biologie Moléculaire.....	32
I.1.8.3.2. Cytométrie en flux.....	33
I.2. Cytométrie en Flux (CMF)	34
I.2.1. Composition du cytomètre	34
I.2.1.1. Système fluide et focalisation hydrodynamique	34
I.2.1.2. Système optique	35
I.2.1.2.1. Excitation.....	35
I.2.1.2.2. Banc optique	36
I.2.1.3. Traitement du signal.....	37
I.2.2. Traitement des données	37
I.3. Cytométrie en Flux et Leucémie Aigüe Myéïde	40
I.3.1. Diagnostic	40
I.3.1.1. Identification des blastes	40
I.3.1.2. Caractérisation et orientation phénotypique	40
I.3.1.3. Notion de marqueur aberrant	41
I.3.2. Suivi	42
I.3.2.1. Approche LAIP : <i>Leukemia associated Immunophenotype</i>	42
I.3.2.2. Approche LSC : <i>Leukemic Stem Cell</i>	44
I.3.2.3. Intérêt des méthodes LAIP et LSC	46
II. OBJECTIFS.....	48
III. MATERIELS ET METHODES	49

III.1. Logiciels utilisés	49
III.2. Mise en place du nouveau panel.....	49
III.2.1. Choix des patients	49
III.2.2. Mode opératoire	49
III.3. Stratégie	50
III.3.1. Panel	50
III.3.2. Diagnostic.....	50
III.3.3. Suivi	51
III.4. Traitement des échantillons	51
III.5. Protocoles d'analyse appliqué à la MRD	52
III.5.1. Gating.....	52
III.5.2. LAIP	58
III.5.3. LSC	62
III.6. Moelles contrôles	64
III.6.1. Rôle des moelles contrôles.....	64
III.6.2. Choix des échantillons.....	64
III.6.3. Retraitement.....	65
III.6.3.1. Recueil des données brutes.....	65
III.6.3.2. Enregistrement des données	66
III.6.3.3. Script « R »	66
III.6.3.4. « Merge ».....	69
III.7. Evaluation de la MRD	69
III.7.1. Préambule	69
III.7.2. Détermination du (des) phénotype(s).....	70
III.7.2.1. LAIP	70
III.7.2.2. LSC.....	72
III.7.2.3. Notion de sensibilité et de significativité	73
III.7.3. Suivi	74
III.7.3.1. LAIP / <i>Different from Normal</i> (DfN).....	74
III.7.3.2. LSC.....	74
III.7.4. Expression des résultats.....	75
IV. RESULTATS.....	76
IV.1. Mise en place du nouveau panel LAM	76
IV.1.1. Echantillons.....	76
IV.1.2. Résultats	76
IV.2. Evaluation de la maladie résiduelle minimale	76
IV.2.1. Patients	76
IV.2.2. LAIP	77
IV.2.2.1. Description des LAIP	77
IV.2.2.2. Nombre d'évènements.....	80
IV.2.3. LSC.....	80
IV.2.3.1. Description des LSC	80
IV.2.3.2. Nombre d'évènements.....	81
IV.2.1. Exemples de détermination de la MRD par CMF.....	82
IV.3. Comparaison de l'évaluation de la MRD par CMF et par BM	94
V. DISCUSSION.....	100
V.1. Mise en place du panel.....	100

V.2. Patients	100
V.3. Seuil de significativité et sensibilité : problématiques techniques	100
V.4. Problématiques immunophénotypiques	102
V.5. Comparaison biologie moléculaire – cytométrie en flux	102
V.6. Problématiques financières	102
V.7. Problématiques informatiques	103
V.8. Revue des données.....	103
Conclusion	104
Références bibliographiques	105
Annexes	110
Serment De Galien.....	128

Table des illustrations

Figure 1. Incidence liée à l'âge des LAM aux Etats-Unis ²	21
Figure 2. Hypothèse du développement d'une leucémie myéloïde ³	22
Figure 3. Comparaison des incidences cumulées de rechute (CIR) selon la technique d'évaluation de la MRD utilisée : (A) Technique NGS (MRD positive en trait continu), (B) WT1 et RQ PCR (MRD positive en bleue), (C) Cytométrie en flux (MRD positive en jaune) ²⁰	30
Figure 4. Seuils de sensibilité d'évaluation de la MRD selon différentes techniques ¹⁷	31
Figure 5. Proportion de patients atteints de LAM présentant une cible spécifique de la leucémie, informative pour la détection de MRD par RT-qPCR selon l'âge ²³	32
Figure 6. Principe focalisation hydrodynamique ²⁵	34
Figure 7. Diffusion de la lumière. Le FSC est proportionnel à la taille, tandis que le SSC est proportionnel à la granularité cellulaire ou à la complexité interne ²⁶	35
Figure 8. Trois types de filtres utilisés en cytométrie de flux : passe-haut, passe-bas, passe-bande. ²⁵	36
Figure 9. Banc optique ²⁵	36
Figure 10. Schéma de fonctionnement d'un PMT ²⁷	37
Figure 11. Histogramme mono-paramétrique représentant l'intensité de fluorescence du CD45 en abscisse par rapport au nombre d'évènements acquis	37
Figure 12. Histogramme bi-paramétrique fenêtré sur la population lymphocytaire opposant le CD7+/-56 au CD19	38
Figure 13. Différence entre un dot-plot et un density-plot.	38
Figure 14. Fenêtrage des lymphocytes B CD19+. Etude des marqueurs CD38 et HLA DR sur la population sélectionnée	38
Figure 15. Dot-plot et density plot CD45/SS	39
Figure 16. Fenêtrage des blastes myéloïdes sur un histogramme SS / CD45 ²⁹	40
Figure 17. Intensité d'expression physiologique de différents marqueurs au cours de la maturation granuleuse ³¹	41
Figure 18. Fréquences de phénotypes aberrants dans la moelle osseuse de sujets sains. MM : marqueur myéloïde ³⁵	43
Figure 19. Effets du taux de LSC au diagnostic sur la survie globale. En bleu clair LAM CD34-, avec un taux de LSC évalué à 0% ; en gris clair, LAM CD34+, avec un taux de LSC faible inférieur à 0.03% ; en bleu foncé, LAM CD34+, avec un taux de LSC élevé supérieur à 0.03% ⁴¹	44
Figure 20. Apport de la combinaison des stratégies LAIP et LSC pour la détection de la MRD évalué chez 91 patients ; (A) Survie sans rechute (RFS) évaluée selon la stratégie LSC ; (B) RFS évaluée selon la stratégie LAIP ; (C) RFS évaluée par la combinaison des 2	

stratégies ; Seuils utilisés pour la détection de la MRD : 0.1%, pour l'évaluation des LSC : 0.0001% ⁴⁶	46
Figure 21. Apport de la combinaison des stratégies LAIP et LSC pour la détection de la MRD évalué chez 242 patients ; Seuils utilisés pour la détection de la MRD : 0.1%, pour l'évaluation des LSC : 0.03% ⁴¹	47
Figure 22. Présentation des 10 histogrammes bi-paramétriques du tube 1 servant à vérifier la bonne distribution des anticorps dans le tube	52
Figure 23. Fenêtrage des cellules vivantes.....	53
Figure 24. Fenêtrage des blastes et des granuleux	53
Figure 25. Fenêtrage des cellules CD34+	54
Figure 26. Fenêtrage monocytes et lymphocytes sur le tube 1	54
Figure 27. Fenêtrage des lymphocytes et des monocytes dans le tube 2	55
Figure 28. Fenêtrage des lymphocytes et des monocytes dans le tube 3	55
Figure 29. Fenêtrage des hémotogones sur le tube 1.....	55
Figure 30. Fenêtrage des hémotogones sur le tube 2.....	56
Figure 31. "Boîtes" P6, P7, P8.....	56
Figure 32. Histogramme bi-paramétrique fenêtré sur tous les évènements d'une moelle normale marquée avec un anticorps anti-CD38 non couplé à un fluorochrome montrant une négativité complète de toutes les cellules pour le marqueur CD38	57
Figure 33. Mise en place du seuil P7 / P8 grâce aux hémotogones.....	57
Figure 34. Mise en place du seuil CD34+	57
Figure 35. Histogrammes bi-paramétriques CD34 / CD38 permettant le fenêtrage de la population CD34+ / CD38-	58
Figure 36. Histogrammes bi-paramétriques montrant les différentes populations leucocytaires colorisées	58
Figure 37. Histogrammes CD117/CD34 permettant la sélection des blastes myéloïdes ainsi que la recherche de marqueurs aberrants. A gauche : patient atteint de LAM présentant une perte d'expression du CD34 sur une partie de la population blastique. A droite : pool de moelle normale.....	59
Figure 38. Histogrammes permettant la recherche de blastes présentant un phénotype aberrant dans le tube 1.....	60
Figure 39. Histogrammes permettant la définition du LAIP : CD34- CD117+ CD38+ CD33++ HLA DR+.....	60
Figure 40. Tableau de résultats du LAIP pour le tube 1	61
Figure 41. Stratégie d'analyse pour la détection des LSC.....	62
Figure 42. Exemple de LSC trouvées sur le tube 1.....	63
Figure 43. Tableau de synthèse LSC-T1	64

Figure 44. Exemples de représentation graphique CD45/SS de 3 échantillons médullaires contrôles sur "R".....	67
Figure 45. Représentation graphique de la zone éliminée après retraitement par "R"	68
Figure 46. Fenêtre TIME permettant la sélection une à une des différentes moelles contrôles	69
Figure 47. Exemple de détermination d'un LAIP	70
Figure 48. Application du "masque-LAIP" à un pool de moelles contrôles	71
Figure 49. Exemple de recherche de LSC. Phénotype retenu : CD34+, CD38-, Mix + (CD97, CLL-1, TIM-3), CD19-, CD123+, CD45RA+	72
Figure 50. Application du "masque-LSC" au pool de moelles contrôles	73
Figure 51. PATIENT 4 – RECHERCHE DE LAIP par DfN : Histogrammes d'intérêt permettant l'évaluation du taux de blastes LAIP au diagnostic et au suivi. De gauche à droite : « masque » LAIP appliqué aux moelles contrôles ; évaluation de la MRD ; la MRD4 correspond à un échantillon médullaire post-allogreffe	82
Figure 52. PATIENT 6 – RECHERCHE DE LAIP : Histogrammes d'intérêt permettant l'évaluation du taux de blastes LAIP au diagnostic et au suivi. De gauche à droite : « masque » LAIP appliqué aux moelles contrôles ; évaluation diagnostique ; évaluation de la MRD	83
Figure 53. Patient 6 - MRD 3 - Hématogones	84
Figure 54. PATIENT 11 – RECHERCHE DE LAIP : Histogrammes d'intérêt permettant l'évaluation du taux de blastes LAIP au diagnostic et au suivi. De gauche à droite : « masque » LAIP appliqué aux moelles contrôles ; évaluation diagnostique ; évaluation de la MRD ; la MRD3 correspond à un échantillon médullaire post-allogreffe	85
Figure 55. PATIENT 11 – RECHERCHE DE LSC : Histogrammes d'intérêt permettant l'évaluation du taux de LSC au diagnostic et au suivi pour le patient 11. De haut en bas : évaluation diagnostique ; évaluation de la MRD1 puis 2 ; la MRD3 correspond à un échantillon médullaire post-allogreffe. Marqueurs d'intérêt : CD45RA, Mix, CD123 au diagnostic	86
Figure 56. PATIENT 12 – RECHERCHE DE LAIP : Histogrammes d'intérêt permettant l'évaluation du taux de blastes LAIP au diagnostic et au suivi. De gauche à droite : « masque » LAIP appliqué aux moelles contrôles ; évaluation diagnostique ; évaluation de la MRD ; le dernier histogramme est fenêtré sur les lymphocytes et permet la détermination du seuil de positivité pour le marqueur CD19	88
Figure 57. Patient 12 - Marquage CD19 des lymphocytes	88
Figure 58. PATIENT 13 – RECHERCHE DE LAIP par DfN : Histogrammes d'intérêt permettant l'évaluation du taux de blastes LAIP au diagnostic et au suivi. De gauche à droite : « masque » LAIP appliqué aux moelles contrôles ; évaluation de la MRD ; la MRD3 a été évaluée sur échantillon sanguin.....	89
Figure 59. PATIENT 14 – RECHERCHE DE LAIP : Histogrammes d'intérêt permettant l'évaluation du taux de blastes LAIP au diagnostic et au suivi. De gauche à droite :	

« masque » LAIP appliqué aux moelles contrôles ; évaluation diagnostique ; évaluation de la MRD.....	90
Figure 60. PATIENT 26 – RECHERCHE DE LAIP : Histogrammes d'intérêt permettant l'évaluation du taux de blastes LAIP au diagnostic et au suivi. De gauche à droite : « masque » LAIP appliqué aux moelles contrôles ; évaluation diagnostique ; évaluation de la MRD 1, 2, 3.....	91
Figure 61. PATIENT 26 – RECHERCHE DE LSC : Histogrammes d'intérêt permettant l'évaluation du taux de LSC au diagnostic et au suivi pour le patient 26. De haut en bas : évaluation diagnostique ; évaluation de la MRD1, 2 et 3. Marqueur d'intérêt : CD45RA.....	92
Figure 62. Evolution du taux de MRD en BM (WT1) et CMF - Patient 3	95
Figure 63. Evolution du taux de MRD en BM (WT1) et CMF - Patient 4	95
Figure 64. Evolution du taux de MRD en BM (WT1) et CMF - Patient 11.....	96
Figure 65. Evolution du taux de MRD en BM (AML1-ETO) et CMF - Patient 12	96
Figure 66. Evolution du taux de MRD en BM (AML1-ETO) et CMF - Patient 12	97
Figure 67. Evolution du taux de MRD en BM (AML1-ETO) et CMF - Patient 14	98
Figure 68. Evolution du taux de MRD en BM (NPM1-A) et CMF - Patient 21.....	98
Figure 69. Evolution du taux de MRD en BM (NPM1-A) et CMF - Patient 24.....	99
Figure 70. Seuil de significativité de la MRD par la stratégie LAIP ³⁸	101

Table des tableaux

Tableau 1. Facteurs de risque associés au développement d'une LAM ⁴	22
Tableau 2. Stratification pronostique des LAM selon le profil cytogénétique. ⁷	25
Tableau 3. Classification OMS 2016 des Leucémies Aiguës Myéloïdes et des néoplasies associées ⁵	26
Tableau 4. Stratification pronostique selon les anomalies cytogénétiques et moléculaires dans les LAM ¹²	27
Tableau 5. Critères de définition de la réponse au traitement ⁷	29
Tableau 6. Revue de la littérature montrant les valeurs pronostiques de l'évaluation de la MRD selon différentes techniques ²¹	30
Tableau 7. Cibles moléculaires pour la détection de la MRD ¹¹	32
Tableau 8. Expression de marqueurs cellulaires dans le diagnostic de LAM ⁷	41
Tableau 9. Incidence des LAIP dans les LAM ¹¹	42
Tableau 10. Recommandations de l'ELN dans l'évaluation de la MRD par CMF ³⁸	43
Tableau 11. Marqueurs utilisables en cytométrie de flux pour l'identification des LSC ¹⁰	45
Tableau 12. Panel LAM mis en place au laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges	50
Tableau 13. Récapitulatif moelles contrôles	65
Tableau 14. LAIP identifiés sur le tube 1 par patient.....	77
Tableau 15. Histogrammes montrant des exemples de LAIP retrouvés chez différents patients comparés aux même histogrammes issus des moelles contrôles	78
Tableau 16. Nombre d'évènements CD45+ acquis lors de la recherche de LAIP	80
Tableau 17. Nombre de d'évènements CD45+ acquis lors de la recherche de LSC	81
Tableau 18. Comparaison BM vs CMF	94

Liste des abréviations

ADN	Acides Désoxyribonucléiques
ALFA	Acute Leukemia French Association
AREB	Anémie Réfractaire avec Excès de Blastes
ARN	Acides Ribonucléiques
BIG	Backbone Inter Group
BM	Biologie moléculaire
CD	Cluster of Differentiation
CIVD	Coagulation IntraVasculaire Disséminée
CMF	Cytométrie en Flux
DfN	Different from Normal
ELN	European Leukemia Net
FAB	French-American-British
FCS	Flow Cytometry Standard
FILO	French Innovative Leukemia Organization
FS ou FSC	Forward Scatter
GEIL	Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies
GTLLF	Groupe de Travail Leucémies Lymphomes Francophone
HSC	Haematopoietic Stem Cell
LA	Leucémie Aiguë
LAIP	Leukemia Associated ImmunoPhenotype
LAL	Leucémie Aiguë Lymphoïde
LAM	Leucémie Aiguë Myéloïde
LMD	List Mode Data
LOD	Limit Of Detection
LSC	Leukemia Stem Cell
MFI	Mean Fluorescence Intensity

MPAL	Mixed Phenotype Acute Leukemia
MRD	Minimal Residual Disease
ND	Non Détectable
NGS	Next Generation Sequencing
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Reaction Chain
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMT	Photomultiplicateur
PMT	Photomultiplicateur
PTI	Purpura Thrombopénique Idiopathique
RC	Rémission Complète
RFS	Relapse Free Survival
RT-qPCR	Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction
SS ou SSC	Side Scatter

Introduction

Les leucémies aiguës myéloblastiques constituent un groupe hétérogène d'hémopathies malignes. Elles sont caractérisées par la prolifération clonale de précurseurs myéloïdes, appelés blastes ou myéloblastes. Ce groupe d'hémopathies touche principalement les personnes âgées et est responsable d'un grand nombre de décès.

La médecine se dirigeant aujourd'hui vers des thérapeutiques de plus en plus personnalisées, une évaluation de la réponse aux traitements est indispensable afin d'adapter voire d'intensifier ceux-ci. La maladie résiduelle estimant l'efficacité de ces derniers peut être définie comme le taux de cellules malignes persistantes estimé à différents points du traitement.

L'évolution des techniques au laboratoire a permis la définition d'un nouveau concept, celui de maladie résiduelle *minimale* (MRD pour *minimal residual disease*). Alors que la maladie résiduelle est évaluée selon un point de vue cytologique, la MRD est déterminée par des techniques plus sensibles permettant de détecter une cellule leucémique parmi 10^3 , voire 10^6 leucocytes. Les approches par *PCR* (*Polymerase Reaction Chain*), en biologie moléculaire, sont devenues le premier recours pour ce type d'évaluation. Elles nécessitent cependant des mutations et autres changements génétiques au sein des cellules recherchées, présents en général chez les patients les plus jeunes, mais souvent absents pour les autres.

Parmi les différentes techniques disponibles, la cytométrie en flux permet une séparation rapide et fiable des populations cellulaires. Les blastes pathologiques sont caractérisés par l'expression anormale de certains marqueurs formant ainsi des phénotypes aberrants. La description de ces combinaisons immunologiques au diagnostic peut ensuite être utilisée lors du suivi pour estimer la valeur de la MRD.

La mise au point d'un nouveau panel au CHU de Limoges permettant l'immunophénotypage des leucémies aiguës myéloïdes au diagnostic et au suivi a été effectuée dans la première étape de ce travail. La seconde partie se consacre quant à elle, à la mise en place de nouveaux protocoles d'analyse permettant l'évaluation de la maladie résiduelle, objectif principal de ce projet. Dans une volonté d'harmonisation des pratiques en cytométrie en flux, les recommandations européennes mais aussi avec celles du groupe français ALFA-FILO (*Acute Leukemia French Association – French Innovative Leukemia Organization*) émises à travers deux études cliniques (BIG et ALFA-1200) ont été respectées pour la mise en place de ces approches. Enfin, un rassemblement des données immunophénotypiques et moléculaires a permis une comparaison des techniques dans l'évaluation de la MRD.

I. GENERALITES

I.1. Leucémie Aigüe Myéloïdes (LAM)

I.1.1. Définition

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est un ensemble de proliférations malignes de cellules progénitrices hématopoïétiques de nature myéloïde appelées « blastes ». Ces derniers sont caractérisés par la perte de leur capacité de différenciation, aboutissant à leur accumulation dans la moelle, le sang et potentiellement dans d'autres organes.¹

I.1.2. Epidémiologie

Les LAM sont les leucémies aiguës les plus courantes avec une incidence estimée de 3,8 cas pour 100 000 à 17,9 cas pour 100 000 personnes pour les plus de 65 ans. L'âge médian de présentation de la maladie est de 70 ans avec 3 hommes pour 2 femmes affectés (Figure 1).¹

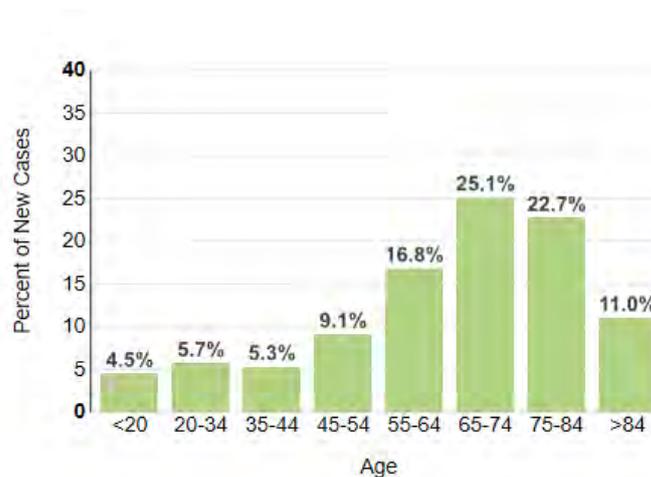


Figure 1. Incidence liée à l'âge des LAM aux Etats-Unis²

I.1.3. Etiologies

Dès les années 50-60, la notion de cellule souche liée à l'origine et à l'évolution de la leucémie aiguë myéloïde est évoquée. L'hypothèse formulée est que cette cellule, suite à une ou plusieurs mutations, donne naissance à une entité fonctionnellement définie comme une cellule souche leucémique (ou Leukemia Stem Cell ou LSC). Les cellules souches normales (ou Haematopoietic Stem Cell ou HSC) se différencient dans la lignée hématopoïétique, donnant naissance à tous les éléments figurés du sang. Les LSC peuvent également suivre cette voie, donnant des cellules portant le(s) défaut(s) acquis, ou peuvent bloquer leur maturation et s'accumuler en tant que cellules progénitrices immatures, les blastes (Figure 2).³

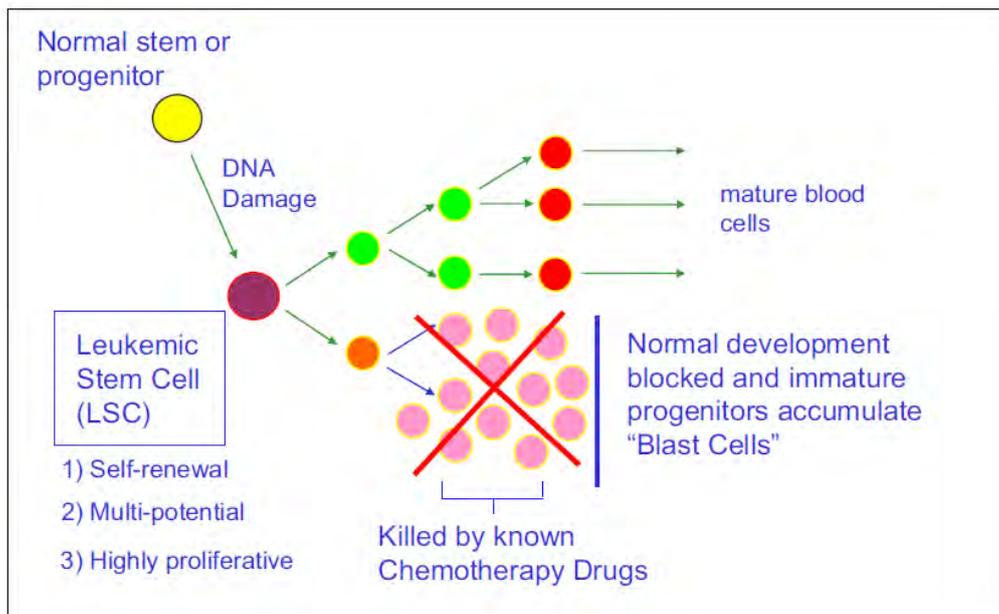


Figure 2. Hypothèse du développement d'une leucémie myéloïde³

De nombreux facteurs de risques ont été associés au développement des LAM (Tableau 1). Ils regroupent l'âge, les antécédents de maladie hématologique, les mutations génétiques, les expositions à des virus, des radiations, des produits chimiques, ou à des traitements types chimiothérapie.⁴

Tableau 1. Facteurs de risque associés au développement d'une LAM⁴

Selected Risk Factors Associated With Acute Myeloid Leukemia	
Genetic disorders	Down syndrome Klinefelter syndrome Patau syndrome Ataxia telangiectasia Shwachman syndrome Kostman syndrome Neurofibromatosis Fanconi anemia Li-Fraumeni syndrome
Physical and chemical exposures	Benzene Drugs such as pipobroman Pesticides Cigarette smoking Embalming fluids Herbicides
Radiation exposure	Nontherapeutic, therapeutic radiation
Chemotherapy	Alkylating agents Topoisomerase-II inhibitors Anthracyclines Taxanes

I.1.4. Diagnostic

I.1.4.1. Circonstances de découverte et manifestations cliniques

Dans la LAM, les manifestations cliniques reflètent l'accumulation de cellules malignes, peu voire non différenciées principalement dans la moelle osseuse et le sang périphérique, plus rarement dans d'autres organes. La majorité des patients présente une symptomatologie d'intensité variable, liée aux cytopénies :

- Syndrome anémique,
- Syndrome infectieux,
- Syndrome hémorragique (thrombopénie).

Une altération de l'état général (fatigue, anorexie, perte de poids) ainsi que l'absence de syndrome tumoral sont généralement observées.

Les complications sont nombreuses et variables, selon l'intensité de la leucocytose (entraînant une leucostase), la présence ou non d'une coagulopathie de consommation (CIVD/fibrinolyse), les localisations extra-médullaires (neurologique)...⁵

I.1.4.2. Diagnostic biologique

I.1.4.2.1. Cytologie

Lors de la lecture d'une lame de sang ou de moelle avec suspicion de leucémie aiguë, le cytologiste est en première ligne. Il est en charge de l'affirmation ou de l'infirmité du diagnostic ainsi que de l'orientation phénotypique de la pathologie si ce dernier se révèle positif.

La cellule recherchée, ou blaste, est une cellule de taille variable (petite à grande), avec un rapport nucléo/cytoplasmique élevé. Elle présente un noyau souvent nucléolé, à chromatine fine, témoignant de sa capacité de synthèse accrue et un cytoplasme uniformément basophile⁶. Le taux de 20 % de blastes dans la moelle ou dans le sang périphérique suffit à affirmer le diagnostic de leucémie aiguë.⁷ Lors de l'examen cytologique, l'orientation myéloïde de la pathologie se fera selon le contexte clinico-biologique :

- L'âge du patient (prévalence plus élevée chez la personne âgée)⁴
- La présence de granulations myéloïdes et/ou de corps d'Auer dans le cytoplasme des blastes
- La notion de signes de dysplasie sur les lignées médullaires
- Une activité myéloperoxydase spécifique des blastes myéloïdes peut être mise en évidence par une coloration particulière.⁶

I.1.4.2.1.1. Hémogramme

Il représente l'examen d'orientation majeur du diagnostic. On retrouve :

- Une anémie presque constante, de sévérité variable, normocytaire ou parfois macrocytaire (composante myélodysplasique associée), arégénérative
- Une thrombopénie fréquente, parfois < 10G/L
- Une leucocytose variable, allant de la leucopénie (< 3 G/L) à l'hyperleucocytose majeure (> 100 G/L), avec une neutropénie (< 1.5 G/L)
- La présence de cellules blastiques est variable d'une LA à l'autre⁸.

I.1.4.2.1.2. Myélogramme

La ponction médullaire a pour objectif d'affirmer le diagnostic et de proposer une première orientation phénotypique de la maladie. Elle est indispensable, et ce même si des blastes sont présents dans le sang.

Le plus souvent, on trouve une moelle richement cellulaire, pauvre en mégacaryocytes et avec au moins 20% de blastes (pouvant aller jusqu'à 100%).⁸

I.1.4.2.2. Cytométrie en flux (CMF)

La cytométrie en flux est une étape majeure de la stratégie diagnostique des LAM notamment grâce à sa rapidité et son accessibilité. L'immunophénotypage par CMF vise les objectifs suivants :

- Déterminer l'appartenance à une lignée cellulaire, et préciser le niveau de différenciation afin d'affiner le diagnostic^{7,9},
- Détecter les leucémies aiguës biphénotypiques ou MPAL (Mixed Phenotype Acute Leukemia)⁷,
- Identifier la présence de certains marqueurs au sein des blastes en vue de l'utilisation d'une thérapeutique ciblée par anticorps monoclonaux¹⁰, comme le Mylotarg (anti-CD33)
- Détecter le profil antigénique aberrant des blastes pouvant se révéler utile pour suivre la maladie résiduelle¹¹

I.1.4.2.3. Cytogénétique

Depuis la révision 2016 de la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la cytogénétique (conventionnelle et hybridation *in situ*) est devenue capitale dans la prise en charge de la pathologie. Elle rend possible une meilleure stratification des LAM, conférant un pronostic plus précis et des stratégies thérapeutiques plus adaptées. Certains types de LAM disposant de mutations génétiques particulières (t(15;17), t(8;21), inv(16), ou t(16;16)) sont exemptées du seuil cytomorphologique de 20% de blastes (Tableau 2).^{7,12}

Tableau 2. Stratification pronostique des LAM selon le profil cytogénétique.⁷

Risk category*	Genetic abnormality
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> ^{low†} Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
Intermediate	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> ^{high†} Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> ^{low†} (without adverse-risk genetic lesions) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> ‡ Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i> -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) Complex karyotype,§ monosomal karyotypell Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> ^{high†} Mutated <i>RUNX1</i> ¶ Mutated <i>ASXL1</i> ¶ Mutated <i>TP53</i> #

I.1.4.2.4. Biologie moléculaire (BM)

Les mutations retrouvées en biologie moléculaire ont plusieurs rôles dans la prise en charge et le suivi des LAM. Elles permettent d'une part un affinement de la classification pronostique (voir I.1.6 Pronostic) et d'autre part, elles ont une utilité dans la détection de la maladie résiduelle (voir I.1.8 Détection de la maladie résiduelle). De nouvelles thérapies sont à l'étude, utilisant les différentes mutations moléculaires comme cible thérapeutique (inhibiteurs de FLT3-ITD, d'IDH1/IDH2...) ¹².

I.1.5. Classification

La classification FAB (French-American-British) représente la première tentative pour distinguer les différents types de LAM. Etablie en 1976, elle définit huit sous-types (M0 jusqu'à M7) basée sur des critères morphologiques et cytochimiques⁶. En 2001, l'Organisation Mondiale de la Santé présente une nouvelle classification intégrant les avancées faites dans le diagnostic et le suivi des LAM. Elle a été révisée en 2008 et en 2016. Elle se base désormais sur l'association de critères cliniques, morphologiques, immunologiques, cytogénétiques et moléculaires, et définit ainsi six entités majeures¹² (Tableau 3) :

- LAM avec anomalies génétiques récurrentes
- LAM avec des critères de myélodysplasie
- LAM secondaire à un traitement
- LAM sans critère spécifié, reprenant les caractéristiques morphologiques de la classification FAB
- Sarcome myéloïde
- Prolifération myéloïde liée au syndrome de Down

Tableau 3. Classification OMS 2016 des Leucémies Aiguës Myéloïdes et des néoplasies associées⁵

Acute myeloid leukemia (AML) and related neoplasms
AML with recurrent genetic abnormalities
AML with t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
APL with <i>PML-RARA</i>
AML with t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
AML with t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
<i>Provisional entity: AML with BCR-ABL1</i>
AML with mutated <i>NPM1</i>
AML with biallelic mutations of <i>CEBPA</i>
<i>Provisional entity: AML with mutated RUNX1</i>
AML with myelodysplasia-related changes
Therapy-related myeloid neoplasms
AML, NOS
AML with minimal differentiation
AML without maturation
AML with maturation
Acute myelomonocytic leukemia
Acute monoblastic/monocytic leukemia
Pure erythroid leukemia
Acute megakaryoblastic leukemia
Acute basophilic leukemia
Acute panmyelosis with myelofibrosis
Myeloid sarcoma
Myeloid proliferations related to Down syndrome
Transient abnormal myelopoiesis (TAM)
Myeloid leukemia associated with Down syndrome

I.1.6. Pronostic

L'évaluation précise du pronostic est centrale dans la prise en charge de la LAM. Les facteurs pronostiques ont pour but la stratification des patients selon le risque de résistance au traitement ou encore selon la mortalité qui lui est associée. Ils orientent le choix du médecin entre les différentes thérapeutiques disponibles : traitement standard ou d'intensité augmentée, chimiothérapie de consolidation ou greffe de cellules souches, utilisation de thérapeutiques conventionnelles ou novatrices. Ils sont d'ordre clinique (âge, performans status), biologique (taux de plaquette, de créatinine, d'albumine) et sont également dépendant du type de LAM (LAM secondaire à un traitement ou à une hémopathie primitive de pronostic défavorable)¹².

L'apport de la cytogénétique a révolutionné la prise en charge. Elle constitue le seul facteur pronostic d'intérêt dans l'obtention de la rémission complète et la survie globale. Partant de cette affirmation, les cas de LAM peuvent être stratifiés en groupes de risque pronostic favorable, intermédiaire, ou défavorable, basé sur leur seul profil cytogénétique^{1,7,12} (Tableau 2).

La découverte de mutations de gènes associés à certains profils cytogénétiques dans les LAM a permis de redéfinir et d'affiner cette stratification. La combinaison d'anomalies moléculaires et cytogénétiques peut faire changer le statut pronostic d'un patient. Par exemple, les patients présentant une t(8;21) sont de pronostic favorable. La présence d'une mutation c-KIT associée

augmente significativement le risque de rechute et diminue la survie globale à des niveaux comparables à ceux des patients avec un risque intermédiaire¹² (Tableau 4).

Tableau 4. Stratification pronostique selon les anomalies cytogénétiques et moléculaires dans les LAM¹²

Prognostic-risk group	Cytogenetic profile alone	Cytogenetic profile and molecular abnormalities
Favorable	t(8:21)(q22;q22) inv(16)(p13;q22) t(15;17)(q22;q12)	t(8:21)(q22;q22) with no c-KIT mutation inv(16)(p13;q22) t(15;17)(q22;q12) Mutated NPM1 without FLT3-ITD (CN-AML) Mutated biallelic CEBPA (CN-AML)
Intermediate	CN-AML t(9;11)(p22;q23) Cytogenetic abnormalities not included in the favorable or adverse prognostic risk groups	t(8:21)(q22;q22) with mutated c-KIT CN-AML other than those included in the favorable or adverse prognostic group t(9;11)(p22;q23) Cytogenetic abnormalities not included in the favorable or adverse prognostic risk groups
Adverse	inv(3)(q21q26.2) t(6;9)(p23;q34) 11q abnormalities other than t(9;11) -5 or del(5q) -7 Complex karyotype	TP53 mutation, regardless of cytogenetic profile CN with FLT3-ITD CN with DNMT3A CN with KMT2A-PTD inv(3)(q21q26.2) t(6;9)(p23;q34) 11q abnormalities other than t(9;11) -5 or del(5q) -7 Complex karyotype

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; ITD, internal tandem duplications.

Additionnées au profil génétique du diagnostic, les informations obtenues durant la prise en charge du patient, et notamment le taux de maladie résiduelle après la première phase du traitement (induction), jouent un rôle de plus en plus important dans la réévaluation pronostique. Les patients déclarés en rémission complète à ce stade ont une chance de survie supérieure à ceux présentant une résistance au traitement¹².

I.1.7. Traitement

La stratégie thérapeutique générale chez les patients atteints de LAM n'a pas changé depuis environ 30 ans. L'évaluation au diagnostic détermine la stratégie thérapeutique.

Phase d'induction

L'objectif de la phase d'induction est d'obtenir la rémission complète (RC). La cytarabine en perfusion continue avec une anthracycline reste le pilier du traitement d'induction. Une réponse complète est obtenue chez 60 à 85% des adultes de moins de 60 ans tandis que chez les patients plus âgés, les taux de RC sont inférieurs (40 à 60%). L'âge avancé seul ne doit pas être une raison d'inéligibilité au traitement intensif initial. La prise en compte du patient dans sa globalité est nécessaire pour déterminer la stratégie thérapeutique : facteurs pronostiques liés à la maladie (anomalies cytogénétiques), comorbidités associées, âge...¹³⁻¹⁶

Phase de consolidation

La phase de consolidation inclut deux stratégies : la chimiothérapie conventionnelle et la greffe de cellules souches hématopoïétiques. Le choix de l'une ou l'autre des voies thérapeutiques dépend principalement du profil de risque génétique leucémique, des scores aux échelles établies prédisant le risque de décès lié au traitement et des facteurs spécifiques associés à la transplantation chez le patient.

Actuellement, il est généralement recommandé, pour les patients présentant un risque favorable selon l'European Leukemia Net (ELN), ainsi qu'un bon état général, de recevoir des cycles répétés de cytarabine.

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques constitue le traitement antinéoplasique le plus puissant en raison du conditionnement cytoréducteur avant transplantation et de l'effet immunologique anti-leucémique du greffon contre la leucémie. Elle est réservée aux patients qui ne sont pas susceptibles d'avoir une rémission complète prolongée avec des approches conventionnelles.

Tous les patients, et notamment ceux présentant un haut risque selon l'ELN, peuvent bénéficier de thérapeutiques expérimentales proposées par l'intermédiaire de divers protocoles de recherche.¹³⁻¹⁶

Traitement des patients non éligibles à la chimiothérapie intensive

Le traitement des patients âgés ou fragiles est principalement composé de soins de support (incluant l'hydroxyurée), de faibles doses de cytarabine et, plus récemment, d'agents déméthylés (décitabine et azacytidine). A l'heure actuelle, aucun arbre décisionnel n'est validé pour les patients ne pouvant suivre une chimiothérapie classique. En pratique clinique, l'âge, l'état général, les comorbidités, les souhaits du patient... orientent la décision thérapeutique. Pour exemple, des doses faibles de cytarabine induisent une réponse dans 15 à 20 % des patients, mais la médiane de survie est de seulement 5 à 6 mois.¹³⁻¹⁶

I.1.8. Détection de la maladie résiduelle

I.1.8.1. Quelques définitions

Depuis 1961¹⁷, l'évaluation du traitement d'une LAM est basée sur un examen cytomorphologique de la moelle osseuse pratiqué à différents moments du schéma thérapeutique. La rémission complète (RC) se définit par :

- Une blastose médullaire inférieure à 5% sans corps d'Auer,
- L'absence de blastes circulants,
- Une absence de localisation extra-médullaire
- Un taux de polynucléaires neutrophiles supérieur à 1,0 G/L
- Un taux de plaquettes supérieur à 100 G/L

L'analyse cytologique, bien qu'étant un premier pas dans l'évaluation de la maladie résiduelle, ne permet pas une quantification assez précise et sensible du taux de blastes persistant chez le patient atteint de LAM. C'est pourquoi, dans les années 1980, le terme de **maladie minimale résiduelle** (ou minimal residual disease ou MRD) a été proposé pour distinguer la maladie résiduelle évaluée morphologiquement de celle détectée par des techniques plus sensibles.¹⁷

La définition de la RC a ensuite été complétée par l'ELN 2017 par l'ajout d'un critère traduisant la présence (RC MRD+) ou l'absence (RC MRD-) de marqueurs génétique ou moléculaire ou immunophénotypique témoignant de la persistance ou non d'une population blastique⁷ (Tableau 5).

Tableau 5. Critères de définition de la réponse au traitement⁷

Category	Definition	Comment
Response		
CR without minimal residual disease (CR _{MRD-})	If studied pretreatment, CR with negativity for a genetic marker by RT-qPCR, or CR with negativity by MFC	Sensitivities vary by marker tested, and by method used; therefore, test used and sensitivity of the assay should be reported; analyses should be done in experienced laboratories (centralized diagnostics)
Complete remission (CR)	Bone marrow blasts <5%; absence of circulating blasts and blasts with Auer rods; absence of extramedullary disease; ANC $\geq 1.0 \times 10^9/L$ (1000/ μ L); platelet count $\geq 100 \times 10^9/L$ (100 000/ μ L)	MRD ⁺ or unknown
CR with incomplete hematologic recovery (CR _i)	All CR criteria except for residual neutropenia ($<1.0 \times 10^9/L$ [1000/ μ L]) or thrombocytopenia ($<100 \times 10^9/L$ [100 000/ μ L])	
Morphologic leukemia-free state (MLFS)	Bone marrow blasts <5%; absence of blasts with Auer rods; absence of extramedullary disease; no hematologic recovery required	Marrow should not merely be "aplastic"; at least 200 cells should be enumerated or cellularity should be at least 10%
Partial remission (PR)	All hematologic criteria of CR; decrease of bone marrow blast percentage to 5% to 25%; and decrease of pretreatment bone marrow blast percentage by at least 50%	Especially important in the context of phase 1-2 clinical trials

I.1.8.2. Impact clinique

Les objectifs de la surveillance de la MRD sont multiples :

- Confirmer ou infirmer la rémission complète avec une sensibilité plus importante que la cytologie par la négativation ou la non-détection des marqueurs d'intérêt,
- Evaluer l'efficacité du traitement par la cinétique de décroissance,
- Détecter les cas présentant un risque élevé de rechute par l'augmentation du taux des différents marqueurs.

L'évaluation de la MRD permet une réévaluation du pronostic ainsi qu'une meilleure prise en charge thérapeutique du patient.¹⁸

Une stratification des patients (MRD positive vs MRD négative) peut également être effectuée. Dans le cadre d'essais cliniques randomisés, celle-ci peut être utilisée afin de définir l'efficacité relative des thérapeutiques expérimentales dans les sous-groupes pronostiques de LAM.

Plusieurs études démontrent qu'une MRD positive est toujours significativement associée à la rechute, et ce quelle que soit la technique utilisée ou le moment du prélèvement (post-induction, post-consolidation) (Figure 3). L'utilisation clinique est cependant délicate. D'une part les sensibilités et spécificités des différents marqueurs utilisés ne sont pas optimales (un résultat positif ne prédit pas systématiquement une rechute et l'inverse est également vrai) et d'autre part parce que les seuils décisionnels, les techniques et les moments clés du traitement où la MRD est réalisée sont variables d'une étude à l'autre ; une homogénéisation des pratiques au niveau européen, voire international, demeure donc nécessaire.¹⁸⁻²⁰

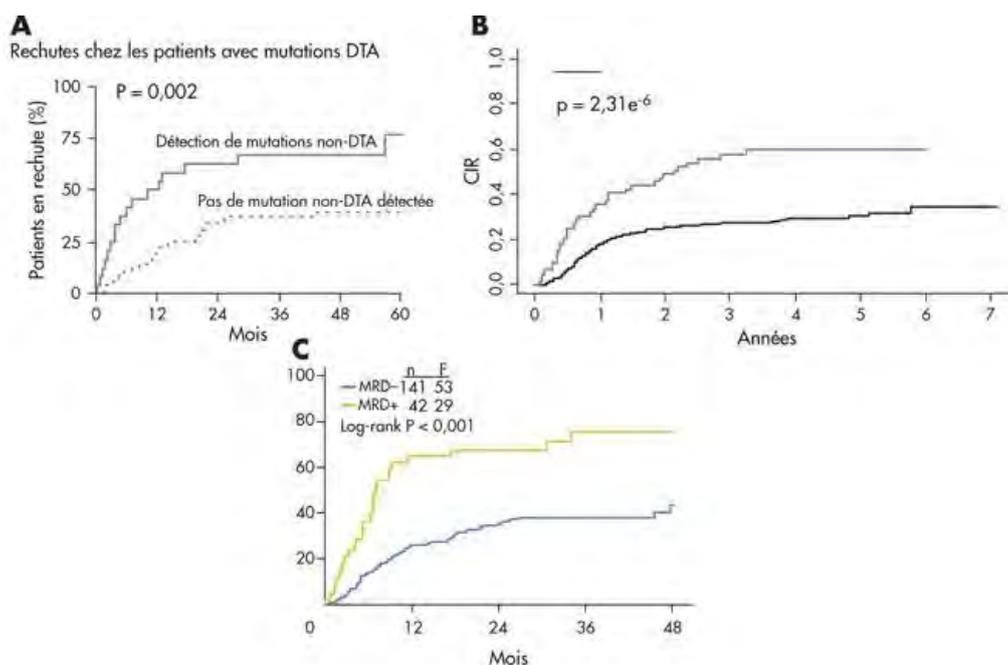


Figure 3. Comparaison des incidences cumulées de rechute (CIR) selon la technique d'évaluation de la MRD utilisée : (A) Technique NGS (MRD positive en trait continu), (B) WT1 et RQ PCR (MRD positive en bleue), (C) Cytométrie en flux (MRD positive en jaune) ²⁰

Différentes méthodes analytiques d'évaluation de la MRD ont été testées dans plusieurs études. Il en ressort de manière globale qu'une MRD non détectable, aux seuils de sensibilité respectifs des différentes techniques, diminue le risque de rechute et améliore la survie globale.²¹ (Tableau 6)

Tableau 6. Revue de la littérature montrant les valeurs pronostiques de l'évaluation de la MRD selon différentes techniques²¹

Technique	Limits of Detection	Timing of MRD measurement	Clinically relevant MRD cutoff	Correlated outcome reported	Number of patients analyzed	Reference
Multi-color flow cytometry	Variable (dependent on LAIP)	1st CR after 2 induction cycles	<0.1%	Lower risk of relapse	183	Terwijn et al. [26] Freeman et al. [25]
		1st CR after 2 induction cycles	<0.1%	Lower risk of relapse Improved 3 year OS	279	
		1st CR after consolidation	<0.035%	Lower risk of relapse, Improved OS	100	Buccsiano et al. [23] Venditti et al. [21]
		1st CR after consolidation	<0.035%	Lower risk of relapse, improved OS	56	
QRT-PCR – Fusion Genes t(8;21) and t(16;16) and Inv16	0.1% to 0.001%	1st CR after Induction	3 log or greater reduction t(8;21) Less than 1 log reduction	Less than 5% risk of relapse Near 100% relapse risk	278	Yin et al. [27]
		1st CR after completion of treatment	0.05% t(8;21) .001% t(16;16), inv16	Near 100% relapse risk		
		1st CR during and after consolidation	Undetectable QRT-PCR testing – two negative results	Improved RFS and OS	49	Corbacioglu et al. [28]
		Monitoring after treatment	Conversion from negative to positive	High relapse risk within six months	10	
KMT2A rearrangements	0.01%	1st CR after 1st cycle of consolidation	0.1%	Improved RFS	133	Jourdan et al. [29] Scholl et al. [30]
		1st CR after induction or 1st consolidation	Undetectable	Improved RFS	28	
QRT-PCR – mutated genes NPM1	0.01% 0.001% to 0.0001%	1st CR after 2 induction cycles	<0.01%	Improved RFS and OS	346	Ivey et al. [31] Krönke et al. [32]
		1st CR after 2 induction cycles	Undetectable	Improved risk of relapsed and OS	245	
		After completion of therapy	Undetectable	Improved risk of relapsed and OS		
QRT-PCR – gene expression WT1	To normal expression levels	1st CR, anytime after induction	2-log reduction	Improved RFS	129	Cilloni et al. [33] Trka et al. [34]
		1st CR following completed treatment	1-log rise	Increased risk of relapse	47	

I.1.8.3. Techniques

Les stratégies moléculaires (recherche de transcrits de fusion, mutations géniques, surexpression de marqueurs) et immunophénotypiques sont les principales techniques évaluant la MRD. Elles présentent des seuils de sensibilités différents, allant de 10^{-1} jusqu'à 10^{-6} (1 blaste leucémique pour 1 000 000 cellules évaluées). (Figure 4)

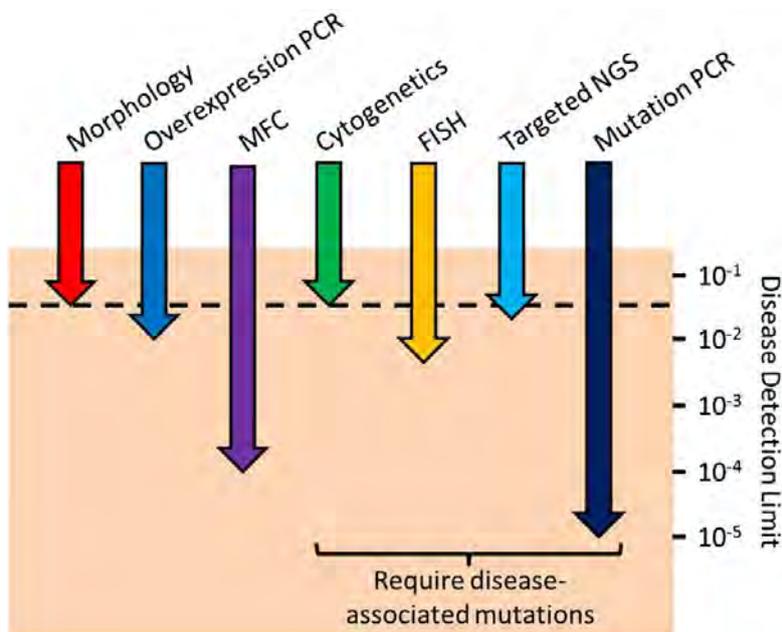


Figure 4. Seuils de sensibilité d'évaluation de la MRD selon différentes techniques¹⁷

Les techniques moléculaires, avec évaluation d'un marqueur spécifique de la maladie et du patient, restent cependant privilégiées du fait de leur sensibilité élevée (mutation NPM1, transcrits de fusion RUNX1-RUNX1T1, CBFB-MYH11, PML-RARA). La MRD par cytométrie en flux est une technique qui se développe dans plusieurs centres français avec une volonté d'harmonisation.²⁰

Les critères pour évaluer un marqueur de suivi sont :

- Sa sensibilité et sa spécificité
- Sa stabilité entre le diagnostic et la rechute
- Son applicabilité à un grand nombre de patients
- Sa détectabilité par une technique facilement réalisable en routine hospitalière
- Le coût acceptable de cette technique.²²

I.1.8.3.1. Biologie Moléculaire

Au niveau moléculaire, les marqueurs les plus performants (en regard des critères sus-cités) sont les transcrits de fusion, les mutations (dont NPM1) et, dans une moindre mesure, la quantification de WT1 (Tableau 7).²⁰

Tableau 7. Cibles moléculaires pour la détection de la MRD¹¹

Molecular targets	Frequency
Fusion genes	25-30%
<i>PML-RARA</i>	
<i>CBFB-MYH11</i>	
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	
<i>MLL-fusion partner</i>	
Mutations	75%
<i>NPM1</i>	
<i>FLT3</i>	
<i>RUNX1</i>	
<i>MLL-PTD</i>	
Overexpression	80%
<i>WT1</i>	

- Les gènes de fusion :

Les protéines de fusion issues de translocations chromosomiques sont des cibles attractives pour la détection de la MRD. Les gènes de fusion, responsables des transcrits et de ces protéines, sont souvent oncogéniques et sont retrouvés dans une majorité des cellules leucémiques. La technique de RT-qPCR (*Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction*) permet la mesure du nombre de copies d'ARN du transcrit d'intérêt. La valeur obtenue est ensuite rationalisée par le taux de base d'un gène de référence (par exemple le gène Abl). Parmi les cibles d'intérêt, on peut trouver *CBFB-MYH11* chez les patients avec une translocation du chromosome 16 – t(16;16) – ou une inversion du 16 – inv(16) – ou encore *RUNX1-RUNX1T1* chez les patients présentant une translocation 8-21 – t(8;21). La sensibilité de l'évaluation de la MRD par des transcrits de fusion est importante, elle peut varier entre 10^{-4} et 10^{-6} .^{20,21}

Ces cibles de MRD représentent environ 25 à 30 % des LAM. Leur prévalence est élevée chez les patients jeunes et diminuent avec l'âge (Figure 5).²³

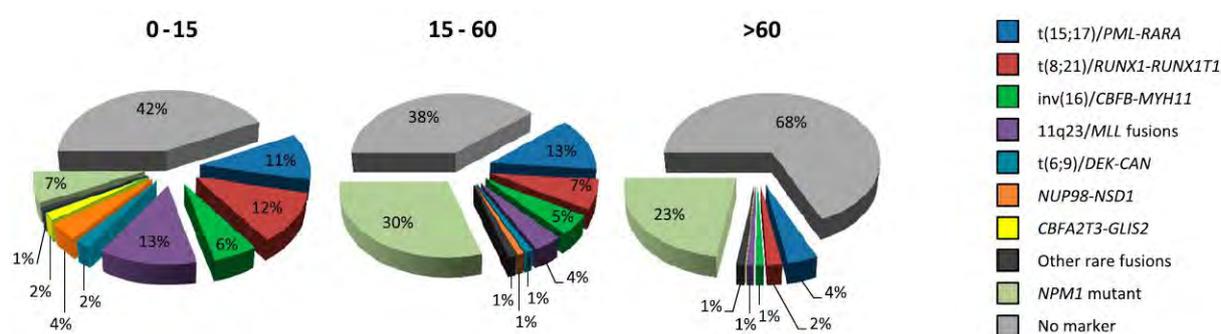


Figure 5. Proportion de patients atteints de LAM présentant une cible spécifique de la leucémie, informative pour la détection de MRD par RT-qPCR selon l'âge²³

- Les mutations

Plusieurs mutations ont été identifiées dans les LAM et peuvent être suivies par des techniques utilisant la PCR (FLT3-ITD, IDH1/IDH2, DNMT3A, NPM1...). Les mutations du gène NPM1 présentent l'avantage d'être stables lors de la rechute, et permettent donc une évaluation fiable de la MRD. Elles sont retrouvées chez 30% des patients atteints de LAM et présentent un impact favorable chez les patients à caryotype normal. Cependant, une proportion non négligeable de patients NPM1 muté sont susceptibles de rechuter. Des analyses multivariées incluant l'âge, le statut FLT3 et le niveau de NPM1 résiduel ont été réalisées. Il a été démontré que ce dernier paramètre est le facteur le plus significatif affectant la survie sans progression pendant la première ligne de traitement. D'une manière plus générale, les taux de NPM1 mutés ont un impact sur la survie globale et sur la rémission complète. Malgré une bonne sensibilité de la technique (jusqu'à 10^{-6}) il existe des cas de rechute présentant une MRD évaluée via NPM1 indétectable.¹¹

- Surexpression de gènes (WT1)

Le gène WT1 (*Wild Tumors*) est surexprimé dans 85 à 90% des cas de LAM. L'expression de ce marqueur peut être suivi par RT-qPCR pour l'évaluation de la MRD. La diminution de l'expression normalisée de WT1 de 2 log après traitement est corrélée avec un meilleur pronostic. Elle peut être évaluée dans le sang ou la moelle. N'étant pas spécifique des LAM, il persiste cependant un bruit de fond à l'état physiologique (<0.5% dans le sang, <2,5% dans la moelle), ce qui ne permet pas d'avoir une sensibilité aussi importante que dans les autres suivis de biologie moléculaire. En effet, il peut être compliqué de différencier la maladie résiduelle du taux de base.^{11,21}

La limite majeure des techniques hyper-sensibles (jusqu'à 10^{-5} , 10^{-6}) de biologie moléculaire reste la nécessité d'avoir une anomalie chromosomique ou une mutation de gène. De plus, même avec ces sensibilités importantes, des rechutes sont observées chez des patients présentant une MRD négative par analyses moléculaires. Cela suggère que les techniques doivent être améliorées (meilleure sensibilité) ou que les marqueurs biologiques impliqués ne permettent pas l'évaluation du pool de cellules leucémiques responsables de la rechute.²⁴

I.1.8.3.2. Cytométrie en flux

La partie concernant l'évaluation de la MRD par cytométrie en flux sera traitée dans le paragraphe CMF et LAM (Voir I.3.2 Suivi).

I.2. Cytométrie en Flux (CMF)

La cytométrie en flux est une technique analytique basée sur la mesure de plusieurs caractéristiques, physiques et biologiques, d'une même cellule. Son fonctionnement dépend des caractéristiques de diffusion de la lumière, émise par des dérivées de colorants ou d'anticorps monoclonaux ciblant des molécules extra ou intracellulaires.

Plusieurs systèmes sont mis en œuvre :

- **Fluidique** : permet l'alignement des cellules les unes derrière les autres au sein d'un liquide appelé « **liquide de gaine** ».
- **Optique** : a pour but de transformer les caractéristiques physiques et biologiques des cellules en informations lumineuses mesurables.
- **Electronique** : convertit différents signaux lumineux en donnée informatiques.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes, dirigés contre des marqueurs cellulaires d'intérêt rend ces derniers détectables par le système optique. Ces épitopes, membranaires ou cytoplasmiques, sont issus d'un grand nombre de familles moléculaires et sont regroupés sous le terme de « *Cluster of Differentiation* » ou CD.

En nomenclature internationale, ces marqueurs sont désignés par les initiales CD suivies d'un chiffre (exemple : CD45).

I.2.1. Composition du cytomètre

I.2.1.1. Système fluidique et focalisation hydrodynamique

Les cellules préalablement traitées sont injectées dans le liquide de gaine à débit constant. Le diamètre de la buse recevant l'échantillon diminuant petit à petit, la vitesse d'écoulement du liquide va progressivement augmenter. C'est cette accélération qui autorise une séparation et un alignement des cellules les unes derrière les autres. Ce phénomène est appelé focalisation hydrodynamique (Figure 6).²⁵

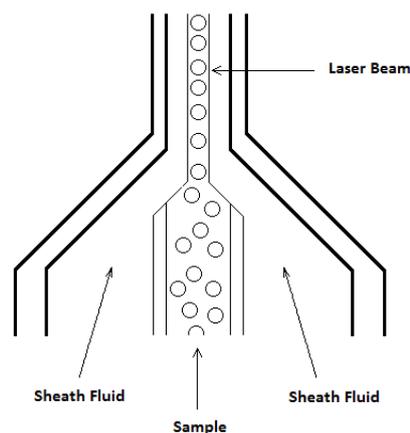


Figure 6. Principe focalisation hydrodynamique²⁵

I.2.1.2. Système optique

I.2.1.2.1. Excitation

Une fois alignées, les cellules vont passer devant un laser afin de générer trois types d'émission (Figure 7) :

- La diffusion axiale ou Forward Scatter (FS ou FSC) collectée dans l'axe du faisceau correspond à la diffraction de la lumière et est liée à la taille de la cellule.
- La diffusion latérale ou Side Scatter (SS ou SSC) collectée à 90° correspond à la réfraction de la lumière et est liée à l'hétérogénéité du contenu cellulaire (granulation, polylobulation nucléaire).
- La fluorescence également collectée à 90°. Les fluorochromes sont excités par le laser et émettent en retour une fluorescence de longueur d'onde supérieure à celle de l'émission. L'intensité de cette fluorescence est liée au type de fluorochrome et d'anticorps ainsi qu'au nombre d'anticorps fixés sur la cellule.²⁶

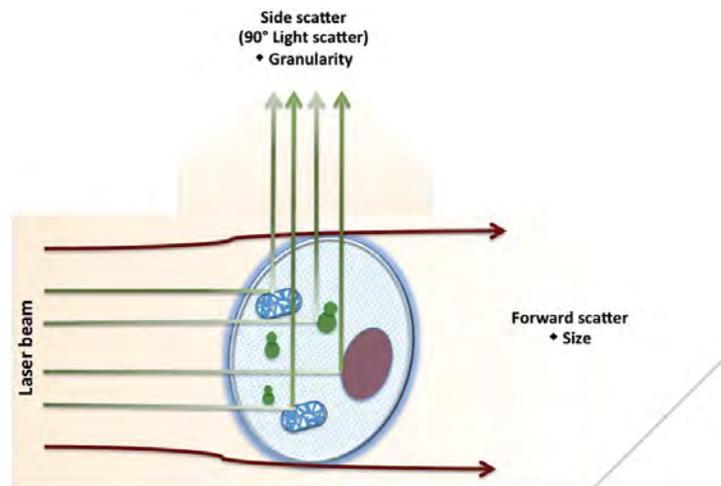


Figure 7. Diffusion de la lumière. Le FSC est proportionnel à la taille, tandis que le SSC est proportionnel à la granularité cellulaire ou à la complexité interne²⁶

I.2.1.2.2. Banc optique

Lors du passage de la cellule devant le laser, plusieurs fluorochromes peuvent être excités par ce même laser. Les différentes longueurs d'ondes émises simultanément vont être triées et séparées par le **banc optique** composé de deux éléments principaux :

- Des **filtres optiques** nettoient la lumière lors de sa progression vers le détecteur en ne sélectionnant que la gamme de longueurs d'onde à mesurer. Il existe trois types de filtres (Figure 8) :
 - Les **passé-haut** (ou longpass -LP-) ne laissent passer que les longueurs d'ondes supérieures à une valeur donnée (ex : le LP500 laissera passer toutes les émissions dont la longueur d'onde est supérieure à 500nm).
 - Les **passé-bas** (ou shortpass -SP-) ne laissent passer que les longueurs d'ondes inférieures à une valeur donnée.
 - Les **passé-bandes** (ou bandpass) ne laissent passer que les émissions dont la longueur d'onde est comprise entre deux valeurs données.²⁵

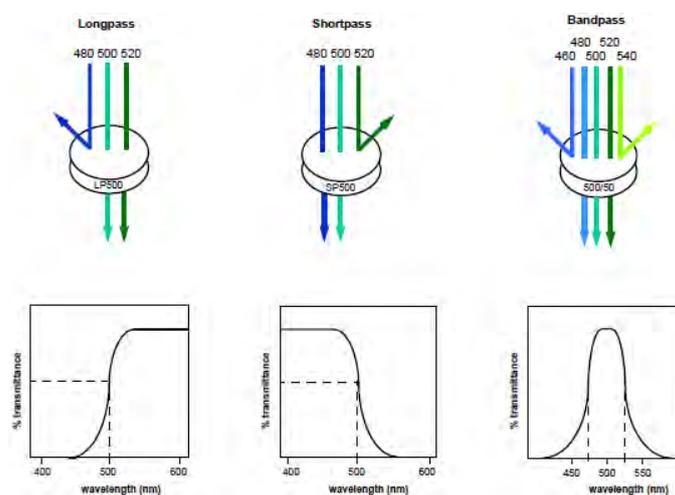


Figure 8. Trois types de filtres utilisés en cytométrie de flux : passé-haut, passé-bas, passé-bande.²⁵

- Des **miroirs dichroïques** réfléchissent une longueur d'onde donnée vers un détecteur spécifique et laissent passer les autres longueurs d'onde de la même manière que les filtres (passé-haut, passé-bas, passé-bande)

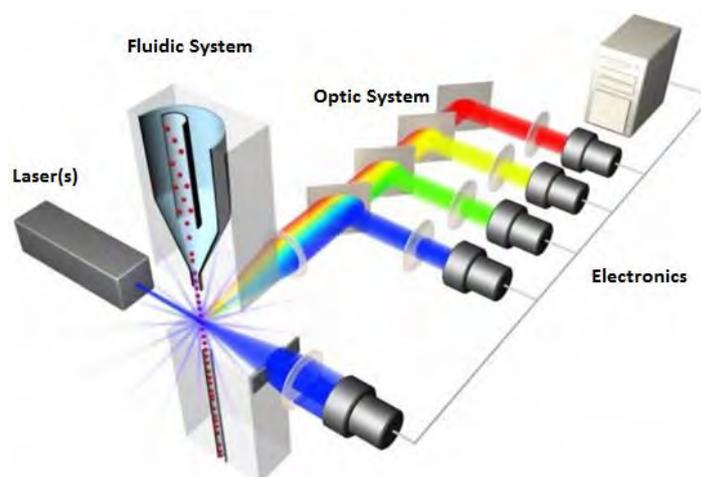


Figure 9. Banc optique²⁵

I.2.1.3. Traitement du signal

Le signal lumineux est recueilli par des photodétecteurs appelés aussi photomultiplicateurs (ou PMT). Lorsque les photons du faisceau lumineux entrent en contact avec le PMT, ils arrachent des électrons à une photocathode par effet photoélectrique et génère ainsi un faible courant électrique. Celui-ci est augmenté par une série de dynodes utilisant le phénomène d'émission secondaire, transformant ainsi le signal lumineux reçu en courant électrique amplifié (Figure 10).

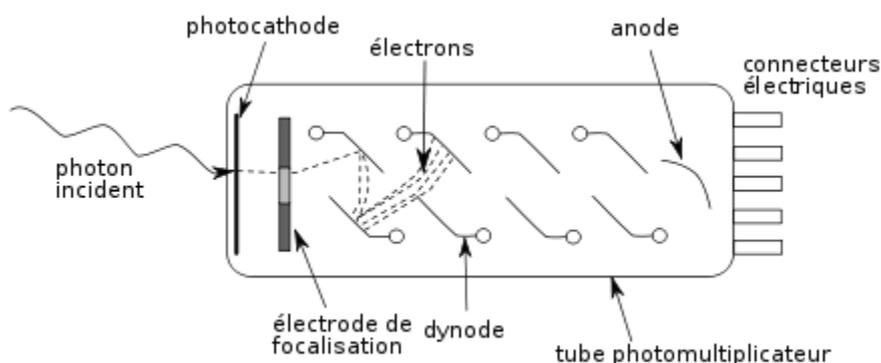


Figure 10. Schéma de fonctionnement d'un PMT²⁷

Le courant électrique ainsi obtenu est ensuite converti en données électroniques grâce à un convertisseur analogique-digital.

I.2.2. Traitement des données

Les données obtenues lors de l'acquisition sur le cytomètre sont enregistrées sous forme de LMD (List Mode Data) ou FCS (Flow Cytometry Standard). Ces fichiers contiennent la moyenne de fluorescence (MFI) de chaque cellule pour chaque paramètre étudié. Ils peuvent être modifiés ou retraités par différents logiciels tels que Kaluza[®] (Beckman Coulter[®]), ou Infinicyt[®] (Becton Dickinson[®]).

Trois éléments clés sont à connaître :

- La **représentation graphique** : les données sont principalement affichées sous forme d'histogrammes mono- ou bi-paramétriques :
 - Mono-paramétrique : oppose en abscisse l'intensité de la fluorescence obtenue pour un marqueur choisi par rapport au nombre d'évènements acquis (*Count*).

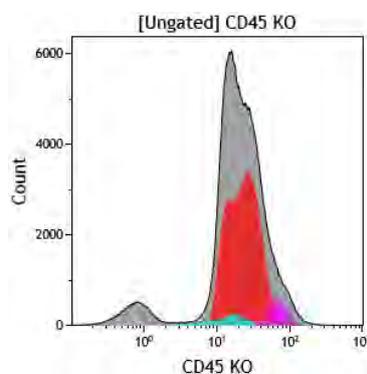


Figure 11. Histogramme mono-paramétrique représentant l'intensité de fluorescence du CD45 en abscisse par rapport au nombre d'évènements acquis

- Bi-paramétrique ou dot-plot : oppose en abscisse et en ordonnée deux intensités de fluorescence. On obtient ainsi la représentation de chaque cellule par un point dont les coordonnées dépendent de l'intensité d'expression de chacun des 2 marqueurs étudiés. On obtient ainsi des nuages de points.

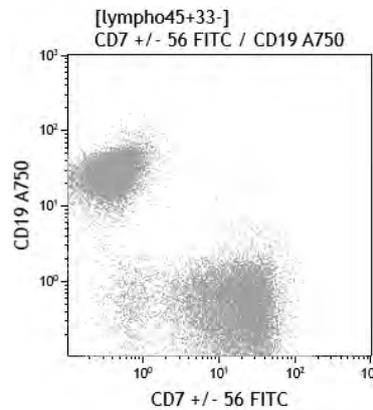


Figure 12. Histogramme bi-paramétrique fenêtré sur la population lymphocytaire opposant le CD7+/-56 au CD19

- Le density-plot : variante du dot-plot, il rajoute une troisième dimension en instaurant un code couleur objectivant le nombre de cellules.

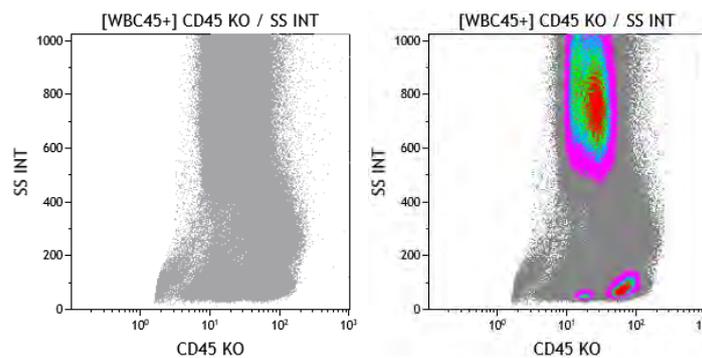


Figure 13. Différence entre un dot-plot et un density-plot.

- Le « **gating** » ou fenêtrage : l'objectif est de sélectionner sur un dot-plot ou sur un histogramme mono-paramétrique une population cellulaire homogène. Pour cela on isole nos populations d'intérêt à l'aide de *gate* (formes géométriques créées par l'utilisateur). On peut ensuite travailler sur les cellules isolées en observant leur fluorescence sur d'autres marqueurs, tout en s'affranchissant du reste des cellules.

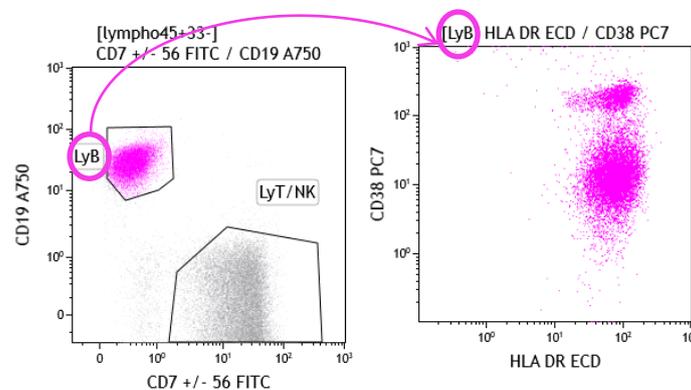


Figure 14. Fenêtrage des lymphocytes B CD19+. Etude des marqueurs CD38 et HLA DR sur la population sélectionnée

Certaines phases complexes de fenêtrage nécessitent de faire appel à des formules nommées en cytométrie « **booléennes** ». Elles permettent de faire ressortir des évènements répondant à une combinaison de plusieurs critères.

- La **colorisation** : par défaut sur le logiciel de retraitement Kaluza[®] les cellules sont représentées par des points gris. Il est cependant possible d'attribuer une couleur aux populations d'intérêt. Le Groupe de Travail Leucémies Lymphomes Francophone (GTLLF) ainsi que le Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies (GEIL) ont émis des recommandations concernant le code couleur utilisé pour représenter les populations principales²⁸ :
 - Fuchsia pour les lymphocytes
 - Rouge pour les granuleux
 - Vert pour les monocytes
 - Cyan pour la zone dite « Bermudes » regroupant entre autres les blastes et cellules immatures

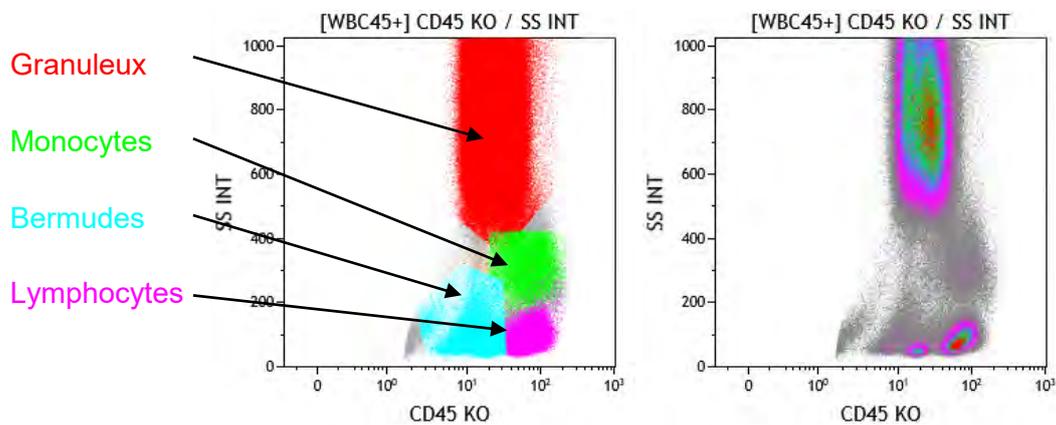


Figure 15. Dot-plot et density plot CD45/SS

I.3. Cytométrie en Flux et Leucémie Aigüe Myéloïde

I.3.1. Diagnostic

I.3.1.1. Identification des blasts

La recherche des blasts est effectuée sur l'histogramme bi paramétrique CD45/SS. Ils présentent généralement une expression faible du CD45 et des caractéristiques SS variables selon leur degré de maturation (Figure 16)²⁹. Des marqueurs d'immaturité, tels que le CD34, permettent d'affiner le fenêtrage sur les cellules les moins différenciées.

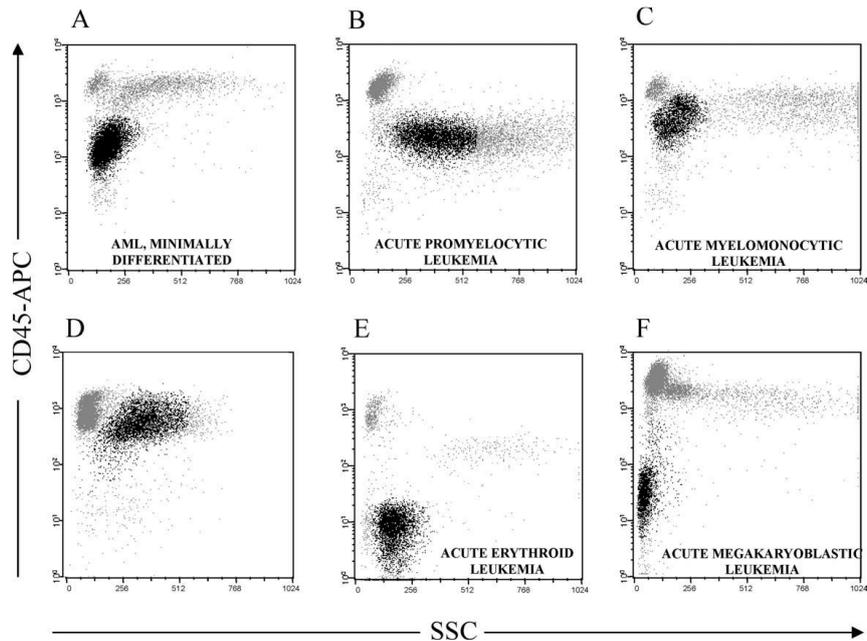


Figure 16. Fenêtrage des blasts myéloïdes sur un histogramme SS / CD45²⁹

I.3.1.2. Caractérisation et orientation phénotypique

La caractérisation et l'orientation phénotypique des blasts se font à l'aide de différents marqueurs spécifiques de lignées cellulaires (Tableau 8) :

- Marqueurs myéloïdes : MPO, CD13, CD33, CD117
- Marqueurs lymphoïdes : CD3, CD7, CD56, CD19, CD10

Tableau 8. Expression de marqueurs cellulaires dans le diagnostic de LAM⁷

Diagnosis of AML*	
Precursors†	CD34, CD117, CD33, CD13, HLA-DR
Granulocytic markers‡	CD65, cytoplasmic MPO
Monocytic markers§	CD14, CD36, CD64
Megakaryocytic markers	CD41 (glycoprotein IIb/IIIa), CD61 (glycoprotein IIIa)
Erythroid markers	CD235a (glycophorin A), CD36
Diagnosis of MPAL¶	
Myeloid lineage	MPO (flow cytometry, immunohistochemistry, or cytochemistry) or monocytic differentiation (at least 2 of the following: nonspecific esterase cytochemistry, CD11c, CD14, CD64, lysozyme)
T-lineage	Strong# cytoplasmic CD3 (with antibodies to CD3 ε chain) or surface CD3
B-lineage**	Strong# CD19 with at least 1 of the following strongly expressed: cytoplasmic CD79a, cCD22, or CD10 or weak CD19 with at least 2 of the following strongly expressed: CD79a, cCD22, or CD10

I.3.1.3. Notion de marqueur aberrant

La notion de marqueur aberrant est importante dans le diagnostic et le suivi de la maladie par cytométrie en flux. Chez un patient atteint de LAM, elle peut être définie par l'expression d'un phénotype anormal par les myéloblastes pathologiques. Pour être décrite comme aberrante, cette expression doit être retrouvée en faible quantité, voire absente chez un sujet sain (Figure 17).^{30,31}

Il existe quatre grands types d'anomalies phénotypiques recensées :

- L'asynchronisme de maturation, traduit par l'expression simultanée pathologique de marqueurs physiologiquement présents à différents stades de maturation (CD34, témoin d'immaturité et le CD15, marqueur des granuleux matures),
- L'infidélité de lignée mettant en jeu l'expression d'épitopes non myéloïdes sur les myéloblastes (appartenant à la lignée lymphoïde comme le CD7, CD19, CD56),
- La surexpression de marqueurs
- Ou, au contraire, leur sous-expression.¹¹

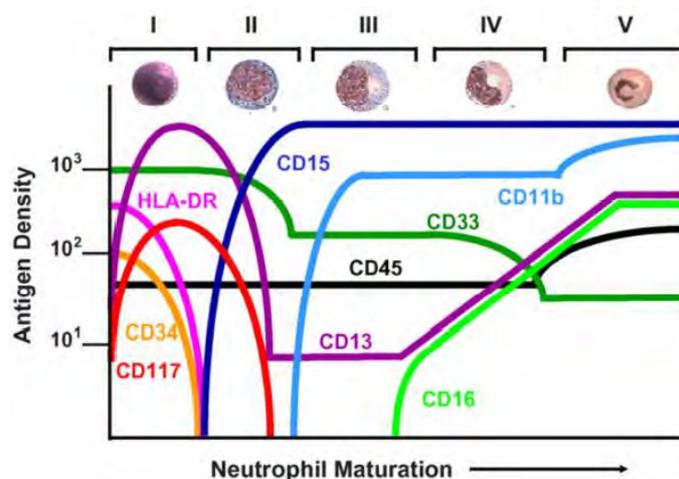


Figure 17. Intensité d'expression physiologique de différents marqueurs au cours de la maturation granuleuse³¹

I.3.2. Suivi

L'étude de la MRD en CMF repose sur la caractérisation des aberrations d'expression de protéines des cellules blastiques permettant de différencier les cellules malignes de celles de l'hématopoïèse normale.

Deux stratégies peuvent être utilisées :

- La stratégie LAIP (Leukemia Associated ImmunoPhenotype) qui peut être appliquée à plus de 85% des patients.¹¹
- La stratégie LSC (Leukemia Stem Cell) couvrant environ 80% des patients.³²

Utilisées ensemble, ces deux techniques permettent l'évaluation de la MRD chez plus de 95% des patients.³²

I.3.2.1. Approche LAIP : *Leukemia associated Immunophenotype*

Un LAIP est un phénotype associé à tout ou partie des cellules leucémiques d'un patient (représentant au moins 10% des blastes^{33,34}) défini par une combinaison d'antigènes et / ou d'anomalies morphologiques observables en cytométrie de flux (Tableau 9).¹¹

Tableau 9. Incidence des LAIP dans les LAM¹¹

Leukemic phenotype	Incidence	Examples
Asynchronous expression	60-70%	CD34 CD14 CD117 CD15
Cross-lineage expression	30-40%	CD19 CD2 CD7
Overexpression	20-30%	CD34 CD13 CD33 CD64 CD15 CD14
Lack of expression	20-30%	DR CD33 CD13
Overall	90-95%	

Pour être déterminantes, ces aberrations phénotypiques doivent être absentes ou très rare dans la moelle osseuse d'un individu sain (Figure 18).^{30,35-37} L'European Leukemia Net (ELN) a fixé un seuil de significativité à 0.1% à partir duquel une anomalie phénotypique permet d'affirmer la positivité de la MRD³⁸ (Tableau 10).

Aberrancy	LAIP	BM controls %LAIP on WBC (range)	N
CD7	CD7 ⁺ /MM ⁺ /CD34 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.024 (0.008–0.068)	9
	CD7 ⁺ /MM ⁺ /CD117 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.057 (0.016–0.098)	2
CD11b	CD11b ⁺ /MM ⁺ /CD34 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.054 (0.045–0.072)	3
	CD13 ⁻ /MM ⁺ /CD34 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.022 (0.000–0.044)	2
CD13	CD13 ⁻ /MM ⁺ /CD117 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.006 (0.000–0.021)	4
	CD15 ⁺ /MM ⁺ /CD34 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.010 (0.006–0.029)	5
CD15	CD15 ⁻ /HLADR ⁺ /CD117 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.027 (0.007–0.041)	6
	CD22 ⁺ /MM ⁺ /CD34 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.024 (0.016–0.102)	5
CD22	CD22 ⁺ /MM ⁺ /CD117 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.061 (0.008–0.079)	3
	CD33 ⁻ /MM ⁺ /CD34 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.002 (0.000–0.070)	6
CD33	CD33 ⁻ /MM ⁺ /CD117 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.073 (0.032–0.114)	2
	CD34 ⁻ /MM ⁺ /CD133 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.003 (0.002–0.005)	6
CD34	CD56 ⁺ /MM ⁺ /CD34 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.011 (0.003–0.030)	3
	CD56 ⁺ /MM ⁺ /CD117 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.011 (0.000–0.024)	4
CD56	HLADR ⁻ /MM ⁺ /CD34 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.009 (0.008–0.043)	3

Figure 18. Fréquences de phénotypes aberrants dans la moelle osseuse de sujets sains. MM : marqueur myéloïde³⁵

Pour obtenir une sensibilité optimale, l'identification d'un ou plusieurs LAIP au diagnostic est nécessaire. La stratégie LAIP permet la définition d'un phénotype spécifique du patient qui sera suivi tout au long de la maladie. L'absence de données immunophénotypiques lors du diagnostic entraînera une évaluation de la MRD via la stratégie dite DfN (Different from Normal). Cette deuxième approche, similaire à la première, repose sur la mise en évidence de cellules présentant des caractéristiques les différenciant de l'hématopoïèse normale. Elle permet également la détection de nouveaux marqueurs aberrants apparaissant sur les blastes au cours de la maladie et de son traitement. Bien que ces deux techniques présentent des caractéristiques relativement proche, la stratégie LAIP permet une définition d'un phénotype spécifique du patient, et donc permet une détection accrue des blastes résiduels (sensibilité de 10^{-4} versus 10^{-3} pour la stratégie DfN). Les recommandations de l'ELN privilégient l'utilisation combinée de ces deux stratégies sur échantillon médullaire dans une optique de sensibilité accrue. Elles incitent également à la mise en place d'un panel commun entre les différents centres évaluant la MRD par CMF dans un souci d'harmonisation des données et des pratiques (Tableau 10).^{20,38}

Tableau 10. Recommandations de l'ELN dans l'évaluation de la MRD par CMF³⁸

	Recommendations
Flow cytometry	
1	Use the following markers in an MRD panel: CD7, CD11b, CD13, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD56, CD117, HLA-DR (backbone: CD45, CD34, CD117, CD13, CD33, forward scatter/sideward scatter) If necessary, add a "monocytic tube" containing: CD64/CD11b/CD14/CD4/CD34/HLA-DR/CD33/CD45.
2	Integrate the classic LAIP approach with the DfN approach. To trace all aberrancies (at and beyond diagnosis, including newly formed postdiagnosis aberrancies) apply a full panel both at diagnosis and at follow-up.
3	Aspirate 5-10 mL of BM and use the first pull for MRD assessment. At present, PB, with its lower MRD content, should not be used for MRD assessment. Pull as low as desirable BM volume because contamination with PB increases with BM volume
4	Estimate the contamination with PB, especially when a first pool of BM was impossible.
5	Use 500 000 to 1 million WBCs; use the best aberrancy available and relate it to CD45 ⁺ WBCs.
6	To define "MRD-negative" and "MRD-positive" patient group, a cutoff of 0.1% is recommended.
7	If true MRD <0.1% is found, report this as "MRD-positive <0.1%, may be consistent with residual leukemia." If applicable, the comment "this level has not been clinically validated" should be added.
8	In a multicenter setting, transport and storage of full BM at room temperature for a period of 3 d are acceptable.
9	Single center studies with no extensive experience on MFC MRD are strongly discouraged.

I.3.2.2. Approche LSC : *Leukemic Stem Cell*

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC ou Haematopoietic Stem Cell) sont les architectes de l'hématopoïèse. Chaque HSC est programmée pour produire efficacement les éléments figurés du sang : les globules rouges, les mégacaryocytes et leur progéniture plaquettaire, les cellules du système immunitaire inné et acquis. Ces cellules progénitrices sont définies par quatre caractéristiques :

- Leur pluripotentialité : une HSC unique est capable de générer tous les types cellulaires hématopoïétiques fonctionnels matures.
- La capacité d'auto-renouvellement permettant de former des cellules filles ayant conservées les caractéristiques de la cellule parentale d'origine.
- Leur capacité de résistance à différents types d'agression (résistance aux rayons gamma, résistance aux chimiothérapies standard)
- Leur immunophénotypage présentant un marquage CD34+ / CD38- avec l'absence d'antigènes de maturité.^{10,39}

L'approche LSC permet la mise en évidence, parmi les cellules souches médullaires, d'une sous population capable d'induire le développement de rechute.¹⁰ Un taux élevé de ces progéniteurs au diagnostic a montré à un taux de survie plus faible, indépendamment des autres facteurs de risques connus (Figure 19).^{40,41}

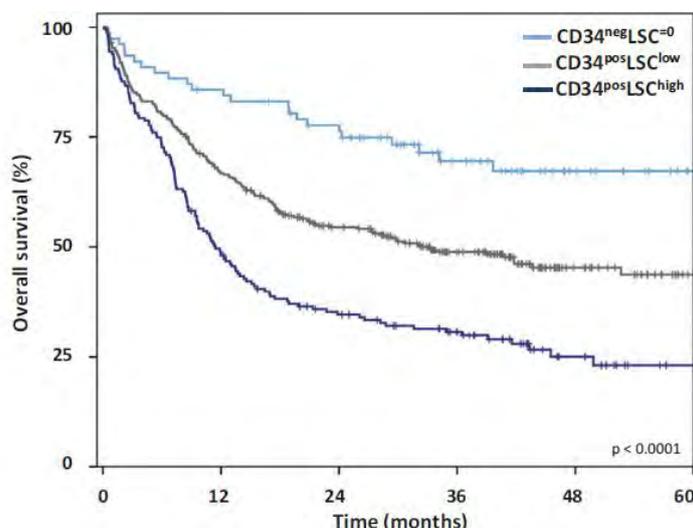


Figure 19. Effets du taux de LSC au diagnostic sur la survie globale. En bleu clair LAM CD34-, avec un taux de LSC évalué à 0% ; en gris clair, LAM CD34+, avec un taux de LSC faible inférieur à 0.03% ; en bleu foncé, LAM CD34+, avec un taux de LSC élevé supérieur à 0.03%⁴¹

Généralement différentes de la population blastique principale, les LSC possèdent cependant des caractéristiques communes avec les cellules souches hématopoïétiques physiologiques (HSC).¹⁰ La propriété majeure les distinguant est leur capacité à induire une LAM après greffe chez un modèle murin, mise en évidence dans les années 1990.^{42,43} Cette technique reste la méthode de référence pour identifier ces cellules initiatrices de leucémie. Néanmoins plusieurs études ont permis d'affiner leur immunophénotypage, afin de rendre leur identification plus rapide et plus simple.^{10,44,45}

Le Tableau 11 présente une partie des épitopes utilisés en cytométrie afin de distinguer les LSC des HSC. La présence ou la surexpression anormales d'un marqueur, associées à l'absence de cellules phéno-identiques au sein d'une moelle contrôle suffit à confirmer la présence de LSC. Cependant, ces antigènes ne présentant ni une sensibilité (CD25 présent que dans 25% des cas de LAM), ni une spécificité (CD44 présent dans les moelles de sujets sains) optimales, c'est par leur association entre eux, ainsi qu'avec d'autres paramètres (taille/structure) que l'on peut identifier les LSC de manière robuste et estimer leur fréquence. Zeijlemaker et al ont ainsi défini le phénotype des LSC comme suit : CD34+/CD38- et CD44++ et/ou CD123++ et/ou CD33++ et/ou CLL-1+ et/ou TIM-3+ et/ou CD45RA+ et/ou CD2+ et/ou CD7+ et/ou CD11b+ et/ou CD14+ et/ou CD15+ et/ou CD19+ et/ou CD22+ et/ou CD56+.^{10,45}

Tableau 11. Marqueurs utilisables en cytométrie de flux pour l'identification des LSC¹⁰

Marker	Identified as	Expression			
			Normal	In AML (%)	HSC
IL1RAP	IL1R3	T cells	79	-	+
CLL-1	CLEC12A, MICL, DCAL-2	Myeloid cells	70	-	+
TIM-3	T-cell Ig Mucin 3	Activated T cells, NK cells	91	-	+
CD2	SRBC, LFA2, T11	T cells, NK cells	87	-	+
CD7	GP40, TP41, LEU-9	T cells	43	-	+
CD11b	Integrin alpha M, Mac-1	Myeloid cells	55	-	+
CD22	BL-CAM, Siglec-2	B cells	51	-	+
CD25	IL2RA, TAC	Activated B and T cells	25	-	+
CD33	P67, Siglec-3	Myeloid cells, NK cells	82	+	++
CD44	Adhesion molecule	Ubiquitously	100	+	++
CD45RA	Tyrosine phosphatase receptor type C	T cells, myeloid cells	65	-	+
CD47	Integrin-associated protein (IAP)	Ubiquitously	100	+	++
CD56	N-CAM, MSK39	NK cells, activated T cells	32	-	+
CD96	TACTILE	Activated T cells	33	-	+
CD99	MIC2, single-chain type-1 glycoprotein	Myeloid cells	83	-	+
CD123	IL3R	Myeloid cells	82	+	++

La puissance d'un marqueur peut être définie selon trois axes :

- Distinction claire entre deux populations au sein de la fraction CD34 + / CD38 -
- Valeur prédictive négative forte (pas de LSC lorsque l'épitope n'est pas présent)
- Sensibilité élevée⁴⁵

Plusieurs marqueurs répondent à ces critères : c'est le cas notamment du CD45RA, du CLL-1, du TIM-3 pour les plus importants. Le CD33 et le CD123 sont également de très bons antigènes, essentiellement au diagnostic. Ils présentent cependant quelques points entraînant une interprétation plus délicate : la distinction entre une expression physiologique et une surexpression peut parfois être difficilement visualisable, surtout au suivi où une augmentation du taux de ces marqueurs sur les HSC peut être observée lors de la régénération médullaire.^{34,44,45}

Dans environ 25% des cas de LAM, il n'y a pas d'expression de marqueur aberrant au sein du compartiment CD34+/CD38- et dans encore plus de cas, l'expression des marqueurs est faible et les événements positifs ne peuvent pas être discriminés efficacement des cellules négatives. Les propriétés de taille et de structure deviennent alors indispensables : les LSC présentent un FS et un SS plus fort que les HSC.⁴⁶

La détection des LSC étant basée sur le phénotype des cellules souches (CD34+ / CD38-), il est nécessaire d'avoir une sous-population leucémique CD34+ (taux supérieur à 1% des blastes totaux⁴⁴). Environ 20% des LAM sont de phénotype CD34- et n'ont pas de population CD34+ / CD38- significative. Elles ne peuvent donc pas être suivies selon la stratégie LSC. Il a été montré le caractère initiateur de leucémie au sein de populations blastiques CD34-, sans toutefois avérer le caractère pronostic péjoratif d'une augmentation significative du contingent de cette population au diagnostic.¹⁰

I.3.2.3. Intérêt des méthodes LAIP et LSC

Les stratégies LAIP et LSC permettent d'obtenir des résultats complémentaires. Terwijn et al ont montré l'apport de la combinaison des deux stratégies sur un échantillon de 91 patients. Les sujets étaient divisés en quatre groupes répartis selon la positivité en MRD (stratégie LAIP, positif pour un taux supérieur à 0.1%) ou en LSC (positif pour un taux supérieur à 0.0001%) : dans le sous-groupe avec une MRD négative par la stratégie LAIP (n = 64), les patients LSC+ (n = 31, seuil à 0.0001%) présentent un pronostic significativement plus sombre que celui des patients LSC - (n = 33; p = 0,01). Parmi les individus LSC +, les sujets MRD -, bien qu'ayant un pronostic péjoratif, ont de meilleurs résultats que les patients MRD + (p = 0,04). Les sous-groupes extrêmes présentent des pronostics significativement différents avec d'une part les patients LSC - / MRD - et leur pronostic relativement bon, et d'autre part, le groupe LSC + / MRD + avec un ratio de survie cumulé faible.⁴⁶

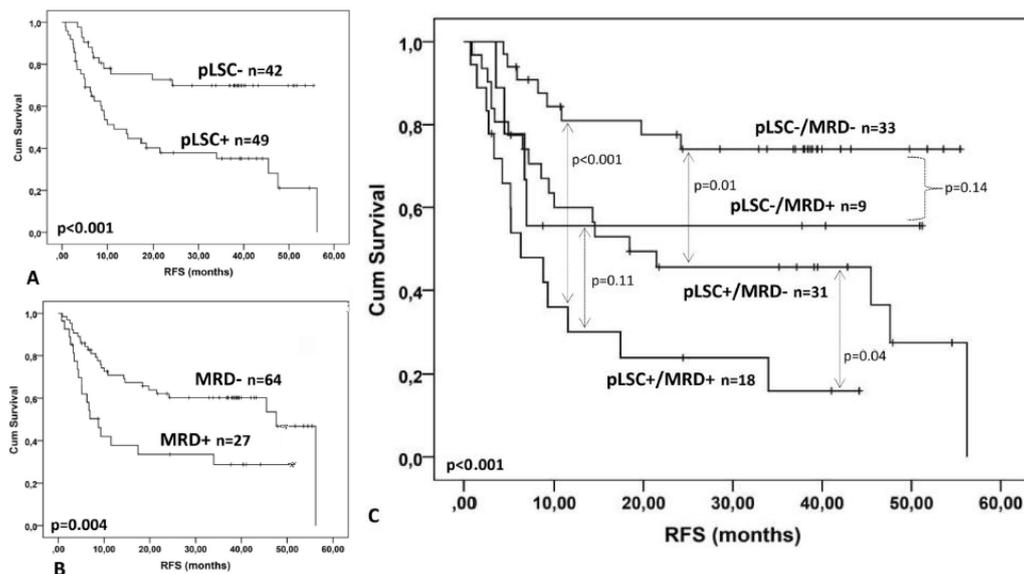


Figure 20. Apport de la combinaison des stratégies LAIP et LSC pour la détection de la MRD évalué chez 91 patients ; (A) Survie sans rechute (RFS) évaluée selon la stratégie LSC ; (B) RFS évaluée selon la stratégie LAIP ; (C) RFS évaluée par la combinaison des 2 stratégies ; Seuils utilisés pour la détection de la MRD : 0.1%, pour l'évaluation des LSC : 0.0001%⁴⁶

Selon plusieurs publications, le seuil de positivité de détection de la MRD par la stratégie LAIP est de 0.1% des leucocytes totaux.^{34,38,46} Pour la recherche des LSC, le seuil de positivité est variable selon les différents articles allant d'une sensibilité de 0.0001%⁴⁶ (1 LSC pour 10⁶ leucocytes) à 0.03% (3 LSC pour 10⁴ leucocytes)⁴¹. Ces différents niveaux de positivité engendrent une disparité dans l'analyse des données. Ainsi Zeijlemaker et al montrent, sur une population de 242 patients en rémission complète, que seuls les sujets présentant des taux supérieurs aux seuils par les deux stratégies combinées ont un pronostic péjoratif

significatif concernant la survie globale ou le développement de rechute, comparé aux autres groupes (Figure 21).

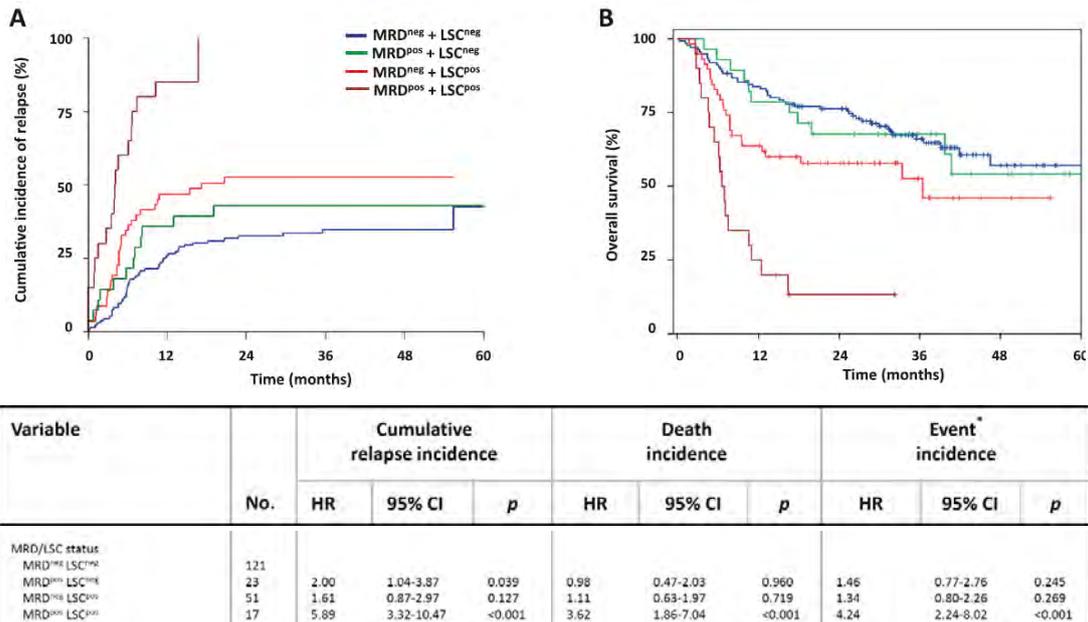


Figure 21. Apport de la combinaison des stratégies LAIP et LSC pour la détection de la MRD évalué chez 242 patients ; Seuils utilisés pour la détection de la MRD : 0.1%, pour l'évaluation des LSC : 0.03%⁴¹

Au vu de ces résultats, une standardisation de l'évaluation de la MRD en CMF est nécessaire afin d'évaluer l'impact clinique apporté par ces deux stratégies.

II. OBJECTIFS

L'objet principal de ce travail est la mise en place de l'évaluation de la MRD par technique de cytométrie en flux au laboratoire d'hématologie du CHU Limoges, et ce pour l'ensemble des patients atteints de LAM. Celui-ci est motivé par l'implication des hématologues et biologistes dans les protocoles BIG et ALFA-1200. Le BIG est un essai de phase III incluant les patients entre 18 et 60 ans comparant plusieurs stratégies thérapeutiques, tandis que l'étude ALFA est une étude observationnelle des patients de plus de 60 ans. Un protocole d'analyse de la MRD par CMF a été établi pour ces deux études et a servi de base pour ce projet.

Le panel utilisé jusqu'alors pour le diagnostic des LAM ne répondant pas aux recommandations du groupe ALFA-FILO pour l'évaluation de la MRD, la mise au point de nouvelles combinaisons d'anticorps a été l'un des objectifs de ce travail. Une comparaison entre ce nouveau panel et l'ancien utilisé jusqu'alors a ainsi été effectuée.

III. MATERIELS ET METHODES

III.1. Logiciels utilisés

Dans le cadre de ce travail, deux logiciels ont été utilisés :

- Kaluza® (version 2.1) de la société Beckman Coulter®, permet aux données brutes issues du cytomètre (« *data* ») d'être réinterprétées à l'aide de protocole (« *Protocol* »). Ce dernier regroupe l'ensemble des histogrammes, fenêtres, réglages, couleurs, tableaux nécessaires à l'interprétation ou à la réinterprétation des données du cytomètre.
- R® (version 3.1) et Rstudio® (version 1.2), logiciel de programmation basique, utilisé pour le retraitement des moelles témoins.

III.2. Mise en place du nouveau panel

Avant la mise en production du nouveau panel LAM, une comparaison a été effectuée avec l'ancien utilisé jusqu'alors.

III.2.1. Choix des patients

Tous les patients avec suspicion de LAM entre octobre 2018 et janvier 2019 ont été inclus dans la comparaison, de même que les échantillons ayant servi de moelles contrôles durant cette période.

III.2.2. Mode opératoire

Dans le cadre du diagnostic classique de LAM, un prélèvement de moelle osseuse sur tube EDTA est systématiquement effectué pour l'immunophénotypage. Pour opposer les deux approches, ancienne et nouvelle, celles-ci ont été réalisées en parallèle.

L'objectif de cette évaluation est de vérifier la cohérence des phénotypes obtenus pour les différentes populations cellulaires. Pour cela, une comparaison visuelle a été effectuée par deux opérateurs différents à l'aide du logiciel de retraitement Kaluza®.

III.3. Stratégie

III.3.1. Panel

Tableau 12. Panel LAM mis en place au laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges

	FITC	PE	ECD	PC5	PC7					
LA orientation (To)	cMPO	c13	c45	c79a	c3					
Tubes	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	AA700	AA750	PB	KO
T1	7/56*	13	HLADR	33	38*	34	10	19	117*	45
T2	90	Mix**	19	123	38*	34	36	45RA*	117*	45
T3	65	4	HLADR	33	11b	34	36	14	117*	45
T4	15	2	19	22	56	24	7	64	16	45

*Mix : mélange de trois anticorps ciblés contre CLL-1, TIM-3 et CD97

Le Tableau 12 présente les compositions des différents tubes du panel. Le détail des anticorps est présent dans l'Annexe 1.

Parmi les cinq tubes qui composent le nouveau panel, les tubes 1 et 2 sont communs avec groupe ALFA-FILO :

- Le tube d'orientation est utilisé pour aider à la caractérisation du phénotype de la leucémie.
- Le tube 1 sert à la fois pour la détermination phénotypique au diagnostic, mais est également le tube principal pour la caractérisation des blastes LAIP. Les LSC peuvent aussi être identifiées sur ce tube.
- Le tube 2 est primordial pour l'évaluation initiale et pour le suivi des LSC.
- Le troisième tube est utilisé pour détecter les blastes présentant un LAIP. Il est surtout informatif pour les LAM avec différenciation monocyttaire. Il ne permet pas cependant d'analyser les LSC de par l'absence de CD38 indispensable au fenêtrage de ces progéniteurs.
- Le tube 4 se compose de marqueurs supplémentaires pouvant être nécessaires au diagnostic (distinction CD7 / CD56, diagnostic de MPAL...)

III.3.2. Diagnostic

Lors de la prise en charge d'un patient avec suspicion de leucémie aiguë, une ponction médullaire est réalisée. L'échantillon est d'une part, étalé sur des lames pour la cytologie, et d'autre part, réparti dans différents tubes selon les secteurs analytiques concernés. Pour la cytométrie en flux, 1 à 2 mL de suc médullaire est récupéré dans un tube EDTA.

Tous les patients âgés de moins de 70 ans ainsi que ceux inclus dans les études BIG et ALFA-1200 ont bénéficié d'un immunophénotypage complet représentant un total de cinq tubes et plus de trente marqueurs différents. Les échantillons d'autres patients ont été analysés avec les tubes 0, 1 et 2.

III.3.3. Suivi

Pour le suivi, le choix des tubes et des marqueurs est fonction des phénotypes LAIP déterminés lors de l'analyse du diagnostic. Les tubes 1 et 2 sont réalisés en systématique. Le tube 3 est effectué en suivi seulement lorsqu'un ou plusieurs LAIP informatifs ont été mis en évidence sur celui-ci lors du prélèvement initial.

Lors du prélèvement à J0, le tube 1 présente la particularité d'avoir deux anticorps couplés à un même fluorochrome (CD7 et CD56 couplés au FITC). Le choix du marqueur utilisé pour le suivi sera fait dès le diagnostic grâce au tube 4 comportant les deux mêmes anticorps couplés à deux fluorochromes différents. Cette combinaison permet un choix optimal entre le CD7 et le CD56 selon le (ou les) LAIP impliqué(s). En cas de négativité des deux marqueurs, le CD7 est choisi par défaut lors du suivi dans le tube 1.

III.4. Traitement des échantillons

La procédure de réalisation technique a été mise en place conformément aux recommandations émises par le groupe dans les protocoles BIG et ALFA1200. Elle comprend :

- Une évaluation de la dilution du prélèvement de moelle osseuse, soit par :
 - Calcul du pourcentage d'hémodilution selon la formule de Holdrinet⁴⁷ (nécessite les numérations sanguine et médullaire du jour). Une pureté inférieure à 70% peut être synonyme d'hémodilution.

$$\% \text{ de pureté} = \left(1 - \left(\frac{GR_{MO}}{GR_{sg}} \times \frac{EN_{sg}}{EN_{MO}} \right) \right) \times 100$$

- Avec :
- GR_{MO} : érythrocytes médullaires
 - EN_{MO} : éléments nucléés médullaires
 - GR_{sg} : érythrocytes sanguins
 - EN_{sg} : éléments nucléés sanguins

- Réalisation de la formule médullaire après étalement d'un frottis du tube EDTA (si NFS non disponible)
- Une lyse macrovolume (Bulk Lyse) (NH₄CL, BD PharmLyse, Versalyse) ainsi qu'un ajustement de la suspension cellulaire à 10 millions de cellules/mL
- La distribution des anticorps dans les tubes T1 +/- T2 +/- T3 (Tableau 12)
- L'incubation de 1 à 1,5 million de cellules/tube avec les anticorps 15 min à l'abri de la lumière à température ambiante, puis un rinçage avec du PBS suivi d'une centrifugation 5min à 430g et enfin la reprise de chaque tube dans 300µL de PBS.
- Le passage au cytomètre : l'acquisition d'au moins **500 000 évènements CD45+** représentant tous les leucocytes est nécessaire pour chaque tube.

III.5. Protocoles d'analyse appliqué à la MRD

Les données brutes du cytomètre sont récupérées au format .LMD (ou .FCS) et sont retraitées dans le logiciel Kaluza®. Pour chaque tube, un masque d'analyse a été défini. La procédure permettant l'étude des données patients est décrite dans III.7 "Evaluation de la MRD". Ces masques ont une architecture commune :

- Un premier onglet « *Gating* » permet le fenêtrage des différentes populations leucocytaires
- Une deuxième partie qui définit et quantifie les blastes LAIP d'intérêt
- Pour les tubes 1 et 2 seulement, une troisième page permet la sélection et la numération les LSC.

III.5.1. Gating

Le premier onglet du protocole a plusieurs rôles. Il permet d'une part une vérification technique, un fenêtrage des cellules d'intérêt et le positionnement des différents seuils, utiles à l'analyse de la MRD.

➤ *Histogrammes de vérification*

Les dix premiers histogrammes (bi-paramétriques, FLX/SS) permettent de vérifier la bonne distribution des anticorps dans le tube. Pour chaque anticorps, une sous-population présente un marquage positif et sert ainsi de contrôle interne (lymphocytes B positifs pour le CD19, monocytes positifs pour le CD13) (Figure 22).

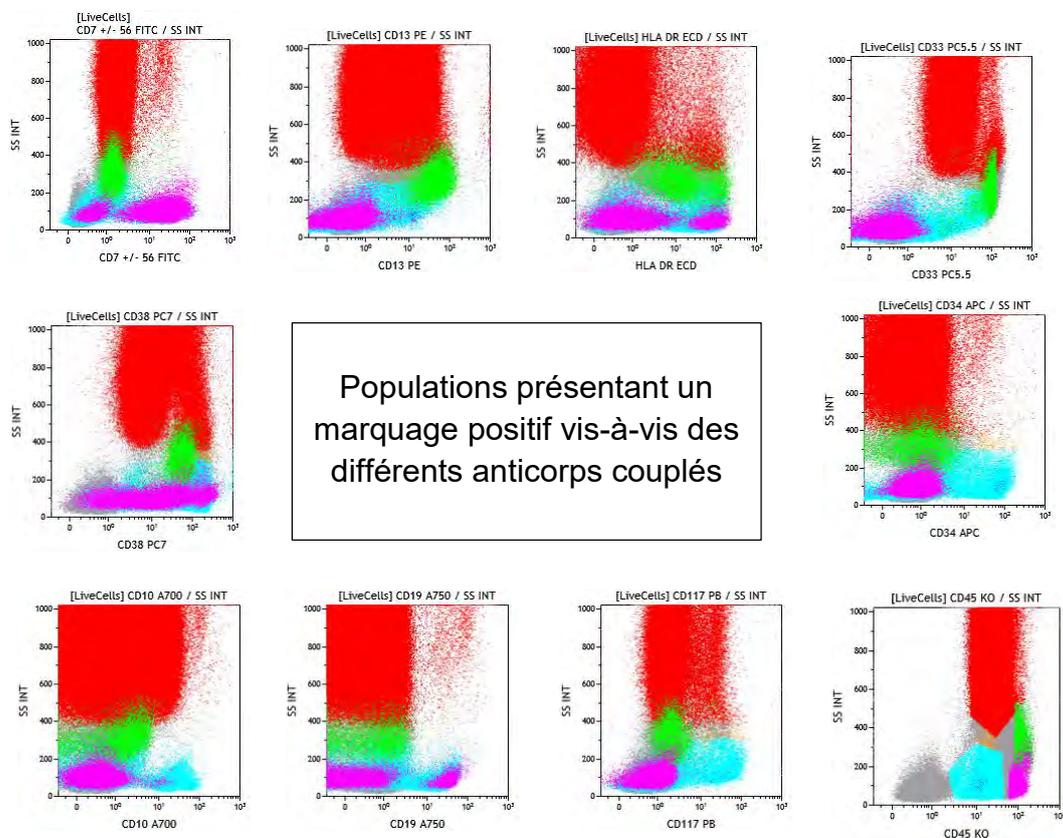


Figure 22. Présentation des 10 histogrammes bi-paramétriques du tube 1 servant à vérifier la bonne distribution des anticorps dans le tube

➤ **Fenêtrage des cellules vivantes**

Le fenêtrage des cellules vivantes se fait grâce à trois graphiques (Figure 23) :

- **Time** sélectionne tous les évènements acquis durant le passage sur le cytomètre
- **LiveCells** élimine les débris (FS faible)
- **WBC 45+** cible les leucocytes grâce au CD45 (marqueur panleucocytaire) et permet également l'élimination à la fois des globules rouges et des débris.

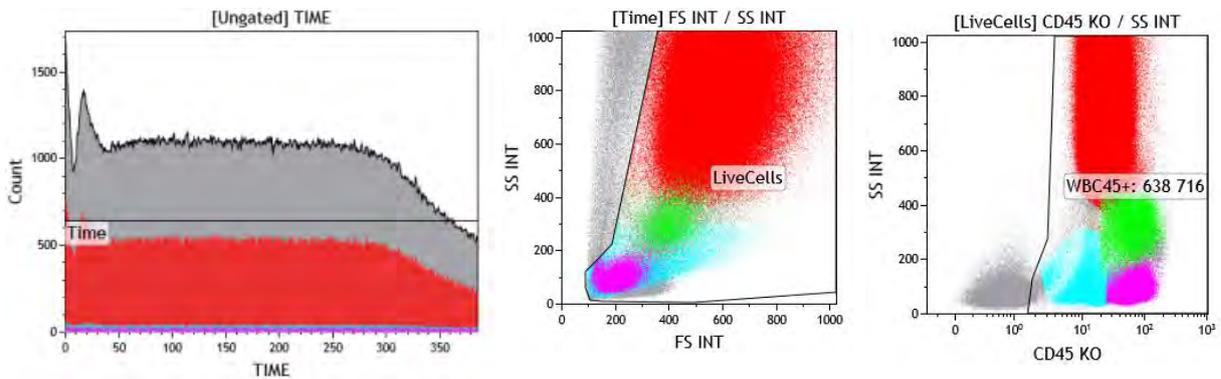


Figure 23. Fenêtrage des cellules vivantes

➤ **Fenêtrage des différentes populations d'intérêt**

Plusieurs populations leucocytaires sont utiles de manière directe (recherche de phénotype LAIP parmi les blastes et les CD34+) ou indirecte (placement de seuil positif / négatif) à l'analyse de la MRD.

Les **granuleux** et les **blastes** sont sélectionnés sur l'histogramme CD45/SS (Figure 24) :

- Les granuleux sont CD45+ avec un SS variable traduisant leur complexité intracellulaire hétérogène.
- Les blastes ont une intensité de marquage diminuée en CD45 et un SS faible. Le placement de cette fenêtrage est variable selon le type de leucémie aiguë myéloïde étudiée.

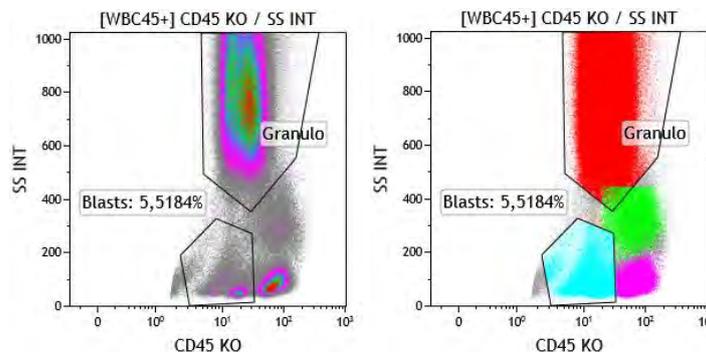


Figure 24. Fenêtrage des blastes et des granuleux

Les cellules **CD34+** donnent une indication sur la richesse du prélèvement et peuvent également contenir des cellules de type LAIP ou LSC (Figure 25).

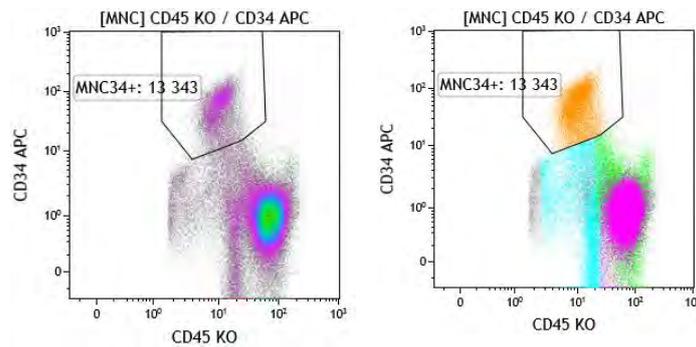


Figure 25. Fenêtrage des cellules CD34+

Les **monocytes** et les **lymphocytes** étant des cellules mononucléées, une première sélection est effectuée sur le graphique taille/structure (FS/SS) prenant en compte les événements présentant une complexité interne faible (SS diminué ; Figure 26A). Compte tenu de la différence de marqueurs entre les trois tubes, la suite du fenêtrage est différente selon le protocole utilisé :

- Pour le **tube 1**, un histogramme CD45 / CD33 met en évidence deux populations présentant une intensité de signal similaire en CD45, mais distincte en CD33 : positive pour les monocytes et négative pour les lymphocytes (Figure 26B). Ces derniers sont ensuite séparés en deux populations selon leur marquage en CD19 pour les lymphocytes B, et en CD7 et/ou CD56 pour les lymphocytes T et NK (Figure 26C).

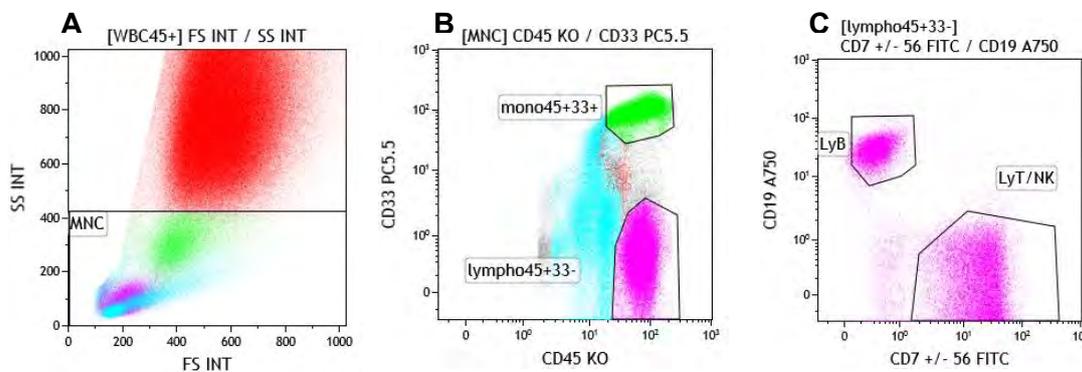


Figure 26. Fenêtrage monocytes et lymphocytes sur le tube 1

- Le **tube 2** fait intervenir l'histogramme bi-paramétrique CD45 / Mix : les monocytes ont un marquage positif pour le Mix, tandis que les lymphocytes présentent une intensité diminuée (Figure 27).

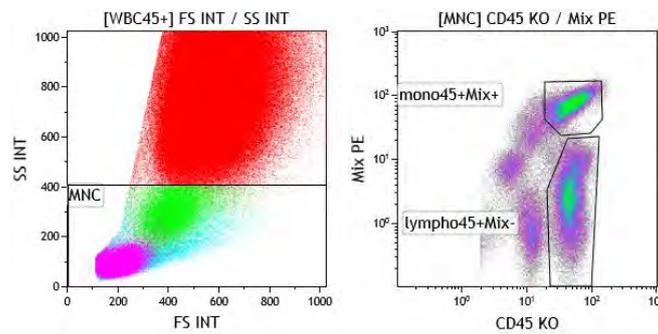


Figure 27. Fenêtrage des lymphocytes et des monocytes dans le tube 2

- A l'instar du tube 1, le **tube 3** distingue les lymphocytes des monocytes via le CD33. Il n'est cependant pas possible de distinguer les différentes sous-populations lymphocytaires (Figure 28).

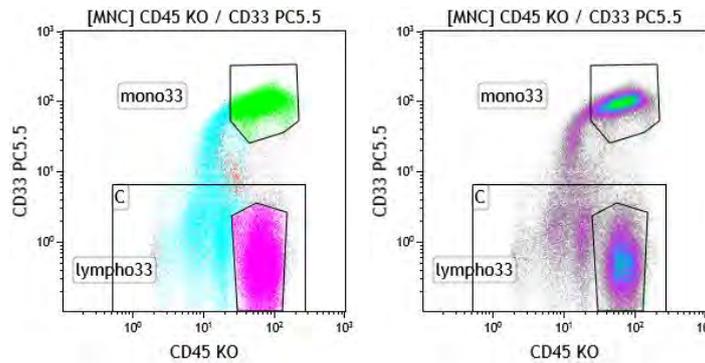


Figure 28. Fenêtrage des lymphocytes et des monocytes dans le tube 3

Les **hématogones** sont les précurseurs des cellules lymphoïdes. Ils permettent de fixer différents seuils nécessaires à l'analyse des LSC. Dans une moindre mesure ils peuvent permettre d'apprécier la régénération médullaire. Sur un premier histogramme CD19 / SS commun aux tubes 1 et 2, les hématogones sont ciblés par leur signal CD19+ (au sein de la population lymphocytaire B globale).

- Pour le tube 1, la population ainsi fenêtrée est nettoyée en enlevant les événements CD33+ (Figure 29).

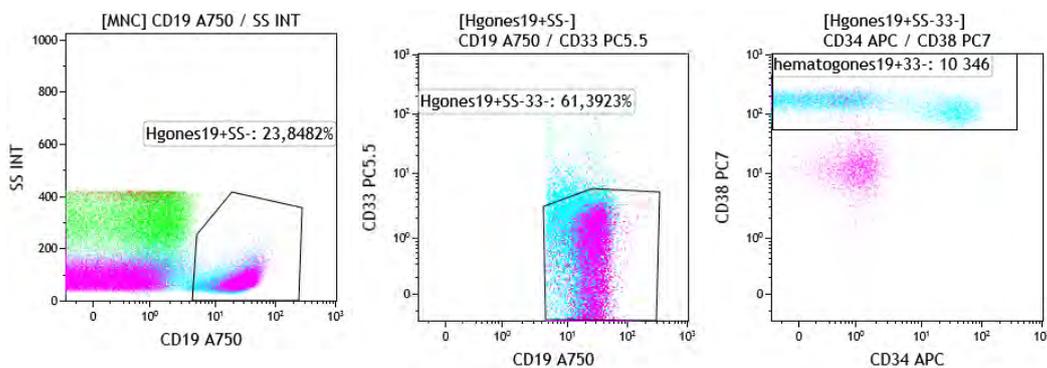


Figure 29. Fenêtrage des hématogones sur le tube 1

- Pour le tube 2, c'est le 45RA (positif) ainsi que le mix (négatif) qui permettent l'isolement des progéniteurs lymphoïdes (Figure 30).

Les cellules ainsi extraites (SS faible, CD19+, CD33- pour le tube 1 et SS faible, CD19+, CD45RA+, Mix – pour le tube 2) sont reportées sur un dot plot CD34 / CD38 pour séparer les lymphocytes des hématogones : ces derniers ont une intensité de marquage élevée en CD38.

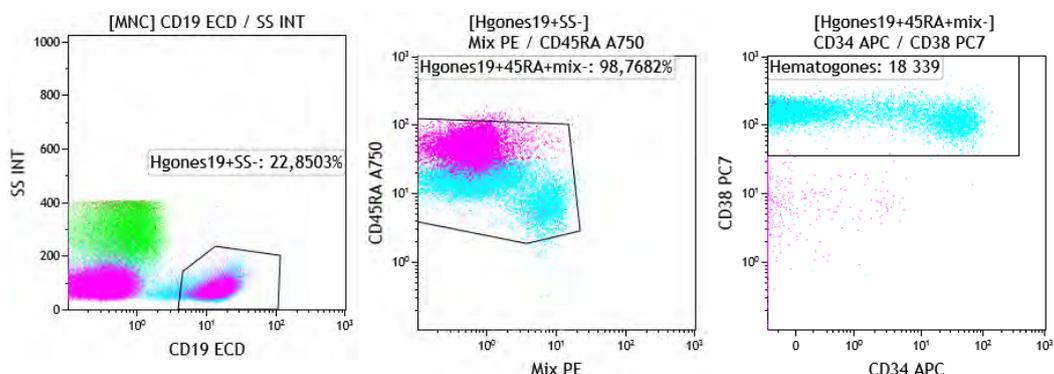


Figure 30. Fenêtrage des hématogones sur le tube 2

➤ **Mise en place des seuils (P6, P7, P8) :**

Parmi les événements CD34+, trois populations ont été identifiées selon leur intensité de fluorescence en CD38. Cette différence d'expression révèle un axe de maturation des cellules les plus immatures (CD38-) aux plus matures (CD38+). Pour une facilité de lecture, trois « boîtes » nommées de P6 à P8 ont permis de délimiter ces populations (Figure 31) :

- La fenêtre P8 contient les cellules CD34+ CD38+,
- En P7 sont présents les événements CD34+ CD38 faible,
- La boîte P6 inclut quant à elle les cellules souches, CD34+ CD38-. C'est cette fenêtre qui nous permettra d'évaluer le taux de LSC.

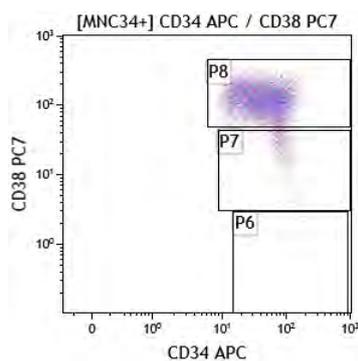


Figure 31. "Boîtes" P6, P7, P8

Le seuil de négativité du CD38 (seuil P6/P7) a été fixé selon la technique dite *FMO* (Fluorescence Minus One) : passage au cytomètre d'un prélèvement médullaire contrôle marqué avec un anticorps CD38 non couplé à un fluorochrome (Figure 32). Ce seuil est réglé sur les fichiers protocoles pour les tubes nécessitant le positionnement de celui-ci (tube 1 et 2) et reste fixe durant l'analyse des données patients.

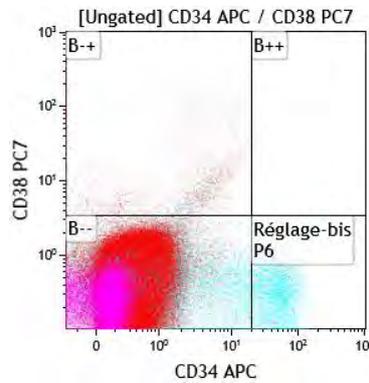


Figure 32. Histogramme bi-paramétrique fenêtré sur tous les événements d'une moelle normale marquée avec un anticorps anti-CD38 non couplé à un fluorochrome montrant une négativité complète de toutes les cellules pour le marqueur CD38

Le seuil différenciant les cellules CD38 faibles des CD38 forts (P7 / P8) est placé selon l'intensité de signal émise par les hématogones marqués (Figure 33).

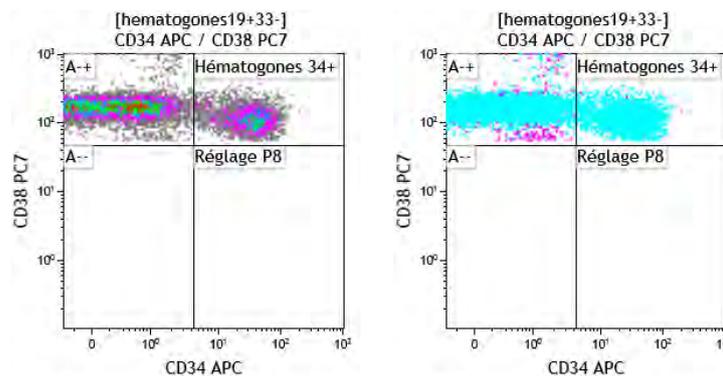


Figure 33. Mise en place du seuil P7 / P8 grâce aux hématogones

Pour la mise en place du seuil de positivité CD34, les événements **CD34+** servent de témoin positif tandis que les **lymphocytes** sont utilisés comme témoin négatif (Figure 34)

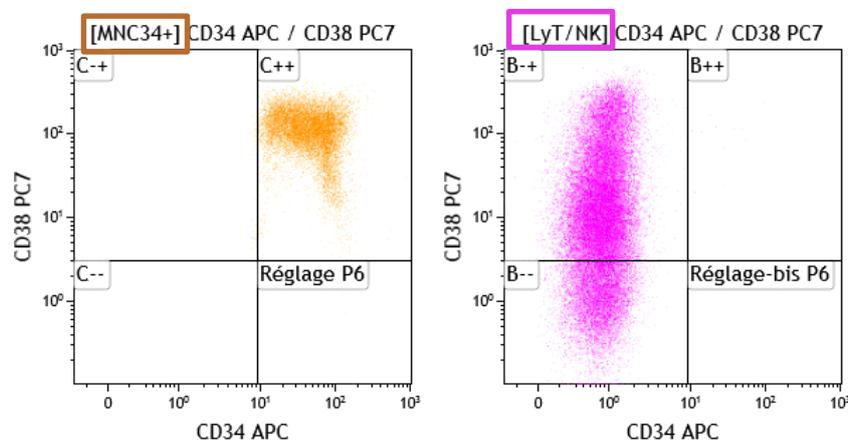


Figure 34. Mise en place du seuil CD34+

Après caractérisation des différents seuils, on obtient un histogramme bi-paramétrique découpé en plusieurs boîtes montrant les P6, P7 et les P8 (Figure 35).

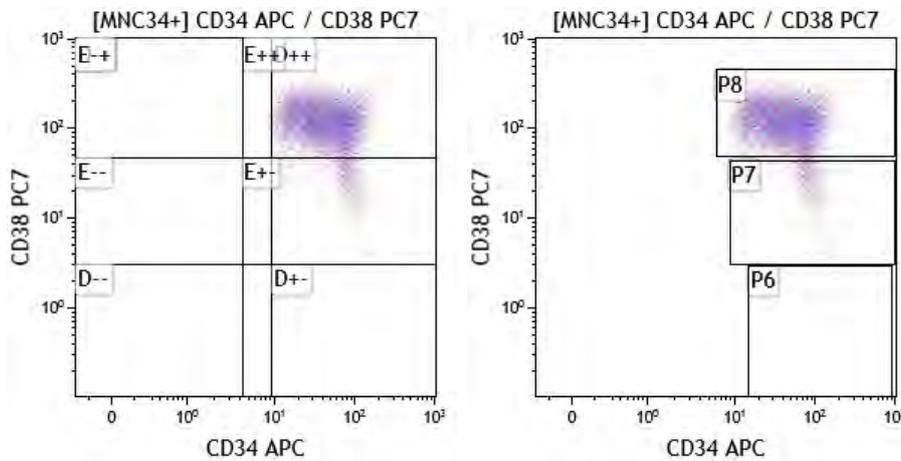


Figure 35. Histogrammes bi-paramétriques CD34 / CD38 permettant le fenêtrage de la population CD34+ / CD38-

III.5.2. LAIP

L'onglet LAIP est composé de 4 parties :

- Vérification rapide
- Recherche du LAIP
- Résumé du LAIP
- Synthèse

➤ Vérification rapide

Composée de deux histogrammes FS / SS et CD45 / SS, la première partie permet un contrôle visuel non exhaustif de l'élimination des débris ainsi que du bon fenêtrage des différentes populations leucocytaires (Figure 36).

Ces histogrammes permettent aussi d'apprécier la position des **blastés type LAIP** une fois l'analyse effectuée.

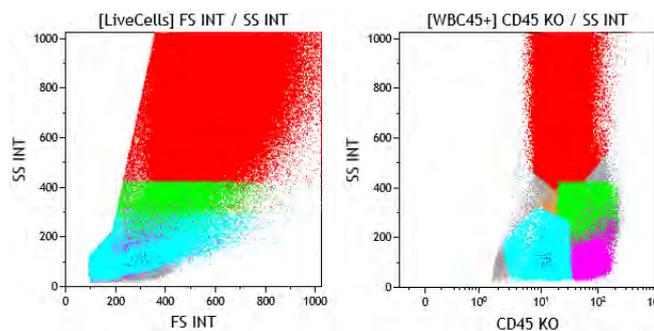


Figure 36. Histogrammes bi-paramétriques montrant les différentes populations leucocytaires colorisées

➤ Recherche du LAIP

La recherche des LAIP se fait à l'aide de 8 histogrammes notés du LAIP 0 au LAIP 6 (Figure 37, Figure 38). Elle fait appel à une connaissance des phénotypes physiologiques retrouvés au sein de moelles contrôles, notamment des blastes et des cellules immatures. Dans cette optique, un fichier d'aide à la validation retrace les différentes images obtenues après passage au cytomètre de 6 moelles de patients non atteints de LAM, présentant des aspects cytologiques différents (PTI, moelle de régénération, présence d'hématogones...) (Annexe 2).

A noter le double rôle de l'histogramme CD34 / CD117 (Figure 37) :

- Sélectionne les cellules immatures myéloïdes CD34+ et/ou CD117+ sur lesquelles seront appliqués les différentes fenêtres LAIP du protocole.
- Permet de rechercher un premier LAIP (LAIP 0) avec, pour exemple une perte d'expression du CD34+.

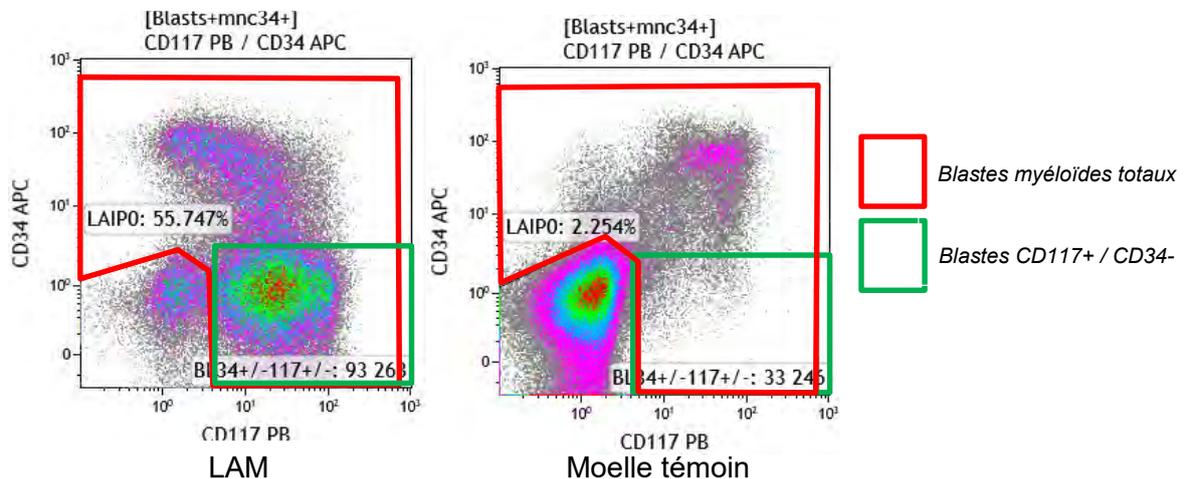


Figure 37. Histogrammes CD117/CD34 permettant la sélection des blastes myéloïdes ainsi que la recherche de marqueurs aberrants. A gauche : patient atteint de LAM présentant une perte d'expression du CD34 sur une partie de la population blastique. A droite : pool de moelle normale

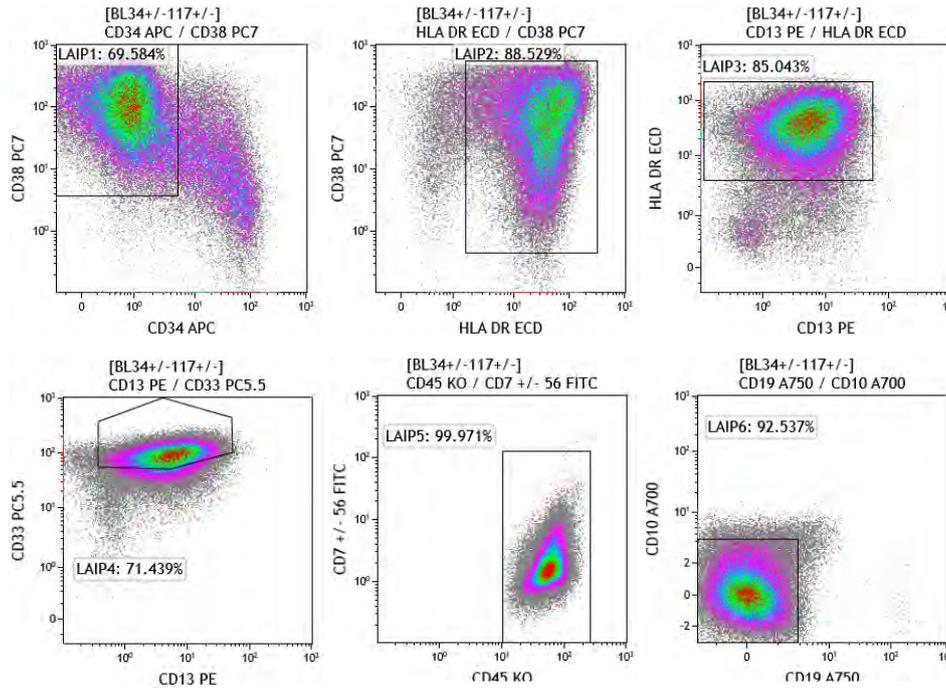


Figure 38. Histogrammes permettant la recherche de blasts présentant un phénotype aberrant dans le tube 1

➤ **Résumé du LAIP**

La booléenne suivante sert à isoler les cellules blastiques présentant un LAIP et à les afficher sur des histogrammes choisis (Figure 39).

$$MRD\ LAIP = (((((((time\ and\ livecells)\ and\ mnc)\ and\ BL34+/-117+/-)\ and\ laip0)\ and\ laip1)\ and\ laip2)\ and\ laip3)\ and\ laip4)\ and\ laip5)\ and\ laip6$$

Cette étape permet une meilleure visualisation du phénotype étudié.

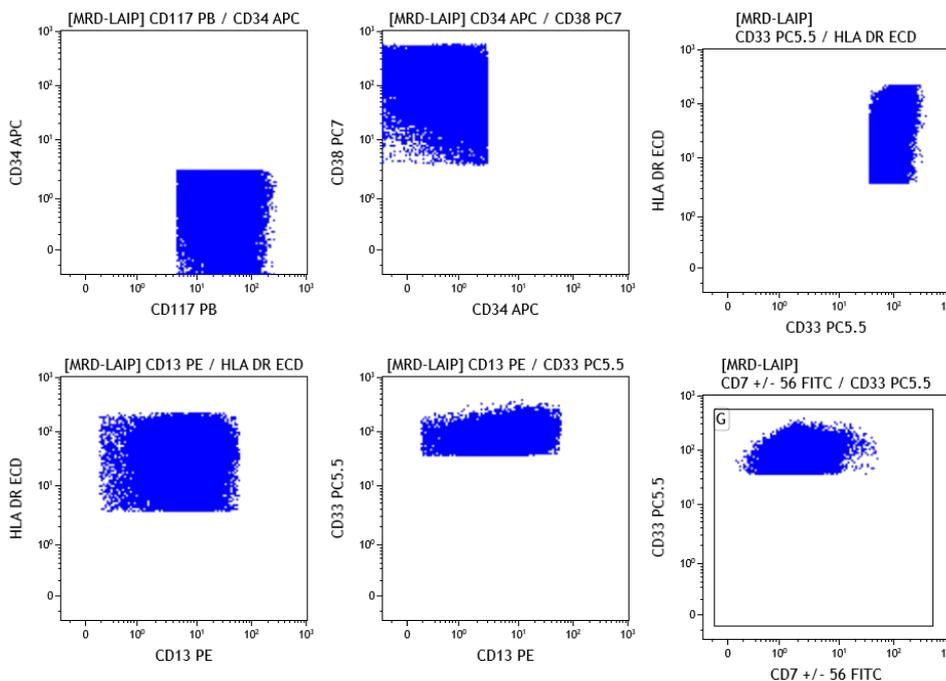


Figure 39. Histogrammes permettant la définition du LAIP : CD34- CD117+ CD38+ CD33++ HLA DR+.

➤ Synthèse

Les résultats sont présentés sous forme de tableau (Figure 40) avec :

- Le nom du cytomètre utilisé
- Le nom du fichier brut
- La date d'acquisition
- La pureté médullaire CD34+ (à titre indicatif, non utilisé dans le rendu de résultat)
- Le nombre de cellules CD45+, CD34+ ainsi que celui des hémotogones
- Le nombre de cellules présentant un phénotype LAIP (*[MRD-LAIP] Number*)
- Le pourcentage de cellules présentant un phénotype LAIP par rapport aux CD45 totaux
- La limite de détection (Limit Of Detection = LOD) pour 50 évènements rendue si la sensibilité du fenêtrage par rapport aux différentes moelles contrôles n'est pas conforme.
- Le pourcentage de cellules présentant un phénotype LAIP par rapport aux blastes totaux

RESULTATS LAIP	
The unique cytometer ID specified by the user	AT10081
Name of the data file containing the data set	7+56_13_1
Date of data set acquisition	06-Dec-18
purete medullaire CD34 %	59,102
[WBC45+] Number	638 716
[MNC34+] Number	13 343
[hematogones19+33-] Number	10 346
[MRD-LAIP] Number	53
MRDLAIP en % des WBC45+	0,008
LOD en % pour 50ev (sans correction de dilution)	0,008
MRDLAIP en % des Blastes totaux	0,148

Figure 40. Tableau de résultats du LAIP pour le tube 1

III.5.3. LSC

L'onglet LSC est composé de 3 parties :

- Recherche des LSC
- Résumé des LSC
- Résultats

➤ Recherche des LSC

L'étude des LSC est effectuée sur les cellules CD34+ / CD38- , appelées P6 et mises en évidence lors de l'étape de fenêtrage.

Booléenne sélectionnant la population P6 sur le tube 1 :

boolP6-T1 = (((time and livecells) and blasts) and mnc) and mnc34+) and d+-

Pour chaque marqueur présentant un intérêt dans la détection des LSC, 3 histogrammes bi-paramétriques ont été représentés :

- Le premier est fenêtré sur la population P6 et présente le fluorochrome d'intérêt (FLi) par rapport au CD38. Sur ce graphique, deux boîtes permettent la séparation des HSC et des LSC (Figure 41A).
- Le deuxième sert de contrôle : une population présentant un marquage positif ou négatif pour le FLi permet de fixer un seuil de significativité. Celui-ci est mis en évidence au moyen d'une fenêtre HSC liée au premier graphique (Figure 41B).
- Le troisième permet de visualiser les CD34+ totaux sur un plot CD34/CD38, pouvant faire apparaître les **LSC** au moyen d'un back-gating (Figure 41C).

Exemple :

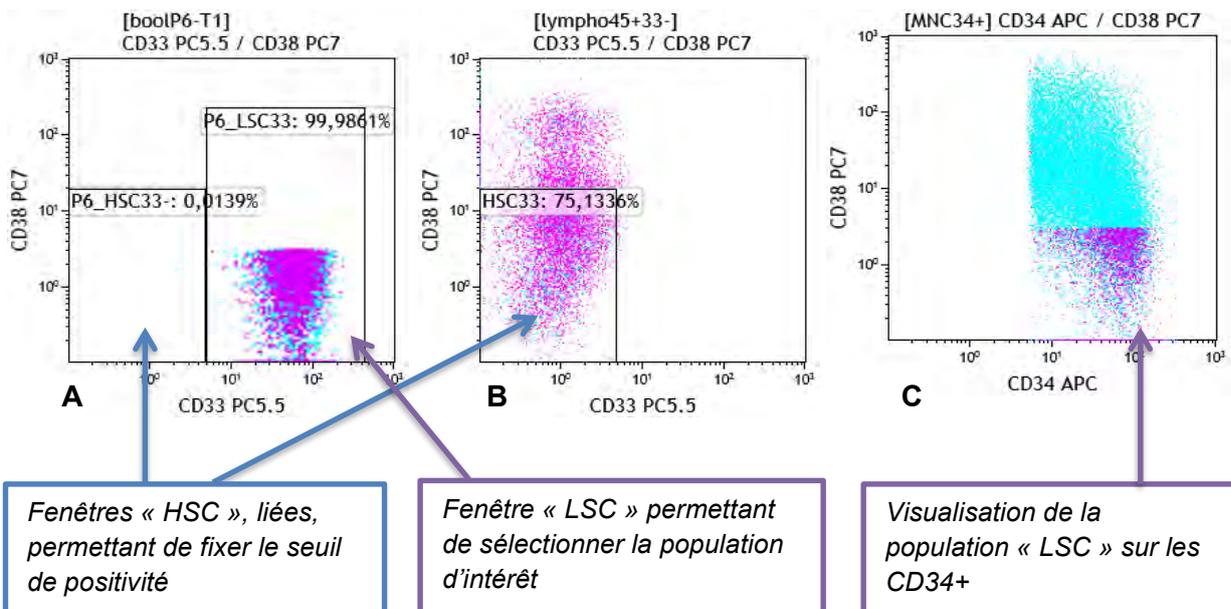


Figure 41. Stratégie d'analyse pour la détection des LSC.

➤ **Résumé des LSC**

Grâce à une booléenne, on visualise, sur différents histogrammes choisis selon la pertinence des marqueurs, les cellules présentant un phénotype LSC (Figure 42).

Booléenne permettant la synthèse des LSC :
LSC-T1 = (((p6_lsc7 and p6_lsc13) and p6_lsc33) and p6_lsc19) and p6_lsc117) and p6_lschladr

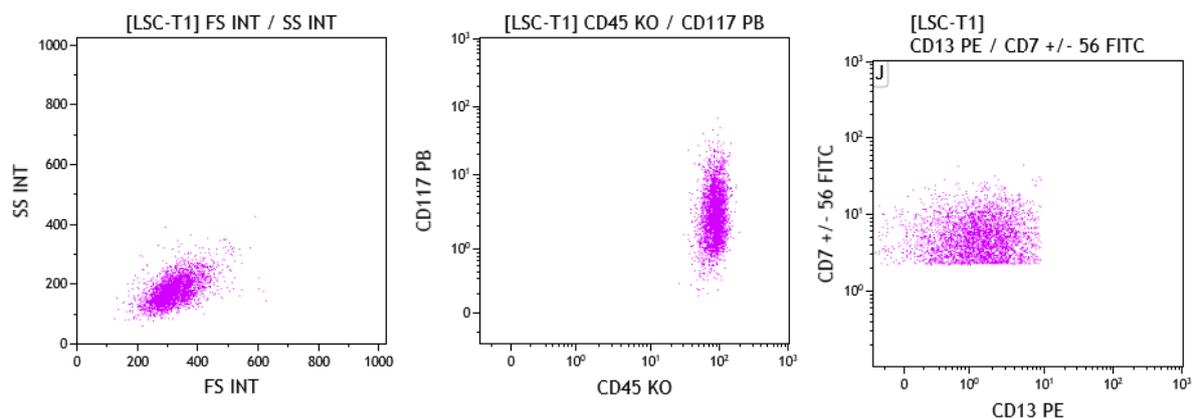


Figure 42. Exemple de LSC trouvées sur le tube 1

➤ **Synthèse**

De la même manière que pour les blastes LAIP, les résultats analytiques sont présentés sous forme de tableau (Figure 43) :

- Le nom du cytomètre utilisé
- Le nom du fichier brut
- La date d'acquisition
- La pureté médullaire CD34+ (à titre indicatif, non utilisé dans le rendu de résultat)
- Le nombre de cellules CD45+ et des CD34+
- Le nombre de cellules présentes en P6 ([boolP6-T1] Number)
- Le nombre de cellules présentant un phénotype HSC ([HSC-T1] Number)
- Le nombre de cellules présentant un phénotype LSC ([LSC-T1] Number)
- Le pourcentage de cellules présentant un phénotype LSC par rapport aux CD45 totaux
- La LOD
- Le pourcentage de cellules présentant un phénotype LSC par rapport aux blastes totaux

The unique cytometer ID specified by the user	AT10081
Name of the data file containing the data set	7+56_13_H
Date of data set acquisition	05-Sep-18
purete medullaire CD34 %	569,250
[WBC45+] Number	133 368
[MNC34+] Number	26 259
[boolP6-T1] Number	7 215
[HSC-T1] Number	0
[LSC-T1] Number	3 591
LSCT1 en % des WBC45+	2,693
LOD en % pour 50ev (sans correction de dilution)	0,037
LSCT1 en % des Blasts	3,395

Figure 43. Tableau de synthèse LSC-T1

III.6. Moelles contrôles

III.6.1. Rôle des moelles contrôles

La détection de la MRD par CMF fait appel à une connaissance approfondie des phénotypes présents dans des moelles contrôles. La recherche de LAIP est différente pour chaque patient. Les réglages du protocole d'analyse (ou « masque ») ayant permis d'obtenir un phénotype aberrant pour un malade donné sont appliqués à plusieurs échantillons de moelles contrôles afin d'obtenir la sensibilité du LAIP. Plus un LAIP est présent dans une moelle normale, plus il est difficile d'interprétation (vrai LAIP ? variations phénotypiques non pathologiques ?), plus sa sensibilité est mauvaise. Pour être validé, son taux doit être inférieur à 0,1% dans les moelles contrôles.

En plus de valider un LAIP, les échantillons contrôles permettent une amélioration des connaissances sur des marqueurs peu utilisés en routine au laboratoire (CD45RA, CLL-1, TIM-3...)

III.6.2. Choix des échantillons

Pour permettre une représentativité correcte, un pool de moelles contrôles a été mis en place. Afin de couvrir plusieurs situations médullaires, six échantillons ont été analysés. Le choix de ces prélèvements a été soumis à plusieurs critères :

- L'âge du patient : la fréquence des hémopathies augmentant avec l'âge, les patients de plus de 75 ans n'ont pas été retenus.
- La disponibilité d'un prélèvement médullaire sur EDTA non utilisé dans le cadre du diagnostic ou du suivi, ou de toute autre examen nécessaire au patient.
- L'évaluation cytologique effectuée par un cytologiste du laboratoire révélant :
 - Un aspect cytologique d'aspect normal ou inflammatoire ou régénératif
 - Une richesse normale ou augmentée
 - L'absence de dystrophie ou de critères évoquant une hémopathie

- Enfin, l'analyse globale du dossier clinico-biologique (indication du myélogramme, hémogramme, analyses spécialisées) est indispensable afin de déterminer si le prélèvement médullaire peut être considéré comme contrôle dans le cadre de l'évaluation de la MRD.

Le Tableau 13 retrace les différentes situations des échantillons patients ayant servi de moelles contrôles.

Tableau 13. Récapitulatif moelles contrôles

	MN1	MN2	MN3	MN4	MN5	MN6
Date	25/10/18	26/11/18	06/12/18	01/02/19	15/01/19	05/02/19
Age	75 ans	58 ans	14 ans	29 ans	35 ans	31 ans
Indication	Thrombopénie	Thrombopénie	Fièvre prolongée + AEG	Thrombopénie	Lymphocytose fluctuante	Suivi hémopathie
NFS	Anémie (9,38g/dL), thrombopénie discrète (131G/L)	Thrombopénie (86G/L)	Absence	Thrombopénie (46G/L)	Lymphocytose : 4.84G/L, 3.41G/L	Anémie (8,50g/dL)
Cytologie médullaire	Normale	Normale	Inflammatoire	Normale	Normale	Régénération
Autre						RC MRD ND en BM
Diagnostic retenu	PTI	PTI	Aucun	PTI	Aucun	RC LALB

III.6.3. Retraitement

Lors de l'étude de chaque prélèvement visant à quantifier le taux de maladie résiduelle, le pool de moelles contrôles est réanalysé en systématique. Au vu du nombre d'évènements nécessaires à l'obtention d'une sensibilité acceptable, les données deviennent vite volumineuses et sont donc difficilement traitables avec le matériel informatique du laboratoire.

Les blastes, cellules d'intérêt dans l'analyse de la MRD, présentent une intensité de signal faible dans le canal SS. Le principe du retraitement des moelles contrôles est de diminuer le nombre d'évènements non nécessaires à l'analyse (cellules autres que blastes). Le logiciel de programmation « R » a permis de supprimer informatiquement tous les évènements présentant un signal SS fort (regroupant principalement les cellules granuleuses matures).

III.6.3.1. Recueil des données brutes

Les échantillons contrôles ont été analysés comme un prélèvement standard avec suspicion diagnostique de LAM : préparation technique et acquisition des trois tubes du diagnostic T1, T2 et T3. Entre 500 000 et 1 000 000 d'évènements représentant des cellules vivantes ont pu être acquis.

III.6.3.2. Enregistrement des données

Les données brutes ont été renommées sous le format suivant :

« MOELLE_N_singles_X_Tn.LMD »

Avec :

- X : numéro de l'échantillon
- Tn : numéro du tube (1, 2 ou 3)

Elles ont ensuite été classées de manière systématique selon le tube utilisé lors de l'acquisition.

Cette étape fastidieuse est nécessaire pour la simplification de la procédure de retraitement par « R ».

III.6.3.3. Script « R »

Les scripts ayant permis l'allègement des données pour les trois tubes sont présentés en Annexe 4. Ils se décomposent en plusieurs parties :

- Ouverture du package « flowCore » préalablement installé et attribution du chemin de travail (*working directory*)

```
library(flowCore)
setwd("C:/Users/CMF/Documents/MRD LAM/LMD_Rangés/Moelles Normales/TUBE_1")
```

- Lecture des fichiers :

La fonction `read.flowSet` permet de lire plusieurs fichiers du même dossier (`path = « SINGLES »`) présentant la même extension (`pattern = « .LMD »`). Le `dataset` permet de prendre les données compensées (`dataset = 2`).

```
t1_comp<-read.flowSet(path = "SINGLES", pattern = ".LMD", dataset = 2)
```

- Réattribution des marqueurs :

Lors de la récupération des fichiers compensés, les différents canaux perdent le marqueur auquel ils sont associés. Il faut passer par une étape de réattribution :

```
## Attribution des noms de marqueurs aux différents canaux afin que le logiciel
Kaluza puissent les reconnaître.
name<-c("FS PEAK LIN","FS INT LIN","FS TOF LIN","SS PEAK LIN","SS INT LIN","FL1
INT LIN","FL2 INT LIN","FL3 INT LIN","FL4 INT LIN","FL5 INT LIN","FL6 INT LIN","FL7
INT LIN","FL8 INT LIN","FL9 INT LIN","FL10 INT LIN","TIME")
## S'il n'y a qu'une moelle normale, mettre un # devant les lignes 2 et 3
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T1.LMD"]].@parameters@data[["name"]]<-name
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T1.LMD"]].@parameters@data[["name"]]<-name
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T1.LMD"]].@parameters@data[["name"]]<-name
```

```
## Attribution de la description des marqueurs afin d'avoir le nom du marqueur
dans le logiciel Kaluza.
```

```
marqueurs<-c("FS PEAK LIN","FS INT LIN","FS TOF LIN","SS PEAK LIN","SS INT
LIN","CD7 +/- 56 FITC","CD13 PE","HLA DR ECD","CD33 PC5.5","CD38 PC7","CD34
APC","CD10 A700","CD19 A750","CD117 PB","CD45 K0","TIME")
```

```
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T1.LMD"]].@parameters@data[["desc"]]<-
marqueurs
```

```
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T1.LMD"]].@parameters@data[["desc"]]<-
marqueurs
```

```
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T1.LMD"]].@parameters@data[["desc"]]<-
marqueurs
```

- Visualisation des plots :

Il peut être utile de vérifier les histogrammes CD45 / SS afin de ne pas supprimer trop d'évènements. La présentation des graphiques peut être effectuée dans « R » (Figure 44).

```
plot(log(t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T1.LMD"]].@exprs[1:100000,15]),
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T1.LMD"]].@exprs[1:100000,5])
```

```
plot(log(t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T1.LMD"]].@exprs[1:100000,15]),
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T1.LMD"]].@exprs[1:100000,5])
```

```
plot(log(t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T1.LMD"]].@exprs[1:100000,15]),
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T1.LMD"]].@exprs[1:100000,5])
```

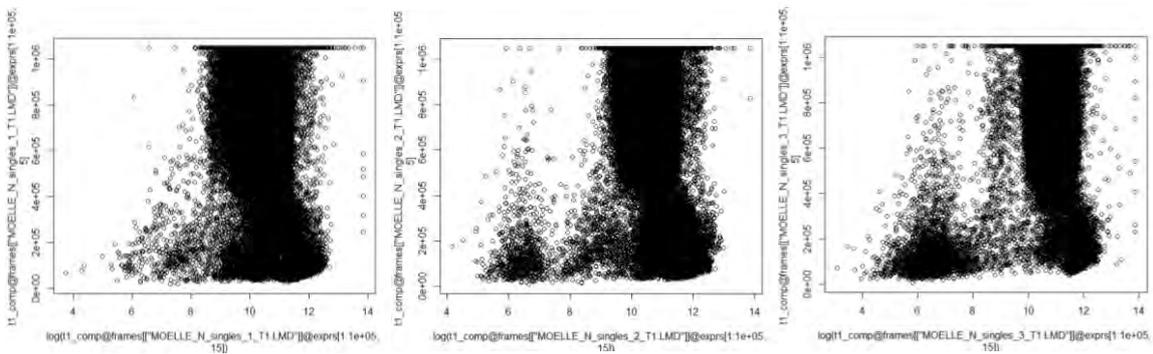


Figure 44. Exemples de représentation graphique CD45/SS de 3 échantillons médullaires contrôles sur "R"

- Elimination des évènements SS fort :

Le seuil de 600 000 a été fixé après visualisation sur Kaluza des blastes sur les différentes moelles contrôles (Figure 45).

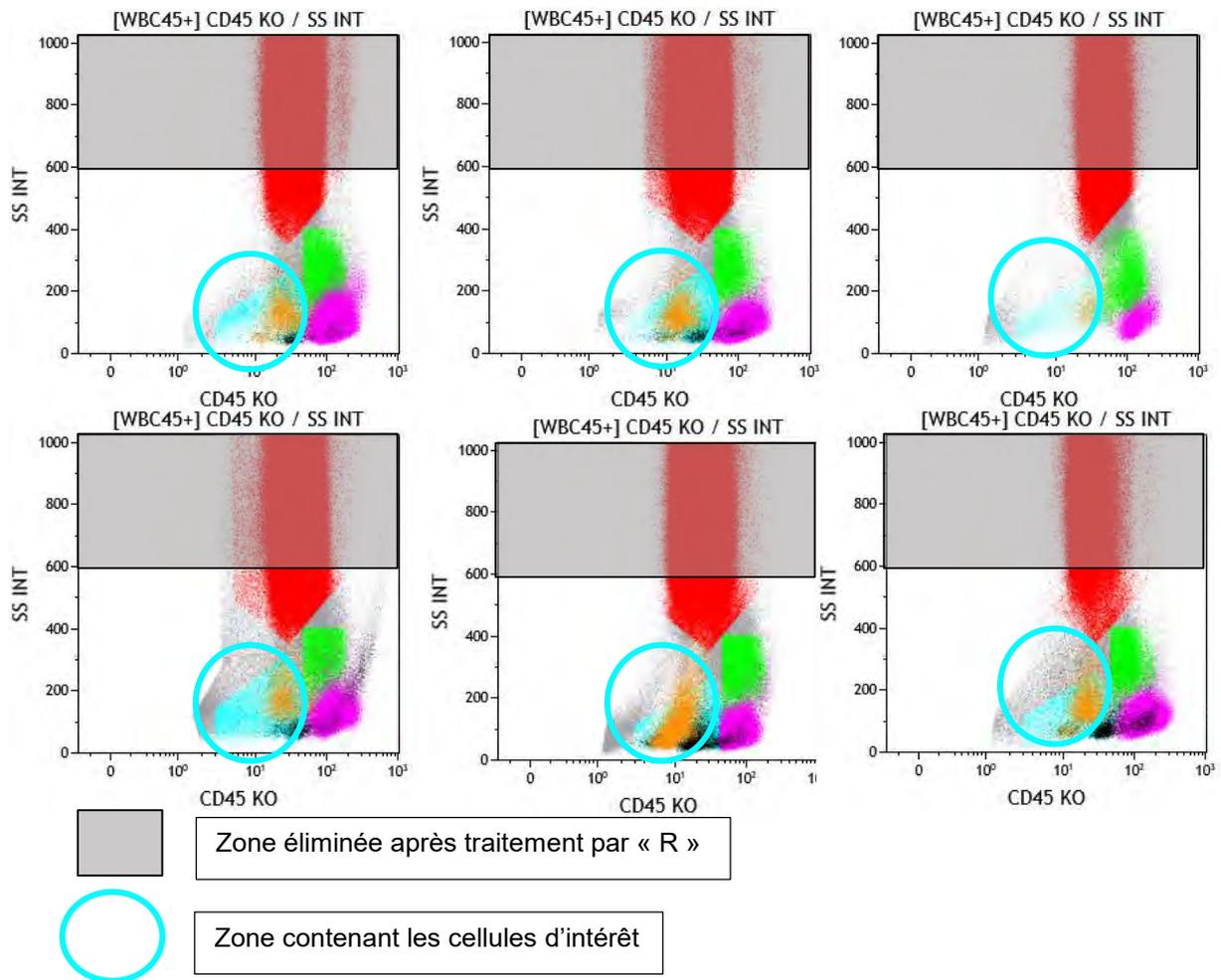


Figure 45. Représentation graphique de la zone éliminée après retraitement par "R"

```
## On enlève les SS fort en supprimant tous les évènements avec un signal SS >
600 000 (cf plot ci-dessus)
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T1.LMD"]].@exprs<-
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T1.LMD"]].@exprs[t1_comp@frames[["MOELLE_N_si
ngles_1_T1.LMD"]].@exprs[,5]<600000,]
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T1.LMD"]].@exprs<-
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T1.LMD"]].@exprs[t1_comp@frames[["MOELLE_N_si
ngles_2_T1.LMD"]].@exprs[,5]<600000,]
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T1.LMD"]].@exprs<-
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T1.LMD"]].@exprs[t1_comp@frames[["MOELLE_N_si
ngles_3_T1.LMD"]].@exprs[,5]<600000,]
```

- Enregistrement :

Une fois les évènements non voulus retirés, les fichiers sont enregistrés dans leur dossier d'origine, sous format .FCS (Flow Cytometry Standard) et renommés comme suit :

« X_MN_SSlow_singles_Tn.FCS »

```
write.flowSet(t1_comp, outdir = "SINGLES", filename = "MN_SSlow_singles_T1")
```

III.6.3.4. « Merge »

Une fois les données retraitées, une étape de fusion peut être effectuée afin de travailler avec un seul fichier regroupant toutes les moelles contrôles. Sur Kaluza® cette étape est appelée « merge ». Bien que ce regroupement permette la gestion des échantillons contrôles sur une seule page, il est toujours possible de visualiser et d'analyser les données moelle par moelle grâce au graphique « TIME » (Figure 46).

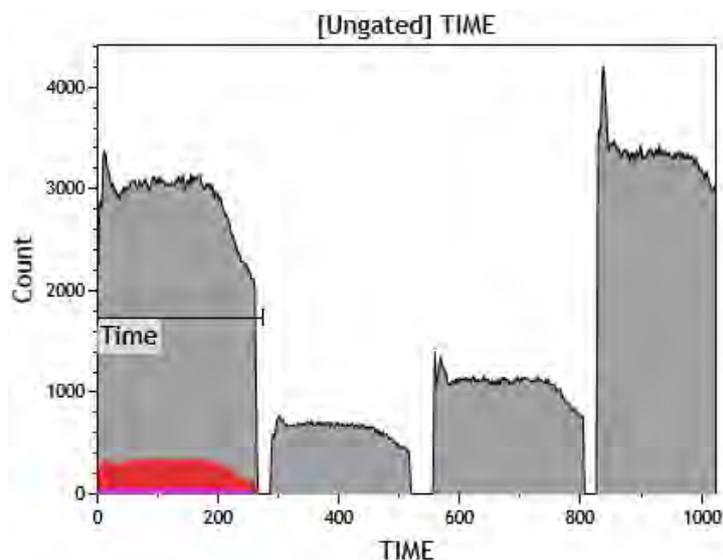


Figure 46. Fenêtre TIME permettant la sélection une à une des différentes moelles contrôles

III.7. Evaluation de la MRD

III.7.1. Préambule

Comme le sous-entend l'architecture du protocole d'analyse, la détection et l'évaluation des blastes LAIP et des LSC sont précédées de deux étapes primordiales :

- Une vérification visuelle des dix premiers histogrammes communs aux trois tubes permet la validation technique de l'acquisition.
- Le fenêtrage des différentes populations d'intérêt (LiveCells, CD45+, CD34+, blastes, granuleux, lymphocytes, monocytes, hématogones) est, quant à elle, indispensable à la suite de l'analyse.

III.7.2. Détermination du (des) phénotype(s)

III.7.2.1. LAIP

Plusieurs étapes sont nécessaires à la détermination d'un LAIP :

- Sélection des événements CD34+ et / ou CD117+ (Figure 47-1)
- Repérage parmi la population myéloblastique principale d'une anomalie phénotypique sur un ou plusieurs histogrammes (Figure 47-2 : perte d'expression du HLA-DR).
- Sélection de la sous-population d'intérêt sur le ou les graphiques choisis (Figure 47-2). Sur les histogrammes non déterminants pour l'extraction des blastes LAIP, la totalité de la population blastique peut être sélectionnée (Figure 47-3).

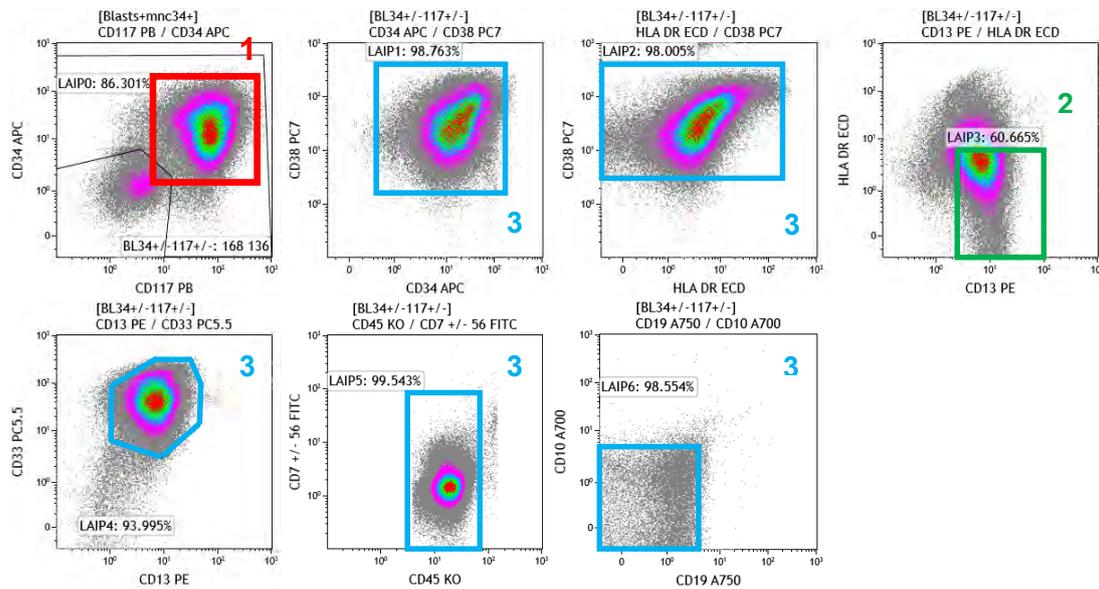


Figure 47. Exemple de détermination d'un LAIP

Une fois déterminé, le « masque LAIP » doit être appliqué aux moelles contrôles à la recherche de cellules présentant le même phénotype (Figure 48). Pour valider le fenêtrage, le taux de blasts LAIP doit être inférieur à 0.1% des leucocytes totaux pour chaque échantillon contrôle.

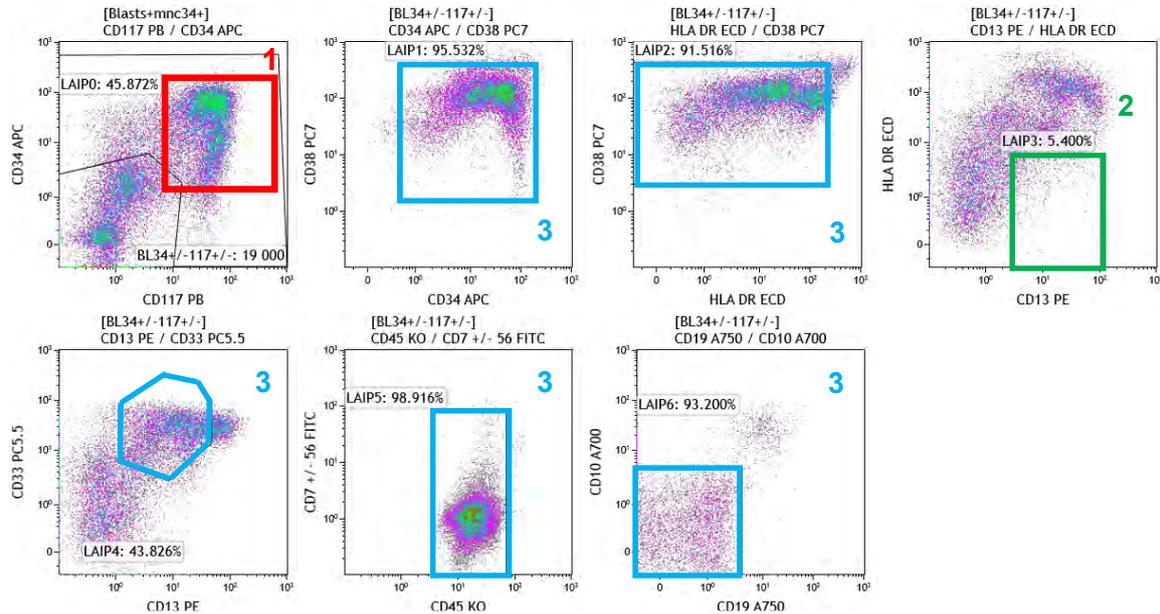


Figure 48. Application du "masque-LAIP" à un pool de moelles contrôles

Il est possible de ne pas extraire de phénotypes aberrants au sein des différentes sous-populations blastiques du patient. Dans ce cas, l'évaluation de la MRD par stratégie LAIP ne peut être réalisée.

III.7.2.2. LSC

De la même manière que pour les LAIP, la détermination des LSC se décompose en plusieurs étapes :

- Fenêtrage des événements CD34+ / CD38- parmi les cellules CD34+, dans l'onglet *Gating* (Figure 49-1)
- Recherche d'anomalies phénotypiques au sein des blasts sélectionnés (Figure 49-2). Les marqueurs présents dans le tube 2 ne présentent pas tous un intérêt dans la recherche des LSC. La booléenne permettant la synthèse et l'évaluation des LSC est basée sur la fonction *AND* : seuls les événements présents dans **toutes** les fenêtres de la formule sont ainsi pris en compte. Or il suffit d'un seul marqueur aberrant pour affirmer la présence de ce type cellulaire. Il est donc nécessaire pour certains anticorps non pertinents (sur la Figure 49, le CD19) de s'affranchir de leur utilisation. Pour cela, la sélection de toutes les cellules du ou des histogrammes concernés est nécessaire (Figure 49-3).

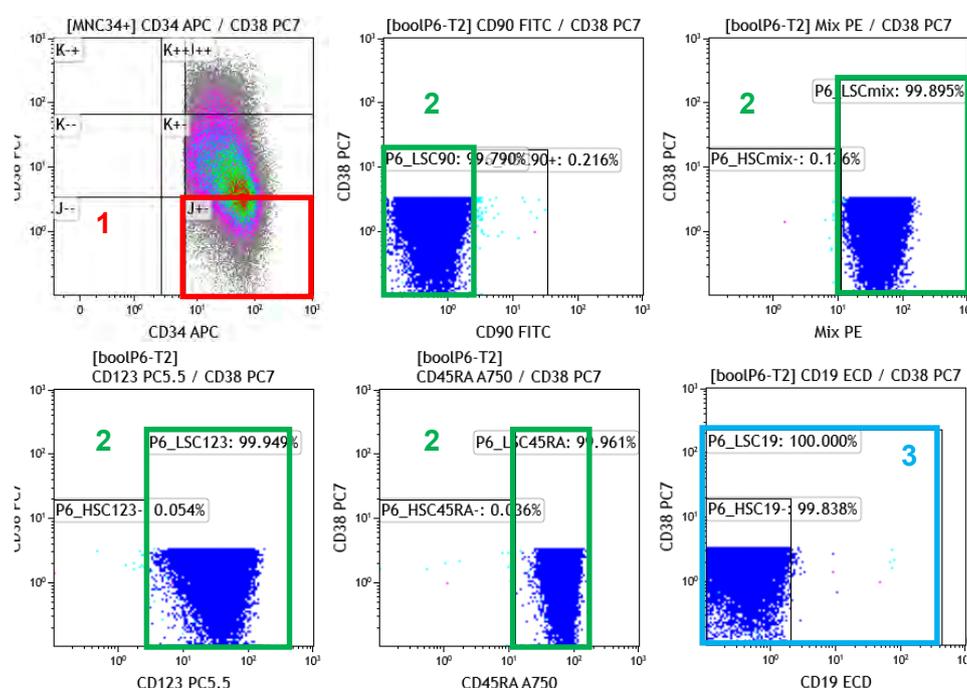


Figure 49. Exemple de recherche de LSC. Phénotype retenu : CD34+, CD38-, Mix + (CD97, CLL-1, TIM-3), CD19-, CD123+, CD45RA+

Le « masque LSC » déterminé est ensuite appliqué aux moelles contrôles à la recherche de cellules phéno-identiques (Figure 50). Un seuil inférieur à 0.01% des leucocytes totaux pour chaque échantillon contrôle permet la validation du fenêtrage.

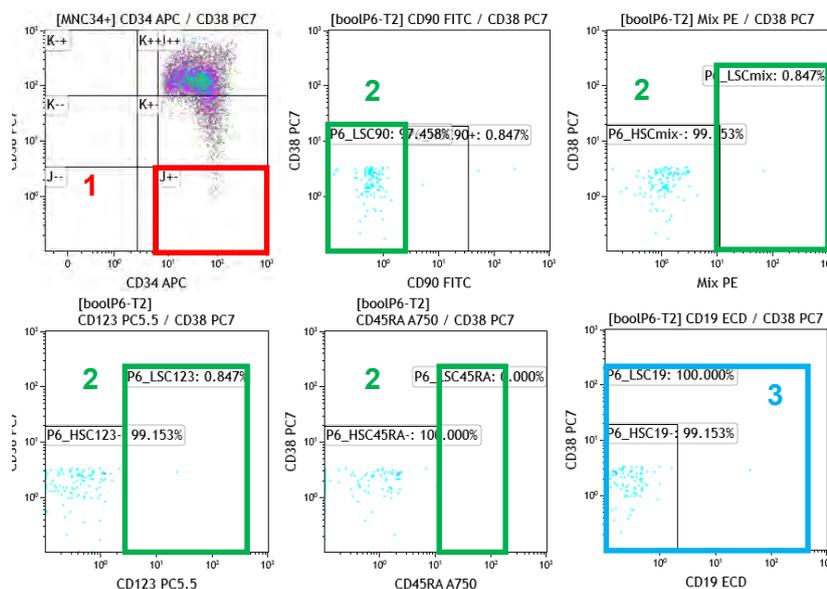


Figure 50. Application du "masque-LSC" au pool de moelles contrôles

Une population de cellules CD34+ représentant au minimum 1% des CD45+ totaux est nécessaire pour la recherche des LSC. Dans ce cas, la MRD par l'approche LSC est non-informative.⁴⁴

III.7.2.3. Notion de sensibilité et de significativité

La sensibilité d'un masque LAIP ou LSC est évaluée pour chaque patient et pour chacun des différents tubes impliqués. Elle est définie par le taux de cellules phéno-identiques retrouvé dans les moelles contrôles après application de ces masques.

Pour la stratégie LAIP, la limite est de 0,1% de blastes anormaux parmi les leucocytes totaux (ou 10^{-3}). Un taux supérieur ne permet pas de valider le masque-LAIP et entraîne donc une modification de celui-ci voire même l'impossibilité de suivre la MRD via cette stratégie.

Pour la recherche de cellules souches leucémiques, une valeur supérieure à 0,01% (ou 10^{-4}) entraîne la non-informativité de la stratégie LSC pour l'évaluation de la MRD.

Les cellules recherchées sont en général présentes à taux faible. Le nombre de leucocytes acquis lors de l'analyse est donc important pour une détection et une évaluation efficace du taux de myéloblastes pathologiques. Les recommandations préconisent l'acquisition minimale de 500 000 leucocytes par tubes. Pour être significatif, le nombre minimum d'évènements présentant le ou les phénotypes aberrants recherchés doit être de 50 cellules. Ces deux données nous permettent ainsi de calculer la limite de détection (LOD pour *Limit Of Detection*) selon la formule suivante :

$$LOD = \frac{nb\ significantif\ d'évènements}{Cellules\ vivantes}$$

Une LOD inférieure à 10^{-4} est essentielle pour obtenir une sensibilité optimale. Dans le cas où ce ratio est supérieur au standard attendu, la valeur de sensibilité retenue est égale au taux le plus grand entre la LOD et le pourcentage de cellules phéno-identiques retrouvées dans les moelles contrôles.

Le seuil de significativité est la valeur seuil au-delà de laquelle la présence de cellules pathologiques est confirmée, conduisant à un taux positif de MRD. Elle est de 0,1% (10^{-3}) pour la stratégie LAIP et de 0,01% (10^{-4}) pour l'approche LSC.

Pour la stratégie LSC, la plus grande valeur entre la LOD, la sensibilité évaluée et le seuil de significativité est pris comme limite de positivité.

III.7.3. Suivi

Lors du suivi, les protocoles d'analyses du diagnostic spécifiques de chaque patient sont appliqués aux données brutes issues du cytomètre. La vérification visuelle ainsi que le fenêtrage des populations d'intérêt sont effectuées de la même manière qu'au diagnostic. L'application des « masques » LAIP et LSC sur les échantillons du suivi permet la recherche de cellules possédant le(s) phénotype(s) aberrant(s) identifié(s) lors du premier prélèvement. Toute modification du protocole (re-fenêtrage des populations d'intérêt, sélection d'une nouvelle population aberrante...) entraîne systématiquement la réévaluation de la sensibilité par le biais des moelles contrôles.

III.7.3.1. LAIP / *Different from Normal* (DfN)

L'évaluation de la MRD par la stratégie LAIP est effectuée en relevant le taux de blastes présentant le phénotype recherché puis en le comparant au seuil de significativité établi. La MRD est dite positive pour un ratio supérieur à la limite de positivité. Dans le cas contraire, l'évaluation de la MRD est inférieure au seuil précédemment cité.

La recherche d'un sous-clone aberrant non vu au diagnostic via l'approche DfN est systématiquement effectuée, sans prendre en compte le résultat de la MRD selon la stratégie LAIP. La mise en évidence d'un tel type de population entraîne un re-fenêtrage permettant la détermination d'un phénotype différent de celui du diagnostic. Le nouveau « masque » est d'abord appliqué aux moelles contrôles afin d'être validé puis, le cas échéant, est adapté à tous les prélèvements précédents à la recherche de la sous-population précédemment décrite. Ceci étant fait afin de déterminer le taux de base du clone nouvellement décrit.

Dans l'éventualité de la mise en évidence d'un tel type de cellules, le suivi est effectué sur les deux populations.

III.7.3.2. LSC

Les LSC possédant une base phénotypique décrite (CD34+ / CD38- avec un ou plusieurs marqueurs aberrants), le prélèvement diagnostique n'est pas indispensable à leur recherche lors du suivi. Le « masque » de base est néanmoins utilisé pour faciliter la mise en exergue de ces cellules. De la même manière que pour les LAIP, le taux de blastes présentant un phénotype LSC par rapport aux CD45 totaux est pris en compte et comparé à la sensibilité choisie. S'il est supérieur, la MRD est positive. Dans le cas contraire, la MRD est dite négative au seuil de significativité retenu.

III.7.4. Expression des résultats

Au final, plusieurs critères sont indispensables pour rendre un taux de MRD positif :

- La présence d'une ou plusieurs anomalies phénotypiques
- Un nombre minimum de 50 évènements regroupés en cluster
- Un taux calculé supérieur à la limite de positivité définie (seuil de significativité de 10^{-3} pour les LAIP ; taux le plus élevé entre la sensibilité évaluée par rapport aux moelles contrôles, la LOD et le seuil de significativité pour les LSC)

La MRD peut être rendue non informative ou inférieure au seuil de significativité dans les cas suivants :

- La présence de blastes objectivée sur l'histogramme CD45/SS ne présentant pas d'anomalies phénotypiques significatives
- Le taux de cellules anormales est inférieur aux différents seuils de significativité établis

Conformément aux recommandations du groupe ALFA-FILO émises dans les protocoles de traitement du BIG et de l'ALFA 1200, le compte-rendu délivré aux médecins hématologues comporte plusieurs points :

- Une évaluation de la représentativité médullaire de l'échantillon estimée par :
 - La formule de Holdrinet
 - Le taux de CD34+ par tube annotant de la potentielle dilution du prélèvement pour un taux inférieur à 2000 évènements CD34+
- Pour l'évaluation de la MRD via l'approche LAIP/DFN :
 - Le profil phénotypique défini
 - Le seuil de sensibilité de l'analyse
 - Le résultat :
 - Positif (supérieur à 10^{-3} ou 0.1%) : Valeur chiffrée en % des leucocytes totaux (CD45+)
 - Inférieur au seuil de significativité établi (10^{-3} ou 0.1%)
- Pour l'évaluation de la MRD via l'approche LSC :
 - Le profil phénotypique utilisé pour identifier les LSC
 - Le seuil de sensibilité de l'analyse
 - Le résultat :
 - Positif :
 - Au diagnostic : Valeur chiffrée en % des **blastés totaux**
 - Au suivi : Valeur chiffrée en % des leucocytes totaux
 - Inférieur au seuil de significativité établi

Tout compte-rendu fait l'objet d'un commentaire et d'une conclusion expliquant les différents résultats obtenus.

IV. RESULTATS

IV.1. Mise en place du nouveau panel LAM

IV.1.1. Echantillons

La comparaison entre le nouveau panel et l'ancien a été effectuée sur 16 échantillons, recrutés à partir d'octobre 2018 jusqu'en janvier 2019 :

- 12 patients atteints de LAM
- 1 patient présentant une leucémie aigüe lymphoblastique B
- 3 moelles contrôles

Les échantillons médullaires représentaient 13 prélèvements tandis que 3 étaient issus du sang périphérique.

IV.1.2. Résultats

Pour des raisons techniques et budgétaires, les 4 tubes n'ont pas été réalisés pour l'intégralité des patients hormis le tube 1. Celui-ci présente des résultats cohérents sauf pour un patient. Cela peut s'expliquer par l'oubli de deux anticorps lors de la réalisation technique.

Le tube 2 a été réalisé pour 11 échantillons. La majorité des anticorps présents dans ce tube n'étant pas utilisée dans l'ancien panel, tous les marqueurs n'ont pas pu être évalués (CD90, CD97, TIM3, CLL-1, CD45RA). Aucune incohérence n'a été notée lors de la vérification.

Le tube 3 a été réalisé pour les moelles contrôles ainsi que pour les patients pour lesquels une évaluation de la MRD était souhaitée. Ainsi parmi les 6 échantillons testés, aucun marqueur du nouveau panel n'a montré d'incohérence avec ceux de l'ancien.

Les histogrammes obtenus durant cette évaluation sont disponibles dans l'Annexe 3. Ils confirment la cohérence du nouveau panel. La mise en production a été effectuée suite à cette évaluation.

IV.2. Evaluation de la maladie résiduelle minimale

IV.2.1. Patients

Un total de 26 patients a été inclus dans ce travail, représentant 70 échantillons dont 63 d'origine médullaire et 7 issus du sang périphérique. Ils sont répartis comme suit :

- Echantillon diagnostique : 23
- Suivi MRD 1 : 17
- Suivi MRD 2 : 15
- Suivi MRD 3 : 11
- Suivi MRD 4 : 2
- Suivi MRD 5 : 1
- Autres : 1

Tous les résultats de patients intégrés dans le cadre de ce travail, et rendus aux hématologues cliniciens ont été obtenus par deux opérateurs différents puis confrontés par la suite.

IV.2.2. LAIP

La détermination et/ou le suivi d'un phénotype aberrant ont été effectués sur le T1 pour 66 échantillons et 4 sur le T3. Sept prélèvements se sont révélés non informatifs pour la détermination de la MRD par stratégie LAIP :

- 3 échantillons ont été analysés avant août 2018 (patients 3 et 4) via un protocole ne présentant pas les réglages définitifs (nombre d'anticorps différents).
- Pour le patient 18 (4 échantillons) : lors de l'analyse de l'échantillon diagnostique, deux anticorps (dirigés contre le CD117 et le CD33) n'ont pas été distribués dans le tube 1 et aucun phénotype aberrant n'a été retrouvé sur aucun des trois tubes rendant l'évaluation au diagnostic et au suivi non informative par stratégie LAIP/DfN.

IV.2.2.1. Description des LAIP

Patient	Phénotype
1	CD34- CD117+ CD38+
2	CD33- CD13+ CD7+
3	CD34- CD117+ CD38+ CD13- CD33+
4	HLA DR- CD13+ CD33-
5	CD34+ CD117- HLA DR++
6	CD34- CD56+
7	CD33- CD13+
8	HLA DR- CD38f CD13+
10	CD34- CD117+ CD38+
11	CD34- CD33++ CD13f
12	CD33- CD13f CD19+
13	CD34- HLA DR-
14	CD34- HLA DR-
15	CD34+ CD117- CD19+
16	CD33- CD13f
17	CD34- CD33- CD13+ CD7+
19	CD34- HLA DR-
20	CD34++ CD33f
21	CD34- CD117+ CD13- HLA DR-
22	CD34- HLA DR-
23	CD34++ CD38f HLA DR+
24	CD34- HLA DR-
25	CD13+ CD33-
26	HLA DR- CD13+

Tableau 14. LAIP identifiés sur le tube 1 par patient

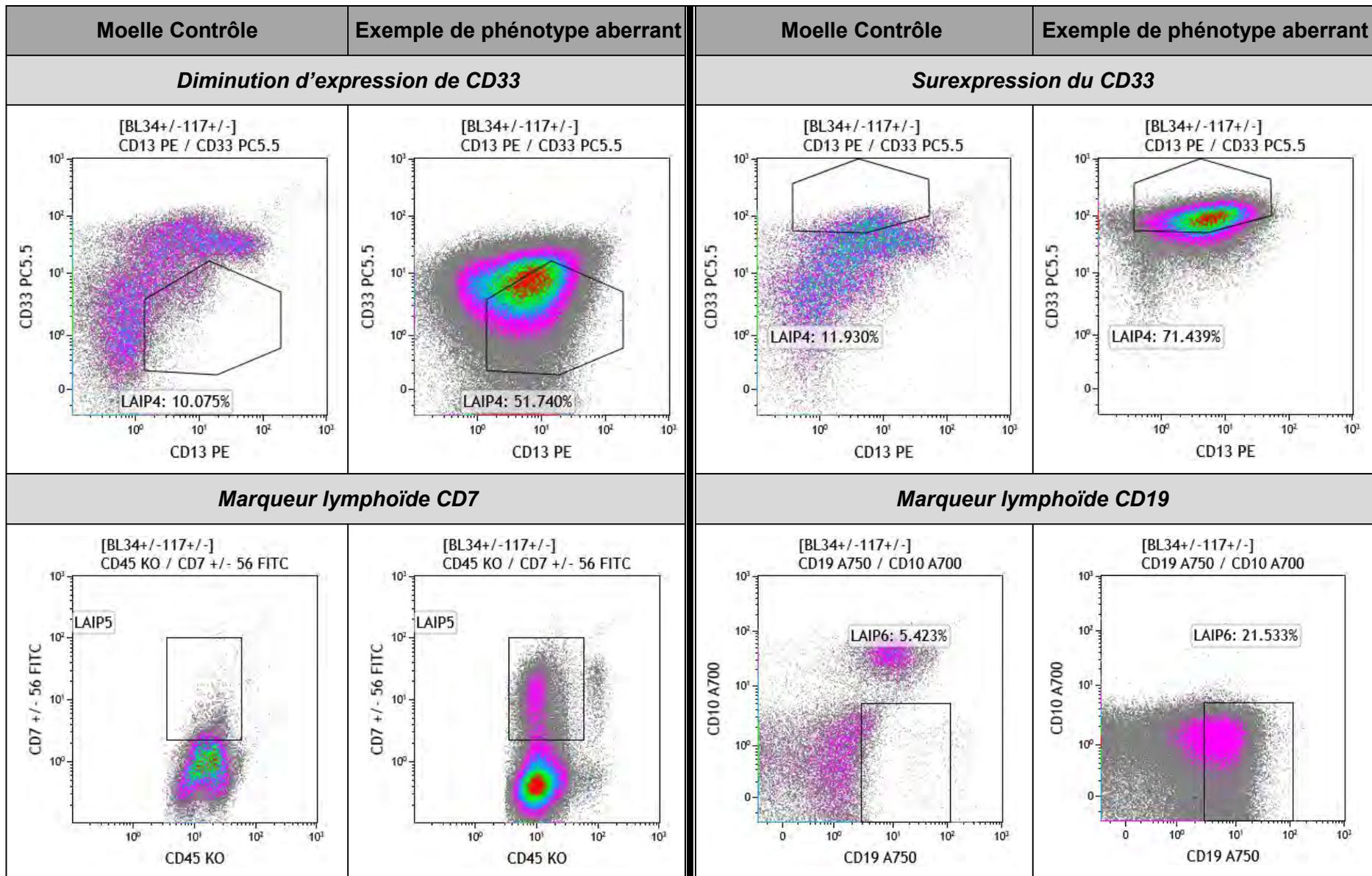
Au vu des résultats obtenus, la perte d'expression du marqueur HLA DR sur les populations blastiques permet une bonne identification de ces cellules, de même que la perte d'expression du CD33 associée à la positivité du CD13 (Tableau 14).

Des exemples de LAIP représentés sous formes d'histogrammes et appliqués aux moelles contrôles sont présentés dans le Tableau 15

Tableau 15. Histogrammes montrant des exemples de LAIP retrouvés chez différents patients comparés aux mêmes histogrammes issus des moelles contrôles

Moelle Contrôle	Exemple de phénotype aberrant	Moelle Contrôle	Exemple de phénotype aberrant
Diminution d'expression de CD34 et de HLA DR		Absence de CD117	
<p>[BL34+/-117+/-] HLA DR ECD / CD34 APC</p> <p>LAIP2: 7.344%</p>	<p>[BL34+/-117+/-] HLA DR ECD / CD34 APC</p> <p>LAIP2: 42.717%</p>	<p>[Blasts+mnc34+] CD117 PB / CD34 APC</p> <p>LAIP0: 2.325%</p> <p>BL34+/-117+/-: 20 463</p>	<p>[Blasts+mnc34+] CD117 PB / CD34 APC</p> <p>LAIP0: 67.210%</p> <p>BL34+/-117+/-: 276 142</p>
Diminution d'expression du HLA DR		Surexpression de HLA DR et diminution d'expression du CD38	
<p>[BL34+/-117+/-] CD13 PE / HLA DR ECD</p> <p>LAIP3: 2.297%</p>	<p>[BL34+/-117+/-] CD13 PE / HLA DR ECD</p> <p>LAIP3: 53.913%</p>	<p>[BL34+/-117+/-] HLA DR ECD / CD38 PC7</p> <p>LAIP2</p>	<p>[BL34+/-117+/-] HLA DR ECD / CD38 PC7</p> <p>LAIP2</p>





IV.2.2.2. Nombre d'évènements

Le nombre optimal d'évènements représentant les leucocytes totaux à acquérir durant l'analyse est de 500 000 ou plus. Parmi les échantillons informatifs, seuls 24 répondent à ce critère. Au-delà de 400 000 évènements la sensibilité est peu impactée lorsque le LAIP décrit est déterminant. En deçà de cette valeur l'évaluation de la MRD est rendue si elle est positive. Si elle est négative, un commentaire accompagne le résultat signalant la mauvaise acquisition et donc une perte de sensibilité non négligeable pour la recherche de LAIP.

Tableau 16. Nombre d'évènements CD45+ acquis lors de la recherche de LAIP

Acquisition	Nombre d'évènements	Nombre d'échantillons
Optimale	> 500 000	24
Acceptable	400 000 – 499 999	15
A interpréter	100 000 – 399 999	20
Non acceptable	< 100 000	4

IV.2.3. LSC

L'évaluation de la charge en cellules leucémiques a été effectuée sur 60 échantillons au total : 58 sur le T2 et seulement 2 informatifs sur le T1. En plus des prélèvements sanguins (7), les échantillons de trois patients n'ont pas bénéficié de l'évaluation de la charge en LSC :

- Les patients 1 (1 échantillon) et 19 (1 échantillon) ont un taux de blastes CD34+ inférieur à 1% des blastes totaux.
- Pour le patient 25 (1 échantillon), l'anticorps dirigé contre le CD90 n'a pas été distribué lors de l'étape analytique rendant impossible l'interprétation.

IV.2.3.1. Description des LSC

Parmi les 60 échantillons analysés, 15 ont un taux de LSC parmi les leucocytes totaux supérieurs au seuil de détection. Pour le tube 2, représentant 13 échantillons positifs, les marqueurs ayant permis l'identification des LSC dans les différents échantillons sont :

- Principalement le CD45 RA (11 / 13 échantillons) ainsi que le Mix contenant les trois anticorps CD97, TIM-3 et CLL-1 (11 / 13 échantillons)
- La présence de CD123 dans 2 échantillons diagnostics

Le tube 1 a permis la détermination de LSC dans seulement 2 échantillons. Le premier présentant des cellules souches coexprimant le CD7 ainsi que le CD33, tandis que chez le deuxième seul le CD33 présentait une significativité.



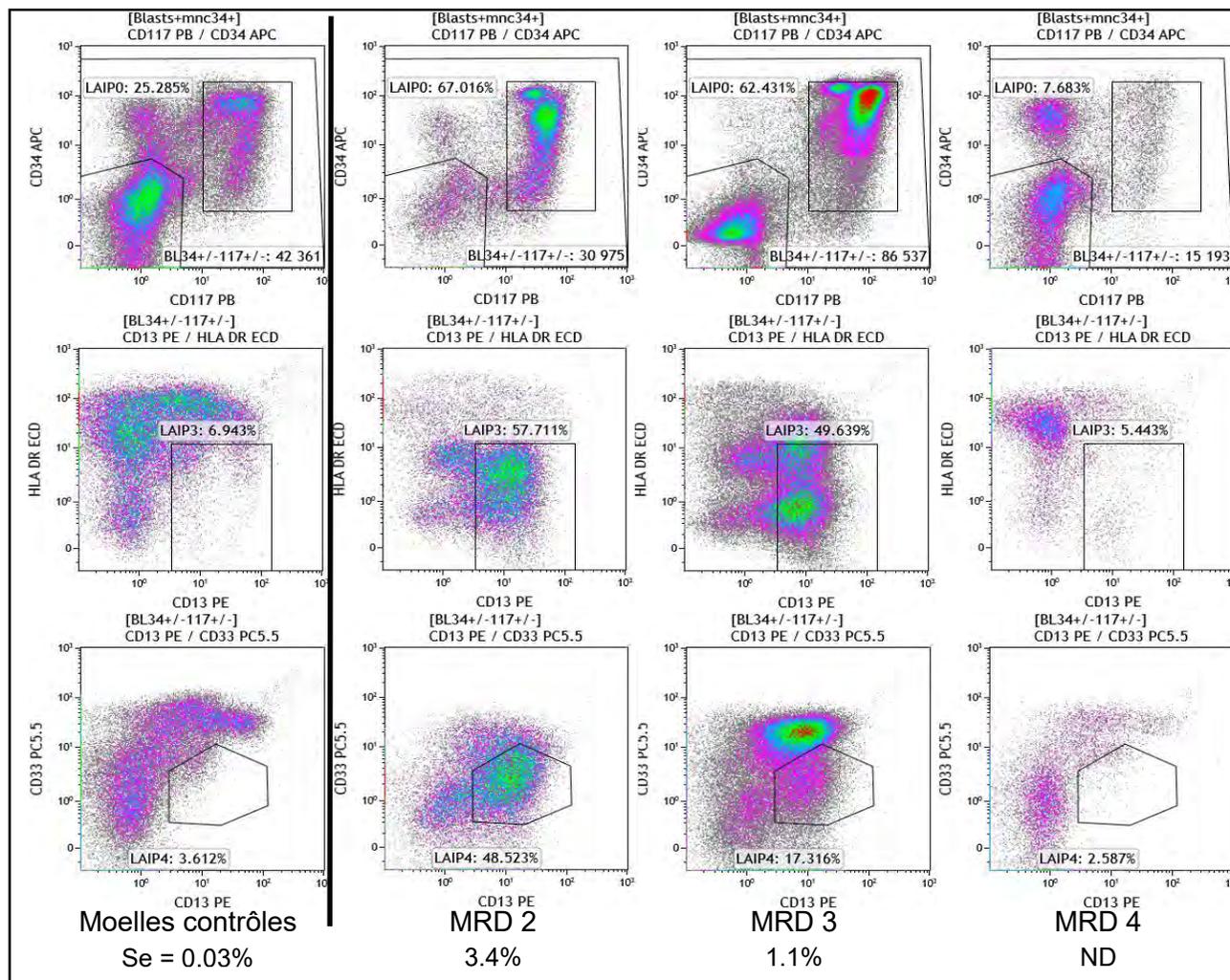
IV.2.3.2. Nombre d'évènements

De la même manière que pour la recherche des LAIP, le nombre optimal de leucocytes totaux à acquérir durant l'analyse est de 500 000 ou plus. En deçà de cette valeur, le taux de LSC est rendu s'il est positif et lorsque les marqueurs utilisés pour la recherche de LSC permettent une bonne distinction entre les différentes populations. Si elle est négative, un commentaire accompagne le résultat signalant la mauvaise acquisition et donc une perte de sensibilité non négligeable pour la recherche de LSC.

Tableau 17. Nombre de d'évènements CD45+ acquis lors de la recherche de LSC

Acquisition	Nombre d'évènements	Nombre d'échantillons
Optimale	> 500 000	27
Acceptable	400 000 – 499 999	12
A interpréter	100 000 – 399 999	19
Non acceptable	< 100 000	2

IV.2.1. Exemples de détermination de la MRD par CMF



Les deux premiers points du **patient 4** (Figure 51), le diagnostic et la MRD 1, ont été évalués avec un protocole antérieur à celui mis en place au cours de ce travail. Les résultats obtenus ne peuvent donc pas être correctement interprétés. Les échantillons ultérieurs ont été évalués par la stratégie différent from normal (DfN). La perte de HLA DR combinée à la faible expression du CD33 permet de détacher une sous-population nette présentant un phénotype aberrant. Les taux évalués pour les points MRD 2 et MRD 3 sont supérieurs au seuil de significativité fixé à 0,1%. Le dernier point de suivi présente un échantillon post-allogreffe, rendant un ratio inférieur au seuil de significativité.

Figure 51. **PATIENT 4 – RECHERCHE DE LAIP par DfN** : Histogrammes d'intérêt permettant l'évaluation du taux de blastes LAIP au diagnostic et au suivi. De gauche à droite : « masque » LAIP appliqué aux moelles contrôles ; évaluation de la MRD ; la MRD4 correspond à un échantillon médullaire post-allogreffe



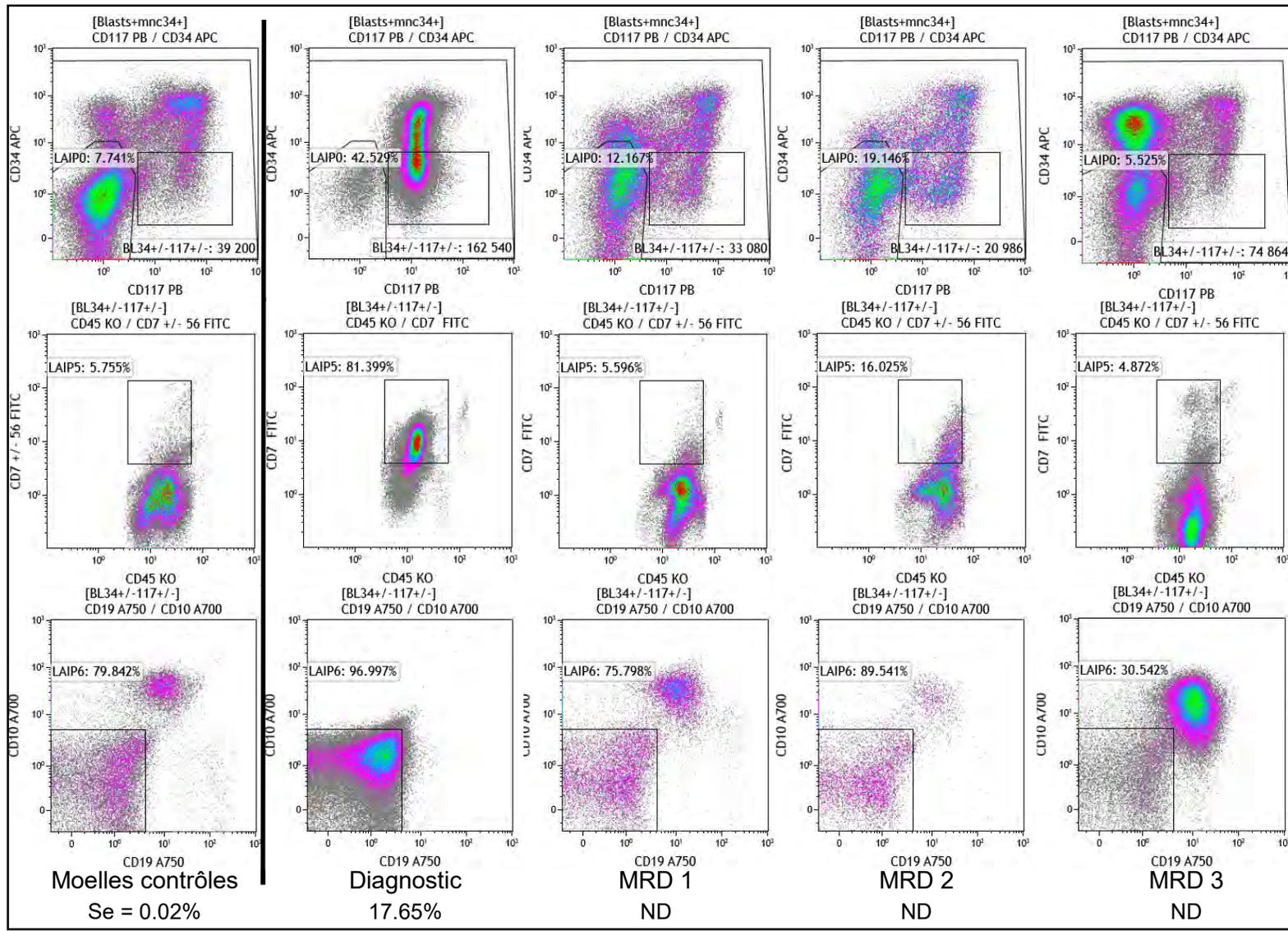


Figure 52. **PATIENT 6 – RECHERCHE DE LAIP** : Histogrammes d'intérêt permettant l'évaluation du taux de blasts LAIP au diagnostic et au suivi. De gauche à droite : « masque » LAIP appliqué aux moelles contrôles ; évaluation diagnostique ; évaluation de la MRD



Le **patient 6** (Figure 52) possède un marqueur lymphoïde (CD7) présent sur une partie des blastes CD34 négatifs. A noter, le point de MRD 3 montre un cluster de phénotype CD34+ CD117- CD19+ CD10+ (Figure 53). Ces événements représentent les hématogones et témoignent de la régénération médullaire.

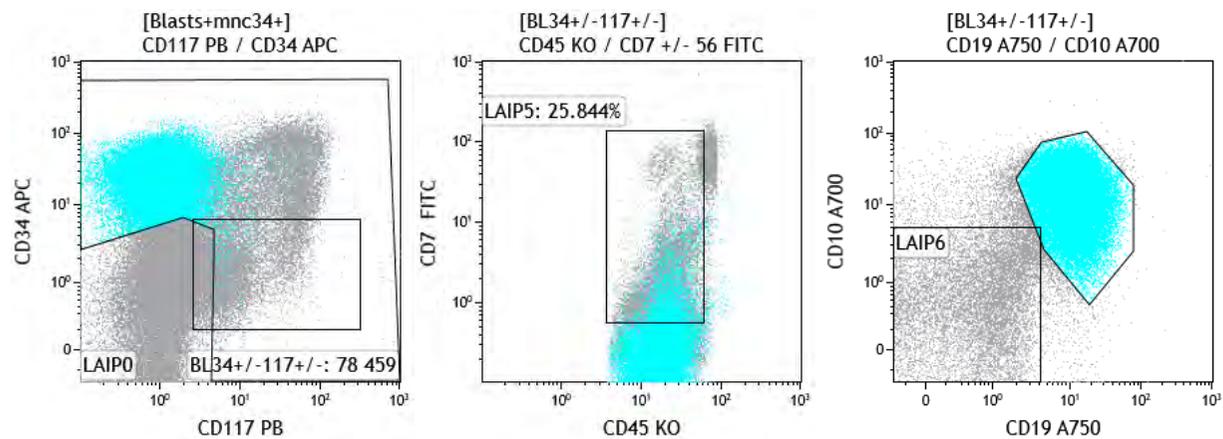


Figure 53. Patient 6 - MRD 3 - Hématogones



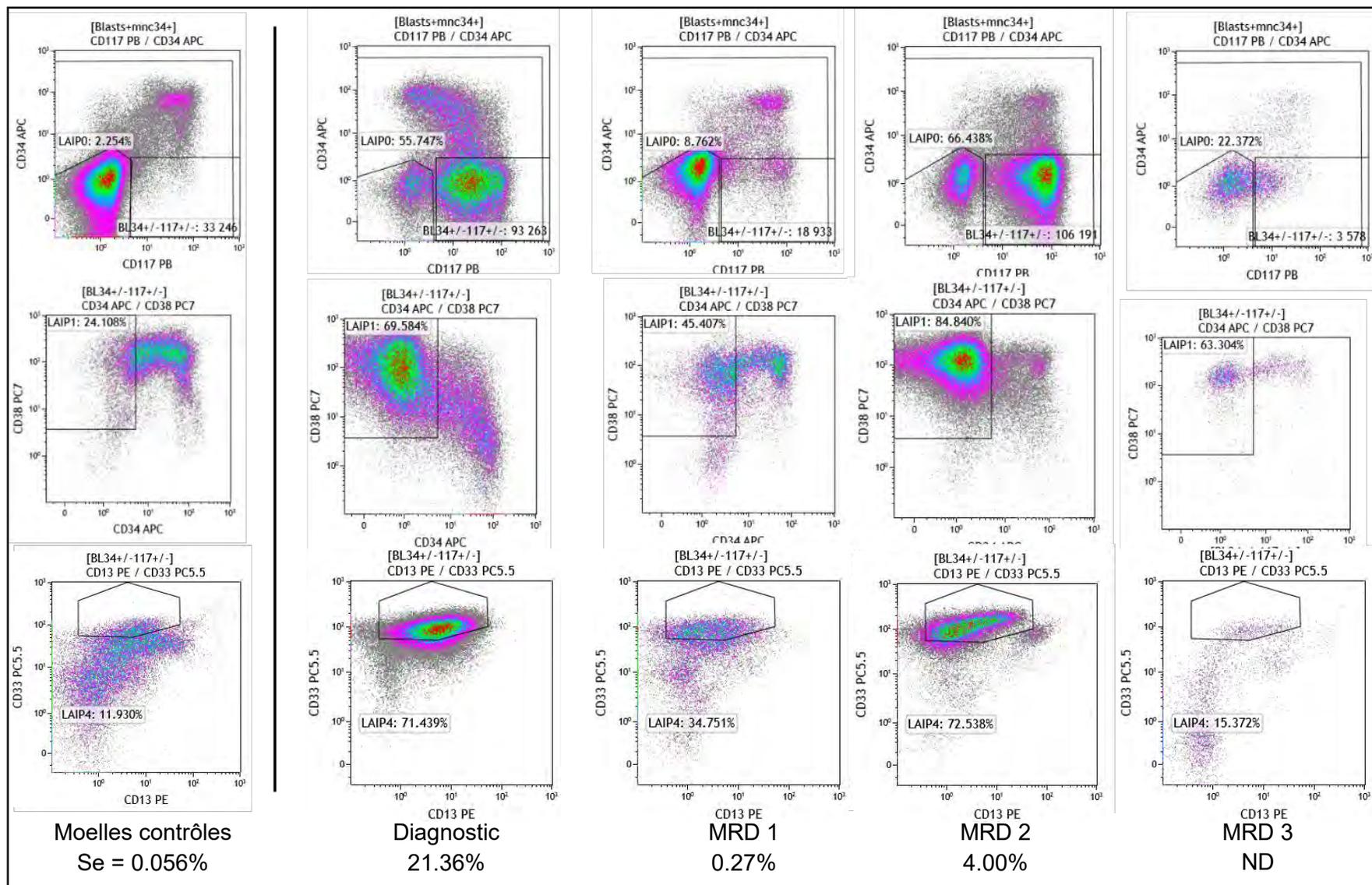
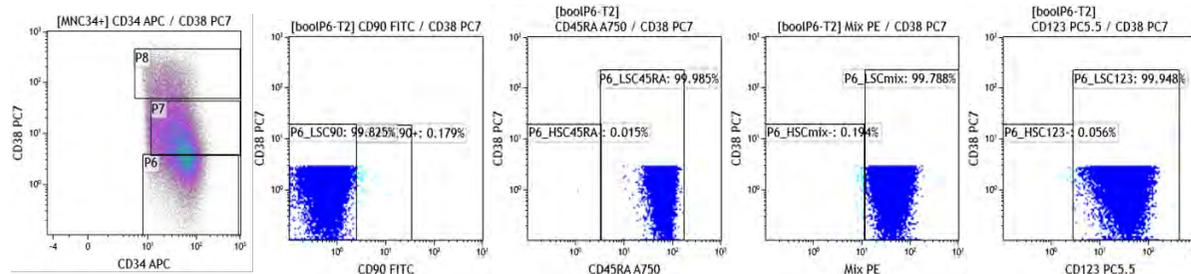
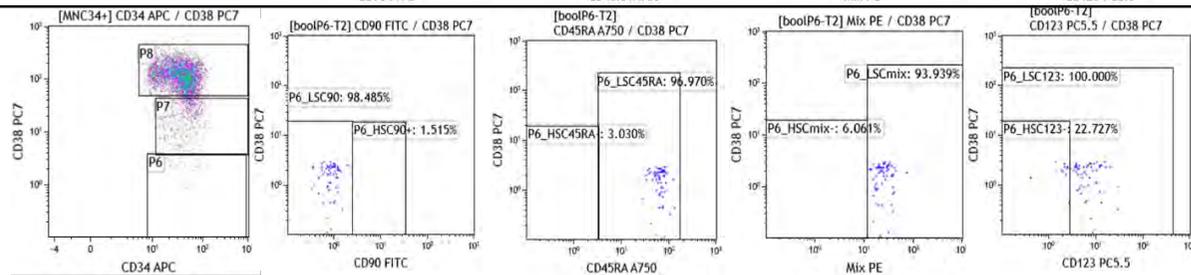


Figure 54. **PATIENT 11 – RECHERCHE DE LAIP** : Histogrammes d'intérêt permettant l'évaluation du taux de blastes LAIP au diagnostic et au suivi. De gauche à droite : « masque » LAIP appliqué aux moelles contrôles ; évaluation diagnostique ; évaluation de la MRD ; la MRD3 correspond à un échantillon médullaire post-allogreffe

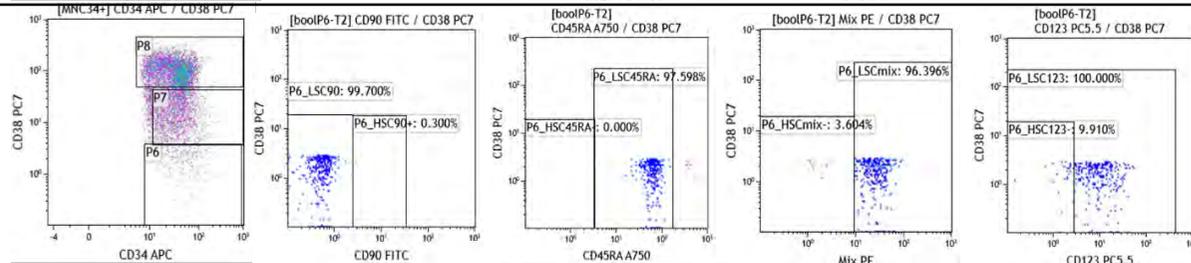
Diagnostic
3.78%



MRD 1
0.02%



MRD 2
0.06%



MRD 3
ND

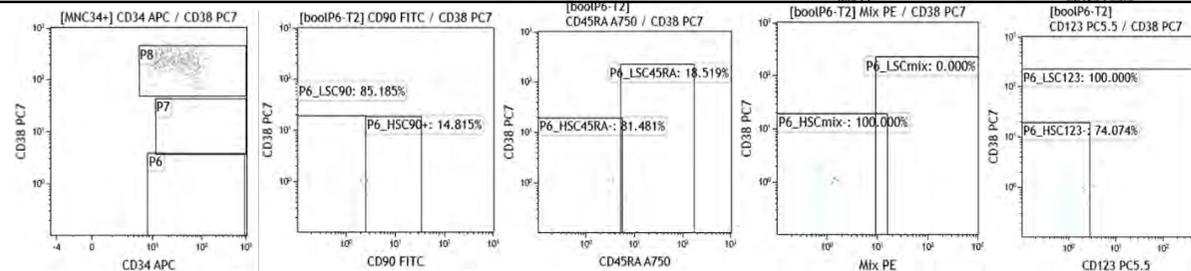


Figure 55. **PATIENT 11 – RECHERCHE DE LSC :** Histogrammes d'intérêt permettant l'évaluation du taux de LSC au diagnostic et au suivi pour le patient 11. De haut en bas : évaluation diagnostique ; évaluation de la MRD1 puis 2 ; la MRD3 correspond à un échantillon médullaire post-allogreffe. Marqueurs d'intérêt : CD45RA, Mix, CD123 au diagnostic

Le **patient 11** présente un suivi positif en CMF par les deux stratégies (LAIP et LSC). Dans cet échantillon, il est possible de distinguer au diagnostic deux sous populations caractérisées par leur niveau d'expression du CD34 : le sous-clone CD34 négatif présentant également un marquage CD38 positif et une surexpression du CD33, peut être suivi par la stratégie LAIP (Figure 54). Le taux de blastes LAIP résiduels diminue au point de MRD 1 mais reste néanmoins supérieur aux seuils de sensibilité et de significativité induisant de ce fait, une positivité du point de suivi. Les images de la MRD 2 font état d'une augmentation du niveau de maladie résiduelle avec le même phénotype que celui identifié au diagnostic. Enfin l'évaluation du dernier point de MRD prélevé après allogreffe rend un taux inférieur aux seuils de significativité et de sensibilité.

La deuxième population composée d'évènements CD34 positifs est quant à elle CD38 négative et exprime plusieurs marqueurs de LSC tels que le CD45RA, le Mix (CD97, CLL-1, TIM-3) et le CD123 discriminant seulement au diagnostic (Figure 55). De la même manière que lors de la recherche de blastes LAIP, la stratégie LSC évalue une MRD fortement positive au diagnostic, limite positive pour la MRD 1 et en augmentation pour la MRD 2. Le dernier point de suivi post-allogreffe ne retrouve pas de cellules souches leucémiques.



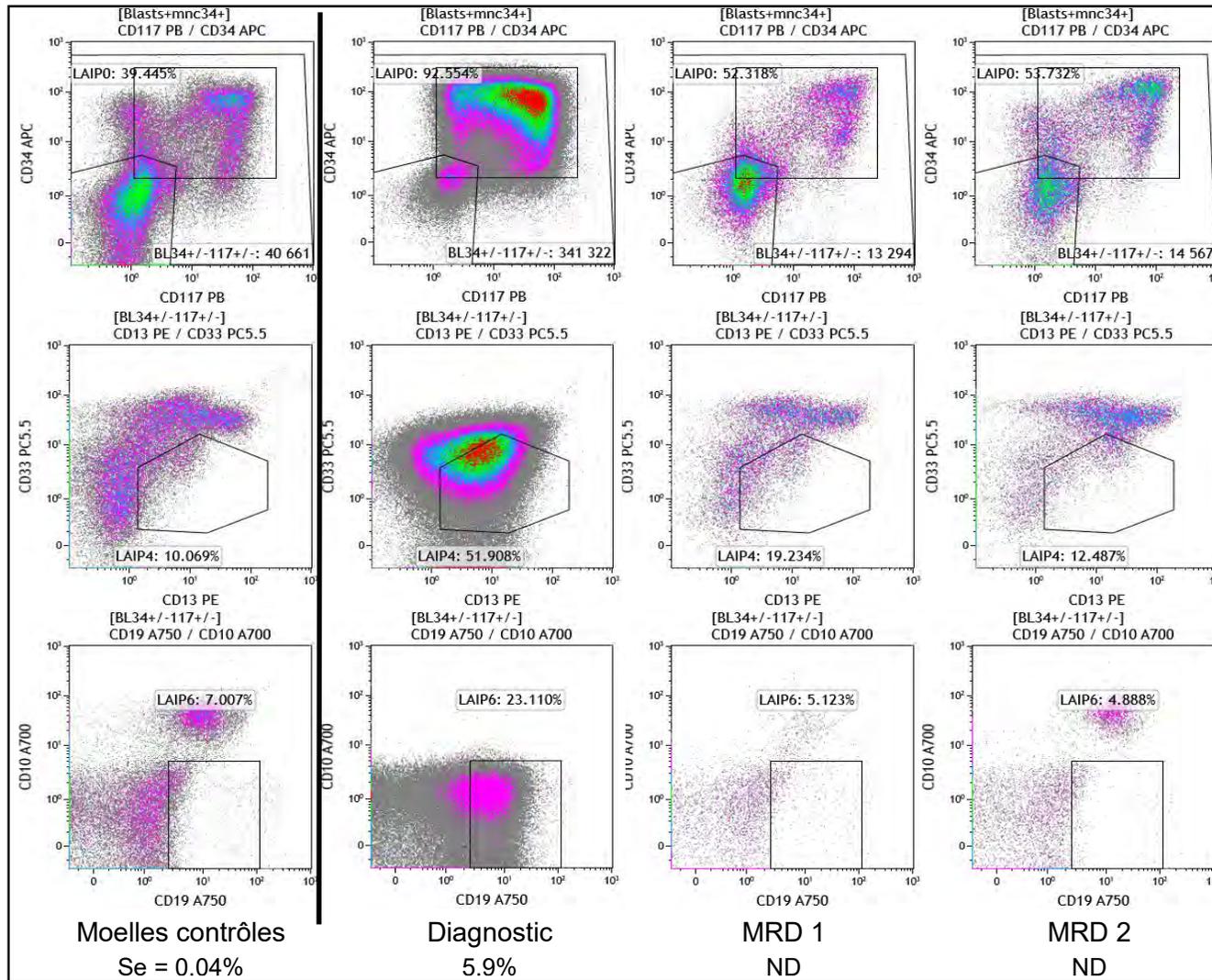


Figure 56. **PATIENT 12 – RECHERCHE DE LAIP** : Histogrammes d'intérêt permettant l'évaluation du taux de blasts LAIP au diagnostic et au suivi. De gauche à droite : « masque » LAIP appliqué aux moelles contrôles ; évaluation diagnostique ; évaluation de la MRD ; le dernier histogramme est fenêtré sur les lymphocytes et permet la détermination du seuil de positivité pour le marqueur CD19

Le **patient 12** possède un marqueur lymphoïde (CD19) sur les myéloblastes CD34+ CD117+ CD33 faible. La combinaison de cet antigène aberrant avec la diminution d'expression du CD33 forme un phénotype informatif pour le suivi. Pour le diagnostic, la fenêtre servant à cibler les blasts CD19+ a été positionnée par rapport aux lymphocytes (Figure 57).

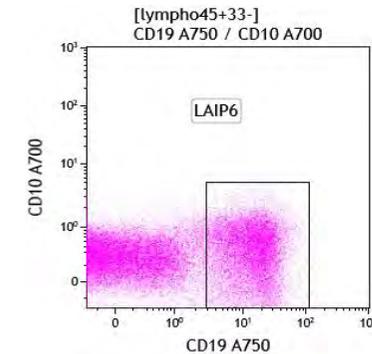
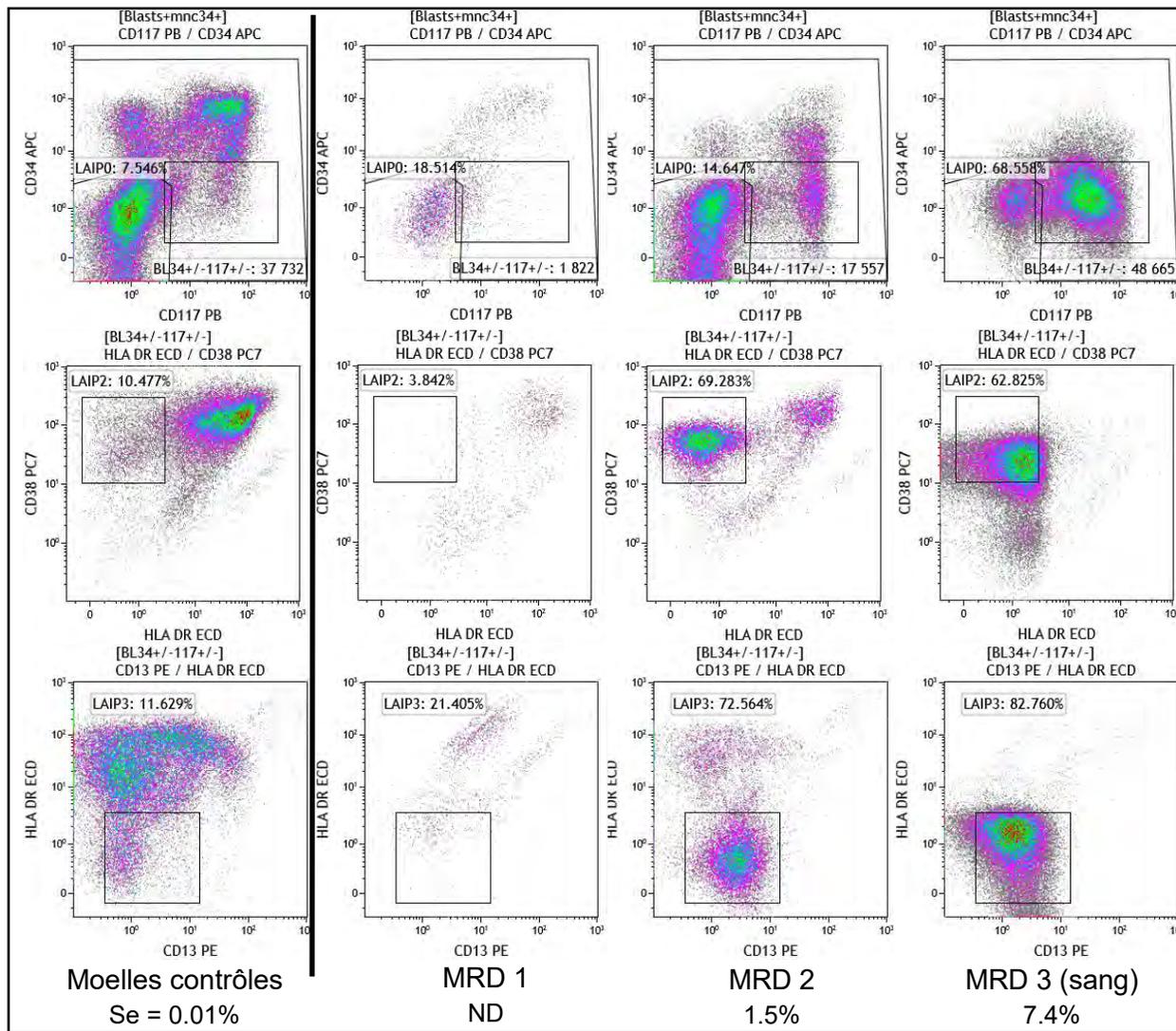


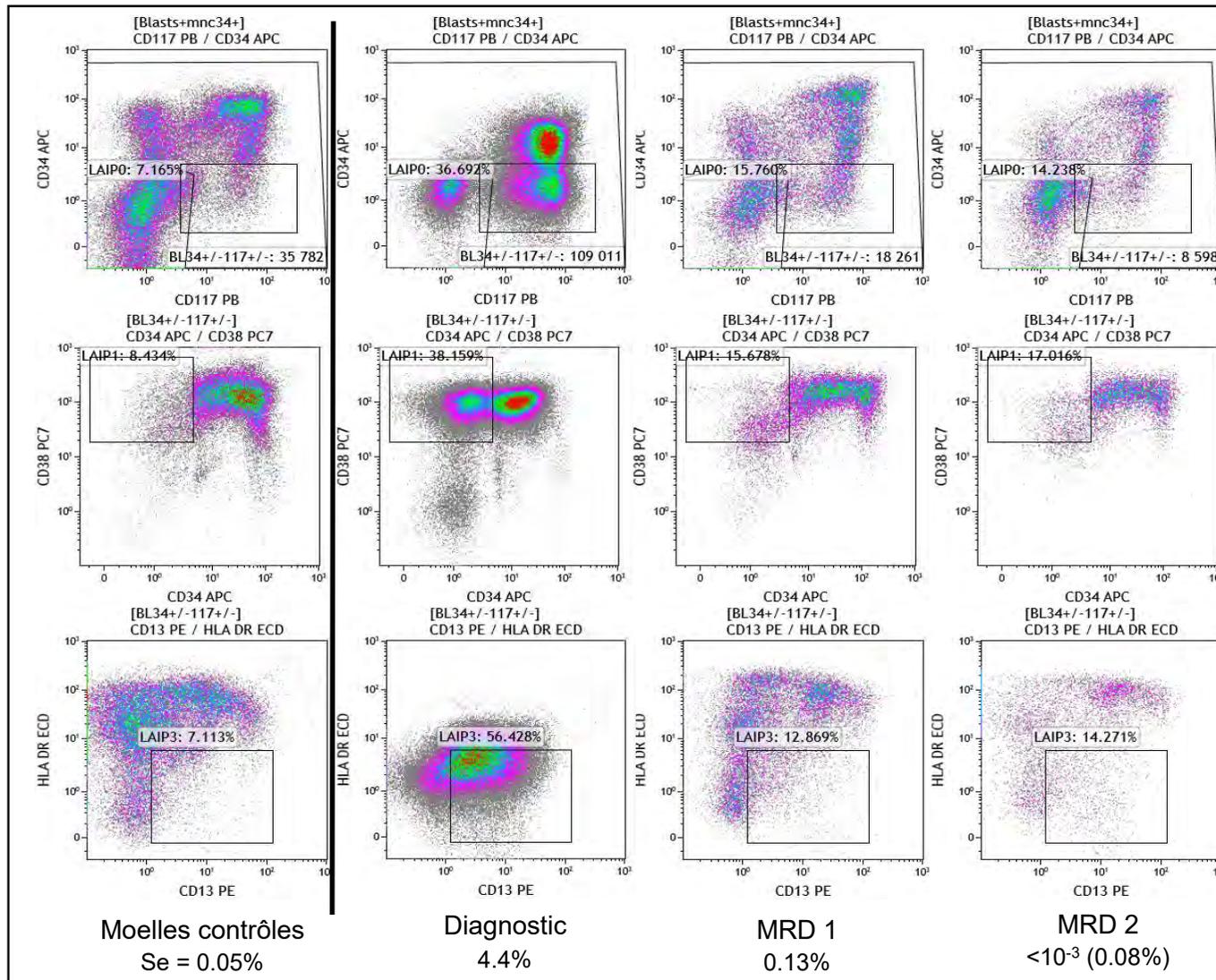
Figure 57. Patient 12 - Marquage CD19 des lymphocytes





Le diagnostic du **patient 13** (Figure 58) n'a pas été réalisé avec le nouveau panel d'anticorps mis en place. La stratégie DfN a donc été appliquée pour les points de suivi. Pour la MRD 1, seuls 83000 évènements ont pu être acquis. L'évaluation de la MRD, rendue non détectable, ne peut être correctement interprétée. Un phénotype aberrant (CD34-, CD38+, HLA DR-, CD13 faible) a été déterminé sur les échantillons suivants à des taux supérieurs au seuil de significativité, concluant à une MRD positive.

Figure 58. **PATIENT 13 – RECHERCHE DE LAIP par DfN** : Histogrammes d'intérêt permettant l'évaluation du taux de blastes LAIP au diagnostic et au suivi. De gauche à droite : « masque » LAIP appliqué aux moelles contrôles ; évaluation de la MRD ; la MRD3 a été évaluée sur échantillon sanguin



Le patient 14 (Figure 59) a été suivi par sa sous-population CD34- CD38+ HLA DR-. La perte d'expression combinée du CD34 et du HLA DR est un bon LAIP retrouvé plusieurs fois parmi les patients suivis au cours de ce travail. Il permet un suivi avec une bonne sensibilité vis-à-vis des moelles contrôles.

Figure 59. **PATIENT 14 – RECHERCHE DE LAIP** : Histogrammes d'intérêt permettant l'évaluation du taux de blastes LAIP au diagnostic et au suivi. De gauche à droite : « masque » LAIP appliqué aux moelles contrôles ; évaluation diagnostique ; évaluation de la MRD

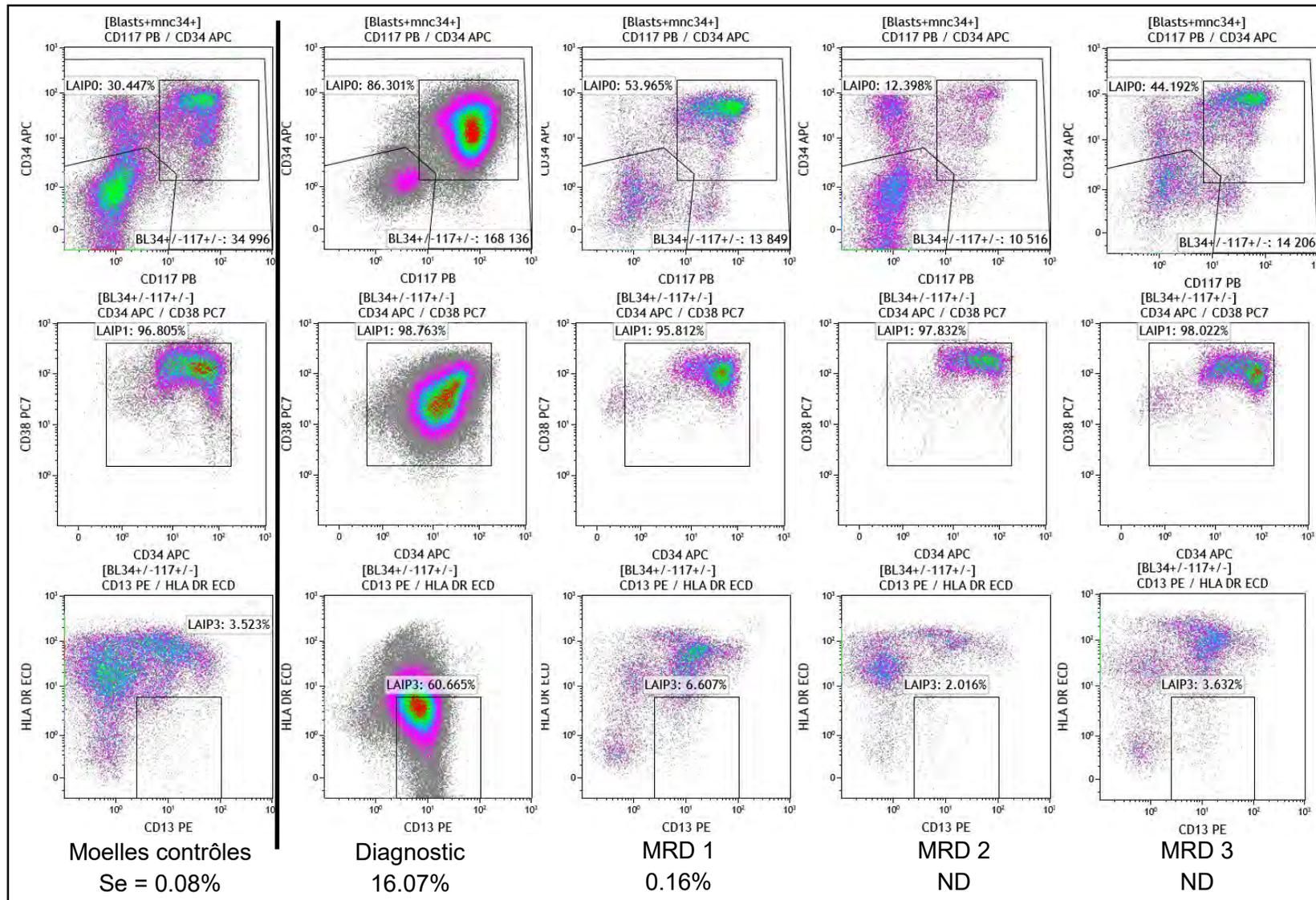
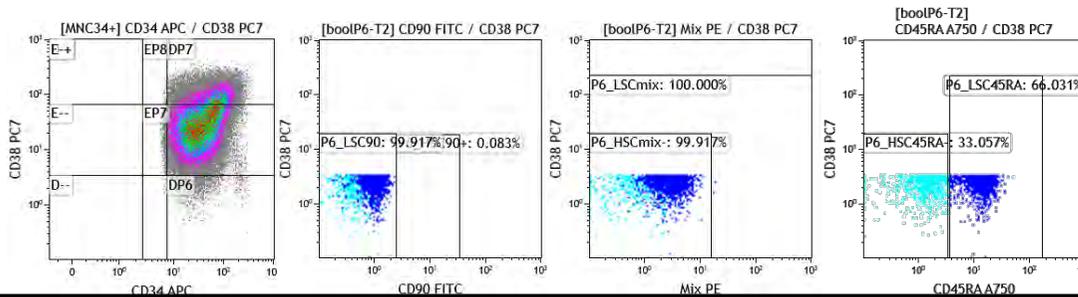


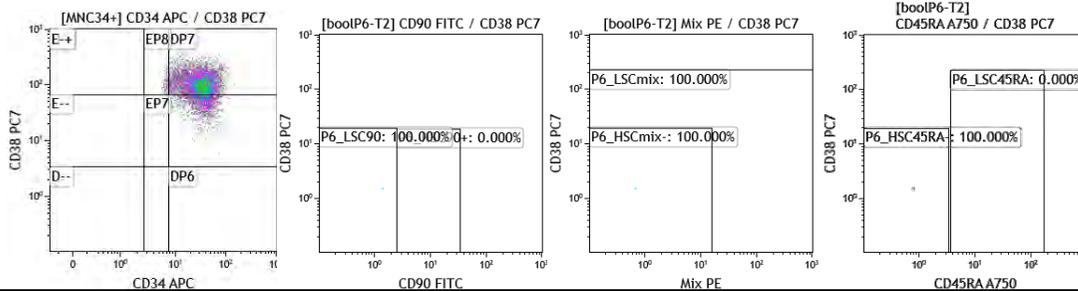
Figure 60. **PATIENT 26 – RECHERCHE DE LAIP** : Histogrammes d'intérêt permettant l'évaluation du taux de blasts LAIP au diagnostic et au suivi. De gauche à droite : « masque » LAIP appliqué aux moelles contrôles ; évaluation diagnostique ; évaluation de la MRD 1, 2, 3



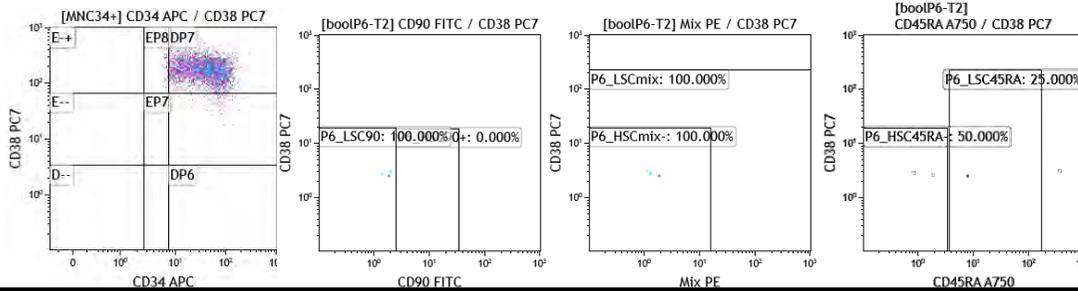
Diagnostic
0.21%



MRD 1
ND



MRD 2
ND



MRD 3
ND

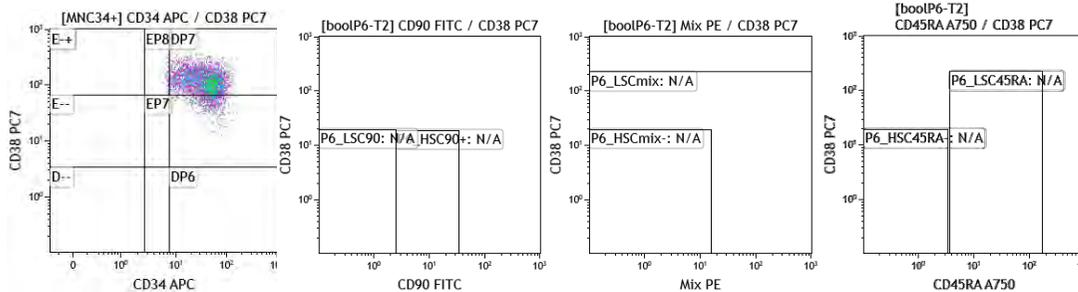


Figure 61. **PATIENT 26 – RECHERCHE DE LSC** : Histogrammes d'intérêt permettant l'évaluation du taux de LSC au diagnostic et au suivi pour le patient 26. De haut en bas : évaluation diagnostique ; évaluation de la MRD1, 2 et 3. Marqueur d'intérêt : CD45RA

Au diagnostic, le taux de blastes LAIP (absence de HLA DR) du **patient 26** représentait 16.1% (Figure 60). Un ratio légèrement positif est ensuite retrouvé au point de MRD 1, tandis que les échantillons suivants évaluant les MRD 2 et 3 sont inférieurs aux seuils de significativité et de sensibilité.

L'identification des LSC a pu être réalisée par la présence du CD45RA sur les cellules CD34+ CD38- (Figure 61). La valeur initiale, était de 0.21% tandis que pour les autres points de suivi, l'absence de cellules P6 ne permet pas la détection de cellules souches leucémiques.



IV.3. Comparaison de l'évaluation de la MRD par CMF et par BM

L'objectif de la comparaison est d'opposer l'évaluation de la MRD par CMF toute stratégie confondue (LAIP, LSC, DfN) à celle obtenue par biologie moléculaire (surexpression de WT1, taux de NPM1 muté, taux de transcrits AML1-ETO).

Quinze patients présentaient au moins un point de MRD en plus du prélèvement diagnostique. Ces échantillons ont été analysés à la fois par CMF ainsi que par biologie moléculaire. Les données de 7 patients (29 échantillons) se sont révélées non informatives pour le suivi par technique de biologie moléculaire (absence de transcrits, de mutations ou de surexpression significative de marqueur).

Seuls 8 patients sont donc informatifs pour le suivi par BM et par CMF. Une comparaison des résultats disponibles obtenus par ces deux techniques a été effectuée sur les prélèvements médullaires uniquement (20 échantillons au total, Tableau 18).

Tableau 18. Comparaison BM vs CMF

	Positif par BM	Inférieur au seuil par BM ²	Total
Positif par CMF	9 WT1 : 6 NPM1 : 2 AML1-ETO : 1	1 WT1 : 1	10
Inférieur au seuil de significativité par CMF ¹	6 NPM1 : 4 AML1-ETO : 2	4 WT1 : 2 NPM1 : 2	10
Total	15	5	20

¹(10⁻³ pour LAIP et DfN, 10⁻⁴ pour LSC)

²Pour WT1, inférieur au seuil normal dans la moelle (2.5%)

13 échantillons sont concordants quand 7 présentent des résultats opposés :

- 6 sont positifs en MRD par biologie moléculaire et négatifs par CMF :
 - Les MRD 1 et 2 du patient 12
 - Le diagnostic du patient 13
 - La MRD 2 du patient 14
 - La MRD 1 du patient 21
 - La MRD 1 du patient 24
- L'échantillon MRD 1 du patient 3 est le seul à être positif par CMF et inférieur au seuil normal en BM (WT1).

Ces discordances sont reprises dans la partie suivante opposant l'évolution des taux de MRD sur différents graphiques. Cette partie a également été réalisée avec les données issues des huit patients informatifs en BM et en CMF (31 échantillons médullaires et sanguins)

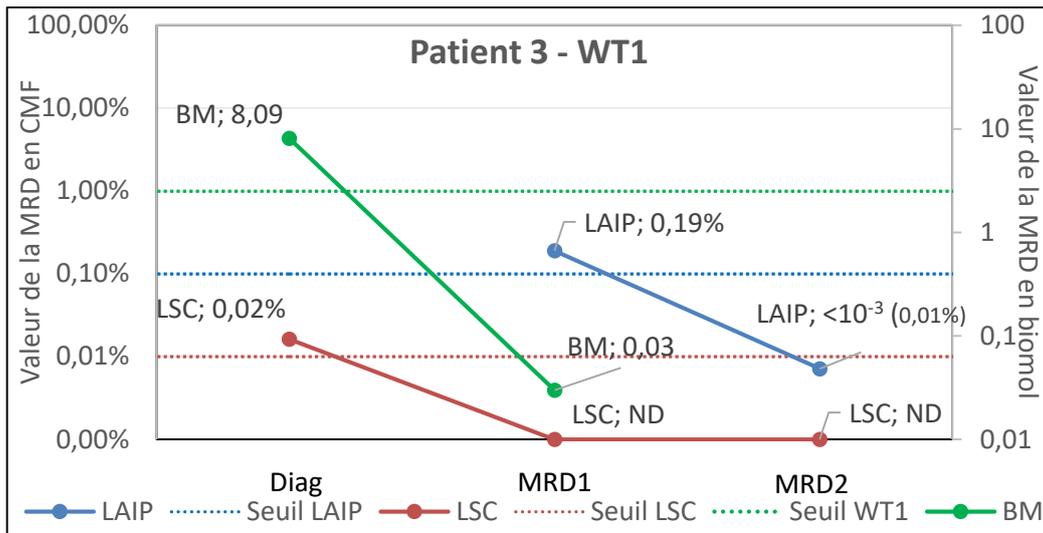


Figure 62. Evolution du taux de MRD en BM (WT1) et CMF - Patient 3

Le **patient 3** (Figure 62) est difficilement interprétable de par le peu de données disponibles. Le diagnostic (juin 2018) a été évalué par la stratégie LAIP via un protocole antérieur, ne présentant pas les mêmes caractéristiques que l'actuel (nombre d'anticorps différent) et rendant l'interprétation non pertinente. Pour le deuxième point de MRD (MRD 2), la biologie moléculaire n'a pas pu être rendue (technique en échec). Néanmoins, l'échantillon MRD 1 présente la particularité d'être positif par technique DfN en CMF ainsi qu'en cytologie (blastose à 7%) tout en étant négatif par biologie moléculaire (suivi par WT1). A noter qu'au diagnostic, la surexpression du marqueur était faible (8.0942). Le taux de MRD1 est quant à lui inférieur au seuil de normalité (0.03). Après allogreffe (février 2019), la MRD n'a pas été suivie sur échantillon médullaire par CMF.

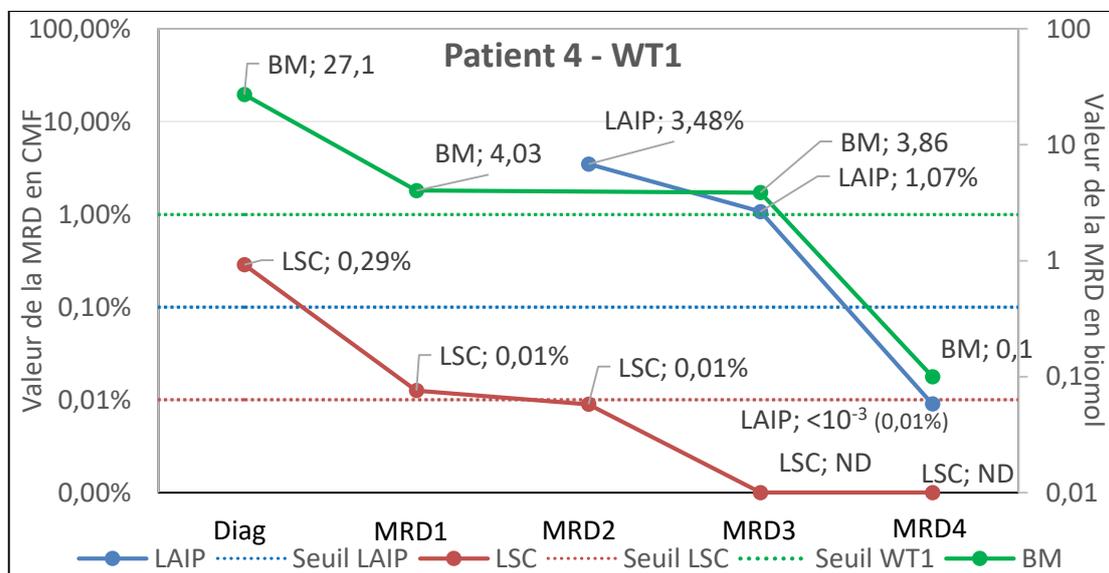


Figure 63. Evolution du taux de MRD en BM (WT1) et CMF - Patient 4

Bien que le **patient 4** (Figure 63) présente le même souci de données que le sujet précédent (absence des deux premiers points par la stratégie LAIP, absence du point MRD2 en biologie moléculaire rendu en échec), il est à noter l'aspect similaire des courbes de décroissance. Le taux de maladie résiduelle reste supérieur au seuil en CMF et en BM jusqu'au point MRD3, précédant la greffe. Aucune discordance n'est à noter pour ce patient. Le dernier

myélogramme datant d'avril 2019 (diagnostic en juin 2018) montre un aspect cytologique de rémission complète et une évaluation de la MRD par biologie moléculaire négative, la cytométrie n'ayant pas été prescrite.

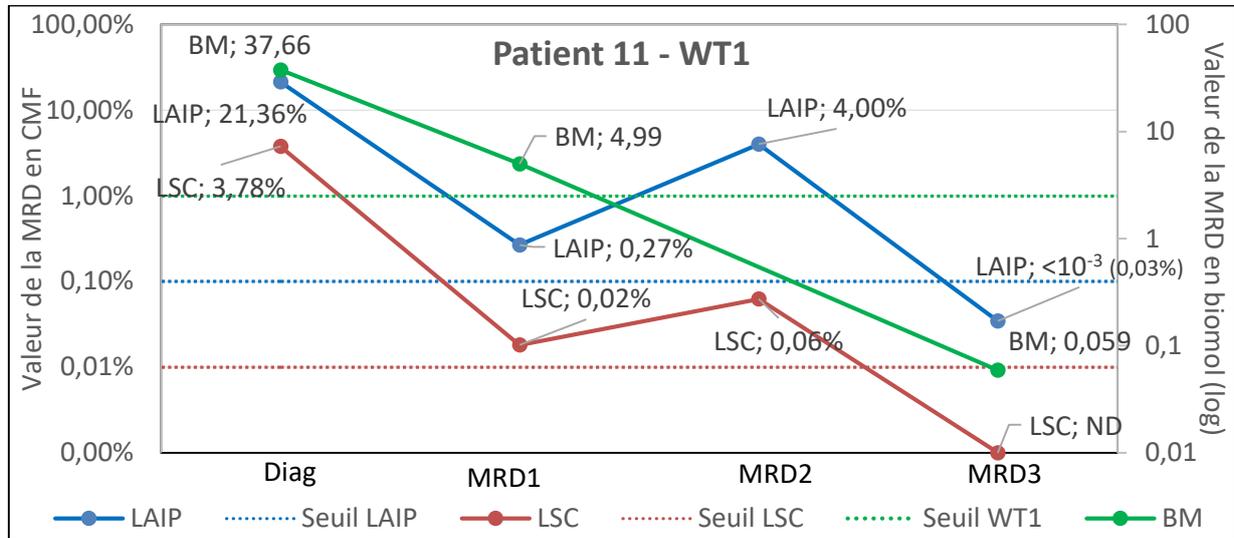


Figure 64. Evolution du taux de MRD en BM (WT1) et CMF - Patient 11

Le **patient 11** (Figure 64) présentait au diagnostic des taux de LSC et de LAIP élevés. Lors de son suivi, il n'a jamais été en rémission complète d'un point de vue cytologique. L'absence de données moléculaires dans la moelle pour le point de MRD2 est dommageable pour cette comparaison. Néanmoins un taux positif a été retrouvé dans le sang (4.08) suggérant une cinétique moléculaire similaire à celle retrouvée par techniques de cytométrie en flux. Le point de MRD3 fait état d'une moelle post-allogreffe ne détectant pas de façon significative de blasts pathologiques par aucune des deux techniques.

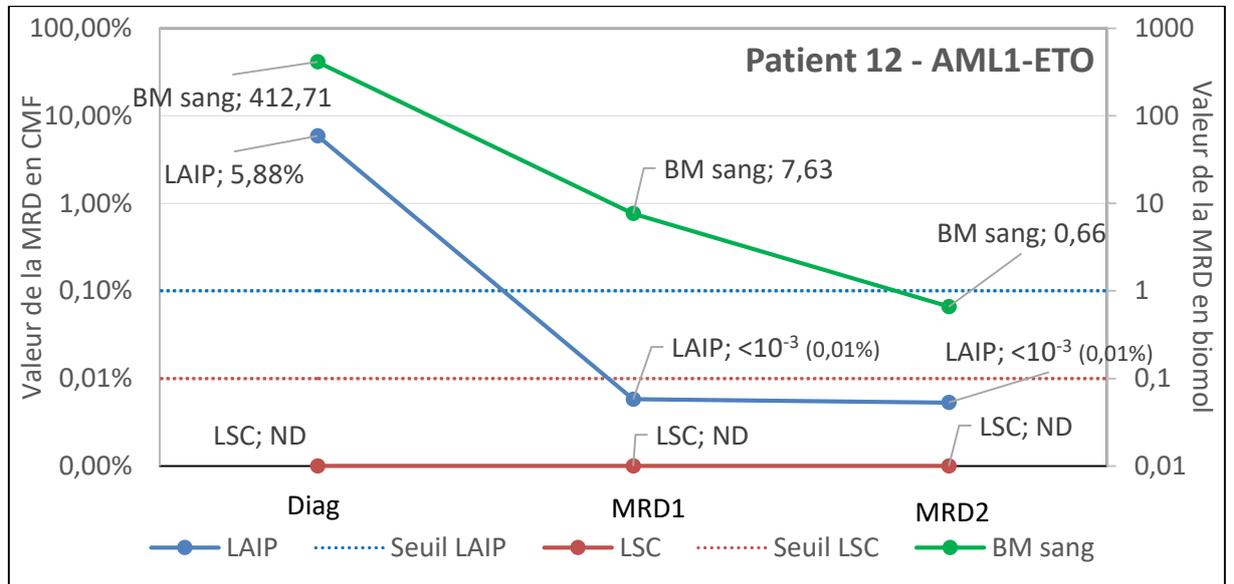


Figure 65. Evolution du taux de MRD en BM (AML1-ETO) et CMF - Patient 12

Le **patient 12** (Figure 65) est suivi pour un transcrite de fusion AML1-ETO en biologie moléculaire. Par technique LAIP il présente un phénotype aberrant caractérisé par une absence d'expression du CD33 ainsi que par la présence d'un marqueur lymphoïde (CD19+) sur sa blastose médullaire initiale (absence de LSC). La décroissance de son taux de MRD en

biologie moléculaire entre le diagnostic (février 2019) et le premier point de suivi est de 2 log (624 puis 2 puis non quantifiable). Par cytométrie, le taux de base au diagnostic est de 5.8% (ou 0.058) des leucocytes totaux pour une sensibilité de 0.1% (ou 10^{-3}). Au vu de la sensibilité, une décroissance de 2 log entraîne une non détectabilité de la MRD par technique de CMF. On peut donc émettre l'hypothèse que malgré un LAIP intéressant (marqueur lymphoïde sur une population myéloïde), le taux de blastes au diagnostic présentant un phénotype aberrant (dans ce cas 10% des blastes totaux) est trop peu représentatif pour détecter une MRD faible. Une persistance de la maladie résiduelle par biologie moléculaire a été retrouvée dans le sang et dans la moelle du dernier point de suivi (juillet 2019).

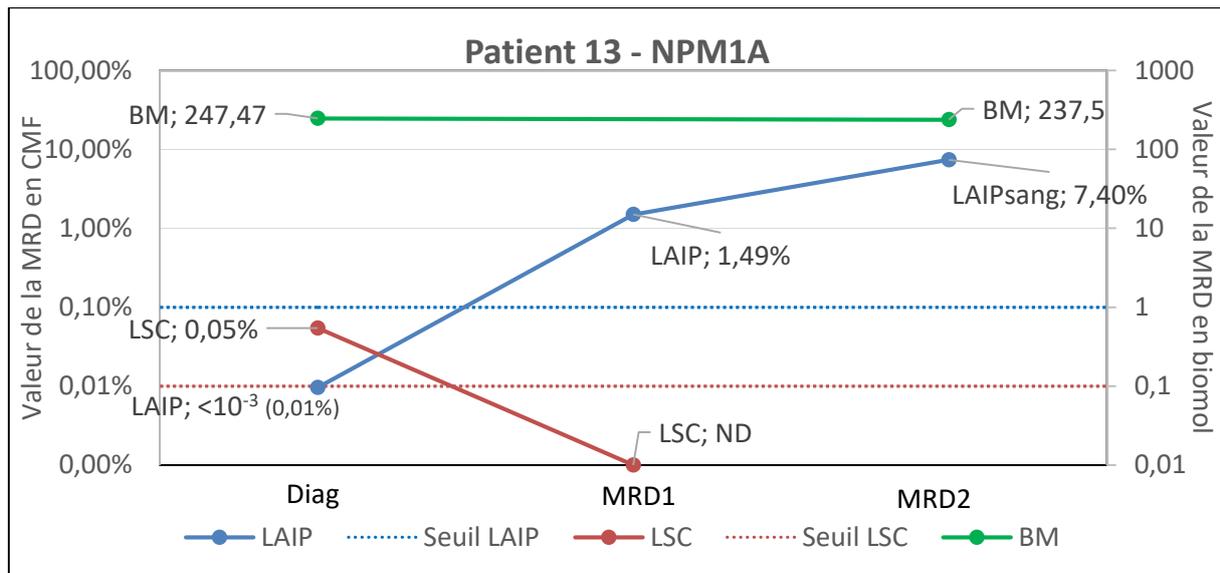


Figure 66. Evolution du taux de MRD en BM (AML1-ETO) et CMF - Patient 12

Les données du **patient 13** (Figure 66) paraissent, de prime abord, incohérentes. Lors de l'analyse de l'échantillon diagnostique (août 2018), seulement 83000 événements ont été acquis. La sensibilité n'est donc pas acceptable et l'évaluation de la MRD au diagnostic, non significative. Les prélèvements de MRD1 et MRD2 présentaient quant à eux un nombre d'évènements satisfaisants et sont en adéquation avec les résultats de biologie moléculaire obtenus. Sur le dernier point de suivi (mai 2019), l'évaluation de la MRD par CMF n'a pas été effectuée.

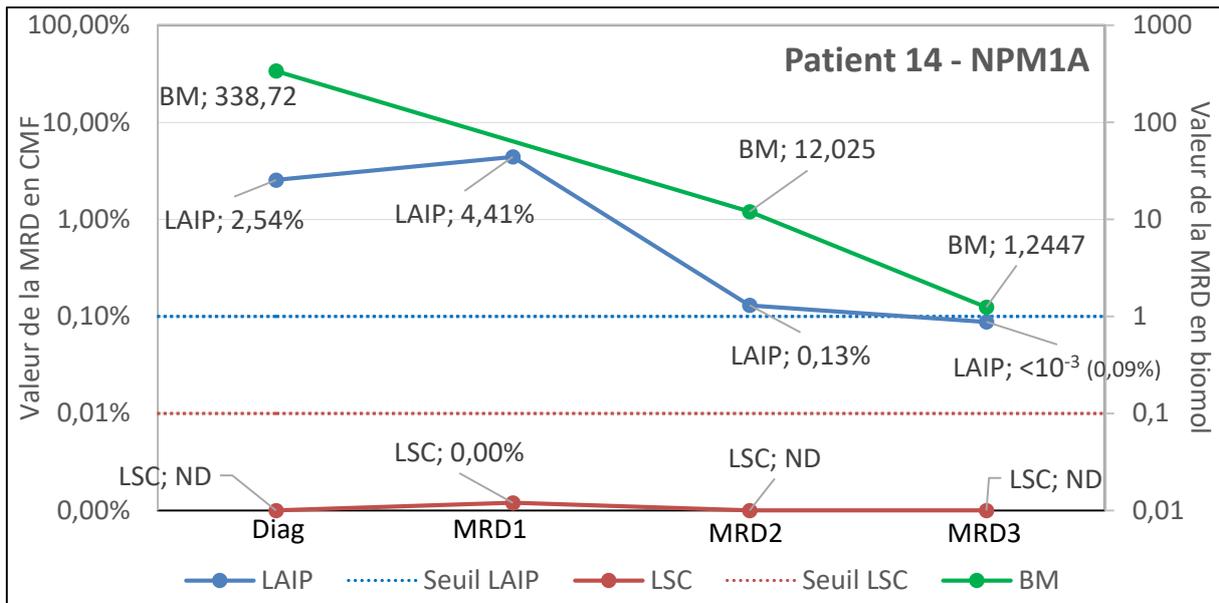


Figure 67. Evolution du taux de MRD en BM (AML1-ETO) et CMF - Patient 14

Au diagnostic (mars 2019), l'évaluation du taux de blastes médullaires par cytologie pour le **patient 14** (Figure 67) était inférieur à 20%. Une hémopathie de type AREB II a été diagnostiquée. Malgré cela, les échantillons ont été traités comme un diagnostic de LAM. Pour ce patient, la dernière évaluation de la MRD disponible est discordante entre la BM et la CMF. Cependant, lors de l'analyse de l'échantillon par technique LAIP, la sensibilité estimée sur les moelles contrôles était de $5 \cdot 10^{-4}$, pour un taux de MRD évalué à 0.09% ($9 \cdot 10^{-4}$). En l'état actuel des connaissances, le seuil de significativité évalué à 10^{-3} conclue à une MRD négative par CMF. Le dernier échantillon médullaire reçu pour ce patient (août 2019) fait état d'une MRD pré-allogreffe non détectable en biologie moléculaire. L'évaluation par CMF n'a pas été demandée.

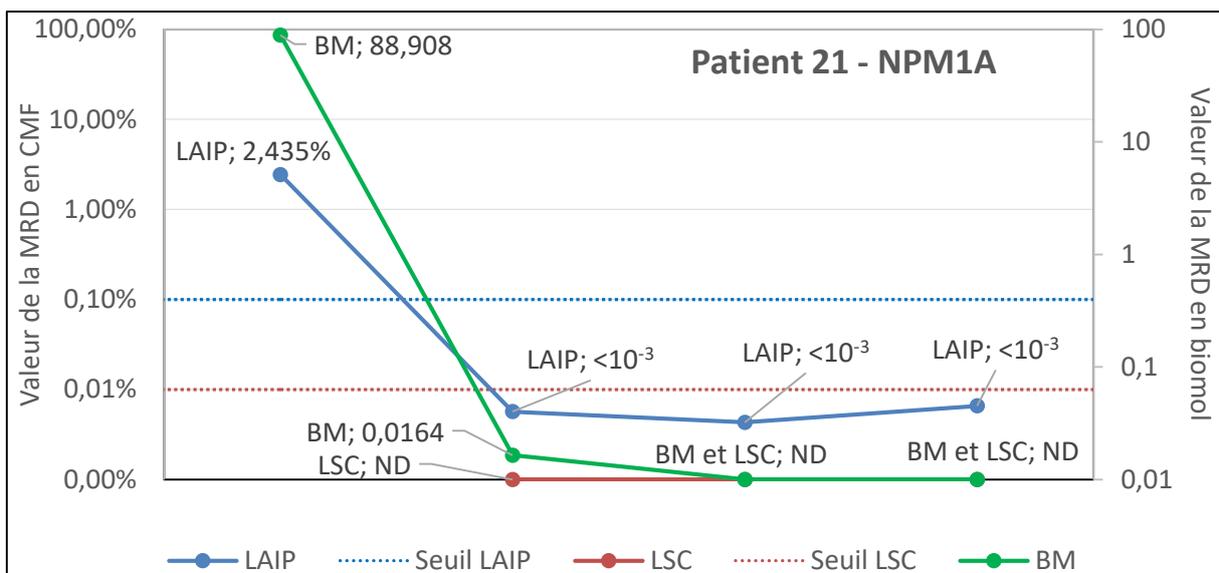


Figure 68. Evolution du taux de MRD en BM (NPM1-A) et CMF - Patient 21

Le **patient 21** (Figure 68), âgé de 36 ans, présente une mutation NPM1-A. Le suivi est donc privilégié par biologie moléculaire compte tenu de la sensibilité et de la robustesse de ce

marqueur. L'analyse par CMF, en accord avec celle de biologie moléculaire, ne permet pas une sensibilité suffisante en regard de celle apportée par PCR.

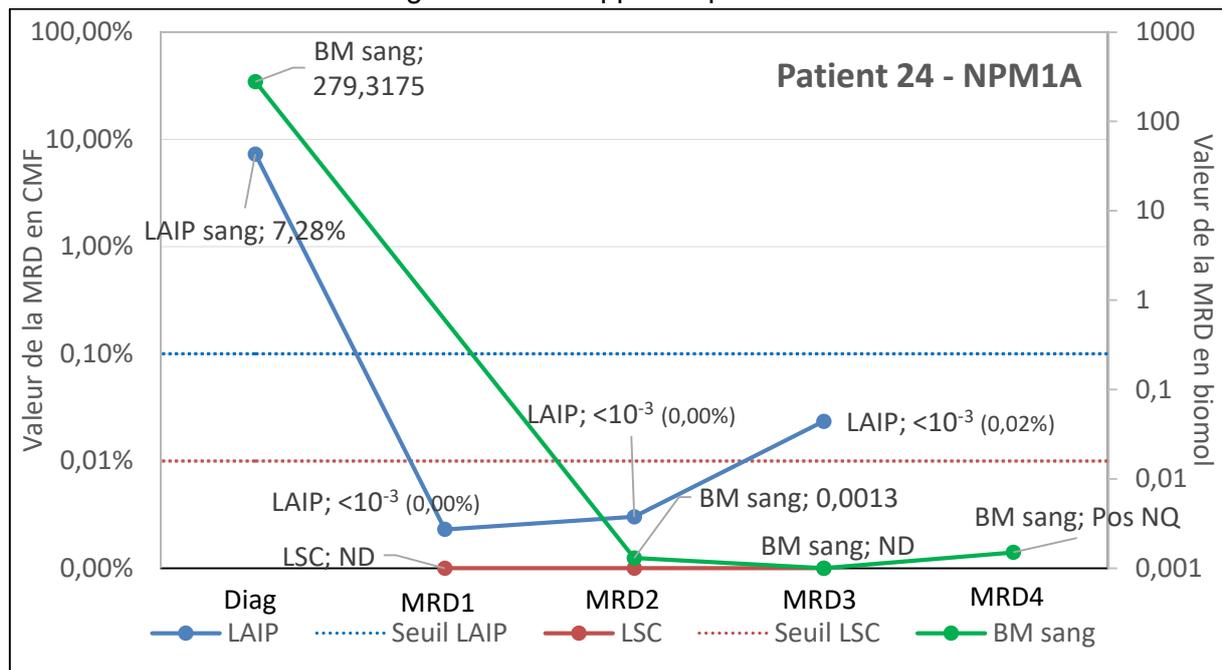


Figure 69. Evolution du taux de MRD en BM (NPM1-A) et CMF - Patient 24

Enfin, pour le **patient 24** (Figure 69), les données de biologie moléculaire sont principalement issues du sang périphérique (en échec pour les prélèvements médullaires des MRD 2 et 4 ; MRD 3 positive faible). En CMF, le niveau de la MRD 2 a été évalué sur plus de 750 000 événements CD45+ quand celui de la MRD 3 n'a été obtenu que sur 100 000 leucocytes. La dernière numération formule sanguine de ce patient faisait état de 96% de blastes.

V. DISCUSSION

V.1. Mise en place du panel

La mise en place au laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges d'un nouveau panel dans le diagnostic et le suivi des LAM s'est révélée indispensable à plusieurs niveaux :

- L'obsolescence du panel antérieur vis-à-vis des marqueurs nécessaires au suivi des LAM par les stratégies LAIP et LSC.
- La nécessité d'avoir un panel commun entre le diagnostic et le suivi.
- La volonté d'une harmonisation globale (du pré-analytique au post-analytique) entre les différents centres de cytométrie en flux de France quasi-obligatoire dans le rendu de la MRD LAM de par sa complexité.

Le nombre d'anticorps étant élevé (43 à distribuer pour le diagnostic), la mise en routine de ce panel s'est avérée complexe et des oublis ont eu lieu pour plusieurs patients.

V.2. Patients

Tous les patients ne peuvent pas être suivis par cytométrie en flux selon le protocole mis en place. La stratégie LAIP nécessite la présence d'un phénotype aberrant parmi les cellules CD34 + et/ou CD117 +. Concernant l'approche LSC, une population CD34+ CD38- est indispensable mais non suffisante pour être informative. La présence de marqueurs aberrants spécifiques des LSC est nécessaires pour leur identification et leur suivi.

V.3. Seuil de significativité et sensibilité : problématiques techniques

Un des axes d'amélioration de la détection de la MRD par CMF au CHU de Limoges est la diminution des seuils de sensibilité et de significativité. Ceci dans l'optique de repérer les taux faibles de MRD. La sensibilité est déterminée par plusieurs critères mettant en jeu les 3 temps de l'analyse biologique : le pré-analytique, l'analytique et le post-analytique.

Au niveau du pré-analytique, la sensibilité finale de l'analyse est principalement soumise à la qualité du prélèvement, l'hémodilution entraînant une perte notable de la sensibilité. Le sang contenant moins de cellules leucémiques que la moelle, les cellules leucocytaires sanguines (polynucléaires neutrophiles, lymphocytes, monocytes...) vont diminuer le taux de cellules d'intérêt de façon artéfactuelle.

Lors de la phase analytique, un échantillon de bonne richesse est indispensable pour obtenir une sensibilité optimale de par la fréquence faible des cellules recherchées (pour les LSC elle peut varier de 1 cellule pour 10^3 à 1 cellule pour 10^6 leucocytes¹⁰). Indépendamment de la qualité du prélèvement, la richesse médullaire estimée par le taux de leucocytes et la formule de Holdrinet, est variable d'un individu à l'autre et présente également une variabilité intra-individuelle (moelle de diagnostic en général plus riche qu'une moelle post-induction). Une diminution de la densité cellulaire ne permet pas, lors du passage au cytomètre, l'acquisition des 500 000 évènements CD45+ recommandés. La réalisation technique à ce stade est également très importante. Une mauvaise lyse des globules rouges entraîne l'acquisition de débris, saturant le cytomètre et entraînant une sous-estimation du taux de leucocytes. Un nouveau cycle technique de lyse, de lavage ainsi qu'une nouvelle acquisition peuvent être justifiés.



La phase post-analytique consiste à retraiter les données brutes issues du cytomètre afin de rechercher des phénotypes aberrants parmi les populations d'intérêt (CD34+ et / ou CD117+ pour la recherche de LAIP, CD34+ / CD 38- pour les LSC). Deux points sont à souligner dans cette étape du rendu de la MRD. Le premier est la subjectivité dont fait preuve l'opérateur lors de la recherche des LAIP et LSC. En effet, celui-ci recherche des regroupements d'évènements dénommés clusters partageant le même phénotype aberrant. Si la notion de *gating* en cytométrie est indispensable à la sélection et à la détermination de différentes populations, elle est difficilement reproductible entre les différents opérateurs. Le manque d'expérience dans le domaine de la MRD en CMF amplifie ce phénomène, nécessitant ainsi plusieurs acteurs dans le rendu d'un seul point de suivi. L'évaluation des taux de maladie résiduelle de manière non supervisée à l'aide de programme informatique tel que *FlowSom* peut être une alternative. Cette application permet la sélection des différentes populations en s'appuyant sur l'analyse statistique des données brutes issues du cytomètre. La formation de clusters et la sélection de populations étant totalement informatisées et basées sur des nombres, le biais induit par l'appréciation humaine est ainsi éliminé.

Le deuxième aspect à noter lors de cette phase post-analytique est la détermination de la sensibilité. Lors de la recherche de LAIP, cette valeur évaluée par rapport aux moelles contrôles est souvent inférieure au taux de significativité défini (10^{-3} ou 0.1%). La définition d'une zone indéterminée comprise entre ces deux seuils rendant une MRD détectable mais de signification indéterminée pourrait être possible au laboratoire du CHU de Limoges (Figure 70).^{36,38}

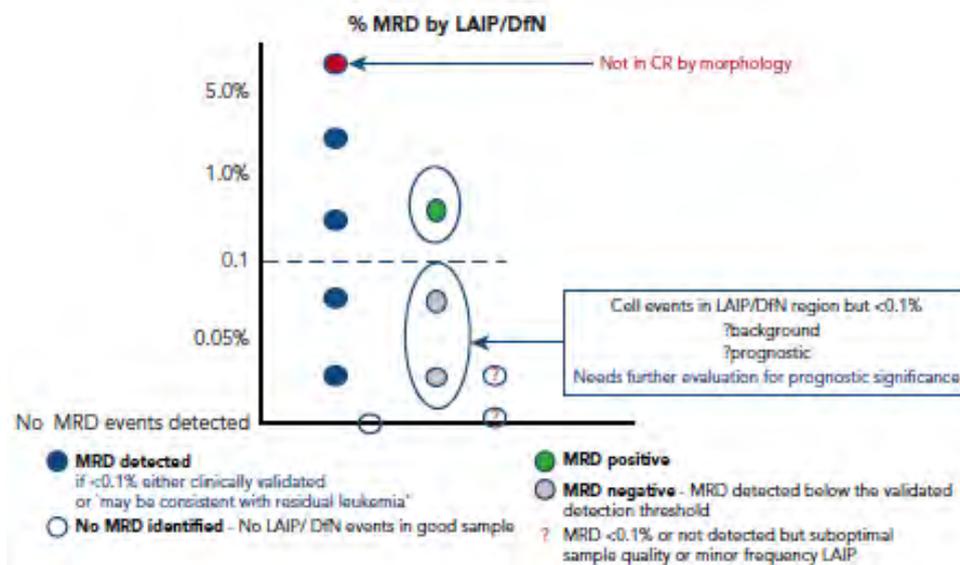


Figure 70. Seuil de significativité de la MRD par la stratégie LAIP³⁸

L'acquisition de nouveaux échantillons médullaires d'individus exempts de toute hémopathie mais présentant des situations physiologiques variées (inflammation, régénération...) est indispensable, de même que l'analyse d'échantillons de patients atteints de LAM. Cela afin d'incrémenter les connaissances des phénotypes médullaires physiologiques et pathologiques et ainsi permettre une restriction de cette zone grise. Néanmoins, plusieurs difficultés sont présentes : le recrutement d'échantillons médullaires de patients sains peut se révéler compliqué au vu des indications de l'examen, ainsi que du geste invasif que représente la ponction de moelle osseuse. Également, la présence de phénotypes aberrants sur les myéloblastes normaux (expression anormale de CD15, CD11b, CD7 ou CD56) à des taux

supérieurs au seuil de significativité établi, pouvant aller jusqu'à 0,43%³⁷ représente une des limites de l'évaluation de la MRD par CMF.

L'expérience du biologiste est primordiale dans la détection de populations minoritaires au diagnostic et surtout au suivi. Des contrôles de qualité de moelles saines ont été mis en place par le groupe français ALFA-FILO afin d'améliorer la détection de ces cellules. La mise en place de CQ virtuel (diagnostic et points de suivis) ou le partage des données brutes de cytométrie anonymisées serait également un plus d'une part pour les cas complexes, et d'autre part dans un objectif de standardisation de l'interprétation.

V.4. Problématiques immunophénotypiques

Des LSC peuvent être présentes sans exprimer de marqueurs aberrants. Leurs propriétés morphométriques deviennent alors indispensables pour leur discrimination.⁴⁶ La définition des LSC via les paramètres FS et SS nécessitent cependant une grande expertise afin d'apprécier la différence entre ces blastes et d'autres cellules mononucléées.

Bien que non observés parmi les échantillons analysés dans ce travail, des changements immunophénotypiques entre le diagnostic et la rechute ont été rapportés dans 88 à 91% des patients atteints de LAM. Ajoutée à cela, la présence de sous populations minoritaires lors du suivi, non détectées lors du prélèvement initial peuvent être source d'erreur lors de l'évaluation de la MRD par la stratégie LAIP.^{21,22,48-50} La stratégie DfN, bien que moins sensible que les stratégies LAIP et LSC, est donc indispensable à tous les points de suivi afin de détecter une augmentation de la MRD due à un clone différent de celui du diagnostic. La présence de deux aberrations phénotypiques permet également de diminuer le risque de non détection d'une rechute.

V.5. Comparaison biologie moléculaire – cytométrie en flux

Le manque de résultats est un frein à l'établissement d'une conclusion concernant la comparaison entre les techniques de cytométrie en flux et de biologie moléculaire. Cependant, plusieurs points sont à noter :

- L'évaluation de la MRD par CMF peut être rendue en moins de 24h, comparée aux différentes techniques de BM pouvant nécessiter plusieurs jours.
- Selon les recommandations de l'ELN³⁸, les patients présentant des mutations moléculaires sur NPM1, ou des transcrits de fusions (RUNX1-RUNX1T1, CBFβ-MYH11 ou PML-RARA) doivent bénéficier d'une évaluation moléculaire de leur maladie résiduelle. Pour les autres, l'approche par cytométrie en flux est recommandée. Au vu de nos premiers résultats, on remarque qu'au diagnostic, parmi les patients suivis à la fois par WT1 et par cytométrie, l'immunophénotypage semble plus informatif que la technique de biologie moléculaire.
- Dans l'ensemble, les seuils de sensibilité des approches moléculaires sont meilleurs que ceux déterminés à l'aide des techniques de cytométrie.

V.6. Problématiques financières

Le changement de panel pour les LAM a induit une hausse des dépenses de par l'augmentation de la quantité d'anticorps distribués lors du diagnostic, mais aussi de l'analyse des différents points de suivi, non effectuée jusqu'alors.

V.7. Problématiques informatiques

Enfin, la sensibilité de l'analyse étant intrinsèquement liée aux nombres d'évènements acquis, la taille d'un seul fichier FCS issu du cytomètre est élevée (un fichier représente l'analyse d'un tube). Ajouté à cela le nombre de tubes techniqués par point de suivi ainsi que les six moelles contrôles (trois tubes chacune), un fichier patient peut contenir de 22 fichiers FCS pour le diagnostic (4 pour le patient, 18 pour les moelles contrôles) à plus de 30 pour les suivis (2 fichiers FCS minimum par point de MRD) représentant jusqu'à 1Go de données. Les ordinateurs disponibles au laboratoire ne permettent pas de retraiter aisément tant de données à l'aide du logiciel Kaluza®. L'analyse post-analytique est donc longue et fastidieuse pouvant représenter jusqu'à une demi-journée complète pour un point de suivi.

V.8. Revue des données

Dans le cadre des protocoles BIG et ALFA-1200, les données de MRD évaluées par cytométrie en flux ainsi que par biologie moléculaire issues des différents centres participants vont être collectées puis analysées à l'échelle nationale.

Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons mis au point un nouveau panel de cytométrie en flux utilisé dans le cadre du diagnostic et du suivi des leucémies aigües myéloïdes. En parallèle, les protocoles nationaux d'évaluation de la maladie résiduelle minimale des études BIG et ALFA-1200 ont été adaptés au laboratoire du CHU Limoges. Ce travail a été effectué en suivant les recommandations du groupe ALFA-FILO dans l'optique d'une harmonisation globale des techniques de cytométrie en flux.

Malgré les difficultés techniques rencontrées, liées en grande partie à la mise en place d'un nouveau panel ainsi que d'un nouveau protocole, les résultats obtenus confirment l'importance de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des leucémies aigües myéloïdes. Le nombre de patient inclus n'étant pas suffisamment élevé, il est difficile de conclure quant à la place des techniques immunophénotypiques dans l'évaluation de la maladie résiduelle minimale. Toutefois, il semble se dégager que, bien qu'étant moins sensible que certaines approches moléculaires, les différentes stratégies de suivi de la MRD par cytométrie en flux semblent s'adapter à un plus grand nombre de patient.

L'approche immunophénotypique de la maladie résiduelle dans les LAM présente de nombreuses difficultés. L'une d'entre elles est la subjectivité dont fait preuve le cytométriste lors de la détermination des populations cibles. Malgré l'action de deux opérateurs différents dans notre travail, il est compliqué d'être à la fois sensible et spécifique lors de la sélection des populations. Un travail sur la cytométrie non supervisée apparaît dès lors intéressant, voire indispensable.

Références bibliographiques

1. Estey, E. & Döhner, H. Acute myeloid leukaemia. *The Lancet* **368**, 1894–1907 (2006).
2. AML Cancer statistics US. Available at: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>.
3. Jordan, C. T. The leukemic stem cell. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **20**, 13–18 (2007).
4. Deschler, B. & Lübbert, M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer* **107**, 2099–2107 (2006).
5. Leucémies Aiguës Myéloïdes. Available at: <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/hematologie-et-pathologie-generale/28-leucemies-aigues-myeloides>.
6. Trimoreau, F. *et al.* Classification OMS des Leucémies aiguës.
7. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **129**, 424–447 (2017).
8. Item 162 : Leucémies aiguës. 22
9. Jennings, C. D. & Foon, K. A. Recent Advances in Flow Cytometry: Application to the Diagnosis of Hematologic Malignancy. 31
10. Hanekamp, D., Cloos, J. & Schuurhuis, G. J. Leukemic stem cells: identification and clinical application. *Int. J. Hematol.* **105**, 549–557 (2017).
11. Del Principe, M. I. MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA OF ADULTS: DETERMINATION, PROGNOSTIC IMPACT AND CLINICAL APPLICATIONS. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **8**, 2016052 (2016).
12. De Kouchkovsky, I. & Abdul-Hay, M. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J.* **6**, e441–e441 (2016).
13. Référentiel Société Française d'Hématologie. 2009

14. Webster, J. A. & Pratz, K. W. Acute myeloid leukemia in the elderly: therapeutic options and choice. *Leuk. Lymphoma* **59**, 274–287 (2018).
15. Döhner, H., Weisdorf, D. J. & Bloomfield, C. D. Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1136–1152 (2015).
16. Podoltsev, N. A., Stahl, M., Zeidan, A. M. & Gore, S. D. Selecting initial treatment of acute myeloid leukaemia in older adults. *Blood Rev.* **31**, 43–62 (2017).
17. Sung, P. J. & Luger, S. M. Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *Curr. Treat. Options Oncol.* **18**, 1 (2017).
18. Kern, W., Schoch, C., Haferlach, T. & Schnittger, S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **56**, 283–309 (2005).
19. Chen, X. *et al.* Relation of Clinical Response and Minimal Residual Disease and Their Prognostic Impact on Outcome in Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol.* **33**, 1258–1264 (2015).
20. Preudhomme, C. Place de la maladie résiduelle dans la prise en charge des leucémies aiguës myéloïdes. doi:10.1684/hma.2019.1463
21. Tomlinson, B. & Lazarus, H. M. Enhancing acute myeloid leukemia therapy - monitoring response using residual disease testing as a guide to therapeutic decision-making. *Expert Rev. Hematol.* **10**, 563–574 (2017).
22. Chen, X. & Wood, B. L. Monitoring minimal residual disease in acute leukemia: Technical challenges and interpretive complexities. *Blood Rev.* **31**, 63–75 (2017).
23. Grimwade, D. & Freeman, S. D. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for 'prime time'? *Blood* **124**, 3345–3355 (2014).
24. Ossenkoppele, G. J. & Schuurhuis, G. J. MRD in AML: It is time to change the definition of remission. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **27**, 265–271 (2014).

25. Rowley, T. Flow Cytometry - A Survey and the Basics. Available at: <https://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html>.
26. Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y. & Nalbant, A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **37**, 163–176 (2017).
27. PMT. Available at: <http://www.composelec.com/photomultiplicateur.php>.
28. Arnoulet, C. Four- and five-color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow: a reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL. doi:10.1002/cyto.b.20484
29. Hoffmann, M. H. *et al.* Clinical impact of leukemic blast heterogeneity at diagnosis in cytogenetic intermediate-risk acute myeloid leukemia. *Cytometry B Clin. Cytom.* **82B**, 123–131 (2012).
30. Kern, W. *et al.* Detection of minimal residual disease in unselected patients with acute myeloid leukemia using multiparameter flow cytometry to define leukemia-associated immunophenotypes and determine their frequencies in normal bone marrow. **88**, 8 (2003).
31. Loken, M., van de Loosdrecht, A., Ogata, K., Orfao, A. & Wells, D. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from a working conference. *Leuk. Res. Janv* **20083215-17** doi:10.1016/j.leukres.2007.04.020
32. Cloos, J. *et al.* Comprehensive Protocol to Sample and Process Bone Marrow for Measuring Measurable Residual Disease and Leukemic Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia. *J. Vis. Exp.* 56386 (2018). doi:10.3791/56386
33. Freeman, S. D. *et al.* Prognostic Relevance of Treatment Response Measured by Flow Cytometric Residual Disease Detection in Older Patients With Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol.* **31**, 4123–4131 (2013).

34. Terwijn, M. *et al.* High Prognostic Impact of Flow Cytometric Minimal Residual Disease Detection in Acute Myeloid Leukemia: Data From the HOVON/SAKK AML 42A Study. *J. Clin. Oncol.* **31**, 3889–3897 (2013).
35. Zeijlemaker, W. *et al.* Peripheral blood minimal residual disease may replace bone marrow minimal residual disease as an immunophenotypic biomarker for impending relapse in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **30**, 708–715 (2016).
36. Al-Mawali, A., Gillis, D., Hissaria, P. & Lewis, I. Incidence, Sensitivity, and Specificity of Leukemia-Associated Phenotypes in Acute Myeloid Leukemia Using Specific Five-Color Multiparameter Flow Cytometry. *Am. J. Clin. Pathol.* **129**, 934–945 (2008).
37. Camburn, A. E., Petrasich, M., Ruskova, A. & Chan, G. Myeloblasts in normal bone marrows expressing leukaemia-associated immunophenotypes. *Pathology (Phila.)* **51**, 502–506 (2019).
38. Schuurhuis, G. J. *et al.* Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood* **131**, 1275–1291 (2018).
39. Ng, A. P. & Alexander, W. S. Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discov.* **3**, 17002 (2017).
40. van Rhenen, A. High Stem Cell Frequency in Acute Myeloid Leukemia at Diagnosis Predicts High Minimal Residual Disease and Poor Survival. *Clin. Cancer Res.* **11**, 6520–6527 (2005).
41. Zeijlemaker, W. *et al.* CD34+CD38– leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **33**, 1102–1112 (2019).
42. Lapidot, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645–648 (1994).

43. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730–737 (1997).
44. Kersten, B. *et al.* CD45RA, a specific marker for leukaemia stem cell sub-populations in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **173**, 219–235 (2016).
45. Zeijlemaker, W. *et al.* A simple one-tube assay for immunophenotypical quantification of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **30**, 439–446 (2016).
46. Terwijn, M. *et al.* Leukemic Stem Cell Frequency: A Strong Biomarker for Clinical Outcome in Acute Myeloid Leukemia. *PLoS ONE* **9**, e107587 (2014).
47. Holdrinet, R., von Egmond, J., Wessels, J. & Haanen, C. A method for quantification of peripheral blood admixture in bone marrow aspirates. *Exp Hematol* (1980).
48. Voskova, D., Schoch, C. & Schnittger, S. Stability of leukemia associated aberrant immunophenotypes in patients with acute myeloid leukemia between diagnosis and relapse: comparison with cytomorphologic, cytogenetic, and molecular genetic findings. *Cytom B Clin Cytom.* 2004
49. Zeijlemaker, W., Gratama, J. W. & Schuurhuis, G. J. Tumor heterogeneity makes AML a “moving target” for detection of residual disease: Phenotype instability and MRD in AML. *Cytometry B Clin. Cytom.* n/a-n/a (2013). doi:10.1002/cytob.21134
50. Ommen, H. B. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia: a review of the current evolving strategies. *Ther. Adv. Hematol.* **7**, 3–16 (2016).

Annexes

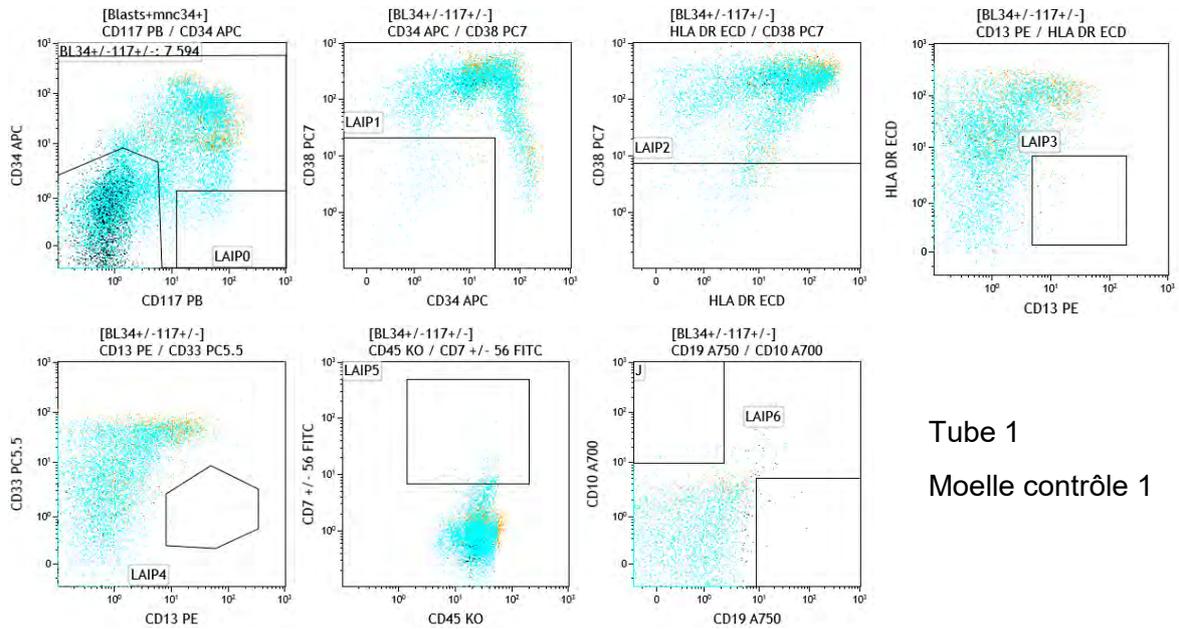
Annexe 1. Anticorps utilisés	111
Annexe 2. Aide à la validation : « images » de moelles contrôles	112
Annexe 3. Evaluation nouveau panel par rapport à l'ancien.....	118
Annexe 4. Script « R » moelles contrôles.....	122

Annexe 1. Anticorps utilisés

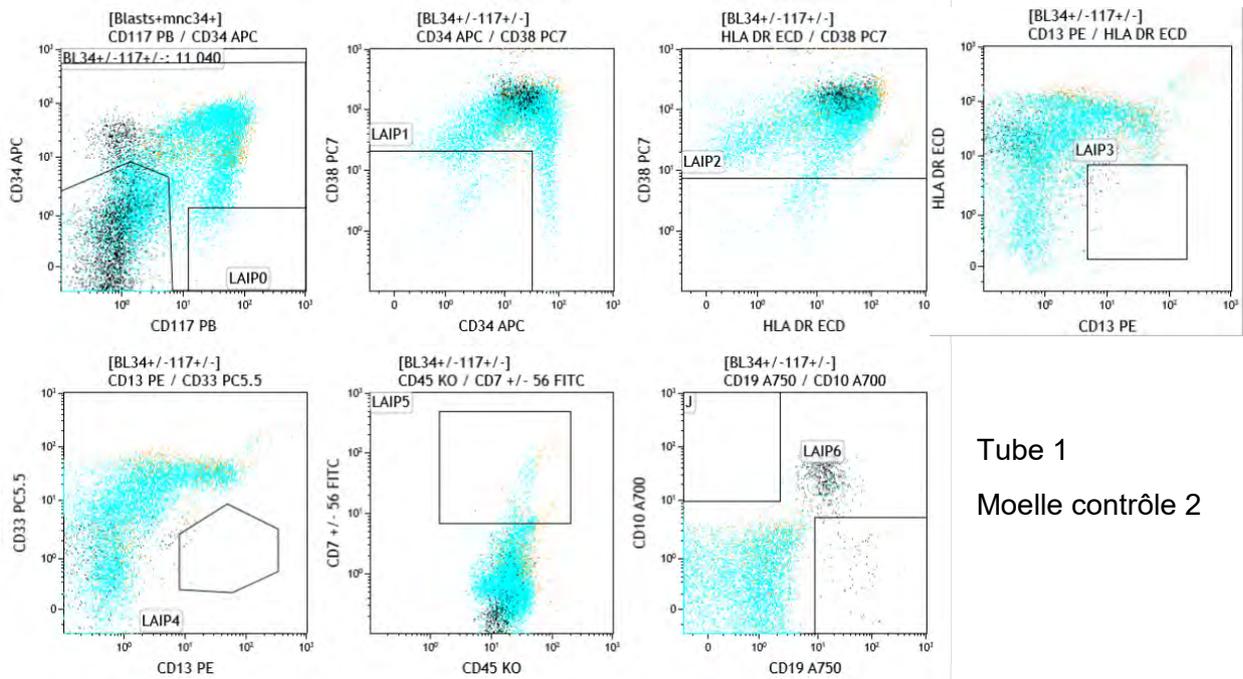
Anticorps	CLONE	Volume	Tube 1	Tube2	Tube3	autre tube
CD10 AA700	ALB1	5µl	x			
CD117 BV421	104D2	5µl	x	x	x	
CD11b PC7	Bear1	5µl			x	
CD123 PC5.5	SSDCLY107D2	5µl		x		
CD13 PE	SJ1D1	10µl	x			
CD13 PE	SJ1D1	5µl				x
CD14 AA750	RMO52	5µl			x	
CD15 FITC		5µl				x
CD16 PB	3G8	5µl				x
CD19 AA750	J3-119	5µl	x			
CD19 ECD	J3 119	5µl		x		
CD2 PE	39C1,5	5µl				x
CD2 PE	39C1.5	5µl				x
CD22 PE Cy5.5	SJ10.1H11	5µl				x
CD24 APC	ALB9	5µl				x
CD3 PE Cy7	UCHT1	5µl				x
CD33 PC5.5	D3HL60.251	5µl	x		x	
CD34 APC	581	5µl	x	x	x	
CD36 AA700	FA6,152	5µl		x	x	
CD38 PC7	HB7	10µl	x	x		
CD4 PE	13B8 2	5µl			x	
CD45 Krome Orange	J33	5µl	x	x	x	x
CD45 ECD	J33	5µl				x
CD45 RA APC H7	HI100	5µl		x		
CD56 FITC	NCAM16,2	10µl	x			x
CD56 PE Cy7	N901[NKH-1]	5µl				x
CD64 A750	22	5µl				x
CD64 PC7	22	5µl				x
CD65 FITC	88H7	5µl			x	
CD7 A700	8H8.1	5µl				x
CD7 FITC	8H8.1	10µl	x			
CD79a PC5.5	HM47.1.1	5µl				x
CD90 FITC	F15-42-1-5	10µl		x		
CD97 PE	VIM3b	2.5		x		
CLL1 PE (CD371)	50C1	2.5		x		
HLADR ECD	Immu-357	5µl	x		x	
MPO FITC	MPO-7	5µl				x
TIM3 PE (CD366)	7D3	2.5		x		

Annexe 2. Aide à la validation : « images » de moelles contrôles

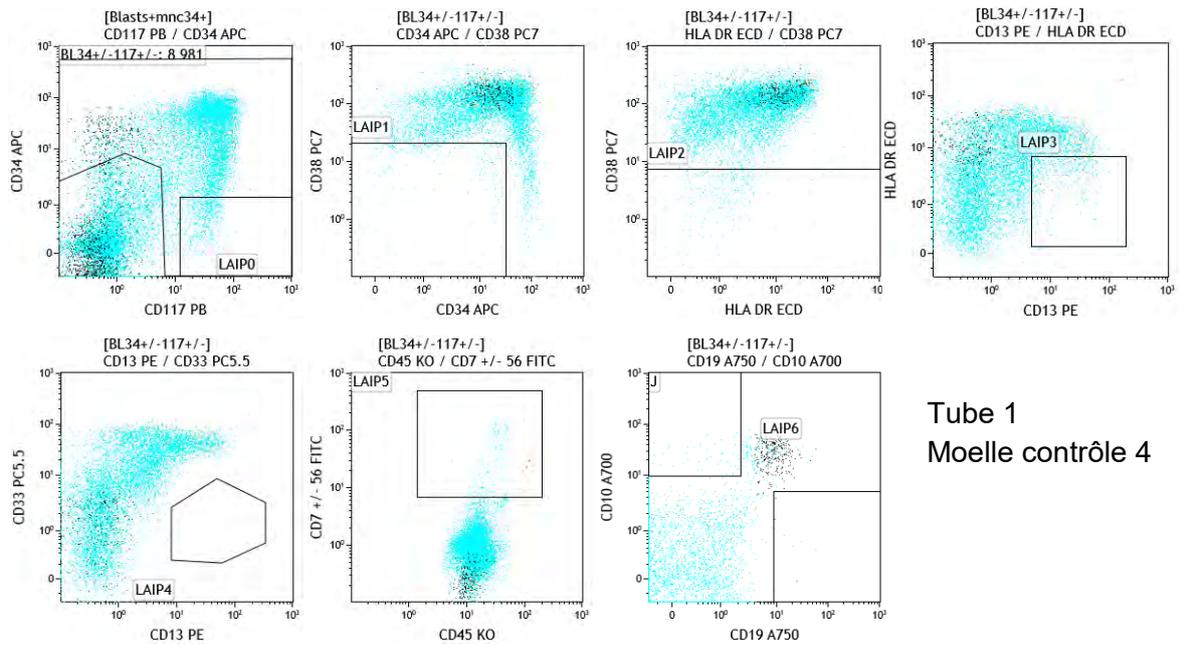
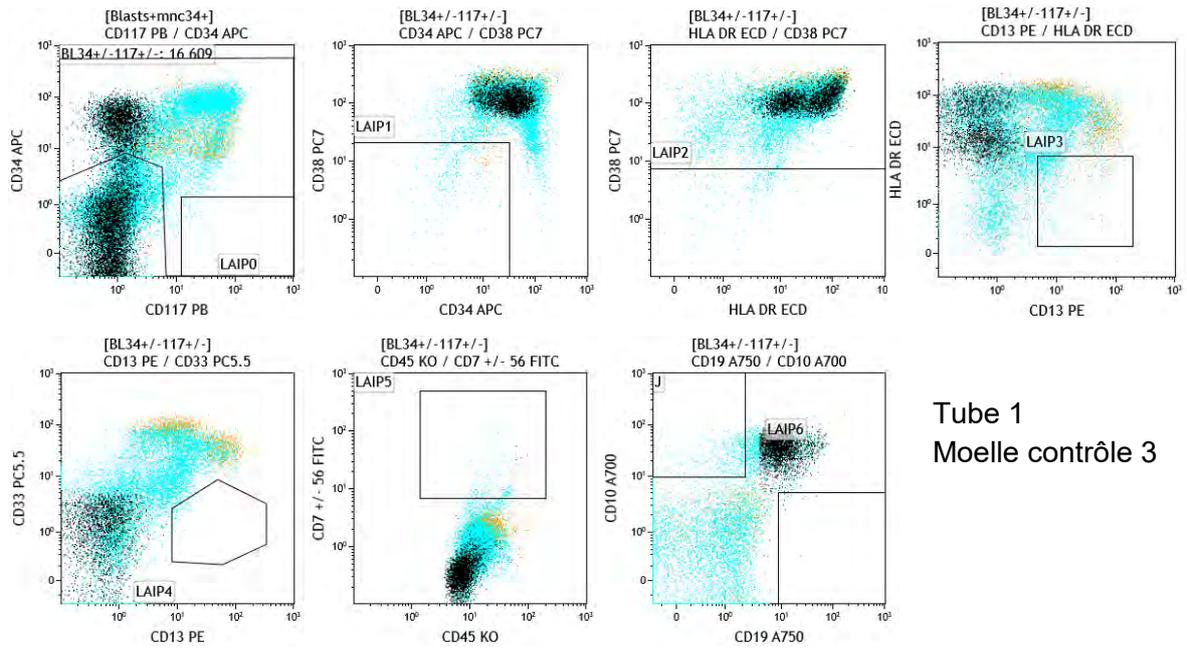
- Tube 1

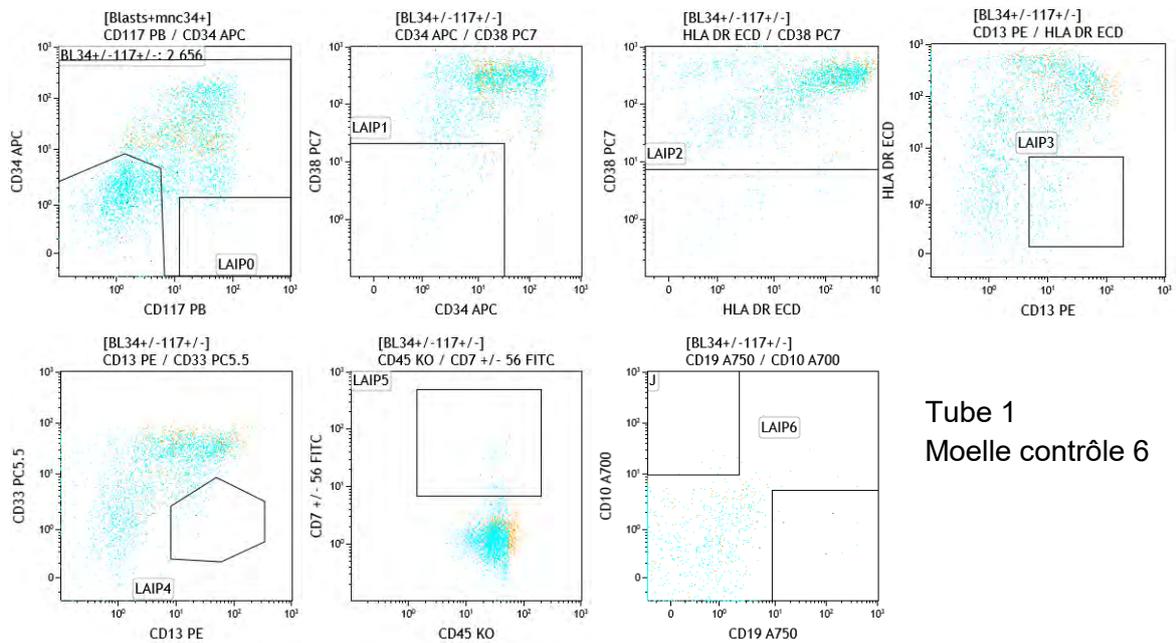
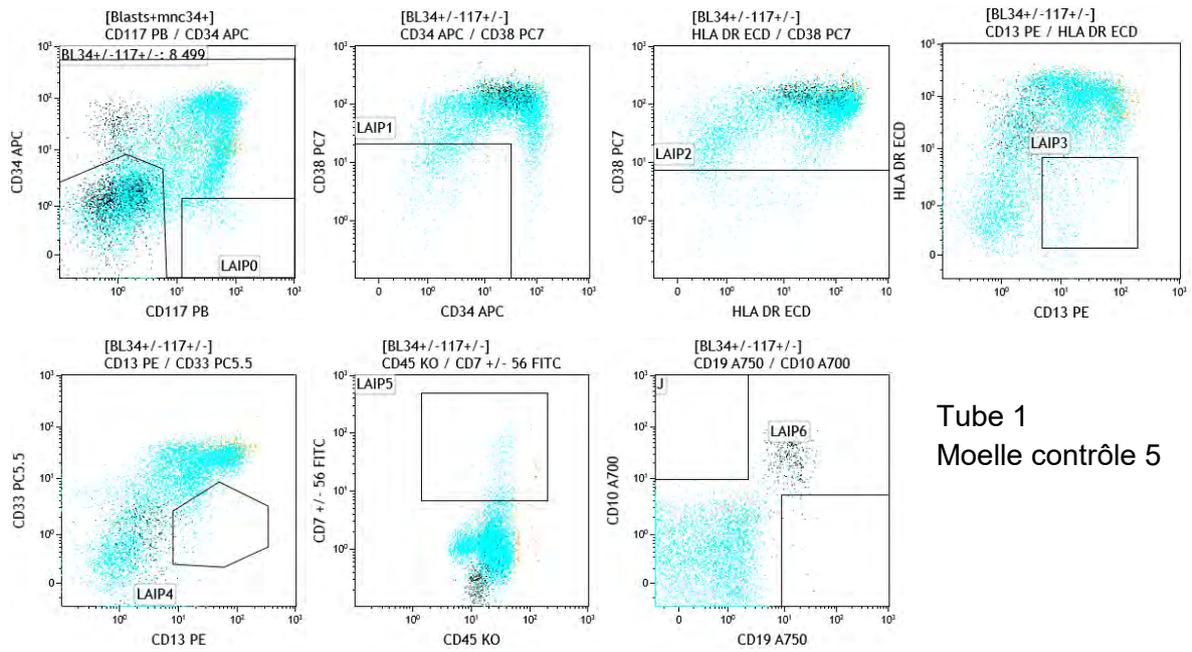


Tube 1
Moelle contrôle 1

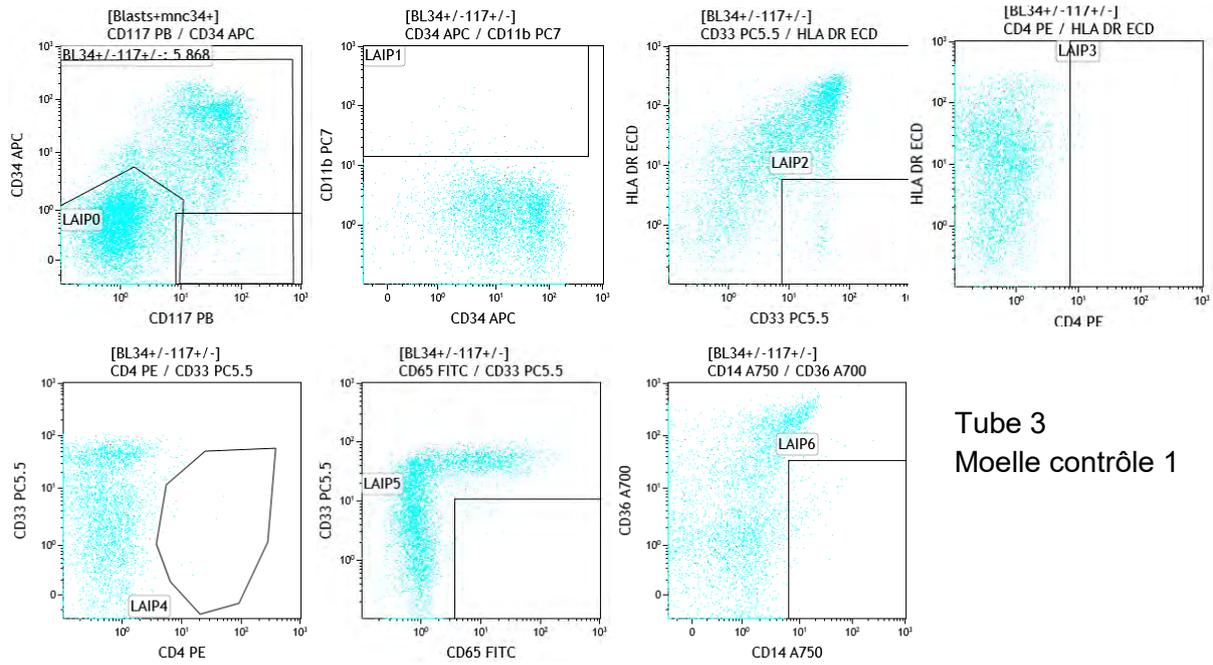


Tube 1
Moelle contrôle 2

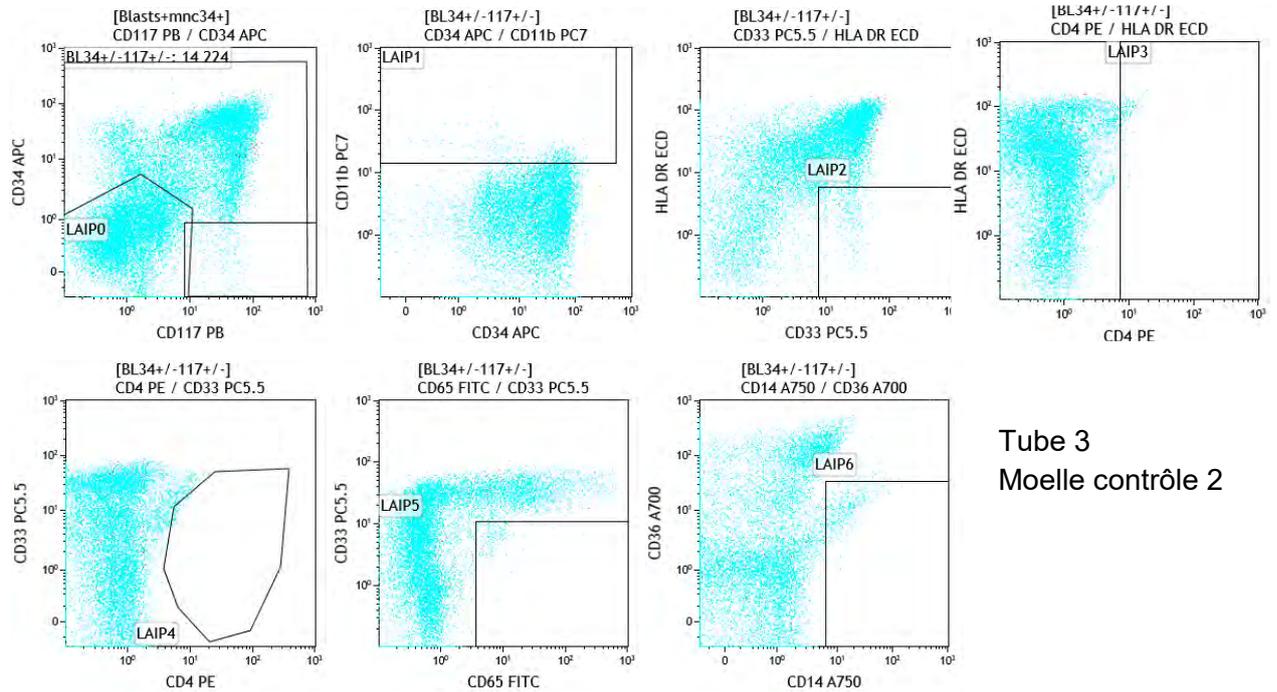




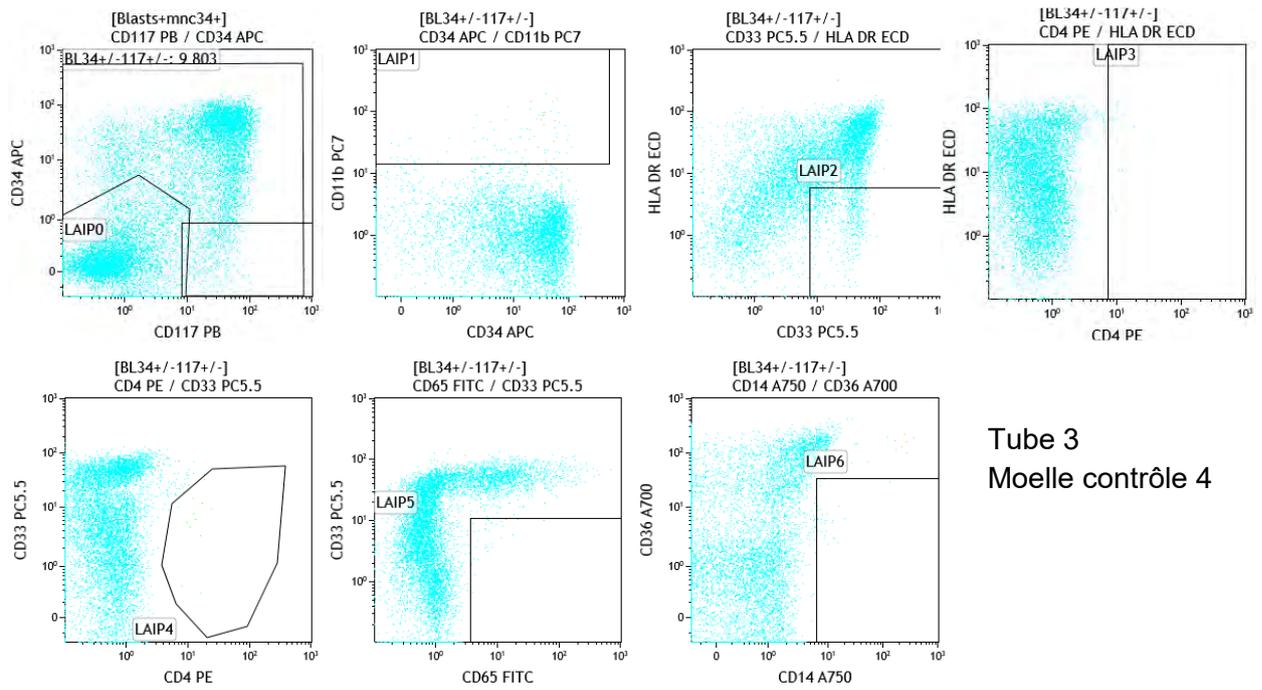
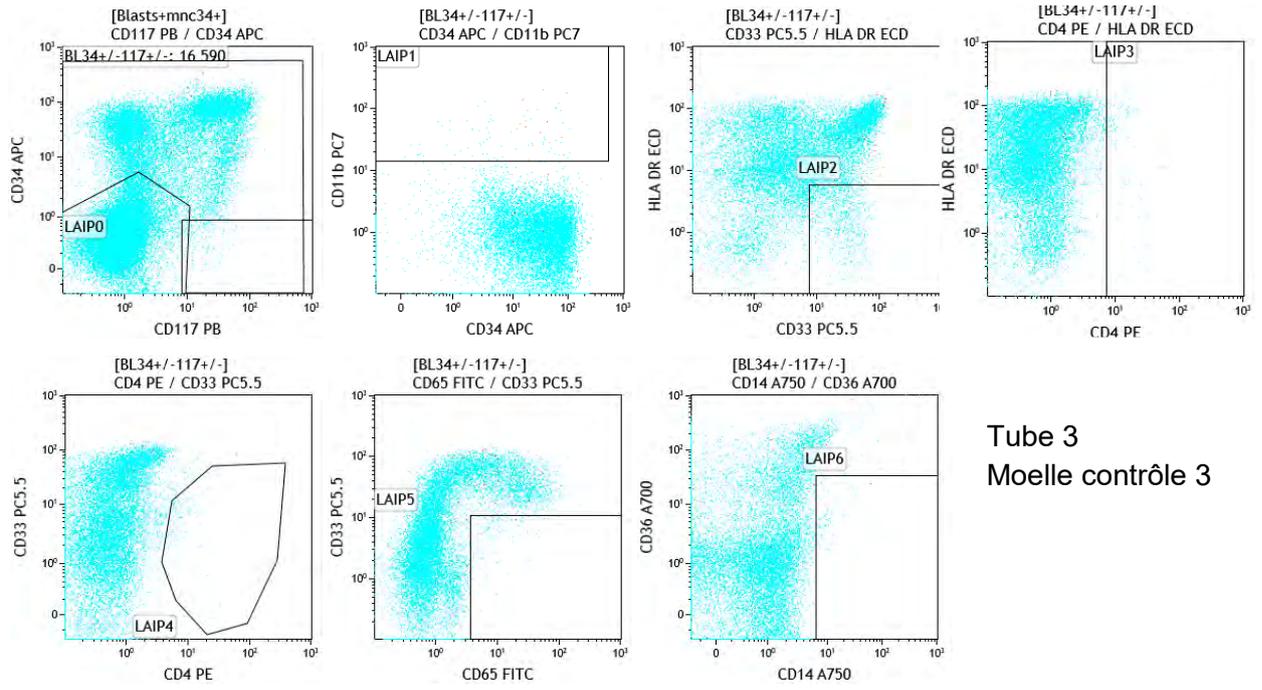
• **Tube 3**

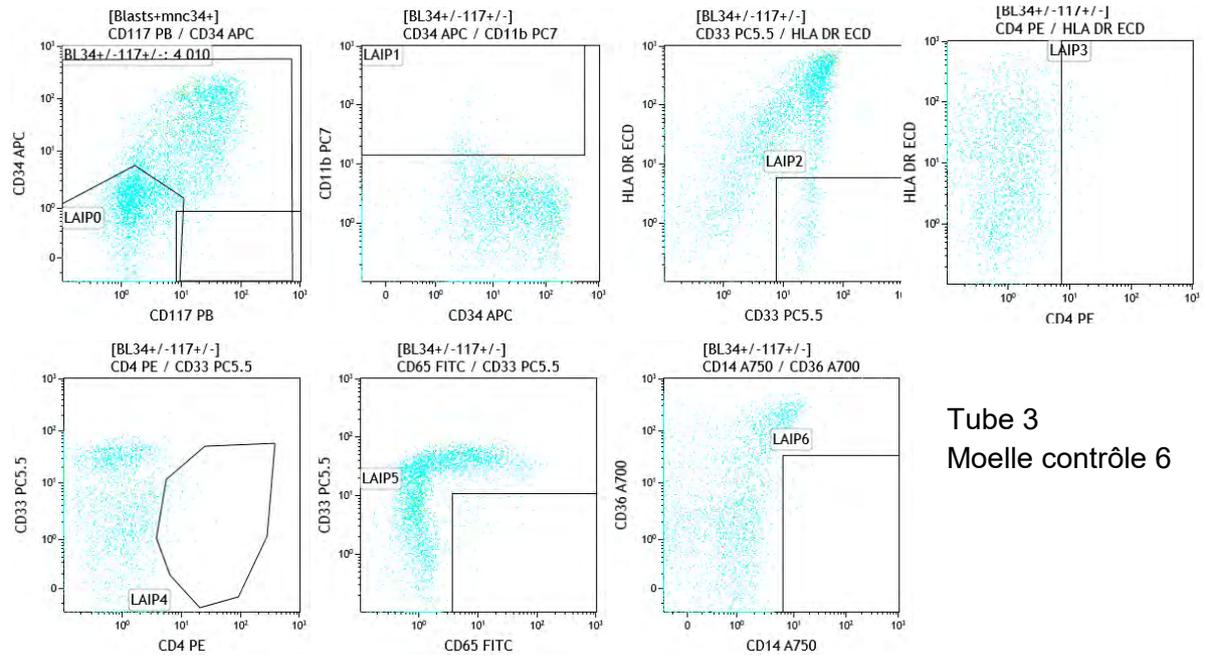
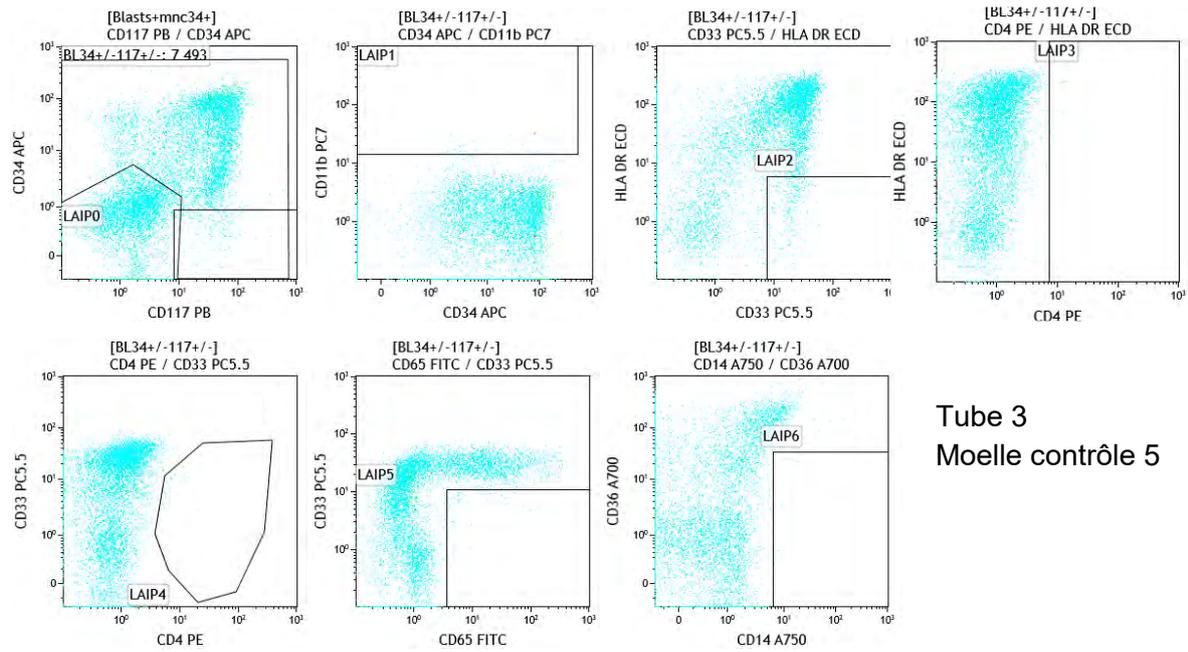


Tube 3
Moelle contrôle 1



Tube 3
Moelle contrôle 2



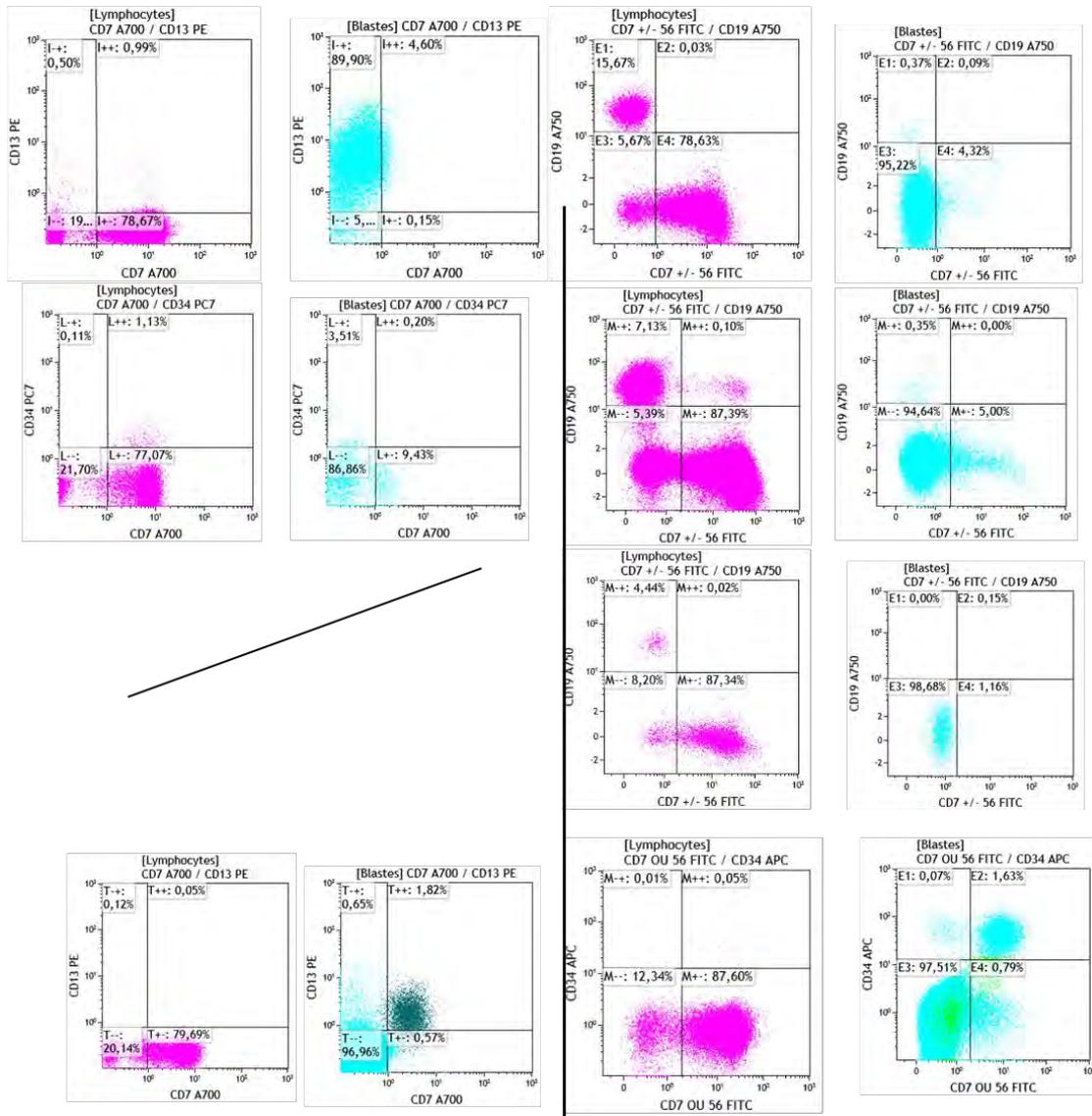


Annexe 3. Evaluation nouveau panel par rapport à l'ancien

CD7+ CD56

ancien tube 1

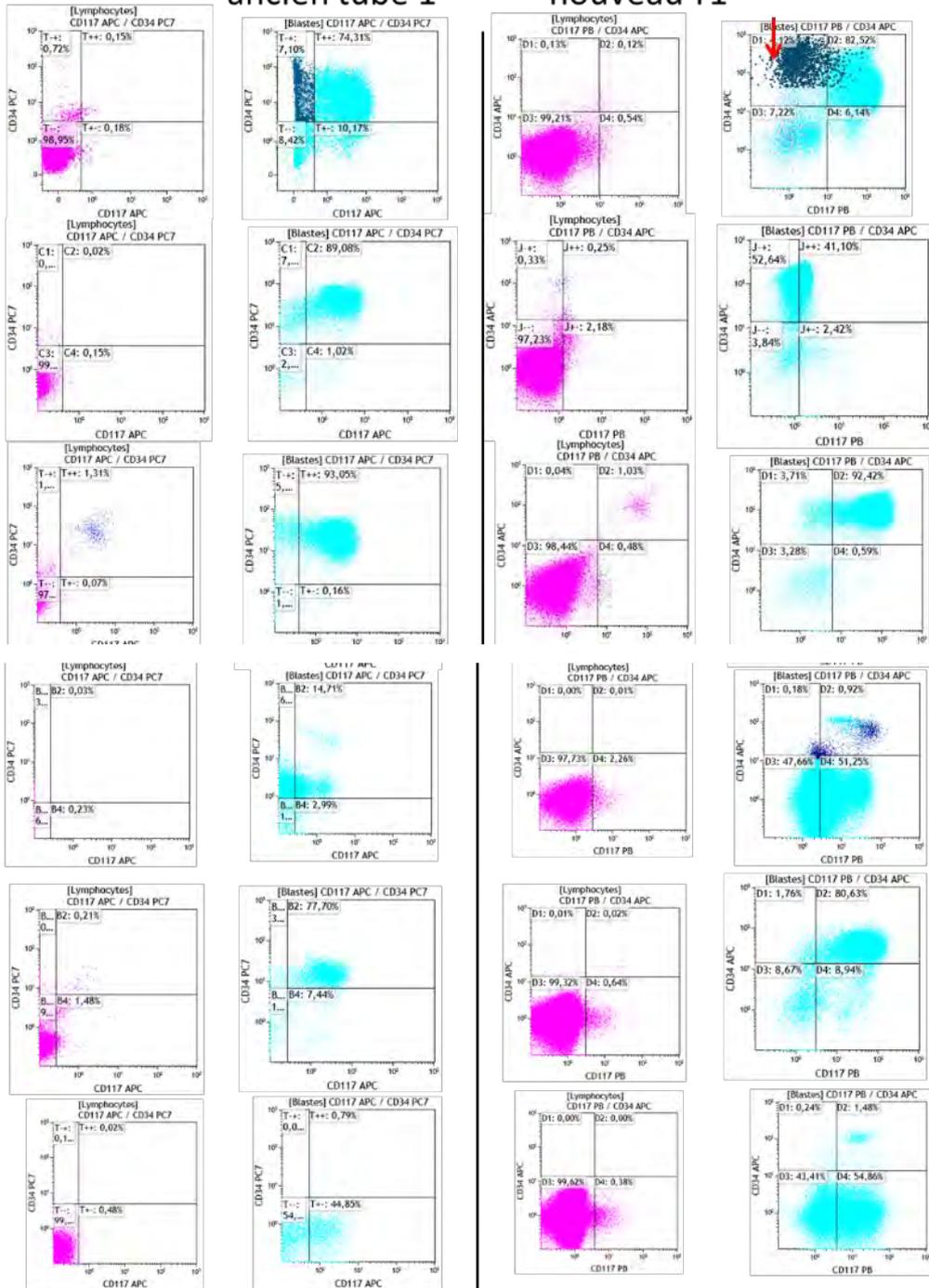
nouveau T1



CD34+CD117

ancien tube 1

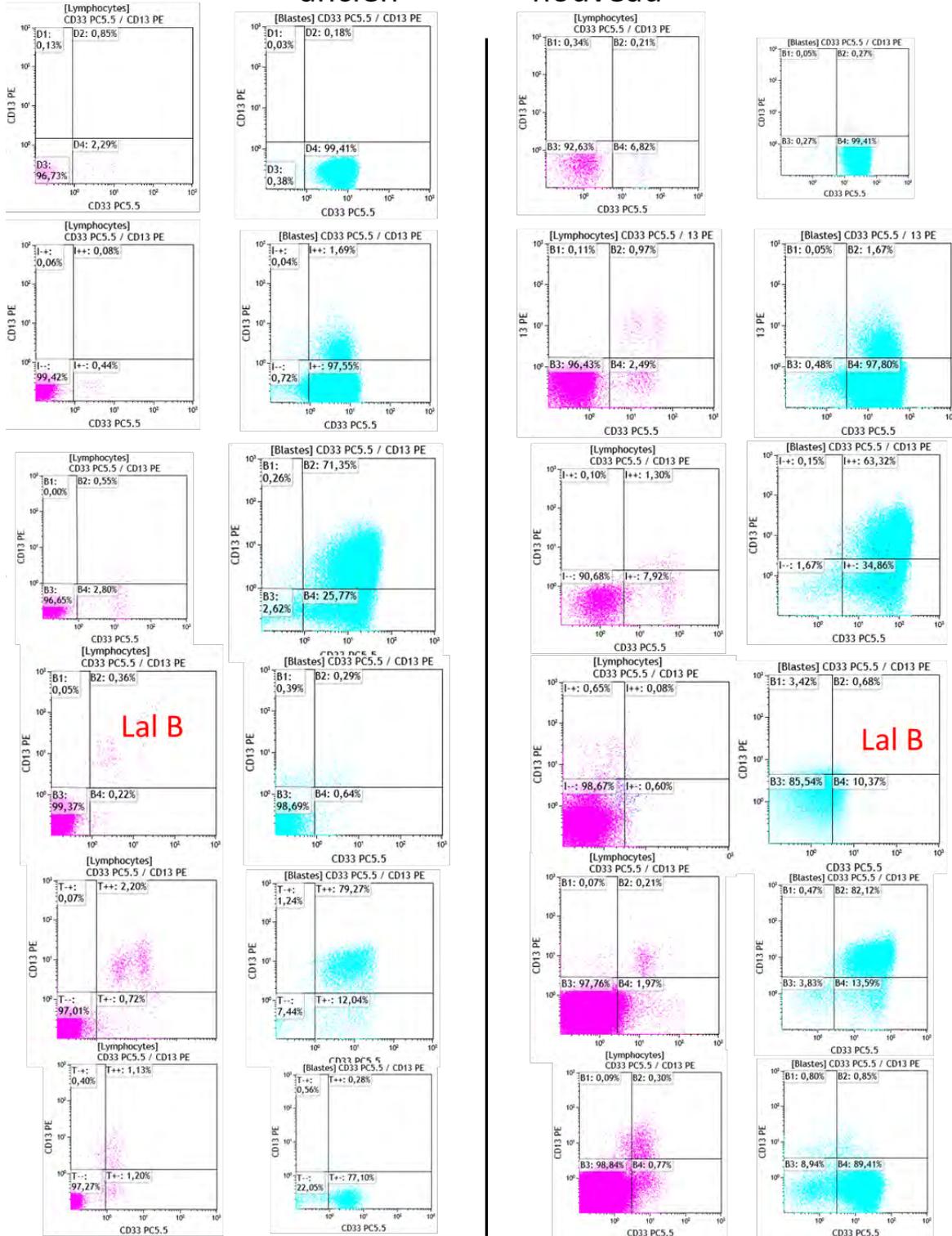
nouveau T1 CD19+



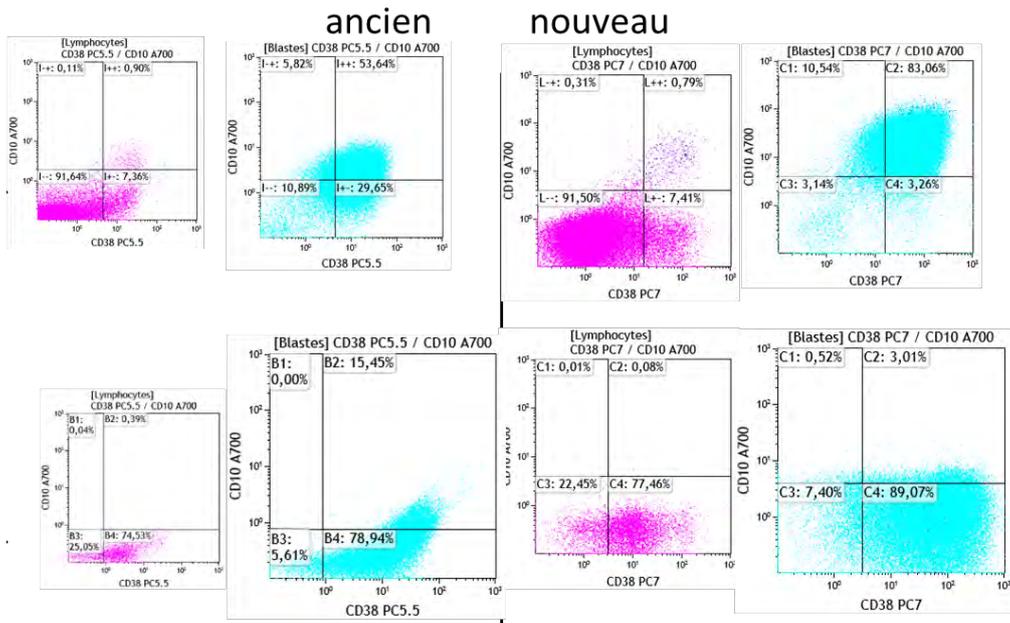
CD13+CD33

ancien

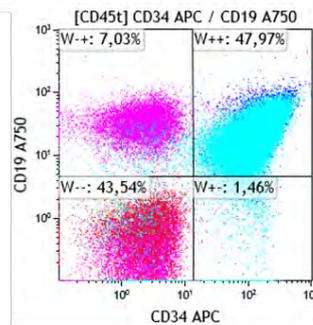
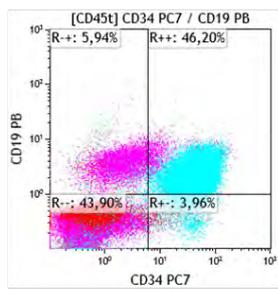
nouveau



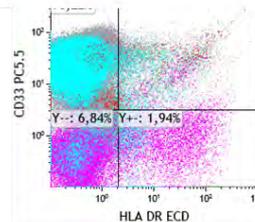
CD10 CD38



CD 19



HLA DR



Annexe 4. Script « R » moelles contrôles

```
##### POOL MOELLE NORMALE #####
##### TUBE 1 #####
library(flowCore)
## setwd A CHANGER --> dossier de travail
setwd("C:/Users/CMF/Documents/MRD LAM/LMD_Rangés/Moelles Normales/TUBE_1")
## Lecture des fichiers LMD. Le t1_noncomp sert à avoir les noms exacts des marqueurs mais ATTENTION, ils ne sont pas
dans le même ordre pour les fichiers compensés et non compensés. Ils doivent être recopiés manuellement.

t1_comp<-read.flowSet(path = "SINGLES", pattern = ".LMD",dataset = 2)
t1_noncomp<-read.flowSet(path = "SINGLES", pattern = ".LMD",dataset = 1)

## Attribution des noms de marqueurs
name<-c("FS PEAK LIN", "FS INT LIN", "FS TOF LIN", "SS PEAK LIN", "SS INT LIN", "FL1 INT LIN", "FL2 INT LIN", "FL3 INT LIN",
        "FL4 INT LIN", "FL5 INT LIN", "FL6 INT LIN", "FL7 INT LIN", "FL8 INT LIN", "FL9 INT LIN", "FL10 INT LIN", "TIME")
## S'il n'y a qu'une moelle normale, mettre un # devant les lignes 2 et 3
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T1.LMD"]@parameters@data[["name"]]]<-name # Si une seule MN garder cette ligne
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T1.LMD"]@parameters@data[["name"]]]<-name
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T1.LMD"]@parameters@data[["name"]]]<-name

marqueurs<-c("FS PEAK LIN", "FS INT LIN", "FS TOF LIN", "SS PEAK LIN", "SS INT LIN", "CD7 +/- 56 FITC", "CD13 PE",
            "HLA DR ECD", "CD33 PC5.5", "CD38 PC7", "CD34 APC", "CD10 A700", "CD19 A750", "CD117 PB", "CD45 KO", "TIME")
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T1.LMD"]@parameters@data[["desc"]]]<-marqueurs # Idem si une seule MN
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T1.LMD"]@parameters@data[["desc"]]]<-marqueurs
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T1.LMD"]@parameters@data[["desc"]]]<-marqueurs
```

```

# Pour avoir une idée du graphique en 45/SS enlever les #
#plot(log(t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T1.LMD"]])@exprs[1:100000,15]),
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T1.LMD"]])@exprs[1:100000,5])
#plot(log(t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T1.LMD"]])@exprs[1:100000,15]),
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T1.LMD"]])@exprs[1:100000,5])
#plot(log(t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T1.LMD"]])@exprs[1:100000,15]),
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T1.LMD"]])@exprs[1:100000,5])

## On enlève les SS fort : supprime tous les évènements avec un signal SS > 600 000 (cf plot ci-dessus)
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T1.LMD"]])@exprs<-
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T1.LMD"]])@exprs[t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T1.LMD"]])@exprs[,5]<600000,]
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T1.LMD"]])@exprs<-
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T1.LMD"]])@exprs[t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T1.LMD"]])@exprs[,5]<600000,]
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T1.LMD"]])@exprs<-
t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T1.LMD"]])@exprs[t1_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T1.LMD"]])@exprs[,5]<600000,]

## on exporte la/les moelle/s indépendamment : elles auront toutes le même nom mais auront un chiffre devant pour les
distinguer. Et elle conserve le nom du patient dans Kaluza au besoin.
write.flowSet(t1_comp, outdir = "SINGLES", filename = "MN_SSslow_singles_T1") # le outdir permet de fixer le dossier
# d'écriture final

##### TUBE 2 #####

## Script valable pour 3 moelles témoins à 16 paramètres
library(flowCore)
setwd("C:/Users/CMF/Documents/MRD LAM/LMD_Rangés/Moelles Normales/TUBE_2")

```

```

## Lecture des fichiers LMD. Le t2_noncomp sert à avoir les noms exacts des marqueurs mais ATTENTION, ils ne sont pas
## dans le même ordre pour les fichiers compensés et non compensés. Ils doivent être recopiés manuellement.
t2_comp<-read.flowSet(path = "SINGLES", pattern = ".LMD",dataset = 2)
t2_noncomp<-read.flowSet(path = "SINGLES", pattern = ".LMD",dataset = 1)

## attribution des noms et description des marqueurs
name<-c("FS PEAK LIN","FS INT LIN","FS TOF LIN","SS PEAK LIN","SS INT LIN","FL1 INT LIN","FL2 INT LIN","FL3 INT LIN",
        "FL4 INT LIN","FL5 INT LIN","FL6 INT LIN","FL7 INT LIN","FL8 INT LIN","FL9 INT LIN","FL10 INT LIN","TIME")
t2_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T2.LMD"]].@parameters@data[["name"]]<-name
t2_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T2.LMD"]].@parameters@data[["name"]]<-name
t2_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T2.LMD"]].@parameters@data[["name"]]<-name

marqueurs<-c("FS PEAK LIN","FS INT LIN","FS TOF LIN","SS PEAK LIN","SS INT LIN","CD90 FITC","Mix PE","CD19 ECD",
            "CD123 PC5.5","CD38 PC7","CD34 APC","CD36 A700","CD45RA A750","CD117 PB","CD45 KO","TIME")
t2_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T2.LMD"]].@parameters@data[["desc"]]<-marqueurs
t2_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T2.LMD"]].@parameters@data[["desc"]]<-marqueurs
t2_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T2.LMD"]].@parameters@data[["desc"]]<-marqueurs

## Plot si besoin
#plot(log(t2_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T2.LMD"]].@exprs[1:100000,15]),
t2_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T2.LMD"]].@exprs[1:100000,5])
#plot(log(t2_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T2.LMD"]].@exprs[1:100000,15]),
t2_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T2.LMD"]].@exprs[1:100000,5])
#plot(log(t2_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T2.LMD"]].@exprs[1:100000,15]),
t2_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T2.LMD"]].@exprs[1:100000,5])

```

```

## On enlève les SS fort :
t2_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T2.LMD"]].@exprs<-
t2_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T2.LMD"]].@exprs[,5]<600000,]
t2_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T2.LMD"]].@exprs<-
t2_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T2.LMD"]].@exprs[,5]<600000,]
t2_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T2.LMD"]].@exprs<-
t2_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T2.LMD"]].@exprs[,5]<600000,]

## on exporte les moelles indépendamment :
write.flowSet(t2_comp, outdir = "SINGLES", filename = "MN_SSslow_singles_T2")

##### TUBE 3 #####
library(flowCore)
setwd("C:/Users/CMF/Documents/MRD LAM/LMD_Rangés/Moelles Normales/TUBE_3")

## Lecture des fichiers LMD. Le t3_noncomp sert à avoir les noms exacts des marqueurs mais ATTENTION, ils ne sont pas
## dans le même ordre pour les fichiers compensés et non compensés. Ils doivent être copiés manuellement.
t3_comp<-read.flowSet(path = "SINGLES", pattern = ".LMD",dataset = 2)
t3_noncomp<-read.flowSet(path = "SINGLES", pattern = ".LMD",dataset = 1)

name<-c("FS PEAK LIN","FS INT LIN","FS TOF LIN","SS PEAK LIN","SS INT LIN","FL1 INT LIN","FL2 INT LIN","FL3 INT LIN",
        "FL4 INT LIN","FL5 INT LIN","FL6 INT LIN","FL7 INT LIN","FL8 INT LIN","FL9 INT LIN","FL10 INT LIN","TIME")
t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T3.LMD"]].@parameters@data[["name"]]<-name
t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T3.LMD"]].@parameters@data[["name"]]<-name
t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T3.LMD"]].@parameters@data[["name"]]<-name

```

```

marqueurs<-c("FS PEAK LIN", "FS INT LIN", "FS TOF LIN", "SS PEAK LIN", "SS INT LIN", "CD65 FITC", "CD4 PE", "HLA DR ECD",
            "CD33 PC5.5", "CD11b PC7", "CD34 APC", "CD36 A700", "CD14 A750", "CD117 PB", "CD45 KO", "TIME")
t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T3.LMD"]@parameters@data[["desc"]]<-marqueurs
t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T3.LMD"]@parameters@data[["desc"]]<-marqueurs
t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T3.LMD"]@parameters@data[["desc"]]<-marqueurs

#plot(log(t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T3.LMD"]@exprs[1:100000,15]),
t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T3.LMD"]@exprs[1:100000,5])
#plot(log(t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T3.LMD"]@exprs[1:100000,15]),
t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T3.LMD"]@exprs[1:100000,5])
#plot(log(t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T3.LMD"]@exprs[1:100000,15]),
t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T3.LMD"]@exprs[1:100000,5])

## On enlève les SS fort :
t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T3.LMD"]@exprs<-
t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T3.LMD"]@exprs[t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_1_T3.LMD"]@exprs[,5]<600000,]
t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T3.LMD"]@exprs<-
t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T3.LMD"]@exprs[t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_2_T3.LMD"]@exprs[,5]<600000,]
t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T3.LMD"]@exprs<-
t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T3.LMD"]@exprs[t3_comp@frames[["MOELLE_N_singles_3_T3.LMD"]@exprs[,5]<600000,]

## on exporte les moelles :
write.flowSet(t3_comp, outdir = "SINGLES", filename = "MN_SSlow_singles_T3")

```

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Mise en place de l'évaluation de la maladie résiduelle dans les leucémies aiguës myéloïdes par technique de cytométrie en flux au laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges

Pour les patients atteints de leucémie aiguë myéloïde (LAM), le statut de la maladie résiduelle minimale (MRD) est capital pour le pronostic et le traitement. Utilisée comme outil diagnostique au laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges, la cytométrie en flux (CMF) permet également l'évaluation de la MRD de façon rapide et sensible. L'adaptation de cette technique a nécessité l'application d'un nouveau panel de cytométrie basé sur les recommandations nationale et européenne. Deux approches d'évaluation de la MRD ont été mises en place au cours de ce travail. La première stratégie est basée sur la recherche de cellules blastiques exprimant un phénotype immunologique aberrant associé à la leucémie (LAIP) tandis que la seconde consiste à évaluer le taux de cellules souches leucémiques (LSC). Celles-ci partagent la même base phénotypique que les cellules souches hématopoïétiques physiologiques (CD34+ CD38-) associée à un ou des marqueurs aberrants.

L'évaluation de la MRD a été réalisée chez 26 patients par cytométrie en flux, combinant les stratégies LAIP et LSC, et comparés aux techniques de biologie moléculaire (surexpression de WT1, mutation de NPM1, recherche de transcrite AML1-ETO) lorsque cela était possible. Les résultats obtenus confirment l'importance de la cytométrie en flux dans l'évaluation de la MRD chez les patients ne présentant pas d'anomalies moléculaires de type CBF, NPM muté ou PML RARA.

Mots-clés : Maladie résiduelle minimale ; Cytométrie en flux ; Leucémie Aigüe Myéloïde ; LAIP ; LSC

Establishment of the residual disease evaluation in acute myeloid leukemias by multiparameter flow cytometry in the hematology laboratory of Limoges University Hospital

Minimal residual disease (MRD) status evaluation for patients with acute myeloid leukemia (AML) is critical for prognosis and treatment. Used as a diagnostic tool in the hematology laboratory of Limoges University Hospital, multiparameter flow cytometry (MFC) also allows quick and sensitive evaluation of MRD. To adapt this technique we design a new cytometry panel based on national and European recommendations. Two approaches to MRD evaluation were implemented during this work. The first strategy is based on the search for blast cells expressing a leukemia associated immunophenotype (LAIP) characterized by the presence of an aberrant phenotype. The second is to evaluate the rate of leukemia stem cell (LSC). These share the same phenotypic basis as physiological hematopoietic stem cells (CD34 + CD38-) associated with one or more aberrant markers.

MRD evaluation was performed in 26 patients by flow cytometry, combining LAIP and LSC strategies, as well as molecular biology techniques (WT1 overexpression, NPM1 mutation, AML1-ETO transcript search) when it was possible. The results obtained confirmed the importance of flow cytometry in the evaluation of MRD in patients without molecular abnormalities like CBF, NPM1 mutated, or PML RARA.

Keywords : Minimal Residual Disease ; Multiparameter Flow Cytometry ; Acute Myeloid Leukemia ; LAIP ; LSC

