

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNÉE : 2021

THÈSE 2021 TOU3 2051

THÈSE

**POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE MÉDICALE**

Présentée et soutenue publiquement par

CANALI Alban

**CALCUL DE LA MALADIE RÉSIDUELLE DES LEUCÉMIES AIGUËS
MYÉLOÏDES PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX**

Le 1^{er} octobre 2021

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur VERGEZ François

JURY

Président :	Madame le Professeur DE MAS Véronique
1 ^{er} assesseur :	Monsieur le Professeur RECHER Christian
2 ^{ème} assesseur :	Madame le Docteur VERGNOLLE Inès
3 ^{ème} assesseur :	Monsieur le Docteur VERGEZ François

**UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNÉE 2021

THÈSE 2021 TOU3 2051

THÈSE

**POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE MÉDICALE**

Présentée et soutenue publiquement par

CANALI Alban

**CALCUL DE LA MALADIE RÉSIDUELLE DES LEUCÉMIES AIGUËS
MYÉLOÏDES PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX**

Le 1^{er} octobre 2021

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur VERGEZ François

JURY

Président :	Madame le Professeur DE MAS Véronique
1 ^{er} assesseur :	Monsieur le Professeur RECHER Christian
2 ^{ème} assesseur :	Madame le Docteur VERGNOLLE Inès
3 ^{ème} assesseur :	Monsieur le Docteur VERGEZ François

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1er octobre 2020

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. GAIRIN J.E.	Pharmacologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitolo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
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 BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	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

Maitres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. DELCOURT N.	Biochimie	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique	Mme BON C. (*)	Biophysique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique	M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme SERONIE-VIVIEN S. (*)	Biochimie	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	Mme CABOU C.	Physiologie
		Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		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 GADEA A.	Pharmacognosie
		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. LE NAOUR A.	Toxicologie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MONFERRAN S.	Biochimie
		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		Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)	
Mme LARGEAUD L.	Immunologie	M. François-Xavier TOUBLET	Chimie Thérapeutique
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie		
M. MOUMENI A.	Biochimie		
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique		
Mme SALABERT A.S	Biophysique		
Mme TRIBAUDEAU L.	Droit Pharmaceutique		

SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances
- 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 Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession
- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens
- De coopérer avec les autres professionnels de santé

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Véronique DE MAS,

C'est un immense honneur pour moi que vous ayez accepté de présider ce jury malgré les nombreuses sollicitations dont vous faites l'objet. Votre maîtrise de la cytologie ainsi que votre pédagogie m'ont toujours impressionné, j'apprends énormément à vos côtés et vous remercie également pour cela.

A Monsieur le Professeur Christian RECHER,

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de siéger au sein de mon jury et d'avoir accepté de juger ce travail avec toute votre expérience et expertise. Je vous prie de bien vouloir accepter ma respectueuse considération.

A Madame le Docteur Inès VERGNOLLE,

C'est un plaisir pour moi que tu fasses partie de mon jury et que tu évalues ce travail avec toutes les connaissances que tu possèdes sur le sujet. Nous n'avons pas beaucoup eu l'occasion de travailler ensemble pour le moment mais le prochain semestre devrait permettre de remédier à cela !

A Monsieur le Docteur François VERGEZ,

Je me souviens encore très bien du moment où, quelques jours après avoir accepté ce sujet, tu m'as simplement dit « Tu es fou d'avoir dit oui » alors que j'étais un pauvre petit 2^e semestre. Effectivement ce n'était pas le plus simple et surtout un travail de longue haleine ! Je te remercie de m'avoir accordé ta confiance, de m'avoir laissé squatter ton bureau (je pense que c'est le terme adapté) pendant des jours entiers pour m'amuser sur FlowSom et d'avoir toujours répondu à mes sollicitations avec ta bonne humeur habituelle ! C'est un réel plaisir de travailler et d'apprendre à tes côtés.

A ma Famille

Merci **Maman**. Pour tout, absolument tout. Je n'en serais pas là aujourd'hui si tu n'avais pas été là pour me soutenir en toutes circonstances. Tu as toujours tout fait pour que ma vie soit la plus simple et agréable possible, je t'en suis éternellement reconnaissant. Je sais à quel point tu es fière de moi et c'est ma plus belle récompense...

Merci **Mamie**. Tu m'as parlé il y'a quelques semaines d'une phrase concernant mon futur que je t'ai dit aux alentours de mes 11 ans, et voilà, aujourd'hui on y est ! Je ne te remercierai jamais assez pour m'avoir accompagné et soutenu durant ce long chemin. Tu es une personne et une mamie exceptionnelle... Merci, merci, merci...

Merci **Lulu**. Ton soutien permanent, ta générosité et l'éducation que tu m'as donnée m'ont permis d'en arriver là aujourd'hui. J'ai une chance inouïe que tu sois entré si tôt dans ma vie ! Merci pour tout.

Merci **Papa**, d'avoir fait de moi l'homme que je suis aujourd'hui.

Merci **Laure** et **Guillaume** pour avoir rendu mes weekends d'enfance beaucoup plus amusants, et également pour ces karaokés sur du Gilbert Montagné pendant les longs trajets en voiture ! On forme une chouette famille ! Et merci aussi à toi **Mathieu**, tu es un beau frère d'exception !

Merci **Mémé, Pépé, Patricia, Stéphane, Justine** et **Alice**, pour tous ces bons moments passés en famille.

Merci **Mémé Lucette** et **Pépé Claude**, pour votre gentillesse incroyable et l'amour que vous m'avez donné.

A mes proches

Tout d'abord ceux qui sont présents depuis l'enfance...

Merci **Hugo**, le petit frère que je n'avais pas, pour tous ces moments passés aux quatre coins de la France, de l'Italie et de l'Allemagne, ces innombrables fous rires, ces spoonings, ces michums et autres french dictons... C'est un bonheur de t'avoir vu et de te voir encore grandir à mes côtés ! Vivement notre prochain périple !

Merci **Chloé**, la petite sœur que je n'avais pas non plus, pour toutes ces soirées passées ensemble, les discussions dans la rue Charles Chanlon, ta joie de vivre et d'avoir toujours été présente quand il le fallait, ne change rien !

Merci également à vos parents, **Christophe** et **Sylvie**, vous avez toujours été accueillants et bienveillants envers moi, on aurait difficilement pu faire mieux comme voisins !

Merci **Thomas**, d'avoir commencé par prendre de nombreuses roustes au judo, c'était un réel plaisir ! Mais ça l'a été encore plus de te garder parmi mes amis les années qui ont suivi !

Merci **Dec** (ou Steeve comme tu préfères) pour ton amitié indéfectible pendant toutes années, je ne préfère pas raconter ici nos voyages à Bordeaux, mais ils resteront gravés dans ma mémoire pendant très longtemps comme tous les autres moments ensemble ! En plus de tout ça tu as rencontré une belle personne **Marion**, que j'ai le bonheur de voir à chaque fois que nous nous retrouvons. Et merci également à tes parents pour nous avoir si souvent ouvert les portes de votre maison, cela nous a permis de vivre des moments d'amitié incroyables pendant toutes ces années !

Puis vient le temps de la faculté...

Merci **Alexanne**, fidèle au poste depuis la PACES, tu as toujours été là pour moi... On aura passé de belles années de bêtise et de fête ! Notre amitié est vraiment précieuse à mes yeux !

Merci **Pierre**, pour ces dimanches de révision à Cham, entre paris sportifs improbables et un épisode de « A pleines dents » on aura réussi à avoir nos concours respectifs ! Merci pour tous ces moments ensemble à Clermont et à Toulouse, et pour ces deux ans et demi de colocation durant lesquels on se sera marré un bon nombre de fois, j'en garderai un souvenir mémorable. T'es un king. Merci **Sara** d'avoir des trous dans le cerveau ! Des RP à la Réunion, et bientôt la Guyane... On n'est pas près de s'arrêter ! Merci **Vio** d'avoir tenté de devenir influenceuse pendant la fac et pour ces soirées télé à la coloc ! Merci **Adrien**, un collègue comme on en fait plus, je suis tellement heureux qu'on se mette des tapes dans le dos depuis 6 ans maintenant ! Merci **Xav** ou Etienne de Crecy je ne sais plus, pour ta folie et ta joie de vivre permanente ! C'est toujours un bonheur de passer du temps avec toi ! Merci **Tatan**, ces soirées à Montchany et à Étang-Salé resteront dans l'histoire, vivement nos retrouvailles dans la jungle ! Merci **Marie** pour nous avoir montré qu'être dans les promotions d'au-dessus n'était pas un signe de maturité ! Merci **Manon** pour tes nombreuses expressions plus dingues les unes que les autres. Il me tarde qu'on se retrouve autour d'une petite pierrade Ambiance de chez Tefal. Merci **Julie** de supporter la bande de grands enfants à chaque fois qu'on se retrouve et pour ton accueil dès que je repasse faire un tour en Auvergne ! Merci à tous les copains de la fac que je n'ai pas cités ici, aussi bien en pharma qu'en med pour ces quelques années d'étude hautes en couleur ! Merci **l'UFC** !

Et des autres facultés de France...

Merci **Maxime**, mon chouineur préféré, une amitié qui a démarré bien avant Toulouse, qui a pris son envol il y a un peu plus d'un an et qui m'est désormais indispensable. Nos RCP en plein cagnard sont toujours de grands moments d'intelligence et de savoir-vivre, il me tarde les prochaines, prépare le TPE !

Merci **Nono** pour tes weekends à Beaulieu, c'est incroyable à chaque fois, à **Marie** de réussir à organiser d'une main de maître des moments pour se retrouver, à **Maxime** DJ en devenir et pêcheur hors pair et à **Olivier** d'être un petit chien si bien élevé (ouaf).

Et pour « finir », l'internat...

Merci **Valouche** pour m'avoir fait découvrir le Nord et ses traditions, et d'être une personne si exceptionnelle. Merci **Mathilde** pour tes petits doigts dodus et tous les bons moments passés ensemble, vivement que tu reviennes sur Toulouse ! Merci **Max** pour tous ces moments de convivialité autour d'une belle assiette de salade, et sans oublier ton jumeau **Marc**. Merci **Louise, Gomar** et **Prout** pour tous les instants passés ensemble lors de nos virées en weekend tous ensemble !

Merci **Tanguy**, difficile de trouver où te caser dans ces remerciements. Du début de l'internat, en passant par 6 mois de folie à Cahors et désormais colocataire... C'est un bonheur de vivre avec toi, tu es une personne en or ! Ne change jamais !

Merci à la promo du dessus. Merci **Ali** d'avoir été ma première interaction dans le milieu de la biologie, on a très vite compris que ça allait bien se passer ! Merci **Hugo** pour ces analyses toujours modérées quand on regarde les matchs de C1. Merci **Imane** d'être aussi bienveillante et d'être en permanence en roue libre ! Merci **Maximin** pour tes remarques toujours subtiles et délicates, et surtout pour ton costume de prêtre ! Merci **Anaïs**, derrière ton petit côté autoritaire se cache une personne d'une profonde gentillesse, il me tarde le prochain semestre !

Merci à tous les co-internes de la promo. Merci **Delphine** la fraT, rencontre tardive mais quelle rencontre, on aura perdu quelques points de vie pour tes derniers mois à Toulouse et c'était chouette (signé beauT) ! Merci Alb.. euh **Dorian** pour tous ces moments où les gens ne savent plus qui est qui et pour ces quelques gueuletons ! Merci **Orancie** pour ces semestres ensemble, c'est toujours un plaisir de passer du temps avec toi, tu vas faire une super maman ! Merci **Caro**, PC sans TC, d'avoir été présente et de m'avoir soutenu dans les derniers instants de cette thèse, ce n'est que le début ! Merci **Marin**, dit Naïf ou Bijou, tant de surnoms qui correspondent si bien à ta personnalité ! Merci **Laurie** pour avoir enfilé ton plus beau gilet jaune pour défendre notre cause pendant l'internat ! Merci **Julia** pour ces moments de rage intense pendant ces 6 mois au deuxième étage et tes petits tirs toujours bien sentis ! Merci **Mathilde** (on va dire que tu aurais dû être dans cette promo, ça te correspond mieux) de m'avoir aidé à surmonter la bactério et de partager la même passion que moi pour la bouffe !

Merci **Théo**, mon italien préféré, d'être aussi chauvin et objectif sur les performances de la Roma et de la Squadra ! Me former à tes côtés en héματο a été une chance et continuer à te voir les semestres suivants en est une également. Merci à toi aussi **Cécile** de m'accueillir toujours aussi chaleureusement !

Merci **Cahors** en fait, une douzaine de personnes totalement différentes, mais avec un point commun, celui de pas être le couteau le plus aiguisé du tiroir. C'était une aventure complètement folle à vivre de tous points de vue, je ne m'attendais pas à perdre autant d'espérance de vie en débarquant à la Villa des Tilleuls. Je ne peux pas détailler toutes les conneries avec chacun d'entre vous sinon ces remerciements seraient beaucoup trop longs et ma thèse serait probablement refusée ! Merci **Yann, Aurore, Kev, Eve, Nono, Clo, Val, Brigitte, Marine, Come, Fannie** et les jumelles **Morgan**. Et sans oublier mon **Faustin**, après une blague de tabouret, un regard et une roucoulette, le contrat était signé ! Je n'aurais jamais pensé avoir un frère caché et monté un club d'aviron avec lui 25 ans plus tard !

Merci à mes anciens chefs devenus amis. Merci **Yannick**, tu as été un chef incroyable pendant mes six premiers mois d'hémato, tu m'as beaucoup fait évoluer en tant que biologiste et également dans mon expertise sur MPG, les petits cafés au marché avec **Aude** et le reste de ta tribu sont toujours de bons moments ! Merci **Barni** pour avoir rendu ce semestre tellement enrichissant, aussi bien du point de vue du travail que du brassage de bière ! Et sans oublier ta **Bérange**, d'une gentillesse inégalée !

Merci à **Claire, Lucile** et **Nathalie** pour ces 6 mois de stage, j'en garde un superbe souvenir !

Merci également à tous les biologistes qui m'ont donné goût à l'hémato et tous ses versants, **JB, Jill, Laetitia, Lucie, Fred, Pauline, Vincent, Sophie** et **Agnès**. Merci aussi à tous les techniciens, biologistes et cliniciens que je ne connais pas personnellement qui ont travaillé pour obtenir toutes les données présentes dans cette étude. Merci beaucoup **Marie-Laure** pour m'avoir expliqué les bases de Kaluza et d'avoir toujours avoir pris des nouvelles quand tu me voyais galérer en traitant mes données.

A toi Papi, à toi Tonton...

Table des matières

Table des matières	15
Liste des abréviations	17
Table des figures	19
Table des tableaux	21
I. Introduction	22
II. Hématopoïèse	23
A. Hématopoïèse et lignées	23
1. Érythropoïèse	25
2. Mégacaryopoïèse	25
3. Granulopoïèse	26
4. Monocytopoïèse.....	27
III. Leucémies Aiguës Myéloïdes	28
A. Définition et diagnostic	28
B. Épidémiologie	28
C. Étiologies et facteurs de risque	29
1. Leucémogénèse.....	29
2. Facteurs de risque	30
D. Physiopathologie des signes clinico-biologiques (16)	30
1. Prolifération des blastes.....	30
2. Impact sur les autres lignées hématopoïétiques	31
E. Diagnostic	31
1. Découverte et signes cliniques (16)	31
2. Diagnostic biologique	32
a) Hémogramme (16).....	32
b) Cytologie	32
c) Myélogramme	33
d) Cytométrie en flux (CMF)	33
e) Cytogénétique	34
f) Biologie moléculaire	34
F. Classifications	34
1. Classification OMS	34
2. Classification proposée par Lindsley et al. (22)	36
G. Pronostic	37
H. Traitement	39
IV. Cytométrie en Flux	41
A. Définition	41
B. Principes	41
1. Système fluide	42
2. Système optique.....	43
a) Lasers	43
b) Miroirs dichroïques et filtres optiques	44

3.	Système informatique	45
C.	Cytométrie et immunophénotypage de la moelle osseuse normale	46
1.	Précurseurs.....	47
2.	Lignée granuleuse.....	48
a)	Polynucléaire neutrophile et ses précurseurs.....	48
b)	Polynucléaires éosinophile et basophile	49
3.	Lignée monocytaire	50
4.	Lignée érythroblastique	50
5.	Lignée mégacaryocytaire.....	51
D.	Immunophénotypage des LAM dans le cadre diagnostique.....	51
E.	Un nouvel outil : FlowSOM	53
V.	Maladie résiduelle	56
A.	Définition.....	56
B.	Outils actuels et intérêt	56
C.	Méthodes et stratégies de réalisation de la MRD en CMF	58
1.	Leukemia Associated ImmunoPhenotype (LAIP) et Different from Normal (DfN)	58
2.	Cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (HSPC)	60
VI.	Matériels et méthodes.....	61
A.	Cohorte.....	61
B.	Cytomètre.....	61
C.	Panels et anticorps	62
D.	Logiciels	62
1.	Réglages préalables.....	63
2.	Vérification des réglages des compensations	63
3.	Normalisation des fluorescences	63
4.	Constitution du fichier fusionné.....	64
5.	Recherche de la MRD	64
a)	Phénotype LAIP-DfN	64
b)	Phénotype HSPC	65
VII.	Résultats.....	67
A.	Évaluation de la valeur pronostique de la MRD par CMF.....	67
B.	Évaluation des marqueurs immunophénotypiques	70
C.	Etude bio-clinique des patients selon les différents groupes	72
D.	Mise en relation avec la biologie moléculaire et la cytogénétique.....	74
E.	Caractérisation du pool de cellules souches leucémiques au diagnostique.....	77
F.	Émergence de deux profils.....	78
G.	Patients avec une LAM avec NPM1 muté	78
VIII.	Discussion.....	80
IX.	Conclusion	83
	Bibliographie	84

Liste des abréviations

BFU	Burst forming unity
CD	Cluster de différenciation
CTI	Chimiothérapie intensive
CFU	Colony forming unity
CMF	Cytométrie en flux
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CSL	Cellule souche leucémique
DfN	Different from Normal
ELN	European LeukemiaNet
FAB	Franco-américain-britannique
FSC	Forward scatter
FISH	Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence
HSPC	Hematopoietic Stem and Progenitor Cells
LAL	Leucémie aiguë lymphoblastique
LAM	Leucémie aiguë myéloïde
LAIP	Leukemia Associated Immunophenotype
MRD	Maladie résiduelle mesurable
OMS	Organisation mondiale de la santé
PCM	Progéniteur commun myéloïde
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PEM	Progéniteur érythro-mégacaryocytaire
PGM	Progéniteur granulo-monocytaire
PL	Progéniteur lymphoïde

PMLM	Progéniteur multipotent lympho-myéloïde
MK	Mégacaryocyte
NGS	Next Generation Sequencing
NK	Natural killer
SSC	Side Scatter

Table des figures

Figure 1 : Étapes de l'hématopoïèse jusqu'aux progéniteurs.	24
Figure 2 : Étapes de l'érythropoïèse.	25
Figure 3 : Étapes de la mégacaryopoïèse.	26
Figure 4 : Étapes de la granulopoïèse.	26
Figure 5 : Étapes de la monocytopoïèse.	27
Figure 6 : Évolution du taux d'incidence des LAM selon les tranches d'âge au cours du temps.	29
Figure 7 : Modèle de la clonalité dans une LAM avec émergence d'un second clone (dès le diagnostic ou à la rechute).	29
Figure 8 : Utilisation des nouvelles molécules dans l'arsenal thérapeutique pour le traitement des LAM. (28)	40
Figure 9 : Schéma d'un cytomètre par Life Technologies Corporation.	41
Figure 10 : Illustration du système fluide selon Alice Longobardi Givan. (30)	42
Figure 11 : Régulation du flux par Becton, Dickinson and Company.	42
Figure 12 : Passage des cellules devant les lasers selon Alice Longobardi Givan. (30).....	43
Figure 13 : Détection du SSC et du FSC d'après l'EMC "Immunophénotypage des hémopathies malignes par CMF". (31).....	43
Figure 14 : Schéma du positionnement des miroirs et des filtres au sein d'un cytomètre en flux par Life Technologies Corporation.	44
Figure 15 : Illustration du principe des miroirs et des filtres par Becton, Dickinson and Company.	45
Figure 16 : Stratégie de fenêtrage sur des dot-plots.	46
Figure 17 : Représentation graphique FSC/SSC des éléments normaux.	46
Figure 18 : Graphique SS/CD45+ sur un patient CHU de Toulouse.	51
Figure 19 : Exemple d'un diagnostic d'une LAM CD34+ HLA-DR- CD14- CD33+ CD65- CD123+ au CHU de Toulouse.	53
Figure 20 : Les quatre étapes de l'algorithme de FlowSOM selon Van Gassen et al. (45)	55
Figure 21 : Échantillon NBM traité par FlowSOM pour le phénotype LAIP au sein de l'étude.	55
Figure 22 : Représentations schématiques des différentes évolutions des leucémies aiguës par Claude Preudhomme. (50)	56
Figure 23 : Sélection de la cohorte.....	61
Figure 24 : Interprétation avec FlowSOM d'une MRD+ avec le panel LAIP.....	64
Figure 25 : Interprétation avec FlowSOM d'une MRD- avec le panel LAIP.....	65
Figure 26 : Interprétation avec FlowSOM d'une MRD+ avec le panel HSPC.	65

Figure 27 : Interprétation avec FlowSOM d'une MRD- avec le panel HSPC.	66
Figure 28 : Survie sans évènement en fonction du résultat de MRD LAIP post-induction.....	67
Figure 29 : Choix des seuils décisionnels pour la MRD HSPC.....	68
Figure 30 : Évaluation de la MRD avec le tube HSPC post-induction par méthode multivariée supervisée.	69
Figure 31 : Évaluation de la MRD avec les tubes LAIP et HSPC post-induction par méthode multivariée supervisée.	70
Figure 32 : Expression des marqueurs utilisés dans le panel LAIP par les blastes.....	71
Figure 33 : Expression des marqueurs non utilisés dans nos panels par les blastes.	72
Figure 34 : Distribution en fonction de l'âge au sein des différents groupes de MRD.	73
Figure 35 : Distribution en fonction de la classification FAB au sein des différents groupes de MRD. .	73
Figure 36 : Distribution en fonction des paramètres de la NFS au sein des différents groupes de MRD.	73
Figure 37 : Évaluation de l'hémodilution au sein des différents groupes de MRD.	74
Figure 38 : Distribution des anomalies mutationnelle et cytogénétique, présentes chez au moins 3 patients au sein de notre cohorte.	74
Figure 39 : Distribution de certaines anomalies selon les différents groupes de MRD.....	75
Figure 40 : Distribution selon le nombre de classes mutées des différents groupes de MRD.	76
Figure 41 : Distribution selon les classes mutationnelles et les différents groupes de MRD.....	76
Figure 42 : Diagrammes de Circos selon les différents groupes de MRD.	77
Figure 43 : Distribution des CSL au sein des différents groupes de MRD.....	77
Figure 44 : Profils types obtenus au sein de la cohorte.	78
Figure 45: Évaluation des différentes méthodes de MRD chez les patients NPM1 muté.....	78
Figure 46 : Évaluation conjointe de la MRD LAIP et BioMol chez les patients NPM1 muté.....	79

Table des tableaux

Tableau 1 : Classification OMS 2016 des LAM.	35
Tableau 2 : Classification pronostique des LAM selon l'OMS 2016.	37
Tableau 3 : Classification pronostique des LAM par l'ELN 2017.	38
Tableau 4 : Facteurs de mauvais pronostic selon la HAS.	39
Tableau 5 : Expression phénotypique des progéniteurs.	47
Tableau 6 : Expression phénotypique des précurseurs.	47
Tableau 7 : Expression phénotypique de la lignée granuleuse.	48
Tableau 8 : Expression phénotypique des polynucléaires éosinophile et basophile.	49
Tableau 9 : Expression phénotypique de la lignée monocyttaire.	50
Tableau 10 : Expression phénotypique de la lignée érythroblastique.	50
Tableau 11 : Orientation phénotypique des LAM dans la classification FAB.	52
Tableau 12 : Recommandations de ELN 2017 concernant la MRD en CMF. (39)	59
Tableau 13 : Proposition de marqueurs phénotypiques pour la détection des CSL. (67)	60
Tableau 14 : Anticorps et fluorochromes utilisés dans le panel LAIP.	62
Tableau 15 : Anticorps et fluorochromes utilisés dans le panel HSPC.	62
Tableau 16 : Analyse multivariée de Cox avec les paramètres pronostiques des LAM et de la MRD LAIP pour la survie sans évènement.	68
Tableau 17 : Analyse multivariée de Cox avec les paramètres pronostiques des LAM et de la MRD HSPC pour la survie sans évènement.	69
Tableau 18 : Analyse multivarié de Cox avec les paramètres pronostiques des LAM et de la MRD LAIP et HSPC pour la survie sans évènement.	70
Tableau 19 : Analyse multivarié de Cox avec les paramètres pronostiques des LAM et de la MRD LAIP et Biologie Moléculaire pour la survie sans évènements	79

I. Introduction

Les leucémies aiguës myéloïdes constituent un ensemble d'hémopathies caractérisé par une prolifération de cellules malignes appelées blastes. Leurs origines diverses au sein de l'hématopoïèse entraînent une grande hétérogénéité cytologique, phénotypique, moléculaire et même d'expression clinique. Ces pathologies touchent principalement le sujet âgé et leur incidence est en constante augmentation. De plus elles sont caractérisées par une létalité importante.

La gestion de la maladie est donc indispensable afin d'augmenter les chances de survie des patients et de diminuer la mortalité. Pour cela, en plus de la cytologie, la *Measurable Residual Disease* ou Maladie résiduelle mesurable (MRD) a fait son apparition et est indispensable à l'heure actuelle. La biologie moléculaire avec les techniques de PCR et de NGS est la référence en MRD des LAM. La cytométrie en flux est très utilisée dans d'autres hémopathies malignes mais l'hétérogénéité des leucémies aiguës myéloïdes en fait une technique compliquée à standardiser.

Dans une volonté d'homogénéisation dans le suivi par cytométrie en flux de nouveaux logiciels de calcul et d'interprétation ont fait leur apparition. Ces programmes d'intelligence artificielle permettent une visualisation simplifiée en deux dimensions d'un ensemble conséquent de données représenté dans de nombreuses dimensions non compréhensible par le cerveau humain. Dans cette étude nous utilisons le logiciel FlowSOM pour réaliser le calcul de la maladie résiduelle chez les patients porteur de LAM.

Les données récoltées via l'utilisation de deux panels de marqueurs puis interprétées via FlowSOM nous ont permis de les comparer rétrospectivement aux données cliniques, moléculaires et génétiques pour chaque patient. Ces informations nous ont permis d'établir le calcul de la MRD par méthode multivarié, ce qui n'a jusqu'alors pas été réalisé pour les LAM.

II. Hématopoïèse

A. Hématopoïèse et lignées

L'hématopoïèse est le phénomène physiologique permettant la production des différentes lignées cellulaires sanguines. La moelle osseuse est son point de départ exclusif à partir de la naissance. Chez l'embryon et le fœtus elle connaît différents lieux de production comme le sac vitellin ou le foie fœtal.
(1) (2)

L'origine de toutes nos cellules sanguines est la cellule souche hématopoïétique (CSH). Elle permet de donner naissance à l'ensemble des lignées, et ce durant toute la vie de l'individu grâce à une faculté d'auto-renouvellement quasi illimitée, de multipotence et de prolifération. Cette cellule souche va évoluer et se différencier au fur et à mesure, en passant du stade de progéniteur multipotent au stade de précurseur spécifique d'une lignée. La capacité d'auto-renouvellement et la différenciation évoluent logiquement dans le sens opposé.

L'entrée en différenciation par la cellule souche se caractérise par la perte de ses propriétés de multipotence pour donner un progéniteur multipotent lympho-myéloïde (PMLM). À partir de ce stade, deux voies se distinguent : la lymphopoïèse (via le progéniteur lymphoïde PL) et la myélopoïèse (via le progéniteur commun myéloïde PCM, Figure 1).

Nous allons rapidement définir la première qui n'est pas en rapport avec le sujet traité ici et qu'il n'est pas nécessaire de développer. La lymphopoïèse permet la production des lymphocytes B et des plasmocytes, des cellules NK et des lymphocytes T à partir de trois progéniteurs issus du progéniteur lymphoïde. La différenciation se fera ensuite dans différents organes comme les organes lymphoïdes secondaires et le thymus.

La myélopoïèse quant à elle nous intéresse particulièrement car les lignées qui la constituent, sont aussi celles qui vont être impliquées dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM). Le progéniteur commun myéloïde donne naissance au progéniteur érythromégacaryocytaire (PEM) et au progéniteur granulomonocytaire (PGM) qui vont eux-mêmes se différencier dans des types cellulaires distincts (Figure 1) :

- le PEM est à l'origine du précurseur érythroblastique ou *Burst forming unit-erythroid* (BFU-E) et du précurseur mégacaryocytaire ou *Colony forming unit-megakaryoblastic* (CFU-MK) ;

- le PGM donne le précurseur granulocytaire ou *Colony forming unit-granulocyte* (CGU-G) et le précurseur monocytaire ou *Colony forming unit-monocyt/macrophage* (CFU-M). C'est à partir de ces cellules que l'engagement unipotent se fait, aboutissant aux premières cellules reconnaissables cytologiquement lors de l'observation des frottis médullaires ou des frottis sanguins. (3)

On parle alors de :

- Érythropoïèse pour le BFU-E
- Mégacaryopoïèse pour le CFU-MK
- Granulopoïèse pour le CFU-G
- Monocytopoïèse (ainsi que macrophages et cellules dendritiques) pour le CFU-M

Toutes les voies principales de ces lignées sont détaillées ci-après. D'autres voies transversales existent, et des découvertes à ce sujet fleurissent encore ces dernières années.

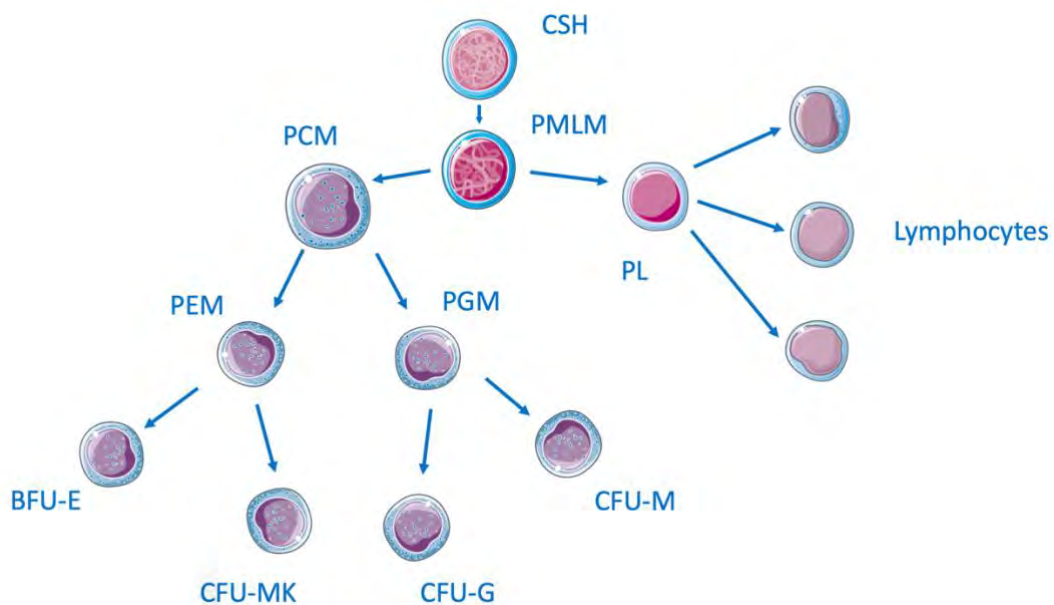


Figure 1 : Étapes de l'hématopoïèse jusqu'aux progéniteurs.

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique, PMLM : Progéniteur multipotent lympho-myéloïde, PL : Progéniteur lymphoïde, PCM : Progéniteur commun myéloïde, PGM : Progéniteur granulo-monocytaire, PEM : Progéniteur érythro-mégacaryocytaire, BFU-E : Burst forming unit-erythroid, CFU-MK : Colony forming unit-megakaryoblastic, CFU-G : Colony forming unit-granulocyte, CFU-M : Colony forming unit-monocyt/macrophage.

1. Érythropoïèse

Après une nouvelle étape de maturation permettant le passage du BFU-E au CFU-E, la stimulation par divers facteurs de croissances, comme l'érythropoïétine (EPO) par exemple, permet la différenciation en précurseur appelé proérythroblaste (Figure 2). A partir de ce stade, l'expression du récepteur à l'EPO diminue et la formation d'hème et de globine se met en place. Par une succession de mitoses, ce proérythroblaste va évoluer vers l'érythroblaste basophile, puis en érythroblaste polychromatophile, puis en érythroblaste acidophile. A ce stade la cellule subit une maturation cytoplasmique ainsi qu'une énucléation permettant la formation du réticulocyte. Ce dernier passe dans la circulation et donne un érythrocyte mature en 24h à 48h, point final de l'érythropoïèse. (4)

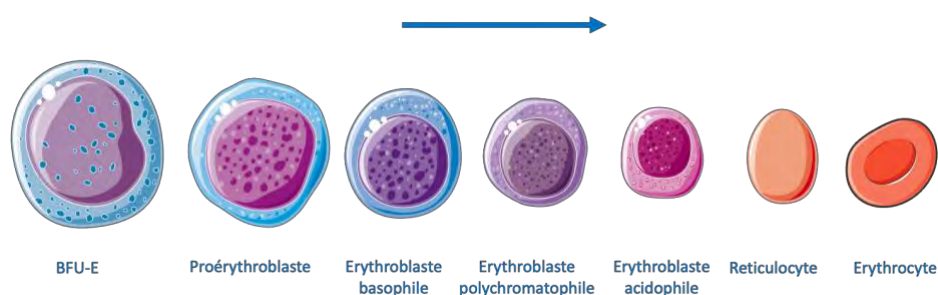


Figure 2 : Étapes de l'érythropoïèse.

La formation de 200 milliards de globules rouges se fait à partir des BFU-E.

2. Mégacaryopoïèse

Sous l'action de la thrombopoïétine (TPO), le progéniteur CFU-MK après plusieurs divisions cellulaires, donne naissance au précurseur appelé mégacaryoblaste (Figure 3). A ce stade un processus caractéristique de cette lignée qu'on appelle endomitose se produit et induit une polypléidie de ces cellules. En effet la capacité de réplication du matériel génétique est maintenue mais celle de division cellulaire est perdue. Au cours de cette évolution la lignée passe par différents stades de maturation, le mégacaryoblaste évoluant vers le mégacaryocyte basophile, puis granuleux, puis plaquettogène. C'est ce dernier qui permet la formation de plaquettes par fragmentation cytoplasmique. (5)

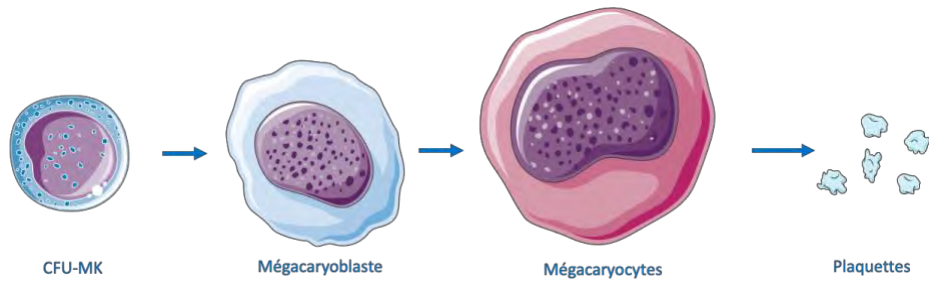


Figure 3 : Étapes de la mégacaryopoïèse.

Les plaquettes correspondent à la fragmentation d'expansions cytoplasmiques des mégacaryocytes au travers des fenêtres des capillaires sinusoides de la vascularisation médullaire.

3. Granulopoïèse

La granulopoïèse neutrophile est le processus permettant d'obtenir les polynucléaires neutrophiles (Figure 4). Elle est dépendante de facteurs de transcription comme CEBPA et PU.1 (expression du premier et diminution du second) et de cytokines telles que le G-CSF. Cette différenciation passe par différents précurseurs que sont le myéloblaste, le promyélocyte, le myélocyte et le métamyélocyte. (6)

La lignée granuleuse acidophile débute à partir du PGM ou du CFU-G et est majoritairement sous la dépendance d'une interleukine appelée IL-5. Elle va ensuite passer par des étapes similaires à la lignée neutrophile, à savoir le promyélocyte éosinophile, le myélocyte éosinophile, le métamyélocyte éosinophile et pour terminer par le polynucléaire éosinophile. (7)

La granulopoïèse basophile se fait avec un mécanisme identique à la granulopoïèse acidophile, mais avec une interleukine différente : IL-4. On retrouve à nouveau le promyélocyte basophile, le myélocyte basophile, le métamyélocyte basophile qui aboutit à un polynucléaire basophile mature. (8)

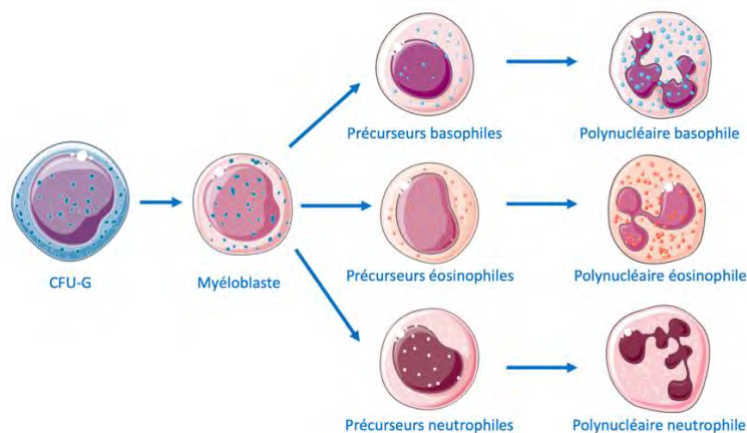


Figure 4 : Étapes de la granulopoïèse.

4. Monocytopoïèse

A l'inverse de la granulopoïèse, on retrouve une augmentation de l'expression du facteur de transcription PU.1 et une diminution de CEBPA. Ses précurseurs sont le monoblaste et le promonocyte (Figure 5) avant d'arriver au monocyte mature qui va soit aller dans la circulation sanguine, soit rester dans la moelle ou migrer dans les tissus en se différenciant en macrophage. (9)

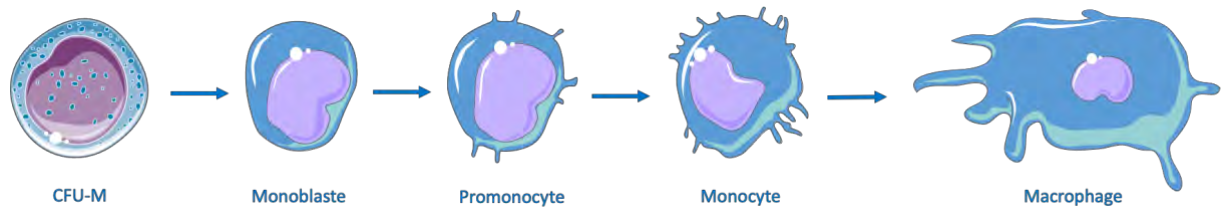


Figure 5 : Étapes de la monocytopoïèse.

III. Leucémies Aiguës Myéloïdes

A. Définition et diagnostic

Les leucémies aiguës (LA) sont des néoplasies du tissu hématopoïétique, à classer dans les pathologies cancéreuses. Elles forment un ensemble d'hémopathies malignes d'expressions clinico-biologiques différentes. Elles sont caractérisées par l'expansion clonale dans la moelle osseuse et le sang de précurseurs des cellules sanguines bloqués à un stade précoce de leur différenciation qu'on appelle communément « blaste ». (10)

On en distingue deux types :

- Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM)
- Leucémies Aiguës Lymphoblastiques (LAL)

Comme pour la lymphopoïèse nous allons mettre de côté les LAL dans ce travail pour nous intéresser uniquement aux LAM. Elles constituent un groupe très hétérogène de pathologies agressives. Les blastes retrouvés dans ces hémopathies dérivent des lignées myéloïdes évoquées lors du chapitre précédent. On les qualifie d'aiguës car sans prise en charge les signes cliniques et biologiques sont évolutifs et conduisent rapidement au décès (médiane de survie 7-28 semaines). (11)

B. Épidémiologie

Parmi les leucémies aiguës de l'adulte, la LAM est la plus représentée avec 80% des cas contre 20% des LAL.

Les LAM touchent majoritairement les sujets âgés avec une médiane de survenue établie à 71 ans (69 pour l'homme et 72 chez la femme). Avant 40 ans, l'incidence est relativement faible avec environ 1,3 nouveaux cas pour 100 000 personnes-années puis augmente avec l'âge. En revanche pour des personnes âgées de 85 ans, l'incidence atteint 30 pour 100 000 personnes-années chez les hommes et 19 pour 100 000 personnes-années chez les femmes. Sur l'ensemble des cas le sex-ratio est de 1,35. (12) (13)

En France, l'incidence était de 3428 nouveaux cas pour l'année 2018 et en constante augmentation depuis l'observation par le réseau Francim (Figure 6). (13)

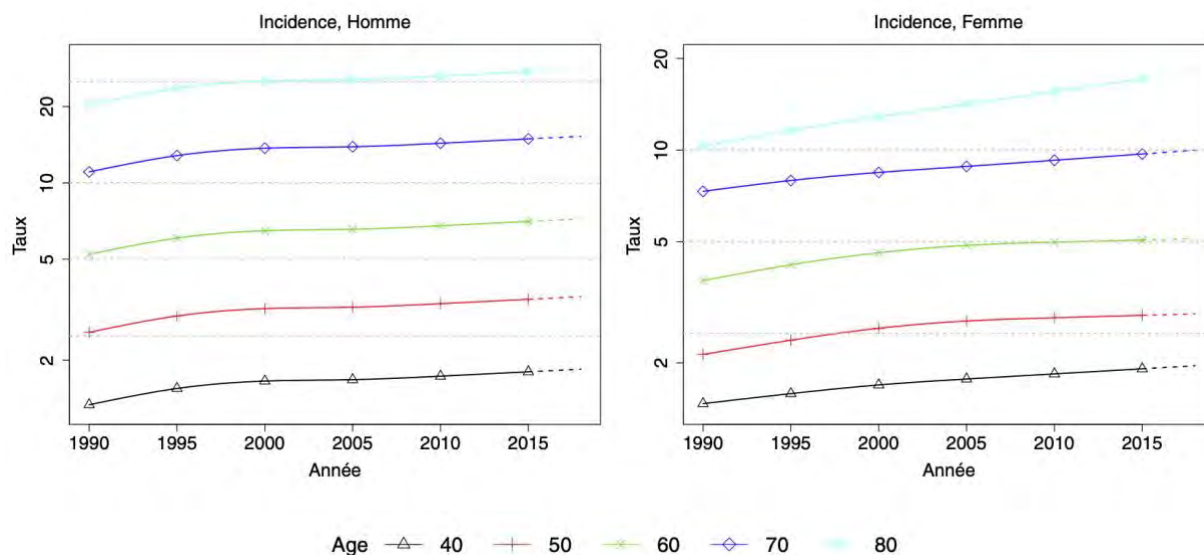


Figure 6 : Évolution du taux d'incidence des LAM selon les tranches d'âge au cours du temps.

C. Étiologies et facteurs de risque

1. Leucémogénèse

Les LAM possèdent une architecture similaire à l'hématopoïèse normale et prennent leur origine de ce qu'on appelle à l'heure actuelle la cellule souche leucémique (Leukemia Stem Cell ou CSL) mise en évidence en 1997 (14). Elles proviennent des CSH ou des progéniteurs plus différenciés ayant subi une accumulation d'anomalies génétiques (Figure 7). Ces modifications sont le produit de différents facteurs : mécanismes génétiques héréditaires, mutations *de novo* via des facteurs de risque (voir chapitre suivant), recombinaisons lors de la division cellulaire physiologique.

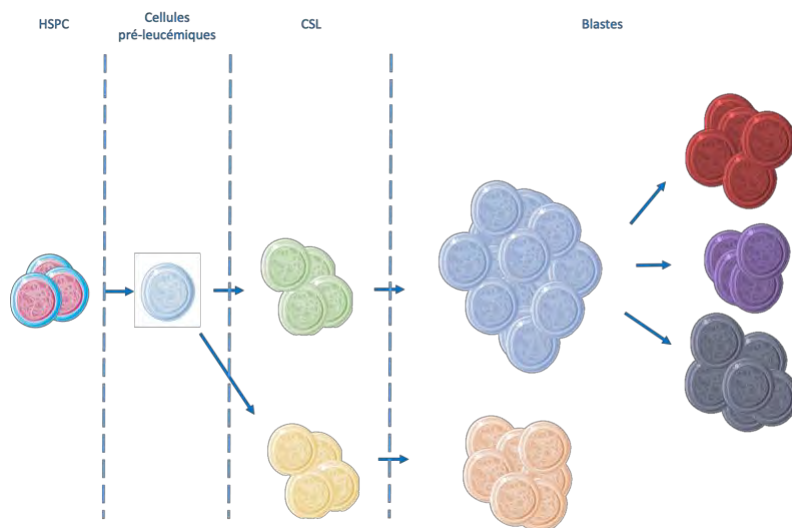


Figure 7 : Modèle de la clonalité dans une LAM avec émergence d'un second clone (dès le diagnostic ou à la rechute).

Ces CSL possèdent les mêmes capacités que les CSH, c'est-à-dire la capacité d'auto-renouveau, de prolifération et de différenciation. Elles vont donner naissance aux blastes qui sont des précurseurs bloqués à un stade précoce de leur différenciation, mais un petit contingent va éventuellement pouvoir évoluer telle une hématopoïèse normale.

2. Facteurs de risque

Certains facteurs favorisants sont actuellement bien identifiés (15) :

- Chimiothérapies antinéoplasiques : agents alkylants, inhibiteurs de topoisomérase II, dérivés de platine, taxanes, antimétabolites
- Facteurs génétiques : des anomalies chromosomiques constitutionnelles comme la trisomie 21, le déficit de p53 dans le syndrome de Li-Fraumeni, ou les déficits immunitaires constitutifs comme l'ataxie-télangiectasie
- Exposition aux radiations ionisantes thérapeutiques ou non
- Exposition aux toxiques et aux hydrocarbures benzéniques
- Autres hémopathies tels que les syndromes myéloprolifératifs

D. Physiopathologie des signes clinico-biologiques (16)

1. Prolifération des blastes

Les LAM étant des néoplasies elles entraînent parfois un syndrome tumoral liés aux localisations extra-médullaires de la maladie, mais ces symptômes sont plus spécifiques des LAL.

Cependant certains signes peuvent apparaître plus fréquemment dans les LAM :

- Localisations méningées induisant céphalées et paralysies des nerfs crâniens.
- Localisation cutanée exprimée sous différentes formes (papules ou nodules, érythrodermie) appelées leucémides.
- Gingivites hypertrophiques.

- Hyperleucocytose majeure (>100G/L). Retrouvée dans les LAM hyperleucocytaires, elle peut provoquer des signes cliniques du fait de la leucostase. Ce sont des amas de blastes qui provoquent des ralentissements de la circulation sanguine, par exemple dans les capillaires pulmonaires où ils entraînent hypoxie et détresse respiratoire, ou dans les capillaires cérébraux ce qui donnent des troubles de la conscience ou encore un coma et des convulsions.

2. Impact sur les autres lignées hématopoïétiques

La prolifération médullaire des blastes entraîne un épuisement des autres lignées car elle empêche leur développement normal en prenant la place qui leur est normalement dédiées dans la moelle osseuse. Cela a pour conséquence directe la présence d'anomalies de l'hémogramme (qui n'est jamais normal) et un retentissement sur la clinique du patient. Ces signes sont d'ailleurs souvent le premier point d'appel :

- Anémie → Syndrome anémique avec asthénie, dyspnée, pâleur cutanéomuqueuse, vertiges, tachycardie, etc.
- Thrombopénie → Syndrome hémorragique cutanéomuqueux comme un purpura ou extériorisées. Cela peut être majoré par un phénomène de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) retrouvé en particulier dans les LAM promyélocytaires (voir classification).
- Neutropénie → Syndrome infectieux sans caractère clinique spécifique, fièvre résistante aux antibiotiques, sepsis grave ou infection de la sphère ORL.

E. Diagnostic

1. Découverte et signes cliniques (16)

Comme énoncé précédemment la clinique est le retentissement de la prolifération et de la circulation des blastes myéloïdes. Celle-ci oriente vers la réalisation d'un hémogramme permettant d'évaluer la profondeur des cytopénies causant les trois syndromes principaux et d'identifier les blastes sanguins.

Les signes de localisations secondaires sont moins régulièrement un point d'appel pour le clinicien.

Il est également classiquement retrouvé une altération de l'état général avec trois signes majeurs que sont la fatigue, l'anorexie et la perte de poids.

2. Diagnostic biologique

a) Hémogramme (16)

La numération formule sanguine est réalisée par un automate. Une ou plusieurs cytopénies, voir une pancytopénie, sont retrouvées :

- Anémie de façon quasi-constante, normocytaire, arégénérative et parfois profonde.
- Thrombopénie fréquente, également parfois profonde
- Leucopénie ou hyperleucocytose selon le type de LAM
- Neutropénie voire agranulocytose

Ces anomalies entraînent la réalisation d'un frottis sanguin afin de repérer la présence potentielle de blastes et fait intervenir l'expertise du cytologiste. D'autres éléments comme les graphiques de la formule sanguine obtenus par les automates de routine peut également attirer l'attention du biologiste.

b) Cytologie

Elle est faite grâce à un frottis sanguin sur une lame. C'est à ce moment que le diagnostic peut être posé. Le diagnostic de leucémie aiguë est établi dans le sang lorsque 20% de blastes sont retrouvés. Que ce pourcentage soit atteint ou non un myélogramme doit être réalisé.

Un blaste possède plusieurs caractéristiques morphologiques :

- De plus ou moins grande taille selon le type de LA, mais souvent grand dans le cadre des LAM
- Rapport nucléo/cytoplasmique élevé
- Chromatine fine avec présence ou non d'un nucléole
- Cytoplasme hyperbasophile

Les différences morphologiques des LAM peuvent s'expliquer par le type de précurseur bloqué dans sa maturation, par exemple entre un précurseur granulocytaire ou un précurseur monocytaire.

Une première orientation vers l'origine myéloïde de la leucémie peut être évoquée grâce à différents traits spécifiques comme la présence de granulations (voir de corps ou de bâtonnets d'Auer) dans le cytoplasme ou des signes de dysplasie sur les lignées myéloïdes par exemple.

Il est également important de souligner que les myéloblastes, les monoblastes, les promonocytes et les mégacaryoblastes doivent être comptabilisés en blastes.

c) Myélogramme

Sa réalisation se fait à partir d'une ponction médullaire sternale ou iliaque puis étalée en frottis sur une lame. Il est indispensable. C'est l'élément clef du diagnostic (si les 20% dans le sang ne sont pas atteints) afin d'évaluer l'infiltration blastique médullaire et de classer l'hémopathie. Le seuil diagnostique est toujours fixé à un taux de blastes de 20% des éléments du compartiment médullaire (17). Sont exemptées de ce seuil les LAM avec translocation équilibrée, c'est-à-dire les t(15;17), t(8;21), inv(16) ou t(16;16) dont la seule présence permet de faire le diagnostic de LAM.

Comme expliqué en III.D.2., les blastes occupent la place des autres cellules. Par conséquent, les lignées myéloïde, érythroblastique et mégacaryocytaire médullaire peuvent paraître hypoplasiques, avec une richesse en blastes pouvant aller jusqu'à 100%.

d) Cytométrie en flux (CMF)

C'est le second niveau d'identification des blastes et est impératif. Cette analyse est fortement recommandée. Elle peut être réalisée sur sang mais préférentiellement sur prélèvement médullaire. La rapidité de rendu des résultats permet également une prise en charge rapide avant d'avoir les résultats d'analyses plus longues comme la cytogénétique et la biologie moléculaire.

Le principe de cytométrie en flux ainsi que tous les marqueurs utilisés pour l'immunophénotypage sont détaillés dans la partie IV.B.

e) Cytogénétique

La cytogénétique est obligatoire pour toutes LAM. Un caryotype, permettant d'obtenir une image des chromosomes sur au moins 20 mitoses, est réalisé en première intention. Il sert d'abord à mettre en évidence des anomalies chromosomiques qui permettent de classer les LAM et d'établir un pronostic afin d'aider dans les choix de prise en charge thérapeutique.

L'hybridation in situ en fluorescence (FISH) est une option pour détecter des remaniements génétiques lorsque la cytogénétique classique n'a pas donné de résultat probant. Dans les LAM à caryotype normal (environ 40% des LAM), par exemple, une recherche des anomalies de *KMT2A* (anciennement MLL) est indispensable ; dans les LAM de l'enfant, ce sont des anomalies de *NUP98*, *ETV6* et *GLIS2* qui sont recherchées. Lorsque la cytologie est évocatrice d'anomalies particulières comme la t(15;17), la t(8;21) ou l'inv(16) mais que le caryotype est sans particularité il faut évoquer une anomalie cryptique et rechercher respectivement les gènes de fusion *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1* et *CBF β -MYH11*. (18)

f) Biologie moléculaire

La biologie moléculaire possède, tout comme la cytogénétique, un rôle majeur dans la classification et le pronostic des LAM. Elle est également indispensable dans le suivi de la maladie résiduelle. Plusieurs techniques sont utilisées comme la qRT-PCR (quantitative Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction) et plus récemment le NGS (Next Generation Sequencing) permettant de balayer de nombreux marqueurs dont les plus fréquemment mutés sont *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*, *IDH1* et *IDH2*. (17)

De nouvelles thérapies ciblées se basent actuellement sur la présence de certaines mutations, ce qui fait un argument de plus concernant son utilisation.

F. Classifications

1. Classification OMS

D'un point de vue historique, il faut d'abord évoquer la classification FAB (19), présentée en 1976, puis révisée en 1985, elle a été longuement utilisée et l'est toujours en pratique courante au laboratoire du fait de sa relative simplicité. Elle regroupe des caractéristiques cytologiques et cytochimiques.

Elle est désormais complétée par la classification OMS (Tableau 1) depuis 2001, puis révisée en 2008 et en 2016 (20) (21). Cette dernière est plurifactorielle et regroupe des éléments morphologiques cliniques, cytogénétiques et moléculaires. Elle permet de distinguer six entités principales (Tableau 1).

L'ancienne classification FAB est limitée, dans la nouvelle classification OMS, à la partie « AML, not otherwise specified ».

Tableau 1 : Classification OMS 2016 des LAM.

Types	Genetic abnormalities
AML with recurrent genetic abnormalities	<p>AML with t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i></p> <p>AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i></p> <p>APL with <i>PML-RARA</i></p> <p>AML with t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i></p> <p>AML with t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i></p> <p>AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i></p> <p>AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i></p> <p>AML with <i>BCR-ABL1</i> (provisional entity)</p> <p>AML with mutated <i>NPM1</i></p> <p>AML with biallelic mutations of <i>CEBPA</i></p> <p>AML with mutated <i>RUNX1</i> (provisional entity)</p>
AML with myelodysplasia-related changes	<p>Complex karyotype 3 or more abnormalities balanced translocations</p> <ul style="list-style-type: none"> - t(5;10) - t(3;5) - t(5;17) - t(5;7) - t(5;12) - t(2;11) - t(1;3) - t(3;21) - t(11;16) <p>Unbalanced translocations :</p> <ul style="list-style-type: none"> - del(12p)/t(12p) - idic(X)(q13) - del(11q) - -13/del(13q) - i(17q)/t(17p) - del(5q)/t(5q) - -7/del(7q)
Therapy-related myeloid neoplasms	

AML, not otherwise specified	AML with minimal differentiation AML without maturation AML with maturation Acute myelomonocytic leukemia Acute monoblastic/monocytic leukemia Acute erythroid leukemia Pure erythroid leukemia Acute megakaryoblastic leukemia Acute basophilic leukemia Acute panmyelosis with myelofibrosis
Myeloid sarcoma	
Myeloid proliferations related to	Transient abnormal myelopoiesis
Down syndrome	ML associated with Down syndrome

2. Classification proposée par Lindsley et al. (22)

Dans cette publication (22), 3 groupes de LAM sont proposées selon leur ontogénèse clinique :

- Les LAM secondaires (sAML) à un syndrome myélodysplasique (SMD) ou une leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC).
- Les LAM développée suite à une thérapie leucémogénique (tAML) comme les chimiothérapies listées en III.C.2. et la radiothérapie.
- Les LAM sans exposition connue ou prodrome identifié (*de novo* AML)

Cependant cette classification est dépendante de la documentation. Et en étudiant ces profils d'un point de vue mutationnel, trois catégories basées sur l'ontogénèse génomique se distinguent :

- Les mutations de type secondaire dont les gènes touchés sont *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR* et *STAG2* connus dans les SMD (23). Elles sont retrouvées chez les individus âgés avec 4 mutations associées en moyenne.
- Les mutations *de novo* ou pan-AML représentées le plus spécifiquement par les mutations de *NPM1*, les réarrangements de *MLL/11q23* et de *CBF*. Ces dernières sont retrouvées chez les individus plus jeunes avec moins de mutations associées.
- La mutation du gène TP53 permettant la constitution d'un groupe caractérisé par un caryotype complexe, avec très peu de co-mutations et une survie très courte.

Le nombre de cas de sAML est estimée entre 10 et 30% de toutes les LAM diagnostiquées. Les tAML représentent quant à elle 7 à 15%. (24)

G. Pronostic

Tableau 2 : Classification pronostique des LAM selon l'OMS 2016.

Pronostic-risk groupe	Cytogenetic profile alone	Cytogenetic profile and molecular abnormalities
Favorable	t(8:21)(q22;q22) inv(16)(p13;1q22) t(15;17)(q22;q12)	t(8:21)(q22;q22) with no <i>c-KIT</i> mutation inv(16)(p13;1q22) t(15;17)(q22;q12) Mutated NPM1 without <i>FLT3-ITD</i> (CN-AML) Mutated biallelic <i>CEBPA</i> (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 <i>c-KIT</i> 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	<i>TP53</i> mutation, regardless of cytogenetic profile CN with <i>FLT3-ITD</i> CN with <i>DNMT3A</i> CN with <i>KMT2A-PTD</i> inv(3)(q21q26.2) t(6;9)(p23;q34) 11q abnormalities other than t(9;11) – 5 or del(5q) – 7 Complex karyotype

L'évaluation des facteurs pronostiques est fondamentale dans la prise en charge des LAM. Cela va permettre au clinicien de se décider parmi les options thérapeutiques en sa possession ; c'est-à-dire entre une chimiothérapie intensive, une greffe de cellules souches hématopoïétiques, une thérapie ciblée, un agent hypométhylant ou une association de ces deux options.

Deux classifications pronostiques existent donc, WHO2016 (Tableau 2) (21) et ELN (Tableau 3) (17), et s'appuient principalement sur la cytogénétique et la biologie moléculaire. Les différentes anomalies génétiques permettent de stratifier les LAM en 3 groupes : favorable, intermédiaire et péjoratif.

La biologie moléculaire a permis d'affiner ces groupes et d'associer des mutations aux anomalies génétiques connues.

Tableau 3 : Classification pronostique des LAM par l'ELN 2017.

Risk Category	Genetic Abnormality
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) 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^{low}</i> Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
Intermediate	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD^{high}</i> Wild type <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD^{low}</i> (w/o 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 karyotype Wild type <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD^{high}</i> Mutated <i>RUNX1</i> Mutated <i>ASXL1</i> Mutated <i>TP53</i>

Ces résultats sont évidemment à confronter aux critères biologiques, cliniques et épidémiologiques (Tableau 4). En France, la classification HAS (25) permet d'identifier les patients pour lesquels le pronostic ne sera pas favorable avec des critères initiaux puis des critères de réponse au traitement.

Tableau 4 : Facteurs de mauvais pronostic selon la HAS.

Facteurs de mauvais pronostic initiaux	<ul style="list-style-type: none"> - Âge > 60 ans - Pathologie de pronostic péjoratif selon les classifications - Évolution depuis un SMD ou SMP ou secondaire à une chimiothérapie - Score de performance OMS > 2 - Comorbidités préexistantes : diabète, maladie coronarienne, BPCO - Hyperleucocytose initiale
Facteurs de mauvais pronostic liés à la réponse aux traitements	<ul style="list-style-type: none"> - Absence d'obtention de la rémission complète après une cure de chimiothérapie - MRD persistante en biologie moléculaire

H. Traitement

Lors de sa mise en place, deux objectifs sont essentiels : obtenir une rémission et éviter les rechutes. Le traitement classique des patients en forme est une chimiothérapie associée à une greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) selon les facteurs pronostiques. D'autres alternatives existent et sont discutées par la suite.

Tout d'abord la chimiothérapie se décompose en trois phases :

- La phase d'induction, subdivisée en 4 phases : la réduction blastique associant anthracycline et cytarabine, l'aplasie liée au traitement, la régénération et la rémission. Elle a pour objectif l'obtention d'une rémission complète définie selon les critères de l'ELN (26) :
 - Présence de moins de 5% de blastes médullaires
 - Absence de blastes contenant des corps d'Auer
 - Absence de localisation extramédullaire
 - Indépendance transfusionnelle en globule rouge
 - PNN > 1 G/L
 - Plaquettes > 100 G/L sur la NFS

- La phase de consolidation a pour objectif de prévenir une rechute. Elle débute donc lorsque la rémission est complète.
- La phase d'entretien est plus souple et est réalisé en ambulatoire, elle n'est pas obligatoire, en particulier lorsqu'il y a une greffe de CSH.

L'allogreffe peut intervenir selon le profil de risque génétique leucémique. Elle est utilisée en particulier chez les patients atteints de LAM avec des pronostics sombres ou réfractaires aux autres traitements. Elle fait suite à la phase de consolidation lorsque le patient est en rémission complète, après un conditionnement cytoréducteur : une cure de chimiothérapie très intensive induisant une aplasie sévère. Les CSH greffées possèdent un effet immunologique anti-leucémique contre les CSL. (27)

DiNardo et Wei (28) proposent une revue (Figure 8) de l'utilisation des différentes chimiothérapies selon la clinique du patient, la cible moléculaire, et les différentes phases de chimiothérapie.

		1 st line therapy	Maintenance			
Fit for intensive chemo	CBF	Intensive chemo + GO		Relapsed/refractory AML		
	FLT3 ^{mut}	Intensive chemo + Midostaurin	Midostaurin*			
	tAML, sAML, AML MRC	CPX-351	CC-486**			
	Alternative non-targeted option	Intensive chemo ± GO				
≥75 or co-morbidities	FLT3-ITD	AZA ± FLT3i			IDH1 ^{mut}	Ivosidenib
	IDH1 ^{mut}	AZA and/or Ivosidenib			IDH2 ^{mut}	Enasidenib
	IDH2 ^{mut}	AZA and/or Enasidenib			FLT3 ^{mut}	Gilteritinib
	NPM1 ^{mut}	HMA or LDAC + Venetoclax			Other	Chemo ± GO
	Alternative non-targeted option	HMA or LDAC + Venetoclax LDAC + Glasdegib				

Figure 8 : Utilisation des nouvelles molécules dans l'arsenal thérapeutique pour le traitement des LAM. (28)

GO : gemtuzumab ozogomycin, CPX-351 : cytarabine-daunorubicine, CC-486 : azacytidine orale, AZA : azacitidine, HMA : agents hypométhylants, LDAC : cytarabine faible dose. *Pour les patients en rémission and non éligible pour une greffe de CSH, le traitement de maintenance peut être considéré pour les patients avec une mutation FLT3. **CC-486 peut être une option future pour la thérapie de maintenance des patients ≥55 ans en RC non éligible à la greffe de CSH.

IV. Cytométrie en Flux

A. Définition

La CMF est utilisée pour mesurer (-métrie) et analyser un nombre conséquent de caractéristiques cellulaires (-cyto) tout en les observant une à une via un liquide vecteur (flux). En ce qui nous concerne, elle est réalisée à partir d'une suspension de sang, de moelle ou de liquide d'épanchement afin d'identifier les cellules pathologiques, les blastes, des cellules normales de l'hématopoïèse. Ses plus grands avantages, comparés aux autres méthodes d'étude des hémopathies sont sa vitesse d'analyse et la quantité de cellules étudiées. Elle est donc un véritable complément de la cytologie et permet de lever certaines incertitudes perçues au microscope par le cytologiste.

B. Principes

Un cytomètre en flux est composé de 3 systèmes (29) qui vont être détaillés par la suite (Figure 9) :

- Système fluidique
- Système optique composé de lasers, de filtres optiques et de miroirs dichroïques
- Système informatique pour le traitement des données

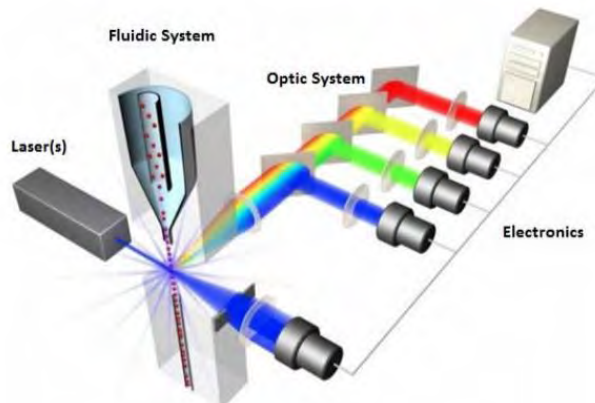


Figure 9 : Schéma d'un cytomètre par Life Technologies Corporation.

1. Système fluide

Dans le système fluide de l'air pressurisé permet au « liquide de gaine » et à l'échantillon préalablement traité pour les analyses ultérieures de se retrouver dans un seul et même compartiment, la chambre de flux, sans se mélanger grâce à un écoulement laminaire et une différence de densité entre l'échantillon et le liquide de gaine (Figure 10). Pour schématiser, cette pièce ressemble à un entonnoir qui va permettre l'alignement des cellules avant leur passage devant le système optique.

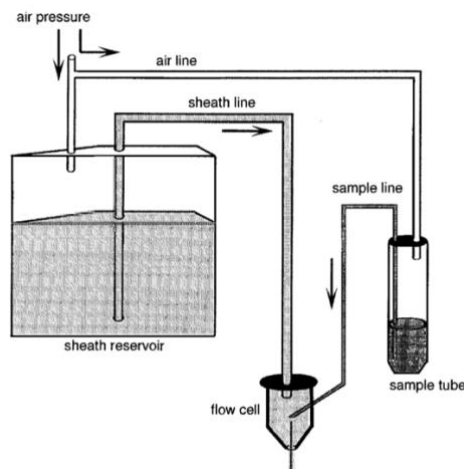


Figure 10 : Illustration du système fluide selon Alice Longobardi Givan. (30)

Cette étape est capitale car elle permet de séparer des cellules et de trouver un équilibre entre vitesse et résolution (Figure 11). Par exemple une pression élevée permet une vitesse d'analyse importante mais certaines cellules vont passer en même temps devant les lasers ce qui entraîne une perte de sensibilité. À l'inverse une pression faible entraîne un allongement du temps d'analyse mais une meilleure séparation de toutes les cellules de l'échantillon.

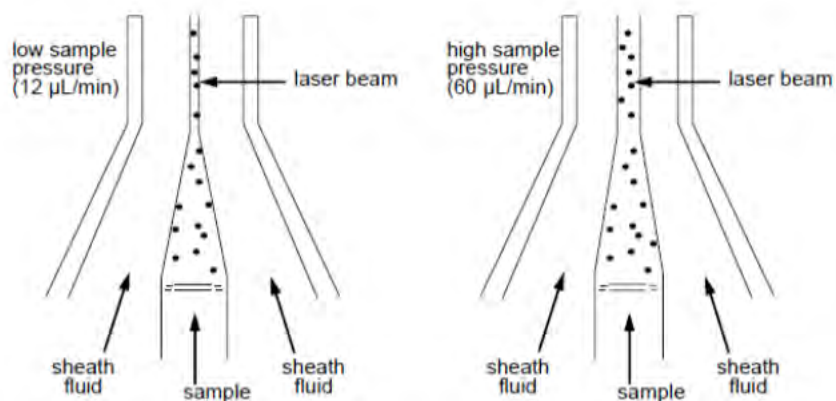


Figure 11 : Régulation du flux par Becton, Dickinson and Company.

2. Système optique

a) Lasers

Le faisceau de lasers est également à prendre en compte pour obtenir une bonne séparation lors de l'analyse des cellules. Sa taille et sa forme doivent être adaptées comme expliqué dans le schéma ci-dessous (Figure 12).

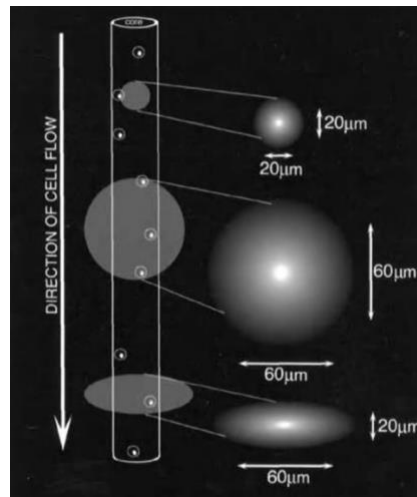


Figure 12 : Passage des cellules devant les lasers selon Alice Longobardi Givan. (30)

Le passage devant les lasers permet trois « types » d'analyses différentes :

- Le Forward Scatter (FSC) ou la diffusion axiale qui est analysée dans le trajet initial du laser, elle est proportionnelle à la surface et à la taille de la cellule (Figure 13).
- Le Side Scatter (SSC) ou diffusion latérale récupérée le plus souvent à 90° correspond à la granularité de la cellule et à sa complexité interne (Figure 13).

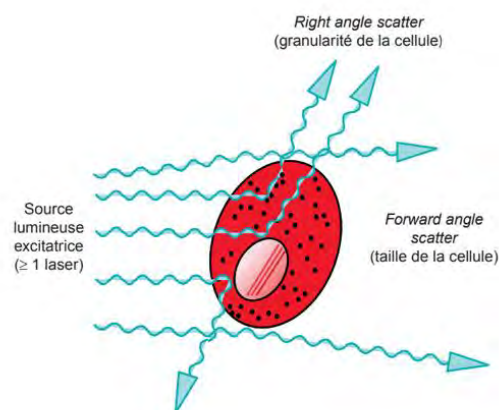


Figure 13 : Détection du SSC et du FSC d'après l'EMC "Immunophénotypage des hémopathies malignes par CMF". (31)

- La fluorescence, récoltée en contiguïté avec le SSC. Elle est obtenue grâce à l'excitation des cellules préalablement mises en suspension avec des anticorps monoclonaux (AcM) associés à des fluorochromes permettant la mise en évidence de Cluster de Différenciation ou CD. L'identification de ces CD permet l'immunophénotypage des cellules. Les fluorochromes doivent posséder plusieurs caractéristiques importantes : ils doivent être facilement conjuguables aux AcM et leurs spectres optiques ne doivent quasiment pas se chevaucher.

b) Miroirs dichroïques et filtres optiques

Tout le système optique placé à 90° du faisceau initial permet la réception des signaux émis par les différents fluorochromes et également par le SSC. Tout d'abord la lumière passe par une lentille de recueil puis est dirigée vers les tubes photomultiplicateurs. Entre ces deux étapes on retrouve des miroirs et des filtres qui vont permettre un tri dans les différentes longueurs d'onde obtenues (Figure 14).

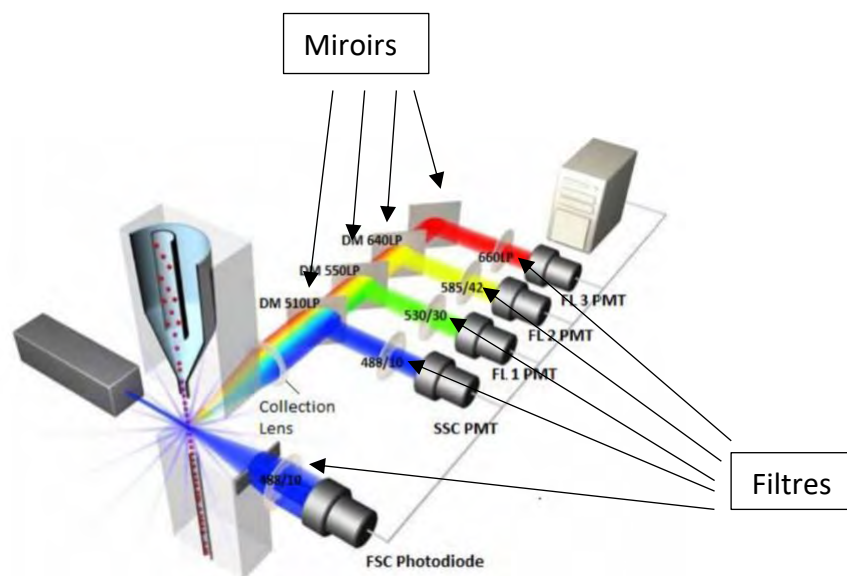


Figure 14 : Schéma du positionnement des miroirs et des filtres au sein d'un cytomètre en flux par Life Technologies Corporation.

- Miroirs dichroïques : ils permettent de réorienter le faisceau de lumière à 90° vers les récepteurs des longueurs d'onde voulues et en laissant passer les autres longueurs d'onde.
- Filtres optiques : tout comme les miroirs, ils permettent d'éliminer les longueurs d'onde « parasites » en permettant le passage de longueurs d'ondes ciblées sans dévier le faisceau.

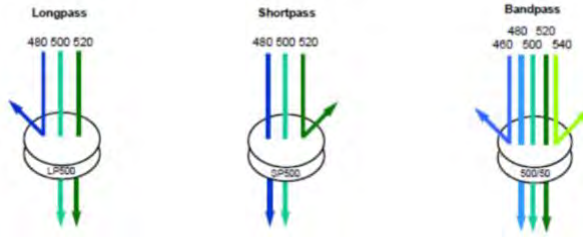


Figure 15 : Illustration du principe des miroirs et des filtres par Becton, Dickinson and Company.

Le schéma ci-dessus s'applique aussi bien aux miroirs qu'aux filtres (Figure 15). Selon les bancs optiques, les miroirs et les filtres peuvent être « longpass » (ils laissent passer toutes les longueurs d'onde au-dessus d'un seuil), « shortpass » (ils laissent passer toutes les longueurs d'onde en-dessous d'un seuil) ou « bandpass » (ils laissent passer toutes les longueurs d'onde comprise dans un intervalle).

3. Système informatique

La première étape du traitement des données est de retranscrire le signal lumineux en signal électrique. Pour se faire une photodiode est utilisée pour le FSC. Pour le SSC et la fluorescence, des photodétecteurs sont utilisés. Ils permettent la réception de signaux plus faibles que la photodiode. Le signal électrique est ensuite analysé par un processeur de signal qui convertit ces données en valeurs numériques sur l'ordinateur où sont stockées et analysées les données.

Afin d'identifier les différentes populations de cellules et leurs particularités on procède au traitement des données grâce à un logiciel dédié tel que Kaluza (Beckman Coulter) :

- Création de graphiques pour identifier les différentes populations cellulaires :
 - o Histogramme : choix d'un paramètre en abscisse et nombre d'évènements en ordonnée
 - o « Dot-plot » ou graphe de nuage de points, il permet de mettre en relation deux paramètres différents, aussi bien le FSC, le SSC ou une intensité de fluorescence d'un CD.
 - o « Density plot » : Sur le même principe que le dot-plot, un troisième paramètre concernant le nombre d'évènements est utilisé. Il est ainsi plus facile de repérer la zone où se trouve le plus grand nombre de cellules. Cela est réalisé grâce à l'utilisation de couleurs corrélées au nombre d'évènements.

- Afin d'affiner l'utilisation de ces graphiques, le fenêtrage est utilisé (Figure 16). Cela permet de cibler une population cellulaire choisie et de la reporter sur un nouveau graphique pour étudier l'expression d'un autre CD. Au fur et à mesure, il est donc possible d'identifier tous les paramètres d'une population de cellules choisies, par exemple dans notre cas, les blasts.

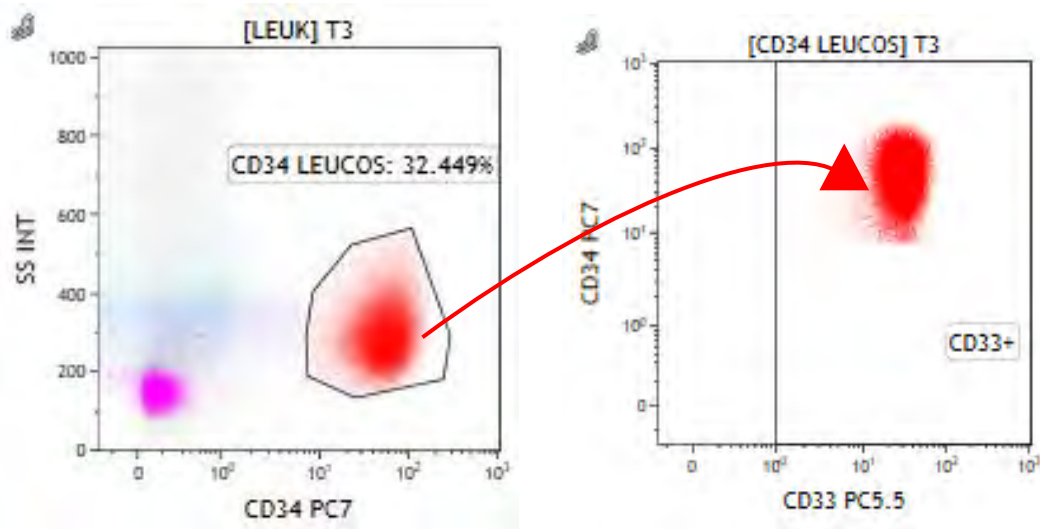


Figure 16 : Stratégie de fenêtrage sur des dot-plots.

C. Cytométrie et immunophénotypage de la moelle osseuse normale

La séparation de base FSC vs SSC (Figure 17) permet de distinguer grossièrement les différentes catégories de cellules. Les lymphocytes sont en vert et les monocytes en rouge. Les polynucléaires neutrophiles ainsi que leurs précurseurs, les polynucléaires basophiles et les polynucléaires éosinophiles dans la zone bleue.

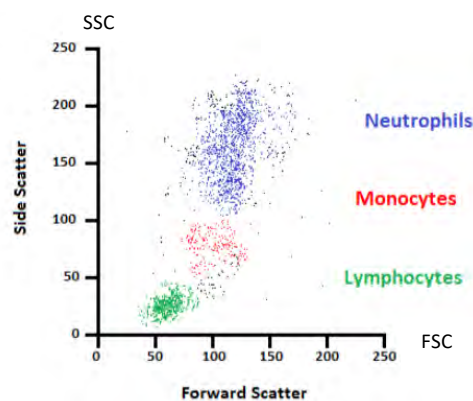


Figure 17 : Représentation graphique FSC/SSC des éléments normaux.

Les cellules pathologiques telles que les blastes se retrouvent dans la zone au-dessus des lymphocytes et des monocytes et peuvent les chevaucher.

La moelle osseuse d'un sujet « sain » est composée de l'ensemble des cellules évoquées dans la partie II. Toutes ces éléments possèdent différents marqueurs immunologiques qui dépendent de leur lignée et de leur stade de différenciation. Même si certaines cellules ne sont pas différenciables cytologiquement elles peuvent posséder des caractéristiques immunologiques particulières. Il est important de les connaître afin d'identifier la lignée et le stade de différenciation des marqueurs.

Le but de ce chapitre est de référencer l'ensemble des marqueurs utilisés pour caractériser une cellule et l'insérer dans l'hématopoïèse normale (Tableau 5, 6, 7, 8, 9 et 10). Cela permet ensuite de reconnaître les marqueurs anormaux, par leur présence ou leur absence, sur des populations cellulaires pathologiques. Afin d'obtenir les tableaux suivants différents ouvrages et publications (32) (33) (34) (35) ont été utilisés ainsi que les observations au laboratoire de CMF du CHU de Toulouse. Pour évaluer l'expression d'un marqueur, l'échelle ci-dessous est utilisée.

Non exprimé	Expression inconstante	Faiblement exprimé	Exprimé	Fortement exprimé
→				
-	+/-	+	++	+++

1. Précurseurs

Tableau 5 : Expression phénotypique des progéniteurs.

	<i>SC-like</i>	<i>MPP-like</i>	<i>CMP-like</i>	<i>GMP-like</i>	<i>Nom</i>
<i>CD34</i>	-/+	++	+	-	gp105-120
<i>CD117</i>	+	++	++	-/+	Stem cell factor-receptor: SCF-R, Steel factor receptor, c-kit
<i>CD33</i>	-	+	++	++	gp67
<i>CD13</i>	-	+	++	++	Aminopeptidase N
<i>MPO</i>	-	-	+	+	Myéloperoxydase

Tableau 6 : Expression phénotypique des précurseurs.

	<i>CFU-Blastes</i>	<i>CFU-GEMM</i>	<i>CFU-GM</i>	<i>Myéloblaste</i>	<i>Promyelocyte</i>	<i>Nom</i>
<i>CD34</i>	++	++	+	+	-	gp105-120
<i>CD117</i>	-/+	+	+	++	+/-	Stem cell factor-receptor: SCF-R, Steel factor receptor, c-kit
<i>CD33</i>	-	-/+	++	++	++	gp67
<i>CD13</i>	-	-/+	++	++	++	Aminopeptidase N
<i>MPO</i>	-	-	+	+	++	Myéloperoxydase

2. Lignée granuleuse

a) Polynucléaire neutrophile et ses précurseurs

Tableau 7 : Expression phénotypique de la lignée granuleuse.

	Myéloblaste	Promyélocyte	Myélocyte	Métamyélocyte	Granulocyte	Nom
CD10	-	-	-	-	++	Endopeptidase neutre (NEP), cALLA
CD11b	-	-/+	++	++	++	MAC-1 chaîne α (associé à CD18)
CD11c	-	-/+	++	++	++	CR4 chaîne α (associé à CD18)
CD13	++	++	+	+ / ++	+++	Amino peptidase N
CD14	-	-	-	-	+	Récepteur du lipopolysaccharide (LPS-R)
CD15	-	++	+++	+++	+++	Lewis x
CD16	-	-	-	+	+++	FcγRIII a/b
CD18	++	+	+++	++	++	β2 integrin
CD24	-	-	+	++	++	BA-1
CD33	++	++	++	+	+	gp67
CD34	+	-	-	-	-	gp105-120
CD35	-	-	-	-	++	Récepteur du complément 1: CR1
CD36	-	-/+	+	-	-	gpIV, gpIIb, OKM-5, PASIV, MGFM
CD38	- / ++	++	-	-	-	T10
CD44	+++	++	+	+	+++	Pgp 1, HCAM, HERMES, ECMR III, gp85
CD45	++	+	+	+	++	Antigène leucocytaire commun: LCA
CD55	+++	+	+	+++	+++	Decay accelerating factor: DAF
CD64	-	+	++	++	-	FcγRI
CD65	-	++	++	++	+++	Fuciganglioside, VIM-2
CD66a	-	-	++	++	++	Biliary glycoprotein BGP, NCA-160
CD66b	-	+++	+++	++	++	CEA gene family members 6: CGM6, NCA-95 (CD67)
CD71	+	+/-	-	-	-	Récepteur de la transferrine: TfR, T9
CD87	-	-	-	-	++	Récepteur de l'urokinase plasminogen activator: uPA-R
CD117	++	+/-	-	-	-	Stem cell factor-receptor: SCF-R, Steel factor receptor, c-kit
HLA-DR	+	-	-	-	-	HLA de classe II

b) Polynucléaires éosinophile et basophile

Tableau 8 : Expression phénotypique des polynucléaires éosinophile et basophile.

	Polynucléaire éosinophile	Polynucléaire basophile	Nom
CD9	-	+++	
CD10	-	-	Endopeptidase neutre (NEP), cALLA
CD11b	++	-/+	MAC-1 chaîne α (associé à CD18)
CD11c	++	-/+	CR4 chaîne α (associé à CD18)
CD13	+	++	Aminopeptidase N
CD14	-	-	Récepteur du lipopolysaccharide (LPS-R)
CD15	-	-	Lewis x
CD16	-	-	Fc γ RIII a/b
CD18	++	+	β 2 integrin
CD24	-	-	BA-1
CD33	+	+++	gp67
CD34	++	-	gp105-120
CD35	-	-	Récepteur du complément 1: CR1
CD36	-	-/+	gpIV, gpIIIb, OKM-5, PASIV, MGFM
CD38	-/+	++	T10
CD44	+++	++	Pgp 1, HCAM, HERMES, ECMR III, gp85
CD45	+++	+++	Antigène leucocytaire commun: LCA
CD55	+++	+	Decay accelerating factor: DAF
CD56	-	-	
CD64	-	-	Fc γ RI
CD65	-	++	Fuciganglioside, VIM-2
CD66a	-	-	Biliary glycoprotein BGP, NCA-160
CD66b	-	+++	CEA gene family members 6: CGM6, NCA-95 (CD67)
CD71	+	+/-	Récepteur de la transferrine: TfR, T9
CD87	-	-	Récepteur de l'urokinase plasminogen activator: uPA-R
CD117	-	-	Stem cell factor-receptor: SCF-R, Steel factor receptor, c-kit
HLA-DR	-	-	HLA de classe II

3. Lignée monocyttaire

Tableau 9 : Expression phénotypique de la lignée monocyttaire.

	Monoblaste	Promonocyte	Monocyte	Nom
CD4	-/+	+	+	T4, récepteur des molécules MHC de classe II
CD11b	-	++	+++	MAC-1 chaîne α (associé à CD18)
CD13	++	+ / ++	++ / +++	Amino peptidase N
CD14	-	+ / ++	+++	Récepteur du lipopolysaccharide (LPS-R)
CD15	-	++	+	Lewis x
CD16	-	-	- / +	FcyRIII a/b
CD33	+++	+++	+++	gp67
CD34	+ / -	-	-	gp105-120
CD36	- / +	++	+++	gpIV, gpIIb, OKM-5, PASIV, MGFM
CD38	- / +	+	+	T10
CD45	+	++	+++	Antigène leucocytaire commun: LCA
CD64	-	++	+++	FcyRI
CD117	+ / -	-	-	Stem cell factor-receptor: SCF-R, Steel factor receptor, c-kit
HLA-DR	++	+++	++ / +++	HLA de classe II

4. Lignée érythroblastique

Tableau 10 : Expression phénotypique de la lignée érythroblastique

	Proérythroblaste	Érythroblaste baso	Érythroblaste poly/acido	Réticulocyte	Nom
CD34	- / +	-	-	-	gp105-120
CD36	++	+++	++	- / +	gpIV, gpIIb, OKM-5, PASIV, MGFM
CD38	+	- / +	-	-	T10
CD45	+	- / +	-	-	Antigène leucocytaire commun : LCA
CD71	+++	+++	+++	+	Récepteur de la transferrine : TfR, T
CD117	++	-	-	-	Stem cell factor-receptor: SCF-R, Steel factor receptor, c-kit
CD235a	+ / ++	+++	+++	+++	Glycophorine a
HLA-DR	++	++	+	-	HLA de classe II

5. Lignée mégacaryocytaire

La lignée mégacaryocytaire se distingue par différents marqueurs retrouvés également sur les plaquettes :

- CD41 correspondant à la glycoprotéine IIb/IIIa
- CD42b correspondant à la glycoprotéine Ib
- CD61 correspondant à la glycoprotéine IIIa

D. Immunophénotypage des LAM dans le cadre diagnostique

Le premier marqueur intervenant dans l'immunophénotypage des LAM et permettant un premier tri pour l'identification des blastes est le CD45+, marqueur pan-leucocytaire. Couplé au SSC, il est possible de définir une zone (36) dans laquelle se trouvent les cellules immatures, exprimant faiblement le CD45 et les blastes (Figure 18).

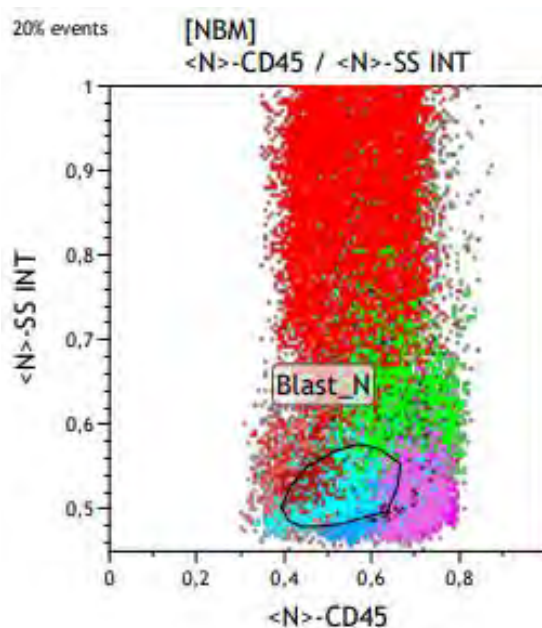


Figure 18 : Graphique SS/CD45+ sur un patient CHU de Toulouse.

Une fois définie (ici en cyan), on travaille sur cette population grâce au fenêtrage et en appliquant différents marqueurs afin d'établir l'origine myéloïde de la leucémie aiguë.

On retrouve des marqueurs d'immaturation, d'expression variable selon les types de LAM mais aussi des marqueurs classiques de la lignée à laquelle les blastes appartiennent. Dans le tableau 11, se trouvent les marqueurs permettant l'orientation vers un type de LAM selon la classification FAB. Même si la biologie moléculaire et la cytogénétique interviennent par la suite pour intégrer le diagnostic dans la classification OMS, l'immunophénotypage permet une caractérisation rapide complémentaire du cytologiste (37).

Tableau 11 : Orientation phénotypique des LAM dans la classification FAB.

Lignée	Marqueurs	LAM 0	LAM 1	LAM 2	LAM 3	LAM 4	LAM 5	LAM 6	LAM 7
Précurseurs	CD34	+	+	+	-	+/-	+/-	+/-	+/-
	HLA-DR	+	+	+	-	+/-	+		+/-
Granulocytaire	CD13	+	+	+	+	+	+/-		
	CD33	+	+	+	+	+	+/-		
	CD117	+	+	+	+/-	+	+/-	+	
Monocytaire	CD4					+/-	+		
	CD14					+/-	+		
	CD64				+	+/-	+		
	CD11b					+/-	+		
Erythrocytaire	CD235a							+	
	CD36					+	+	+	+
	CD71							+	
Mégacaryocytaire	CD41								+
	CD42b								+
	CD61								+
Aberrants/Lymphocytaire	CD7								+
	CD19			+/-					

NB : CD36 est également exprimé naturellement dans les lignées monocytaire et mégacaryocytaire

A la différence des cellules normales des lignées myéloïdes, des expressions aberrantes font leur apparition selon différents schémas :

- Sur ou sous-expression de certains marqueurs
- Asynchronisme de maturation : co-expression de marqueur d'immaturation et de maturité
- Expression de CD n'appartenant pas la lignée myéloïde mais à la lignée lymphoïde. Par exemple : LAM avec maturation associée à une translocation t(8;21) qui exprime le CD19, marqueur de la lignée lymphoïde B. (38)

L'expression doit être retrouvée en faible quantité ou être absente dans la moelle d'un sujet sain pour être considérée comme aberrante.

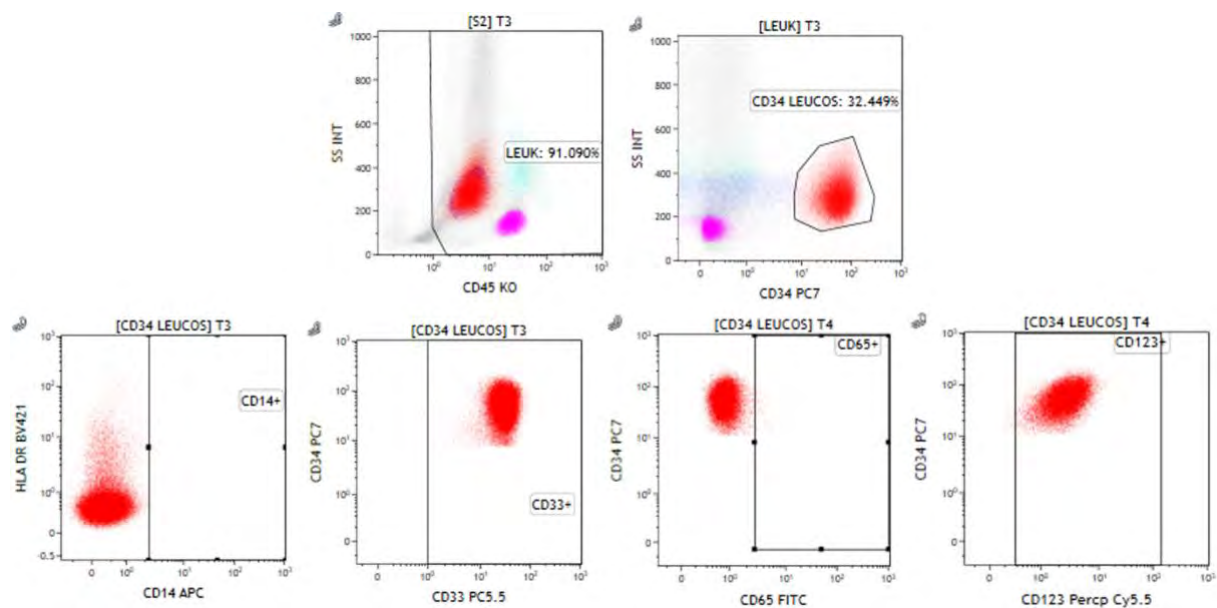


Figure 19 : Exemple d'un diagnostic d'une LAM CD34+ HLA-DR- CD14- CD33+ CD65- CD123+ au CHU de Toulouse.

Pour le patient ci-dessus (Figure 19), sur une population blastique CD45faible/CD34+ on observe l'expression des marqueurs CD33 et CD123. A l'inverse le marqueur monocytaire CD14 et le marqueur de maturité CD65 ne sont pas exprimés.

E. Un nouvel outil : FlowSOM

Comme observé dans l'exemple du chapitre précédant l'interprétation des résultats d'immunophénotypage n'est pas aisée car nous utilisons de nombreux marqueurs et de nombreux graphiques. De nouveaux outils d'interprétation ont fait leur apparition ces dernières années, facilitant l'analyse des données. Leur but est de regrouper sur un graphique en deux dimensions, lisible et facilement compréhensible par l'œil humain, une multitude de paramètres, sans laisser place à la subjectivité. C'est ce que l'on appelle l'analyse non supervisée, et est recommandée par l'ELN pour le suivi des LAM (39). Différents algorithmes et logiciels permettent ces représentations grâce à l'intelligence artificielle :

- Ceux basés sur la réduction du nombre de dimensions comme : l'analyse en composante principale, t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) (40) et visualizing data using t-SNE (visNE) (41)

- Ceux basés sur la création de clusters : Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events (SPADE) (42), PhenoGraph (43), Citrus (44) et FlowSOM pour « Flow-Self Organizing Map » (45).

Ce dernier est celui choisi pour cette étude car il possède une vitesse d'exécution relativement courte et une sensibilité importante (46). Via le logiciel en accès libre « R » (Bioconductor), il permet la formation de clusters cellulaire ou « nœuds » de façon non supervisée, c'est-à-dire que l'opérateur n'intervient pas dans la stratégie de regroupement des évènements.

L'algorithme de FlowSOM se décompose en quatre étapes (Figure 20) détaillées par Van Gassen et al (45) :

- Récupération et lecture des données du cytomètre, puis l'intervention du technicien ou du biologiste pour les compensations et la normalisation des fluorescences conditionnant le résultat final. Un nombre binaire (0 ou 1) est ensuite attribué pour chaque cellule et pour chaque marqueur.
- Construction d'une « Self-Organizing Map » (SOM) ou carte autoadaptative qui va permettre d'organiser tous nos points dans une grille au sein de laquelle les cellules se retrouvent voisines de celles qui leur sont les plus semblables. Au fur et à mesure que l'intelligence artificielle incorpore des points, la taille de la grille diminue pour s'affiner et donner le nombre de cluster final.
- Construction du « Minimal Spanning Tree » qui récupère les SOM afin de les organiser dans un espace multidimensionnel puis de les représenter sur un graphique. Les nœuds sont reliés de façon à ce que la somme des « poids » des branches soit minimale.
- « Meta-clustering » qui permet d'étendre l'arbre créé en réalisant des sous-catégories des clusters déjà existants. Les cellules entre deux types peuvent donc être représentées rendant plus précise la représentation.

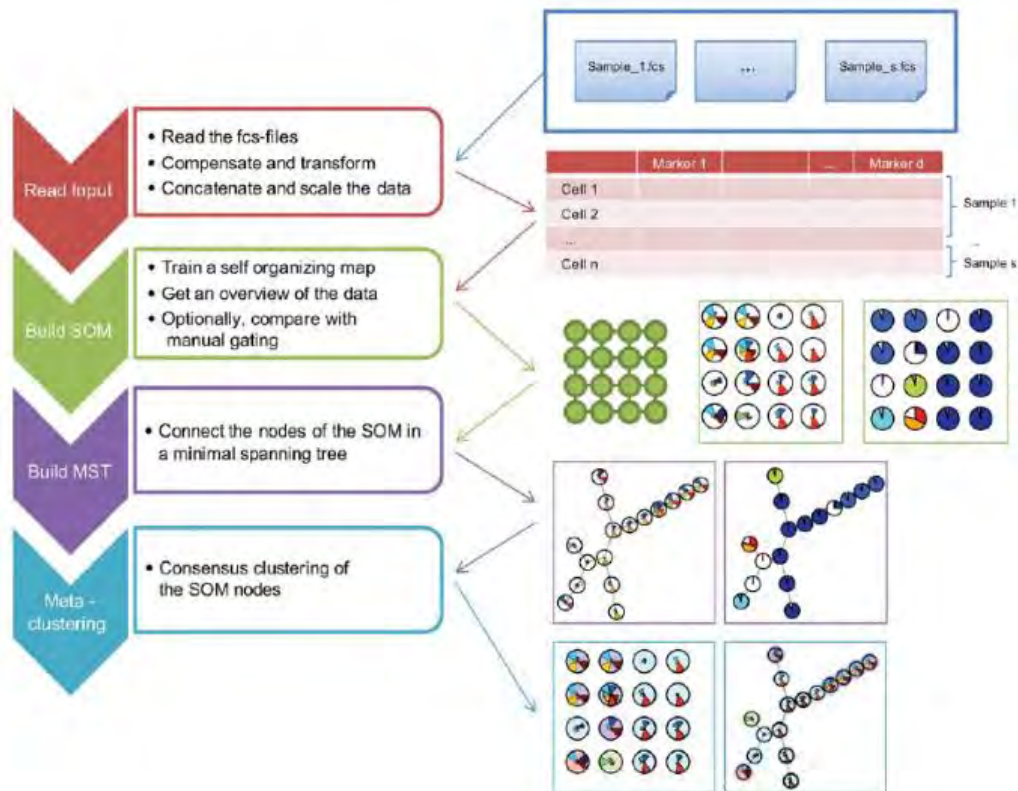


Figure 20 : Les quatre étapes de l'algorithme de FlowSOM selon Van Gassen et al. (45)

Voici un exemple de résultat obtenu avec FlowSOM au CHU de Toulouse (Figure 21). Ce graphique montre la distribution de la fusion de 10 moelles normales (utilisée comme référence pour la recherche de cellules anormales chez les patients).

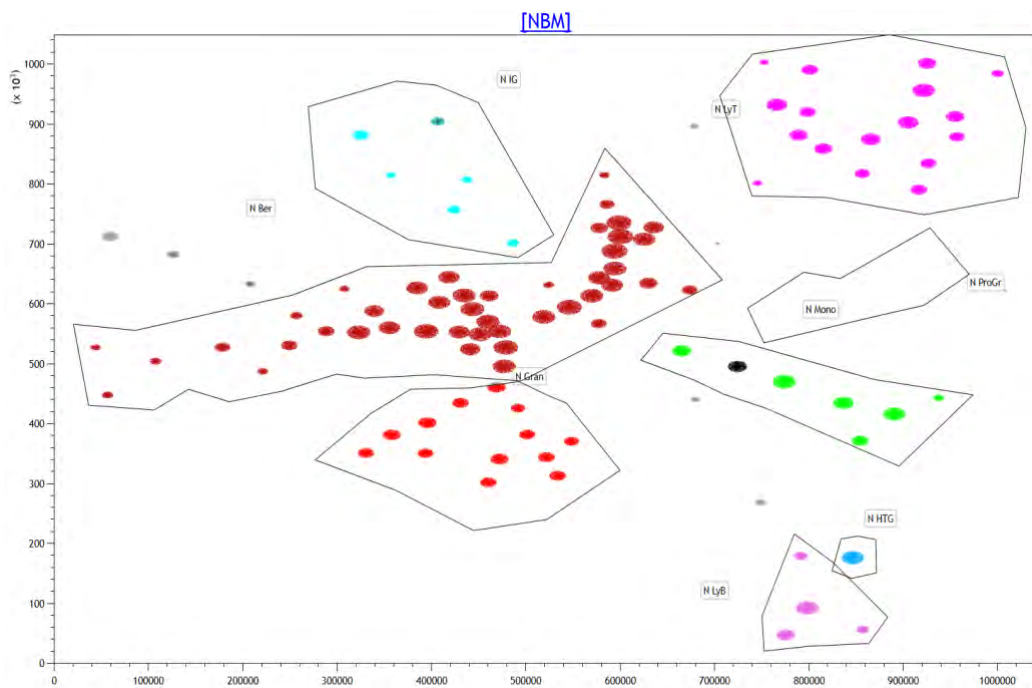


Figure 21 : Échantillon NBM traité par FlowSOM pour le phénotype LAIP au sein de l'étude.

V. Maladie résiduelle

A. Définition

En anglais *Measurable Residual Disease* (anciennement *Minimal Residual Disease*) ou MRD correspond à la quantité de blastes chez un patient présentant une LAM après un traitement par chimiothérapie (Figure 22). La rémission cytologique (RC) est atteinte chez la plupart des patients traités. Mais elle ne garantit pas la guérison, effectivement entre 60% (47) et 65% (48) de ces patients rechutent dans les mois suivant la RC. Il est donc nécessaire de détecter à des seuils plus bas, ces cellules malignes résiduelles et d'anticiper les rechutes grâce à un traitement préemptif (49). Plusieurs techniques permettent d'évaluer celle-ci avec, pour chacune des avantages et des inconvénients.

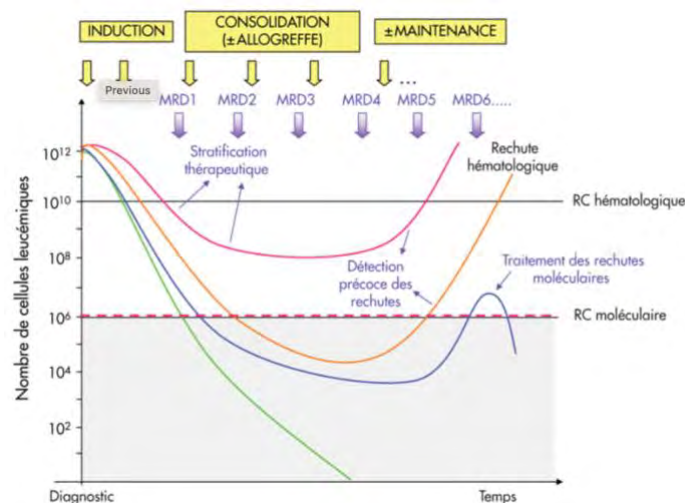


Figure 22 : Représentations schématiques des différentes évolutions des leucémies aiguës par Claude Preudhomme. (50)

B. Outils actuels et intérêt

L'évaluation cytologique est un outil rapide, mais peu sensible pour évaluer véritablement la MRD et sujette à une expertise lecteur-dépendante. D'autres techniques comme la cytogénétique (51), la FISH (fluorescent *in situ* hybridization) (52), le NGS (next generation sequencing) (53), la ddPCR (digital droplet PCR) (54) (55) permettent cette recherche mais ne sont pas installées dans la pratique quotidienne.

Actuellement deux techniques de MRD sont utilisées en routine : l'immunophénotypage par CMF et la biologie moléculaire par qRT-PCR. Dans le paragraphe suivant les avantages et les inconvénients de ces deux techniques vont être exposés et comparés l'une à l'autre (56).

La biologie moléculaire est le standard de référence car elle possède une excellente sensibilité estimée à environ 10^{-3} à 10^{-6} contre 10^{-4} pour la CMF (57).

Cette différence de sensibilité pour la biologie moléculaire s'explique par la cible moléculaire sur laquelle s'effectue la MRD. La mutation de *NPM1* est détectable à des seuils très bas (10^{-6}) (58) contrairement à l'anomalie *MLLT3-KMT2A* qui ne se détecte pas en dessous de 10^{-3} (59). En ce qui concerne la CMF, le suivi de la MRD est réalisable sur environ 90% à 100% des LAM au diagnostic, contre 50% pour la biologie moléculaire (60).

Un point difficile à gérer pour les deux techniques est le changement de cible à la rechute :

- Concernant la CMF, un changement de phénotype des blastes à la rechute est retrouvé d'environ 30% des cas (61). L'opérateur peut à passer à côté de ces éléments lors de l'analyse.
- La biologie moléculaire peut également être confrontée à ce problème : l'anomalie peut également disparaître à la rechute. La mutation de *NPM1* par exemple n'est pas retrouvée lors de la rechute dans 10% des cas (62). Également, dans l'étude de Höllein et al (63) qui s'intéresse des LAM avec la mutation *RUNX1-RUNX1T1*, la perte de mutations à la rechute est significative ($p=0.0485$) en particulier avec les mutations *FLT3*, *KIT*, *KRAS* et *NRAS*.

Le délai de rendu des résultats est plus court en CMF qu'en biologie moléculaire. C'est un atout important mais cela n'est pas critique dans la prise en charge du patient.

La CMF permet également la détection sous-populations cellulaires telles que les *Leukemia Stem Cells* ou Cellules Souches Leucémiques (CSL) contrairement à la biologie moléculaire, ce qui permet d'identifier les cellules à l'origine de l'hémopathie et donc de les utiliser dans le suivi (voir chapitre suivant). Même si cette approche n'a pas encore prouvé son utilité en clinique, elle présente un fort potentiel de développement.

La qRT-PCR s'affranchie également de l'interprétation de l'opérateur contrairement à la CMF « classique », cependant l'approche par des techniques non supervisées permet de s'affranchir d'une partie de ce biais, le fenêtrage supervisé n'existant quasiment plus. Dans une volonté d'harmonisation ce type de technique d'interprétation de résultats de CMF est essentielle. L'éventuelle utilisation dans plusieurs laboratoires des mêmes panels d'analyse, de la même programmation de FlowSOM ainsi que de la même référence de moelle normale laisse envisager une harmonisation de la technique. Ces méthodes nécessitent un matériel informatique conséquent et demandent toujours une expertise importante dans la compréhension du logiciel et l'interprétation des résultats.

C. Méthodes et stratégies de réalisation de la MRD en CMF

1. Leukemia Associated ImmunoPhenotype (LAIP) et Different from Normal (DfN)

Deux approches sont utilisées dans le calcul de la MRD par CMF. Tout d'abord le LAIP qui correspond à tout phénotype possédant des marqueurs aberrants associé à des marqueurs de précurseurs classiques. Chez un patient atteint d'une LAM on peut donc observer plusieurs LAIPs du fait de l'hétérogénéité des cellules blastiques. Il se résume au final à identifier les différentes populations blastiques et les suivre dans le temps.

Le phénotype dit DfN est un panel fixe et est défini par tout marqueur dont le niveau d'expression est différent de ce qui est retrouvé dans l'hématopoïèse normale. Il peut donc être très utile lorsque le phénotype des cellules leucémiques change et détecter des nouvelles aberrations.

Au final ces deux approches sont très complémentaires (39) et les recommandations suggèrent de les utiliser conjointement pour le calcul de la MRD. Deux limites sont à signaler pour cette approche LAIP-DfN :

- Elle nécessite un grand nombre d'anticorps pour obtenir un LAIP précis (64)
- Le risque de faux négatif suite aux modifications phénotypiques du clone ou à l'émergence d'un sous clone (65) ne sont pas négligeables

La comparaison systématique avec une moelle normale (NBM) permet d'améliorer les résultats de la MRD par CMF, ce qui est appliqué avec l'utilisation de FlowSOM.

L'ELN a fixé le seuil de significativité clinique à 0,1%. Elle a également fixé un panel d'antigènes à rechercher ainsi que des règles, dans une volonté d'harmoniser la MRD en CMF, qui est pour l'instant centre dépendant.

Tableau 12 : Recommandations de ELN 2017 concernant la MRD en CMF. (39)

Points	Recommandations
1	<p>Use the following markers in an MRD panel:</p> <p>CD7, CD11b, CD13, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD56, CD117, HLA-DR (backbone: CD45, CD34, CD117, CD13, CD33, forward scatter/sideward scatter)</p> <p>If necessary, add a “monocytic tube” containing : CD64/CD11b/CD14/CD4/CD34/HLA-DR/CD33/CD45</p>
2	<p>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.</p>
3	<p>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.</p> <p>Pull as low as desirable BM volume because contamination with PB increases with BM volume</p>
4	<p>Estimate the contamination with PB, especially when a first pool of BM was impossible.</p>
5	<p>Use 500 000 to 1 million WBCs; use the best aberrancy available and relate it to CD451 WBCs.</p>
6	<p>To define “MRD-negative” and “MRD-positive” patient group, a cutoff of 0.1% is recommended.</p>
7	<p>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.</p>
8	<p>In a multicenter setting, transport and storage of full BM at room temperature for a period of 3 d are acceptable.</p>
9	<p>Single center studies with no extensive experience on MFC MRD are strongly discouraged.</p>

2. Cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (HSPC)

Une autre méthode consiste à identifier les CSL au sein des cellules du HSPC, ces éléments étant quiescents, chimiorésistants et capables d'induire les rechutes post-traitement. Cette population possédant les mêmes caractéristiques que les CSH : elles expriment le CD34 et n'expriment pas le CD38 ni des marqueurs de maturité (66).

Hanekamp et al (67) ont identifié plusieurs marqueurs utiles dans la détection des CSL dans la population CD34+ CD38- permettant la distinction avec les CSH (Tableau 13).

Tableau 13 : Proposition de marqueurs phénotypiques pour la détection des CSL. (67)

Marker	Identified as	Expression			
		Normal	In AML (%)	HSC	CD34+ CD38- LSC
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	+	++

D'un autre côté Zeijlemaker et al (68) ont mis en place un tube unique composé de 13 de ces anticorps dans le but d'homogénéiser et de faciliter la détection des CSL :

- Marqueurs communs : CD34, CD38, CD45
- Marqueurs spécifiques de lignées : CD45RA, CD123, CD33, CD44
- Marqueurs spécifiques des CSL : CLL-1, TIM-3, CD7, CD11b, CD22, CD56

A noter que le SSC et le FSC sont également plus élevés pour une CSL qu'une CSH. (69)

L'avantage majeur du panel CSL sur la population CD34+, comparé au panel DfN-LAIP est de diminuer le nombre de faux négatifs et donc d'améliorer la valeur pronostic de la MRD en CMF (69). Cependant son utilisation sur les patients dont les CSL sont CD34- s'avèrent plus délicates.

VI. Matériels et méthodes

A. Cohorte

Les patients inclus dans l'étude ont tous eu un diagnostic de LAM par cytométrie en flux au CHU de Toulouse entre 2017 et 2020. Ils ont eu également un suivi de MRD 35 jours après le début de l'induction par chimiothérapie intensive. Ce point de suivi a été choisi pour homogénéiser la cohorte afin que les données soient traitées au même stade.

Ils sont au nombre de 155 (Figure 23), dont 65 femmes et 90 hommes, âgés de 21 à 80 ans avec une médiane à 60 ans et une moyenne à 52 ans.

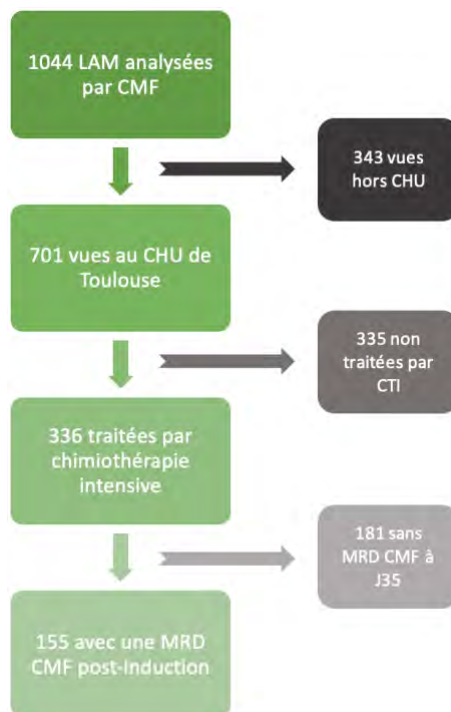


Figure 23 : Sélection de la cohorte.

B. Cytomètre

Le modèle utilisé au laboratoire d'hématologie de l'IUC-T Oncopole est un Navios™ EX 10 Colors/3 Lasers Beckman Coulter ®.

C. Panels et anticorps

Les anticorps ainsi que les fluorochromes utilisés dans nos deux panels LAIP et HSPC sont listés dans les tableaux 14 et 15.

Tableau 14 : Anticorps et fluorochromes utilisés dans le panel LAIP.

Anticorps	Fluorochrome	Clone	Fournisseur	Référence	Volume (µL) / tests
CD7	PE	M-T701	Becton Dickinson	555361	5
CD13	PE CF594	WM15	Becton Dickinson	562491	2
CD19	FITC	J3-119	Beckman Coulter	A07768	5
CD33	APC	P67.6	Becton Dickinson	345800	2
CD34	BV421	581	Becton Dickinson	562577	2
CD38	PECy7	HB-7	Becton Dickinson	335825	2
CD56	PE	N901	Beckman Coulter	A07788	5
CD117	PC5	104D2D1	Beckman Coulter	IM2733	2
HLA-DR	APC-H7	L243	Becton Dickinson	641411	2

Tableau 15 : Anticorps et fluorochromes utilisés dans le panel HSPC.

Anticorps	Fluorochrome	Clone	Fournisseur	Référence	Volume (µL) / tests
CD34	BV421	581	Becton Dickinson	562577	2
CD38	PECy7	HB-7	Becton Dickinson	335825	2
CD45	Krome Orange	J33	Beckman Coulter	B36294	2
CD45RA	APCH7	HI100	Becton Dickinson	560674	2
CD133	APC	AC133	Miltenyi	130-090-826	2
CD135	PE	4G8	Becton Dickinson	558996	10

D. Logiciels

Le logiciel Kaluza[®] (version 2.1) permet de traiter les données brutes provenant du cytomètre, l'affichage des différents graphiques et le paramétrage.

Le plugin R console ® (version 3.3.2) intégré directement dans Kaluza ® permet l'application des scripts de normalisation et la création des fichiers. Les scripts utilisés sont cryptés et ne sont pas détaillés ici.

FlowSOM ® est un logiciel open source qui nous permet de créer les « Self organization map », chaque échantillon de cette étude est analysé via cette méthode.

Le calcul de la MRD sur FlowSOM consiste à comparer le patient avec un échantillon de moelle normale composé de 10 moelles de donneurs sains dont certains ont une moelle normale et d'autres sont en post chimiothérapie.

1. Réglages préalables

Plusieurs étapes sont nécessaires afin de lancer l'analyse non supervisée :

- Sélection de l'ensemble des cellules présentes dans l'échantillon afin de ne pas exclure la population d'intérêt et ne pas compter les débris cellulaires.
- Sélection des singulets avec exclusion des doublets.

2. Vérification des réglages des compensations

Comme défini dans les prérequis, les données brutes (répertoires « Raw ») acquises à partir de patients (Diag ou FU) ou à partir de moelles normales (NBM) doivent faire l'objet d'une vérification systématique des paramètres de compensation de fluorescences, avant de pouvoir être normalisées par les scripts et analysé avec FlowSOM.

3. Normalisation des fluorescences

L'utilisation de deux scripts différents dans R selon le fichier traité, permettant d'harmoniser les fluorescences des prélèvements en normalisant sur l'expression des marqueurs de la population lymphocytaire du patient :

- 001 : Moelle au diagnostic
- 001bis : Moelle au suivi ou Follow Up (FU)

Le fichier NBM est préalablement normalisé grâce au script 02 et il n'est pas retouché à chaque passage de patient.

4. Constitution du fichier fusionné

L'utilisation du script 005 permettant la fusion des données des moelles normales, du diagnostic et du point de suivi et la sélection de la région blastique.

5. Recherche de la MRD

Le ou les nœuds où se trouvent les blastes sont identifiés sur les graphiques de la moelle normale et du diagnostic. Ces populations doivent être faiblement représentées dans la NBM et évidemment plus importante au diagnostic. Le fenêtrage sur ces dernières nous permet ensuite de suivre son évolution au point de suivi.

Les quatre situations auxquelles nous avons été confrontés : LAIP MRD+, LAIP MRD-, HSCP MRD+, HSCP MRD- sont listées sous forme d'exemple dans les figures 24, 25, 26 et 27.

a) Phénotype LAIP-DfN

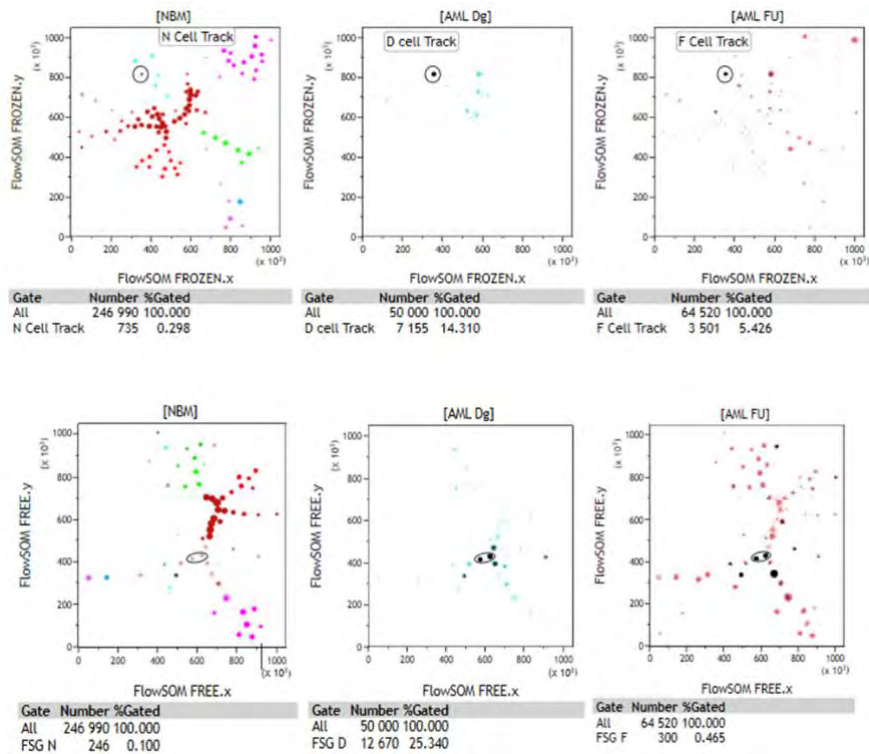


Figure 24 : Interprétation avec FlowSOM d'une MRD+ avec le panel LAIP.

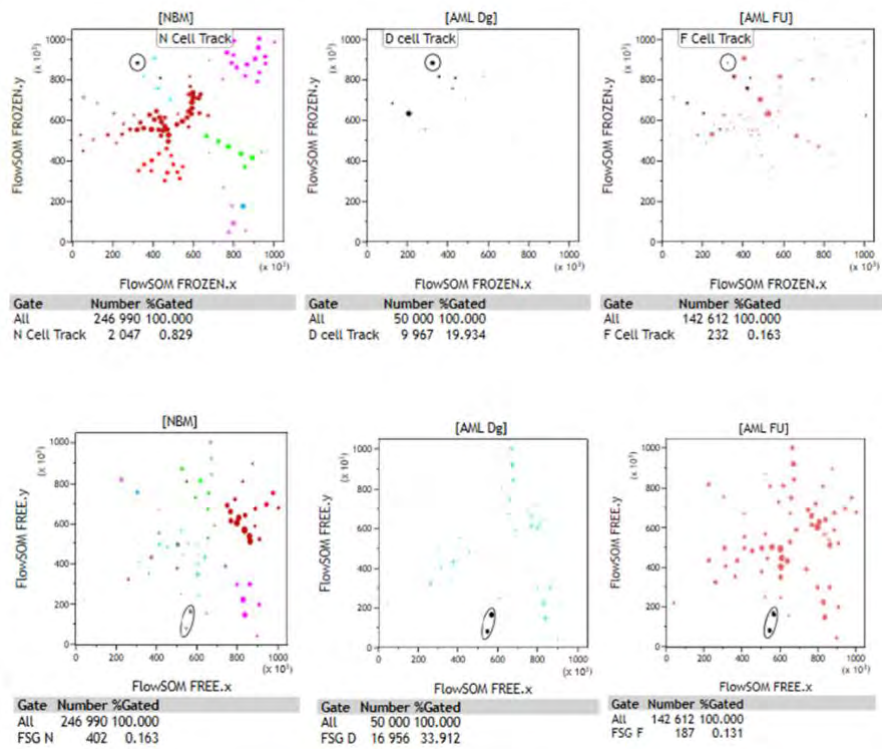


Figure 25 : Interprétation avec FlowSOM d'une MRD- avec le panel LAIP.

b) Phénotype HSPC

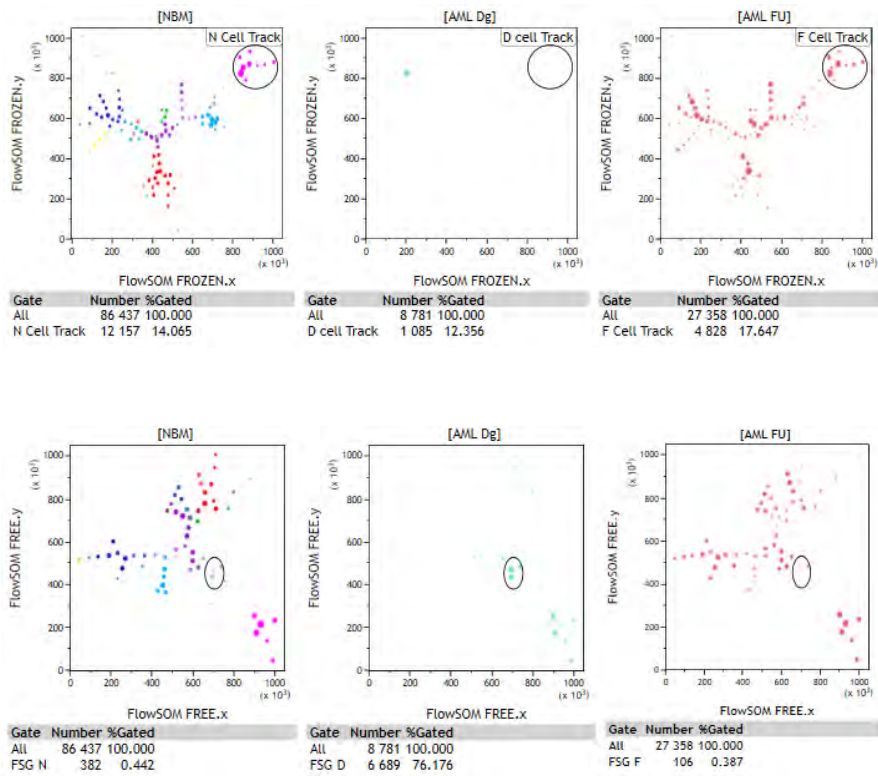


Figure 26 : Interprétation avec FlowSOM d'une MRD+ avec le panel HSPC.

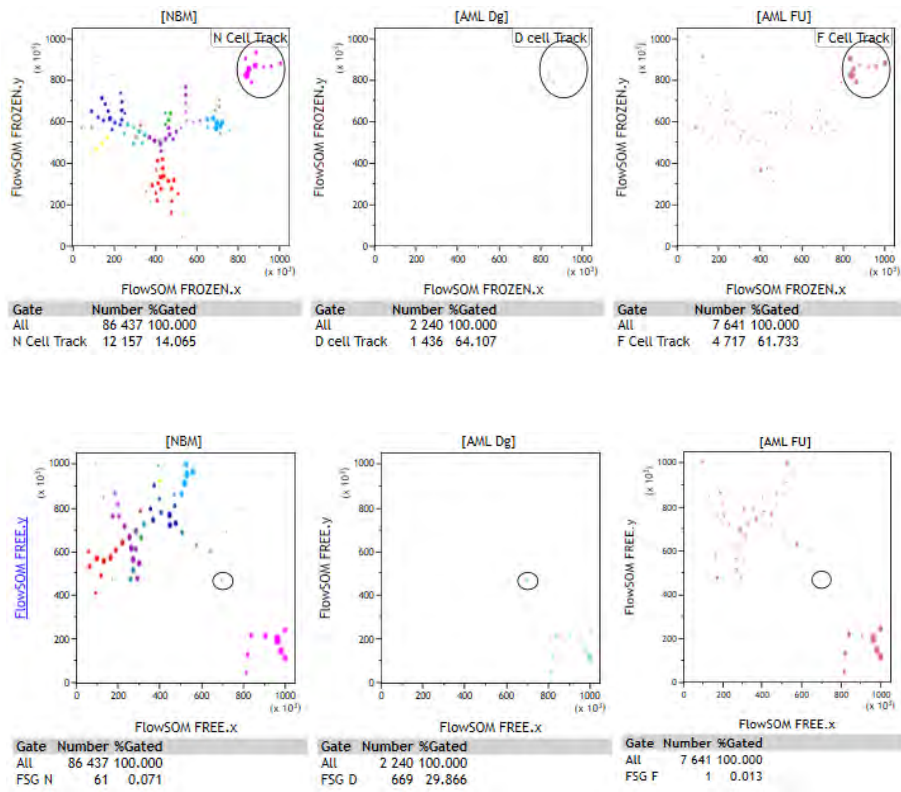


Figure 27 : Interprétation avec FlowSOM d'une MRD- avec le panel HSPC.

VII. Résultats

A. Évaluation de la valeur pronostique de la MRD par CMF

Bien que l'impact pronostique de la MRD par cytométrie en flux dans les LAM est largement documenté dans la littérature (47,70,71), elle n'a jamais été évaluée après calcul par méthode multivariée non supervisée de type FlowSOM. Nous avons mesuré la MRD dans notre cohorte de 155 patients LAM traités par chimiothérapie intensive 3+7 avec le tube LAIP en post-induction (J35). Les résultats obtenus montrent que 95 patients (61%) ont une MRD LAIP négative et 60 patients (39%) ont une MRD LAIP positive, aux seuils de 0,1%, établi par l'ELN (39) et en respectant un pourcentage d'évènements positifs au moins 2 fois supérieurs à celui des moelles normales comme déjà décrit (64). Les patients avec une MRD LAIP positive ont une survie sans évènement diminuée par rapport aux patients avec une MRD LAIP négative (médiane de survie de 7,1 contre 25,1 mois, log-rank test $p < 0.0001$) (Figure 28). Dans un modèle statistique multivarié de Cox, la MRD LAIP+ sort comme un facteur indépendant de pronostic (hazard ratio 3,36, $p < 0.0001$) (Tableau16).

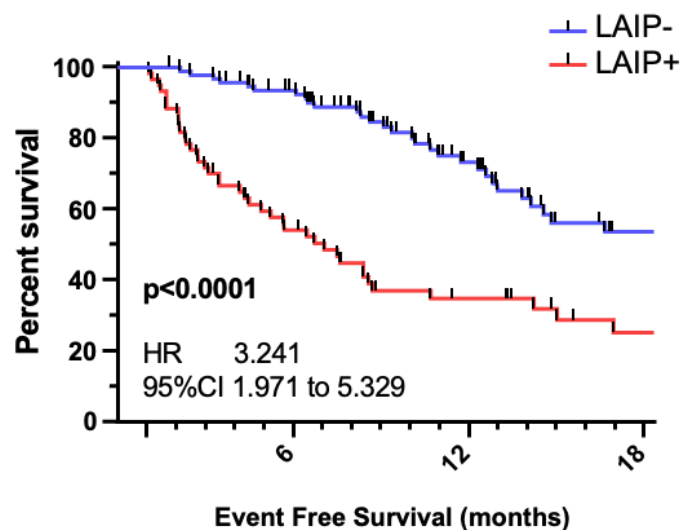


Figure 28 : Survie sans évènement en fonction du résultat de MRD LAIP post-induction.

Tableau 16 : Analyse multivariée de Cox avec les paramètres pronostiques des LAM et de la MRD LAIP pour la survie sans évènement.

_t	Haz. Ratio	Std. Err.	z	P>z	[95% Conf.	Interval]
Age>60y	1.380781	.3317974	1.34	0.179	.8621518	2.211393
MRD LAIP+	3.358513	.8455863	4.81	0.000	2.05039	5.5012
MRC1	.5021133	.2759473	-1.25	0.210	.1710036	1.474342
MRC3	1.010376	.1019229	0.10	0.918	.8291193	1.231258
FLT3-ITD	.9428096	.0720037	-0.77	0.441	.8117393	1.095044
NPM1ex12	.8494494	.2691777	-0.51	0.607	.4564619	1.580777
DNMT3Aex23	1.880858	.6210899	1.91	0.056	.9846356	3.59283
Status	2.527775	.7452679	3.15	0.002	1.41833	4.505049
dysmyelo	.9604242	.2496482	-0.16	0.877	.5770398	1.598529
WBC>50GL	1.31647	.392899	0.92	0.357	.7334504	2.362931

Suivre la MRD selon le phénotype cellule souche a déjà été décrit dans la LAM (68), mais il n'existe pas de seuils décisionnels pour l'analyse par FlowSOM. Afin de déterminer la meilleure façon de classer les patients, nous avons regardé la MRD HSPC exprimée en pourcentage des CD34+, en taux par rapport au diagnostic et en taux par rapport aux cellules normales dans le groupe LAIP- et le groupe LAIP+. Dans les 3 cas, les valeurs de MRD HSPC étaient différentes entre les 2 groupes, avec des aires sous les courbes ROC similaires (Figure 29). Pour la suite de l'étude, nous avons donc sélectionné un taux de cellules positives supérieur à 2 fois celui des cellules normales et un seuil supérieur à 0,6% pour définir une MRD HSPC positive (les 2 meilleurs seuils déterminés par les 2 meilleures courbes ROC).

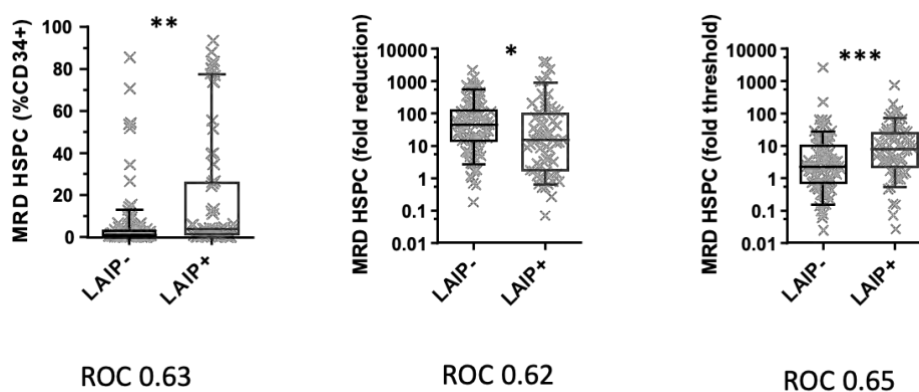


Figure 29 : Choix des seuils décisionnels pour la MRD HSPC.

Afin d'évaluer l'impact pronostique de la MRD HSPC, nous l'avons calculée dans notre cohorte de 155 patients. 72 patients avaient une MRD HSPC négative (46%) et 82 d'entre eux avaient une MRD HSPC positive (54%). Les patients avec une MRD HSPC positive ont une survie sans évènement diminuée par rapport aux patients avec une MRD HSPC négative (médiane de survie de 13 contre 21,9 mois, log-rank test $p=0.015$) (Figure 30). Dans un modèle statistique multivarié de Cox, seule la mutation de DNMT3A et le statut de la LAM sortent comme des facteurs indépendants du pronostic (Tableau 17). La MRD HSPC positive a un hazard ratio de 1,68 et reste à la limite de la significativité statistique ($p=0.058$).

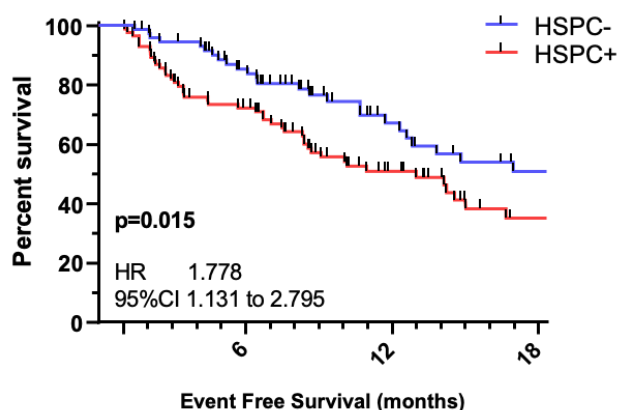


Figure 30 : Évaluation de la MRD avec le tube HSPC post-induction par méthode multivariée supervisée.

Tableau 17 : Analyse multivariée de Cox avec les paramètres pronostiques des LAM et de la MRD HSPC pour la survie sans évènement.

_t	Haz. Ratio	Std. Err.	z	P>z	[95% Conf.	Interval]
Age>60y	1.237268	.2993515	0.88	0.379	.7700512	1.987963
MRD HSPC+	1.624812	.4163163	1.89	0.058	.9833422	2.684736
MRC1	.6586673	.3695348	-0.74	0.457	.2193376	1.977968
MRC3	1.081693	.1054491	0.81	0.421	.8935615	1.309434
FLT3-ITD	.9328248	.0740551	-0.88	0.381	.7984081	1.089871
NPM1ex12	.6754514	.2122613	-1.25	0.212	.3648406	1.250504
DNMT3Aex23	1.90053	.6197678	1.97	0.049	1.002988	3.601254
Status	2.237539	.6437754	2.80	0.005	1.273111	3.932555
dysmyelo	1.113615	.2833127	0.42	0.672	.6763676	1.833529
WBC>50GL	1.58472	.4772544	1.53	0.126	.878223	2.859569

Compte tenu de la différence de pronostic entre les mesures de la MRD LAIP et HSPC (72) et connaissant les différences déjà décrites dans la littérature entre les valeurs pronostiques de la MRD mesurée par cytométrie en flux et par biologie moléculaire (73,74), nous nous sommes demandés si ces deux méthodes ne devaient pas être associées. Dans notre cohorte de 155 patients, 53 (34,2%) étaient négatifs en MRD LAIP et HSPC, 41 (26,5%) étaient positifs en MRD LAIP et HSPC, 19 (12,3%) étaient positifs uniquement en MRD LAIP et 42 (27,1%) étaient positifs uniquement en MRD HSPC. Nous avons donc classé les patients de la cohorte en 3 groupes selon les résultats des MRD par cytométrie en flux post-induction : LAIP- et HSPC-, LAIP+ ou HSPC+, LAIP+ et HSPC+.

Les patients avec des MRD LAIP et HSPC positives ont une survie sans évènement diminuée par rapport aux deux autres groupes (médiane de survie de 7,5 mois contre 14,6 mois pour les patients MRD LAIP+ ou HSPC+ et 32,9 mois pour les patients MRD LAIP-HSPC-, log-rang test $p < 0.0001$) définissant ainsi un groupe de mauvais pronostic dès la post-induction (Figure 31). Dans un modèle statistique multivarié de Cox, la MRD LAIP+HSPC+ sort comme un facteur indépendant de mauvais pronostic (hazard ratio 2,21, $p = 0.007$) alors que la MRD LAIP-HSPC- sort comme un facteur indépendant de bon pronostic (hazard ratio 0,49, $p = 0.035$), toujours en association avec le statut de la LAM et la présence de la mutation de *DNMT3A* (Tableau 18).

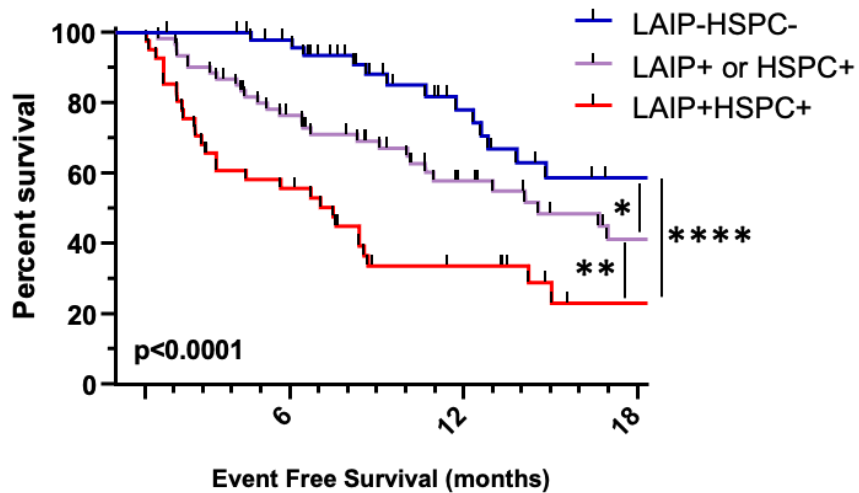


Figure 31 : Évaluation de la MRD avec les tubes LAIP et HSPC post-induction par méthode multivariée supervisée.

Tableau 18 : Analyse multivarié de Cox avec les paramètres pronostiques des LAM et de la MRD LAIP et HSPC pour la survie sans évènement.

_t	Haz. Ratio	Std. Err.	z	P>z	[95% Conf. Interval]
Age>60y	1.183921	.2857864	0.70	0.484	.7376517 1.900177
LAIP_HSPC_neg	.4899643	.1656979	-2.11	0.035	.2525236 .9506636
LAIP_HSPC_pos	2.207734	.6537309	2.67	0.007	1.235657 3.944533
MRC1	.687898	.3855747	-0.67	0.504	.2293062 2.063632
MRC3	1.034763	.1037067	0.34	0.733	.8502197 1.259362
FLT3-ITD	.9398354	.0814089	-0.72	0.474	.7930863 1.113738
NPM1ex12	.8825015	.2899933	-0.38	0.704	.4634549 1.680442
DNMT3Aex23	2.074285	.6879789	2.20	0.028	1.082805 3.973624
Status	2.465709	.727819	3.06	0.002	1.382571 4.397404
dysmyelo	1.042982	.2680111	0.16	0.870	.6302995 1.725865
WBC>50GL	1.38563	.4247246	1.06	0.287	.7598644 2.526727

B. Évaluation des marqueurs immunophénotypiques

Comme les mesures de la MRD se font par cytométrie en flux nous nous sommes demandés si le phénotype des blastes pouvait avoir un impact sur la capacité de la méthode à détecter les cellules résiduelles chimiorésistantes. Afin de répondre à cette question, nous avons regardé l'expression des marqueurs utilisés dans les panels d'immunophénotypage.

Le panel LAIP est composé de 8 marqueurs (Figure 32). Parmi ceux-ci, on observe que le CD13 est moins exprimé par les blastes chimiorésistants MRD LAIP+HSPC+ (moyenne : 77% contre 84% pour MRD LAIP+ ou HSPC+, $p=0.01$ et 87% pour MRD LAIP-HSPC-, $p=0.03$), et que le CD56 est plus exprimé par les blastes chimiorésistants MRD LAIP+HSPC+ (moyenne : 34% contre 27% pour MRD LAIP+ ou HSPC+, $p=0.03$ et 21% pour MRD LAIP-HSPC-, $p=0.002$).

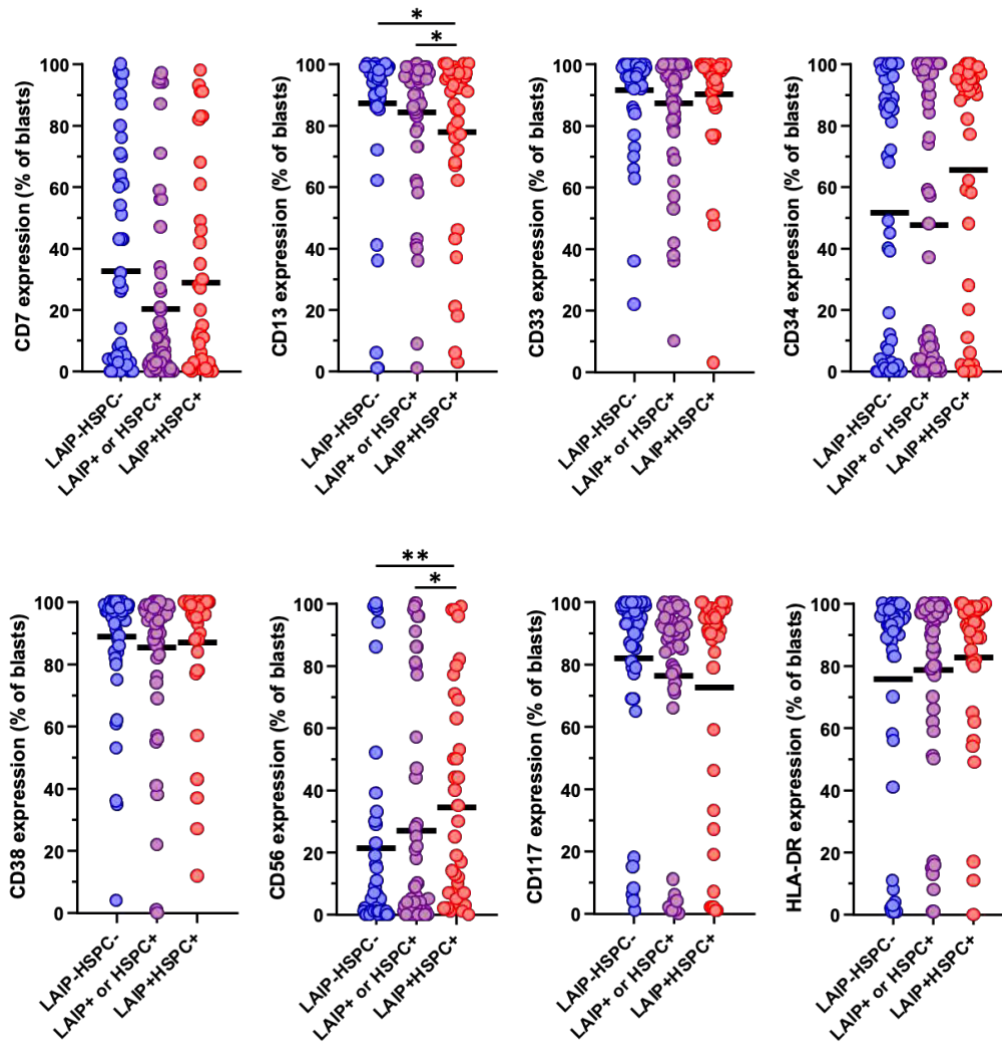


Figure 32 : Expression des marqueurs utilisés dans le panel LAIP par les blasts.

L'utilisation de marqueurs spécifiques des cellules leucémiques chimiorésistantes est un élément important conditionnant l'efficacité de la méthode d'analyse multivariée par clusterisation de type FlowSOM. Dans cet optique, nous avons étudié l'expression de 8 marqueurs mesurée au diagnostic de LAM mais non inclus dans les panels de MRD (Figure 33). Parmi ceux-là, le CD11b et le CD36 sont surexprimés dans les LAM chimiorésistantes. En particulier le CD36 est exprimé par 27% des blastes chimiorésistants (groupe MRD LAIP+ ou HSPC+ et MRD LAIP+HSPC+) contre 14% des blastes chimiosensibles (MRD LAIP-HSPC-).

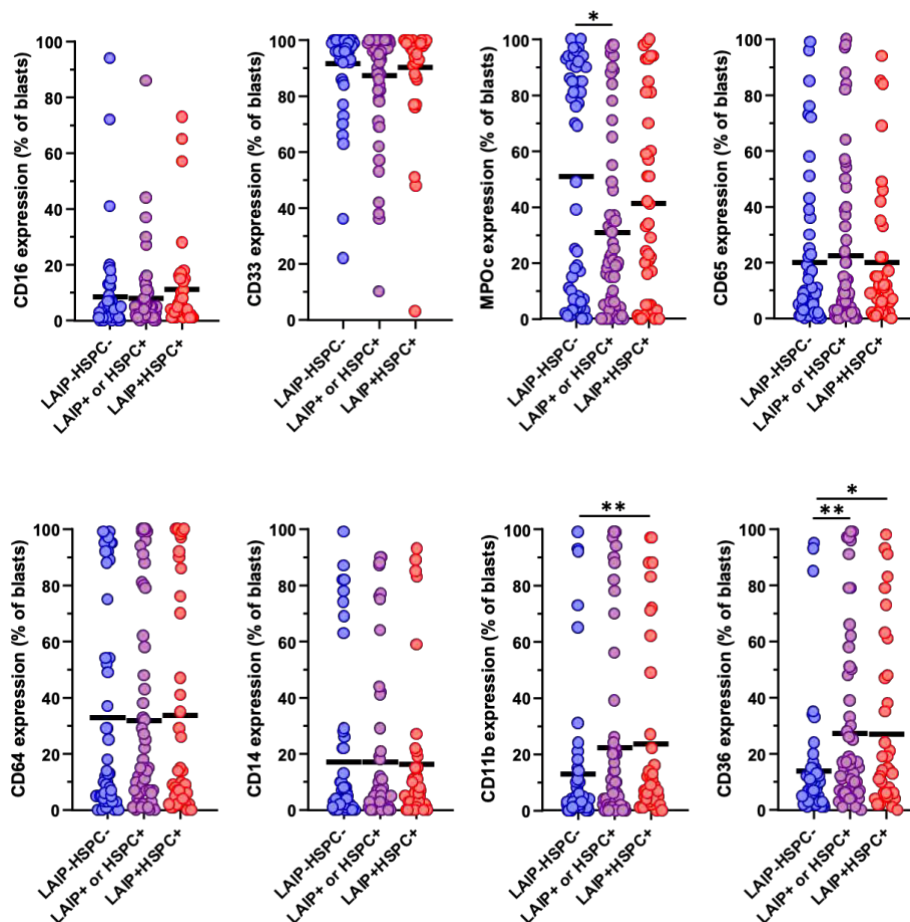


Figure 33 : Expression des marqueurs non utilisés dans nos panels par les blasts.

C. Etude bio-clinique des patients selon les différents groupes

Comme les critères classiques pronostiques des LAM (âge, caryotypie, mutations) ne sortaient pas de façon indépendante dans nos modèles statistiques multivariés, nous avons voulu étudier leurs liens avec la chimiorésistance des blasts ou des populations leucémiques progénitrices en post-induction. Une évaluation de ces différents marqueurs a été réalisée sur les trois groupes de MRD. Tout d'abord concernant l'âge, avec comme énoncé précédemment une médiane à 60 ans, aucune différence significative n'est observée entre les trois groupes (Figure 34). La distribution des différentes LAM selon la classification FAB ne révèle pas non plus de différences notables (Figure 35). Concernant les paramètres de la NFS il en est de même, le nombre de globules blancs (WBC) et le taux d'hémoglobine et la quantité de plaquettes (PLT count) sont statistiquement identiques dans les trois groupes (Figure 36). L'hémodilution du prélèvement médullaire (pouvant artificiellement négativer le résultat de la MRD LAIP) est également évaluée selon un ratio $CD34^{+}_{patient}/CD34^{+}_{NBM}$ (75), et ne montre pas de différences significatives entre les trois groupes et donc des qualités de prélèvement identiques (Figure 37).

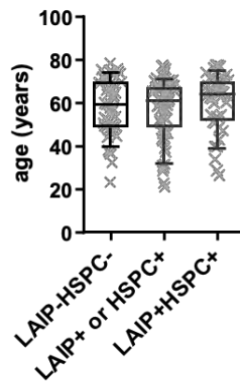


Figure 34 : Distribution en fonction de l'âge au sein des différents groupes de MRD.

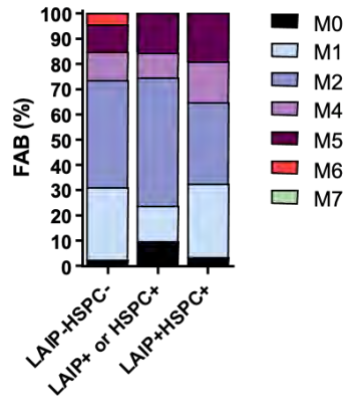


Figure 35 : Distribution en fonction de la classification FAB au sein des différents groupes de MRD.

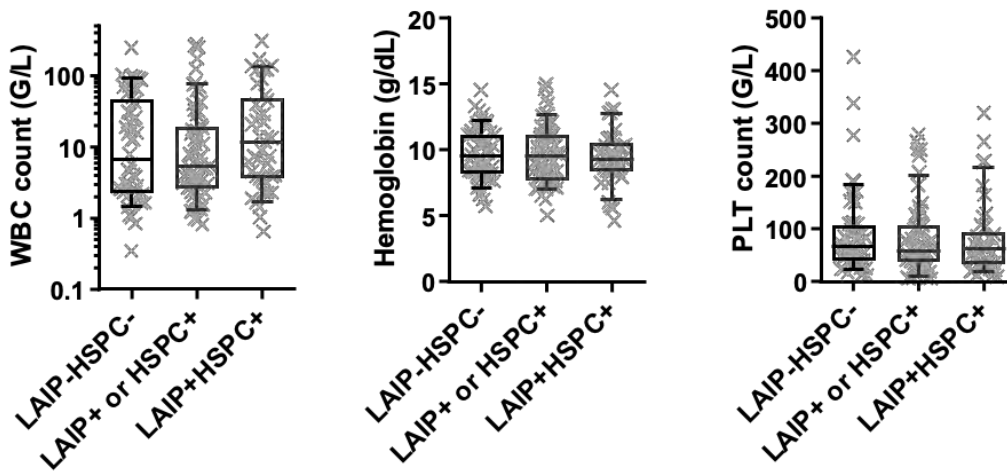


Figure 36 : Distribution en fonction des paramètres de la NFS au sein des différents groupes de MRD.

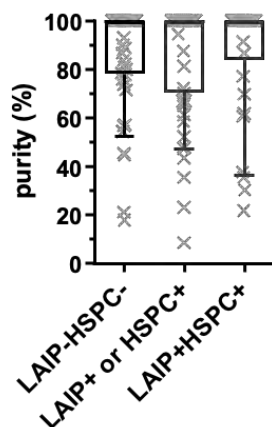


Figure 37 : Évaluation de l'hémodilution au sein des différents groupes de MRD.

D. Mise en relation avec la biologie moléculaire et la cytogénétique

Afin d'étudier les liens entre la chimiorésistance post-induction et les caractéristiques cytogénétiques et moléculaires des blastes, nous nous sommes concentrés sur 73 patients de notre cohorte (47%) possédant des données mutationnelles complètes sur 46 gènes par NGS et des données génétiques (Figure 38). La distribution des anomalies chez ces patients est représentative de ce qui est connue dans les LAM (76).

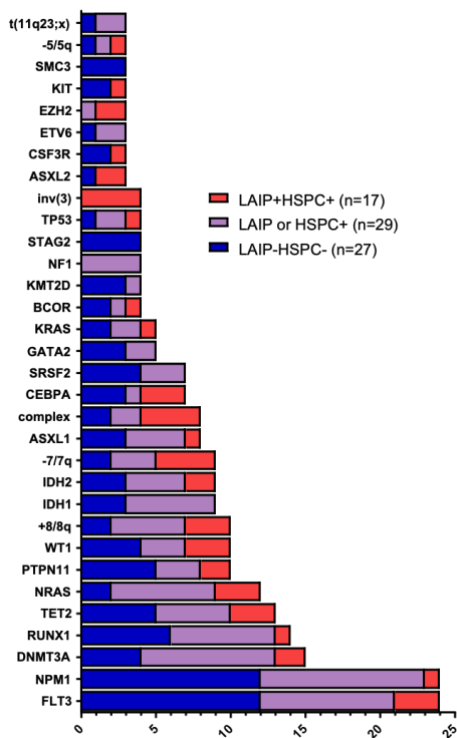


Figure 38 : Distribution des anomalies mutationnelle et cytogénétique, présentes chez au moins 3 patients au sein de notre cohorte.

En observant quelques anomalies spécifiques, on note que plusieurs profils se distinguent. Les mutations *NPM1* et *FLT3* sont très présentes dans la population MRD LAIP-HSPC-. Les mutations *DNMT3A* et *NRAS* sont plus fréquentes dans le groupe MRD LAIP+ ou HSPC+. Les anomalies génétiques *inv(3)* et *del7q* sont plus fréquentes dans le groupe MRD LAIP+HSPC+ (Figure 39).

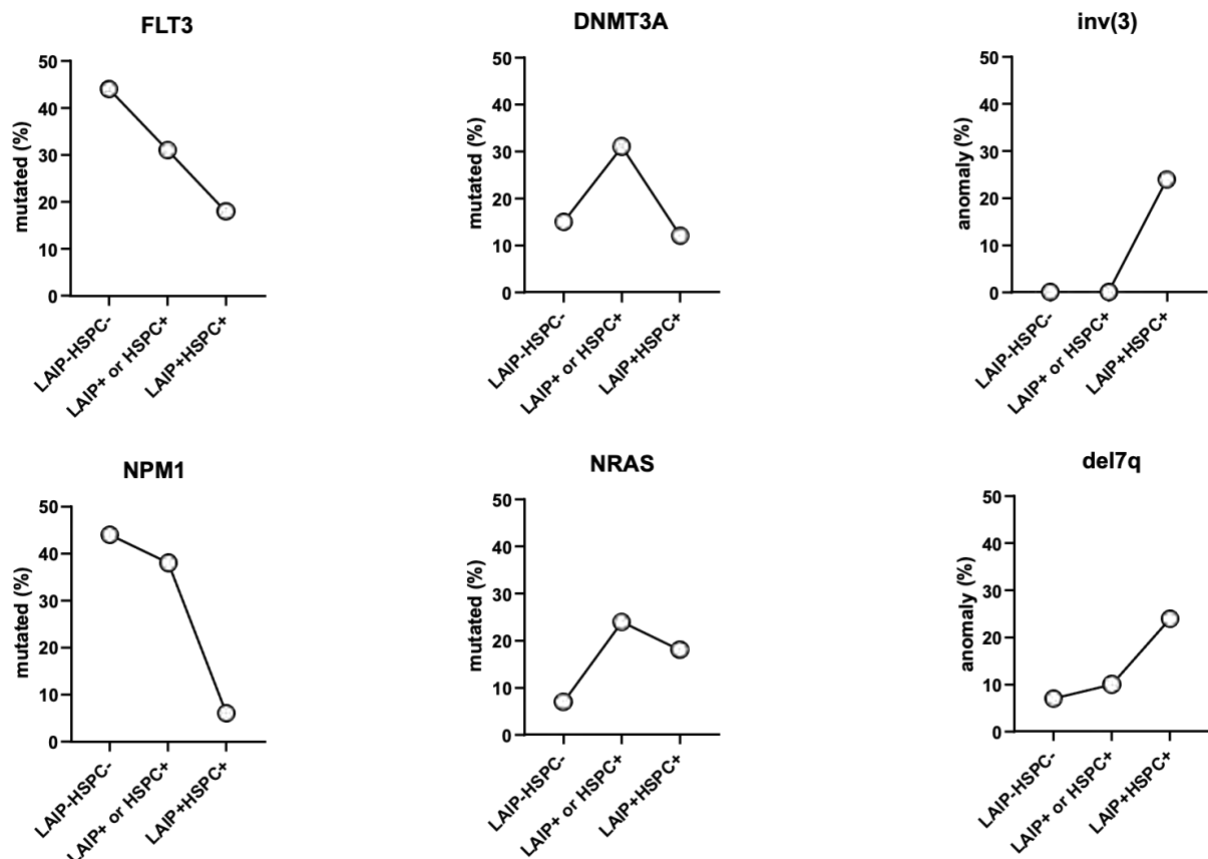


Figure 39 : Distribution de certaines anomalies selon les différents groupes de MRD.

Comme le lien direct entre les mutations et le profil de chimiorésistance post-induction n'est pas statistiquement mis en évidence dans notre cohorte, nous avons regroupés les anomalies selon 9 classes fonctionnelles définies par TCGA (76). Il est connu que l'émergence du clone leucémique est un processus séquentiel d'acquisition d'anomalies liée à ces 9 classes. De façon étonnante, dans notre cohorte, les patients chimiorésistants MRD LAIP+HSPC+ ont moins de classes mutées que les autres groupes (médiane 2, $p=0.0011$ vs MRD LAIP-HSPC- et $p=0.0067$ vs MRD LAIP+ ou HSPC+) (Figure 40). En regroupant ces anomalies par classe plusieurs observations se détachent (Figure 41). Précisément, le groupe des mutations du complexe cohesin sont associés au profil MRD LAIP-HSPC- ($p=0.0032$) et l'absence de la mutation *NPM1* avec le profil MRD LAIP+HSPC+ ($p=0.0072$).

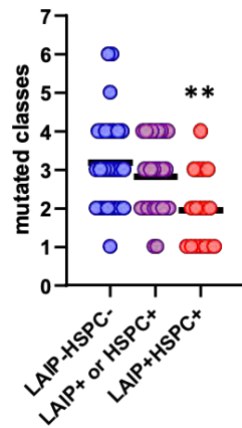


Figure 40 : Distribution selon le nombre de classes mutées des différents groupes de MRD.

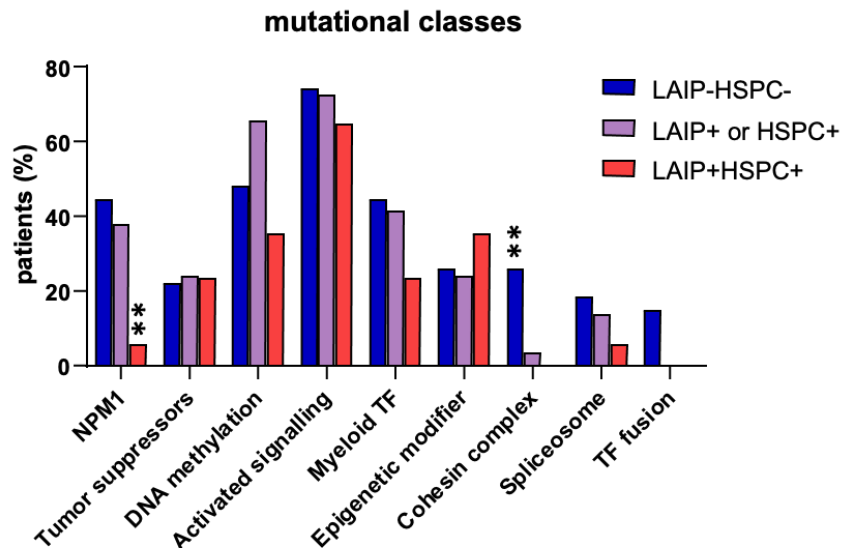


Figure 41 : Distribution selon les classes mutationnelles et les différents groupes de MRD.

Afin d'étudier les connexions entre les différentes classes de mutation et le profil de chimiorésistance, nous avons présenté nos résultats sous forme de diagramme de Circos (Figure 42).

Il y apparaît :

- Groupe LAIP-HSPC- : interaction entre les classes mutationnelles touchées importante, avec rôle central de NPM1.
- Groupe LAIP+ ou HSPC+ : co-occurrence de classes mutationnelles touchées moins importante, avec une place prépondérante des anomalies touchant la méthylation de l'ADN.
- Groupe LAIP+HSPC+ : co-occurrence de classes mutationnelles touchées plus limitée, avec un avec une place importante des anomalies épigénétiques.

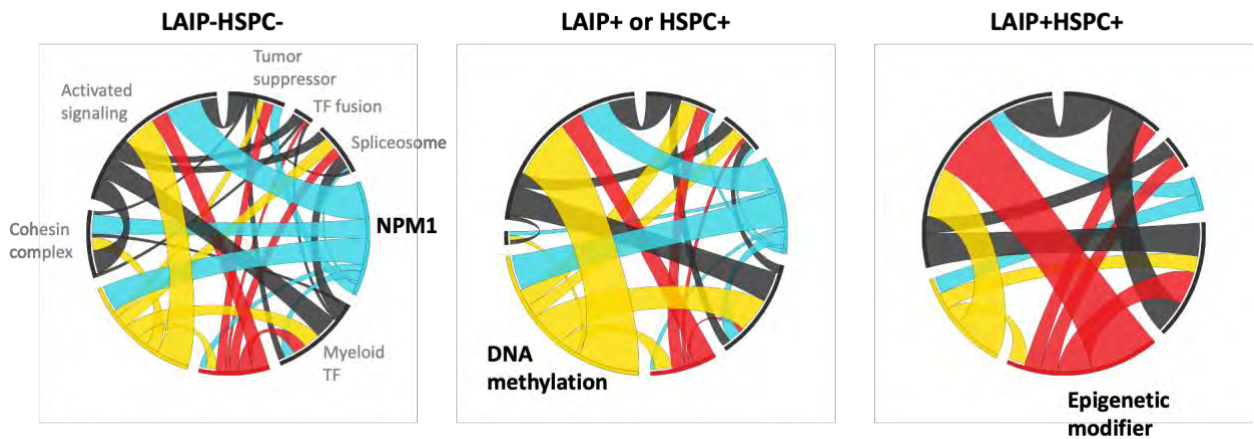


Figure 42 : Diagrammes de Circos selon les différents groupes de MRD.

E. Caractérisation du pool de cellules souches leucémiques au diagnostic

Compte tenu du rôle des cellules leucémiques dans la chimiorésistance des LAM (77) (78), nous avons voulu regarder le lien avec les différents profils de MRD (Figure 43). Les cellules souches leucémiques exprimant le CD34 et faiblement le CD38 sont plus fortement représentées au diagnostic dans le groupe MRD LAIP+HSPC+ que dans les deux autres (médiane 11,2% contre 2,5% pour les MRD LAIP-HSPC-, $p=0.024$ et 3,3% pour les MRD LAIP+ ou HSPC+, $p=0.075$). De même, les cellules chimiorésistantes CD34+CD36+ sont plus fréquentes au diagnostic dans le groupe MRD LAIP+HSPC+ que dans les deux autres (médiane 5,7% contre 2% pour les MRD LAIP-HSPC, $p=0.0021$ et 3,3% pour les MRD LAIP+ ou HSPC+, $p=0.043$).

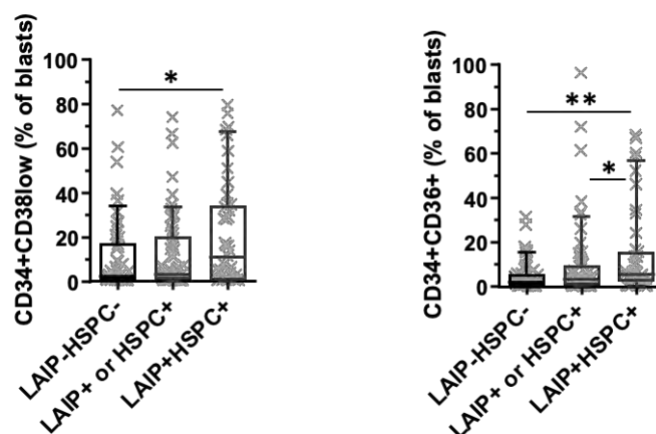


Figure 43 : Distribution des CSL au sein des différents groupes de MRD.

F. Émergence de deux profils

Pour résumer l'ensemble de nos données sur les profils de chimiorésistance évalués selon la MRD LAIP et HSPC en post-induction, il apparaît que les LAM de phénotype granulocytaire dont la leucémogénèse est moléculaire et possédant peu de cellules souches sont plus chimiosensibles. Sans que nos données soient assez puissantes statistiquement, elles mettent aussi en avant la place de 2 groupes de mutations : celles du complexe cohesin pour les MRD LAIP-HSPC- et celles de l'épigénétique pour les MRD LAIP+HSPC+ (Figure 44).

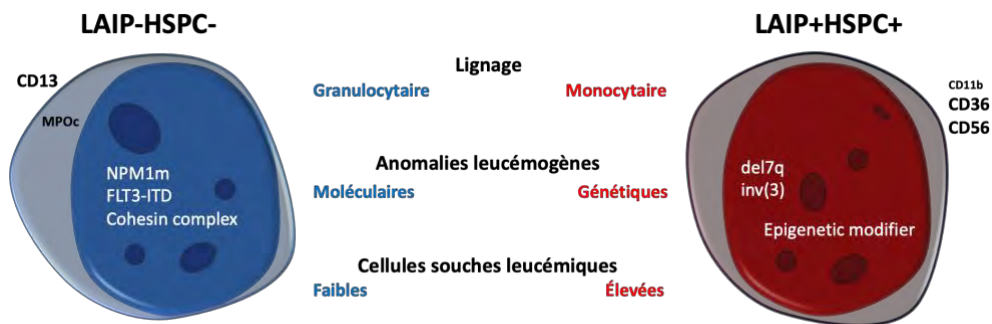


Figure 44 : Profils types obtenus au sein de la cohorte.

G. Patients avec une LAM avec *NPM1* muté

Au sein de notre cohorte l'anomalie la plus représentée est la mutation de *NPM1* (48 patients). Ce groupe est très intéressant puisqu'il représente un vrai défi pour notre stratégie de MRD par cytométrie en flux (LAM souvent monocyttaire, exprimant peu de CD34 et donc avec un contingent HSPC fortement réduit) et qu'il est suivi en MRD par biologie moléculaire. Nous nous sommes donc demandé quel pouvait être la place de la MRD par cytométrie en flux chez ces patients (Figure 45). Les résultats des profils de chimiorésistance des MRD LAIP et BioMol ont une bonne corrélation ($p < 0.0001$ au seuil de 0,1% et $p = 0.0047$ au seuil de 1% respectivement). A l'inverse, le panel HSPC ne donne pas de résultats significatifs ($p = 0,91$).

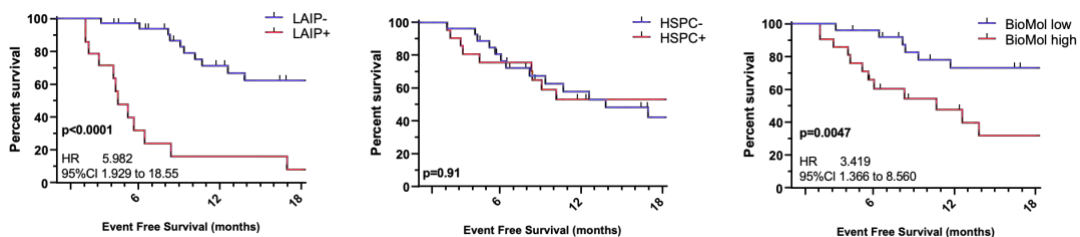


Figure 45: Évaluation des différentes méthodes de MRD chez les patients *NPM1* muté.

Compte tenu de ces résultats, nous avons associé les résultats de MRD LAIP et BioMol pour les patients de notre cohorte (Figure 46). La population positive pour les 2 techniques de MRD représente un groupe de patients de pronostic très défavorable (médiane de survie sans évènement de 4,2 mois, $p < 0.0001$) (Tableau 19).

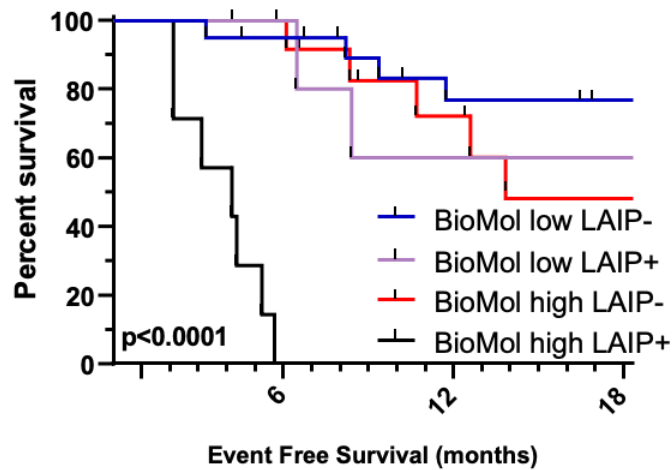


Figure 46 : Évaluation conjointe de la MRD LAIP et BioMol chez les patients *NPM1* muté.

Tableau 19 : Analyse multivarié de Cox avec les paramètres pronostiques des LAM et de la MRD LAIP et Biologie Moléculaire pour la survie sans évènements.

_t	Haz. Ratio	Std. Err.	z	P>z	[95% Conf.	Interval]
Age>60y	2.158017	1.293703	1.28	0.199	.6664552	6.987775
LAIP+	20.90439	15.5962	4.07	0.000	4.843722	90.21854
BioMol high	5.608157	4.092453	2.36	0.018	1.341748	23.44063
ITD	.7531818	.5024985	-0.42	0.671	.2037069	2.7848
DNMT3aex23	1.583359	.9192002	0.79	0.429	.5074865	4.940084
Status	.6843211	.631963	-0.41	0.681	.1119914	4.18153
dysmyelo	.8254566	.6089518	-0.26	0.795	.1944241	3.5046
WBC>50GL	1.871926	1.247844	0.94	0.347	.506838	6.913659

VIII. Discussion

Le défi de la MRD des LAM par cytométrie en flux est très important du fait de l'hétérogénéité de cette maladie, au diagnostic et au suivi. Dans ce travail, nous avons souhaité valider la pertinence clinique d'une double approche de calcul de la MRD par cytométrie en flux, sur les blastes totaux et sur le contingent plus immature CD34+. Pour cela, nous avons inclus dans notre étude 155 patients traités de façon homogène, par chimiothérapie intensive et tous suivis en post-induction.

À ce point de suivi précoce, les résultats obtenus dans notre cohorte pour la MRD LAIP sont très satisfaisants, comme déjà publié dans la littérature. L'analyse avec une méthode multivariée de clusterisation de type FlowSOM n'apporte pas d'avantages sur la détection de la MRD, dans ce cadre, mais facilite grandement l'homogénéisation du rendu des résultats (phase de normalisation des données, suivi au cours du temps avec la référence du diagnostic, aide informatique au choix du LAIP/DfN). La rapidité avec laquelle l'analyse est produite est aussi un élément déterminant dans son applicabilité au sein d'un laboratoire de cytométrie en flux. Il est évident que la puissance de la clusterisation est largement dépendante du choix des anticorps du panel. À ce titre, nous avons mis en évidence que les marqueurs CD13 et CD56 étaient différenciellement exprimés entre les LAM détectables et non détectables. Même si ces marqueurs font partis des profils classiques LAIP/DfN et donc peuvent influencer notre capacité à détecter les cellules résiduelles lorsqu'ils sont fortement exprimés, ils semblent quand même être aussi liés à la chimiorésistance intrinsèque des LAM, et donc ne pas représenter un biais analytique. En effet Raspadori et al (79) ont montré que l'expression des CD56 dans les LAM était associée à une survie raccourcie et à une probabilité faible d'atteindre une rémission complète.

L'équipe hollandaise de Shuurhuis a beaucoup travaillé sur la MRD de type HSPC (80). En parallèle, notre équipe a aussi montré l'importance des cellules souches leucémiques dans la chimiorésistance des LAM (78). L'approche MRD HSPC est donc appropriée pour prédire la réponse thérapeutique des patients. Les résultats de notre étude sur le calcul de la MRD HSPC semblent toutefois montrer le contraire avec une absence de différence statistique significative dans notre modèle de Cox multivarié. Plusieurs raisons pourraient expliquer ce résultat :

- Notre panel ne comporte pas de marqueurs forts de CSL (comme CLL-1, TIM3 ou CALCRL) mais repose essentiellement sur une approche DfN avec des marqueurs de l'hématopoïèse normale (CD135, CD133, CD45RA), ce qui pourrait être insuffisant pour un suivi aussi précoce que le J35 post-induction.

- Nous avons inclus dans notre calcul de MRD HSPC, l'ensemble des sous-populations souches et progénitrices CD34+, quel que soit leur niveau d'expression du CD38.
- Nous montrons que dans les LAM *NPM1* muté, l'impact pronostique d'une MRD calculée uniquement sur les CD34+ est faible. Ces LAM sont majoritairement CD34- et leurs cellules souches leucémiques sont retrouvées dans le compartiment CD34- (81). Il est donc possible que cette approche ne soit pas adaptée à ce sous-groupe de LAM. Ces patients représentent 31% de notre cohorte (48/155) et peuvent donc minorer l'impact de la MRD HSPC dans les LAM.
- Les cellules immatures HSPC sont impliquées dans la chimiorésistance et les rechutes des patients LAM. Le suivi médian de notre cohorte n'est que de 355 jours, ce qui peut être trop court pour observer l'impact pronostique de la MRD HSPC.
- Nous avons suivi la MRD précoce en post-induction, uniquement, afin d'avoir une cohorte de patients homogène. Il est possible que ce point de suivi ne soit pas adapté à la cinétique de réponse au traitement de la sous-population souche leucémique.

Notre étude des marqueurs immunophénotypiques exprimés par les LAM MRD LAIP+HSPC+ met en avant le CD36. Ce récepteur membranaire aux acides gras est très intéressant dans la LAM puisqu'il est impliqué dans le métabolisme lipidique et la chimiorésistance des cellules souches leucémiques (82). En effet, selon Ye et al, les CSL CD36+ sécrètent des cytokines inflammatoires permettant la lipolyse des adipocytes. La libération d'acides gras et leur récupération grâce au CD36 permet leur utilisation par les CSL comme une source d'énergie supplémentaire qui est normalement peu présente dans la moelle.

La classification des patients selon leur profil de chimiorésistance révèle des profils cytogénétique et mutationnel différents.

Si l'inv(3) et la del7q sont connus pour conférer au clone leucémique un caractère chimiorésistant, notre étude souligne le rôle potentiel des mutations du groupe des modificateurs épigénétiques (*ASXL1*, *ASLEX2*, *EZH2*, *KDM5A*, *KDM6A*, *KMT2D*). Il est à noter qu'*ASXL1* et *EZH2*, les deux mutations de ce groupe les plus fréquentes dans notre cohorte, font partie des anomalies moléculaires retrouvées dans les LAM secondaires (22). De même l'inv(3) et la del7q font partie des anomalies cytogénétiques LAM-MRD. Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de la MRD spécifiquement dans le sous-groupe des LAM secondaires et MRC, décrites comme chimiorésistantes.

La mutation *NPM1* est, comme attendu, plus fréquente dans le groupe des patients chimiosensibles (MRD LAIP-HSPC-). Le rôle des mutations du complexe cohesin (*RAD21*, *SMC1A*, *SMC3*, *STAG2*) est quant à lui, plus surprenant. Il a cependant été récemment rapporté par Tothova et al (83) que les

blastest présentant des mutations du complexe cohesin sont dépendant des éléments permettant la réplication et la réparation des dommages de l'ADN. Ces mutations leur confèrent par conséquent une chimiosensibilité aux inhibiteurs de PARP (poly ADP-ribose polymerase). Ces résultats vont dans le sens de ceux de notre étude et poussent pour étudier l'impact de ces anomalies dans des cohortes de patients plus larges.

L'impact pronostique de la MRD HSPC est en deçà de nos attentes. Une augmentation du seuil de sensibilité du fait de la présence d'une hématopoïèse classique résiduelle, de régénération post-induction, est possible. De plus, la caractérisation du pool de cellules souches leucémiques au diagnostic montrent que les patients du groupe MRD LAIP+HSPC+ possèdent plus de cellules CD34+CD38-. La réanalyse du phénotype HSPC sur le versant cellule souche, pourrait permettre d'obtenir de meilleurs résultats. L'ajout de marqueurs spécifiques des cellules souches pourraient être aussi un moyen d'améliorer la sensibilité de cette MRD (84).

La durée du suivi, avec une médiane à 355 jours, représente une limite à l'exploitation des données de cette étude. Notre tube LAIP montre de bons résultats pour chimiorésistance précoce post-induction mais il faudra aussi l'évaluer sur le long terme. Pour le tube HSPC, les résultats ne sont pas aussi probants que ce qui était envisagé au départ, mais le suivi court n'exclut pas un impact de cette MRD sur la survenue d'évènements tardifs.

La présence de la mutation *DNMT3A* comme un facteur indépendant dans l'évaluation de la chimiorésistance précoce post-induction peut paraître surprenante. Néanmoins, cette mutation est connue pour assombrir le pronostic des LAM *NPM1* muté (85). Ce groupe de patients reste très intéressant à cibler car les origines de leur chimiorésistance ne sont pas élucidées (hématopoïèse clonale (86), échappement immunologique (87) ou hypométhylation de l'ADN (88)).

Un suivi de la MRD en fonction de la chimiothérapie reçue par le patient peut s'avérer intéressante. En effet l'utilisation du traitement Venetoclax-Azacitidine est sensé réduire le pool de cellules souches leucémiques (89). Il serait donc intéressant d'observer le comportement des MRD de nos tubes LAIP et HSPC chez cette population et celle traitée par chimiothérapie classique, la MRD HSPC ciblant principalement les cellules immatures pourrait être impactée. Selon l'étude préliminaire de DiNardo et al (90), les patients ayant reçu Venetoclax-Azacitidine atteignent une rémission complète dans 73% des cas. Il serait utile d'évaluer la MRD par cytométrie en flux pour comparer une population ayant reçu cette chimiothérapie avec une population en ayant reçu une différente.

IX. Conclusion

L'utilisation de méthode multivariée de clusterisation de type FlowSOM permet le rendu de MRD LAM en routine sur un grand nombre de patients en facilitant l'analyse et également en l'homogénéisant. En effet la méthode est reproductible entre opérateurs, et de ce fait permet d'harmoniser le rendu de résultat lors des différents points de suivi.

La MRD LAM par cytométrie en flux montre un fort impact pronostique. Nos résultats montrent que l'utilisation de la MRD HSPC est utile, en association avec la MRD LAIP et peut certainement être améliorée. Le panel LAIP, quant à lui, montre de bons résultats utilisé seul, mais possède un impact pronostic d'autant plus fort quand il est associé au résultat de la biologie moléculaire.

L'utilisation de nouveaux marqueurs, dans des cohortes de patients traitées par de nouvelles thérapies, va certainement bouleverser l'utilisation de l'outil MRD par cytométrie en flux et nécessiter de nombreuses autres études.

Bibliographie

1. Delhommeau F, Najman A. Hématopoïèse normale et sa régulation. 2019;18.
2. Mikkola HKA, Orkin SH. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development*. 1 oct 2006;133(19):3733-44.
3. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. nov 2007;131(5):861-72.
4. Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, Flygare J, Lodish HF. From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood*. 8 déc 2011;118(24):6258-68.
5. Kaushansky K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood*. 1 févr 2008;111(3):981-6.
6. Manz MG, Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol*. mai 2014;14(5):302-14.
7. Gauvreau GM, Ellis AK, Denburg JA. Haemopoietic processes in allergic disease: eosinophil/basophil development. *Clinical & Experimental Allergy*. sept 2009;39(9):1297-306.
8. Huang H, Li Y. Mechanisms Controlling Mast Cell and Basophil Lineage Decisions. *Curr Allergy Asthma Rep*. sept 2014;14(9):457.
9. Iwasaki H, Somoza C, Shigematsu H, Duprez EA, Iwasaki-Arai J, Mizuno S, et al. Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood*. 1 sept 2005;106(5):1590-600.
10. Ferrando AA, López-Otín C. Clonal evolution in leukemia. *Nat Med*. oct 2017;23(10):1135-45.
11. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer*. 1 nov 2006;107(9):2099-107.
12. Bories P. Épidémiologie des leucémies aiguës myéloïdes. *Horizon hémato*. oct 2018. 8(4).
13. Le Guyader-Peyrou S, Defosse G, Dantony E, Mounier M, Cornet E, Uhry Z, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 2 – Hémopathies malignes. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Saint-Maurice (Fra) : Santé publique France, 2019. 169 p. Disponible à partir des URL : <http://www.santepubliquefrance.fr/>
14. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. juill 1997;3(7):730-7.
15. Costello R, Venton G, Colle J, Ivanov V, Mercier C, Delassus L et Baccini V (Article 13-018-G-50), Leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte, Elsevier Masson, coll. « EMC / Hématologie », 2018;13:18-G-50

16. Les leucémies aiguës. In : Ifrah N, Maynadié M, authors. Hématologie. 3^e ed. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson ; 2018 (Les référentiels des Collèges)
17. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 26 janv 2017;129(4):424-47.
18. Luquet I. Place de la cytogénétique dans le diagnostic des leucémies aiguës myéloïdes. *Revue Francophone des Laboratoires*. avr 2015;2015(471):43-9.
19. Bennett JM. Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia: A Report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. 1 oct 1985;103(4):620.
20. Weltgesundheitsorganisation. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th edition. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., éditeurs. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. 585 p. (World Health Organization classification of tumours).
21. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer Journal*. juill 2016;6(7):e441-e441.
22. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman PV, Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 26 févr 2015;125(9):1367-76.
23. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. févr 2014;28(2):241-7.
24. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Reviews*. juill 2019;36:70-87.
25. Haute Autorité de Santé ALD n°30 – Guide médecin sur la leucémie aiguë myéloïde de l'adulte. [Internet]. [cité le 10 juin 2021]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_1216166/fr/ald-n-30-leucemie-aigue-de-l-adulte
26. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 21 janv 2010;115(3):453-74.
27. Sweeney C, Vyas P. The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. *Front Oncol*. 19 nov 2019;9:1217.
28. DiNardo CD, Wei AH. How I treat acute myeloid leukemia in the era of new drugs. *Blood*. 9 janv 2020;135(2):85-96.
29. Rowley T. Flow Cytometry - A Survey and the Basics. *MATER METHODS* [Internet]. 9 août 2012 [cité 23 juill 2021];2. Disponible sur: <http://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html>
30. Givan AL. Flow cytometry: first principles. New York: Wiley-Liss; 2010.

31. Costopoulos M, Garff-Tavernier ML. Immunophénotypage des hémopathies malignes par cytométrie en flux. 2019;16.
32. Lees O, Béné M-C, Groupe d'Étude Immunologique des Leucémies. Immunophénotypage des leucocytes: clusters de différenciation humains : application à la caractérisation des hémopathies. Paris: Biotem Éditions; 1998.
33. Wood B. Multicolor Immunophenotyping: Human Immune System Hematopoiesis. In: Methods in Cell Biology [Internet]. Elsevier; 2004 [cité 23 juill 2021]. p. 559-76. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X04750232>
34. Gorczyca W, Sun Z-Y, Cronin W, Li X, Mau S, Tugulea S. Immunophenotypic Pattern of Myeloid Populations by Flow Cytometry Analysis. In: Methods in Cell Biology [Internet]. Elsevier; 2011 [cité 23 juill 2021]. p. 221-66. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123854933000103>
35. Ferial J. Interprétation de l'hémogramme. John Libbey Eurotext ; 2020
36. Arnoulet C, Béné MC, Durrieu F, Feuillard J, Fossat C, Husson B, et al. 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. Cytometry. 2009;9999B:NA-NA.
37. Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. Leukemia. avr 2011;25(4):567-74.
38. Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA, Schuurhuis GJ. Review of the relevance of aberrant antigen expression by flow cytometry in myeloid neoplasms. British Journal of Haematology. mai 2011;153(4):421-36.
39. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné M-C, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. Blood. 22 mars 2018;131(12):1275-91.
40. Van der Maaten. Visualizing data using t-SNE. Journal of Machine Learning Research 9 (2008) 2579-2605 .pdf.
41. Amir ED, Davis KL, Tadmor MD, Simonds EF, Levine JH, Bendall SC, et al. viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. Nat Biotechnol. juin 2013;31(6):545-52.
42. Qiu P, Simonds EF, Bendall SC, Gibbs KD, Bruggner RV, Linderman MD, et al. Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with SPADE. Nat Biotechnol. oct 2011;29(10):886-91.
43. Levine JH, Simonds EF, Bendall SC, Davis KL, Amir ED, Tadmor MD, et al. Data-Driven Phenotypic Dissection of AML Reveals Progenitor-like Cells that Correlate with Prognosis. Cell. juill 2015;162(1):184-97.

44. Bruggner RV, Bodenmiller B, Dill DL, Tibshirani RJ, Nolan GP. Automated identification of stratifying signatures in cellular subpopulations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1 juill 2014;111(26):E2770-7.
45. Van Gassen S, Callebaut B, Van Helden MJ, Lambrecht BN, Demeester P, Dhaene T, et al. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data: FlowSOM. *Cytometry*. juill 2015;87(7):636-45.
46. Weber LM, Robinson MD. Comparison of clustering methods for high-dimensional single-cell flow and mass cytometry data: Comparison of High-Dim. *Cytometry Clustering Methods*. *Cytometry*. déc 2016;89(12):1084-96.
47. Terwijn M, van Putten WLJ, Kelder A, van der Velden VHJ, Brooimans RA, Pabst T, et al. High Prognostic Impact of Flow Cytometric Minimal Residual Disease Detection in Acute Myeloid Leukemia: Data From the HOVON/SAKK AML 42A Study. *JCO*. 1 nov 2013;31(31):3889-97.
48. Ravandi F. Relapsed acute myeloid leukemia: Why is there no standard of care? *Best Practice & Research Clinical Haematology*. sept 2013;26(3):253-9.
49. Bewersdorf JP, Shallis RM, Boddu PC, Wood B, Radich J, Halene S, et al. The minimal that kills: Why defining and targeting measurable residual disease is the “Sine Qua Non” for further progress in management of acute myeloid leukemia. *Blood Reviews*. sept 2020;43:100650.
50. Preudhomme C. Place de la maladie résiduelle dans la prise en charge des leucémies aiguës myéloïdes. 2019;25:14.
51. Freireich EJ, Cork A, Stass SA, McCredie KB, Keating MJ, Estey EH, et al. Cytogenetics for detection of minimal residual disease in acute myeloblastic leukemia. *Leukemia*. juin 1992;6(6):500-6.
52. Fröhling S, Skelin S, Liebisch C, Scholl C, Schlenk RF, Döhner H, et al. Comparison of Cytogenetic and Molecular Cytogenetic Detection of Chromosome Abnormalities in 240 Consecutive Adult Patients With Acute Myeloid Leukemia. *JCO*. 15 mai 2002;20(10):2480-5.
53. Ghannam J, Dillon LW, Hourigan CS. Next-generation sequencing for measurable residual disease detection in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. janv 2020;188(1):77-85.
54. Winters A, Goosman M, Stevens BM, Purev E, Smith C, Pollyea DA, et al. Tracking of AML-Associated Mutations Via Droplet Digital PCR Is Predictive of Outcomes Post-Transplant. *Blood*. 29 nov 2018;132(Supplement 1):2138-2138.
55. Bill M, Grimm J, Jentzsch M, Kloss L, Goldmann K, Schulz J, et al. Digital droplet PCR-based absolute quantification of pre-transplant NPM1 mutation burden predicts relapse in acute myeloid leukemia patients. *Ann Hematol*. oct 2018;97(10):1757-65.
56. Hourigan CS, Karp JE. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol*. août 2013;10(8):460-71.

57. 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.* juin 2008;129(6):934-45.
58. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N Engl J Med.* 4 févr 2016;374(5):422-33.
59. Scholl C, Schlenk RF, Eiwien K, Döhner H, Fröhling S, Döhner K. The prognostic value of MLL-AF9 detection in patients with t(9;11)(p22;q23)-positive acute myeloid leukemia. :9.
60. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for “prime time”? *Blood.* 27 nov 2014;124(23):3345-55.
61. Voskova D, Schoch C, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. Stability of leukemia-associated aberrant immunophenotypes in patients with acute myeloid leukemia between diagnosis and relapse: Comparison with cytomorphologic, cytogenetic, and molecular genetic findings. *Cytometry.* nov 2004;62B(1):25-38.
62. Papadaki C, Dufour A, Seibl M, Schneider S, Bohlander SK, Zellmeier E, et al. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor. *Br J Haematol.* févr 2009;144(4):517-23.
63. Höllein A, Nadarajah N, Meggendorfer M, Jeromin S, Kern W, Haferlach C, et al. Molecular characterization of AML with RUNX1-RUNX1T1 at diagnosis and relapse reveals net loss of co-mutations. *Hemasphere.* févr 2019;3(1):e178.
64. Vial JP, Lechevalier N, Lacombe F, Dumas P-Y, Bidet A, Leguay T, et al. Unsupervised Flow Cytometry Analysis Allows for an Accurate Identification of Minimal Residual Disease Assessment in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers.* 5 févr 2021;13(4):629.
65. Zeijlemaker W, Gratama JW, Schuurhuis GJ. Tumor heterogeneity makes AML a “moving target” for detection of residual disease: Phenotype instability and MRD in AML. *Cytometry.* août 2013;n/a-n/a.
66. Hanekamp D, Snel AN, Kelder A, Scholten WJ, Khan N, Metzner M, et al. Applicability and reproducibility of acute myeloid leukaemia stem cell assessment in a multi-centre setting. *Br J Haematol.* sept 2020;190(6):891-900.
67. Hanekamp D, Cloos J, Schuurhuis GJ. Leukemic stem cells: identification and clinical application. *Int J Hematol.* mai 2017;105(5):549-57.
68. Zeijlemaker W, Kelder A, Oussoren-Brockhoff YJM, Scholten WJ, Snel AN, Veldhuizen D, et al. A simple one-tube assay for immunophenotypical quantification of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* févr 2016;30(2):439-46.

69. Terwijn M, Zeijlemaker W, Kelder A, Rutten AP, Snel AN, Scholten WJ, et al. Leukemic Stem Cell Frequency: A Strong Biomarker for Clinical Outcome in Acute Myeloid Leukemia. Bunting KD, éditeur. PLoS ONE. 22 sept 2014;9(9):e107587.
70. Freeman SD, Virgo P, Couzens S, Grimwade D, Russell N, Hills RK, et al. Prognostic relevance of treatment response measured by flow cytometric residual disease detection in older patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 10 nov 2013;31(32):4123-31.
71. Köhnke T, Sauter D, Ringel K, Hoster E, Laubender RP, Hubmann M, et al. Early assessment of minimal residual disease in AML by flow cytometry during aplasia identifies patients at increased risk of relapse. *Leukemia*. févr 2015;29(2):377-86.
72. Hanekamp D, Tettero JM, Ossenkuppe GJ, Kelder A, Cloos J, Schuurhuis GJ. AML/Normal Progenitor Balance Instead of Total Tumor Load (MRD) Accounts for Prognostic Impact of Flowcytometric Residual Disease in AML. *Cancers*. 26 mai 2021;13(11):2597.
73. Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, Kavelaars FG, al Hinai A, Zeilemaker A, et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 29 mars 2018;378(13):1189-99.
74. Patkar N, Kakirde C, Shaikh AF, Salve R, Bhanshe P, Chatterjee G, et al. Clinical impact of panel-based error-corrected next generation sequencing versus flow cytometry to detect measurable residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia*. mai 2021;35(5):1392-404.
75. Delgado JA, Guillén-Grima F, Moreno C, Panizo C, Pérez-Robles C, Mata JJ, et al. A simple flow-cytometry method to evaluate peripheral blood contamination of bone marrow aspirates. *Journal of Immunological Methods*. mars 2017;442:54-8.
76. The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 30 mai 2013;368(22):2059-74.
77. Zeijlemaker W, Grob T, Meijer R, Hanekamp D, Kelder A, Carbaat-Ham JC, et al. CD34+CD38– leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. mai 2019;33(5):1102-12.
78. Vergez F, Nicolau-Travers M-L, Bertoli S, Rieu J-B, Tavitian S, Bories P, et al. CD34+CD38–CD123+ Leukemic Stem Cell Frequency Predicts Outcome in Older Acute Myeloid Leukemia Patients Treated by Intensive Chemotherapy but Not Hypomethylating Agents. *Cancers*. 6 mai 2020;12(5):1174.
79. Raspadori D, Damiani D, Lenoci M, Rondelli D, Testoni N, Nardi G, et al. CD56 antigenic expression in acute myeloid leukemia identifies patients with poor clinical prognosis. *Leukemia*. août 2001;15(8):1161-4.

80. Zeijlemaker W, Kelder A, Cloos J, Schuurhuis GJ. Immunophenotypic Detection of Measurable Residual (Stem Cell) Disease Using LAIP Approach in Acute Myeloid Leukemia. *Current Protocols in Cytometry* [Internet]. déc 2019 [cité 16 sept 2021];91(1). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpcy.66>
81. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *N Engl J Med*. 20 janv 2005;352(3):254-66.
82. Ye H, Adane B, Khan N, Sullivan T, Minhajuddin M, Gasparetto M, et al. Leukemic Stem Cells Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche. *Cell Stem Cell*. juill 2016;19(1):23-37.
83. Tothova Z, Valton A-L, Gorelov RA, Vallurupalli M, Krill-Burger JM, Holmes A, et al. Cohesin mutations alter DNA damage repair and chromatin structure and create therapeutic vulnerabilities in MDS/AML. *JCI Insight*. 8 févr 2021;6(3):e142149.
84. Jordan C, Upchurch D, Szilvassy S, Guzman M, Howard D, Pettigrew A, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*. oct 2000;14(10):1777-84.
85. Heiblig M, Duployez N, Marceau A, Lebon D, Goursaud L, Plantier I, et al. The Impact of DNMT3A Status on NPM1 MRD Predictive Value and Survival in Elderly AML Patients Treated Intensively. *Cancers*. 29 avr 2021;13(9):2156.
86. Buscarlet M, Provost S, Zada YF, Barhdadi A, Bourgoin V, Lépine G, et al. DNMT3A and TET2 dominate clonal hematopoiesis and demonstrate benign phenotypes and different genetic predispositions. *Blood*. 10 août 2017;130(6):753-62.
87. Que Y, Li H, Lin L, Zhu X, Xiao M, Wang Y, et al. Study on the Immune Escape Mechanism of Acute Myeloid Leukemia With DNMT3A Mutation. *Front Immunol*. 20 mai 2021;12:653030.
88. Spencer DH, Russler-Germain DA, Ketkar S, Helton NM, Lamprecht TL, Fulton RS, et al. CpG Island Hypermethylation Mediated by DNMT3A Is a Consequence of AML Progression. *Cell*. févr 2017;168(5):801-816.e13.
89. Pollyea DA, Stevens BM, Jones CL, Winters A, Pei S, Minhajuddin M, et al. Venetoclax with azacitidine disrupts energy metabolism and targets leukemia stem cells in patients with acute myeloid leukemia. *Nat Med*. déc 2018;24(12):1859-66.
90. DiNardo CD, Pratz K, Pullarkat V, Jonas BA, Arellano M, Becker PS, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naïve, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 3 janv 2019;133(1):7-17.

CALCUL DE LA MALADIE RÉSIDUELLE DES LEUCÉMIES AIGÜES MYÉLOÏDES PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX

Toulouse, le 1^{er} octobre 2021

Le calcul de la maladie résiduelle est un enjeu majeur pour le suivi des patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes. Déjà utilisée en routine pour la mesure de la maladie résiduelle d'autres hémopathies malignes, sa mise en place est plus difficile pour les LAM du fait de leur hétérogénéité. L'utilisation d'une technique plus performante et plus homogène est donc essentielle, spécifiquement pour la cytométrie en flux.

Afin d'évaluer l'impact pronostique de la MRD des LAM par cytométrie en flux, nous l'avons calculée pour une cohorte de 155 patients diagnostiqués au CHU de Toulouse entre 2017 à 2020 et traités par chimiothérapie intensive. Nous avons réalisé ces analyses en méthode multivariée grâce au script R FlowSOM, à partir de deux panels de marqueurs permettant l'identification des blastes leucémiques et des progéniteurs CD34+. Cette approche d'analyse supervisée mais aidée par une technique de clusterisation des cellules, permet de simplifier et d'harmoniser les résultats.

Au final, nous montrons que le calcul de la MRD par nos deux approches est complémentaire et fortement corrélé avec la réponse thérapeutique des patients.

The calculation of residual disease is a major issue for the follow-up of patients with acute myeloid leukemia. Already used routinely for the measurement of residual disease of other hematological malignancies, its implementation is more difficult for AML because of its heterogeneity. The development of a more efficient and homogeneous approach is therefore essential, especially by flow cytometry.

In order to evaluate the prognostic impact of MRD of AML by flow cytometry, we calculated it in a cohort of 155 patients diagnosed at the Toulouse University Hospital between 2017 and 2020 and treated by intensive chemotherapy. We performed these analyses in a multivariate method using the R script FlowSOM, from two panels of markers allowing the identification of leukemic blasts and CD34+ progenitors. This supervised analysis approach, but helped by a cell clustering technique, allows simplification and harmonization of results.

Finally, we show that the calculation of MRD by our two approaches is complementary and strongly correlated with the therapeutic response of patients.

DISCIPLINE administrative : Pharmacie – Biologie médicale

MOTS-CLES : Leucémie Aiguë Myéloïde, Cytométrie en flux, Immunophénotypage, Maladie résiduelle, Leukemia associated immunophenotype, Cellule souche leucémique.
