

UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTÉ DE SANTÉ
DEPARTEMENT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE 2022

THÈSE 2022 TOU3 2094

THÈSE

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

Présentée et soutenue publiquement par

Mouanes-Abelin Joy

Recherche de la maladie résiduelle par cytométrie en flux
dans les LAM traitées par la combinaison
Azacitidine et Vénétoclax

Le 18 octobre 2022

Directeur de Thèse : Monsieur le Docteur VERGEZ François

JURY

Président : Madame la Professeure AYYOUB Maha

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
du Département des Sciences Pharmaceutiques de la Faculté de santé
au 4 avril 2022

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-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.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GENISSON 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

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitolo-Universitaires		Universitaires	
M. DELCOURT N.	Biochimie	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
Mme KELLER L.	Biochimie	M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	Mme BON C. (*)	Biophysique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique	M. BOUAJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique	Mme CABOU C.	Physiologie
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie	Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	Mme CHAPUY-REGAUD S. (*)	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		Mme DERA EVE 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. PILLOUX L.	Microbiologie
		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
		(*)	Pharmacognosie
		Mme VANSTEELANDT M.	Mathématiques
		Mme WHITE-KONING M. (*)	

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

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitolo-Universitaires		Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)	
M. AL SAATI A	Biochimie	Mme AMRANE Dyhia	Chimie Thérapeutique
Mme BAKLOUTI S.	Pharmacologie		
Mme CLARAZ P.	Pharmacie clinique		
Mme CHAGNEAU C.	Microbiologie		
Mme LARGEAUD L	Immunologie		
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie		
Mme STRUMIA M.	Pharmacie clinique		
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 couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

Remerciements

A Madame le Professeur Mahaa AYYOUB,

C'est un immense honneur pour moi que vous ayez accepté de présider mon jury. Je vous remercie pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises durant mes années de faculté. Votre implication universitaire et scientifique suscite mon plus grand respect.

A Monsieur le Professeur Christian RECHER,

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de siéger au sein de mon jury. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt que vous portez à ce travail.

A Madame le Docteur Inès VERGNOLLE,

C'est un immense honneur et un plaisir de t'avoir dans mon jury. Merci pour ta gentillesse et ta pédagogie. Travailler et apprendre à tes côtés est pour moi une grande chance.

A Monsieur le Docteur François VERGEZ,

Je te remercie de m'avoir confié ce travail et de m'avoir soutenu tout le long de ce projet. Merci pour tous tes conseils, pour tes connaissances que tu sais si bien transmettre et pour ta bonne humeur au quotidien. C'est un réel plaisir de pouvoir continuer à travailler à tes côtés. Merci pour tout.

A ma famille,

A mes **grands-parents**, pour tous les bons souvenirs que vous avez gravés dans ma mémoire à jamais.

A ma **Maman**, quelle chance de t'avoir comme mère. Ta force, ton courage et ton abnégation m'ont toujours permis d'avancer dans la vie. Si je suis devenue la femme que je suis aujourd'hui c'est grâce à toi. Tu es tout pour moi. Je t'aime.

A **ma tante** Hiam, ton parcours universitaire suscite mon admiration.

A **mon frère**, merci pour tout ce que tu m'apportes : **ton amour, ta gentillesse, ton écoute, ton soutien**. Merci d'être toujours là pour moi, j'ai de la chance d'avoir un grand frère comme toi.

A **Mathilde**, « ma belle-sœur » devenue également mon amie, merci pour ta bonne humeur et ta gentillesse.

A mes amis :

A l'Oriental Crew : **Anna, Sonia, Soumia** et **Nedjma**.

Anna alias « mafiosa » malgré la distance qui nous sépare notre amitié est restée intacte.

Sonia, à tous les voyages qu'on a faits ensemble et à ceux venir. **Soumia**, mon binôme de TP, à tous nos après-midis salon de thé. Toutes ces années de fac n'auraient pas été les mêmes sans vous.

Aux anciens de l'internat : **Sylvain, Sam, Apo, Alexiane, Marie** et **Simon** avec qui on aura partagé des bons moments confinés (merci la covid).

A **Selim**, mon ancien Co-VP internat, tu es une belle personne ne change pas.

A **Roxane** et **Camille** pour nos soirées mémorables à l'internat.

Au classico : **Antoine** et **Souf** pour toutes les soirées gogo – St gé et after rue saint Rome.

Au Sancho la fine équipe : **Clara, Jess, Candice, Fat, Mehdi, Cécile, Julie, Houda, Aglaé, Lise, Clément, Nico 1 et Nico 2** et toutes les parties de baby gagnés (perdus) ensemble.

Linda (la Linde) et toutes les calories dépensées devant les vidéos Pamela, tous les jus d'orange pressés par tes soins et toutes les bonnes gardes passées ensemble.

Marion et ta gentillesse, ton soutien, nos soirées films, nos vacances au Pays basque, bref tous les bons moments passés ensemble et ceux à venir.

A mes co-internes :

Anne-Marie ma binôme de stage depuis mon premier semestre, merci pour ta gentillesse, ton écoute, j'ai de la chance de t'avoir à mes côtés, **Gauthier** pour tous les fous rires, toutes les chansons mises dans la tête, c'est un plaisir de travailler à tes côtés, **Lucie** et toutes les soirées internat et rando ensemble, **Benji** et **Germain** et notre amour commun pour le baby-foot, **Yasmine** et ta bienveillance, , **Thibaut, Laure** et Nono, **Justine** alias « la mad » à ton sourire communicatif, **Matteo** mon italien préféré, **Maelys** et nos cours de rock endiablé.

A mes chefs biologistes en Hématologie, Madame **De Mas, Fred, JB, Jill, Laetitia, Lucie, Vincent**. Merci de m'avoir donné goût à la cytologie et pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises, pouvoir travailler et apprendre à vos côtés est une grande chance pour moi.

A cette belle équipe de techniciens que j'ai eu la chance de côtoyer lors de mes différents stages.

A l'hémato été 2022 : aux néo niveau 1, **Pauline, Vallauris, Guillaume, Ophélie, Candice**.

A mes DJ préférés : **Yolla, Anaïs** et surtout merci à toi **Alban** de m'avoir si bien expliqué le fonctionnement de FlowSOM, de m'avoir aidé dans ce travail et d'avoir toujours répondu présent à mes sollicitations.

A toi **Papa**, je te dédie cette thèse et tout mon parcours.
Tu resteras à jamais dans mon cœur,
Je t'aime.

Table des matières	10
Table des figures	12
Table des tableaux	14
Liste des abréviations	15

I. Leucémies Aigües Myéloïdes17

1. Généralités	17
A. Définition.....	17
B. Épidémiologie	17
C. Leucémogénèse	18
D. Classifications	22
2. Diagnostic	24
A. Clinique	24
B. Biologique	24
3. Options thérapeutiques	25

II. Combinaison : Vénétoclax/Azacitidine26

1.Azacitidine	26
A. Généralités	26
B. Mécanismes d'action	27
2. Association du Vénétoclax à l'Azacitidine.....	28
A. Histoire et mode d'utilisation	28
B. Mécanismes d'actions	29
a. Mécanisme d'action du Vénétoclax	29
b. Mécanisme d'action de l'association Azactidine/Vénétoclax	30
C. Tolérance	32
D. Efficacité	33
E. Mécanismes influençant la réponse à l'association AZA/VEN	36
a. Mutations IDH 1 et 2	36
b. Mécanismes de résistance	37

III. La maladie résiduelle	39
1.Définition et intérêts cliniques	39
2.Techniques d'évaluation de la MRD	41
A. La cytométrie en flux	38
a. Principe de la cytométrie en flux.....	43
b. Approche LAIP/DfN	43
c. Approche LSC.....	45
d. L'analyse non supervisée.....	46
B. La biologie moléculaire : qRT-PCR ou NGS.....	47
 IV. Recherche de la maladie résiduelle par CMF chez les patients traités par l'association AZA/VEN	 49
1. Objectif	49
2. Matériels et méthodes	49
3. Résultats	53
4. Discussion	70
5. Conclusion.....	75

TABLE DES FIGURES

Figure 1 Taux d'incidence de la LAM selon la classe d'âge en 2018 en France (5).....	17
Figure 2: Évolution génétique et épigénétique de la LAM (6).....	18
Figure 3: Courbe de Kaplan-Meier représentant la proportion de personnes sans diagnostic de cancer hématopoïétique selon la présence ou non d'une hématopoïèse clonale (7).....	19
Figure 4: Expression des marqueurs phénotypiques utilisés pour la détection des LSC par rapport aux nCSH d'après l'étude de Zeijlemaker (20)	21
Figure 5: Structures chimiques de la cytidine et de l'azacitidine (26).....	26
Figure 6: Mécanismes d'action des agents hypométhylants Azacitidine et Décitabine (30)....	27
Figure 7: Schéma représentant le mécanisme d'action du Vénétoclax (33).....	29
Figure 8: Résumé du ciblage de LSC par l'association AZA/VEN chez les patients atteints de LAM (36)	30
Figure 9: Schéma représentant le mécanisme d'action de la combinaison Azacitidine/Vénétoclax (38).....	31
Figure 10: Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie globale chez les patients traités par la combinaison AZA/VEN ou par l'azacitidine seule (39).....	34
Figure 11: Analyse du sous-groupe de la survie globale comparant la bithérapie AZA/VEN avec Azacitidine+Placebo	35
Figure 12: Mécanisme physiologique ou leucémique de la méthylation de l'ADN suite à la mutation d' <i>IDH1/2</i> , Inspiré de Eriksson et al. 2015 (49)	36
Figure 13: Graphiques montrant l'expression de BCL2 et de MCL1 dans les sous-classes FAB de M0 à M5 à partir du jeu de données TCGA	37
Figure 14: Corrélation inverse de la sensibilité au vénétoclax (sDSS) par rapport à l'expression de S100A8/A9	38
Figure 15: Le concept de la MRD avec les différentes possibilités de modifications de la charge cellulaire leucémique à la suite du traitement (60).....	39
Figure 16: Représentation schématique des 3 différents systèmes d'un cytomètre : Système fluïdique, système optique et système informatique (68).....	42
Figure 17: Histogramme bi-paramétrique CD45 (abscisse) Side scatter (SSC, ordonnée)d'une moelle osseuse normale (69)	42
Figure 19: Évaluation de trois techniques de visualisation alternatives à l'aide d'ensemble de données d'ensemble de données à sélection manuelle (79).....	46
Figure 20: Présentation des 4 étapes de l'algorithme FlowSOM (83)	52
Figure 21: Diagramme de flux	53
Figure 22: Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie globale chez les patients traités par la combinaison AZA/VEN ou par la monothérapie Azacitidine (VDZ).....	54
Figure 23: Taux de rémission complète (RC), d'absence de rémission (no RC) et de décès prématuré (ED) selon le traitement par AZA/VEN ou AZA seul.....	54
Figure 24: Évaluation de l'association MRD LAIP/LSC selon le traitement par la bithérapie AZA/VEN ou bien par ICT	55
Figure 25: Évaluation de la survie globale selon l'approche LAIP en post bithérapie Azacitidine/Vénétoclax par méthode FlowSOM	56
Figure 27: Évaluation de la survie sans évènement selon l'approche LAIP en post bithérapie AZA/VEN par méthode FlowSOM.....	57
Figure 28: Évaluation de l'indice cumulé de rechute selon l'approche LAIP en post bithérapie AZA/VEN par méthode FlowSOM.....	57
Figure 29: Évaluation de la survie globale selon l'approche LSC en post bithérapie AZA/VEN par méthode FlowSOM	58
Figure 30: Évaluation de la survie sans évènement selon l'approche LSC en post bithérapie AZA/VEN par méthode FlowSOM.....	58

Figure 31: Evaluation de l'indice cumulé de rechute selon l'approche LSC en post-bithérapie AZA/VEN par méthode FlowSOM.....	59
Figure 32: Évaluation de la survie globale selon l'approche combinée LAIP/LSC en post-bithérapie AZA/VEN par méthode FlowSOM.....	60
Figure 33: Évaluation de la survie sans évènement selon la combinaison MRD LAIP/LSC post 2 cures d'AZA/VEN par méthode FlowSOM	61
Figure 34: Evaluation de l'indice cumulé de rechute selon l'approche combinée LAIP/LSC en post-bithérapie AZA/VEN par méthode FlowSOM.....	62
Figure 35: Modèles multivariés de COX et de FINE & GRAY selon différents facteurs pronostiques des LAM pour la survie globale (OS), la survie sans évènements (EFS) et l'indice cumulé de rechute (CIR). La ligne verticale représente un rapport de risque (HR) de 1. En bleu sont présentés les facteurs de bon pronostic, en noir les facteurs ne présentant pas d'impact pronostique significatif et en orange, les facteurs de mauvais pronostic.	63
Figure 36: Évaluation de la survie globale chez un sous-groupe présentant les mutations IDH1 et 2 après traitement par la combinaison AZA/VEN ou bien par l'AZA seule	65
Figure 37: Evaluation de la survie globale post-bithérapie AZA/VEN en fonction de la présence (IDH1/2m) ou l'absence (IDH1/2wt) de la mutation IDH 1 et 2	66
Figure 38: Évaluation de la survie sans évènement en post-bithérapie AZA/VEN en fonction de la présence (IDH1/2m) ou l'absence (IDH1/2wt) de la mutation IDH 1 et 2	67
Figure 39: Évaluation de l'indice cumulé de rechute en post-bithérapie AZA/VEN en fonction de la présence (IDH1/2m) ou l'absence (IDH1/2wt) de la mutation IDH 1 et 2	67
Figure 40: Évaluation de la survie globale par la combinaison des 2 approches de MRD LAIP/LSC chez les patients ne présentant pas de mutation IDH.....	68
Figure 41: Évaluation de la survie globale selon une MRD LAIP-/LSC- par rapport aux autres groupes	68
Figure 42: Évaluation de la survie globale par la combinaison des 2 approches de MRD LAIP/LSC chez les patients présentant la mutation IDH.....	69
Figure 43: Évaluation de la survie globale selon la MRD LAIP-/LSC- par rapports aux autres groupes	69

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Nouvelle classification OMS 2022 des LAM	22
Tableau 2: Classification pronostique des LAM par l'ELN 2017	23
Tableau 3: Facteurs de mauvais pronostic selon la HAS	23
Tableau 4: Effets indésirables après traitement par Azacitidine seule ou bithérapie AZA/VEN (40)	32
Tableau 5: Critères de réponse au traitement selon l'ELN 2021(67)	40
Tableau 6: L'incidence de LAIP dans les LAM (70).....	43
Tableau 7: Recommandations de l'ELN 2021 concernant la MRD en CMF (67)	44
Tableau 8: Liste des marqueurs phénotypiques pour la détection des LSC d'après l'étude de Hanekamp et al. (77)	45
Tableau 9: Comparaison des différentes techniques d'évaluation de la MRD selon Dix et al. (87)	48
Tableau 10: Anticorps et fluorochromes utilisés dans le panel LAIP	50
Tableau 11: Anticorps et fluorochromes utilisés dans le panel LSC	50

Liste des abréviations

AA : Acide Aminée

ARCH : Age-Related Clonal Hematopoiesis

AZA/VEN : Azactidine/ Vénétoclax

BCL2 : B Cell Lymphoma 2

CD : Cluster de différenciation

CHIP : Clonal Hemaopoiesis od Indeterminate Potential

CIVD : Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée

CMF : Cytométrie en flux

CSH : Cellules souches hématopoiétiques

DfN : Différent de la normale

ELN : European LeukemiaNet

FAB : Français-Américano-Britannique

FlowSOM : Flow-Self Organizing Map

FSC : Forward Scatter

HAS : Haute Autorité de Santé

HSC : Hematopoietic Stem Cell

ICT : Chimiothérapie intensive

LA : Leucémies aiguës

LAIP : Leukemia-associated Aberrant ImmunoPhenotype

LAM : Leucémie aigue myéloïde

LAL : Leucémie aigue lymphoïde

LMMC : Leucémie myélo-monocytaire chronique

LSC : Leukemia Stem Cell

LCP : Progéniteurs engagés leucémiques

MRD : Minimal/mesurable Residual Disease

nCSH : normal Hematopietic Stem Cell

NGS : Next Generation Sequencing

OMS : Organisation mondiale de la santé

OXPHOS : Phosphorylation oxydative

PMT : Photomultiplicateur

PréL-HSPC : Cellules souches hematopietiques / progénétrices pré-leucémiques

PNN : Polynucléaire neutrophile

RFS : Relapse Free Survival

RT-qPCR : Real Time – quantitative Polymerase Chain Reaction

SMD : Syndrome myélodysplasique

SMP : Syndrome myéloprolifératif

SPADE : Spanning-tree Progression Analysis of Density normalized Events

SSC : Side Scatter

PCR : Polymerase chain reaction

RC : Rémission complète

HSPC : Cellules souches hématopoïétiques/progénitrices

PréL-CSH : Cellules souches hématopoïétiques pré-leucémiques

VDZ : Vidaza

I. Leucémies Aiguës Myéloïdes

1. Généralités

A. Définition

Les leucémies aiguës (LA) sont des hémopathies malignes à point de départ médullaire, le plus souvent et qui se définissent par une prolifération clonale de cellules immatures d'origine hématopoïétiques, nommées blastes. Il existe deux types de LA, les leucémies aiguës lymphoïdes (LAL) et les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), sujet de notre étude.(1)

B. Épidémiologie

Les LAM touchent en majorité les personnes âgées avec une médiane au diagnostic de 69 ans chez l'homme et 72 ans chez la femme.(2) Le taux d'incidence est très hétérogène. En effet, une très faible incidence est observée avant 40 ans, tandis qu'après 90 ans on atteint des taux importants estimés à 26,1 cas pour 100 000 habitants chez les femmes et de 34,4 pour 100 000 habitants chez les hommes.(3)(4) Au niveau mondial, les taux d'incidence standardisés (TSM) sont de 3,1 chez l'homme et de 2,3 chez la femme pour 100 000 personnes-années.(3)

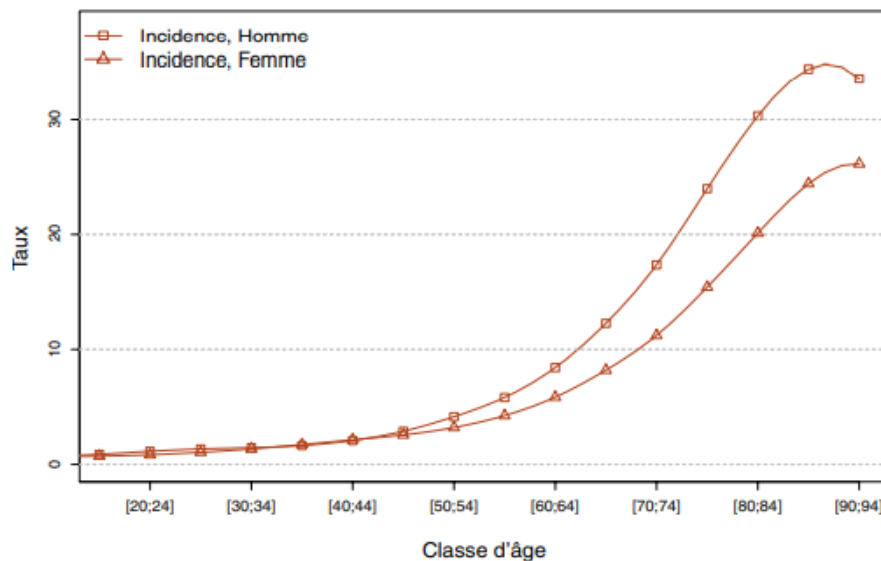


Figure 1 Taux d'incidence de la LAM selon la classe d'âge en 2018 en France (5)

Dans la majorité des cas les facteurs étiologiques sont inconnus. Cependant de nombreux facteurs de risques ont été identifiés : le tabagisme, l'exposition à des produits chimiques (ex : le benzène, peintures, certains détergents...) ou à de fortes doses de rayonnements ionisants, ainsi que des anomalies génétiques comme la trisomie 21. Des LAM secondaires peuvent être engendrer par l'utilisation de certaines chimiothérapies cytotoxiques comme les alkylants ou par la transformation d'hémopathies myéloïdes chroniques tel que les syndromes myéloprolifératifs (SMP) et les syndromes myélodysplasiques (SMD)(2), ces hémopathies acutisées représentent 10 à 30% des LAM (5) (1)

C. Leucémogénèse

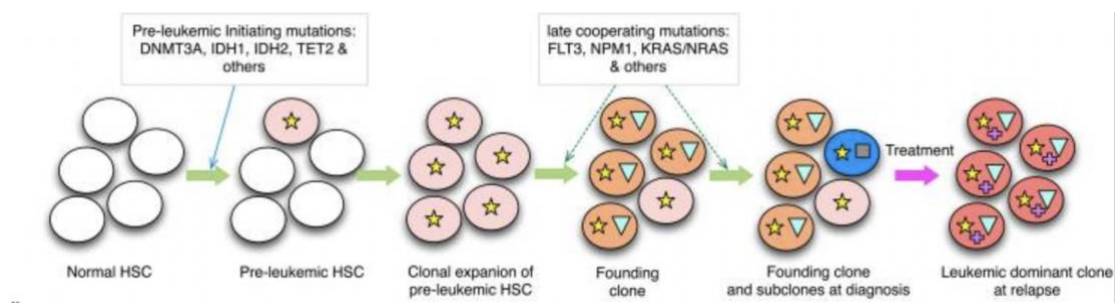


Figure 2: Évolution génétique et épigénétique de la LAM (6)

Chez des individus sains, il a été découvert des mutations génétiques connues pour être impliquées dans la genèse des LAM, ceci a permis de mettre en évidence l'existence d'une hématopoïèse clonale pré-leucémique. (7)

Avec l'avancée en âge et plus particulièrement chez les patients de plus de 70 ans, une hématopoïèse clonale peut s'expandre graduellement (ARCH, age-related clonal hematopoiesis). Elle est le résultat d'une augmentation de l'instabilité hématopoïétique. (8)

La présence de cette hématopoïèse clonale a été corrélée à une augmentation significative de la survenue d'un cancer hématologique (Figures 2 et 3).

Cet état se définit en tant qu'Hématopoïèse Clonale à Potentiel Indéterminé (CHIP).(9)

Les mutations « précoces » sont à l'origine de l'acquisition ou d'une accentuation du potentiel d'auto-renouvellement cellulaire et induisent généralement une altération dans la différenciation. Les gènes les plus souvent touchés sont : *DNMT3A*, *TET1* et *TET2*, *IDH1* et *IDH2*, *ASXL1* et *TP53*.

Il existe également des mutations dites « tardives », qui touchent les voies de signalisation cellulaires comme le gène *FLT3*. Ces mutations favorisent la prolifération cellulaire, induisent un blocage complet de la différenciation et donc le développement de la LAM. (10)

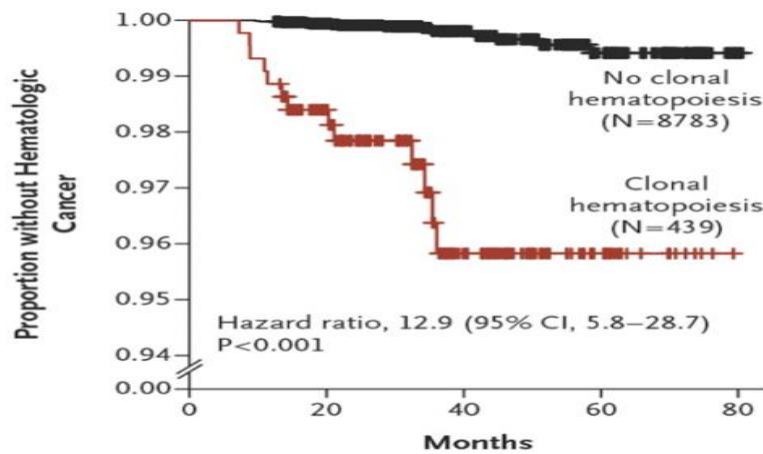


Figure 3: Courbe de Kaplan-Meier représentant la proportion de personnes sans diagnostic de cancer hématopoïétique selon la présence ou non d'une hématopoïèse clonale (7)

Il existe 4 grandes populations de cellules qui sont définies par leur génotype et leur phénotype :

1. **Cellules souches hématopoïétiques/progénitrices (HSPC)** fonctionnelles et non porteuses de variants récurrents liés à la leucémie.
2. **Cellules souches hématopoïétiques/progénitrices pré-leucémiques (PréL-HSPC)** portent des mutations pré-leucémiques récurrentes mais possèdent toujours les capacités de maturation et de différenciation.
3. **Cellules souches leucémiques (LSC)** qui ont un variant génétique leucémique et ne peuvent pas produire de descendances complètement matures.
4. **Progéniteurs engagés leucémiques (LCP)** portent les mêmes mutations que leurs LSC ancestrales et sont plus matures que celles-ci, cependant elles ne peuvent pas engendrer de cellules matures et fonctionnelles.(11)

Nous allons nous intéresser plus particulièrement **aux cellules souches pré-leucémiques** et aux **cellules souches leucémiques** :

Les PréL-HSPC sont des cellules progénitrices myéloïdes qui n'ont pas la capacité suite à leur mutation d'induire isolément une leucémie aiguë. C'est l'acquisition séquentielle de mutations somatiques dans le clone pré-leucémique qui aboutira à la transformation en maladie très proliférative. (12) (13)(9)

Les **PréL-HSPC** persistent chez les patients en rémission complète et peuvent être à l'origine d'une rechute de la maladie. (14)

Les LSC ont été caractérisées pour la première fois en 1994 lorsqu'il a été découvert qu'une sous population de cellules CD34+CD38- , avec donc un phénotype identique aux cellules souches hématopoïétiques normales (nCSH) étaient capables d'induire une LAM suite à leur greffe chez des souris immuno-déficientes sévères. (10) (15)

Ces cellules malignes possèdent un pouvoir **d'auto-renouvellement** très important ce qui leur permet de modifier le micro-environnement aux dépens de l'hématopoïèse normale. (16)(17)

La connaissance du **métabolisme** de ces cellules est fondamentale pour pouvoir les cibler en optimisant les approches thérapeutiques.

Ces LSC contrairement aux CSH dépendent fortement de la **phosphorylation oxydative (OXPHOS)** grâce à une augmentation de l'absorption des acides aminés (AA) et ne peuvent pas utiliser la glycolyse lorsque l'OXPHOS est inhibée.

L'étude menée par Lagadinou et al. a permis de mettre en évidence que la majorité des LSC possèdent des niveaux faibles d'espèces réactives de l'oxygène « ROS low » avec une expression accrue de BCL2, responsable de la régulation de l'OXPHOS chez ces cellules.(18)

En revanche chez les patients en rechute de leur LAM, les LSC possèdent une flexibilité métabolique accrue puisqu'elles ne dépendent plus du métabolisme des AA et compensent par un métabolisme accru des acides gras. (19) Ce mécanisme explique la résistance plus importante aux traitements lors des rechutes.

De nouveaux moyens thérapeutiques ont été mis en place afin de cibler ces LSC dans l'objectif d'éviter les rechutes observées à la suite d'une rémission complète (RC).

Les LSC possèdent une grande hétérogénéité phénotypique, résultat des différentes interactions entre la cellule d'origine, le microenvironnement et le fond génétique.

Une bonne connaissance du phénotype des LSC est donc primordiale et pourrait nous permettre en ciblant spécifiquement ces cellules une amélioration de l'impact pronostique de la recherche de MRD. (Figure 4).

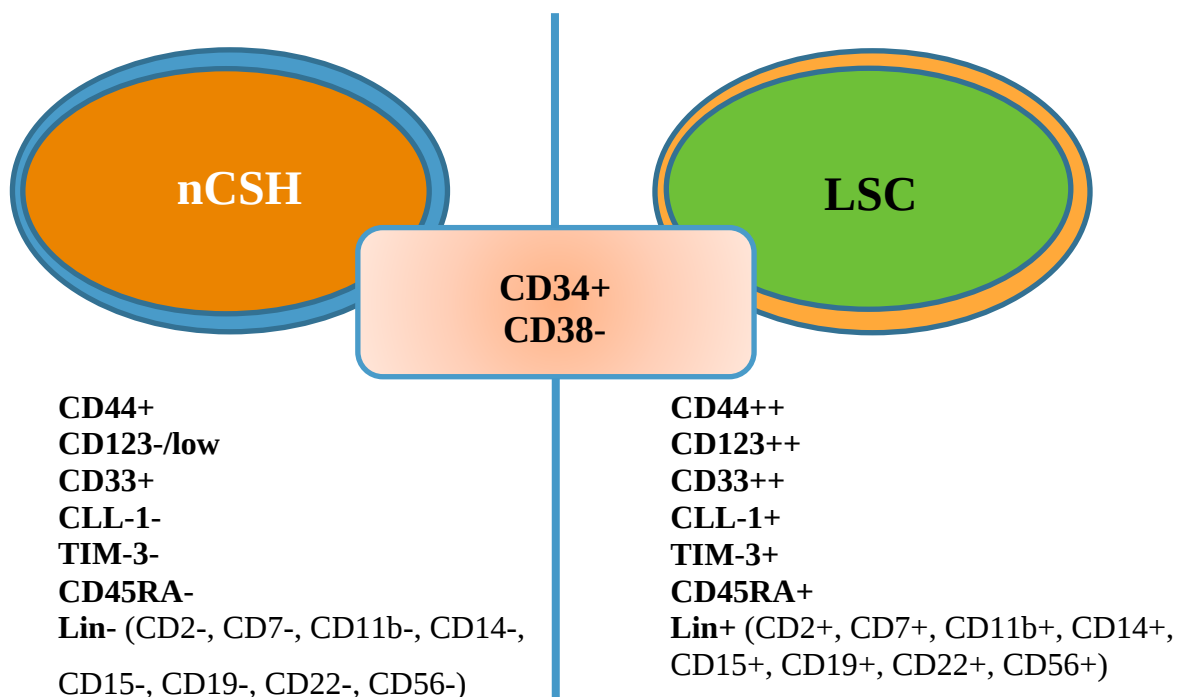


Figure 4: Expression des marqueurs phénotypiques utilisés pour la détection des LSC par rapport aux nCSH d'après l'étude de Zeijlemaker (20)

De nombreuses études ultérieures ont cherché à caractériser davantage le **phénotype** de ces LSC. L'étude de Zeijlemaker et al. a montré l'utilité des marqueurs suivants pour la détection des LSC à partir d'un seul tube : des **marqueurs communs** (CD34, CD38, CD45), des **marqueurs spécifiques de lignées** (CD45RA, CD123, CD33, CD44) et enfin des **marqueurs spécifiques des LSC** (CLL-1, TIM-3, CD7, CD11b, CD22, CD56). L'expression de ces marqueurs sur les CSH normales (nCSH) et les LSC est décrite dans la figure 4. (20).

D. Classifications

Les LAM ont été initialement classées en 1976 par le système Français-Américano-Britannique (FAB) en 8 sous-types de M0 à M7. Cette classification, révisée en 1985, se base sur l'origine des blastes, leur morphologie et les cellules matures les accompagnant. (21) Par la suite, une nouvelle classification a été proposée par l'OMS en 2001 puis révisée en 2008, en 2016 et plus récemment en 2022. Les anciennes classifications se basaient sur les caractéristiques morphologiques, cliniques, immunophénotypiques, cytogénétiques et moléculaires dans le but de former des entités pathologiques d'importance clinique. (22).

Avec la nouvelle révision de 2022, les LAM sont classées en fonction de leurs anomalies génétiques et de leur stade de différenciation (Tableau 1). Un seuil de blastes supérieur à 20% dans la moelle osseuse n'est plus une exigence pour le diagnostic, dans certaines conditions. (23)

Tableau 1: Nouvelle classification OMS 2022 des LAM

Acute myeloid leukaemia with defining genetic abnormalities
Acute promyelocytic leukaemia with <i>PML::RARA</i> fusion
Acute myeloid leukaemia with <i>RUNX1::RUNX1T1</i> fusion
Acute myeloid leukaemia with <i>CBFB::MYH11</i> fusion
Acute myeloid leukaemia with <i>DEK::NUP214</i> fusion
Acute myeloid leukaemia with <i>RBM15::MRTFA</i> fusion
Acute myeloid leukaemia with <i>BCR::ABL1</i> fusion
Acute myeloid leukaemia with <i>KMT2A</i> rearrangement
Acute myeloid leukaemia with <i>MECOM</i> rearrangement
Acute myeloid leukaemia with <i>NUP98</i> rearrangement
Acute myeloid leukaemia with <i>NPM1</i> mutation
Acute myeloid leukaemia with <i>CEBPA</i> mutation
Acute myeloid leukaemia, myelodysplasia-related
Acute myeloid leukaemia with other defined genetic alterations
Acute myeloid leukaemia, defined by differentiation
Acute myeloid leukaemia with minimal differentiation
Acute myeloid leukaemia without maturation
Acute myeloid leukaemia with maturation
Acute basophilic leukaemia
Acute myelomonocytic leukaemia
Acute monocytic leukaemia
Acute erythroid leukaemia
Acute megakaryoblastic leukaemia

Afin d'orienter la stratégie thérapeutique, différentes classifications pronostiques sont utilisées :

- L'ELN 2017 (Tableau 2) et l'OMS 2016 qui s'appuient sur des anomalies génétiques ont permis de stratifier les LAM en 3 catégories : favorable, intermédiaire et mauvais pronostics. (24)
- La **classification de la HAS** (Tableau 3) qui s'appuie sur des facteurs de mauvais pronostic initiaux ainsi que sur la réponse aux traitements.

Tableau 2: 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)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD or with <i>FLT3</i> -ITD ^{low} † Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
Intermediate	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD ^{high} † Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD or with <i>FLT3</i> -ITD ^{low} † (without adverse-risk genetic lesions) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> ‡ Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3;q26.2) 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</i> -ITD ^{high} † Mutated <i>RUNX1</i> ¶ Mutated <i>ASXL1</i> ¶ Mutated <i>TP53</i> #

Tableau 3: Facteurs de mauvais pronostic selon la HAS

Facteurs de mauvais pronostic initiaux	Age > 60 ans
	Cytogénétique défavorable
	Certaines anomalies moléculaires
	Évolution depuis un syndrome myélodysplasique ou une néoplasie myéloproliférative
	Score de performance OMS > 2
	Comorbidités préexistantes : diabète, maladie coronarienne BPCO
Facteurs de mauvais pronostic	Hyperleucocytose initiale
	Absence d'obtention de la rémission complète en une cure
	Maladie résiduelle persistante en biologie moléculaire dans certaines formes

2 . Diagnostic

A. Clinique

La symptomatologie dans la LAM est rapidement progressive. Elle résulte de l'envahissement médullaire des blastes induisant un appauvrissement des autres lignées. Une insuffisance médullaire s'installe, à l'origine des signes cliniques ci-dessous :

- Anémie : mal tolérée du fait de son installation rapide peut être à l'origine d'asthénie, pâleur cutanéomuqueuse, dyspnée, vertiges etc...
- Neutropénie : Syndrome infectieux, sepsis grave, fièvre résistante aux antibiotiques.
- Thrombopénie : Anomalie de l'hémostase primaire pouvant causer un syndrome hémorragique cutanéomuqueux, Coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) en particulier dans la LAM promyélocytaire.

Ce trépied est souvent le premier point d'appel. Il existe cependant d'autres signes cliniques liés aux différentes localisations de la maladie entraînant un syndrome tumoral : Adénopathie, splénomégalie, hépatomégalie, gingivites hypertrophiques, céphalées et paralysies des nerfs crâniens lors d'une localisation méningée ainsi que des papules et érythrodermie lors d'une localisation cutanée. Enfin, dans les cas d'hyperleucocytose majeure (>50G/L) un syndrome de leucostase au niveau des capillaires pulmonaires et cérébraux peut avoir lieu.

D. Biologique

En premier lieu, une numération formule sanguine est réalisée. L'analyse de l'hémogramme permet de détecter une ou plusieurs cytopénies : dans la majorité des cas, une anémie normocytaire arégénérative est retrouvée, elle est fréquemment associée à une thrombopénie. La numération leucocytaire est très variable allant de la leucopénie à l'hyperleucocytose majeure souvent associée à une neutropénie.

Ces anomalies vont entraîner la réalisation d'un frottis sanguin afin d'observer la présence potentielle de blastes. Les blastes sont des cellules de tailles variables, à rapport nucléocytoplasmique élevé avec une chromatine fine, un noyau souvent nucléolé et un cytoplasme basophile. L'existence dans le cytoplasme de granulations et/ou de corps d'Auer permet de se diriger vers le caractère myéloïde de la LA.

Par la suite, la réalisation d'un myélogramme est indispensable au diagnostic. Il va permettre par l'analyse cytologique d'évaluer l'infiltration blastique médullaire et de classer l'hémopathie.

Enfin, dans la majorité des cas un immunophénotypage par cytométrie en flux, une analyse cytogénétique et par biologie moléculaire sont également réalisées sur les myéloblastes médullaires.

3. Options thérapeutiques

Le diagnostic confirmé, les patients intègrent différents protocoles thérapeutiques en fonction de leurs facteurs pronostiques qui sont définis par la HAS et les classifications de l'OMS et de ELN. Chez les patients en bon état général, une chimiothérapie intensive est mise en place (induction et consolidation) avec plus ou moins une allogreffe de CSH. L'objectif de ces traitements est d'obtenir une rémission complète (RC) qui est définie par l'ELN 2017 (25):

- **Moins de 5% de blastes médullaire**
- **Absence de blastes circulants et des blastes contenant des corps d'Auer**
- **Absence de localisation extra médullaire**
- **PNN > 1 G/L**
- **Plaquettes > 100G/L**

Chez les patients ne tolérant pas une chimiothérapie intensive, **la combinaison azacitidine et vénétoclax peut être utilisée en 1ere ligne.**

II. Combinaison : Azacitidine / Vénétoclax

1. Azacitidine (VIDAZA ®)

A. Généralités

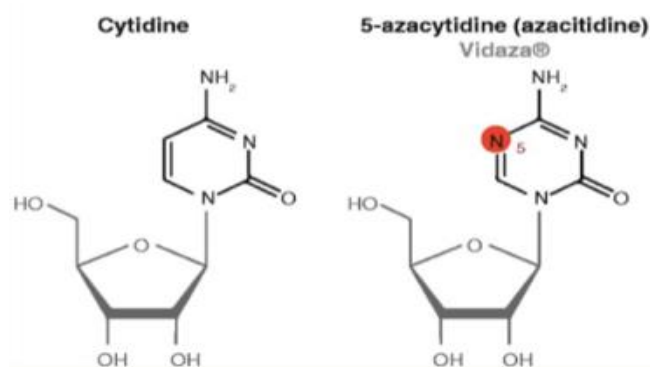


Figure 5: Structures chimiques de la cytidine et de l'azacitidine (26)

L'azacitidine est un analogue de la cytidine, un nucléoside pyrimidique naturelle.(27) Sa structure chimique présente une modification de l'anneau de la cytosine avec un groupement méthyle substitué par un azote en position 5 ce qui lui donne la capacité d'interférer avec la méthylation de l'ADN, d'où leur nom d'agent hypométhylant.

Les azanucléosides dont fait partie l'azacitidine et la décitabine ont été synthétisés pour la première fois en 1964.

Ils obtiennent leur première autorisation temporaire d'utilisation (ATU) en 2004 pour le traitement des syndromes myélodysplasiques. (26)(28) Puis c'est en 2008 que l'agence européenne du médicament accorde son AMM à l'azacitidine dans le traitement des SMD de haut grade, des LMMC (Leucémie myélo-monocytaire chronique) et dans le traitement des LAM des patients non éligibles à la greffe de CSH. (29)

B. Mécanismes d'action

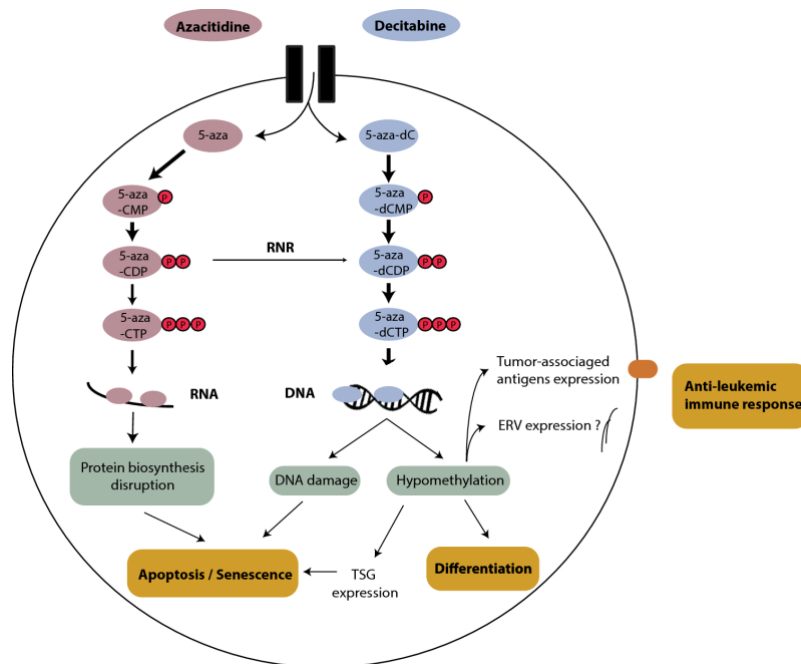


Figure 6: Mécanismes d'action des agents hypométhylants Azacitidine et Décitabine (30)

L'absorption cellulaire de l'azacitidine est dépendante des transporteurs nucléosidiques. Elle est par la suite successivement phosphorylée par des kinases intracellulaires jusqu'à arriver à son métabolite actif triphosphorylé (5-aza-CTP). (26) C'est ce dernier qui va pouvoir agir à différents niveaux :

- La 5-aza-CTP est incorporée majoritairement dans l'ARN (environ 80%) avec comme conséquence une perturbation de la synthèse protéique, ce qui favorise l'apoptose cellulaire.
- Les 20 % restants sont converties en 5-aza-dCTP par la ribonucléotide réductase et sont incorporées dans l'ADN lors de sa réplication. Ils vont par la suite se lier à l'ADN méthyltransférase (DNMT1) avec une liaison covalente qui ne peut pas être coupée par bêta élimination, ce qui va induire la dégradation de cette DNMT1 et engendrer une hypométhylation progressive de l'ADN. Cela entraîne la restauration d'une différenciation cellulaire normale, ainsi qu'une activation des gènes suppresseurs de tumeurs réprimés à l'origine d'une apoptose cellulaire.
- L'azacitidine peut également permettre l'expression d'antigènes associés aux tumeurs à l'origine d'une réponse immunitaire antitumorale. (30)

2. Association du vénétoclax à l'azacytidine

A. Histoire et mode d'utilisation

Le vénétoclax était initialement indiqué dans certains cas de leucémies lymphoïdes chroniques (31) En 2018, il obtient en association avec l'azacitidine une autorisation accélérée pour le traitement de la LAM chez les patients âgés de ≥ 75 ans et/ou présentant des comorbidités excluant la chimiothérapie intensive.(32) Cette association apporte une amélioration du service médicale rendu de façon modérée (ASMR III) par rapport à l'azacitidine seule. (29)

Un cycle de traitement a une durée de 28 jours :

- L'Azacitidine (VIDAZA ®) est administrée à une dose de 75 mg/m² par jour pendant 7 jours par voie sous cutanée ou en intra-veineuse.
- Le Vénétoclax (VENCLYXTO ®) doit être pris tous les jours du cycle par voie orale à une dose de 400mg avec une augmentation des doses par palier au début du traitement afin d'éviter le syndrome de lyse tumorale : 100mg à J1, 200mg à J2 et 400mg à partir du J3.

B. Mécanismes d'action

a. Mécanisme d'action du Vénétoclax

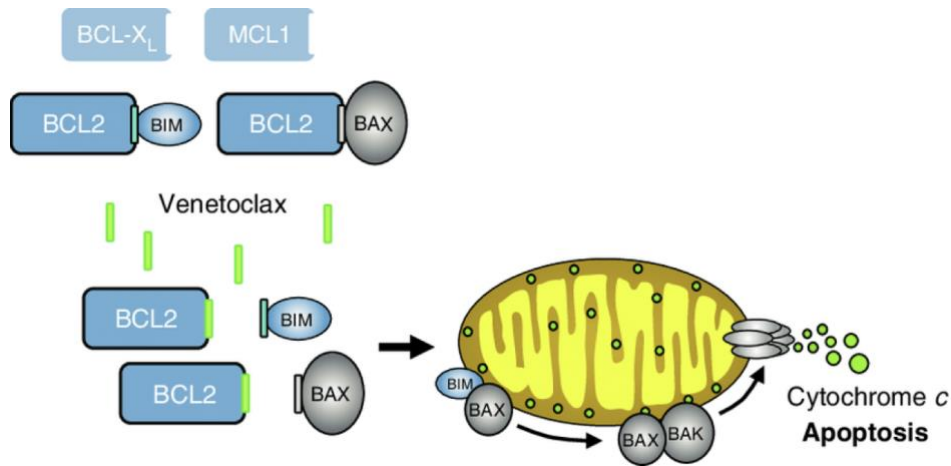


Figure 7: Schéma représentant le mécanisme d'action du Vénétoclax (33)

Le Vénétoclax est un inhibiteur sélectif d'une protéine anti-apoptotique, BCL2 (B cell lymphoma 2). Il agit en tant que mimétique du motif BH3 des protéines BAX et BIM, en se liant au sillon de liaison du BH3 sur la BCL2. Le motif BH3 libre induit par la suite l'activation des effecteurs apoptotiques (BAX et BAK) ce qui entraîne la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et la libération du cytochrome c dans le cytosol. Celui-ci va engendrer l'activation des caspases induisant ainsi l'apoptose. (34)(35)

Le Vénétoclax permet donc de limiter l'action de BCL2, une protéine qui présente une expression accrue dans les cellules cancéreuses et qui est responsable de la suppression de l'apoptose à médiation mitochondriale.

Dans les LSC, l'inhibition ciblée de BCL2 entraîne une diminution de la phosphorylation oxydative, une diminution des taux d'ATP et une augmentation de l'apoptose.

b. Mécanisme d'action de l'association Azactidine/Vénétoclax

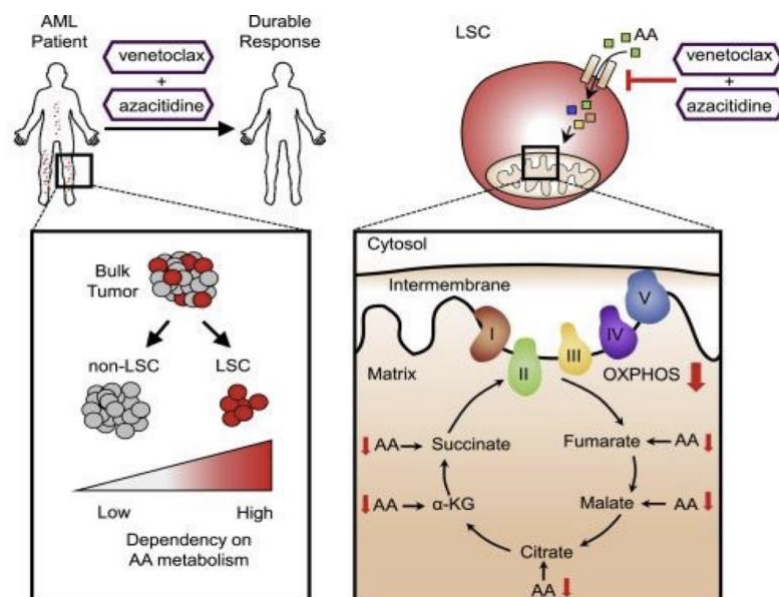


Figure 8: Résumé du ciblage de LSC par l'association AZA/VEN chez les patients atteints de LAM (36)

L'association Azacitidine/Vénétoclax (AZA/VEN) entraîne une diminution de l'absorption des AA dans les LSC et par ce fait une inhibition du mécanisme d'OXPHOS cellulaire ce qui entraîne à terme la mort cellulaire. En effet, ce sont des cellules très dépendantes du métabolisme des AA pour leur fonctionnement et leur survie du fait d'un métabolisme accru des AA comme le montre Jones et al (24)

L'étude sur les LSC menée par Pollyea et al. chez des patients traités par l'association AZA/VEN a montré une perturbation du cycle du TCA. Avec une diminution de l' α -cétooglutarate et une augmentation des niveaux de succinate, qui suggère une inhibition du complexe de la chaîne de transport d'électrons II (ETC II). En effet, le succinate est le substrat métabolique du complexe ETC II. La modélisation *in vitro* a confirmé l'inhibition du complexe II.

Ces perturbations métaboliques suppriment l'OXPHOS, ce qui cible efficacement et sélectivement les LSC. (37)

Les CSH et les blastes peuvent, contrairement aux LSC, réguler à la hausse leur glycolyse pour compenser la diminution du métabolisme OXPHOS dépendant des AA.

Les LSC présentes chez les patients atteints de LAM *de novo* sont différentes d'un point de vue métaboliques des LSC retrouvées dans les LAM en rechute. En effet, les LSC impliquées dans les rechutes peuvent compenser par d'autres voies métaboliques, comme un métabolisme accru des acides gras ce qui contribue directement au cycle de l'acide tricarboxylique (TCA), l'utilisation de cette voie métabolique peut être à l'origine de résistances thérapeutiques. Ce mécanisme est également retrouvé dans les blastes.

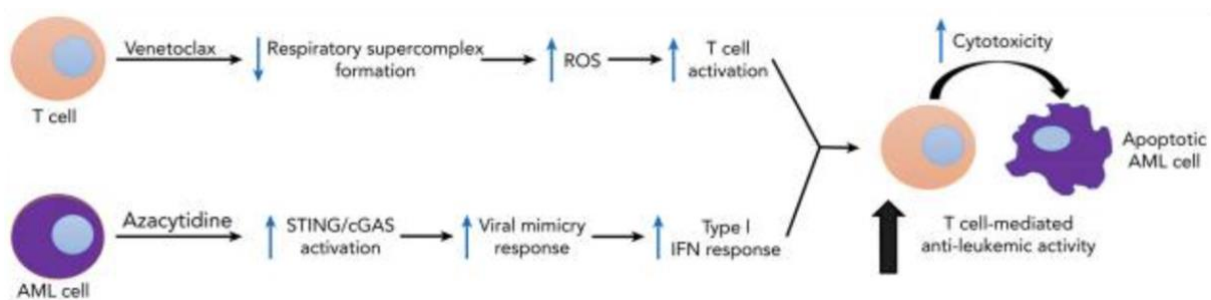


Figure 9: Schéma représentant le mécanisme d'action de la combinaison Azacitidine/Vénétoclax (38)

Un nouveau mécanisme d'action a été décrit en 2021 par Jong Bok Lee et al. Ce mécanisme à médiation immunitaire entraîne une augmentation accrue par le vénétoclax des espèces réactives de l'oxygène, ce qui augmente efficacement et de façon directe la fonction effectrice des lymphocytes T. En parallèle, l'azacitidine rend les cellules de LAM plus sensibles aux lymphocytes T de par l'activation de la voie STING/cGAS à l'origine d'un mimétisme viral dans les cellules leucémiques induisant une réponse d'interférons de type I. (38)

C. Tolérance

Les effets indésirables les plus fréquemment observés étaient surtout hématologiques (thrombopénie, neutropénie...) et gastro-intestinaux représentés par des troubles digestifs (nausée, vomissement...). (39) Ces effets indésirables sont concordants avec les résultats d'études précédentes et sont résumés dans le tableau 4 ci-dessous. (40)

Tableau 4: Effets indésirables après traitement par Azacitidine seule ou bithérapie AZA/VEN (40)

Event	Azacitidine–Venetoclax Group (N = 283)		Azacitidine–Placebo Group (N = 144)	
	All Grades†	≥Grade 3‡	All Grades†	≥Grade 3‡
	<i>number of patients (percent)</i>			
All adverse events	283 (100)	279 (99)	144 (100)	139 (97)
Hematologic adverse events	236 (83)	233 (82)	100 (69)	98 (68)
Thrombocytopenia	130 (46)	126 (45)	58 (40)	55 (38)
Neutropenia	119 (42)	119 (42)	42 (29)	41 (28)
Febrile neutropenia	118 (42)	118 (42)	27 (19)	27 (19)
Anemia	78 (28)	74 (26)	30 (21)	29 (20)
Leukopenia	58 (21)	58 (21)	20 (14)	17 (12)
Nonhematologic adverse events				
Nausea	124 (44)	5 (2)	50 (35)	1 (1)
Constipation	121 (43)	2 (1)	56 (39)	2 (1)
Diarrhea	117 (41)	13 (5)	48 (33)	4 (3)
Vomiting	84 (30)	6 (2)	33 (23)	1 (1)
Hypokalemia	81 (29)	30 (11)	41 (28)	15 (10)
Peripheral edema	69 (24)	1 (<1)	26 (18)	0
Pyrexia	66 (23)	5 (2)	32 (22)	2 (1)
Fatigue	59 (21)	8 (3)	24 (17)	2 (1)
Decreased appetite	72 (25)	12 (4)	25 (17)	1 (1)
Infections	239 (84)	180 (64)	97 (67)	74 (51)
Pneumonia	65 (23)	56 (20)	39 (27)	36 (25)
Serious adverse events§	235 (83)	232 (82)	105 (73)	102 (71)
Febrile neutropenia	84 (30)	84 (30)	15 (10)	15 (10)
Anemia	14 (5)	14 (5)	6 (4)	6 (4)
Neutropenia	13 (5)	13 (5)	3 (2)	3 (2)
Atrial fibrillation	13 (5)	10 (4)	2 (1)	2 (1)
Pneumonia	47 (17)	46 (16)	32 (22)	31 (22)
Sepsis	16 (6)	16 (6)	12 (8)	12 (8)

* The safety population included all patients who received at least one dose of azacitidine–venetoclax or azacitidine–placebo.

† Adverse events reported in at least 20% of patients in either treatment group are listed.

‡ Adverse events of grade 3 or higher that were reported in at least 10% of patients in either treatment group are listed.

§ Serious adverse events that were reported in at least 5% of patients in either treatment group are listed.

D. Efficacité

Avant l'utilisation de la combinaison azacitidine/vénétoclax, l'approche standard de soins des LAM chez les patients âgés non éligibles à la chimiothérapie intensive se basait sur le traitement par des agents hypométhylants (AHM) en monothérapie ou avec de la cytarabine à faible dose (LDAC).

Les AHM présentaient une efficacité qui restait modeste. (41) En effet, l'azacitidine seule permettait d'obtenir une rémission complète (RC), une RC avec récupération hématologique incomplète (RCi), ou une amélioration hématologique chez près de 50% des patients nouvellement diagnostiqués et chez 10 % des patients en rechute ou réfractaire au traitement (42). En parallèle, l'essai du vénétoclax en monothérapie a donné un taux de réponse globale très faible de 19% avec une durée médiane de rémission inférieurs à 8 semaines. (33)

Du fait de ces résultats insuffisants en monothérapie, des associations thérapeutiques ont été envisagées, notamment l'association vénétoclax et azacitidine. L'objectif est d'obtenir une efficacité clinique accrue et une synergie combinée. De nombreux essais cliniques ont mis en évidence l'efficacité de cette bithérapie.

Comme le montre l'étude de Pollyea et al. qui retrouve un taux de réponse global de 91% dont 61% de RC et 24% de RCi. (37)

L'essai de phase 1b rapporté en 2014 par DiNardo et al. a montré un taux de RC et de RCi de 73% pour cette association avec une dose de Vénétoclax de 400 mg. (40)

Les études précédentes ont mené à l'étude randomisée de phase 3 multicentrique contrôlée en double aveugle : VIALE-A qui a été publiée dans le New England journal of medicine en 2020. Cette étude a comparé l'efficacité de l'azacitidine seule avec celle de son association au vénétoclax. Elle a permis de prouver le gain d'efficacité par rapport au traitement par AZA seule. (39)

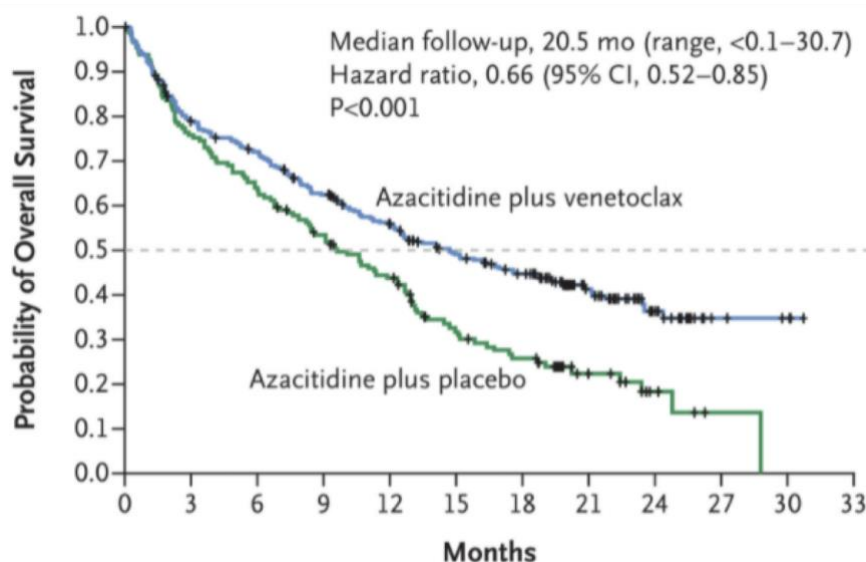


Figure 10: Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie globale chez les patients traités par la combinaison AZA/VEN ou par l'azacitidine seule (39)

Le critère de jugement principal était la survie globale, qui a été significativement plus importante suite au traitement par l'association AZA/VEN avec une médiane de 14,7 mois contre 9,6 mois dans le groupe témoin avec un rapport de risque de décès de 0,66 (IC à 95% = 0,52 à 0,85).

D'autres critères jugeant l'efficacité ont été étudiés, comme l'incidence de la rémission complète. Cette rémission était plus importante avec l'AZA/VEN (36,7 % contre 17,9 % ; $P < 0,001$), de même pour la rémission complète composite (RC ou RCi) (66,4 % contre 28,3 % ; $P < 0,001$).

Il a également été observé que chez les patients présentant les mutations *IDH1* ou *IDH2* à l'inclusion, le risque relatif de décès était significativement plus faible 0,34 (IC à 95 % 0,20 - 0,60) suite au traitement par l'association AZA/VEN. (39) Ce risque relatif a été estimé à l'aide du modèle à risques proportionnels de Cox non stratifié.

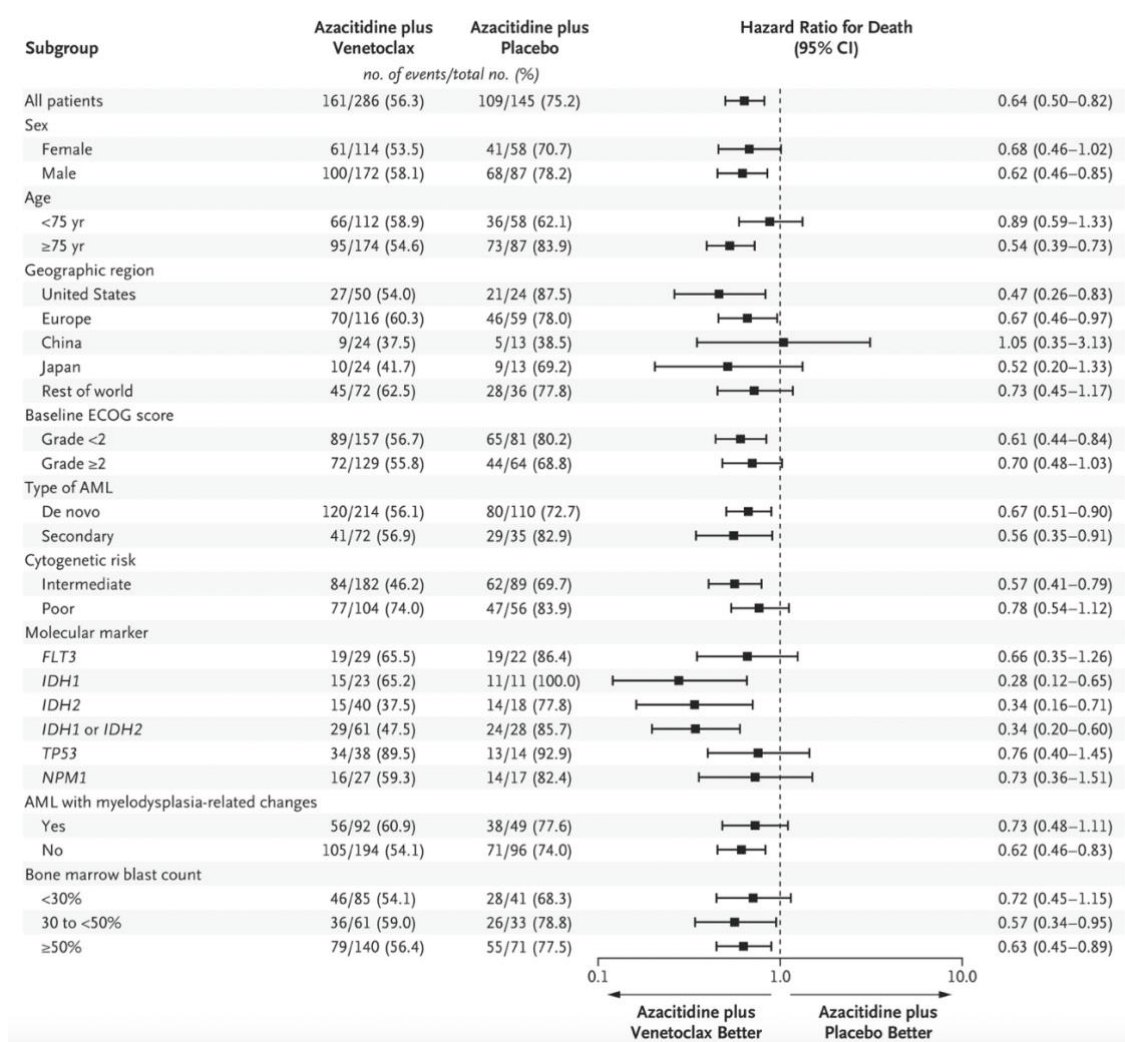


Figure 11: Analyse du sous-groupe de la survie globale comparant la bithérapie AZA/VEN avec Azacitidine+Placebo (39)

Enfin, une étude visant à évaluer l'efficacité de la bithérapie azacitidine/vénétoclax dans la « vie réelle » a montré une efficacité moindre de cette association avec une survie globale de 381 jours contre 880 jours dans les essais cliniques.

Cette efficacité a également été comparée à une modélisation dans laquelle les patients étaient traités par chimiothérapie intensive. Les résultats ont permis de montrer une absence de différence entre les taux de réponse pour les 2 prises en charge, cependant les taux de mortalité précoce en post traitement par la combinaison AZA/VEN étaient inférieurs à ceux attendus avec le traitement d'induction. (43)

L'étude de Cherry et al. a également montré des taux de réponses équivalents entre ces deux lignes de traitement. (44)

E. Mécanismes influençant la réponse à l'association AZA/VEN

a. Mutations d'*IDH1* et d'*IDH2*

Les mutations *IDH1* et *IDH2* sont décrites chez près de 20% des patients atteints de LAM avec une prévalence plus importante chez les personnes âgées. (45) Plus rarement, ces deux mutations peuvent être simultanément présentes chez un même patient. (46)

Elles ont lieu sur des résidus d'arginine conservés au niveau du site actif enzymatique : le locus R132 d'*IDH1* et le locus R140 ou R172 d'*IDH2*. (45)

Ces mutations associées à la LAM entraînent une défaillance au niveau du cycle de Krebs en induisant une formation du 2-Hydroxyglutarate à la place de l'alpha-cétoglutarate. Le 2-Hydroxyglutarate est un oncométabolite, qui va inhiber de manière compétitive les enzymes de la famille TET et les lysines déméthylases ce qui va conduire à une hyperméthylation de l'ADN. (47) (48)

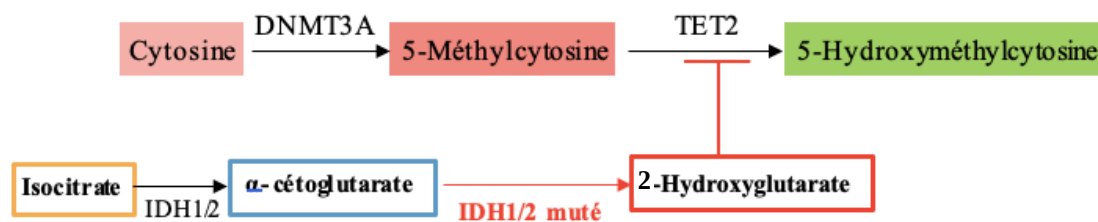


Figure 12: Mécanisme physiologique ou leucémique de la méthylation de l'ADN suite à la mutation d'*IDH1/2*, inspiré d'Eriksson et al. 2015 (49)

Elle engendre aussi des perturbations de certains facteurs de transcriptions. Ces modifications sont à l'origine de lésions de l'ADN et d'une altération de la différenciation et de la prolifération cellulaire.

Le 2-HG entraîne une inhibition de l'activité de la COX dans la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, ce qui a pour conséquence un abaissement du seuil mitochondrial nécessaire pour déclencher l'apoptose à la suite de l'inhibition de BCL2. (45)(50)

Dans l'étude de Pollyea et al., les patients *IDH1/2mut* obtiennent des taux de RC et de RCi plus élevés avec l'association AZA/VEN (72%) par rapport aux patients avec *IDH* non mutés (60%). Ces mutations d'après l'étude de Pollyea et al. entraînent donc une plus grande sensibilité au traitement par le vénétoclax. (51)

b. Mécanismes de résistances

Malgré tous ces résultats prometteurs de l'association de AZA/VEN dans le traitement de la LAM, il existe encore des patients réfractaires et d'autres qui rechutent. Il est donc capital de caractériser les différents mécanismes de résistances afin de pouvoir les cibler et ainsi améliorer la prise en charge.

Plusieurs mécanismes ont été décrits dans la littérature :

- **L'exposition à la chimiothérapie** : les LSC des patients en rechute de leur LAM ne dépendent plus du métabolisme des AA en raison de leur capacité à compenser par un métabolisme accru des acides gras. (36) De plus, lors d'une rechute en post traitement une sélection a lieu et la signature épigénétique du clone le plus apte à évoluer prédomine.(52) L'étude de Shanshan Pei et al a montré que chez certains patients atteints de MMP-LAM c'est-à-dire une LAM mixte monocyttaire/Primitive, la bithérapie AZA/VEN pouvait être à l'origine de la maladie monocyttaire lors de la rechute chez ces derniers. Ceci est le résultat de la sélection de sous-clones monocytaires préexistants. (53)
- **Statut de différenciation** : les LAM monocytaires (FAB LAM5) perdent l'expression de BCL2, protéine cible du Vénétoclax à l'origine d'une résistance au traitement. Ils dépendent préférentiellement de MCL1 pour le métabolisme énergétique et la survie. (53)

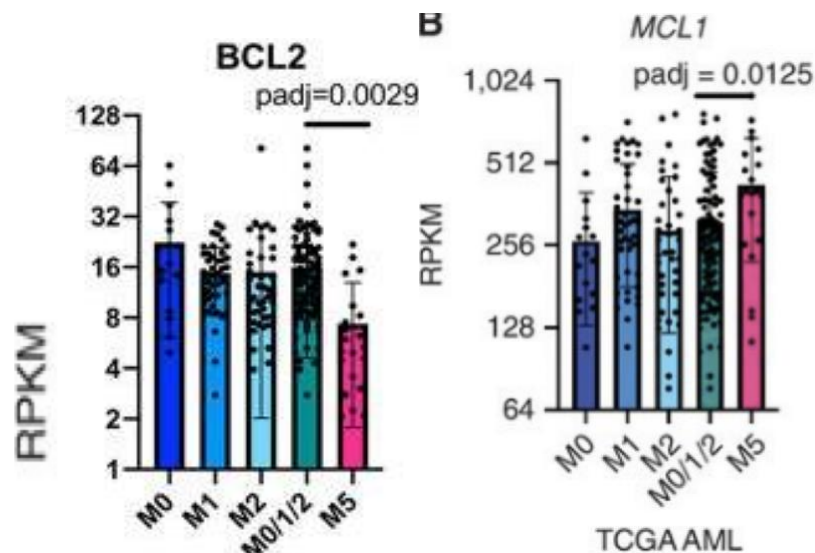


Figure 13: Graphiques montrant l'expression de BCL2 et de MCL1 dans les sous-classes FAB de M0 à M5 à partir du jeu de données TCGA (53)

- **La mutation de *TP53*** : La mutation de *TP53* peut affecter l'expression des protéines anti-apoptotiques tel que BCL2 et BCL2L1 ou bien engendrer une perte de la fonction de BAX. (54) Les patients présentant cette mutation ont montré dans de nombreuses études des réponses plus faibles à l'association AZA/VEN (55)(ex : sans mutation RC/RCi de 70% vs 47% chez les patients avec mutation *TP53*)(56)
- **Les modifications de la structure mitochondriale** : Les cellules de LAM résistantes au vénétoclax présentent des crêtes plus serrées et en plus grand nombre par mitochondrie que les clones sensibles. Il existe également une légère augmentation des transcrits CLPB dans les cellules résistantes au vénétoclax, ce CLPB permet le maintien de la structure des crêtes mitochondriales. (57)
- **Expression élevée de S100A8 et S100A9** : Le complexe S100A8/A9 a comme rôle de lier le calcium cytosolique libre. Lors de la surexpression de ce complexe, cela va entraîner un empêchement de la migration du calcium vers les mitochondries et ainsi l'initiation de l'apoptose. (58)

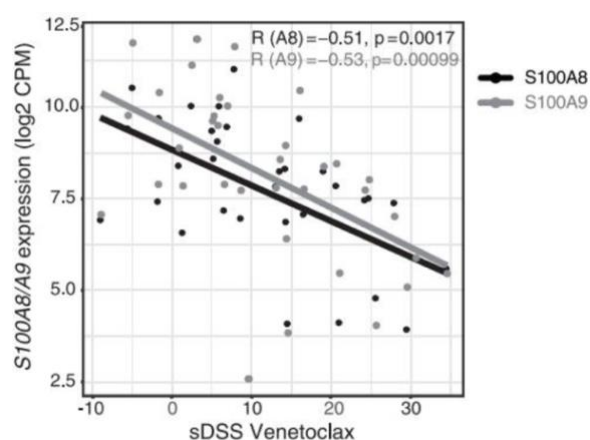


Figure 14: Corrélation inverse de la sensibilité au vénétoclax (sDSS) par rapport à l'expression de S100A8/A9 (58)

- **Le Métabolisme du Nicotinamide** : Ce mécanisme a été mis à jour par la démonstration d'un plus fort taux de précurseurs NAD⁺ dans les LSC de LAM en rechute par rapport aux LSC de LAM *de novo*. Cette différence de taux dans les LSC résistantes serait due à l'augmentation de l'absorption du nicotinamide à l'origine de l'activation du métabolisme des AA et de l'oxydation des AG qui alimente le mécanisme d'OXPHOS permettant ainsi aux LSC de contourner les effets cytotoxiques de la chimiothérapie.(59)

III. La maladie résiduelle

1. Définition et intérêts cliniques

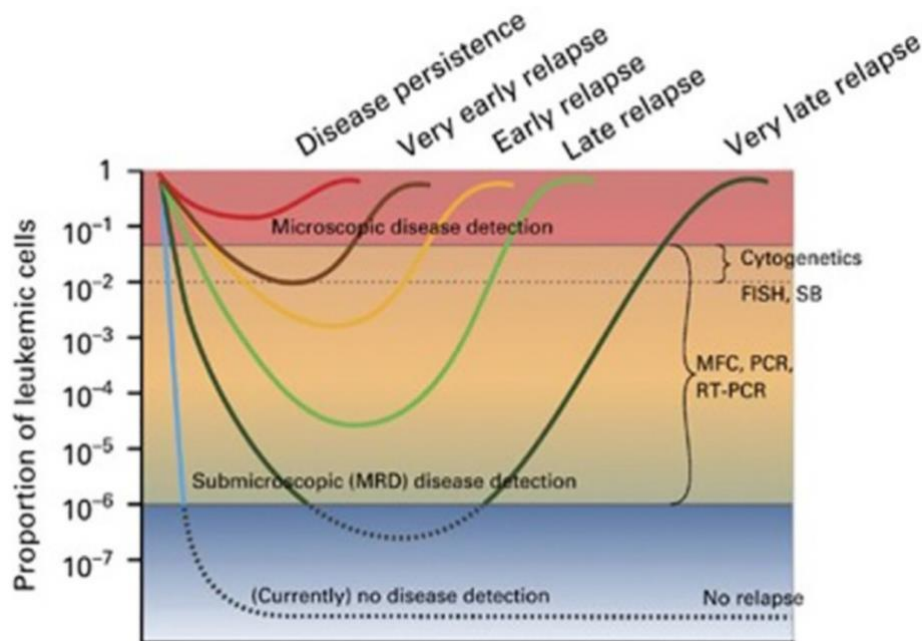


Figure 15: Le concept de la MRD avec les différentes possibilités de modifications de la charge cellulaire leucémique à la suite du traitement (60)

La maladie résiduelle mesurable, en anglais Measurable Residual Disease (MRD) désigne la persistance post thérapie de cellules leucémiques ne pouvant pas être détectées par une analyse cytomorphologique standard. (61)

C'est dans les années 90 que la notion de MRD est apparue grâce au développement de nouvelles techniques de détection plus sensibles que l'analyse cytologique comme la biologie moléculaire ou encore la cytométrie en flux (CMF). (62)

La recherche de la MRD chez les patients atteints de LAM post chimiothérapie intensive a été validée par de nombreuses études comme étant un outil essentiel dans l'évaluation pronostique et prédictive de l'efficacité de la réponse au traitement ainsi que dans la prédiction de la survie globale et du risque de rechute. (61)(63)

La recherche de la MRD permet donc d'adapter le traitement post rémission en fournissant un moyen de surveillance permettant une intervention précoce en cas de rechute. (64)

La MRD pré-transplantation a également prouvé qu'elle était prédictive de la survie globale ainsi que de la rechute.(65)

Cependant, il n'existe pas encore assez de données pour définir le rôle pronostique de la recherche MRD chez les patients traités par des chimiothérapies de faible intensité telle que l'association azacitidine/vénétoclax. Une étude récente menée par Pratz et al. a montré l'importance de la recherche de la MRD pour prédire la survie mais d'autres études sont encore nécessaires . (66)

La MRD fait partie des critères de réponse au traitement par l'ELN 2021, ces critères sont séparés en 4 groupes :

Tableau 5: Critères de réponse au traitement selon l'ELN 2021(67)

Catégorie	Critères
RC avec MRD-	Rémission morphologique complète + MRD négatif dans toutes les technologies utilisées (CMF, qPCR, NGS) sur MO.
RC avec MRD +	Rémission morphologique complète + MRD positif dans toutes les technologies qui ont été utilisées (CMF, qPCR, NGS) sur sang périphérique ou MO
RC avec détection moléculaire de MRD à faible niveau	Rémission morphologique complète + MRD moléculaire détectable à faible niveau dans le sang périphérique et/ou MO, c'est-à-dire qPCR pour <i>NPM1</i> <2% ou NGS-MRD <0.1% mais au-dessus de la limite de détection du test.
Rechute de la MRD	Conversion de la négativité MRD en positivité MRD indépendant de la technique MRD ou augmentation du nombre de copies MRD $\geq 1 \log 10$ entre n'importe quel 2 échantillons positifs chez des patients atteints de CR-MRD-LL qui sont surveillés par qPCR et enfin ces résultats doivent être rapidement confirmés sur un deuxième échantillon consécutif qui devrait de préférence être un échantillon de MO.

Il est important de noter qu'une MRD négative ne signifie pas une éradication certaine de la maladie mais uniquement une maladie inférieure au seuil de détection du test dans l'échantillon. (67)

Récemment, le LeukemiaNet européen (ELN) un groupe de travail MRD qui évalue la normalisation et l'harmonisation de la MRD a mis à jour les recommandations de 2018 afin d'optimiser l'utilisation des différentes techniques dans la recherche de la MRD. (67)

2. Les techniques d'évaluation de la MRD

Différentes techniques existent, tels que l'immunophénotypage par CMF, la biologie moléculaire par qRT-PCR et le NGS (next generation sequencing). D'autres techniques comme la cytogénétique, la FISH (fluorescent *in situ* hybridization), la ddPCR (digital droplet PCR) permettent également cette évaluation mais ne sont pas utilisées dans la pratique courante.

A. La cytométrie en flux (CMF)

a. Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) est une technique d'analyse qui permet de caractériser et de quantifier des cellules présentes en suspension dans un flux liquidien. Les cellules subissent une excitation par différents lasers monochromatiques et seront caractérisées en fonction de leur taille (Forward Scatter = FSC) ou de leur structure cellulaire (Side Scatter = SSC).

Ils pourront également être différenciés selon leur phénotype grâce à des anticorps monoclonaux communément appelés CD pour Cluster de Différenciation qui seront couplés à des fluorochromes. Suite à leur excitation il en résulte une émission de lumière à une longueur d'onde plus élevée que celle de la lumière excitatrice. Cette lumière émise sera captée par les photomultiplicateurs (PMT) et sera à l'origine d'un signal électrique amplifié puis traduit informatiquement en données numériques qui pourront être affichées sous forme d'histogramme (figure 14).

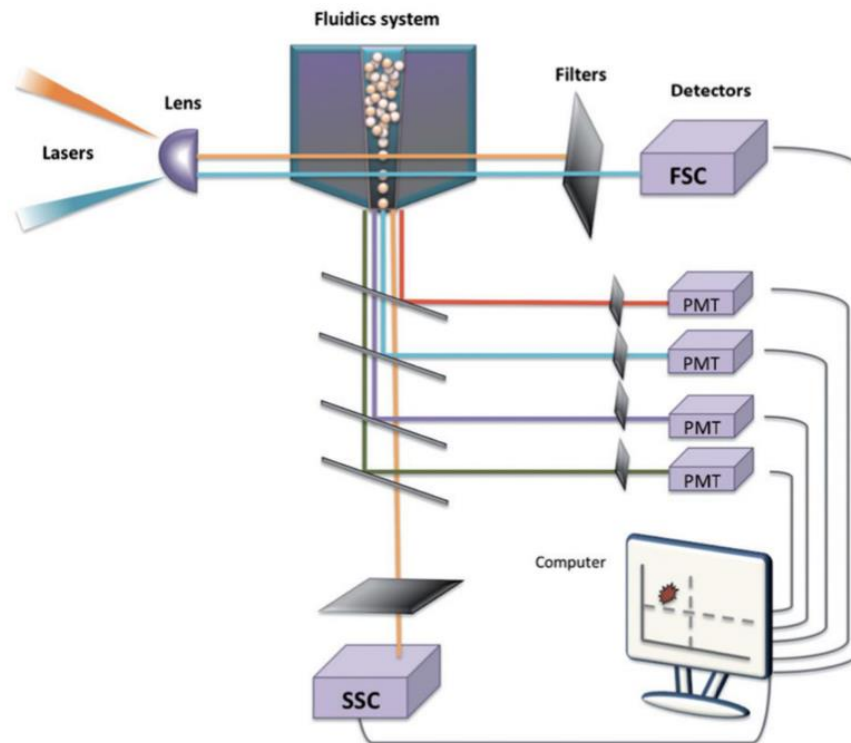


Figure 16: Représentation schématique des 3 différents systèmes d'un cytomètre : Système fluidique, système optique et système informatique (68)

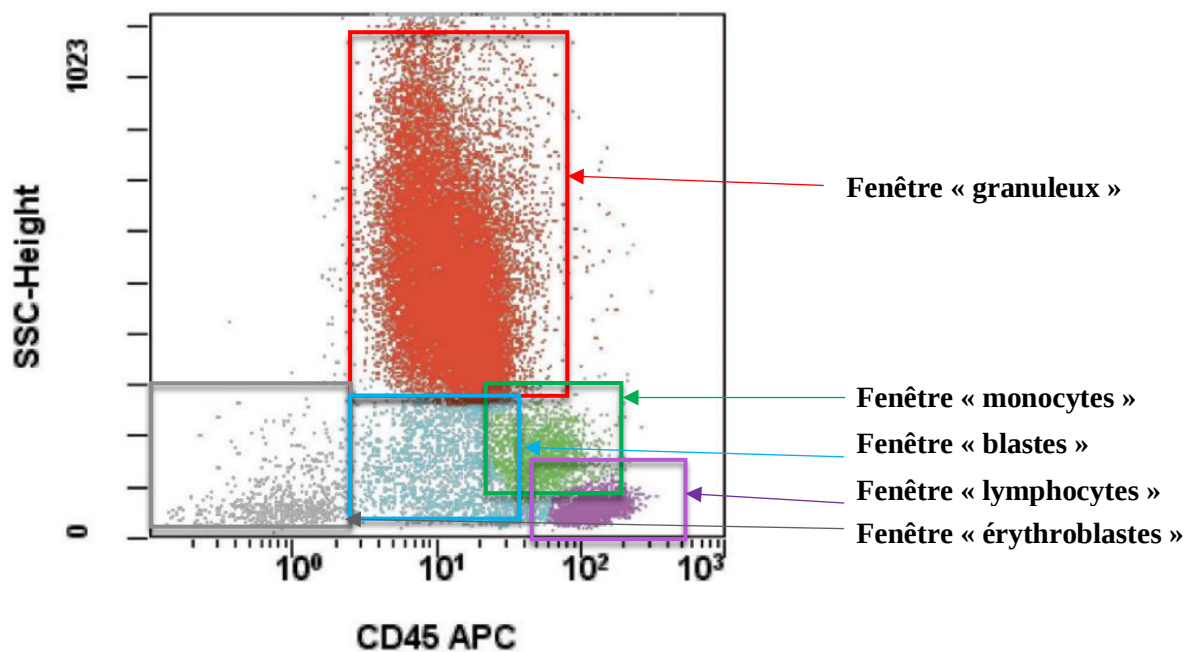


Figure 17: Histogramme bi-paramétrique CD45 (abscisse) Side scatter (SSC, ordonnée)d'une moelle osseuse normale (69)

**b. L'approche LAIP « Leukemia Associated Immunophenotype » et CMF-DfN
« different from normal »**

Elle permet de mettre en évidence des anomalies d'expression d'antigènes tels que l'expression de marqueurs d'une autre lignée myéloïde, un asynchronisme d'expression ou encore une modification de l'intensité d'expression de marqueurs de la lignée myéloïde (sur ou sous-expression). Toutes ces anomalies vont permettre de différencier ces cellules des cellules de l'hématopoïèse normale. (70)

Tableau 6: L'incidence de LAIP dans les LAM (70)

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

La LAIP permet d'identifier les différentes populations blastiques et de les suivre dans le temps grâce à un panel d'anticorps de dépistage qui sélectionne des combinaisons d'antigènes au moment du diagnostic. Chacune de ses combinaisons d'antigènes doit être présente sur moins de 0,1 à 0,01% des cellules nucléées normales de la MO et sur au moins 5 à 10% des cellules leucémiques de sorte que dans un échantillon adéquat, un seuil de sensibilité de détection de 10^{-3} à 10^{-4} puisse être atteint. (71)

L'inconvénient majeur de cette approche est la possibilité de la survenue d'une modification des LAIP en post-chimiothérapie ce qui peut conduire à des faux négatifs. (72)

La DfN utilise un panel d'anticorps fixe et permet donc de montrer une différence d'expression d'un marqueur en le comparant à une MO normale et cela quel que soit l'immunophénotypage leucémique au diagnostic ce qui permet d'éviter les faux négatifs qui sont dus aux changements phénotypiques et aux sous-clones émergents. (71)(73)

L'ELN conseille une approche combinée LAIP/DfN et a récemment mis à jour ces recommandations concernant la MRD en CMF (tableau 7) pour obtenir la technique la plus optimale possible tout en permettant une certaine harmonisation des pratiques. (67)

Tableau 7: Recommandations de l'ELN 2021 concernant la MRD en CMF (67)

Recommandations

A1	When available, a diagnostic sample is preferred to a) determine if a patient has a diagnostic flow cytometric MRD target, b) assess treatment efficacy on potential clearance of the diagnostic-LAIP populations.
A2	Implementation of a minimum required set of tubes/ fluorochromes combination is a prerequisite for harmonized LAIP/DfN MRD detection, analysis and reporting.
A3	We recommend harmonized use of the integrated diagnostic-LAIP and DfN strategy for MRD detection that incorporates core MRD markers CD34, CD117, CD45, CD33, CD13, CD56, CD7, HLA-DR to assess all samples.
A4	Particular attention should be devoted to evaluating expression of the identified aberrant immunophenotypes in control samples that include regenerating BM.
A5	When immunophenotypic abnormalities in specific samples may reflect transient features of regenerating or ‘stressed’ hematopoiesis, the MRD report should comment on this possibility and note that a repeat sample in 2-4 weeks, if clinically indicated, may be informative.
A6	Request first pull BM aspirate for MRD, process sample within 3 days of storage, undiluted, at ambient conditions.
A7	For samples stored at ambient temperature >3 days, the MRD report should make specific note of potentially compromised cell viability.
A8	Explore strategies to assess hemodilution that can be incorporated and reported as part of the MRD assay.
A9	For clinical decision making, MRD assessment should be performed with a qualified assay as based on the guidelines for rare events in MFC.

A10	To ensure the best quality of relevant events acquisition, use a gating syntax including FSC versus time and doublet exclusion plots.
A11	The standard for determining MFC MRD negativity is the acquisition of >500,000 CD45+ cells and a least 100 viable cells in the blast compartment assessed for the best aberrancy(s) available.
A12	Lower limit of detection (LLOD) and Lower limit of quantification (LLOQ) should be calculated to assess MFC-MRD assay performance.

c. Approche des cellules souches leucémiques

Il est important de rechercher les LSC étant donné leur capacité à résister aux traitements et à induire des rechutes. Un taux important de LSC a également été associé à un facteur prédictif de survie globale ou de rechute chez les patients atteints de LAM. (74) (75)(76)

L'immunophénotypage permet de détecter la présence de ces LSC grâce à l'utilisation de différents marqueurs permettant de les distinguer des CSH (tableau 8). (77)(78)

Tableau 8: Liste des marqueurs phénotypiques pour la détection des LSC d'après l'étude de Hanekamp et al. (77)

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. L'analyse non supervisée

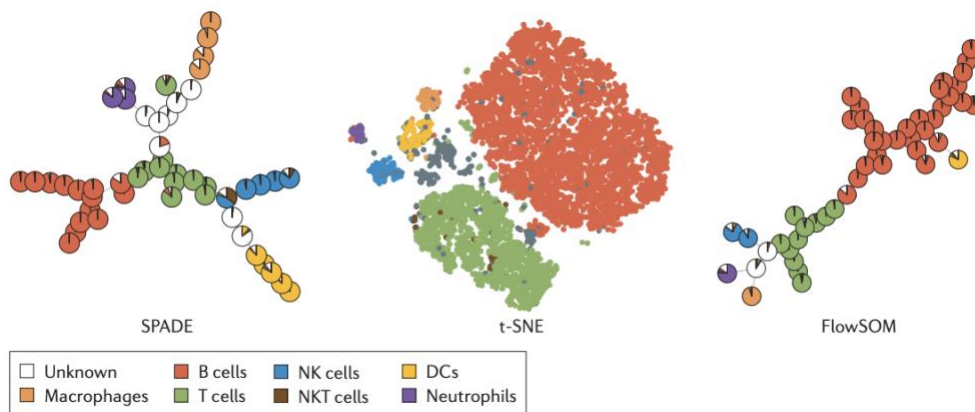


Figure 18: Évaluation de trois techniques de visualisation alternatives à l'aide d'ensemble de données d'ensemble de données à sélection manuelle (79)

Il existe plusieurs algorithmes et logiciels permettant de limiter l'intervention d'un opérateur dans la stratégie de regroupement des événements, ce qui en fait des analyses non supervisées. C'est à partir d'une analyse mathématique que l'identification des sous-groupes et leur nombre sont générés. Ces nouvelles techniques d'analyse permettent de regrouper sur un graphique en deux dimensions de nombreux paramètres sans laisser place à la subjectivité, ce qui rend l'analyse des données plus facile, permettant de s'affranchir des stratégies plus ou moins subjectives de fenêtrage. (79)

Il existe 2 types d'approche :

- Celle se basant sur la formation de clusters, elle regroupe les informations sur de nombreuses cellules, avec une image moyenne de chaque cluster = type de cellules. Ex : PhenoGraph, « Spanning-tree Progression Analysis of Density normalized Events » SPADE, Citrus et enfin le « Flow-Self Organizing Map » FlowSOM. (80)(81)(82)(83)
- Celle se basant sur la réduction du nombre de dimensions, elle permet de caractériser chaque cellule par un point de données. Ex : t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) et visualizing data using t-SNE (viSNE) (84)(85)

Dans cette étude, le FLOWSOM a été utilisé de par ses nombreux avantages tels qu'une grande sensibilité et une vitesse de rendu de résultats rapide.(86) La technique sera détaillée dans la partie matériel et méthodes.

B. La biologie moléculaire : qRT-PCR ou NGS

Il existe deux principales approches qui permettent d'étudier la MRD par biologie moléculaire.

- Le séquençage haut débit NGS (Next generation sequencing) (64)
- La qRT-PCR (quantitative Reverse transcriptase – Polymerase Chain Reaction) traditionnellement utilisée et également la PCR numérique (dPCR). La RT-PCR quantitative en temps réel utilise une approche basée sur l'ARN en effectuant d'abord la transcription inverse (RT) pour générer de l'ADN complémentaire avant l'étape de la PCR quantitative (qPCR) ce qui permet le clonage des points de cassure des réarrangements chromosomiques dans la LAM. (71) L'applicabilité de la PCR est limitée à environ 40 à 60 % des cas de LAM avec une ou plusieurs anomalies pouvant être ciblées, tel que les mutations moléculaires le plus fréquemment observées : *NPM1*, *RUNX1-RUNX1T1* (translocation des chromosomes 8 et 21), *CBFB-MYH11* (inversion du chromosome 16 ou translocation des chromosomes 16), *PML-RARA* (translocation des chromosomes 15 et 17)

Tableau 9: Comparaison des différentes techniques d'évaluation de la MRD selon Dix et al. (87)

Méthodologie MRD	Sensibilité	Avantages	Inconvénients
CMF-LAIP	1 sur 10^3 - 10^5	- Sensible - Technologie largement disponible - Applicable >90% des patients - Délai d'exécution rapide	- Nécessite un échantillon du diagnostic - Panel d'anticorps étendu requis - Ne tient pas compte des changements phénotypiques - Standardisation limitée
CMF-DfN	1 sur 10^3 - 10^5	- Sensible - Aucun échantillon de diagnostic requis - Les changement phénotypiques n'interféreront pas avec les résultats - Applicable à >90% des patients - Délai d'exécution rapide	- Expérience significative de l'opérateur requise - Standardisation limitée
qPCR	1 sur 10^4 - 10^6	- Sensible - Standardisé	- Cibles appropriées présentes chez seulement 60% des patients - Nombreuses mutations ne conviennent pas à la MRD (telles que <i>FLT3</i>) - Long
NGS	Variable	- Potentiellement très sensible - Multiples mutation détectées/suivis à la fois	- Confondu par des mutations pré-leucémiques - Long - Technologie pas largement disponible - Taux d'erreur - Chère - Non standardisé - Interprétation complexe

IV. Recherche de la maladie résiduelle par CMF chez les patients traités par l'association AZA/VEN

A. Objectif

L'impact pronostique de la MRD en post bithérapie azactidine/vénétoclax est très peu connu. En effet, peu d'études se sont jusqu'à maintenant intéressées à l'intérêt de la recherche de la MRD en post chimiothérapie non intensive.

Notre étude vise donc à évaluer l'intérêt pronostique de la recherche de la MRD par cytométrie en flux, grâce à la méthode FlowSOM, après deux cures d'azacitidine/vénétoclax.

Nous avons également évalué la recherche de la MRD chez un sous-groupe de patients présentant les mutations *IDH1* et *IDH2* avec comme objectif secondaire d'identifier une éventuelle modification de l'impact pronostique chez ces patients.

B. Matériel et méthodes

a. Patients

Au CHU de Toulouse, 815 personnes ont eu un diagnostic de LAM ou ont rechuté entre janvier 2020 et mars 2022. Lorsque les prélèvements étaient disponibles, la MRD a été analysée par cytométrie en flux.

Au total, 107 patients âgés de 21 à 86 ans ont été analysés avec une médiane d'âge de 74 ans . 43% de notre cohorte étaient des femmes (n=46) et 57 % étaient des hommes (n=61).

Les paramètres évalués sont : la survie globale (OS), la survie sans événements (EFS) et l'indice cumulé de rechute (CIR).

b. Cytomètre et le panel d'anticorps

A l'IUC-T Oncopole, on utilise comme cytomètre le modèle Navios EX 10 Couleurs/3 lasers Beckman Coulter. Cet instrument comprend 10 canaux de détection de fluorescence : 2 pour le laser violet (405nm), 5 pour le laser bleu (488nm) et 3 pour le laser rouge (638nm).

La MRD a été mesurée chez tous les patients suivant l'approche LAIP, l'approche LSC ou l'approche combinée LAIP/LSC.

Pour l'approche LAIP, on a utilisé un panel de 9 anticorps (tableau 9) et pour l'approche LSC, 6 anticorps ont été utilisés pour cibler ces cellules (tableau 10).

Tableau 10: Anticorps et fluorochromes utilisés dans le panel LAIP

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

Tableau 11: Anticorps et fluorochromes utilisés dans le panel LSC

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

c. Logiciels

Kaluza version 2.1 est un logiciel d'analyse de cytométrie en flux qui permet le traitement des données brutes provenant du cytomètre, l'affichage des différents graphiques et le paramétrage.

Le **Plugin R Console** version 3.3.2 permet de créer des scripts et des fonctions directement intégrées dans Kaluza et de préparer les données pour une analyse plus approfondie tout en analysant par lots tous les ensembles de données.

Par la suite, **FlowSOM** a été utilisé pour l'analyse de cluster hiérarchique à l'aide du plug-in R Console. Ce nouvel outil d'intelligence artificielle permet l'analyse non supervisée des données de la CMF en créant des « Self Organization Map = SOM ». (88) La carte auto-organisée résultante est affichée sous forme de carte en étoile. Le calcul de la MRD y est effectué par comparaison du patient avec un échantillon de moelles normales prélevées dans un contexte de moelle osseuse sans hémopathie ou de moelle en régénération.

Avant de lancer l'analyse, il est important de ne pas prendre des doublets et de bien sélectionner toutes les cellules de l'échantillon pour ne pas exclure la population d'intérêt. Il faut par la suite effectuer des vérifications des réglages des compensations avant de passer à la normalisation par les scripts puis à l'analyse par FlowSOM.

Enfin, un fichier fusionné est constitué par des données de moelles normales, des moelles du diagnostic et du suivi, puis la recherche de la MRD est effectuée par le fenêtrage des nœuds dans lesquels se trouvent les cellules leucémiques.

L'algorithme de FlowSOM selon Van Gassen et al est divisé en 4 étapes : La première vise à lire les données, la seconde à créer une carte auto-organisée « Self-Organizing Map », la troisième à créer un arbre à portée minimale « Minimal spanning tree » qui représente les SOM sous forme de graphique et enfin la dernière étape se définit par le calcul d'un résultat de méta-clustering qui consiste à rendre des sous-catégories de clusters déjà existants.(83)

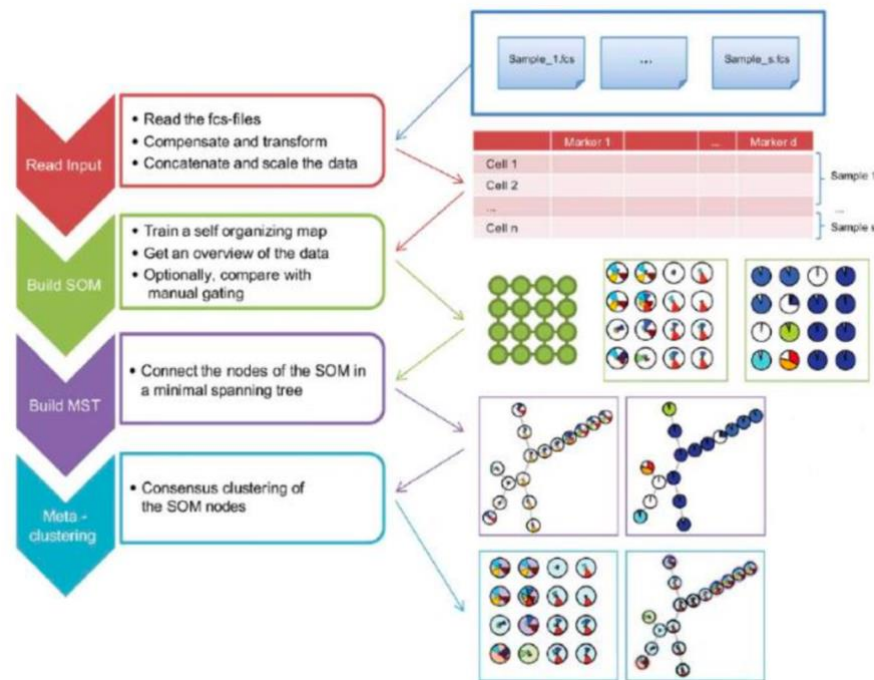


Figure 19: Présentation des 4 étapes de l'algorithme FlowSOM (83)

d. Analyses statistiques

Dans cette étude, les variables qualitatives sont exprimées en pourcentage et les variables quantitatives sont exprimées en médiane et en moyenne.

Les critères de jugement sont la survie globale (OS), la survie sans évènement (EFS), l'indice cumulé de rechute (CIR) et enfin l'évaluation du taux de rémission complète (RC) selon le traitement.

Les taux de **survie globale** ont été mesurés de la date du diagnostic jusqu'au décès.

Les taux de **survie sans évènement** ont été mesurés de la date du diagnostic à la date du premier évènement (décès, rechute ou échec du traitement).

Les **indices cumulés de rechute** ont été mesurés de la date de la rémission complète jusqu'à la rechute de la LAM.

Tous ces taux ont été estimés par la méthode de **Kaplan-Meier** et comparés à l'aide du test du log-rank où il a été fixé comme résultat significatif un $p < 0,05$.

Les modèles multivariés de **COX et de FINE & GRAY** ont été utilisés pour l'évaluation de l'impact que peut avoir différents paramètres sur l'OS, l'EFS et la CIR.

C. Résultats :

Description de la cohorte

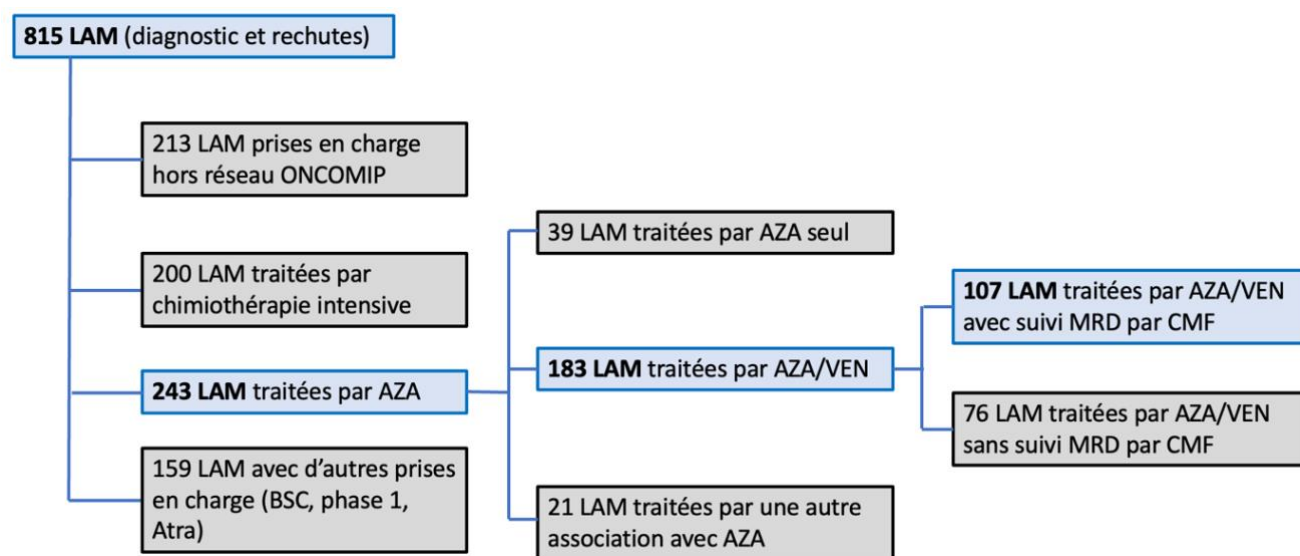


Figure 20: Diagramme de flux

A l'IUCT-Oncopole, 815 patients ont eu un diagnostic de LAM ou ont rechuté entre janvier 2020 et mars 2022.

Parmi ces patients, 183 patients ont été traités par la combinaison AZA/VEN. Nous avons inclus **107 patients** dans notre étude dont 46 femmes et 61 hommes âgés de 21 à 86 ans, avec une médiane à 74 ans et une moyenne à 71 ans et 76 patients ont été exclus en raison de l'absence de suivi de la maladie résiduelle par cytométrie en flux.

Comparaisons de l'association AZA/VEN à l'AZA en monothérapie :

Les 170 patients qui ont été traités par la combinaison AZA/VEN ont une médiane de survie globale supérieure aux 180 patients traités par l'azacitidine seule (15 mois contre 8,8 mois). Cette différence est statistiquement significative (log rank test $p=0,0040$). La médiane de suivi était de 9,4 mois (**figure 22**).

Nous avons également retrouvé un taux de rémission complète (RC) chez les patients traités par AZA/VEN (RC= 75%) significativement supérieur au taux de RC chez les patients traités par AZA seule (RC =35%) (**figure 23**).

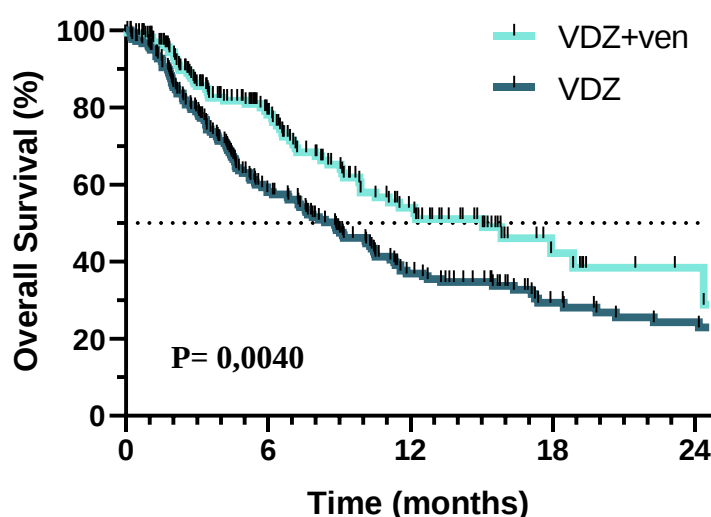


Figure 21: Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie globale chez les patients traités par la combinaison AZA/VEN ou par la monothérapie Azacitidine (VDZ)

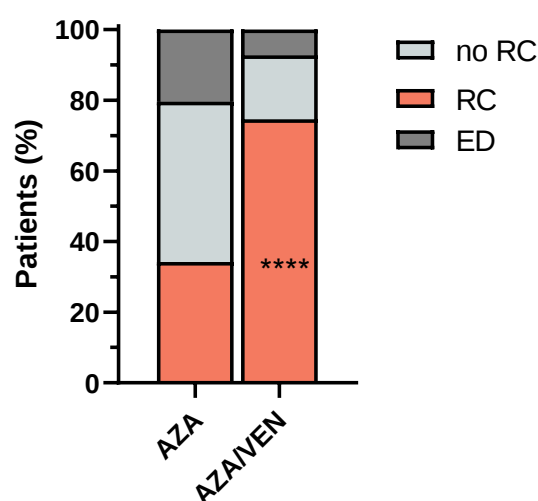


Figure 22: Taux de rémission complète (RC), d'absence de rémission (no RC) et de décès prématuré (ED) selon le traitement par AZA/VEN ou AZA seule

L'impact de l'AZA/VEN sur les LSC :

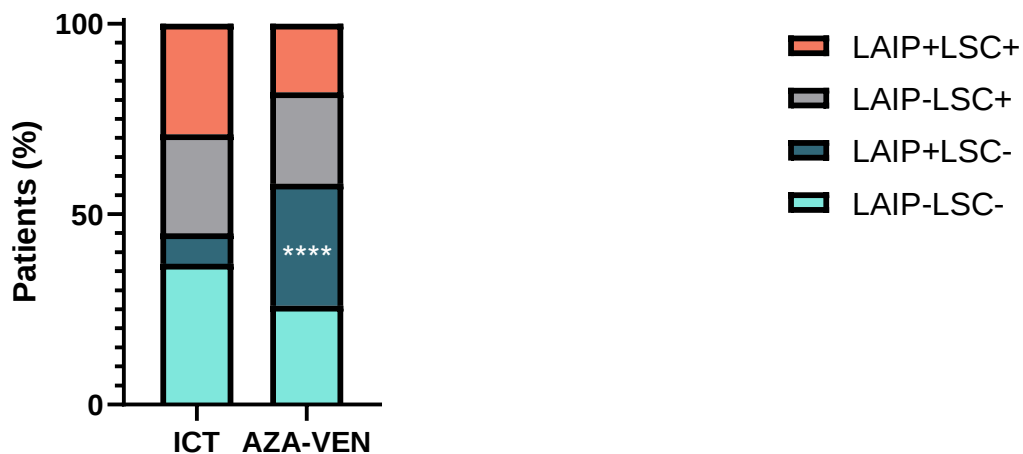


Figure 23: Évaluation de l'association MRD LAIP/LSC selon le traitement par la bithérapie AZA/VEN ou bien par ICT

Chez le groupe de patients traités par l'association AZA/VEN avec l'approche combinée LAIP/LSC, le pourcentage de patients LAIP+LSC- est statistiquement plus important que chez les patients traités par la chimiothérapie intensive (ICT).

Les groupes de patients LAIP-LSC-, LAIP+LSC+ et LAIP-LSC+ n'ont pas montré de différences statistiquement significatives (**figure 24**).

Évaluation de l'impact pronostique de la MRD par CMF en post 2 cures d'azacitidine/vénétoclax ;

1. Approche LAIP

a. Survie Globale

Les résultats obtenus dans notre cohorte de 107 patients ont montré que 55 patients (51,4 %) ont une MRD LAIP négative et que 52 patients (48,6 %) ont une MRD LAIP positive, au seuil de 0,1% établi par l'ELN et en respectant un pourcentage d'évènements positifs au moins deux fois plus important à celui des moelles normales.

L'approche LAIP n'a pas montré de résultats statistiquement différents pour la survie globale chez les patients MRD positive ou non (log-rank test $p = 0,12$, figure 25).

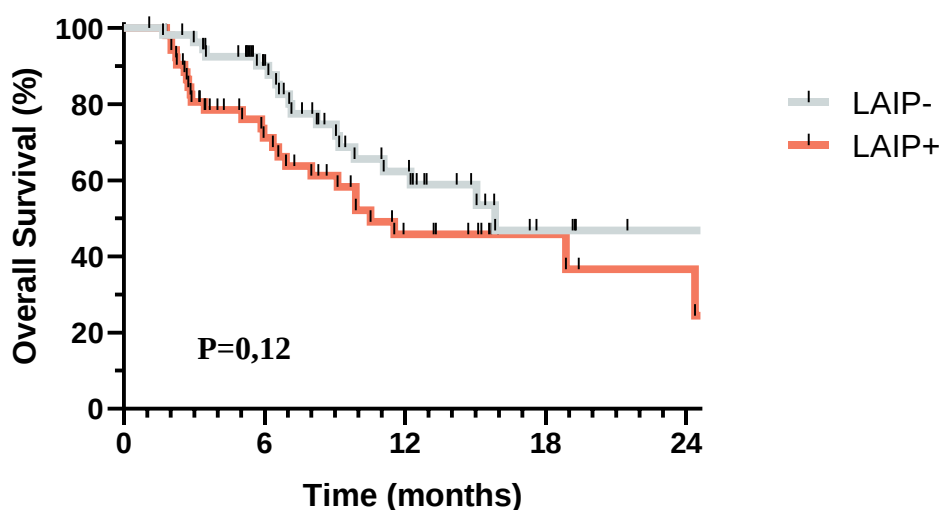


Figure 24: Évaluation de la survie globale selon l'approche LAIP en post bithérapie Azacitidine/Vénétoclax par méthode FlowSOM

b. Survie sans évènements (EFS)

Les patients avec une MRD LAIP négative n'ont pas de survie sans événement différente par rapport aux patients ayant une MRD LAIP positive (log-rank test $p = 0,096$)

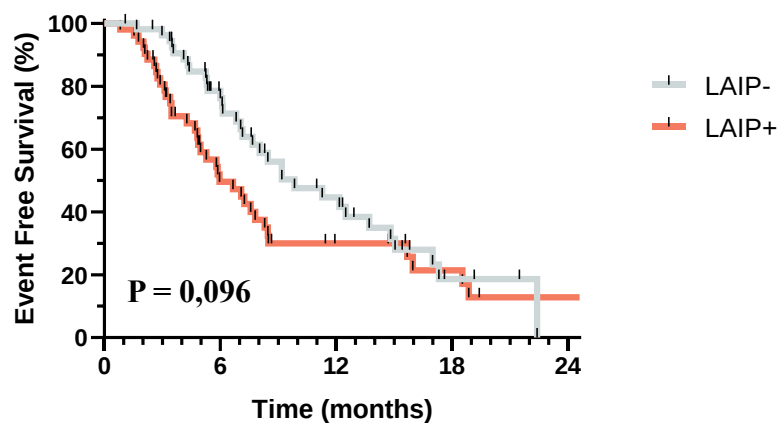


Figure 25: Évaluation de la survie sans évènement selon l'approche LAIP en post bithérapie AZA/VEN par méthode FlowSOM

c. Indice cumulé de rechute (CIR)

L'indice cumulé de rechute a été estimé avec l'approche LAIP chez 82 patients de notre cohorte ayant obtenu une rémission complète (RC).

Aucune différence significative n'a été observée entre les patients avec une MRD LAIP négative et les patients avec une MRD LAIP positive ($p = 0,26$)

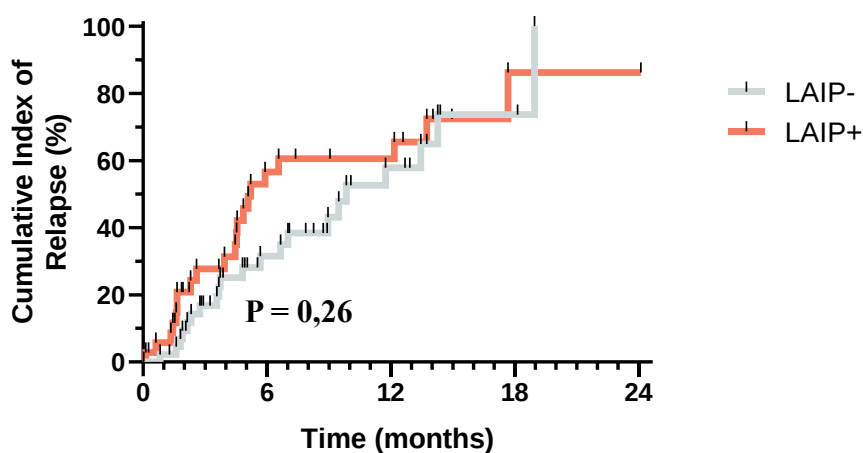


Figure 26: Évaluation de l'indice cumulé de rechute selon l'approche LAIP en post bithérapie AZA/VEN par méthode FlowSOM

2. Approche LSC

a. Survie Globale

Pour l'approche LSC, il a été observé 58 patients (54,2 %) avec une MRD LSC négative et 49 patients (45,8%) avec une MRD LSC positive. Cette approche n'a pas montré de résultats statistiquement différents pour la survie globale chez les patients MRD LSC positive ou non (log-rank test $p=0,12$, figure 29).

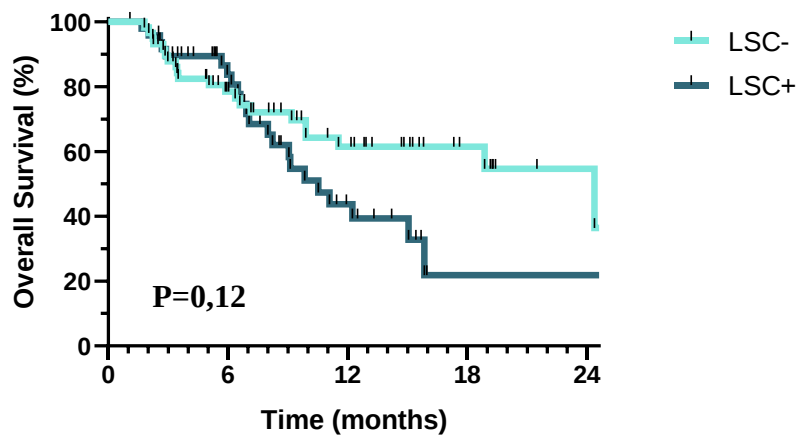


Figure 27: Évaluation de la survie globale selon l'approche LSC en post bithérapie AZA/VEN par méthode FlowSOM

b. Survie sans évènement (EFS)

Les patients avec une MRD LSC négative n'ont pas de survie sans évènement différente par rapport aux patients ayant une MRD LAIP positive (log-rank test $p = 0,080$)

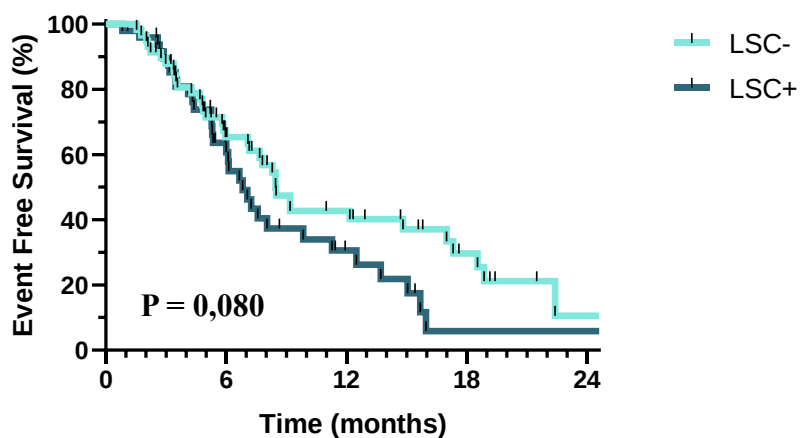


Figure 28: Évaluation de la survie sans évènement selon l'approche LSC en post bithérapie AZA/VEN par méthode FlowSOM

c. Indice cumulé de rechute (CIR)

L'indice cumulé de rechute a été estimé avec l'approche LSC chez 82 patients de notre cohorte ayant obtenu une rémission complète (RC).

Aucune différence significative n'a été observée entre les patients avec une MRD LAIP négative et les patients avec une MRD LAIP positive (p-value = 0,071)

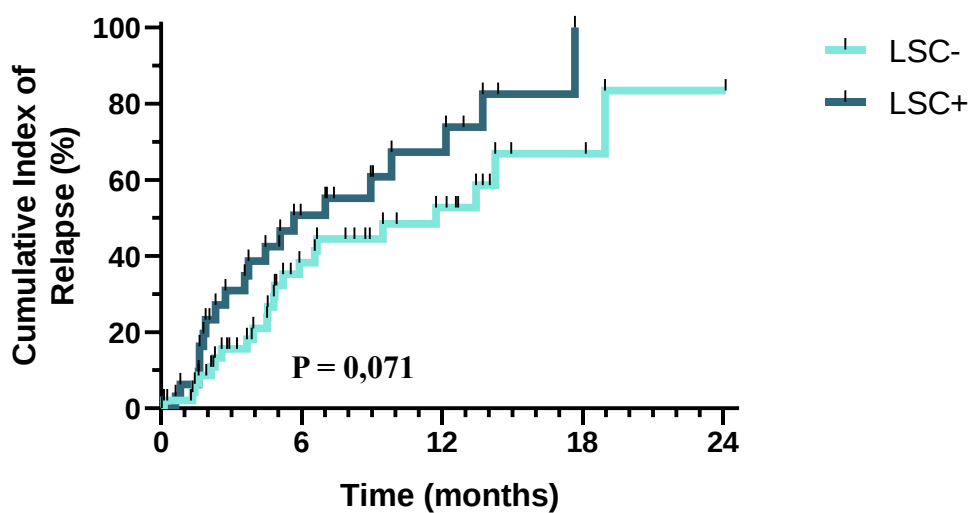


Figure 29: Evaluation de l'indice cumulé de rechute selon l'approche LSC en post-bithérapie AZA/VEN par méthode FlowSOM

3. Approche combinée LAIP/LSC

a. Survie globale

En combinant ces 2 approches, on obtient 4 groupes de patients :

- 29 (27,1 %) patients sont négatifs en MRD LAIP et LSC (**LAIP-LSC-**)
- 23 (21,5 %) patients sont positifs en MRD LAIP et LSC (**LAIP+LSC+**)
- 29 (27,1%) patients sont uniquement positifs en MRD LAIP (**LAIP+LSC-**)
- 26 (24,3 %) patients sont uniquement positifs en MRD LSC (**LAIP-LSC+**)

Cette double approche a permis d'avoir des résultats statistiquement significatifs entre tous les groupes (log-rank test $p=0,032$) avec une meilleure survie globale pour les patients MRD LAIP-/LSC-.

Le groupe de patients MRD LAIP-/LSC- comparé aux autres groupes combinés a obtenu des résultats encore plus significatifs (log-rank test $p=0,0035$, figure 32).

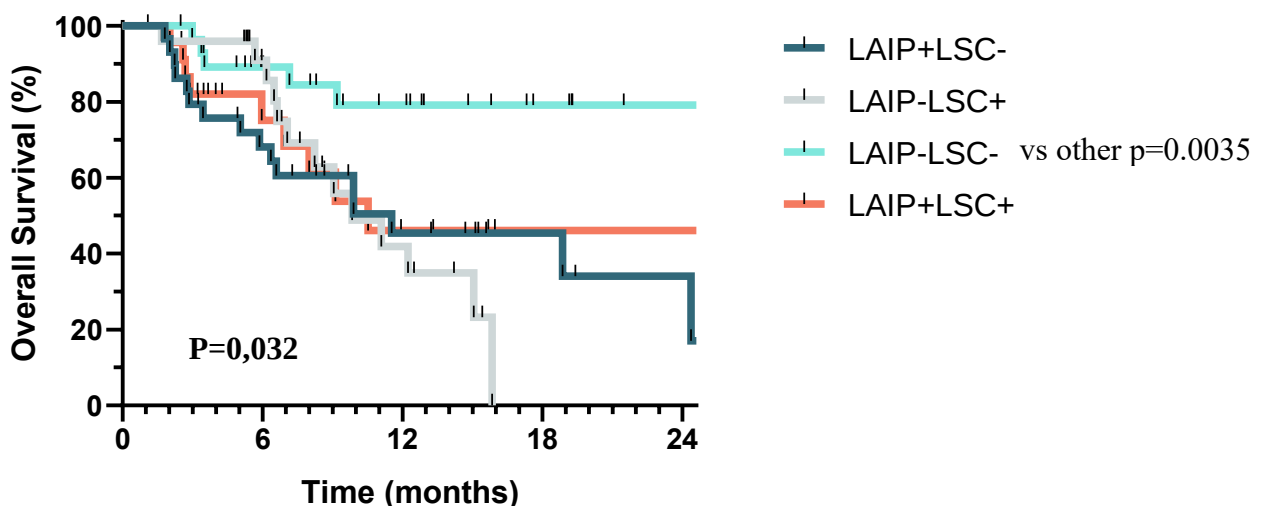


Figure 30: Évaluation de la survie globale selon l'approche combinée LAIP/LSC en post-bithérapie AZA/VEN par méthode FlowSOM

b. La survie sans évènements (EFS)

L'approche combinée LAIP/LSC entre tous les groupes n'a pas montré de résultats statistiquement significatifs pour la prédiction de la survie sans évènements (log-rank test $p = 0,057$).

Cependant, les patients avec une MRD LAIP-/LSC- ont une survie sans évènement significativement meilleure comparés aux autres groupes combinés (log-rank test $p = 0,0063$, figure 33).

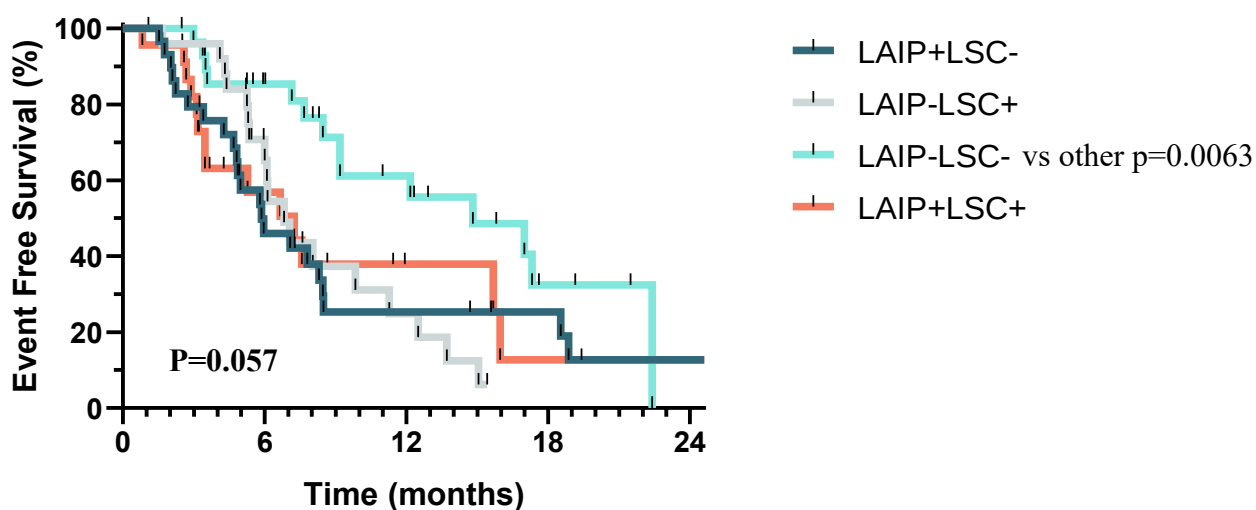


Figure 31: Évaluation de la survie sans évènement selon la combinaison MRD LAIP/LSC post 2 cures d'AZA/VEN par méthode FlowSOM

c. Indice cumulé de rechute (CIR)

L'approche combinée LAIP/LSC n'a pas montré de résultats significatifs entre les différents groupes.

Cependant, la combinaison des 2 approches LAIP/LSC constitue un bon moyen prédictif de l'indice cumulé de rechute pour les patients avec une LAIP-LSC-. En effet, ces patients ont un indice cumulé de rechute significativement inférieure par rapport aux autres groupes combinés ($p=0,013$, figure 34)

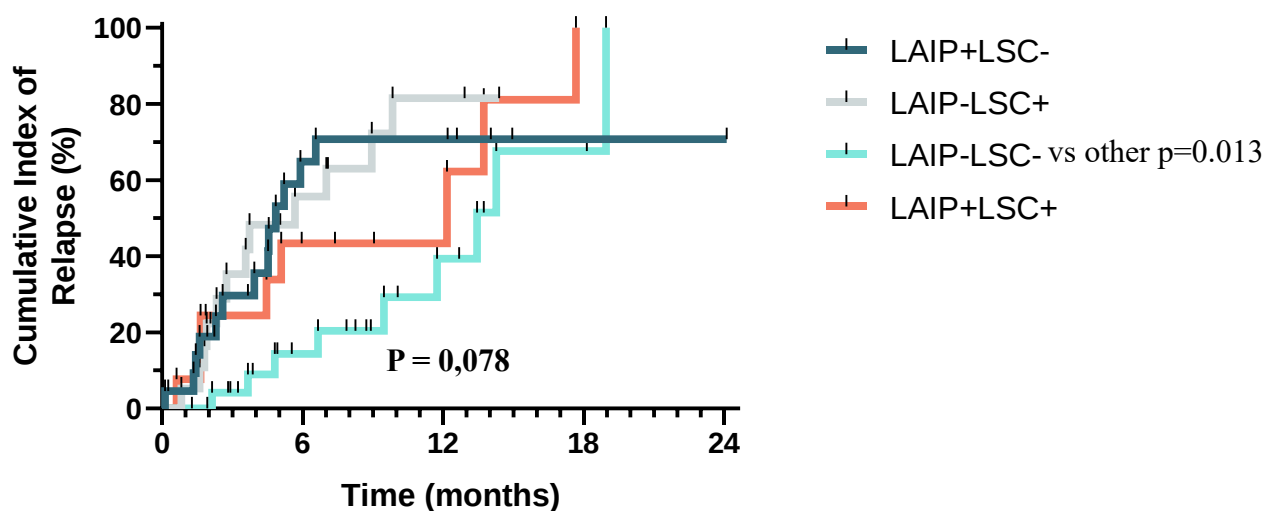


Figure 32: Evaluation de l'indice cumulé de rechute selon l'approche combinée LAIP/LSC en post-bithérapie AZA/VEN par méthode FlowSOM

Comparaison des 3 paramètres pronostiques

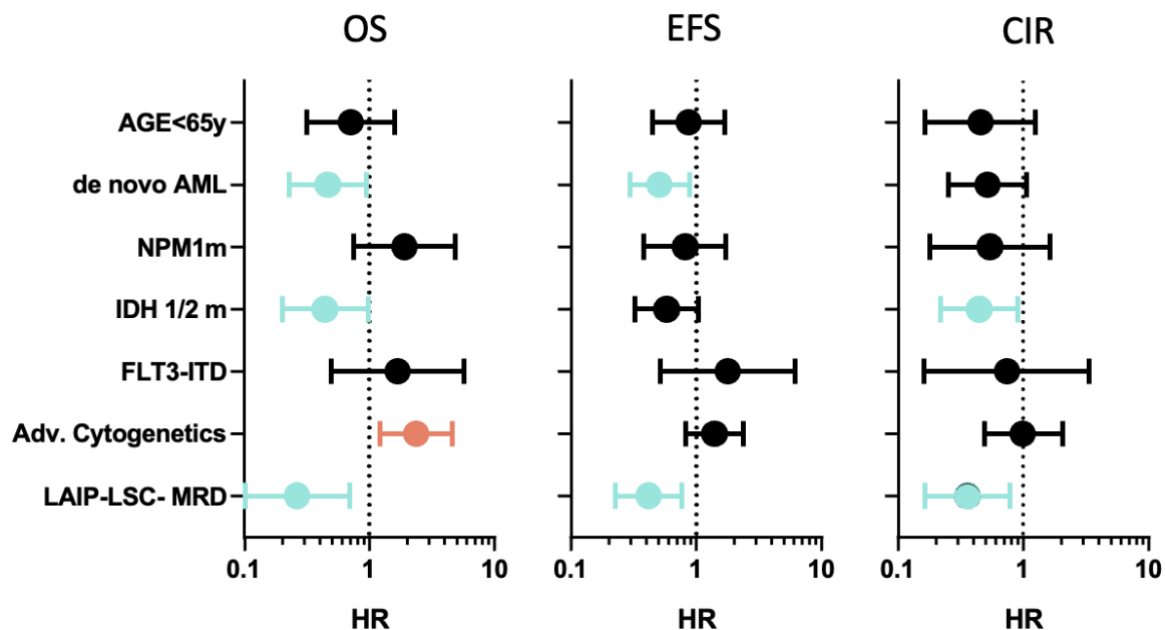


Figure 33: Modèles multivariés de COX et de FINE & GRAY selon différents facteurs pronostiques des LAM pour la survie globale (OS), la survie sans événements (EFS) et l'indice cumulé de rechute (CIR). La ligne verticale représente un rapport de risque (HR) de 1. En bleu sont présentés les facteurs de bon pronostic, en noir les facteurs ne présentant pas d'impact pronostique significatif et en orange, les facteurs de mauvais pronostic.

Dans un modèle statistique multivarié de COX, nous avons cherché à évaluer s'il existe un impact des principales caractéristiques des patients (âge, statut mutationnel...) sur la survie globale (**OS**), la survie sans événements (**EFS**) et l'indice cumulé de rechute (**CIR**).

L'âge inférieur à 65 ans et la présence de la **mutation NPM1 ou FLT3-ITD** n'ont pas montré d'impact sur les 3 paramètres évalués.

Il a été montré significativement une meilleure survie globale et une survie sans événement plus importante chez les patients atteints de **LAM primaire** (OS HR=0.46 IC95%=0.23-0.95 ; EFS HR=0.51 IC95%=0.29-0.88)

La présence de **mutations IDH1/2** a montré un pronostic plus favorable pour la survie globale (OS HR=0.44 IC95%=0.20-0.98) et l'indice cumulé de rechute (CIR HR=0.44 IC95%=0.22-0.90) mais n'a pas eu d'impact sur la survie sans événement.

Une cytogénétique défavorable dans les LAM s'est avérée être un facteur de mauvais pronostic pour la survie globale, un résultat attendu (OS HR=2.37 IC95%=1.22-4.61). Mais elle n'a pas montré d'impact pour la survie sans événement ainsi que pour l'indice cumulé de rechute.

Les patients LAIP-/LSC- ont un meilleur pronostic pour tous les paramètres évalués (OS HR=0.27 IC95%=0.10-0.69 ; EFS HR=0.41 IC95%=0.22-0.77 ; CIR HR=0.35 IC95%=0.16-0.78) (**figure 35**).

Évaluation de la Survie Globale : AZA/VEN vs AZA chez les patients présentant les mutations *IDH1* et *IDH2*

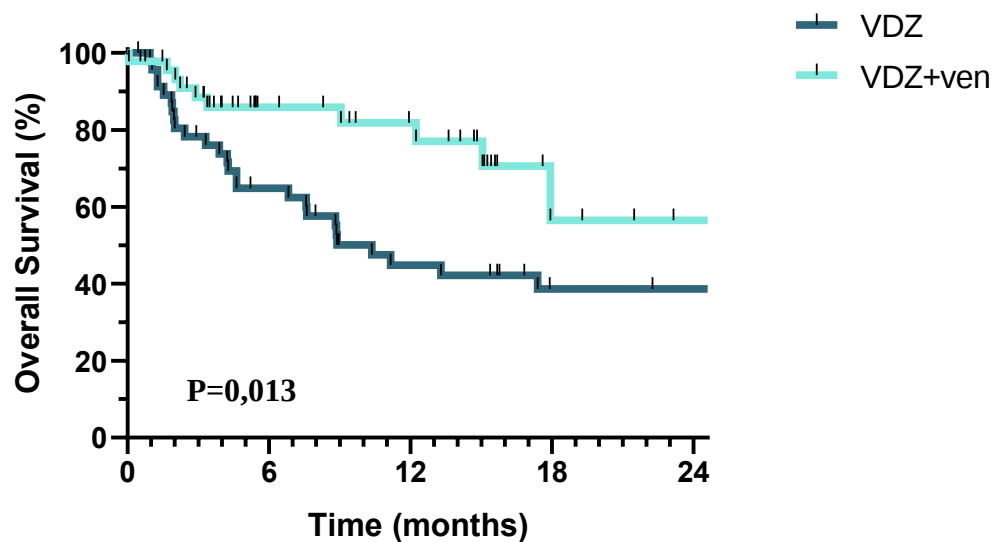


Figure 34: Évaluation de la survie globale chez un sous-groupe présentant les mutations *IDH1* et 2 après traitement par la combinaison AZA/VEN ou bien par l'AZA seule

La survie globale a été estimée suite à la prise d'azacitidine seule chez 47 patients mutés *IDH1/2* ou suite à la combinaison AZA/VEN chez 46 patients mutés *IDH1/2* avec une médiane de suivi de 12 mois.

La médiane de survie globale chez les patients traités par l'association AZA/VEN est supérieure à 24 mois tant dis qu'elle a été estimée à 10,4 mois chez les patients traités par l'azacitidine. Cette différence est significative ($p=0,013$)

Une meilleure survie globale a donc été observée chez les patients du groupe AZA/VEN ($n=46$ patients) par rapport au groupe azacitidine seule ($n=47$).

Évaluation de la survie globale (OS), survie sans évènements (EFS), indice cumulé de rechute (CIR) chez les patients mutés IDH1/2 et patients non mutés traités par AZA/VEN

Nous avons analysé l'OS, l'EFS et le CIR chez 32 patients mutés IDH1/2 et 75 patients non mutés.

Les patients avec une mutation IDH1/2 (IDH1/2m) présentent une meilleure **survie globale** que les patients non mutés. Cette différence n'est cependant pas significative (log-rank test $p=0,085$) (**figure 36**).

De même pour la **survie sans évènement** qui n'a pas montré de différence significative chez les patients présentant ou non une mutation de l'IDH (log-rank test $p=0,15$) (**figure 37**).

L'**indice cumulé de rechute** a quant à lui était plus important chez les patients ne présentant pas de mutations IDH. Ces résultats sont statistiquement significatifs ($p= 0,044$)

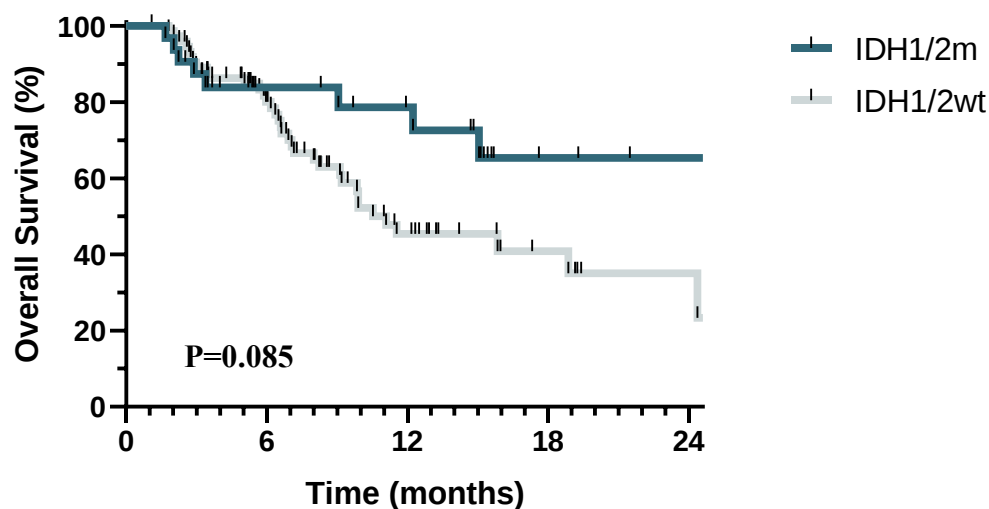


Figure 35: Evaluation de la survie globale post-bithérapie AZA/VEN en fonction de la présence (IDH1/2m) ou l'absence (IDH1/2wt) de la mutation IDH 1 et 2

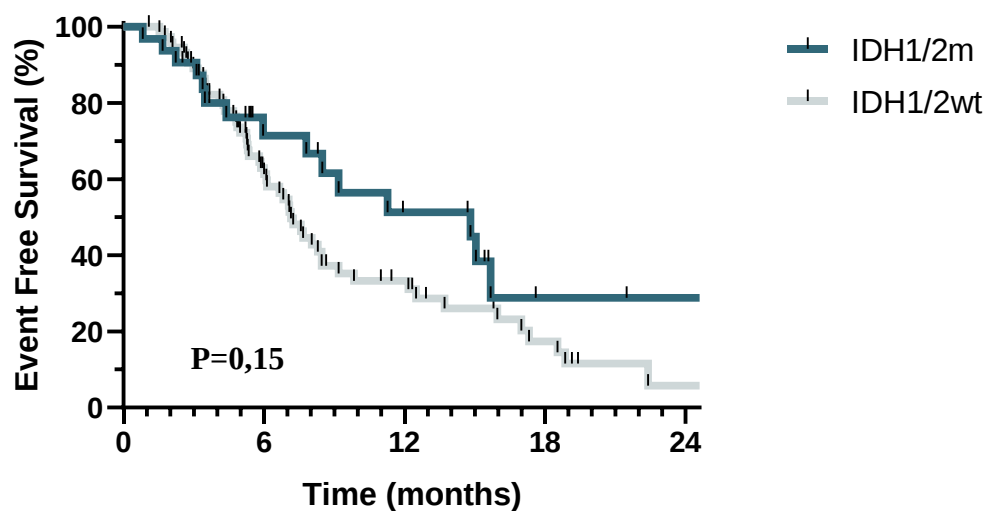


Figure 36: Évaluation de la survie sans évènement en post-bithérapie AZA/VEN en fonction de la présence (IDH1/2m) ou l'absence (IDH1/2wt) de la mutation IDH 1 et 2

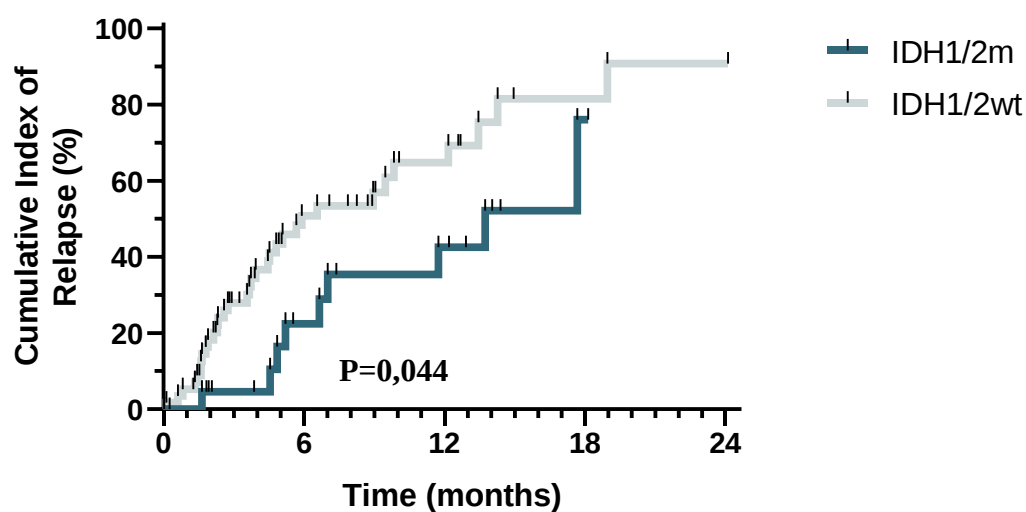


Figure 37: Évaluation de l'indice cumulé de rechute en post-bithérapie AZA/VEN en fonction de la présence (IDH1/2m) ou l'absence (IDH1/2wt) de la mutation IDH 1 et 2

Étude de la survie globale par l'approche LAIP/LSC chez les patients mutés ou non mutés pour l'IDH1/2 :

1. Patients non mutés IDH1/2 (IDHwt)

L'approche combinée LAIP/LSC a été évaluée chez les patients mutés IDH1/2. Nous avons trouvé 13 patients LAIP+/LSC+, 22 LAIP-/LSC-, 22 LAIP+/LSC- et 18 LAIP-/LSC+. Concernant la survie globale, l'approche combinée LAIP/LSC a montré des résultats statistiquement significatifs entre les 4 groupes (LAIP+/LSC+, LAIP+/LSC-, LAIP-/LSC+, LAIP-/LSC-) (log-rank $p = 0,042$) (**figure 40**).

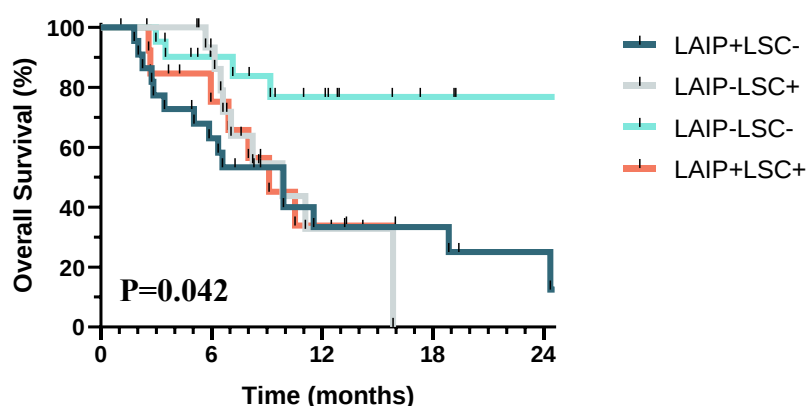


Figure 38: Évaluation de la survie globale par la combinaison des 2 approches de MRD LAIP/LSC chez les patients ne présentant pas de mutation IDH

En regroupant les groupes LAIP+/LSC+, LAIP+/LSC- et LAIP-/LSC+ et en les comparant aux patients LAIP-/LSC- les résultats sont d'autant plus significatifs (log-rank test $p = 0,0047$) (**figure 41**)

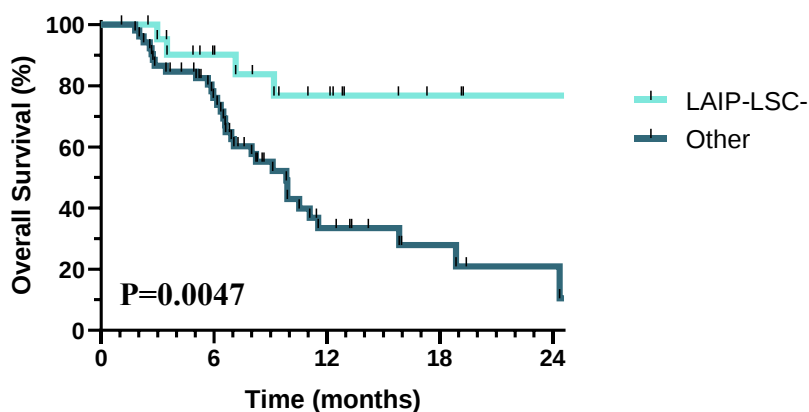


Figure 39: Évaluation de la survie globale selon une MRD LAIP-/LSC- par rapport aux autres groupes

2. Patients mutés IDH1/2 (IDHm)

L'approche combinée LAIP/LSC a été évaluée chez les patients mutés IDH1/2. Nous avons trouvé 10 patients LAIP+/LSC+, 7 LAIP-/LSC-, 5 LAIP+/LSC- et 8 LAIP-/LSC+.

Aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes (LAIP-LSC-, LAIP+ ou LSC+, LAIP+ LSC+) pour les patients avec une IDH mutée (IDHm) (log-rank test $p=0,34$) (**figure 42**).

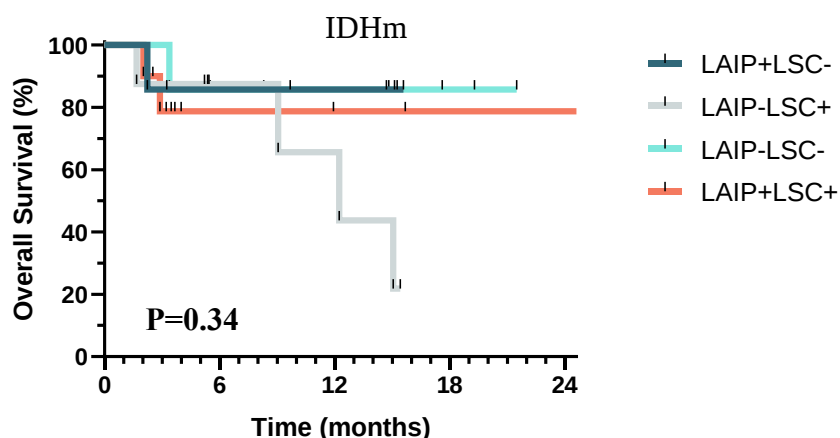


Figure 40: Évaluation de la survie globale par la combinaison des 2 approches de MRD LAIP/LSC chez les patients présentant la mutation IDH

De même, pour la MRD LAIP-/LSC- qui n'a pas montré de différence statistiquement significative avec les autres groupes regroupés (log-rank test $p = 0,39$) (**figure 43**)

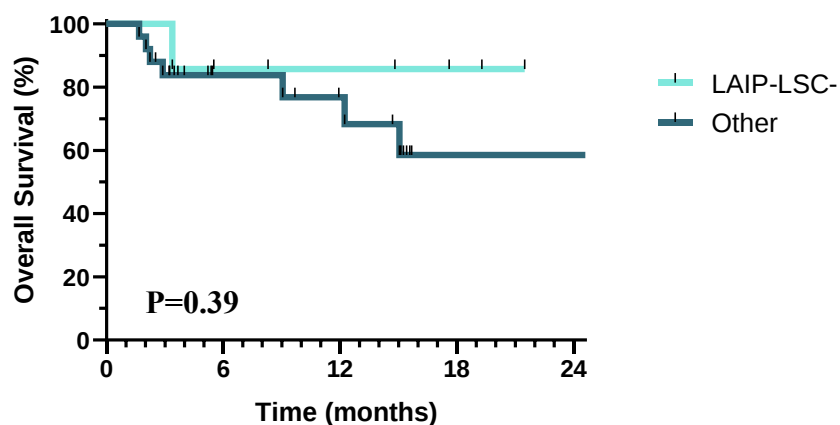


Figure 41: Évaluation de la survie globale selon la MRD LAIP-/LSC- par rapports aux autres groupes

Discussion

Dans notre étude, nous avons évalué l'efficacité de l'association AZA/VEN par rapport à l'azacitidine utilisée en monothérapie par l'analyse de la survie globale des patients.

La médiane de survie globale chez les patients traités par la combinaison AZA/VEN est de 15 mois contre 8,8 mois chez les patients traités par l'azacitidine seule. Cette différence entre les survies globales était statistiquement significative.

Le taux de rémission complète (RC) a également été évalué dans notre cohorte. Il a montré que le pourcentage de patients présentant une RC est plus important chez les patients traités par AZA/VEN par rapport à l'AZA seule (75 % contre 35 %).

Nos résultats sont comparables à l'étude VIALE-A de Di Nardo et *al.* qui retrouve également une plus longue survie globale médiane chez les patients traités par cette combinaison par rapport à l'AZA seule (14,7 mois avec l'AZA/VEN vs 9,6 mois avec l'AZA seule) et un taux de RC plus important avec cette association (66,4% vs 28,3%). (39)

Les patients avec les mutations IDH1/2 ont présenté une survie globale plus importante chez le groupe traité par AZA/VEN par rapport à l'azacitidine seule. Les médianes de survie étaient respectivement non atteintes à 24 mois et de 10,4 mois. Ce résultat confirme ce qui est publié dans la littérature. En effet, les patients possédant ces mutations ont une sensibilité accrue au vénétoclax ce qui a pour conséquence de majorer l'efficacité de cette association. (42)(46)(51)

Jusqu'à présent, très peu d'études se sont intéressées à évaluer l'impact clinique de la MRD par CMF à la suite d'un traitement non intensif par l'association AZA/VEN. L'objectif principal de notre étude visait donc à évaluer l'impact pronostique de l'analyse de la MRD par cytométrie en flux selon différentes approches : l'approche LAIP et l'approche LSC ainsi que l'approche combinée LAIP/LSC. Pour cette analyse, nous avons utilisé le calcul non supervisé par FlowSOM, chez 107 patients atteints de LAM et ayant reçu deux cures d'azacitidine/vénétoclax au CHU de Toulouse.

Nous avons également évalué la recherche de la MRD chez un sous-groupe de patients présentant les mutations IDH 1 et 2 avec comme objectif d'identifier une éventuelle modification de l'impact pronostique chez cette population.

L'approche combinée LAIP/LSC retrouve chez le groupe de patients traités par l'association AZA/VEN un pourcentage de patients LAIP+LSC- statistiquement plus important que chez les patients traités par la chimiothérapie intensive (ICT). Les groupes de patients LAIP-LSC-, LAIP+LSC+ et LAIP-LSC+ n'ont pas montré de différences statistiquement significatives. Cette bithérapie possède donc une efficacité importante et une synergie d'action sur les cellules souches leucémiques. Ceci a également été décrit dans la littérature. (36)(89)(37)

Dans notre étude la recherche de la MRD a été évaluée selon différentes approches :

L'approche LAIP en post 2 cures d'AZA/VEN a montré des résultats décevants quant à son potentiel pronostique. Celle-ci n'a été prédictive pour aucun des critères analysés : survie globale ($p=0,12$), survie sans événement ($p=0,096$) et l'indice cumulé de rechute ($p=0,26$).

Nos résultats ne sont donc pas en accord avec l'étude de Pratz et *al.* qui a montré une survie globale (OS) et une survie sans événements (EFS) significativement supérieures chez les patients en rémission complète composite avec MRD LAIP négative par rapport aux patients MRD LAIP positive. Les patients MRD LAIP négative ont présenté un taux de OS de 94% et d'EFS de 83,2% à 12 mois contre 67,9% d'OS et 45,5% d'EFS pour les patients MRD LAIP positive (seuil $>10^{-3}$) ($p \text{ value} < 0.001$). (66) L'étude de Maiti et *al.* réalisée chez des patients traités par Vénétoclax et Décitabine a également montré un impact pronostique de la MRD pour l'OS et l'EFS. (63)

L'approche LSC n'a pas montré d'intérêt pronostique pour les trois paramètres évalués (OS, EFS et CIR). La sensibilité de cette approche pourrait être améliorée en ajoutant un autre marqueur spécifique à notre panel LSC tels que le CD123 (90) ou bien le CLL-1 (91). En effet, notre panel LSC actuel, repose principalement sur une approche DfN avec des marqueurs de l'hématopoïèse normale (CD133, CD135, CD45RA).

Les résultats de ces 2 approches LAIP et LSC ne sont pas en accord avec une autre étude réalisée par notre équipe au CHU de Toulouse, qui a montré avec l'approche LAIP et également l'approche LSC une survie sans événements significativement diminuée chez les patients avec une MRD LAIP + ou LSC + par rapport aux patients avec une MRD LAIP- ou LSC -. Cependant, ces analyses ont été réalisées en post chimiothérapie intensive.

L'approche combinée LAIP/LSC quant à elle, a montré un impact pronostique pour tous les critères de jugements évalués (OS, EFS, CIR).

En effet, l'approche combinée LAIP/LSC a été contributive pour la prédiction de la **survie globale** et a présenté particulièrement un fort impact pronostique chez le groupe LAIP-LSC-.

Concernant **la survie sans évènement et l'indice cumulé de rechute**, la recherche de la MRD avec cette double approche a obtenu une différence significative quand nous avons comparé le groupe LAIP-LSC- avec les autres groupes combinés ($p=0,0063$ pour l'EFS et $p=0,013$ pour CIR).

Ces approches LAIP et LSC sont complémentaires et leur utilisation combinée a permis d'améliorer la valeur pronostique de la recherche de la MRD par CMF.

Nos résultats sont cohérents avec d'autres études, tel que l'étude de Zeijlemaker et al. ou encore celle de Terwijn et al. qui ont retrouvé après un traitement par chimiothérapie intensive, un moins bon pronostique pour les patients MRD LAIP+LSC+ par rapport aux patients LAIP-LSC-.

Cependant, l'étude de Zeijlemaker montre une différence significative uniquement pour le groupe MRD+LSC+ comparé aux autres groupes pour la survie globale et l'indice cumulé de rechute alors que dans l'étude de Terwijn, une différence significative a été obtenue pour la survie globale entre le groupe MRD-LSC+ avec ceux du groupe MRD-LSC- et MRD+LSC+ (92)(93).

Les variabilités d'interprétation pronostique observées entre les différents sous-groupes de ces études (92)(93) peuvent s'expliquer par l'utilisation de différents *cut-off*, résultat d'un manque de standardisation des seuils à utiliser pour la recherche de la MRD avec l'approche LSC.

L'impact pronostique de la MRD post chimiothérapie intensive a également été évaluée au CHU de Toulouse mais en utilisant la méthode multivariée de clusterisation de type FlowSOM. Celle-ci a retrouvé chez les patients MRD LAIP et LSC positives une survie sans évènement significativement diminuée aux autres groupes (LAIP+ ou LSC+, LAIP-LSC-).

Dans un modèle statistique multivarié de COX, nous avons cherché à évaluer s'il existe un impact des principales caractéristiques des patients (âge, statut mutationnel...) sur la survie globale (**OS**), la survie sans événements (**EFS**) et l'indice cumulé de rechute (**CIR**).

Concernant la survie globale, la LAM *de novo* et la présence de mutations IDH 1/2 chez les patients ont montré un meilleur pronostique alors qu'une cytogénétique défavorable était quant à elle de mauvais pronostique pour cette survie.

Pour la survie sans événements, cette survie était plus importante chez les patients avec une LAM *de novo*.

Nous nous sommes également intéressés à l'indice cumulé de rechute pour lequel la présence de **mutations IDH1/2** a montré de meilleurs résultats.

Toutes ces différences étaient statistiquement significatives.

La MRD **LAIP-/LSC-** est le seul élément à avoir obtenu un impact pronostique significatif pour les trois paramètres évalués. Cela confirme donc que l'approche LAIP/LSC permet d'avoir un moyen prédictif de bon pronostique chez ces patients.

Par la suite, nous avons analysé les trois critères pronostiques (OS, EFS et CIR) chez les patients mutés ou non mutés pour IDH 1/2 (IDHm vs IDHwt).

Malgré le nombre restreint de patients, nous avons observé une différence significative entre les 2 groupes (IDHm vs IDHwt) uniquement pour l'indice cumulé de rechute entre les 2 groupes avec un plus grand nombre de rechutes chez les patients ne présentant pas ces mutations IDH1/2.

Ces résultats s'expliquent par l'augmentation de la sensibilité de ces patients mutés IDH à l'association AZA/VEN, traitement ciblant spécifiquement les LSC qui jouent un rôle dans les rechutes. (10)(37)(51)

Cependant, ces résultats préliminaires sont à prendre avec précautions du fait d'un effectif assez restreint de nos sous-groupes (n=75 pour le groupe IDHwt contre n=32 pour le groupe IDHm). L'inclusion prochainement d'un nombre plus important de patients devrait nous permettre d'obtenir une puissance accrue.

Dans un dernier temps, l'impact pronostique de la recherche de la MRD par l'approche LAIP/LSC a été évalué chez les patients mutés ou non IDH1/2.

Un intérêt prédictif de la survie globale a été retrouvé chez les patients non mutés IDH1/2 avec l'approche combinée LAIP/LSC et plus particulièrement chez le groupe LAIP-/LSC- qui se trouve être de très bon pronostic ($p=0,0047$).

A l'inverse, la recherche de la MRD LAIP/LSC chez les patients mutés IDH1/2 n'était pas contributif pour la prédiction de la survie globale.

Nous avons évalué la recherche de la MRD LAIP/LSC après deux cures d'AZA/VEN.

Cette analyse a été évaluée au même stade du traitement afin d'avoir une cohorte homogène et comparable. Cependant, dans la littérature le moment optimal pour l'évaluation de la MRD en post thérapie de faible intensité n'a pas encore été clairement déterminée. L'évaluation de la MRD a été évaluée à différents moments selon les études. Dans celle de VIALE-A, la MRD a d'abord été évaluée après le premier cycle puis tous les trois cycles jusqu'à atteindre 2 rémissions complètes composites (CRc) à la suite. Celles-ci étaient atteintes avec une médiane de 3 MRD. En parallèle, l'étude de Maiti et al. a évalué la MRD chez les patients traités par décitabine et vénétoclax à 1, 2 et 4 mois après le début du traitement. Les patients devenus MRD négative au bout d'un mois présentait une meilleure OS par rapport aux patients MRD positive. L'impact pronostique de la MRD a persisté durant les 4 mois d'évaluation.

L'évaluation de la MRD dans notre étude n'a été réalisée qu'à un moment du suivi, ce qui par conséquent ne nous permet pas de prédire le moment le plus informatif pour l'évaluation de la MRD dans notre cohorte. De plus, la question de la pertinence de cet unique point de suivi de la MRD qui est assez précoce en post 2 cures d'azacitidine/vénétoclax peut être discuté surtout pour les patients IDH1/2 mutés, pour lesquels l'approche combinée LAIP/LSC n'a pas montré d'intérêt prédictif du pronostique. Un suivi plus tardif de la MRD serait particulièrement intéressant chez ces patients.

Conclusion

Dans notre étude, nous avons cherché à déterminer le potentiel pronostique de la recherche de la MRD par CMF avec l'approche LAIP, LSC ou combinée LAIP/LSC en post deux cures AZA/VEN par méthode non supervisée de type FlowSOM. Cette méthode nous a permis d'avoir une évaluation simple et robuste avec des résultats homogènes et opérateurs indépendants.

Nos résultats n'ont pas montré d'intérêt pronostique pour la survie globale, la survie sans événement et l'indice cumulé de rechute avec l'approche LAIP ou LSC. Toutefois l'approche combinée LAIP/LSC a permis d'obtenir chez les patients MRD LAIP-/LSC- un bon impact pronostique pour les 3 paramètres.

Un nombre plus important de rechutes a été significativement corrélé à l'absence de mutations IDH1/2, résultat attendu du fait de la plus grande sensibilité au traitement chez ces patients mutés. Traitement connu pour cibler les LSC, en partie responsables des rechutes.

L'impact pronostique pour la survie globale a été évalué avec l'approche LAIP/LSC selon la présence ou non de mutations IDH1/2. Il a été retrouvé un très bon impact prédictif chez les patients non mutés.

La recherche de la MRD par cytométrie en flux avec l'approche combinée LAIP/LSC pourrait être un bon outil pronostique pour prédire les rechutes et orienter le traitement chez les patients traités par AZA/VEN. Cependant, cette recherche de MRD LAIP/LSC n'a pas fait ces preuves chez les patients mutés IDH1/2.

Nos résultats sont des résultats préliminaires, nous avons pour objectif d'inclure un nombre plus important de patients dans les mois à venir afin d'avoir des résultats plus solides qui pourront potentiellement aboutir à la mise en place de cette technique en routine.

Bibliographie

1. Leucémies aiguës 4eme édition 2021. Elsevier Masson Collège.pdf.
2. Deschler B, Lübbert M. Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology. :10.
3. 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. :169.
4. Épidémiologie-des-leucémies-aiguës-myéloblastiques.pdf.
5. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev.* juill 2019;36:70-87.
6. Li S, Mason C, Melnick A. Genetic and Epigenetic Heterogeneity in Acute Myeloid Leukemia. *Curr Opin Genet Dev.* févr 2016;36:100-6.
7. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med.* 25 déc 2014;371(26):2477-87.
8. Young AL, Challen GA, Birmann BM, Druley TE. Clonal haematopoiesis harbouring AML-associated mutations is ubiquitous in healthy adults. *Nat Commun.* 22 août 2016;7(1):12484.
9. Majeti R. Clonal evolution of pre-leukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2014;27(3-4):229-34.
10. Vetrie D, Helgason GV, Copland M. The leukaemia stem cell: similarities, differences and clinical prospects in CML and AML. *Nat Rev Cancer.* mars 2020;20(3):158-73.
11. Shlush LI, Feldman T. The evolution of leukaemia from pre-leukaemic and leukaemic stem cells. *J Intern Med.* 2021;289(5):636-49.
12. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature.* août 2013;500(7463):415-21.
13. Pulikkan JA, Castilla LH. Preleukemia and Leukemia-Initiating Cell Activity in inv(16) Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol.* 26 avr 2018;8:129.
14. Corces-Zimmerman MR, Hong WJ, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci.* 18 févr 2014;111(7):2548-53.
15. A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID

mice.pdf.

16. Ashok D, Polcik L, Dannewitz Prosseda S, Hartmann TN. Insights Into Bone Marrow Niche Stability: An Adhesion and Metabolism Route. *Front Cell Dev Biol.* 18 janv 2022;9:798604.
17. Chopra M, Bohlander SK. The cell of origin and the leukemia stem cell in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2019;58(12):850-8.
18. Lagadinou ED, Sach A, Callahan K, Rossi RM, Neering SJ, Minhajuddin M, et al. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell Stem Cell.* 7 mars 2013;12(3):329-41.
19. Stevens BM, Jones CL, Pollyea DA, Culp-Hill R, D'Alessandro A, Winters A, et al. Fatty acid metabolism underlies venetoclax resistance in acute myeloid leukemia stem cells. *Nat Cancer.* déc 2020;1(12):1176-87.
20. 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.
21. 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.
22. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 19 mai 2016;127(20):2391-405.
23. Khoury JD, Solary E, Abal O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia.* juill 2022;36(7):1703-19.
24. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. 2017;129(4):24.
25. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. 2017;129(4):24.
26. Diesch J, Zwick A, Garz AK, Palau A, Buschbeck M, Götze KS. A clinical-molecular update on azanucleoside-based therapy for the treatment of hematologic cancers. *Clin Epigenetics.* 21 juin 2016;8(1):71.
27. Unnikrishnan A, Vo ANQ, Pickford R, Raftery MJ, Nunez AC, Verma A, et al. AZA-MS: a novel multiparameter mass spectrometry method to determine the intracellular dynamics of azacitidine therapy in vivo. *Leukemia.* avr 2018;32(4):900-10.

28. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* mars 2009;10(3):223-32.
29. VIDAZA (azacitidine) [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 7 août 2022]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_798090/fr/vidaza-azacitidine
30. Duchmann M, Itzykson R. Clinical update on hypomethylating agents. *Int J Hematol.* 1 août 2019;110(2):161-9.
31. Venetoclax: A new wave in hematooncology.
32. Schuh AC, Döhner H, Pleyer L, Seymour JF, Fenaux P, Dombret H. Azacitidine in adult patients with acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1 août 2017;116:159-77.
33. Konopleva M, Pollyea DA, Potluri J, Chyla B, Hogdal L, Busman T, et al. Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov.* oct 2016;6(10):1106-17.
34. Samra B, Konopleva M, Isidori A, Daver N, DiNardo C. Venetoclax-Based Combinations in Acute Myeloid Leukemia: Current Evidence and Future Directions. *Front Oncol.* 5 nov 2020;10:562558.
35. Guerra VA, DiNardo C, Konopleva M. Venetoclax-based Therapies for Acute Myeloid Leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* juin 2019;32(2):145-53.
36. Jones CL, Stevens BM, D'Alessandro A, Reisz JA, Culp-Hill R, Nemkov T, et al. Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells. *Cancer Cell.* 12 nov 2018;34(5):724-740.e4.
37. 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 Acute Myeloid Leukemia Patients. *Nat Med.* déc 2018;24(12):1859-66.
38. Lee JB, Khan DH, Hurren R, Xu M, Na Y, Kang H, et al. Venetoclax enhances T cell-mediated antileukemic activity by increasing ROS production. *Blood.* 22 juill 2021;138(3):234-45.
39. DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, Thirman MJ, Garcia JS, Wei AH, et al. Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 13 août 2020;383(7):617-29.
40. 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.

41. Webster JA, Pratz KW. Acute myeloid leukemia in the elderly: therapeutic options and choice. *Leuk Lymphoma*. févr 2018;59(2):274-87.
42. Al-Ali HK, Jaekel N, Junghanss C, Maschmeyer G, Krahel R, Cross M, et al. Azacitidine in patients with acute myeloid leukemia medically unfit for or resistant to chemotherapy: a multicenter phase I/II study. *Leuk Lymphoma*. janv 2012;53(1):110-7.
43. Winters AC, Gutman JA, Purev E, Nakic M, Tobin J, Chase S, et al. Real-world experience of venetoclax with azacitidine for untreated patients with acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 16 oct 2019;3(20):2911-9.
44. Cherry EM, Abbott D, Amaya M, McMahon C, Schwartz M, Rosser J, et al. Venetoclax and azacitidine compared with induction chemotherapy for newly diagnosed patients with acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 28 déc 2021;5(24):5565-73.
45. Issa GC, DiNardo CD. Acute myeloid leukemia with IDH1 and IDH2 mutations: 2021 treatment algorithm. *Blood Cancer J*. 3 juin 2021;11(6):107.
46. Platt MY, Fathi AT, Borger DR, Brunner AM, Hassarjian RP, Balaj L, et al. Detection of Dual IDH1 and IDH2 Mutations by Targeted Next-Generation Sequencing in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *J Mol Diagn JMD*. nov 2015;17(6):661-8.
47. Figueroa ME, Wahab OA, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 14 déc 2010;18(6):553-67.
48. Abdel-Wahab O, Levine RL. Metabolism and the leukemic stem cell. *J Exp Med*. 5 avr 2010;207(4):677-80.
49. Eriksson A, Lennartsson A, Lehmann S. Epigenetic aberrations in acute myeloid leukemia: Early key events during leukemogenesis. *Exp Hematol*. 1 août 2015;43(8):609-24.
50. Montalban-Bravo G, DiNardo CD. The role of *IDH* mutations in acute myeloid leukemia. *Future Oncol*. avr 2018;14(10):979-93.
51. Pollyea DA, Dinardo CD, Arellano ML, Pigneux A, Fiedler W, Konopleva M, et al. Results of Venetoclax and Azacitidine Combination in Chemotherapy Ineligible Untreated Patients with Acute Myeloid Leukemia with IDH 1/2 Mutations. *Blood*. 5 nov 2020;136:5-7.
52. Ferrando AA, López-Otín C. Clonal evolution in leukemia. *Nat Med*. oct 2017;23(10):1135-45.
53. Pei S, Pollyea DA, Gustafson A, Stevens BM, Minhajuddin M, Fu R, et al. Monocytic Subclones Confer Resistance to Venetoclax-Based Therapy in Acute Myeloid Leukemia Patients. *Cancer Discov*. avr 2020;10(4):536-51.
54. Nechiporuk T, Kurtz SE, Nikolova O, Liu T, Jones CL, D'Alessandro A, et al. The TP53

Apoptotic Network Is a Primary Mediator of Resistance to BCL2 Inhibition in AML Cells. *Cancer Discov.* 1 juill 2019;9(7):910-25.

55. Desoutter J, Gay J, Berthon C, Ades L, Gruson B, Geffroy S, et al. Molecular prognostic factors in acute myeloid leukemia receiving first-line therapy with azacitidine. *Leukemia.* juin 2016;30(6):1416-8.

56. TP53 Deficient/Mutant AMLs Are Resistant to Individual BH3 Mimetics: High Efficacy of Combined Inhibition of Bcl-2 and Mcl-1 | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cité 4 août 2022]. Disponible sur: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0006497118591886?token=BD249C3B7747987FE4F1DF08DD18565D734FB88020463C5626E0B73B12455FBC19464EC3CCF05DFA22735677D689C0C8&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220804100230>

57. Chen X, Glytsou C, Zhou H, Narang S, Reyna DE, Lopez A, et al. Targeting Mitochondrial Structure Sensitizes Acute Myeloid Leukemia to Venetoclax Treatment. *Cancer Discov.* 1 juill 2019;9(7):890-909.

58. Karjalainen R, Liu M, Kumar A, He L, Malani D, Parsons A, et al. Elevated expression of S100A8 and S100A9 correlates with resistance to the BCL-2 inhibitor venetoclax in AML. *Leukemia.* 1 oct 2019;33(10):2548-54.

59. Jones CL, Stevens BM, Pollyea DA, Culp-Hill R, Reisz JA, Nemkov T, et al. Nicotinamide Metabolism Mediates Resistance to Venetoclax in Relapsed Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 5 nov 2020;27(5):748-764.e4.

60. Bernardi M, Ferrara F, Carrabba MG, Mastaglio S, Lorentino F, Vago L, et al. MRD in Venetoclax-Based Treatment for AML: Does it Really Matter? *Front Oncol.* 18 juill 2022;12:890871.

61. Short NJ, Zhou S, Fu C, Berry DA, Walter RB, Freeman SD, et al. Association of Measurable Residual Disease With Survival Outcomes in Patients With Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 1 déc 2020;6(12):1890.

62. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry.* 1999;38(4):139-52.

63. Maiti A, DiNardo CD, Wang SA, Jorgensen J, Kadia TM, Daver NG, et al. Prognostic value of measurable residual disease after venetoclax and decitabine in acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 1 avr 2021;5(7):1876-83.

64. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Grimwade D, Haferlach T, Hills RK, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. :17.

65. Buckley SA, Wood BL, Othus M, Hourigan CS, Ustun C, Linden MA, et al. Minimal residual disease prior to allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Haematologica*. mai 2017;102(5):865-73.
66. Pratz KW, Jonas BA, Pullarkat V, Recher C, Schuh AC, Thirman MJ, et al. Measurable Residual Disease Response and Prognosis in Treatment-Naïve Acute Myeloid Leukemia With Venetoclax and Azacitidine. *J Clin Oncol*. 10 mars 2022;40(8):855-65.
67. 2021 Update Measurable Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia EuropeanLeukemiaNet Working Party Consensus Document.pdf.
68. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 17 févr 2017;37(2):163-76.
69. Béné MC, Lacombe F. Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Rev Francoph Lab*. avr 2015;2015(471):35-41.
70. Principe MID. MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA OF ADULTS: DETERMINATION, PROGNOSTIC IMPACT AND CLINICAL APPLICATIONS. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 20 oct 2016;8:e2016052-e2016052.
71. 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.
72. Zeijlemaker W, Gratama JW, Schuurhuis GJ. Tumor heterogeneity makes AML a “moving target” for detection of residual disease. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014;86(1):3-14.
73. Chen X, Wood BL. Monitoring minimal residual disease in acute leukemia: Technical challenges and interpretive complexities. *Blood Rev*. 1 mars 2017;31(2):63-75.
74. Plesa A, Dumontet C, Mattei E, Tagoug I, Hayette S, Sujobert P, et al. High frequency of CD34+CD38-/low immature leukemia cells is correlated with unfavorable prognosis in acute myeloid leukemia. *World J Stem Cells*. 26 déc 2017;9(12):227-34.
75. Vergez F, Nicolau-Travers ML, Bertoli S, Rieu JB, 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.
76. Vergez F, Green AS, Tamburini J, Sarry JE, Gaillard B, Cornillet-Lefebvre P, et al. High levels of CD34+CD38low/–CD123+ blasts are predictive of an adverse outcome in acute myeloid leukemia: a Groupe Ouest-Est des Leucémies Aiguës et Maladies du Sang (GOELAMS) study. *Haematologica*. 1 déc 2011;96(12):1792-8.
77. Hanekamp D, Cloos J, Schuurhuis GJ. Leukemic stem cells: identification and clinical application. *Int J Hematol*. 1 mai 2017;105(5):549-57.

78. 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.* 2020;190(6):891-900.
79. Computational flow cytometry- helping to make sense of high-dimensional immunology data. Saeys et al. 2016pdf.pdf.
80. 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.
81. Levine JH, Simonds EF, Bendall SC, Davis KL, Amir E ad D, Tadmor MD, et al. Data-Driven Phenotypic Dissection of AML Reveals Progenitor-like Cells that Correlate with Prognosis. *Cell.* 2 juill 2015;162(1):184-97.
82. Bruggner RV, Bodenmiller B, Dill DL, Tibshirani RJ, Nolan GP. Automated identification of stratifying signatures in cellular subpopulations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 juill 2014;111(26):E2770-2777.
83. 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. *Cytometry A.* 2015;87(7):636-45.
84. Maaten L van der, Hinton G. Visualizing Data using t-SNE. *J Mach Learn Res.* 2008;9(86):2579-605.
85. Amir EA, Davis K, Tadmor M, Simonds E, Levine J, Bendall S, et al. ViSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat Biotechnol.* 19 mai 2013;31.
86. Weber LM, Robinson MD. Comparison of clustering methods for high-dimensional single-cell flow and mass cytometry data. *Cytometry A.* 2016;89(12):1084-96.
87. Dix C, Lo TH, Clark G, Abadir E. Measurable Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia Using Flow Cytometry: A Review of Where We Are and Where We Are Going. *J Clin Med.* 3 juin 2020;9(6):1714.
88. Vial JP, Lechevalier N, Lacombe F, Dumas PY, 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.
89. Nakada D. Venetolax with Azacitidine Drains Fuel from AML Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 3 janv 2019;24(1):7-8.
90. 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.

91. van Rhenen A, van Dongen GAMS, Kelder A, Rombouts EJ, Feller N, Moshaver B, et al. The novel AML stem cell–associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood*. 1 oct 2007;110(7):2659-66.

92. 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.

93. 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. *PLoS ONE*. 22 sept 2014;9(9):e107587.

RECHERCHE DE LA MALADIE RÉSIDUELLE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX DANS LES LAM TRAITÉES PAR LA COMBINAISON AZACITIDINE + VENETOCLAX

La recherche de la maladie résiduelle par cytométrie en flux a déjà montré son impact pronostique en post chimiothérapie intensive. Cet impact n'a pas encore été démontré à ce jour en post traitement par AZA/VEN, une association désormais approuvée en première ligne chez les personnes atteintes de LAM et qui sont inaptes à la chimiothérapie intensive. Nous avons donc cherché à évaluer cet impact pronostique grâce à trois paramètres : La survie globale (OS), la survie sans évènement (EFS) et l'indice cumulé de rechute (CIR).

Notre étude comprend 107 patients ayant eu un diagnostic de LAM ou de rechute. Ces patients ont été inclus au CHU de Toulouse entre janvier 2020 et mars 2022, avec un suivi de la MRD après deux cures d'AZA/VEN. L'analyse de la MRD a été réalisée à partir de différentes approches (LAIP, LSC ou combinée LAIP/LSC) par méthode non supervisée de type FlowSOM permettant une homogénéisation ainsi qu'une simplification des résultats. Nos résultats montrent un bon impact pronostique de l'approche combinée LAIP/LSC dans la recherche de la MRD mais une perte de ce pouvoir prédictif chez les patients mutés IDH1/2. Nos résultats sont des résultats préliminaires, notre objectif est d'inclure davantage de patients dans les mois à venir afin de disposer à terme de résultats plus solides.

RESEARCH OF RESIDUAL DISEASE BY FLOW CYTOMETRY IN AML TREATED WITH AZACITIDINE + VENETOCLAX

Flow cytometric testing for residual disease has already shown its prognostic impact in the post-intensive chemotherapy setting. This impact has not yet been demonstrated in post-treatment with AZA/VEN, a combination now approved as first-line therapy for AML patients who are not suitable for intensive chemotherapy. We therefore sought to evaluate this prognostic impact using three parameters: overall survival (OS), event-free survival (EFS) and cumulative relapse index (CIR).

Our study includes 107 patients with a diagnosis of AML or relapse. These patients were included at the Toulouse University Hospital between January 2020 and March 2022, with follow-up of MRD post two courses of AZA/VEN. The analysis of the MRD was performed using different approaches (LAIP, LSC or combined LAIP/LSC) by unsupervised method of FlowSOM type allowing a homogenization as well as a simplification of the results. Our results show a good prognostic impact of the combined LAIP/LSC approach in the search for MRD but a loss of this predictive power in IDH1/2 mutated patients. Our results are preliminary, our goal is to include more patients in the coming months in order to have more representative results.

DISCIPLINE administrative : Pharmacie - Biologie médicale

MOTS-CLES : Leucémie Aiguë Myéloïde, Cellules souches leucémiques, Vénétoclax, Azacitidine, Combinaison Azacitidine/Vénétoclax, Cytométrie en flux, Immunophénotypage, Maladie résiduelle, Leukemia associated immunophenotype,

Université Toulouse III - Paul Sabatier - Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35 chemin des maraîchers
31062 Toulouse Cedex 4

Directeur de thèse : Monsieur le docteur François VERGEZ