



UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG



Année : 2013

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE**

**Expression de la protéine B7-H3
et impact pronostique dans les leucémies aiguës myéloïdes**

Présentée et soutenue publiquement le 1^{er} Octobre 2013

Par Thomas Guéry

Jury

Président : Monsieur le Professeur Claude Preudhomme

**Assesseurs : Monsieur le Professeur Bruno Quesnel
Monsieur le Professeur Ibrahim Yakoub-Agha**

Directeur de Thèse : Monsieur le Docteur Christophe Roumier

Abréviations	1
Introduction	1
Sang, hématopoïèse et moelle osseuse	1
Leucémies aiguës myéloïdes	4
Définition et classifications	4
Traitement	8
Facteurs pronostiques	9
B7-H3	12
Famille B7	12
Structure	13
Expression	16
Action	17
B7-H3 et cancer	19
Patients, Matériel et Méthodes	20
Patients	20
Témoins	21
Cytométrie en flux	21
Anticorps de fenêtrage	22
Anticorps anti-B7-H3	24
Méthode	25
Décongélation des échantillons	25
Préparation des témoins	25
Saturation des sites non spécifiques	25
ImmunoMarquage	26
Acquisition	30
Réglages du cytomètre	30
Stratégie de fenêtrage	32
Critères de positivité	33
Statistiques	34
Comparaison d'une variable continue dans 2 groupes distincts	34
Corrélation de deux variables linéaires appariées	34
Comparaison de deux variables linéaires appariées	34
Comparaison des répartitions de deux variables discrètes	35
Tests de survie globale	35
Courbes ROC	35

Mises au point	36
Comparaisons des différents réactifs	36
Caractéristiques de marquage	37
Recherche de la concentration saturante	38
Tests de stabilité	39
Influence d'un lavage avant marquage	40
Influence du comarquage	41
Expression de B7-H3 par les cellules de moelles témoins	45
Effet de l'âge sur l'expression de B7-H3	46
Variabilité interindividuelle	47
Tests de marquage sur des lignées cellulaires	49
Description des patients	50
Expression de B7-H3	52
Expression de B7-H3 à la surface des différents types cellulaires	52
Mode d'expression du résultat	53
Critères de positivité	55
Expression de B7-H3 par les sous-populations de blastes	57
Influence de l'anti-CD14/AA750 à la surface des blastes	59
Corrélation de l'expression de B7-H3 avec les critères pronostiques classiques	61
Âge	61
Sexe	61
Classification FAB	62
Leucocytose au diagnostic	63
Caractère primitif ou secondaire de la leucémie	64
Caryotype	65
Biologie moléculaire	66
Obtention d'une rémission complète après l'induction	67
Impact pronostique de la présence de B7-H3	68
Survie globale en cas de traitement intensif	68
Risque de rechute	72
Réponse au traitement par agent déméthylant	72
Courbes ROC	73
Discussion	74
Intérêt de l'étude	74
Méthode	75
Choix de la technique	75
Choix du réactif	76
Constitution du panel	77
Type d'étude	77
Représentativité de notre étude	78
Ensemble des patients	78
Cohorte homogène	78

Expression de B7-H3	79
Impact pronostique de l'expression de B7-H3	81
Mécanismes d'action de B7-H3	82
Survie cellulaire	82
Modulation immunologique	83
Implications de l'interaction entre les réactifs anti-B7-H3/PE et anti-CD14/AA750	86
Conclusion	88
Table des illustrations	90
Bibliographie	93
Annexes	99
Annexe I : Représentation graphique de la MFI des blastes et des sous-population CD34+, CD34+/CD38- et CD34+/CD38-/CD123+ pour chaque patient	99
Annexe II : Tableau présentant l'ensemble des données pour chaque patient	99

Abréviations

1- β	Puissance
AA750	APC-Alexa Fluor® 750
APC	AlloPhycoCyanine
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
B7	B cell defining marker 7
B7-H3	B7-Homolog 3
B7-H3a	forme courte à 2 domaines Ig de B7-H3
B7-H3b	forme longue à 4 domaines Ig de B7-H3
CD	Cluster of Differentiation
C/EBP α	CCAAT/Enhancer Binding Protein α
CMF	CytoMétrie en Flux
FAB (classification)	Classification du groupe Franco-Américano-Britannique
FITC	Fluorescéine IsoThioCyanate
FLT3-ITD	Duplication en Tandem du gène FMS-Like Tyrosine Kinase 3
Ig	Immunoglobuline
IgC	Domaine Immunoglobuline de type Constant
IgV	Domaine Immunoglobuline de type Variable
KO	Krome-Orange™
LAM	Leucémie Aiguë Myéloïde
LPS	LipoPolySaccharide
MFI	Moyenne de l'Intensité de Fluorescence
MGG	coloration de May-Grünwald Giemsa
MPO	Myélopéroxydase
m	moyenne

NK	Natural Killer
NPM1	NucleoPhosMin
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC7	Phycoérythrine-Cyanine 7
PE	PhycoÉrythrine
r	coefficient de corrélation
RPMI	Milieu de culture Roswell Park Memorial Institute 1640
RC	Rémission Complète
σ	Écart-type
SAB	SérumAlbumine Bovine
SVF	Sérum de Veau Foetal
TLT-2	TREM-Like Transcript 2
TREM	Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells

Sang, hématopoïèse et moelle osseuse

Le sang est un tissu conjonctif liquide essentiel à la vie ; sa principale fonction est le transport cellulaire et moléculaire. Il est composé de 45% de cellules en suspension dans 55% d'une solution protéique, lipidique et ionique, le plasma. Ces cellules ou éléments figurés du sang (polynucléaires neutrophiles, polynucléaires éosinophiles, polynucléaires basophiles, monocytes, lymphocytes, hématies et plaquettes) sont quotidiennement étudiés par la numération formule sanguine.

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes qui assurent le remplacement continu et régulé de ces cellules sanguines. Il s'agit d'un processus physiologique homéostatique impliquant une étroite collaboration entre le stroma médullaire et les cellules hématopoïétiques pour réguler leur prolifération, leur survie et leur différenciation.

Après la naissance, elle a lieu dans la moelle osseuse qui est un tissu complexe composé de cellules mésenchymateuses et de cellules hématopoïétiques. Les cellules mésenchymateuses (cellules réticulaires, fibroblastes, cellules des sinusoides vasculaires, adipocytes, macrophages, lymphocytes...) synthétisent les protéines fibreuses, glycoprotéines et protéoglycannes qui constituent la matrice extra-cellulaire (collagènes, fibronectine, laminine, thrombospondine...). Ce microenvironnement permet la régulation du développement des cellules souches hématopoïétiques grâce à la sécrétion de facteurs de croissance (Stem Cell Factor (SCF), FMS-Like Tyrosine Kinase 3 Ligand (FLT3L), Colony-Stimulating Factor (CSF), Kit-Ligand (KL), Érythropoïétine (EPO), Thrombopoïétine (TPO), Interleukine (IL) 3, 5, 7) mais aussi aux contacts intercellulaires et à l'adhésion aux protéines de la matrice. ^[1]

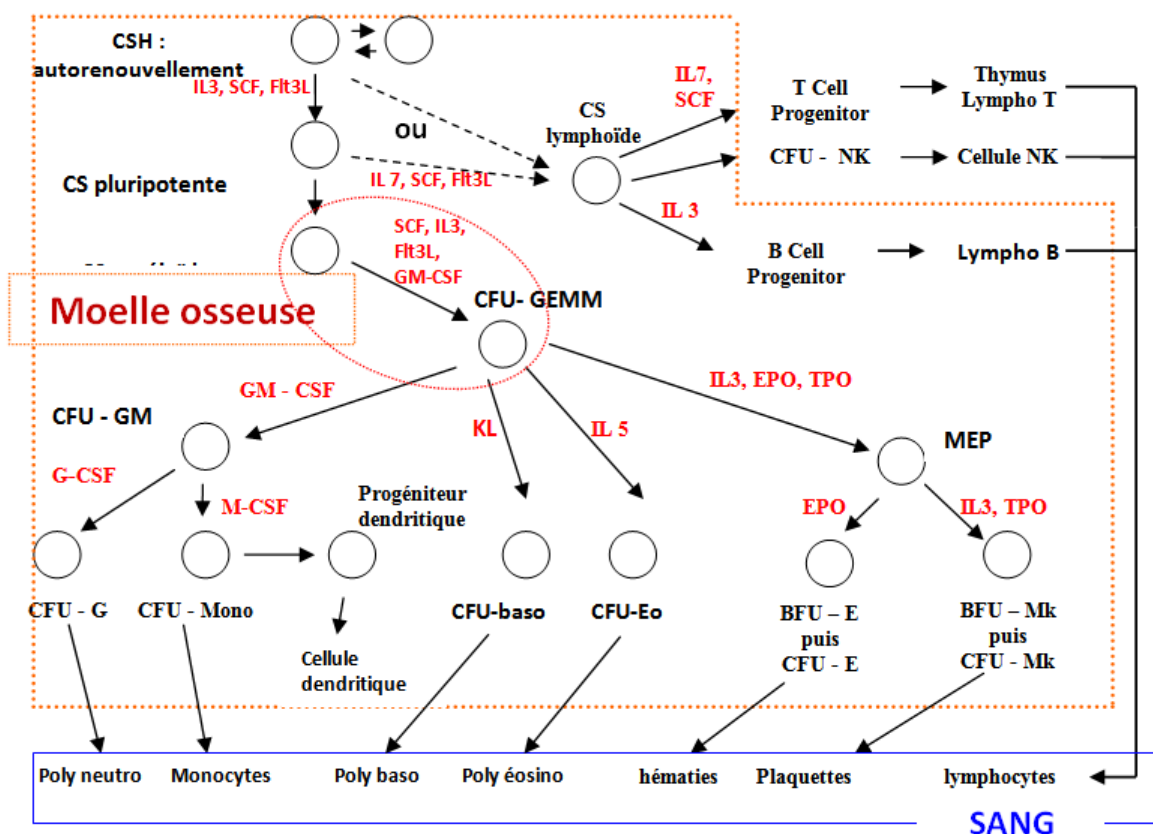


Figure 1 : Schéma de l'hématopoïèse montrant la différenciation des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) en éléments figurés du sang tout en assurant leur autorenouvellement sous l'influence de facteurs de croissance

En noir : nom des cellules, CS : Cellules Souches, CFU : colony forming unit, GEMM : granulocyte-erythrocyte-megakaryocyte-monocyte GM : Granulocyte-Macrophage, G : granulocyte, MEP : megakaryocyte-erythroid progenitor, BFU : Burst Forming Unit, E : Erythroid, Mk : Megakaryocyte.

En rouge : Facteurs de croissance, IL : Interleukine, SCF : Stem Cell Factor, FLT3L : FLT3 Ligand, CSF : Colony-Stimulating Factor, KL : Kit-Ligand, EPO : Érythropoïétine, TPO : Thrombopoïétine. ^[1]

Dans cet environnement, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) pluripotentes se multiplient et se différencient en progéniteurs communs (CFU-GEMM : colony forming unit-granulocyte-erythrocyte-megakaryocyte-monocyte puis CFU-GM : Granulocyte-Macrophage, et MEP : megakaryocyte-erythroid progenitor) puis en progéniteurs tardifs (CFU-M : monocyte, CFU-G : granulocyte, BFU-E : Burst Forming Unit Erythroid, BFU-Mk : Megakaryocyte). (Figure 1) L'ensemble de ces cellules est capable de prolifération et de différenciation. Elles sont toutes morphologiquement identiques et sont regroupées sous le terme blastes lors d'un décompte microscopique. Chaque progéniteur tardif ne donne

naissance qu'à une lignée cellulaire en se différenciant en précurseur, première cellule morphologiquement identifiable.^[1]

Les précurseurs des sept lignées cellulaires (neutrophile, basophile, éosinophile, lymphocytaire, monocytaire, érythroblastique et mégacaryocytaire) mûrissent progressivement en passant par différents stades morphologiquement identifiables explorés par le myélogramme en pratique courante. Cet examen permet, notamment, de constater que ces différentes cellules sont réparties en proportions stables. En effet, l'expansion incontrôlée d'une cellule provoque des perturbations de l'ensemble des lignées sanguines. Les leucémies aiguës en sont le principal exemple. Ce travail portant sur les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM), nous ne parlerons pas des leucémies aiguës lymphoblastiques.



Leucémies aiguës myéloïdes

Définition et classifications

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) résultent de l'expansion clonale de blastes myéloïdes dans le sang périphérique, la moelle osseuse ou d'autres tissus.[2] Dans la plupart des cas, la cellule leucémique est en effet un myéloblaste malin avec un blocage de différenciation. Le myéloblaste est une grande cellule (15-30µm) au noyau régulier, à la chromatine fine, souvent nucléolée, au rapport nucléocytoplasmique (N/C) élevé (0,8-0,95), au cytoplasme basophile qui contient souvent des granulations azurophiles et parfois des corps d'Auer en coloration

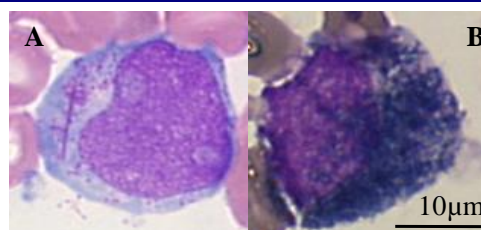


Figure 2 : Myéloblaste

A : coloration May-Grünwald Giemsa

B : cytochimie Myélopéroxydase

Photo prise dans notre laboratoire

de May-Grünwald Giemsa (MGG). (Figure 1) Les corps d'Auer sont des structures cytoplasmiques allongées en aiguille (3-10µm x 0,5µm). Leur présence dans des blastes oriente très fortement vers une LAM sans être absolument pathognomonique. La présence d'une activité myélopéroxydase (MPO) dans les myéloblastes est mise en évidence par cytochimie. Le groupe Franco-Américano-Britannique qui a établi une classification morphologique des LAM (Tableau I) sépare les leucémies aiguës myéloblastiques en deux types selon que les blastes représentent plus de 90% de la lignée myélo-monocytaire (LAM1) ou moins (LAM2).^{[3][4]} L'activité MPO peut être déficitaire dans les LAM avec différenciation minimale (LAM0). Ces blastes seront alors rattachés à la lignée myéloïde par la mise en évidence d'antigènes myéloïdes en cytométrie.^[5] La leucémie aiguë myélomonocytaire (LAM4) est une prolifération de myéloblastes accompagnée d'une différenciation monocytaire (monocytes à plus de 20% dans le sang ou la moelle ou plus de 5G/L dans le sang) tandis que la leucémie aiguë à éosinophile (LAM4Éo) est une prolifération de myéloblastes avec présence d'éosinophiles anormaux. La leucémie aiguë érythroïde

(LAM6) est une prolifération de myéloblastes représentant plus de 20% de la lignée myélomonocytaire associée à un excès d'érythroblastes (plus de 50% des éléments nucléés dans la moelle).^[1]

Tableau I : Classification FAB des leucémies aiguës myéloïdes

Classification des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) proposée par le groupe Franco-Américano-Britannique (FAB) sur des critères morphologiques en 1976^[3] révisée en 1985^[4] avec ajout de la LAM 0 en 1991^[5] et de la LAM 7 en 1985^[6] sur des critères immunophénotypiques.

- LAM 0 : indifférenciée : myéloperoxydase (MPO) activité < 3% ; 2 antigènes myéloïdes positifs
- LAM 1 : myéloblastique sans différenciation : blastes > 90% ; MPO activité > 3%
- LAM 2 : myéloblastique avec différenciation : blastes < 90% de la lignée granulo-monocytaire
- LAM 3 : promyélocytaire : promyélocytes anormaux avec corps d'Auer en fagot
- LAM 4 : myélomonocytaire : myéloblastes ; monocytémie > 20% ou 5G/L ou monocytose médullaire > 20%
- LAM 4Éo : myélomonocytaire avec éosinophilie : éosinophiles anormaux (grosses granulations rouges)
- LAM 5a : monoblastique : monoblastes > 80% ; estérases positives
- LAM5b : monocytaire : promonocytes/monocytes > 80% ; estérases positives
- LAM 6 : érythroïde : érythroblastes > 50% ; excès de myéloblastes au sein de la lignée granulo-monocytaire
- LAM6v : érythroblastique pure : érythroblastes ; présence de glycophorine A et d'hémoglobine
- LAM 7 : mégacaryoblastique : mégacaryoblastes ; présence de CD61, CD41 et CD42 à l'immunophénotype

Pourtant, dans quelques cas, la cellule leucémique n'est pas un myéloblaste. Ainsi, la leucémie aiguë promyélocytaire (LAM3) est une prolifération de promyélocytes anormaux :

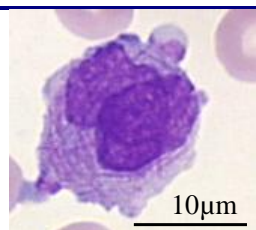


Figure 3 :
Promyélocyte
 coloration MGG
 Photo de notre labo

grandes cellules au noyau irrégulier, au cytoplasme basophile et plus abondant comportant de nombreuses granulations azurophiles et la présence fréquente de corps d'Auer en fagot (plus de 3 corps d'Auer superposés). (Figure 3)

La leucémie aiguë monoblastique (LAM5) est une prolifération de la lignée monocytaire (plus de 80% des cellules de la moelle). La LAM5a est une prolifération de monoblastes :

grandes cellules au rapport N/C variable, au noyau arrondi ou ovalaire, à la chromatine fine avec nucléole volontiers volumineux, au cytoplasme basophile sans granulations. (Figure 4) Ils n'ont pas d'activité MPO, l'activité Naphtol ASD acétate estérase (NASDA)

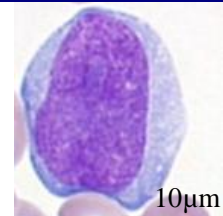


Figure 4 : Monoblaste
 coloration MGG
 Photo de notre laboratoire

est intense et inhibée par le fluorure de sodium. La LAM5b est une prolifération de cellules monocytaires plus matures : promonocytes et monocytes (Figure 6) qui sont de grandes cellules au rapport N/C variable, au noyau irrégulier à la chromatine ratissée, au cytoplasme

basophile tirant sur le gris ciel d'orage, volontiers vacuolisé aux granulations fines en poussière en quantité variable. L'activité MPO peut être faible et dispersée, l'activité NASDA

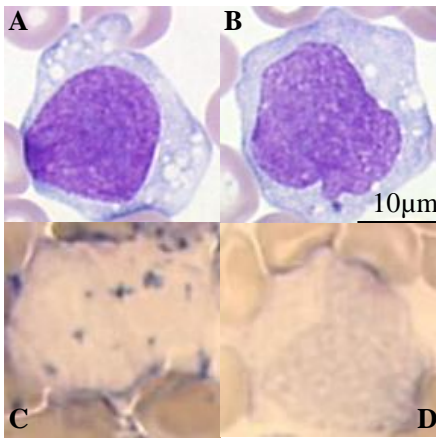


Figure 6 : Série monocyttaire
A Promonocyte, **B** Monocyte en MGG
 Activité NASDA (**C**) inhibée par le fluorure de sodium (**D**)
 Photo prise dans notre laboratoire

est intense et inhibée par le fluorure de sodium. L'activité butyrate estérase est positive. La leucémie érythroblastique pure (LAM6v) est une prolifération de précurseurs érythroblastiques : cellules rondes au noyau rond à l'activité MPO absente dont la cytométrie en flux (CMF) confirme le caractère érythroblastique (présence de glycophorine A et d'hémoglobine, absence de marqueurs myéloïdes). La leucémie mégacaryoblastique (LAM7) est une

prolifération de mégacaryoblastes : cellules de taille plus modérée (12-20µm) au rapport N/C très élevé, au noyau de forme variable à la chromatine fine volontiers multinucléolée, au cytoplasme réduit pouvant émettre des pseudopodes ou des

bourgeons et agrégeant souvent les plaquettes. (Figure 5) L'activité MPO est absente, la cytométrie en flux confirme le caractère mégacaryoblastique (présence d'au moins une glycoprotéine plaquettaire : CD41, CD61, CD42).^[6] Dans tous les

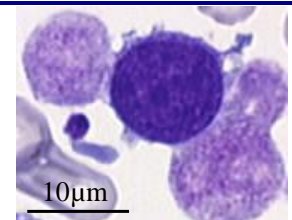


Figure 5 : Mégacaryoblaste
 Coloration MGG
 Photo de notre laboratoire

cas, nous désignerons, au cours de ce travail, la cellule leucémique par le vocable générique « blaste ».

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a édité en 2001 une classification à but pronostique des LAM et l'a révisée en 2008.^[2] Elle comporte 7 classes (Tableau II) : LAM avec anomalies génétiques récurrentes (translocations équilibrées, inversions, mutations), LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies, LAM thérapie-induite, LAM sans

spécifications particulières (les rubriques de cette classe reprennent les critères morphologiques utilisés dans la classification FAB), sarcome granulocyttaire (forme pseudo-tumorale de LAM qui ne sera pas traitée au cours de ce travail), proliférations myéloïdes associées à la trisomie 21 (réaction leucémoïde transitoire, non traitées dans ce travail et leucémies vraies) et tumeurs blastiques plasmocytoïdes dendritiques (forme rare et de diagnostic difficile, non traitée dans notre étude).

Tableau II : Classification OMS des leucémies aiguës myéloïdes

Classification des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) éditée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2001 sur des critères pronostiques majoritairement cytogénétiques et révisée en 2008 ^[2]

LAM avec anomalies génétiques récurrentes

LAM avec t(8;21) (q22;q22) ; RUNX1-RUNX1T1
 LAM avec t(15;17) (q22;q12) ; PML-RARA
 LAM avec inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) ; CBFβ-MYH11
 LAM avec t(9;11)(p22;q23) ; MLLT3-MLL
 LAM avec t(6;9)(p23;q34) ; DEK-NUP214
 LAM avec inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) ; RPN1-EVI1
 LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13;q13) ; RBM15-MKL1
 Entités provisoires : LAM avec mutation NPM1 et LAM avec mutation C/EBPα

LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies

Soit faisant suite à un syndrome myélodysplasique ou un syndrome myéloprolifératif/dysplasique
 Soit présentant des anomalies cytogénétiques identiques à celles des myélodysplasies
 Soit présentant une dysplasie sur > 50% des cellules d'au moins 2 lignées myéloïdes

LAM thérapie-induite

LAM sans spécification particulière

LA Myéloblastique avec différenciation minimale
 LA Myéloblastique sans maturation
 LA Myéloblastique avec maturation
 LA myélomonocytaire
 LA monoblastique / monocytaire
 LA érythroïde : LA érythroïde pure, Érythroleucémie (= érythroïde/myéloïde)
 LA mégacaryoblastique
 LA Myéloblastique à composante basophile
 LA avec myélofibrose (panmyélose aiguë)

Sarcome granulocyttaire (non traité dans ce travail)

Proliférations myéloïdes associées à la trisomie 21 constitutionnelle

Réaction leucémoïde transitoire (non traitée dans ce travail)
 LAM associée à la trisomie 21 constitutionnelle

Tumeur blastique plasmocytoïde dendritique (non traitée dans ce travail)

Traitement

Naturellement, cette prolifération incontrôlée aux dépens de l'hématopoïèse met rapidement en jeu le pronostic vital par l'insuffisance médullaire et les cytopénies qui en découlent. Dès lors, on comprend qu'une prise en charge rapide et efficace soit nécessaire. Le traitement comporte deux volets.

D'une part, les soins de support symptomatiques permettent au patient de tolérer à court terme les effets indésirables de la maladie et du traitement. Les transfusions de culots globulaires et de concentrés plaquettaires permettent de pallier respectivement à l'anémie et à la thrombopénie. Les antibiotiques, et autres médicaments anti-infectieux permettent de lutter contre les infections fréquentes chez ces patients leucopéniques. Les antalgiques et anti-émétiques permettent un meilleur confort du patient.

D'autre part, le traitement spécifiques est représenté par une polychimiothérapie intensive à base d'agents intercalants de l'ADN (Anthracyclines et apparentés, Amsacrine), d'analogue des bases puriques (cytarabine), d'inhibiteurs de topoisomérase (Amsacrine, Étoposide) et d'antimétabolites (L-Asparaginase, Méthotrexate, Clofarabine). Les patients aux pathologies les plus graves et aptes à supporter cette procédure lourde peuvent bénéficier d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques. La LAM3 bénéficie de protocoles spécifiques qui sont organisés autour de l'acide tout-*trans* rétinoïque qui permet une maturation des promyélocytes anormaux transformant ainsi radicalement le pronostic de cette pathologie.

Les patients dont l'état général ne permet pas de supporter la polychimiothérapie intensive peuvent bénéficier de traitements alternatifs. On peut alors leur proposer un traitement à base de cytarabine en faible dose ou bien d'un agent déméthylant, la 5-azacytidine.

Enfin, dans certains cas, on n'instaure pas une polychimiothérapie d'emblée. En général, il s'agit de patients qui présentent une très grande leucocytose qui fait craindre un



syndrome de lyse : troubles métaboliques brutaux (hyperkaliémie, hyperphosphatémie, hyperuricémie, hypocalcémie, insuffisance rénale aiguë) entraînés par la lyse simultanée de nombreuses cellules libérant leur contenu cytoplasmique. On peut alors commencer par réduire la masse tumorale grâce à de l'hydroxyurée.

Ces traitements sont pourvoyeurs d'effets secondaires graves parfois létaux, on n'obtient pourtant une rémission complète que pour 70 à 80% des patients.^[7] Se pose alors le problème de l'évaluation du pronostic pour ne réserver les moyens les plus lourds qu'aux pathologies les plus graves.

Facteurs pronostiques

Les facteurs de risques classiquement décrits peuvent être classés en trois types : les facteurs liés à l'hôte, les facteurs liés à la maladie et les facteurs composites c'est-à-dire la réponse au traitement.^[8] Les principaux facteurs pronostiques utilisés dans notre étude sont résumés dans le [Tableau III](#).

Parmi les facteurs liés à l'hôte, le plus important est l'âge. Plus le patient est âgé, plus le risque d'échec de la chimiothérapie est important. Pour cette étude nous retiendrons le seuil consensuel de 60 ans. Les enfants ont un taux de rémission complète (RC) plus important que les adultes. L'état général et les comorbidités du patient sont également très importants à évaluer et peuvent d'ailleurs pondérer l'âge réel. Malgré les indices créés à cet effet, il n'est pas aisé de coter objectivement ces critères. Les évaluer dans une étude rétrospective est quasiment impossible. C'est pourquoi nous ne tiendrons pas compte de ce point dans notre travail. Notons que le sexe masculin est légèrement défavorable.^[8]

Les facteurs liés à la maladie sont plus nombreux. Les LAM M0, M6 et M7 de la classification FAB sont de pronostic plus défavorable que les autres.^[8] Par ailleurs, une masse tumorale importante au diagnostic est de mauvais pronostic. Ceci peut être évalué par une leucocytose supérieure à 30 G/L ou un taux de lactico-déshydrogénase (LDH) plasmatique



élevé. Nous avons choisi d'utiliser la leucocytose dans ce travail. Les LAM secondaires à la chimiothérapie, à un syndrome myélodysplasique ou myéloprolifératif sont de plus mauvais pronostic que les LAM *de novo*. Le caryotype réalisé sur les blastes malins est un élément pronostique majeur. Il permet de classer les LAM en trois catégories pronostiques. Les translocations t(8;21), t(16;16) et t(15;17) ainsi que l'inversion du chromosome 16 inv(16) sont plutôt favorables. L'évolution des maladies présentant une translocation t(6;9), une anomalie touchant le chromosome 11q23, une monosomie 7 (-7) ou 5 (-5) ou un caryotype complexe (plus de 3 ou 5 anomalies selon les études) est plus sombre. Les anomalies de caryotypes contenues ni dans un groupe ni dans l'autres sont de pronostic intermédiaire. On affine alors le pronostic grâce à la biologie moléculaire. Nous ne traiterons ici que de la duplication en tandem du gène FMS-Like Tyrosine kinase 3 (FLT3-ITD) et des mutations des gènes Nucleophosmin (NPM1), CAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α). En effet, ces anomalies sont les plus fréquentes et ont une valeur pronostique clairement établie. FLT3-ITD est de pronostic péjoratif. En l'absence de cette anomalie et en cas de caryotype intermédiaire, les mutations de NPM1 et les mutations des deux allèles de C/EBP α sont favorables. En plus de ces trois anomalies, de nombreuses mutations ont été décrites. Nous ne les utiliserons pas dans notre étude mais citons les plus étudiées. Les autres mutations du gène FLT3^[2] et les mutations des gènes c-KIT, RAS, Wilms Tumor 1 (WT1) et Tumor Protein 53 (TP53) semblent péjoratives.^[9] L'association d'une mutation du gène WT1 et de FLT3-ITD paraît assombrir encore le pronostic.^[2] L'hyper-expression des gènes Brain And Acute Leukemia, Cytoplasmic (BAALC)^[10], v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (ERG) et Meningioma 1 (MN1) et la duplication partielle en tandem du gène myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (MLL-PTD) semblent également négatives.^[2] En revanche, la mutation du signal de localisation nucléaire (NLS) du gène NPM1 entraîne la localisation cytoplasmique de la protéine NPM1 et semble de bon pronostic.^[2]



Les facteurs composites sont les évaluations de la réponse au traitement. Une bonne réponse est évidemment de bon pronostic. La principale évaluation de la réponse précoce est le myélogramme prélevé à la sortie d'aplasie après la première cure de chimiothérapie. Il est réalisé environ un mois après le début du traitement. On recherche l'obtention d'une rémission complète (RC) hématologique (moins de 5% de blastes, absence de corps d'Auer) sur le myélogramme après cette première cure. Sa limite de détection est de 5% de blastes malins dans la moelle. Le suivi de la maladie résiduelle en biologie moléculaire sur le long terme permet de prédire une rechute avant qu'elle ne se manifeste cliniquement. Sa limite de détection se situe autour de 10^{-4} pour la majorité des techniques. Pour des raisons pratiques, nous n'utiliserons que la RC post-induction dans cette étude.^[8]

Tableau III : Principaux facteurs pronostiques des leucémies aiguës myéloïdes

Listes des facteurs pronostiques limitées aux seuls facteurs utilisés dans cette étude établie d'après ^[8].

	Bon	Mauvais
Facteurs liés à l'hôte		
Âge	Moins de 60 ans	Plus de 60 ans
Facteurs liés à la maladie		
Leucocytose	Moins de 30 G/L	Plus de 30 G/L
Origine	<i>de novo</i>	Secondaire
Caryotype	t(8;21) t(16;16) t(15;17) inv(16)	11q23 t(6;9) -7 -5 complexe
Biologie moléculaire	NPM1 C/EBP α	FLT3-ITD
Facteurs composites		
Post-induction	Rémission Complète	

Ceci permet de comprendre l'importance d'établir des critères pronostiques dès le début de la maladie. Dans ce but, nous nous proposons d'étudier un nouveau marqueur, la protéine B7-H3 présente à la surface de certains blastes qui a été décrite comme un facteur de mauvais pronostic dans les leucémies aiguës dans une étude chinoise.^[11]

B7-H3

B7-H3 est une protéine membranaire également dénommée B7-homolog 3, B7H3 ou Cluster of Differentiation 276 (CD276). Il s'agit d'une protéine transmembranaire immunorégulatrice de la super-famille des immunoglobulines de la famille B7.^[12] Elle possède 20 à 27% d'identité avec les autres protéines de la famille B7.^[13]

Famille B7

Le terme B7 fait référence à une ancienne classification des antigènes membranaires et signifie « B cell defining marker 7 » soit septième marqueur des lymphocytes B.^[14] La famille B7 joue un rôle prépondérant dans la régulation du système immunitaire.

L'étape fondamentale de l'immunité acquise est la présentation de l'antigène au lymphocyte T par une cellule spécialisée (CPA : cellule présentatrice d'antigène). Il s'établit alors une synapse immunologique au centre de laquelle, le récepteur des lymphocytes T (T Cell Receptor : TCR) reconnaît le complexe majeur d'histocompatibilité lié à l'antigène. Cette première étape permet l'activation du lymphocyte T allo-réactif et est régulée par un ensemble de molécules co-activatrices et co-inhibitrices.

En périphérie de la synapse, les membres de la famille B7 et leurs récepteurs jouent ces deux rôles.^[15] En général, la molécule B7 se situe sur la CPA et ses récepteurs sur le lymphocyte. B7.1 et B7.2 - les deux protéines fondatrices de la famille – sur la cellule dendritique, co-activent le lymphocyte via CD28 et entraînent une co-inhibition via CTLA-4 (cytolytic T cell-associated sequence-4). B7-H1 et B7-DC (dendritic cells) entraînent une immunotolérance via PD-1 (programmed cell death-1). B7-H2 maintient une réaction immunitaire durable via ICOS (inducible costimulator). B7-H3 et B7-H4 ont des rôles encore controversés. La protéine B7-H6 est un cas particulier puisqu'elle est portée par les cellules tumorales et active les lymphocytes NK (natural killer) via le NKp30.^{[14][16]}



De plus, le signal est bidirectionnel, c'est-à-dire que l'interaction entre la molécule de la famille B7 et son récepteur entraîne aussi une transduction du signal dans la cellule qui porte la molécule B7.^[14] Ainsi, la CPA est aussi régulée par cette interaction. Toutes ces fonctions sont supportées par une structure commune qui fait la définition de la famille B7.

Structure

Comme toutes les protéines de la famille B7, B7-H3 est une protéine transmembranaire de type I de la super-famille des immunoglobulines : son extrémité C-terminale porte plusieurs domaines immunoglobulines (Ig) extracellulaires (boucle protéique fermée par un pont disulfure entre deux résidus cystéines conservés) qui permettent l'interaction protéique, elle n'a qu'un seul domaine transmembranaire et sa courte extrémité N-terminale intracellulaire permet la transduction du signal. (Figure 7)

Son originalité réside dans la présence de 4 domaines Ig. En effet, le gène de 18 380 paires de bases situé sur le chromosome 15 en position 15q23q24 a subi une duplication de deux exons au cours de l'évolution. Un phénomène d'épissage alternatif produit deux acides ribonucléiques messagers (ARNm) différents.^[17]

La première forme d'ARNm de 1344 bases comporte 9 exons et code une protéine composée de 9 domaines : un peptide de tête, 4 domaines Immunoglobuline (IgV1, IgC1, IgV2, IgC2), un domaine transmembranaire et 3 domaines intracellulaires. Cette protéine longue de 534 acides aminés qui pèse environ 100kDa est unique dans la famille B7 par ses 4 domaines Ig. *In vivo*, elle est N-glycosylée avec une arborescence sucrée de 40kDa environ puisque la masse moléculaire après l'action de la N-glucosidase est de 60kDa environ.^[18] Elle est appelée 4IgB7-H3 ou B7-H3b.^[17] L'action des Matrix MetalloProteinases (MMP) permet son clivage en une protéine soluble d'environ 90kDa.^[19]

La deuxième forme d'ARNm est amputée des 2 domaines Ig centraux. Elle mesure 690 bases et code ainsi une protéine plus courte (316 acides aminés, environ 50 kDa ^[20])



constituée de 7 domaines : un peptide de tête, 2 domaines Immunoglobuline (IgV1 et IgC2), un domaine transmembranaire et 3 domaines intracellulaires. Elle ne semble pas glycosylée puisque la masse moléculaire théorique correspond à la masse moléculaire observée.^[20] Cette protéine, à la forme classique de la famille B7, est donc appelée 2IgB7-H3, B7-H3a ou parfois simplement B7-H3. Elle est probablement la forme ancestrale de B7-H3,^[17] notons d'ailleurs qu'elle est l'homologue de la seule forme présente chez la souris.^[21] L'action des MMP permet son clivage en une protéine soluble d'environ 17kDa.^[22]

Au cours de ce travail, B7-H3a désignera la protéine à 2 domaines Ig, B7-H3b la forme longue et B7-H3 l'ensemble des protéines sans distinction de taille.

B7-H3a a été isolée en 2001 par passage au crible des protéines membranaires des cellules dendritiques.^[13] En 2002, une première équipe fait état de 2 isoformes chez l'humain.^[21] Il faudra attendre 2003 pour que B7-H3b soit parfaitement caractérisée.^[17] Cette chronologie ainsi que l'absence de forme à 4 domaines Ig chez la souris explique que B7-H3a soit la protéine la mieux étudiée. Pourtant, depuis 10 ans, beaucoup de fabricants de réactifs et beaucoup d'études publiées ne précisent pas quelle(s) isoforme(s) détectent leurs techniques. Cette hétérogénéité rend la comparaison inter-études difficile.



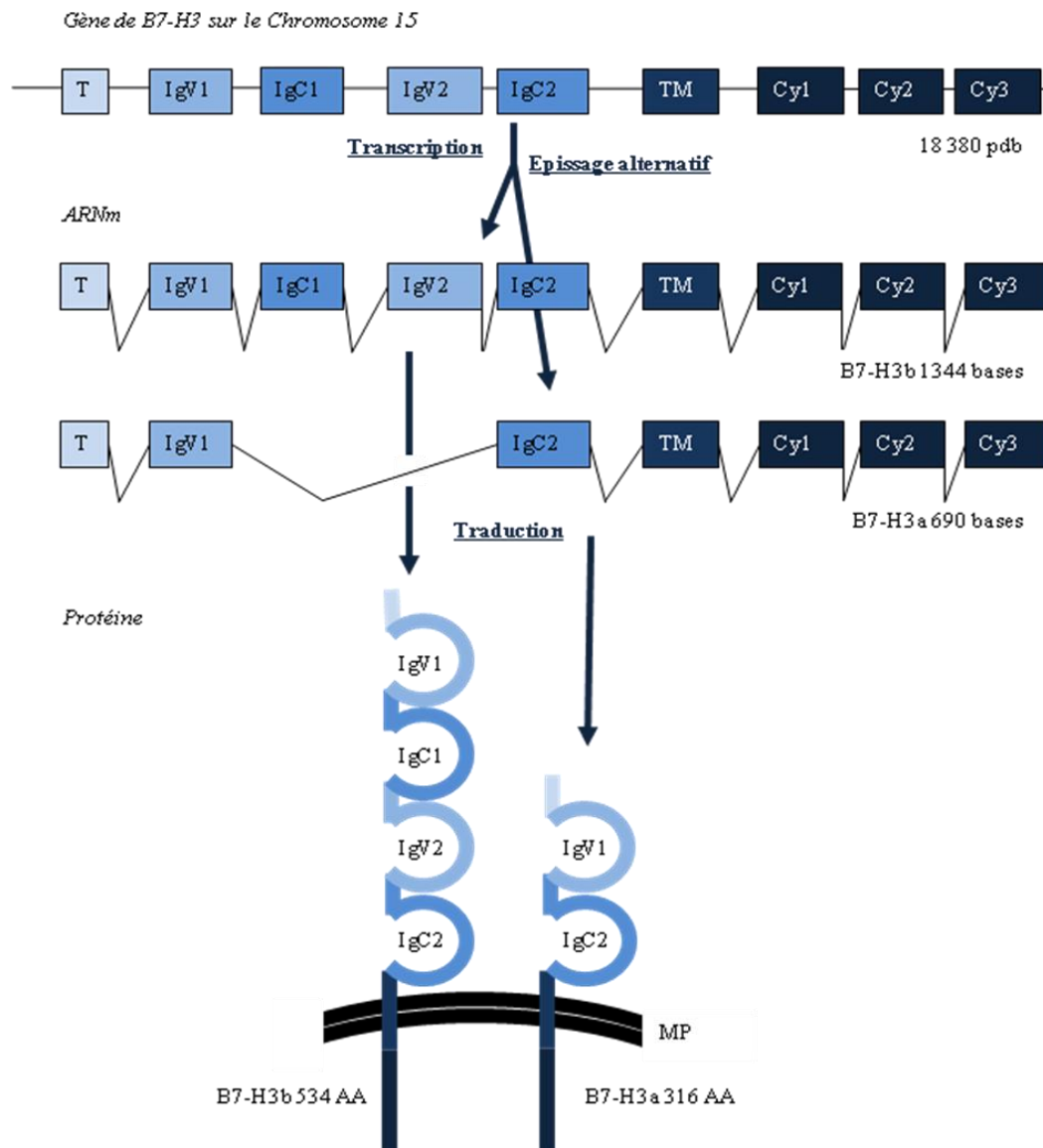


Figure 7 : Schéma de la transcription et de la traduction du gène B7-H3 montrant l'épissage alternatif conduisant aux protéines B7-H3a et B7-H3b

Le gène B7-H3 a 18 380 paires de bases (pdb) sur le chromosome 15q23q24. Un épissage alternatif produit 2 acides ribonucléiques messagers (ARNm). Le 1er ARNm de 1344 bases a 9 exons et code pour 9 domaines : un peptide de tête (T), 4 domaines Immunoglobulines : 2 domaines Ig variables (IgV) et 2 domaines Ig constants (IgC), un domaine transmembranaire (TM) et 3 domaines intracellulaires (Cy). Cette protéine a 534 acides aminés (AA). Le deuxième ARNm est amputé des 2 domaines Ig centraux. Il mesure 690 bases et code pour une protéine de 316 AA. (MP : Membrane Plasmique)

Expression

Contrairement aux autres molécules de la famille B7, B7-H3 est présente sur de nombreuses cellules non-hématopoïétiques (cœur, foie, placenta, prostate, testicule, utérus, pancréas, intestin, cerveau, muscle, rein, poumon...). Elle est également présente dans tous les organes hématopoïétiques et lymphoïdes (rate, ganglions, moelle, foie fœtal et thymus).^[13] En revanche, son expression sur les leucocytes circulants n'est pas consensuelle.

L'étude princeps ne retrouve B7-H3a dans aucune cellule circulante ni au niveau ribonucléique ni au niveau protéique.^[13] En revanche, son expression est provoquée par la stimulation des lymphocytes (par le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) + ionomycine mais pas par la phytohémagglutinine (PHA)), des monocytes (par le PMA + ionomycine ou le GM-CSF) et des cellules dendritiques (par l'interféron gamma et le PMA + ionomycine).^[13] Une autre étude retrouve des résultats similaires : pas d'expression de B7-H3a par les lymphocytes au repos ou stimulés par la PHA, très faible expression sur les monocytes fraîchement isolés et positive sur les monocytes activés par le lipopolysaccharide (LPS).^[20] Une équipe a montré que l'expression de B7-H3a par les monocytes est faible en culture simple et augmentée par le LPS et l'interféron- γ . Celle des lymphocytes B reste nulle en toutes circonstances. Celle des lymphocytes T est nulle en culture simple, négligeable après stimulation par la PHA, faible après interféron- γ et après stimulation par anticorps anti-CD3 + anti-CD28. Pourtant la sécrétion dans le milieu de culture est très forte après stimulation par anticorps anti-CD3 + anti-CD28.^{[20][22]} L'expression de B7-H3a serait stable tout au long de la maturation des cellules dendritiques (DC) monocytoïdes pour certains auteurs^[22] alors que pour d'autres B7-H3a ne serait présente que sur les DC immatures et B7-H3b tout au long de leur maturation.^[23] B7-H3b semble être l'isoforme majoritaire des tissus humains normaux et malin^[23]. Selon cette étude, elle n'est pas exprimée par les monocytes ni les lymphocytes au repos mais fortement par les monocytes stimulés par le LPS, par les DC monocytoïdes matures et immatures et faiblement par les lymphocytes T, B et NK stimulés par le PMA +

ionomycine.^[24] À notre connaissance, une seule étude a recherché B7-H3 à la surface des granulocytes et ne l'y a pas trouvé.^[18] Notons qu'il semble y avoir une régulation post transcriptionnelle de B7-H3.^[13]

La forme soluble de B7-H3 est dosable dans le sérum et le plasma de témoins sains. Son taux semble élevé avant l'âge d'un an. Il décroît de 1 à 11 ans, puis il est stable à partir de cet âge.^[22]

Son expression à la membrane de nombreuses tumeurs solides a été très largement prouvée sur des cellules fraîchement extraites et des lignées cellulaires.^[25] En revanche, son étude sur les hémopathies malignes est beaucoup plus limitée. Une étude ne retrouve B7-H3a sur aucune des huit lignées testées^[20] alors qu'une autre en retrouve trois positives sur huit grâce à un anticorps qui reconnaît B7-H3a et b.^[18] A notre connaissance, une seule équipe a recherché sa présence sur les blastes de 134 patients,^[11] elle la retrouve dans 45% des leucémies aiguës (M1 : 42% ; M2 : 50% ; M3 : 22% ; M4 : 44% ; M5 : 36% ; LB : 54% ; LT : 20%).

Action

On sait qu'une forme soluble et marquée de B7-H3 est capable de se lier aux lymphocytes T activés.^[13] On peut donc dire que ces lymphocytes portent des récepteurs de B7-H3 sans qu'ils n'aient été formellement identifiés. La protéine Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells (TREM-)Like Transcript 2 (TLT-2) pourrait être un récepteur activateur porté par les lymphocytes T CD8+.^[26] Mais toutes les études ne montrent pas la même interaction.^[27] Par analogie avec les autres membres de la famille B7, on peut supposer que B7-H3 a au moins un récepteur activateur et un récepteur inhibiteur. Ceci expliquerait en partie les propriétés contradictoires qui ont été rapportées.

En effet, elle a d'abord été décrite *in vitro* comme une protéine co-activatrice des lymphocytes T4, T8 et T cytotoxiques préalablement activés par le TCR, augmentant leur

prolifération et leur production d'interféron γ .^[13] De même, chez la souris, une inactivation de B7-H3 produit une diminution de la réponse inflammatoire.^{[28][29]}

En revanche, d'autres études montrent que B7-H3 aurait une action co-inhibitrice.^[25] Ainsi, lorsque B7-H3 est impliquée *in vitro* dans la synapse immunologique, proche du TCR sur la membrane du lymphocyte T, elle produit une diminution de l'activation du lymphocyte.^[17] Cela est cohérent avec des études *in vitro* et murines où l'inactivation de B7-H3 entraîne une augmentation des marqueurs biologiques de l'inflammation et des pathologies inflammatoires en particulier.^{[30][31][32][33]} Une étude a même montré que des cellules transfectées en B7-H3 sont protégées de la lyse par les NK en inhibant leur fonctions cytotoxiques.^[18]

Pourtant les souris Knock Out (KO) pour le gène naissent au terme attendu et sont normales en taille, maturation et fertilité. Leurs populations lymphocytaires T, B et NK dans la moelle osseuse, le thymus, les ganglions, la rate et le sang périphérique sont en nombre normal. Mais elle présentent une hypersensibilité TH1.^[33]

Il est intéressant de mentionner que lorsqu'une comparaison de la fonction de B7-H3 a et b a été tentée, aucune différence n'a été mise en évidence^{[17][23]} et que la forme soluble de B7-H3 est capable d'entrer en compétition avec la forme membranaire et ainsi atténuer ses effets.^[22]

Le mécanisme d'action de ces effets n'est pas connu, notamment car on ne connaît pas les récepteurs de B7-H3. On peut tout de même noter des phénomènes qualifiés de non immunologiques. Ils désignent les effets produits dans la cellule qui porte B7-H3 lorsque celle-ci est stimulée. L'inactivation de B7-H3 dans des cellules tumorales, entraîne la déphosphorylation en série de JAK2 et STAT3 et une diminution d'expression de MCL1 et de Survivin, deux facteurs anti-apoptotiques. STAT3 est également connu pour favoriser

l'expression de BCL-2 et BCL-XL. Ainsi, la présence de B7-H3 favorise la survie et la résistance au traitement des cellules cancéreuses qui la portent.^{[34][35]}

Devant l'ensemble complexe de ces données, on comprend aisément que la résultante globale de l'expression de B7-H3 sur le pronostic des cancers est difficile à prévoir.

B7-H3 et cancer

Encore une fois, les résultats sont contradictoires. Plusieurs études montrent que la transfection de B7-H3 dans plusieurs types de tumeurs murines (lymphome, tumeur colique, hépatocarcinome) les fait régresser et diminue leur potentiel métastatique. Les études rétrospectives humaines sont moins consensuelles : la présence de B7-H3 augmente la survie dans les cancers gastriques et pancréatiques mais est de mauvais pronostic dans les cancers pulmonaires, rénaux, prostatiques, colorectaux et ovariens.^[25]

En ce qui concerne les hémopathies, une seule étude montre le mauvais pronostic de B7-H3 sur 134 patients, toutes leucémies confondues. B7-H3 serait prédictif de progression et de survie plus courte.^[11]

Le but de notre étude est donc d'étudier l'expression de B7-H3 dans les LAM, sa corrélation aux caractéristiques bio-cliniques des patients et son impact pronostique dans une cohorte rétrospective de 111 Leucémies Aiguës Myéloïdes. Le critère d'évaluation principal sera la survie globale des patients traités par chimiothérapie intensive.



Patients

Nous avons inclus tous les patients dont le diagnostic de Leucémie Aiguë Myéloïde a été fait au Centre Hospitalier Universitaire de Lille entre 2009 et 2011 et pour lesquels des cellules leucémiques congelées au diagnostic étaient disponibles. Les patients n'ayant pas manifesté d'opposition à la conservation des cellules par congélation au diagnostic, les prélèvements ont été conservés dans la cellulothèque des hémopathies malignes. Ce travail a été approuvé par le conseil scientifique de la tumorothèque. Nous avons privilégié les prélèvements médullaires lorsqu'ils étaient disponibles, dans le cas contraire nous avons utilisé un prélèvement sanguin.

Les échantillons des patients étaient composés de cellules mononucléées de moelle ou de sang isolées au diagnostic par centrifugation sur gradient de Ficoll® et conservées à -80°C dans une solution de cryopréservation : du Sérum de Veau Fœtal décomplémenté 1 heure à 56°C (SVF) additionné de 10% de Diméthylsulfoxyde (DMSO) à la concentration de 10 millions de cellules par millilitre.

Pour chaque patient, nous avons recueilli les informations cliniques et biologiques au diagnostic. Nous avons également noté le traitement reçu et l'évolution de la maladie (rémission, rechute, allogreffe, décès, cause...). L'ensemble de ces données est disponible en [Annexe II](#).

Témoins

Pour les mises au point, nous avons utilisé 16 échantillons de sang périphérique et 5 de moelles prélevés sur EDTA. Ces échantillons reflétaient divers états physio-pathologiques. Les témoins sanguins ne présentaient pas d'hémopathie connue. Les témoins médullaires étaient des patients en rémission complète de leucémie aiguë lymphoblastique. Nous avons observé l'effet de l'âge sur l'expression de B7-H3 (2 jours, 270 jours, 5 ans et 32 ans) ainsi que celui de l'infection par les bactéries à Gram positif et l'état réanimatoire. Quinze des prélèvements de sang utilisés au cours de nos tests nous ont également permis de réaliser une comparaison interindividuelle.

Cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) permet d'analyser une à une les cellules placées dans le flux d'un liquide de gainage. Différents paramètres (taille structure et fluorescence à différentes longueur d'ondes) sont obtenus grâce à une série de lasers. L'interruption et la diffraction du faisceau laser permettent d'évaluer la taille et la structure de la cellule, respectivement. On peut également détecter la présence d'antigènes membranaires à la surface de chaque cellule. Dans ce but, nous incubons les cellules avec des anticorps reconnaissant les protéines choisies. Chaque anticorps étant couplé avec un fluorochrome excitable par les lasers, il émet un spectre lumineux spécifique lors de sa relaxation.

Dans notre laboratoire, nous utilisons un Cytomètre Navios™ 10 couleurs trois lasers de la société Beckman-Coulter.



Anticorps de fenêtrage

Les différentes populations cellulaires sont identifiées par la présence d'antigènes membranaires sélectionnés à la surface des cellules (fenêtrage). Nous avons choisi les antigènes suivants : (Tableau IV)

CD56 : Le Cluster of Differentiation (CD) 56 ou neural cell adhesion molecule est une molécule d'adhésion cellulaire de la superfamille des immunoglobulines. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire ou ancrée à la membrane par une liaison Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) selon les isoformes. Il peut se lier à une autre molécule de CD56 ou à l'héparine sulfate. Il est exprimé dans le tissu nerveux, par les lymphocytes Natural Killer (NK) et par les Cellules Dendritiques plasmocytoïdes (pDC).^[36] L'anticorps anti-CD56 couplé à la Fluoresceine IsoThioCyanate (FITC) est issu du clone NCAM16.2 et est commercialisé par la société BD Bioscience.

CD34 : Le CD34 est une glycoprotéine transmembranaire, fortement glycosylée, de la famille des sialomucines dont le ligand est le CD62L. Il est exprimé à la surface des progéniteurs hématopoïétiques indifférenciés.^[36] L'anticorps anti-CD34, issu du clone 581, couplé au Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7) est commercialisé par la société Beckman-Coulter.

CD123 : Le CD123, chaîne α du récepteur de l'interleukine 3, est une glycoprotéine transmembranaire de la famille des récepteurs des cytokines hématopoïétiques de classe I. Il est exprimé sur les progéniteurs hématopoïétiques, les monocytes et les cellules jeunes de la lignée B.^[36] L'anticorps anti-CD123, issu du clone 7G3, couplé à l'Allophycocyanine (APC) est commercialisé par la société BD Biosciences.

CD14 : Le CD14 est le récepteur du lipopolysaccharide, il s'agit d'une glycoprotéine membranaire ancrée à la surface des cellules par une liaison GPI. Il est fortement exprimé par les monocytes et les macrophages et plus faiblement par les granulocytes.^[36] L'anticorps anti-

CD14, issu du clone RMO52, couplé à l'Allophycocyanine-Alexa Fluor® 750 (AA750) est commercialisé par la société Beckman-Coulter.

CD38 : Le CD38 est une glycoprotéine transmembranaire de type II qui possède une activité catalytique du Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide (NAD), et de l'Adénosine-diphosphate-ribose cyclique. Il est fortement exprimé par les thymocytes et présent sur les lymphocytes T et B jeunes, les lymphocytes NK, les lymphocytes T activés, les plasmocytes et les globules rouges. Il est absent des lymphocytes au repos.^[36] L'anticorps anti-CD38, issu du clone HB7, couplé au V450, est commercialisé par la société BD Biosciences.

CD45 : Le CD45 est une glycoprotéine transmembranaire à activité tyrosine-phosphatase exprimée à divers degrés à la surface de toutes les cellules d'origine hématopoïétique.^[36] L'anticorps anti-CD45, issu du clone J.33, couplé au Krome-Orange™ (KO) est commercialisé par la société Beckman-Coulter.

Tableau IV : Liste des anticorps utilisés dans notre étude

pDC : Cellules dendritiques plasmocytoïdes, NK : lymphocytes Natural Killer

CSH : cellules souches hématopoïétiques

Antigène	Fluorochrome	Marque	Clone	Isotype	Référence	Spécificité
CD56	FITC	BD Biosciences	NCAM16.2	IgG2b	345811	pDC, NK
CD 34	PC7	Beckman Coulter	581	IgG1	A21691	CSH
CD 123	APC	BD Biosciences	7G3	IgG2a	560087	CSH immatures
CD 14	AA750	Beckman Coulter	RMO52	IgG2a	A86052	Monocytes
CD 38	V450	BD Biosciences	HB7	IgG1	646851	CSH, lymphocytes
CD 45	KO	Beckman Coulter	J.33	IgG1	A96416	Leucocytes
B7-H3	PE	R&D Systems	185504	IgG1	FAB1027P	
B7-H3	PE	Miltenyi Biotec	FM276	IgG2a	130-095-525	
B7-H3	PE	BioLegend	DCN.70	IgG1	331605	
B7-H3	PE	BioLegend	MIH42	IgG1	351003	
Isotype	PE	R&D Systems	11711	IgG1	IC002P	/

Anticorps anti-B7-H3

Nous avons testé les anticorps anti-B7-H3 destinés à la cytométrie en flux (CMF) et marqués à la Phycoérythrine (PE) disponibles sur le marché. Le clone 185504 d'isotype IgG1 de la société R&D system (référence FAB1027P, lot AAPQ0411081) a été généré en utilisant comme immunogène un peptide composé des acides aminés 29 à 245 de B7-H3a soit les 2 domaines immunoglobulines (IgV1 et IgC2) présents dans cette forme. La société R&D system suppose que cet anticorps réagit aussi avec B7-H3b puisque les deux domaines IgV1 et IgC2 sont aussi présents dans la protéine B7-H3b quoiqu'ils soient séparés par 2 autres domaines (IgC1 et IgV2).

La société Miltenyi Biotec ne nous a pas fourni plus d'informations sur son clone FM276 d'isotype IgG2a. La société BioLegend n'a pas pu non plus nous fournir plus d'informations sur son clone DCN.70 d'isotype IgG1.

Le clone MIH42 de la société Biolegend a été établi en utilisant la portion extracellulaire (acides aminés 1 à 244) de la forme murine de B7-H3. ^[26] Sa spécificité a été vérifiée sur des cellules transfectées avec la B7-H3b humaine. Les auteurs supposent que cet anticorps réagit avec les 2 isoformes de la protéine puisqu'il bloque *in vitro* la fonction de la forme murine B7-H3 qui est plus proche de B7-H3a.

Méthode

Décongélation des échantillons

La décongélation a été réalisée dans 5mL de milieu de culture Roswell Park Memorial Institute 1640 avec 10% de SVF (RPMI-SVF) à 37°C. Elle était suivie d'une centrifugation douce à 300g pendant 5 min puis de 2 lavages au RPMI-SVF séparés par une centrifugation à 430g pendant 5min. Les cellules ont été remises en suspension de 10 millions de cellules par millilitre dans du tampon phosphate salin (PBS) avec de la séralbumine bovine à 10g/L (PBS-SAB).

Préparation des témoins

Les échantillons qui servaient aux tests ont subi une lyse des érythrocytes pour permettre de garder tous les leucocytes : un volume d'échantillon (sang ou moelle) contenant 10 millions de leucocytes était incubé pendant 10 minutes dans 10 volumes de solution de lyse (NH_4Cl à 8,29g/L, KHCO_3 à 1g/L, Acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) à 0,037g/L) puis lavé au PBS-SAB. Les cellules étaient remises en suspension de 10 millions de cellules par millilitre dans du PBS-SAB. Les différentes étapes étaient séparées par une centrifugation à 430g pendant 5 minutes.

Saturation des sites non spécifiques

Nous avons réalisé une saturation des récepteurs pour le fragment Fc des Ig qui peut être responsable d'une fixation non spécifique des anticorps monoclonaux par leur fragment constant (plutôt que par le fragment variable immunoréactif), en particulier les anticorps d'isotype IgG2a. Pour cela, nous avons incubé la suspension de 10 millions de cellules par mL de PBS-SAB volume à volume avec une solution d'immunoglobulines polyvalentes humaines à 0,1g/L + NaCl à 0,9g/L pendant 30 minutes. Après centrifugation à 430g pendant

5 minutes, un même volume était enlevé pour retrouver une solution à 10 millions de cellules par millilitre sans lavage.

ImmunoMarquage

Le marquage des cellules a été réalisé par des protocoles différents selon les phases de l'étude : comparaison des réactifs disponibles, recherche de la concentration saturante de l'anticorps sélectionné, optimisation des conditions de marquage, test de l'anticorps au sein du panel choisi et analyse des patients.

Comparaison des réactifs anti-B7-H3

Pour la comparaison des différents anticorps anti-B7-H3 nous avons incubé 500 000 cellules (50µL) de sang témoin avec 10 µL de chaque réactif et 5µL d'anticorps anti-CD45/KO dans 50µL de PBS-SAB. Nous avons évalué la capacité de chaque réactif à discriminer les lymphocytes (témoin négatif) des monocytes (témoin positif) par le calcul : moyenne de fluorescence (MFI) des monocytes – MFI des lymphocytes.

Recherche de la concentration saturante

Pour le clone choisi (clone 185504, de la société R&D system), nous avons recherché la concentration saturante. Pour cela, 500 000 cellules (50µL) de sang témoin ont été incubées avec une gamme de concentration d'anticorps (0µL, 2,5µL, 5µL, 7,5µL, 10µL, 15µL ou 20µL d'anticorps dans un volume final fixe de 150µL). (Tableau V) Un graphique représentant la MFI des monocytes en fonction du volume d'anticorps utilisé a permis de voir une courbe croissante qui forme secondairement un plateau correspondant à la saturation de toutes les molécules de B7-H3 par l'anticorps. Nous avons choisi d'utiliser la deuxième concentration de ce plateau pour avoir une marge de sécurité.

Tableau V : Réalisation du test de concentration saturante

Les cellules dont les récepteurs du fragment Fc des Immunoglobulines avait été saturés étaient en suspension à 10 millions de cellules par millilitre dans du tampon phosphate salin avec de la sérumalbumine bovine à 10g/L (PBS-SAB). 500 000 cellules ont été incubées 20 minutes avec des concentrations croissantes d'anticorps anti-B7-H3 clone 185504 couplé à la phycoérythrine de R&D system et du PBS-SAB en quantité suffisante pour 150µL.

Anticorps anti-B7-H3	Suspension cellulaire	PBS-SAB	Volume final
/	50µL	100µL	150µL
2,5µL	50µL	97,5µL	150µL
5µL	50µL	95µL	150µL
7,5µL	50µL	92,5µL	150µL
10µL	50µL	90µL	150µL

Les autres anticorps ont été utilisés avec le volume habituellement utilisé dans notre laboratoire après des tests de concentration saturante similaires soit : 10µL pour l'anti-CD56/FITC et 5µL pour tous les autres anticorps.

Optimisation des conditions techniques

Nous avons également testé différentes conditions techniques : influence d'un lavage avant marquage, de la perméabilisation des cellules et du délai de réalisation de l'analyse.

Influence d'un lavage avant marquage

Nous avons testé l'influence d'un lavage avant marquage pour éliminer la fixation non spécifique de la forme soluble de B7-H3 à la membrane. Pour cela nous avons incubé 5 millions de cellules d'un témoin 2 heures à 37°C dans du RPMI-SVF et traité 5 autres millions immédiatement. La saturation des sites non spécifiques a été effectuée dans un deuxième temps selon le protocole décrit précédemment. Puis nous avons réalisé un marquage de 500 000 cellules avec 7,5µL d'anti-B7-H3/PE dans 50µL de PBS-SAB pour chacune des 2 conditions. Puis nous avons comparé l'intensité de fluorescence en PE dans chaque condition.

Influence du délai de réalisation de l'analyse

Nous avons évalué la stabilité de l'expression de B7-H3 dans le temps après le prélèvement. Pour cela, nous avons comparé la MFI des monocytes lorsque 500 000 cellules (50µL) de sang témoin étaient marquées avec 7,5µL d'anti-B7-H3/PE dès le prélèvement, après 5 heures ou 24 heures.

Nous avons également étudié la stabilité de B7-H3 au cours de la technique. Pour cela, nous avons incubé 500 000 cellules (50µL) de sang témoin avec 10µL d'anti-B7-H3/PE. Nous avons gardé la suspension de cellules saturées en immunoglobulines pendant quelques heures à température ambiante ou à 4°C pour réaliser le même marquage. Puis nous avons comparé l'intensité de fluorescence en PE dans chaque condition.

Anticorps au sein du panel

Pour savoir comment le réactif se comportait en combinaison avec les autres, nous avons comparé la MFI de 500 000 cellules sanguines (50µL) d'un témoin sain monomarquées par 7,5µL d'anti-B7-H3/PE dans 50µL de PBS-SAB à la MFI de 500 000 cellules du même patient bimarquées avec 7,5µL d'anti-B7-H3/PE et 10µL d'anti-CD56/FITC, 5µL d'anti-CD34/PC7, 5µL d'anti-CD123 APC, 5µL d'anti-CD14/AA750, 5µL d'anti-CD38/V450 ou 5µL d'anti-CD45/KO. (Nous avons également réalisé les monomarquages pour chacun des autres anticorps.)

Comme nous avons suspecté une interaction inattendue entre l'anticorps anti-B7-H3/PE et l'anticorps anti-CD14/AA750, nous avons, de la même manière, comparé l'intensité de fluorescence de 500 000 cellules d'un sang témoin marquées par 7,5µL d'anti-B7-H3 en monomarquage ou en bimarquage avec 5µL d'anti-CD14/AA750, 10µL d'anti-CD14/FITC ou 5µL d'anti-CD45/AA750. (Tableau VI) Notons que les deux anticorps anti-CD14 (l'un couplé au FITC et l'autre à l'AA750) sont issus du même fabricant (société Beckman-Coulter) et du même clone RMO52. De même, les 2 anticorps couplés à l'AA750 (anti-CD14 et anti-CD45) sont issus du même fabricant et sont donc comparables.

Tableau VI : Combinaisons d'anticorps destinées à explorer l'interaction entre l'anti-B7-H3/PE et l'anti-CD14/AA750

500 000 cellules (50µL à 10 millions/mL) incubée 20 min avec les anticorps (10µL pour les réactifs en FITC, 7,5µL pour les réactifs en PE, et 5µL pour les réactifs en AA750) dans 50µL de PBS-SAB.

	FITC	PE	AA750
		B7-H3	
CD14		B7-H3	
		B7-H3	CD45
		B7-H3	CD14

Enfin nous avons marqué 500 000 cellules (50µL) de 5 moelles témoins (rémission complète de LAL) avec le panel total. Pour l'une d'entre elles, les 5 tubes choisis pour notre étude ont été testés. (Tableau VII) Nous avons comparé les MFI des blastes dans chacun de ces tubes. Ces marquages nous ont également permis d'étudier l'expression de B7-H3 par les différentes sous-populations de blastes.

Conditions d'immunomarquages choisies pour notre étude

Enfin, les cellules médullaires des patients de la cohorte principale et d'un témoin ont été traitées selon le protocole suivant. Cinquante mille cellules (50µL) ont été incubées dans 50µL de PBS-SAB avec tous les anticorps simultanément pour chacune des 3 combinaisons utilisées : le panel établi (10µL d'anti-CD56/FITC – 7,5µL d'anti-B7-H3/PE – 5µL d'anti-CD34/PC7 – 5µL d'anti-CD123/APC – 5µL d'anti-CD14/AA750 – 5µL d'anti-CD38/V450 – 5µL d'anti-CD45/KO) associé à un tube Auto sans anticorps pour vérifier que les cellules étudiées ne présentaient pas d'autofluorescence et un tube B7-H3 seul pour constater l'effet de la présence d'autres anticorps sur le signal de B7-H3. (Tableau VII)

Tableau VII : Tableau récapitulatif des principales combinaisons d'anticorps utilisées

500 000 cellules (50µL à 10 millions/mL) incubées 20 min avec les anticorps dans 50µL de PBS-SAB

Pour les patients de la cohorte : Auto + B7-H3 + Panel (+ contrôle isotypique tous les 5 patients)

Pour les LAM5 : Auto + B7-H3 + Panel + contrôle isotypique + sans 14

	FITC	PE	PC7	APC	AA750	V450	KO
Auto							
B7-H3		B7-H3					
Panel	CD56	B7-H3	CD34	CD123	CD14	CD38	CD45
Ctl iso	CD56	IgG1	CD34	CD123	CD14	CD38	CD45
Sans 14	CD56	B7-H3	CD34	CD123		CD38	CD45
Volume	10µL	7,5µL	5µL	5µL	5µL	5µL	5µL

Nous avons choisi de ne pas utiliser le contrôle isotypique pour chaque patient de notre série pour différentes raisons. Les raisons de limitations des coûts sont évidentes. De plus, le contrôle isotypique présentait des fixations non spécifiques différentes de celles de

l'anticorps anti-B7-H3, ainsi certaines populations pouvaient être plus faibles en B7-H3 qu'en contrôle isotypique. Enfin, les échantillons comprenaient des témoins internes plus pertinents négatifs (les lymphocytes) et positifs (les monocytes). Nous avons donc réalisé un marquage isotypique seulement pour un patient à chaque série soit 1 patient sur 5 environ.

Les anticorps anti-B7-HE3/PE et anti-CD14/AA750 étant incompatibles nous avons ajouté pour chaque LAM5 (fréquemment positive en CD14) un tube de contrôle isotypique et un tube sans anticorps anti-CD14.

Incubation

Quelle que soit la méthode de marquage, les 20 minutes d'incubation à l'obscurité étaient suivies d'un lavage au PBS et d'une centrifugation à 430g pendant 5 minutes.

Acquisition

Les cellules remises en suspension dans 500 μ L de PBS étaient passées au cytomètre pour l'acquisition de 50 000 événements.

Réglages du cytomètre

Le réglage des photomultiplicateurs a été réalisé grâce à des cellules lavées non marquées, témoin d'autofluorescence. Le voltage de chaque photomultiplicateur a été ajusté pour que 95% des événements apparaissent dans la fenêtre d'analyse (5% des cellules ont un signal trop faible pour être visualisé).

Les spectres d'émission des différents anticorps pouvant se chevaucher légèrement, il est nécessaire d'appliquer une transformation mathématique du signal brut appelé matrice de compensation afin de soustraire les signaux non spécifiques venant des autres fluorochromes (appelées fuites).

	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6	FL7	FL8	FL9	FL10
FL1		0.6	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.3
FL2	22.9		8.4	1.5	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
FL3	6.1	33.3		0.5	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
FL4	1.8	11.1	51.7		0.2	0.4	0.4	0.0	0.0	0.0
FL5	0.4	2.4	13.5	46.0		0.2	0.6	2.5	0.0	0.0
FL6	0.0	0.0	0.2	1.1	0.0		6.9	17.7	0.0	0.0
FL7	0.0	0.0	0.1	23.6	0.3	46.4		14.0	0.0	0.0
FL8	0.0	0.0	0.0	7.0	5.1	8.8	21.1		0.0	0.0
FL9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		2.1
FL10	2.9	2.2	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	11.1	

Figure 8 : Matrice de compensation utilisée pour notre étude

Matrice représentant les facteurs de correction appliqués au signal brut pour éliminer les fuites venant des autres fluorochromes. Cette matrice de compensation a été réalisée dans notre laboratoire. Des lymphocytes témoins étaient monomarqués par un anticorps anti-CD45 marqué d'un fluorochrome. Les facteurs de compensations étaient appliqués informatiquement et ajustés empiriquement pour que les cellules restent négatives (dans la 1ère décade) pour toutes les autres couleurs. Cette opération a été renouvelée pour les 9 autres fluorochromes.

La matrice de compensation utilisée dans notre étude a été réalisée à partir de lymphocytes témoins. Les lymphocytes ont été monomarqués par un anticorps anti-CD45 couplé à un fluorochrome de la société Beckman-Coulter. Les lymphocytes émettaient donc un signal fort dans la couleur de ce fluorochrome, et les fuites de fluorescences dans les autres couleurs étaient aisément visualisables. Les facteurs de compensations étaient calculés informatiquement et ajustés empiriquement pour que les cellules restent négatives (c'est-à-dire dans la première décade) pour toutes les autres couleurs. Cette opération a été réalisée séparément pour chacun des 10 fluorochromes. Le résultat est visualisé sous forme d'une matrice contenant ces différents facteurs de correction du signal brut. (Figure 8)

Stratégie de fenêtrage

Sur un graphique représentant la structure cellulaire en fonction de la taille de la cellule, nous avons éliminé les débris cellulaires d'une part et sélectionné les cellules mononucléées d'autre part. Sur un graphique représentant la structure de la cellule en fonction de l'intensité de marquage en CD14, nous avons sélectionné les cellules fortement positives en CD14 (monocytes). (Figure 9)

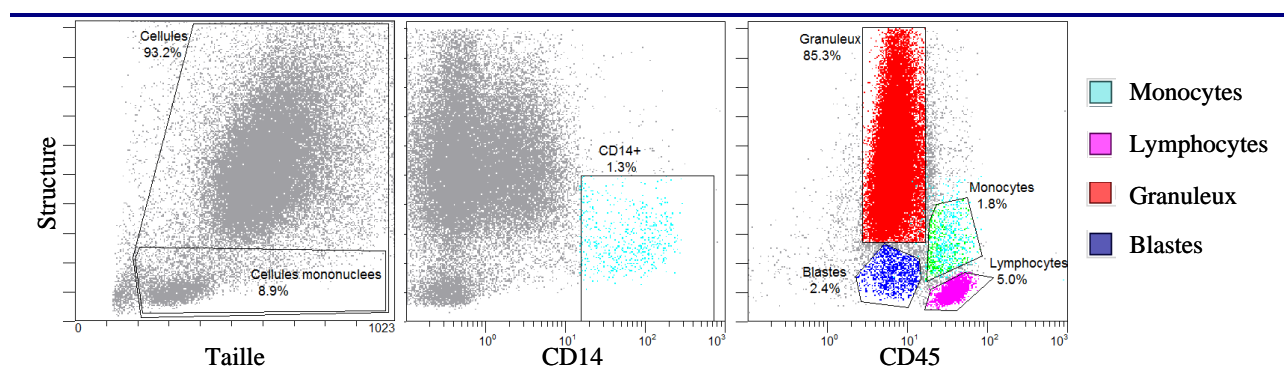


Figure 9 : Stratégie de fenêtrage utilisée dans notre étude

Sur un graphique taille/structure nous avons éliminé les débris cellulaires et sélectionné les cellules mononucléées. Sur un graphique CD14/structure nous avons sélectionné les monocytes. Sur un graphique CD45/structure nous avons sélectionné les lymphocytes (CD45 fort, structure simple, CD14-), les monocytes (CD45 fort, structure intermédiaire, CD14+), les blastés (CD45 intermédiaire, structure variable, CD14-).

Sur un graphique représentant la structure de la cellule en fonction de l'intensité de marquage en CD45, nous avons sélectionné les différentes populations leucocytaires. Les lymphocytes étaient fortement positifs en CD45, de structure simple, et négatifs en CD14. Les monocytes étaient fortement positifs en CD45, de structure légèrement plus complexe et positifs en CD14. Les blastés étaient de structure variable, de CD45 intermédiaire, et négatifs en CD14. Toutefois, pour les LAM5b, nous n'avons pas séparé les monocytes et nous avons inclus toutes les cellules positives en CD14 dans les cellules leucémiques.

Nous avons mis en évidence des populations de cellules souches hématopoïétiques à divers degrés de maturation en sélectionnant les blastés 34+, les blastés 34+/38-, les blastés 34+/38-/123+ (que nous avons différenciés des éventuelles cellules dendritiques

plasmocytoïdes car ces dernières sont fortement positives en CD56) nous avons relevé la MFI en B7-H3 de chaque population à condition qu'elle soit composée d'au moins 50 cellules.

Pour chaque patient, nous avons relevé la moyenne de fluorescence en PE des cellules mononucléées dans le tube B7-H3 seul et le pourcentage de cellules mononucléées positives. Dans le tube panel, nous avons relevé le pourcentage de chaque type cellulaire, la moyenne de fluorescence en PE des petites cellules, des monocytes, des lymphocytes et des blastes et le pourcentage de blastes positifs par rapport aux lymphocytes.

Critères de positivité

Nous avons testé deux seuils de positivité : moyenne de fluorescence des blastes à 1,2 et 2.

Statistiques

Comparaison d'une variable continue dans 2 groupes distincts

Pour les petits échantillons (<50), la normalité de distribution du caractère étudié est vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. L'homogénéité des variances entre les échantillons est vérifiée par le Test F de Fischer. Si les normalités et l'homogénéité des variances sont vérifiées, ou dans le cas de grands échantillons, la significativité de la différence constatée est calculée par le test t de Student. Si les normalités ou l'homogénéité ne sont pas vérifiées, la significativité de la différence constatée est mesurée par le test de Mann-Whitney. Dans tous les cas, la différence est considérée significative pour un $p < 0,05$.

Dans le cas d'une différence non significative, la puissance statistique du test est calculée selon la méthode décrite par Howell en 1998. La puissance est jugée suffisante quand elle est supérieure à 80%. Dans ce cas, les deux échantillons sont considérés comme appartenant à la même population d'origine.

Corrélation de deux variables linéaires appariées

Le coefficient de corrélation linéaire de Bravais-Pearson r est calculé et les 2 variables sont considérées comme corrélées lorsque p est inférieur à 0,05 (et r se rapproche de 1 ou de -1). La courbe de tendance est établie selon la technique des moindres carrés.

Comparaison de deux variables linéaires appariées

Dans le cas de deux variables linéaires appariées, nous avons utilisé le test t de Student pour séries appariées dans le cas de grands échantillons (à partir de 50). La différence entre les 2 séries est considérée comme significative pour un $p < 0,05$.

Comparaison des répartitions de deux variables discrètes

Dans le cas de grands échantillons (effectifs de chaque modalité >5), nous avons utilisé le test de χ^2 . Dans les cas de petits échantillons ($1 < \text{effectifs de chaque modalité} < 6$), nous avons utilisé le test exact de Fisher. Dans tous les cas, la différence est considérée significative pour un $p < 0,05$.

Tests de survie globale

Nous avons établi des courbes de survie selon la méthode de Kaplan-Meier et testé la significativité de la différence de survie constatée par un test logarithmique de rang. La différence est considérée comme significative pour un $p < 0,05$.

Courbes ROC

Nous avons établi une courbe ROC (Receiving Operating Characteristics) et calculé l'aire sous la courbe par méthode géométrique. Nous avons testé la significativité du test diagnostique en calculant la probabilité que la courbe soit confondue avec la bissectrice grâce au test de Student.



Résultats

Mises au point

Comparaisons des différents réactifs

Nous avons testé tous les anticorps anti-B7-H3 destinés à la cytométrie en flux (CMF) et marqués à la Phycoérythrine (PE) disponibles sur le marché – le clone 185504 (IgG1, R&D system) avec son isotype, le clone FM276 (IgG2a, Miltenyi Biotec), le clone DCN.70 (IgG1, BioLegend) et le clone MIH42 (IgG1, BioLegend) – sur du sang présentant une légère monocytose (1,2G/L) d'origine infectieuse : pneumopathie à *Pseudomonas aeruginosa*. (Figure 10) Ces tests ont été réalisés sur du sang total avec lyse des globules rouges pour marquer tous les leucocytes. Les différentes populations leucocytaires ont été différenciées grâce à un comarquage au CD45.

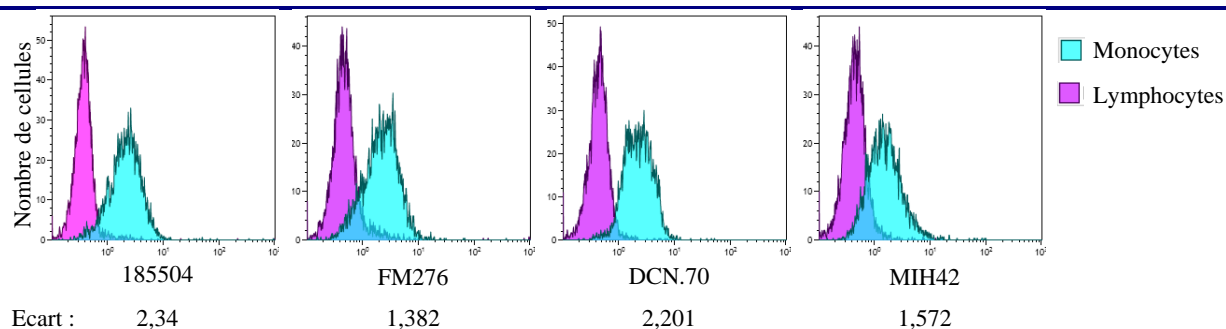


Figure 10 : Capacité des différents réactifs à discriminer les monocytes des lymphocytes

Histogrammes montrant le nombre de cellules marquées (lymphocytes et monocytes) en fonction de leur intensité de fluorescence sur du sang présentant une légère monocytose (1,2 G/L) d'origine infectieuse
Ecart : moyenne de l'intensité de fluorescence (MFI) des monocytes – MFI des lymphocytes

Nous avons évalué la capacité des réactifs à séparer les lymphocytes (témoin négatif) des monocytes (témoin positif) par l'écart des moyennes de l'intensité de fluorescence des monocytes et des lymphocytes (MFI des monocytes – MFI des lymphocytes). Cet écart était de 2,34 pour le clone 185504, de 1,38 pour le clone FM276, de 2,20 pour le clone DCN.70 et de 1,57 pour le clone MIH42. Nous avons donc choisi le clone 185504 de R&D system.

Caractéristiques de marquage

Pour le clone choisi, nous avons comparé le marquage de tous les leucocytes du même patient. (Figure 11) La MFI est de 0,676 pour les lymphocytes, de 3,02 pour les monocytes et de 1,81 pour les polynucléaires neutrophiles. Cela donne donc un écart de MFI de 2,34 pour les monocytes et de 1,13 pour les granulocytes par rapport aux lymphocytes. On constate que les granulocytes ont un marquage très hétérogène dont la résultante globale n'est pas vraiment positive.

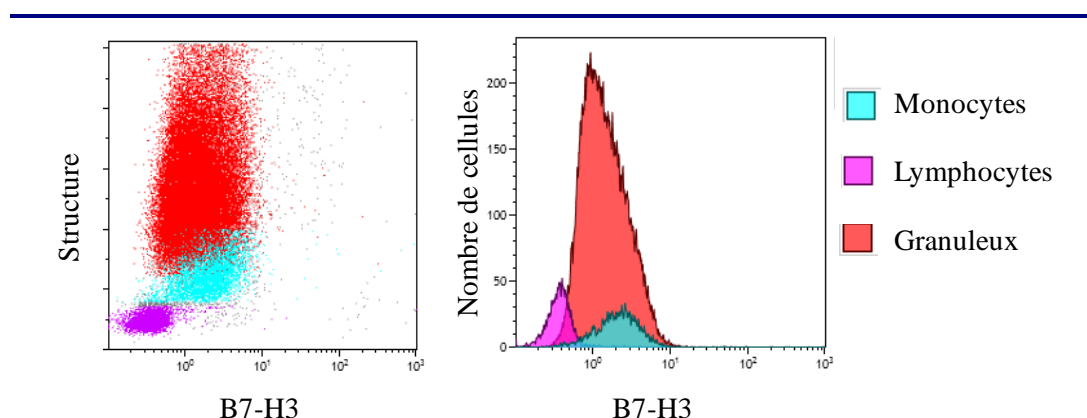


Figure 11 : Comparaison des marquages des différentes populations leucocytaires sanguines avec l'anticorps anti-B7-H3 clone 185504

Graphiques biparamétriques montrant la structure des cellules en fonction de l'intensité de signal de B7-H3 et histogramme montrant le nombre de cellules marquées en fonction leur intensité de signal en B7-H3 sur du sang présentant une légère monocytose (1,2 G/L) d'origine infectieuse.

Au cours de la même manipulation, nous avons également comparé la MFI des monocytes (témoin positif) dans trois conditions différentes : autofluorescence (0,4), contrôle isotypique (1,08) et anticorps anti-B7-H3/PE (3,02). (Figure 12) Ceci donne un écart de MFI de 2,62 par rapport au témoin auto et de 1,94 par rapport au témoin isotypique.

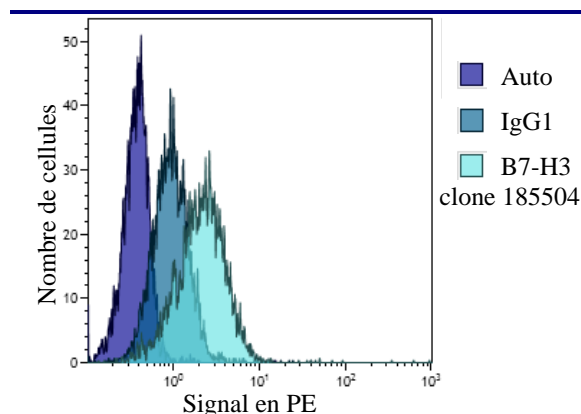


Figure 12 : Comparaison du clone 185504 au contrôle isotypique et à l'autofluorescence

Histogrammes montrant l'intensité de fluorescence des monocytes sans marquage ou marqués avec l'anticorps anti-B7-H3 clone 185504 ou avec le contrôle isotypique

Recherche de la concentration saturante

Pour savoir quelle quantité d'anticorps anti-B7-H3/PE nous allons utiliser, nous avons cherché la concentration saturante, c'est-à-dire la concentration à laquelle toutes les molécules de B7-H3 présentes sur chacune des cellules testées sont marquées par un anticorps. Il s'agit donc de la concentration pour laquelle l'ajout d'anticorps n'augmente pas le signal, bon compromis entre efficacité et économie. De plus, cela a l'avantage de limiter la variabilité entre les manipulations car en condition saturante, des petites variations de quantité d'anticorps n'entraînent pas de changement de la MFI. Pour cela, nous avons comparé la MFI émise par les monocytes d'un sang présentant une légère monocytose (1,1G/L) transitoire non infectieuse marqués avec 0 μ L, 2,5 μ L, 5 μ L, 7,5 μ L, 10 μ L ou 20 μ L d'anticorps anti-B7-H3/PE.

(Figure 13)

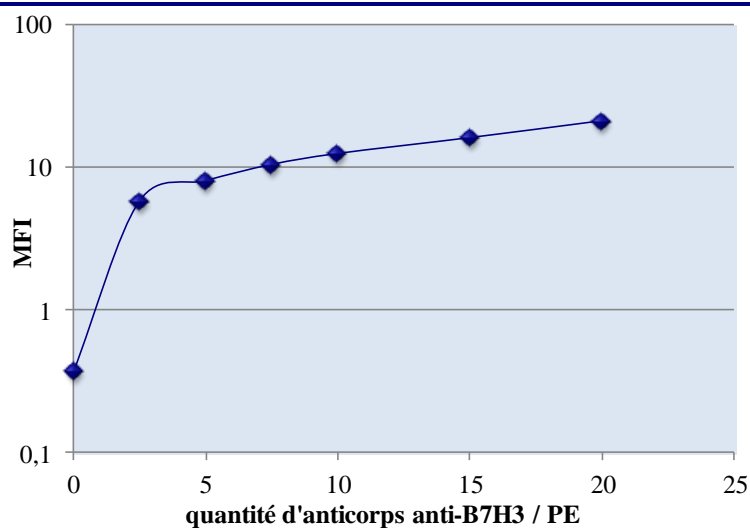


Figure 13 : Etablissement de la courbe de concentration saturante

Nous avons comparé le signal émis par les monocytes d'un sang présentant une légère monocytose marqués avec 0 μ L, 2,5 μ L, 5 μ L, 7,5 μ L, 10 μ L ou 20 μ L d'anticorps anti-B7-H3/PE. Nous avons marqué 500 000 cellules dans un volume final de 150 μ L. La MFI des monocytes augmente jusqu'à la dose de 2,5 μ L ; à partir de la dose de 5 μ L, la courbe atteint un plateau : 5 μ L est la dose saturante.

Nous pouvons voir que la MFI des monocytes augmente jusqu'à la dose de 2,5 μ L ; à partir de la dose de 5 μ L, la courbe atteint un plateau : 5 μ L est la dose saturante. Pour plus de sécurité, nous avons travaillé par la suite avec une dose de 7,5 μ L.

Tests de stabilité

Pour connaître la stabilité de B7-H3 à la surface des monocytes après le prélèvement sur un tube EDTA conservé à température ambiante, nous avons comparé les MFI à la surface des monocytes d'un témoin sain juste après le prélèvement (MFI = 1,62) ou 5 heures après le prélèvement (MFI = 2,32) ou 24 heures après le prélèvement (MFI = 7,05) sur un tube avec un anticorps anti-B7-H3/PE seul. Nous voyons que l'expression de B7-H3 à la surface des monocytes augmente au cours du temps pour atteindre 4,4 fois sa valeur initiale à 24 heures. (Figure 14)

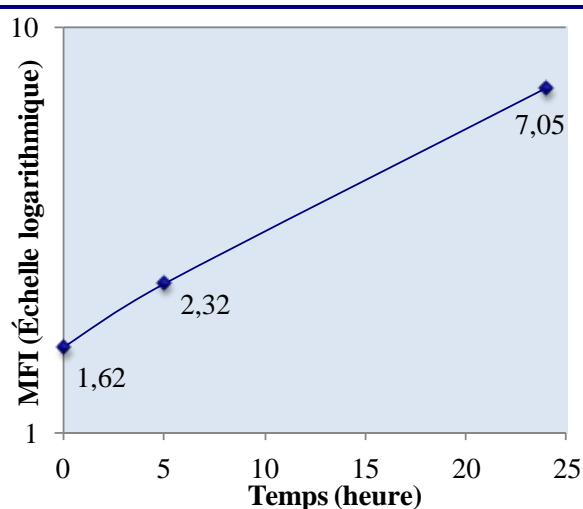


Figure 14 : Test de stabilité de l'expression de B7-H3 après le prélèvement

Nous avons gardé un prélèvement de sang sur tube EDTA à 24h et réalisé un marquage des monocytes avec l'anticorps anti-B7-H3/PE immédiatement, 5 heures et 24 heures après le prélèvement. L'expression de B7-H3 augmente jusque 4,4 fois sa valeur initiale.

Pour connaître la stabilité de l'expression de B7-H3 au cours de la technique, nous avons gardé la suspension de cellules d'un autre témoin à 10 millions de cellules par millilitre pendant quelques heures à 4°C ou à température ambiante. Nous avons comparé la MFI des monocytes dans ces deux conditions à la MFI des monocytes marqués et passés immédiatement et à celle des monocytes marqués immédiatement et repassés quelques heures après. Nous avons fait chacune de ces manipulations sans anticorps, avec 5µL et 10µL d'anticorps anti-B7-H3/PE.

Nous pouvons constater que la MFI est stable pendant plusieurs heures après le marquage, (Figure 15) ce qui n'est pas surprenant puisque la liaison antigène/anticorps est stable dans les conditions de conservation adaptées (4°C et à l'obscurité) et que cette liaison protège la protéine contre la dégradation et l'internalisation. On peut aussi conclure de cette expérience que l'on peut garder la suspension cellulaire quelques heures avant marquage car la perte de signal est acceptable quelque soit la température.

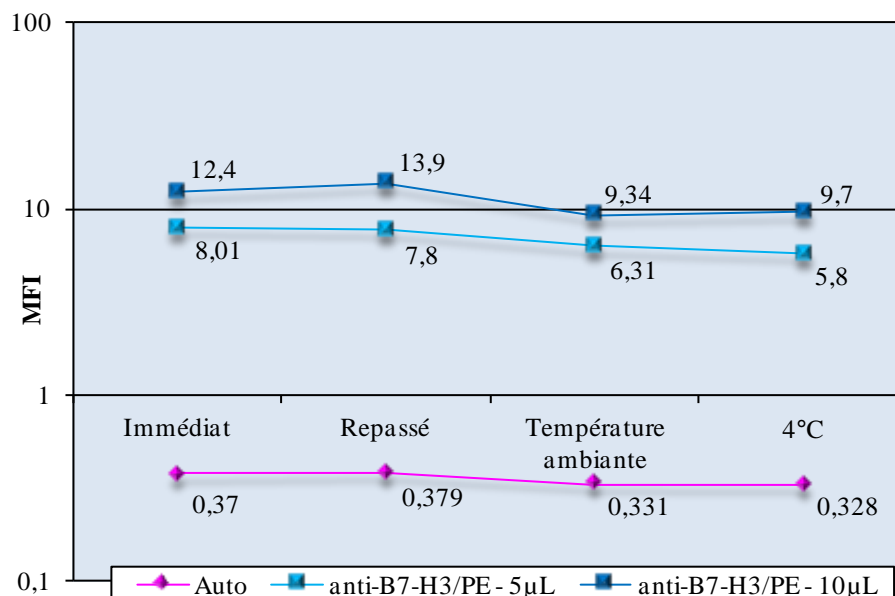


Figure 15 : Tests de stabilité de l'expression de B7-H3 au cours de la technique

Nous avons gardé la suspension de cellules à 10 millions de cellules par millilitre pendant quelques heures à 4°C ou à température ambiante. Nous avons comparé la MFI des monocytes dans ces 2 conditions à la MFI des monocytes marqués et passés immédiatement et à celle des monocytes marqués immédiatement et repassés quelques heures après. La MFI est stable pendant plusieurs heures après le marquage. La perte de signal quand on garde la suspension cellulaire avant marquage est acceptable.

Influence d'un lavage avant marquage

Pour savoir si le marquage observé est spécifiquement dû à la présence de B7-H3 membranaire ou à l'adsorption non spécifique de la forme soluble de B7-H3, nous avons testé l'influence d'un lavage avant marquage. Nous avons comparé la MFI des monocytes d'un sang présentant une légère monocytose (1,6 G/L) d'origine infectieuse (pyélonéphrite à E. coli) marqués sans lavage (MFI : 16,8) ou après lavage de 2h à 37°C (MFI : 16,5). L'effet du lavage étant négligeable, il n'a pas été utilisé au cours de cette étude.

Influence du comarquage

Pour savoir comment se comporte le réactif anti-B7-H3/PE en présence des autres réactifs, nous avons comparé la MFI des monocytes pour B7-H3 d'un témoin sain en présence de l'anticorps anti-B7-H3/PE seul (MFI : 1,56) et en bimarquage avec un anticorps anti-CD56/FITC (1,19), anti-CD34/PC7 (1,26), anti-CD123/APC (1,25), anti-CD14/AA750 (9,5), anti-CD38/V450 (1,78) ou anti-CD45/KO (0,811). (Tableau VIII) On voit que les bimarquages avec les réactifs anti-CD56, anti-CD123, anti-CD34 et anti-CD38 produisent une légère diminution du signal dans des proportions raisonnables. On constate que l'anticorps anti-CD45/KO produit une diminution du signal beaucoup plus importante (x0,52). A l'opposé, et de façon beaucoup plus inhabituelle, l'anticorps anti-CD14/AA750 augmente fortement le signal de l'anti-B7-H3/PE (x6).

Tableau VIII : Tableau représentant la MFI des monocytes pour B7-H3 en présence de l'anti-B7-H3 seul et en bimarquage avec les autres réactifs

L'anti-CD45 produit une diminution du signal importante (x0,52). L'anti-CD14 augmente fortement le signal (x6). Les autres réactifs font des variations habituelles.

	MFI de B7-H3
anti-B7-H3 seul	1,56
Avec anti-CD56	1,19
Avec anti-CD123	1,26
Avec anti-CD34	1,25
Avec anti-CD14	9,5
Avec anti-CD38	1,78
Avec anti-CD45	0,811

En explorant cet effet inattendu, nous avons constaté qu'en cas de bimarquage anti-B7-H3/PE et anti-CD14/AA750, le signal en FL5 (canal du PC7) était aussi affecté (MFI en FL5 positive à 0,246) de sorte que les signaux en FL2 (anti-B7-H3/PE), en FL8 (anti-CD14/AA750) et en FL5 (canal du PC7) n'étaient pas indépendants. Ceci est matérialisé sur des graphiques biparamétriques CD14 en fonction de B7-H3, CD34 en fonction de B7-H3 et CD34 en fonction de CD14 par la déformation du nuage des monocytes qui fuse vers le coin supérieur droit du graphique pour former la « flèche des monocytes » traduisant une tendance à la proportionnalité de ces trois signaux. (Figure 16) Cela signifie que ces trois signaux sont affectés par le même phénomène.

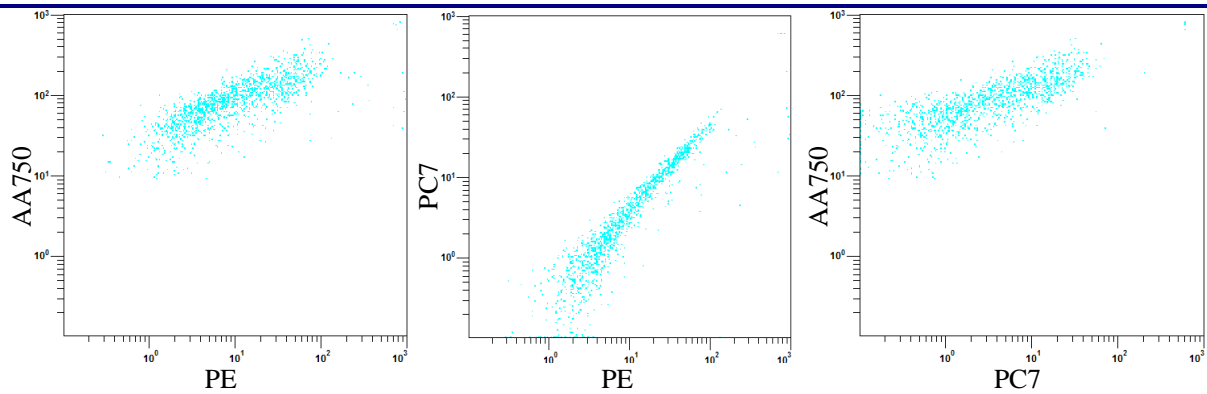


Figure 16 : Graphiques biparamétriques montrant la « flèche des monocytes » en B7-H3, CD34 et CD14
 Graphiques biparamétriques anti-CD14/AA750 en fonction d'anti-B7-H3/PE, PC7 en fonction d'anti-B7-H3/PE et PC7 en fonction d'anti-CD14/AA750 sur des monocytes de témoin sain montrant la « flèche des monocytes » qui fuse vers le coin supérieur droit des graphiques traduisant une tendance à la proportionnalité de ces trois signaux.

Nous avons donc vérifié que notre matrice de compensation était adaptée, c'est-à-dire qu'en appliquant les facteurs de compensation matriciels, la présence d'un fluorochrome ne provoquait pas de fuite de signal dans les deux autres canaux. Pour cela, nous avons marqué les monocytes du même patient avec l'anticorps anti-B7-H3/PE ou avec l'anticorps anti-CD14/AA750. Les mêmes graphiques que précédemment montrent un signal dans le canal attendu et une absence de signal dans les deux autres canaux : la matrice est adaptée.

(Figure 17)

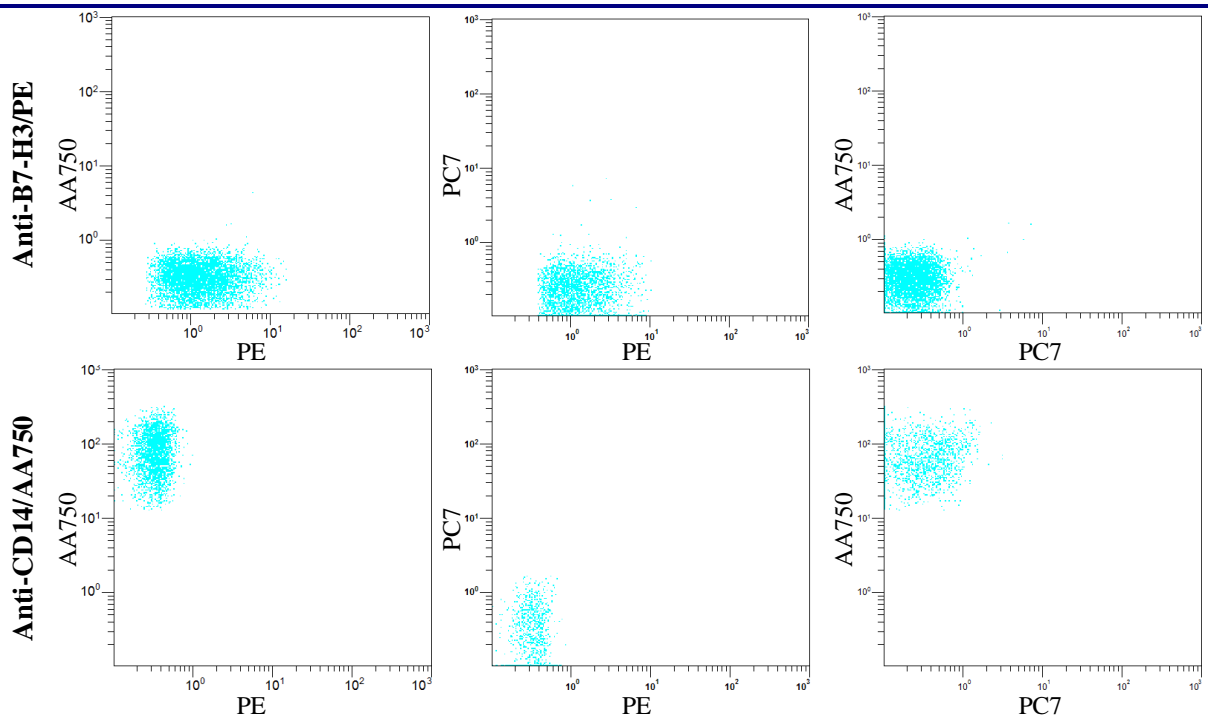


Figure 17 : Graphiques biparamétriques montrant la compensation efficace des signaux en PE et AA750
 Graphiques biparamétriques AA750 en fonction de PE, PC7 en fonction de PE et PC7 en fonction d'AA750 sur des monocytes témoins marqués par un anticorps anti-B7-H3/PE ou anti-CD14/AA750. On constate l'absence de flèche et l'absence de positivité des canaux qui n'ont pas d'anticorps.

En comparant les MFI des monomarquages avec celles du comarquage, nous pouvons en plus constater que le signal en FL8 (canal de l'AA750) n'est pas affecté par le phénomène. (Tableau IX)

Tableau IX : Tableau montrant les MFI des monocytes marqués par les 2 anticorps en mono- et en bimarquage dans les 3 canaux d'intérêt

	PE	PC7	AA750
Anti-B7-H3/PE	1,56	0,246	0,321
Anti-CD14/AA750	0,35	0,26	88,9
Comarquage	21	7,25	95,8

Pour explorer l'interférence entre les signaux des réactifs anti-B7-H3/PE et anti-CD14/AA750, nous avons mesuré la MFI des monocytes d'un sang présentant une légère monocytose (1,1 G/L) transitoire non infectieuse en FL2 (PE) et en FL5 (PC7) lorsqu'ils sont monomarqués en anti-B7-H3/PE ou comarqués avec différentes combinaisons. Nous avons voulu savoir si le phénomène observé était dû à une interaction de signal entre les fluorochromes, à la présence concomitante des deux anticorps (anti-CD14 et anti-B7-H3) ou à un phénomène plus complexe. Pour cela les combinaisons suivantes ont été testées: l'anti-B7-H3/PE a été associé à l'anti-CD14/AA750, au même anti-CD14 marqué par un autre fluorochrome (FITC) ou à un autre anticorps (anti-CD45) marqué par le même AA750.

Tableau X : Comportement de l'anti-B7-H3/PE en présence d'un autre anticorps

La fuite vers les canaux PE et PC7, ne se produit qu'en présence des 2 anticorps anti-B7-H3/PE et anti-CD14/AA750

FITC	PE	AA750	PE	PC7
	B7-H3		8,71	0,327
CD14	B7-H3		2,11	0,367
	B7-H3	CD45	0,936	0,662
	B7-H3	CD14	70,6	32

(Tableau X) Nous pouvons constater que la fuite ne se produit de manière spécifique que si le réactif anti-B7-H3/PE est en présence de l'anti-CD14/AA750.

Enfin, nous avons étudié le comportement du réactif anti-B7-H3/PE au sein du panel complet. Pour cela, nous avons comparé la MFI des cellules positives au sein d'une moelle témoin (rémission complète de LAL) marquées par du B7-H3 seul ou par le panel complet (anti-CD56/FITC, anti-B7-H3/PE, anti-CD34/PC7, anti-CD123/APC, anti-CD14/AA750, anti-CD38/V450, anti-CD45/KO). La MFI des monocytes est nettement plus importante (+55%) quand ils sont marqués par le panel (MFI : 3,15) que quand ils sont marqués seulement par l'anti-B7-H3/PE (2,03) et la « flèche des monocytes » est nettement visible sur les graphiques appropriés. (Figure 18)



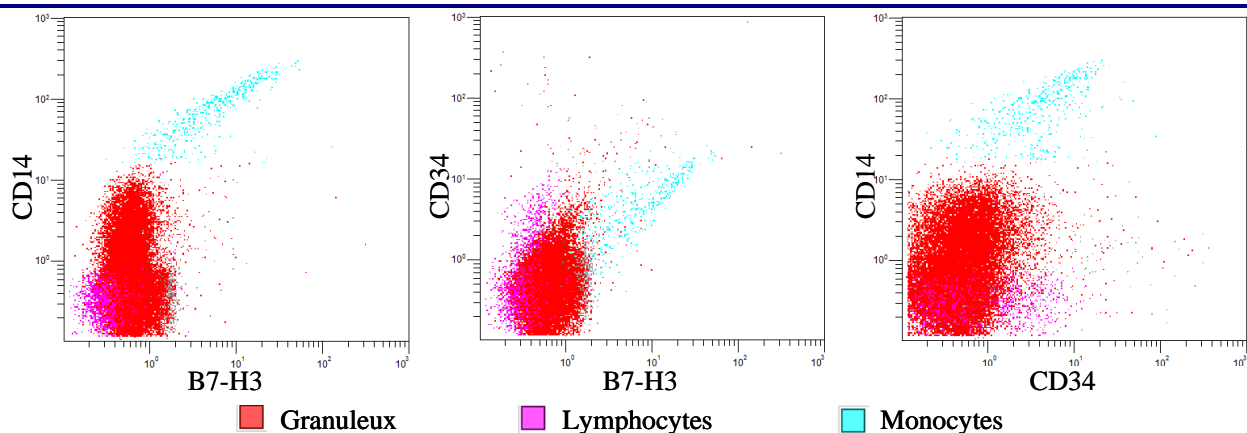


Figure 18 : Graphiques biparamétriques montrant la « flèche des monocytes » en B7-H3, CD34 et CD14
 Graphiques biparamétriques anti-CD14/AA750 en fonction d’anti-B7-H3/PE, anti-CD34/PC7 en fonction d’anti-B7-H3/PE et anti-CD34/PC7 en fonction d’anti-CD14/AA750 sur des cellules de moelle témoin (rémission complète de LAL) montrant la « flèche des monocytes » qui fuse vers le coin supérieur droit des graphiques représentant une tendance à la proportionnalité de ces trois signaux.

Nous avons également ajouté un tube sans réactif anti-CD14/AA750 à cause de l’interférence précédemment décrite et un tube remplaçant le réactif anti-B7-H3/PE par son contrôle isotypique. La spécificité de l’interférence de signal entre les réactifs anti-B7-H3/PE et anti-CD14/PAA750 est confirmée. (Tableau XI) Notons que la MFI en CD14/AA750 n’est pas affectée par la fuite de signal.

Tableau XI : Comparaison des MFI en l’absence de chaque anticorps impliqué dans l’interférence

La fuite de signal constatée vers les canaux B7-H3/PE et CD37/PC7 ne se produit qu’en présence des 2 anticorps anti-B7-H3/PE et anti-CD14/AA750 mais n’affecte pas le canal CD14/AA750

	B7-H3	CD14	CD34
Panel	6,53	64,1	9,01
Isotype	/	65,6	4,48
Sans CD14	3,09	/	4,74

Expression de B7-H3 par les cellules de moelles témoins

Nous avons marqué l’ensemble des leucocytes de 5 moelles sans excès de blastes (rémission complète de LAL) par le panel complet. Nous avons relevé les MFI pour B7-H3 des différentes populations leucocytaires (exceptés les monocytes à cause de l’interférence décrite) et des sous-populations de blastes de plus en plus indifférenciés (CD34+, CD34+/CD38- et CD34+/CD38-/CD123+) quand nous disposions d’une population d’au moins 50 cellules pour chaque sous-population. Nous pouvons constater que les populations lymphoïdes médullaires, à l’instar des lymphocytes circulants, n’expriment pas B7-H3. Les granuleux ont une expression négligeable de B7-H3. Les hémoblastes n’expriment pas B7-

H3. Il est surprenant de constater que la sous-population CD34+/CD38- a une expression de B7-H3 légèrement plus forte que l'ensemble des blastes alors que la sous-population CD34+/CD38-/CD123+ est comparable à l'ensemble des blastes. Mais le faible nombre de patients nous empêche d'extrapoler ces résultats. (Tableau XII)

Tableau XII : Tableau représentant les MFI pour B7-H3 des différentes populations leucocytaires de 5 moelles témoins

Les lymphocytes, granuleux et blastes sont négatifs. Les CD34+/CD38- sont légèrement plus positifs.

	Lymphocytes	Granuleux	CD34+	CD34+/CD38-	CD34+/CD38-/CD123+
Témoin 1	0,394	0,707	0,409	/	/
Témoin 2	0,299	1,08	0,633	/	/
Témoin 3	0,599	1,28	0,606	2,25	0,776
Témoin 4	0,310	0,606	0,440	1,28	0,248
Témoin 5	0,445	0,591	0,613	1,38	/
Moyenne	0,409	0,853	0,540	1,64	0,512

Effet de l'âge sur l'expression de B7-H3

Nous avons voulu savoir si l'expression de B7-H3 dépendait de l'âge. Pour cela, nous avons marqué les monocytes de 4 échantillons de personnes d'âges différents : 2 jours, 9 mois, 5 ans et 32 ans. Seul l'enfant de 5 ans présentait un syndrome inflammatoire biologique.

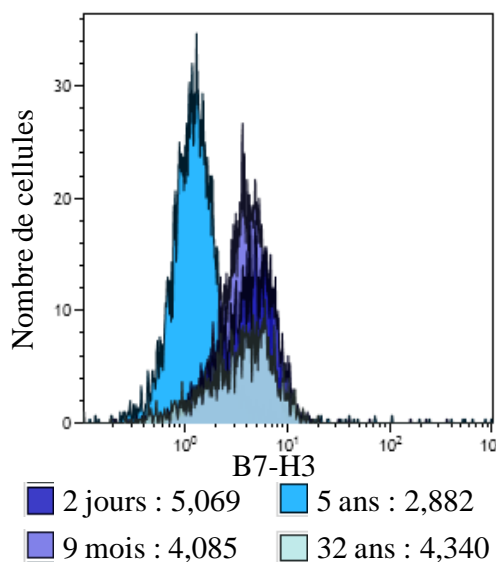


Figure 19 : Effet de l'âge sur l'expression de B7-H3

L'âge n'a pas d'influence sur l'expression de B7-H3 : les patients de 2 jours, 9 mois et 32 ans ont des MFI équivalentes ; l'enfant de 5 ans a une MFI beaucoup plus basse.

Nous constatons que l'âge n'a pas d'influence sur l'expression de B7-H3 puisque les patients de 2 jours, 9 mois et 32 ans ont des MFI équivalentes pour B7-H3 sur les monocytes (5,069, 4,085 et 4,340, respectivement) alors que les monocytes de l'enfant de 5 ans présentent une fluorescence beaucoup plus basse : 2,882. (Figure 19) Nous pouvons toutefois noter que l'expression monocyttaire de B7-H3 présente une grande variabilité inter-individuelle sans cause retrouvée

dans notre étude.

Variabilité interindividuelle

Pour mettre en évidence cette variabilité interindividuelle de l'expression de B7-H3 à la surface des monocytes circulants, nous avons relevé la MFI des monocytes sélectionnés sur un graphique taille/structure de tous les témoins qui avaient bénéficié d'un monomarquage B7-H3 à 7,5 μ L au cours de nos mises au point. (Tableau XIII)

Tableau XIII : Mise en évidence de la variabilité interindividuelle de l'expression monocyttaire de B7-H3 sur 15 patients

L'expression de B7-H3 est nettement positive (moyenne des MFI : 9,3) mais très variable (écart-type : 7,5)

N°	B7-H3	Service	Leuco	mono	CRP	Infection
1	0,93	Rééducation	7,69	1	8	
2	1,27	Chir viscérale	7,88	0,7	<3	
3	1,62	Témoin sain	5,22	0,53	/	
4	2,27	Urgences	9,88	0,5	/	
5	2,35	Neuro	10,13	1,4	31	Cystite à S. aureus
6	2,39	Maternité	15,8	1,1	4	
7	5,56	Réa	7,9	/	58	Péritonite à E. coli
8	8,59	Gériatrie	11,81	1,1	6	
9	10,6	Gastro	6,26	0,9	73	
10	11,8	Cardio	9,83	1,1	3	
11	16	Gastro	24,03	0,3	51	Pleurésie à E. coli
12	16,2	Urgences	20,11	1,3	157	Pyélonéphrite à E. coli
13	17,7	Urgences	9,15	0,9	<3	
14	20,7	Chir cardio	8,67	1,3	143	Ostéite à M. morganii
15	20,9	Chir plastique	8,83	1,1	/	

Nous pouvons voir que l'expression moyenne de B7-H3 est nettement positive (moyenne des MFI : 9,3). Mais l'expression est très variable (écart-type : 7,5) d'un patient négatif pour B7-H3 (MFI : 0,93) à une MFI de 20,9. (Figure 20) On peut également voir que cette expression ne dépend ni de l'inflammation, ni de l'infection, ni de la monocytose, ni de l'âge.

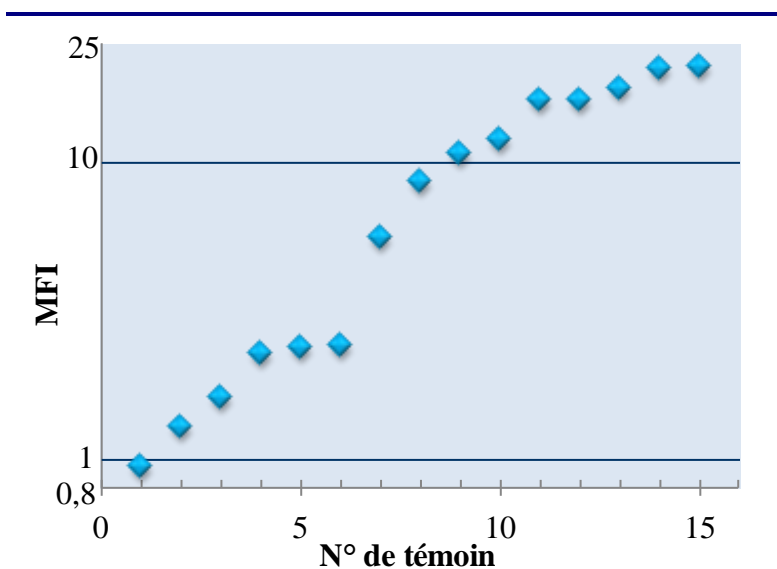


Figure 20 : Graphique représentant la MFI pour B7-H3 des monocytes circulants monomarqués avec 7,5 μ L de chaque témoin utilisé lors des mises au point

Nous pouvons voir que l'expression moyenne de B7-H3 est nettement positive (moyenne des MFI : 9,3). Mais l'expression est très variable (écart-type : 7,5) d'un patient négatif pour B7-H3 (MFI : 0,93) à une MFI de 20,9. Il y a un hiatus apparent entre le 6^{ème} et le 7^{ème} patient c'est-à-dire entre des MFI de 2,39 et 5,56.

Tests de marquage sur des lignées cellulaires

Enfin, nous avons marqué deux lignées cellulaires à notre disposition avec notre anticorps B7-H3 seul et avec le panel complet et le contrôle isotypique seul et au sein du panel. (Figure 21) La lignée myéloïde U937 est positive (MFI : 8,28) et sa positivité est diminuée au sein du panel (signal divisé par 3,5). Les cellules sont positives à 75% par rapport au contrôle isotypique en monomarquage et à 15% au sein du panel. La lignée lymphoblastique 697 se sépare très nettement en deux populations : 45% sont positives en B7-H3 (MFI : 14,4) et 55% ne le sont pas (MFI : 0,925). Au sein du panel, la MFI de la population positive n'est pas modifiée (13,4).

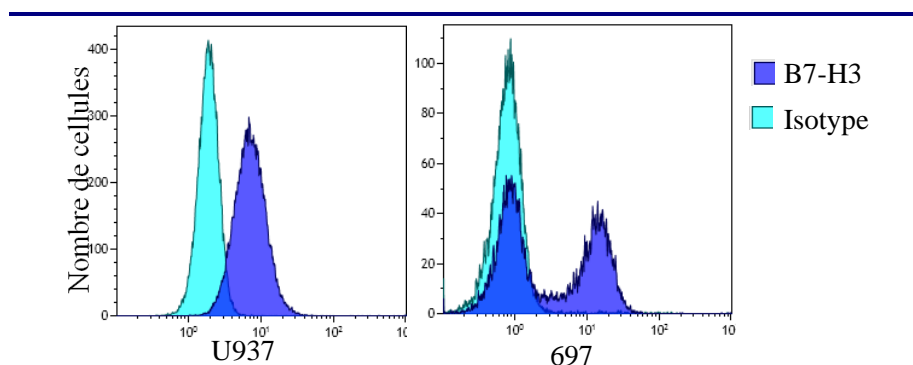


Figure 21 : Histogrammes représentant l'expression de B7-H3 par 2 lignées leucémiques par rapport au contrôle isotypique

Nous avons marqué 500 000 cellules de 2 lignées cellulaires par l'anticorps anti-B7-H3/PE et son contrôle isotypique. Nous pouvons noter une positivité de la lignée U937, tandis que la lignée 697 forme une double population.

Description des patients

Nous avons inclus 111 patients, 18 enfants et 93 adultes de 0 à 88 ans (moyenne : $m = 49$ ans). (Données brutes en Annexe II) La répartition des patients selon la classification FAB retrouve 5 LAM0, 24 LAM1, 39 LAM2, 6 LAM3, 14 LAM4, 3 LAM4 à éosinophiles, 17 LAM5, 2 LAM6 et 1 LAM7. (Figure 22)

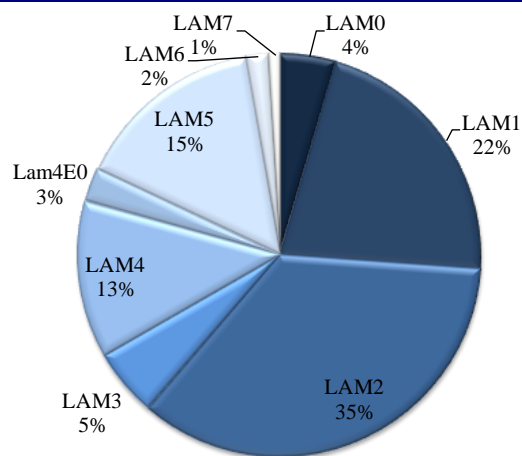


Figure 22 : Camembert représentant la répartition des 111 patients selon la classification FAB

Selon la classification OMS (imparfaite puisque 19 patients n'ont pas bénéficié de caryotype), la répartition est de 47 leucémies avec anomalies génétiques récurrentes (5 t(8;21), 3 t(15;17), 6 anomalies du chromosome 16, 1 t(9;11), 23 mutations NPM1 et 9 mutation C/EBP α), 9 leucémies associées aux myélodysplasies, 6 leucémies thérapie-induites, 48 leucémies sans spécification particulière et une leucémie associée à la trisomie 21 constitutionnelle. (Figure 23)

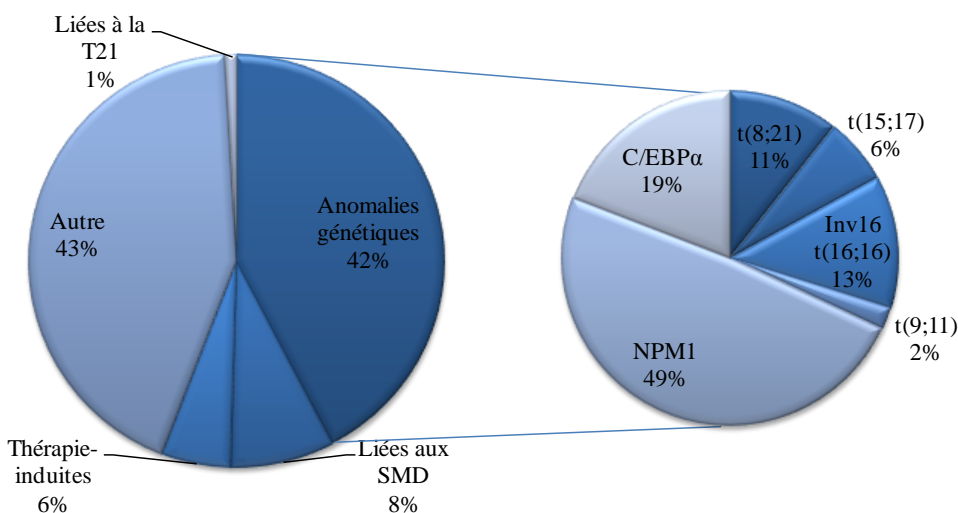


Figure 23 : Camemberts représentant la répartition des 111 patients selon la classification OMS avec détail des anomalies cytogénétiques récurrentes

L'étude cytogénétique des patients donne, en plus des caryotypes cités précédemment, 13 caryotypes complexes, 2 monosomies 7, 4 anomalies du chromosome 11q23 n'impliquant pas le chromosome 9, 32 caryotypes normaux et 26 autres caryotypes intermédiaires. Soixante-quinze patients ont bénéficié d'un traitement intensif, 15 d'un agent déméthylant, 12 d'un traitement adapté au cas par cas et 9 d'un traitement uniquement palliatif. Quarante-huit patients présentaient une hyperleucocytose supérieure à 30 G/L au diagnostic.

Nous en avons isolé une cohorte homogène de 54 adultes ayant bénéficié d'une chimiothérapie intensive à l'exclusion des leucémies aiguës promyélocyaires. Dans cette cohorte, la répartition des âges s'étend de 22 à 72 ans avec une moyenne à 50. La classification FAB retrouve 2 LAM0, 13 LAM1, 18 LAM2, 12 LAM4 et 9 LAM5. La classification OMS retrouve 30 leucémies avec anomalies génétiques récurrentes (4 t(8;21), 5 anomalies du chromosome 16, 15 mutations NPM1 et 6 mutations C/EBP α), 3 leucémies associées aux myélodysplasies, et 21 leucémies sans spécification particulière. Ces patients présentaient également 1 caryotype complexe, 1 monosomie 7, 2 anomalies du chromosome 11q23 n'impliquant pas le chromosome 9, 22 caryotypes normaux et 11 autres caryotypes intermédiaires, 8 n'ont pas été réalisés. Vingt-huit patients présentaient une hyperleucocytose supérieure à 30 G/L au diagnostic.

Expression de B7-H3

Expression de B7-H3 à la surface des différents types cellulaires

Pour l'ensemble des patients, l'expression de B7-H3 à la surface des lymphocytes est très stable avec une MFI moyenne à 0,638 avec un écart-type à 0,099 pour une MFI minimale de 0,478 et une MFI maximale de 1,03. (Figure 24) Un seul patient n'avait pas suffisamment de lymphocytes pour établir une MFI. Les monocytes ont évidemment une grande variabilité à cause de l'interférence entre les anticorps anti-B7-H3/PE et anti-CD14/AA750 avec une moyenne des MFI à 12,1, un écart type à 8,44, une

valeur minimale très basse à 0,851 et une valeur maximale de 38,8. Seuls 65 patients avaient suffisamment de monocytes pour permettre d'établir une MFI. Naturellement, chacun des 111 patients a pu bénéficier d'une MFI pour les blastes avec une MFI moyenne à 2,07, un écart type de 2,64, une MFI minimale de 0,465 et une MFI maximale de 13,8. (Figure 25)

La comparaison des MFI des lymphocytes, monocytes et des blastes 2 à 2 montre une différence significative entre les trois types de cellules ($p = 3.10^{-28}$, 2.10^{-20} et 3.10^{-22}).

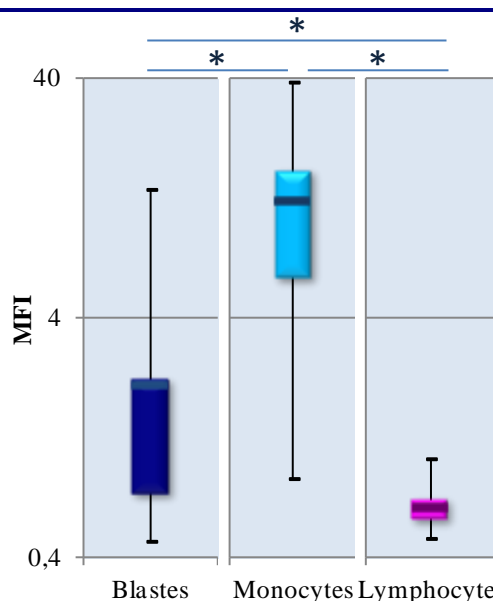


Figure 24 : Boîtes à moustaches représentant la répartition des MFI des trois types cellulaires présents dans nos échantillons

Les boîtes représentent les premiers et troisièmes quartiles, les moustaches, les valeurs maximales et minimales et le trait, la moyenne. * : différence significative, $p < 1.10^{-19}$
n = 111, 65 et 110

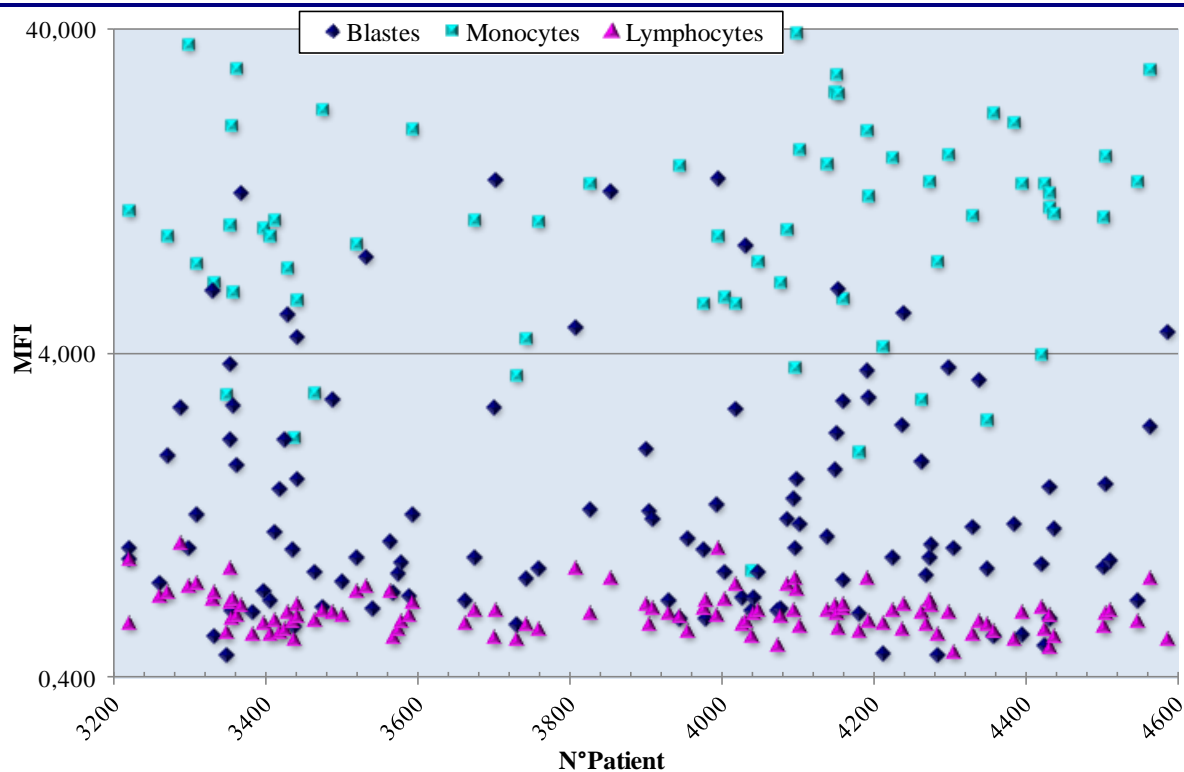


Figure 25 : Graphiques montrant la MFI de chaque population cellulaire pour chaque patient

Mode d'expression du résultat

La positivité de B7-H3 sur les blastes peut être exprimée en moyenne de fluorescence (MFI) comme indiquée ci-dessus. Elle peut également être exprimée en médiane de fluorescence. Cette médiane de fluorescence s'étend de 0,354 à 13,4 avec une moyenne à 1,58 et un écart-type (σ) à 2,33. Ces 2 expressions sont corrélées ($r = 0,99$; $p = 4,09.10^{-12}$).

Elle peut également être exprimée en ratio MFI des blastes / MFI des lymphocytes. Cette expression ne peut évidemment pas être utilisée pour le patient qui n'a pas assez de lymphocytes pour établir une MFI. Pour les 110 autres patients, les ratios s'étendent de 0,74 à 21,5 pour une moyenne à 3,13 et un écart-type (σ) à 3,68. Les expressions en MFI et en ratio sont corrélées ($r = 0,98$; $p = 1,32.10^{-73}$).

Enfin, la positivité de B7-H3 peut être exprimée en pourcentage de blastes plus positifs que les lymphocytes du même patient. (Figure 26) Cette expression pose également problème pour le patient présentant très peu de lymphocytes mais n'est pas complètement impossible. Elle s'étend de 1% à 100% avec une moyenne à 27,1% et un écart-type de 30,6%. Le pourcentage de blastes positifs et la MFI sont corrélés ($r = 0,84$; $p = 4,37.10^{-31}$). Pourtant la corrélation entre ces deux expressions est plus proche d'un modèle exponentiel puisque la corrélation entre le pourcentage de blastes positifs et le logarithme de la MFI des blastes est plus forte ($r = 0,96$; $p = 4,12.10^{-60}$).

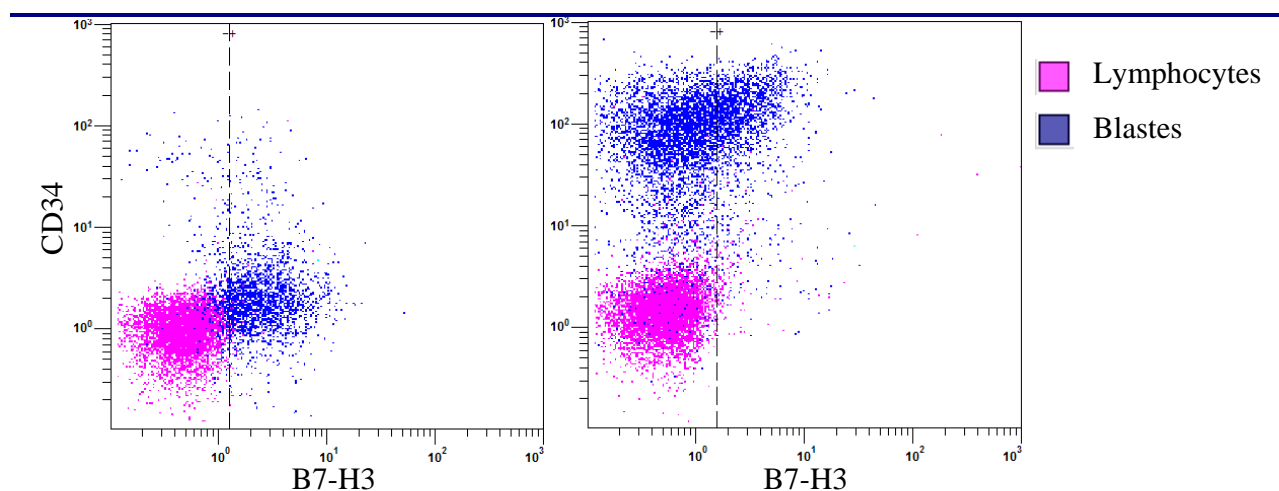


Figure 26 : Stratégie de détermination du pourcentage de blastes positifs

Sur des graphiques biparamétriques CD34 en fonction de B7-H3, nous avons placé un seuil après le nuage des lymphocytes de chaque patient. Pour le même patient, le pourcentage de blastes au dessus de ce seuil par rapport au nombre total de blastes est le pourcentage de blastes positifs. Les exemples ci-dessus sont positifs à 75% et 25% respectivement.

L'ensemble de ces expressions repose sur la mesure de fluorescence des blastes marqués par le panel complet. Nous pouvons les comparer aux paramètres mesurés sur le tube B7-H3 seul pour 109 patients, (en effet 2 patients n'ont pas bénéficié de ce tube car nous n'avions pas suffisamment de cellules congelées) ce qui permet de vérifier que les interactions observées entre les différents réactifs ne modifient pas l'interprétation finale des résultats.

La comparaison de la médiane de fluorescence des cellules mononucléées sur le tube B7-H3 seul à la médiane de fluorescence des cellules mononucléées sur le tube panel ($r = 0,80$; $p = 1,17.10^{-25}$) et à la médiane de fluorescence des blastes sur le tube panel ($r = 0,77$; $p =$

= $7,75 \cdot 10^{-23}$) montre une corrélation statistiquement significative. De la même manière, la comparaison de la moyenne de fluorescence des cellules mononucléées sur le tube B7-H3 seul à la moyenne de fluorescence des cellules mononucléées sur le tube panel ($r = 0,59$; $p = 1,11 \cdot 10^{-11}$) et à la moyenne de fluorescence des blastes sur le tube panel ($r = 0,71$; $p = 3,67 \cdot 10^{-18}$) montre une corrélation statistiquement significative. Enfin, la comparaison du pourcentage des cellules mononucléées positives sur le tube B7-H3 seul au pourcentage des cellules mononucléées positives sur le tube panel ($r = 0,88$; $p = 4,30 \cdot 10^{-36}$) et au pourcentage des blastes positifs sur le tube panel ($r = 0,82$; $p = 4,10 \cdot 10^{-27}$) montre une corrélation statistiquement significative.

Pour 19 patients, nous avons également mesuré la MFI des blastes incubés en présence du contrôle isotypique IgG1/PE, (ce qui nous permet de faire un ratio MFI de B7-H3 des blastes / MFI de contrôle isotypique des blastes et de déterminer le pourcentage de blastes positifs par rapport au contrôle isotypique). Le pourcentage de blastes positifs par rapport au contrôle isotypique est corrélé au pourcentage de blastes positifs par rapport aux lymphocytes ($r = 0,91$; $p = 8,64 \cdot 10^{-8}$). Le ratio de MFI B7-H3/contrôle isotypique des blastes est corrélé au ratio de MFI blastes/lymphocytes pour B7-H3 ($r = 0,88$; $p = 7,19 \cdot 10^{-7}$). Notons que 4 MFI pour le contrôle isotypique sont légèrement plus élevées que les MFI pour B7-H3.

Critères de positivité

L'ensemble de ces expressions est donc également utilisable. Se pose alors la question d'un critère de positivité. La MFI des blastes est le critère le plus facile à utiliser pour nous car il est disponible pour tous les patients. Le groupe de patients ne se présente pas en deux groupes distincts naturels séparés par une plage de MFI qui ne comprendrait aucun patient. (Figure 27) Nous devons donc arbitrairement fixer un seuil en accord avec les habitudes de la cytométrie et présentant une certaine légitimité au sein de notre cohorte. Une MFI à 1,2 sépare un groupe de patients aux MFI très faibles et groupées, assimilables à un bruit de fond négatif, des MFI moyennes à fortes et correspond environ à 20% de blastes plus

positifs que les lymphocytes et à une médiane de fluorescence de 0,9. Or, 20% de cellules positives est un critère classiquement utilisé. Nous retiendrons donc ce seuil. Ce critère sépare notre étude en 64 patients négatifs et 47 patients positifs pour B7-H3.

Par ailleurs, le seuil de MFI à 2 sépare deux groupes de patients : le premier avec 81 MFI faibles ou négatives et un groupe de 30 MFI fortes (et dispersées). (Figure 27) Une MFI à 2 correspond environ à une médiane de fluorescence de 1,6 et 40% de blastes plus positifs que les lymphocytes.

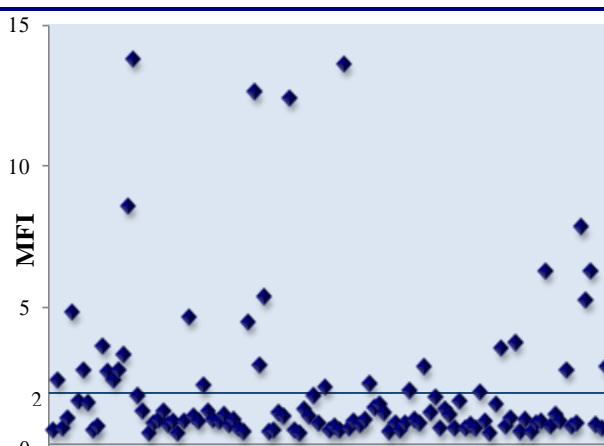


Figure 27 : Représentation des moyennes des MFI des blastes pour B7-H3 des 111 patients de notre étude montrant un seuil « naturel » à 2
Nous pouvons voir qu'un seuil à 2 sépare nos patients en 2 groupes, l'un fait de MFI faibles à modérées et groupées, l'autre de MFI fortes et dispersées.

Quatre patients se détachent vraiment de la cohorte par leur MFI très forte. Ce groupe ne peut pourtant pas être spécifiquement isolé car l'effectif est trop faible pour étudier une corrélation avec d'autres facteurs.

Nous pouvons constater que cette expression ne suit pas une loi normale ($p = 2,33 \cdot 10^{-16}$). L'expression de ces résultats en classes d'une unité de MFI montre alors une expression bimodale : la première classe est la plus abondante avec 54 patients, les classes diminuent ensuite progressivement jusqu'à ne plus avoir de patient pour des MFI de 9 à 12, puis le deuxième mode semble apparaître pour 4 patients dont les blastes présentent des MFI de 12 à 14. (Figure 28)

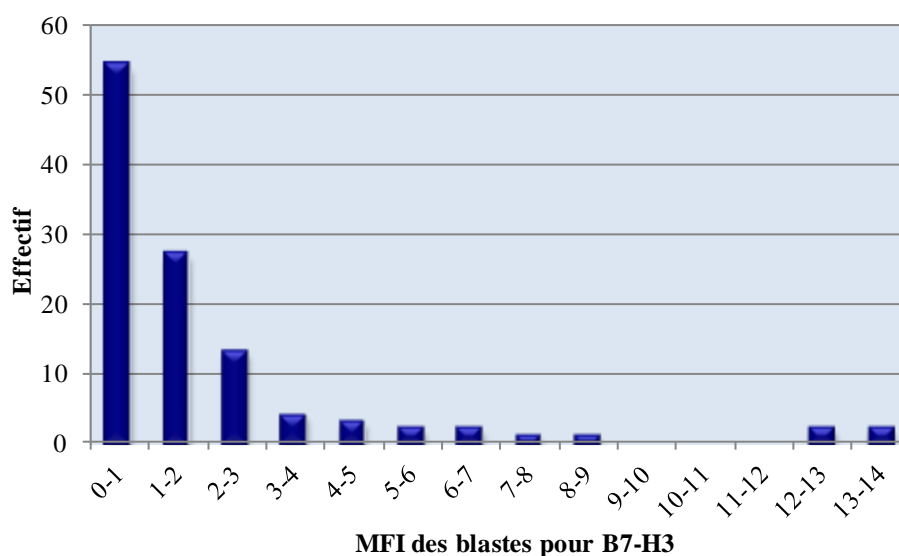


Figure 28 : Représentation des moyennes de fluorescence (MFI) des blastes pour B7-H3 des 111 patients de notre étude en effectifs de classes d'une unité

Nous pouvons voir qu'il y a une expression bimodale de B7-H3, le premier groupe de patients se répartit pour des MFI de 0,465 à 8,590 en fréquence décroissante. Puis un second groupe, restreint à 4 patients, se répartit entre des MFI de 12,4 et 13,8.

Expression de B7-H3 par les sous-populations de blastes

Pour nos 111 patients, nous avons comparé la MFI de l'ensemble des blastes à la MFI des différentes sous-populations présentes dans le tube panel (34+ ou 34+/38- ou 123+ ou 34+/38-/123+) à la condition que chaque population comprenne au moins 50 cellules. (Figure 29)

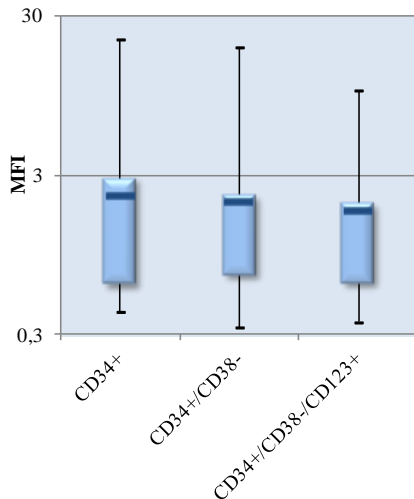


Figure 29 : Boîtes à moustaches représentant la répartition des MFI des sous-populations de blastes

Les boîtes représentent les premiers et troisièmes quartiles, les moustaches, les valeurs maximales et minimales et le trait, la moyenne.
n = 109, 99 et 80

Pour 109 patients, la MFI de l'ensemble de des blastes ($m = 2,07$; $\sigma = 2,64$) et la MFI des blastes 34+ ($m = 2,10$; $\sigma = 2,98$) sont corrélées ($r = 0,81$; $p = 8,2 \cdot 10^{-27}$). L'équation de la courbe de tendance est $y = 0,96x$. (Figure 30) Les MFI des ces deux populations ne sont pas significativement différentes ($p = 0,44$).

Pour 99 patients, la MFI de l'ensemble des blastes ($m = 1,91$; $\sigma = 2,27$) et la MFI des blastes 34+/38- ($m = 2,00$; $\sigma = 2,53$) sont corrélées ($r = 0,36$; $p = 3,0 \cdot 10^{-4}$). L'équation de la courbe de tendance est $y = 0,67x$. Les MFI de ces 2 populations ne sont pas significativement différentes ($p = 0,72$).

Pour 80 patients, la MFI de l'ensemble des blastes ($m = 1,60$; $\sigma = 1,79$) et la MFI des blastes 34+/38-/123+ ($m = 1,77$; $\sigma = 1,90$) sont corrélées ($r = 0,77$; $p = 5,6 \cdot 10^{-17}$). L'équation de la courbe de tendance est $y = 0,94x$. Les MFI de ces deux populations ne sont pas significativement différentes ($p = 0,25$). L'ensemble des MFI de toutes les sous-populations de blastes pour chaque patient est représenté en Annexe I.

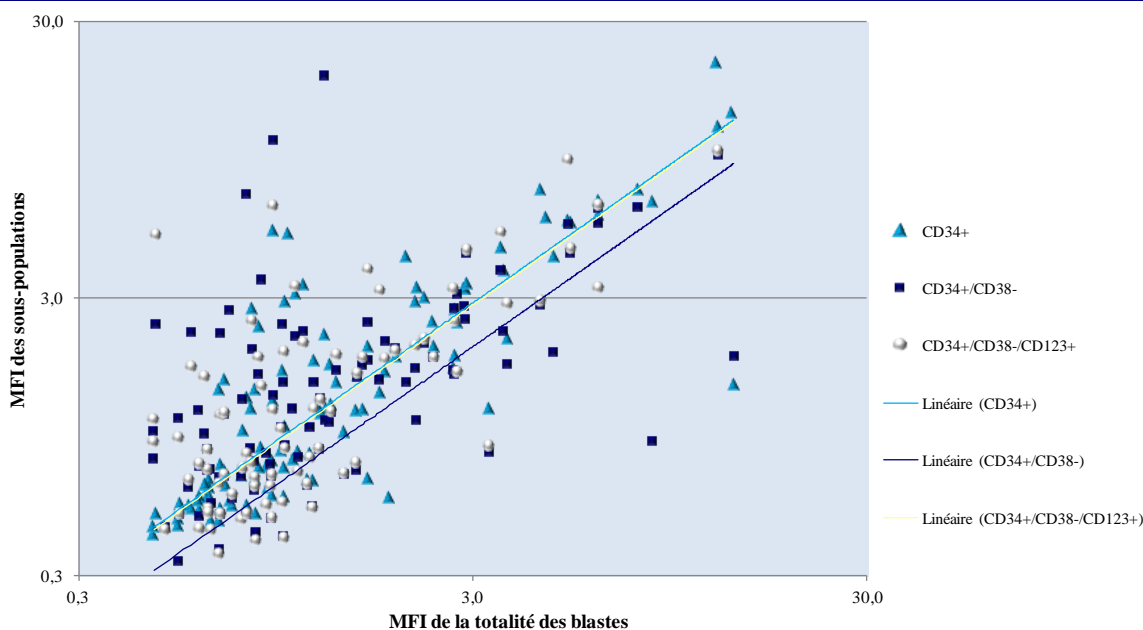


Figure 30 : Représentation des MFI des sous-populations de blastes en fonction de la MFI totale des blastes
 Nous pouvons voir que les MFI des sous-population de blastes sont corrélées à la MFI de la totalité des blastes et qu'il n'y a pas de différence d'expression de B7-H3 en fonction de ces différentes sous-populations.

Influence de l'anti-CD14/AA750 à la surface des blastes

Nous avons comparé les signaux en FL2 (canal du PE), en FL5 (canal du PC7) et en FL8 (canal de l'AA750) des blastes marqués par le panel complet, le contrôle isotypique ou le tube sans CD14 pour 11 patients qui présentent une leucémie avec expression positive pour le CD14. Les résultats

Tableau XIV : Interférence des réactifs anti-CD14/AA750 et anti-B7-H3/PE à la surface des blastes CD14+

Moyenne des ratios de MFI par rapport au tube panel pour les 11 patients et écart-type entre parenthèses. La même interférence que sur les monocytes témoins se produit.

	B7-H3	CD14	CD34
Panel	1	1	1
Isotype	/	0,97 (0,05)	0,61 (0,25)
Sans	0,46	/	0,65
CD14	(0,26)	/	(0,21)

sont exprimés en ratio de fluorescence par rapport au tube panel complet. (Tableau XIV) À la surface des blastes, le comarquage par les deux réactifs produit le même phénomène qu'à la surface des monocytes : les signaux de B7-H3 et de CD34 sont augmentés en présence des deux anticorps tandis que le signal en CD14 est inchangé. La « flèche » est également visible sur les graphiques biparamétriques appropriés.

Deux cas ont attiré notre attention. Premièrement, le patient N°3957 atteint d'une LAM5 CD14+ est négatif pour B7-H3 selon nos critères (MFI retenue à 1,04 avec le marquage sans anti-CD14/AA750). Pourtant, ses blastes CD14+ présentent une « flèche » très nette dans le panel complet, (Figure 31) la MFI observée de B7-H3 passant alors à 4,25.

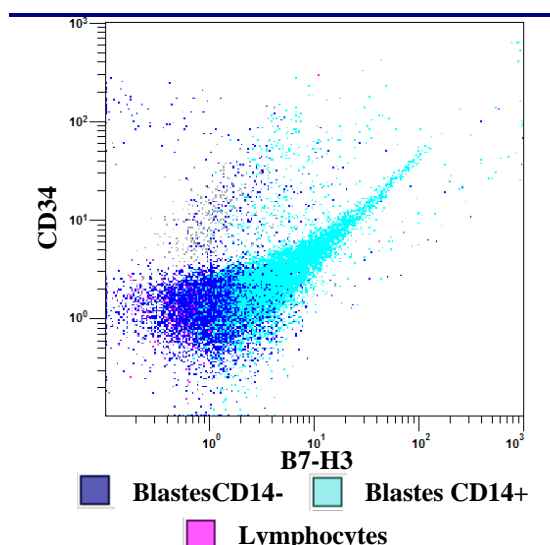


Figure 31 : Blastés CD14+ et B7-H3- produisant une « flèche »

Malgré la négativité de B7-H3 selon nos critères (MFI : 1,03), les blastés sont le siège d'une interférence entre les réactifs anti-B7-H3/PE et anti-CD14/AA750.

Inversement, le patient N°4589 atteint d'une LAM3 CD14+ présente une interférence beaucoup plus faible que les autres : la MFI de B7-H3 ne varie quasiment pas, la MFI du CD34 varie peu et la « flèche » est quasiment inexistante. (Figure 32) Cela est peut-être dû au fait que le CD14 est beaucoup plus faiblement exprimé par ces cellules (MFI : 3,85) que par les LAM5 (MFI moyenne : 44).

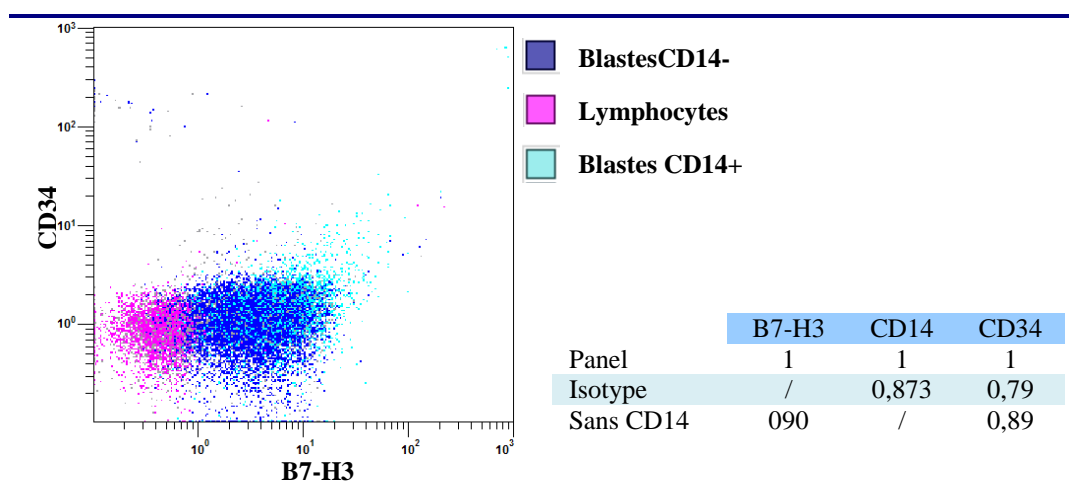


Figure 32 : Interférence minimale entre les réactifs anti-B7-H3/PE et anti-CD14/AA750

L'interférence entre les réactifs anti-B7-H3/PE et anti-CD14/AA750 est très faible à la surface des blastés du patient N°4589 atteint d'une LAM3.

Corrélation de l'expression de B7-H3 avec les critères pronostiques classiques

Âge

L'âge des patients au diagnostic n'est pas statistiquement corrélé à la MFI des blastes pour B7-H3 ($r = -0,16$; $p = 0,10$).

Les MFI des blastes chez des enfants ($m = 2,61$; $\sigma = 3,50$) et chez les adultes ($m = 1,96$; $\sigma = 2,44$) ne présentent pas de différence statistiquement significative ($p = 0,44$; $1-\beta = 13\%$). De même, les MFI des blastes chez des adultes de moins de 60 ans ($m = 2,24$; $\sigma = 3,19$) et de plus de 60 ans ($m = 1,69$; $\sigma = 1,35$) ne présentent pas de différence statistiquement significative ($p = 0,293$; $1-\beta = 19\%$). (Figure 33)

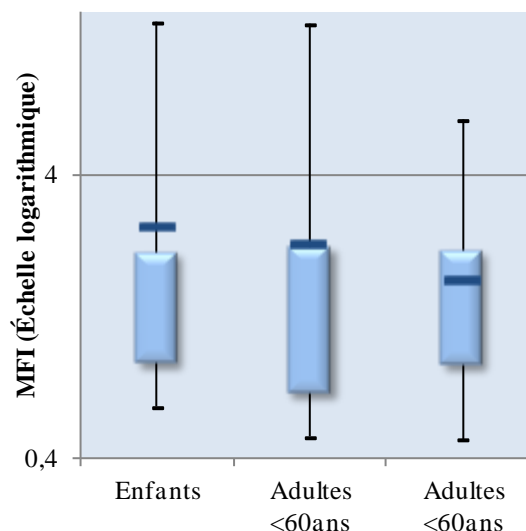


Figure 33 : Boîtes à moustaches représentant la répartition des MFI pour B7-H3 en fonction des classes d'âge

Les boîtes représentent les 1^{er} et 3^{ème} quartiles, les moustaches, les valeurs maximales et minimales et le trait, la moyenne. $n = 18, 46$ et 47 , $p > 0,05$.

La répartition des patients en deux classes, positive et négative, pour B7-H3 avec un seuil de MFI à 1,2 permet de réaliser un test de répartition : le test du χ^2 ne montre pas non plus de différence significative entre les enfants et les adultes ($p = 0,84$). De la même manière, le test du χ^2 , ne montre pas de différence de répartition entre les adultes de moins de 60 ans et les adultes de plus de 60 ans ($p = 0,59$). Un seuil à 2 ne montre pas non plus de différence de répartition (respectivement, $p = 0,94$ et $0,86$).

Sexe

Les MFI des blastes chez les femmes ($m = 2,01$; $\sigma = 2,17$) et chez les hommes ($m = 2,16$; $\sigma = 3,27$) ne présentent pas de différence statistiquement significative ($p = 0,18$; $1-\beta = 6\%$). On ne note pas non plus de différence significative de répartition des patients positifs parmi les hommes et les femmes ($p = 0,21$ pour un seuil à 1,2 et $0,79$ pour un seuil à 2).

Classification FAB

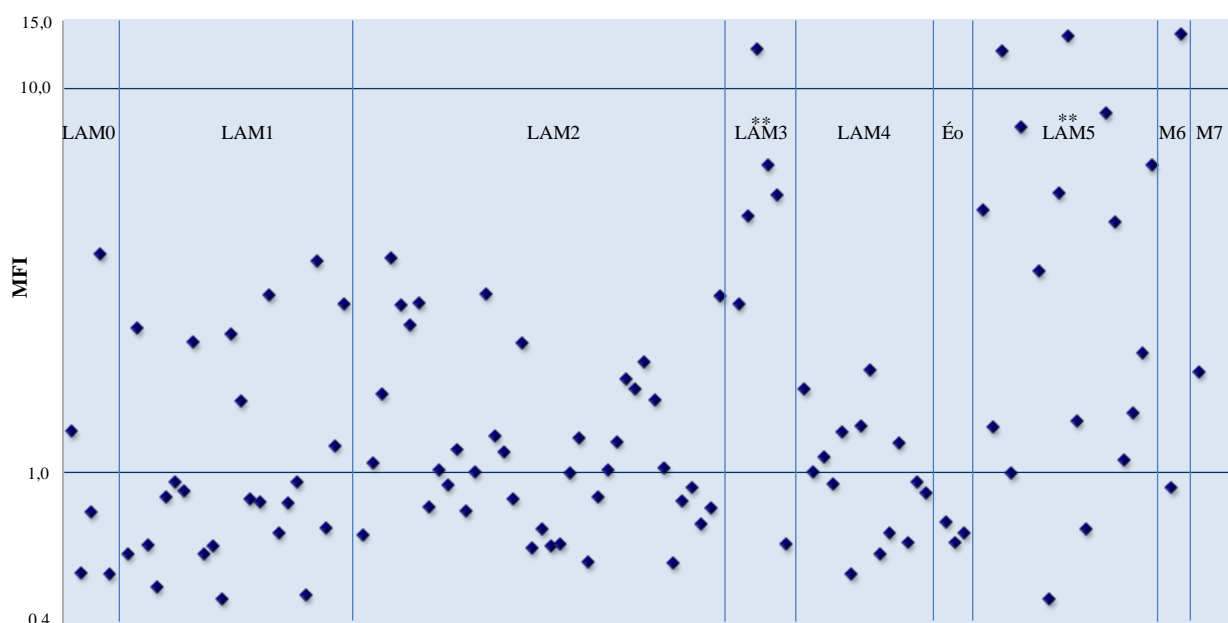


Figure 34 : Représentation des moyennes de fluorescence (MFI) des blastes pour B7-H3 des 111 patients en fonction de la classification FAB

Les LAM 0, 1, 2, 4 et 4Éo ne présentent pas de différence statistiquement significative. Les LAM4Éo ont toutes une MFI très basse ($<0,8$). La MFI des LAM3 et 5 est significativement plus haute que celle des LAM2 (** : $p < 0,01$).

Nous avons comparé la MFI des blastes des LAM2 ($m = 1,32$; $\sigma = 0,772$) avec chaque autre sous-type. Nous l'avons choisi car c'est le sous-type le plus fréquent. Les MFI des blastes des LAM2 ne présentent pas de différence statistiquement significative avec les MFI des blastes des LAM0 ($m = 1,36$; $\sigma = 1,33$; $p = 0,395$; $1-\beta = 5\%$), des LAM1 ($m = 1,25$; $\sigma = 0,772$; $p = 0,205$; $1-\beta = 6\%$), des LAM4 ($m = 1,03$; $\sigma = 0,383$; $p = 0,48$; $1-\beta = 33\%$), ni des LAM4 à éosinophiles ($m = 0,691$; $\sigma = 0,024$; $p = 0,057$; $1-\beta = 49\%$). Notons toutefois que les LAM4 à éosinophiles ont une moyenne nettement plus basse que les autres et qu'aucun des 3 patients de ce sous-type ne présente de positivité pour B7-H3. À l'inverse, les LAM3 ($m = 5,34$; $\sigma = 4,08$) et les LAM5 ($m = 4,47$; $\sigma = 4,1$) présentent des MFI des blastes significativement plus élevées que celle des LAM2 ($p = 0,0087$ et $0,0016$, respectivement).

Les LAM6 et LAM7 ne comprennent pas suffisamment de patients pour effectuer de test statistique. (Figure 34)

On ne note pas non plus de différences significatives de répartition des patients positifs ($>1,2$) dans les LAM0 ($p = 1$), les LAM1 ($p = 0,30$) ni les LAM4 ($p = 0,74$) par rapport aux LAM2. Il y a statistiquement plus de patients positifs ($>1,2$) pour B7-H3 parmi les LAM 5 que parmi les LAM2 ($p = 0,0083$). Les LAM 3, 4Éo, 6 et 7, n'ont pas été testées avec des tests de répartition faute d'effectifs suffisants.

Le seuil à 2 ne permet ne montre pas non plus de différence de répartition des entre les LAM0 et les LAM2 ($p = 0,50$). Et montre aussi un excès de patients positifs parmi les LAM5, par rapport aux LAM2 ($p = 0,0022$). Avec ce seuil, les effectifs sont trop faibles parmi les LAM0, 3, 4, 4Éo, 6 et 7 pour effectuer un test de répartition.

Leucocytose au diagnostic

La leucocytose au diagnostic s'étend de 0,81 G/L à 325 G/L pour une moyenne de 66 G/L et un écart-type de 88 G/L et n'est pas corrélée à la MFI des blastes pour B7-H3 ($r = 0,19$; $p = 0,0051$) chez les 107 patients pour lesquels nous connaissons la numération au diagnostic. (Figure 35)

La MFI des blastes des 48 patients hyperleucocytaires ($m = 2,31$; $\sigma = 2,91$) au diagnostic et celle des 59 patients normo ou hypo-leucocytaires ($m = 1,88$; $\sigma = 2,45$) ne présentent pas de différence statistiquement significative ($p = 0,63$; $1-\beta = 13\%$). On ne note pas non plus de différence de répartition des patients hyperleucocytaires parmi les patients positifs avec un seuil ni à 1,2 ($p = 0,35$) ni à 2 ($p = 0,38$).

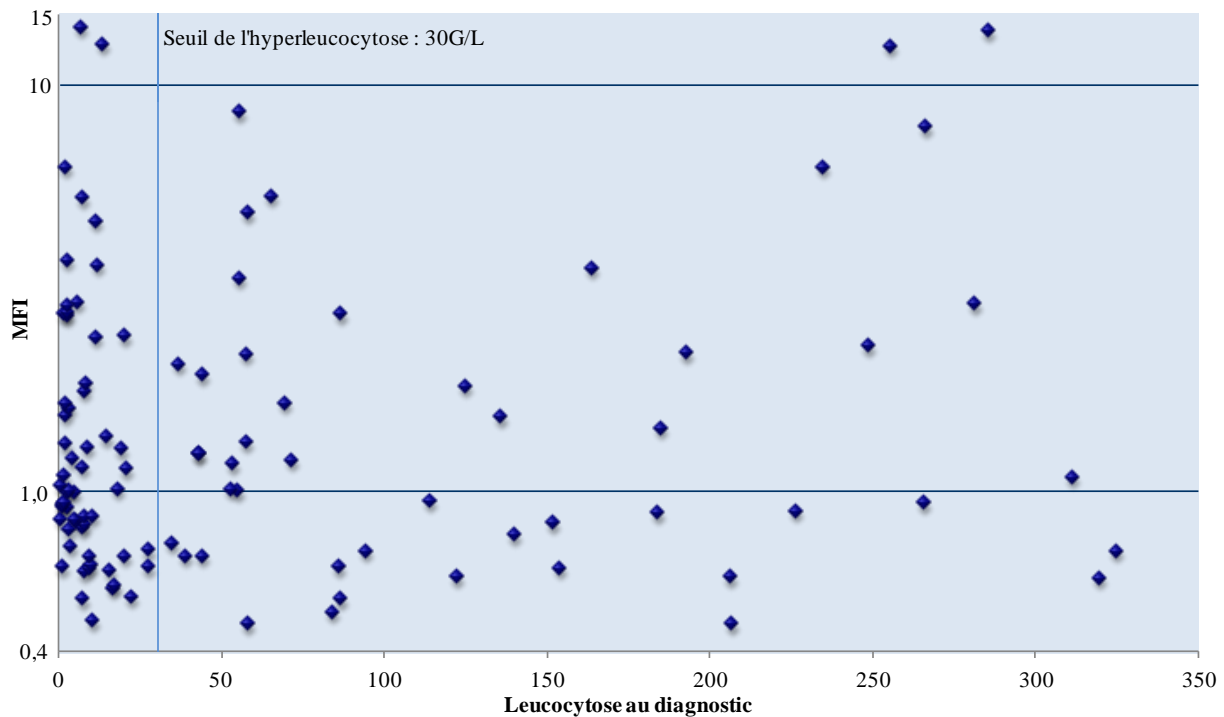


Figure 35 : Représentation des moyennes de fluorescence (MFI) des blastes pour B7-H3 de 107 patients en fonction de la leucocytose au diagnostic

On peut voir qu'il n'y a pas de corrélation entre la valeur de la leucocytose au diagnostic et la MFI des blastes pour B7-H3

Caractère primitif ou secondaire de la leucémie

La MFI des blastes des 94 leucémies *de novo* ($m = 2,13$; $\sigma = 2,81$) et celle des 15 leucémies secondaires ($m = 1,87$; $\sigma = 1,31$) ne présentent pas de différence statistiquement significative ($p = 0,45$; $1-\beta = 7\%$). (Deux leucémies étaient en fait des rechutes dont le primo-

Tableau XV : Tableau de contingence montrant la positivité de B7-H3 avec un seuil à 1,2 en fonction du caractère primitif ou secondaire de la leucémie

	B7-H3 -	B7-H3+	Total
<i>de novo</i>	56	38	94
Secondaire	6	9	15
Total	62	47	109

diagnostic avait été traité hors de notre hôpital.)

On ne note pas non plus de différences

significatives de répartition des patients positifs

parmi les leucémies secondaires ou *de novo* ($p =$

0,16 pour un seuil à 1,2 et 0,59 pour un seuil à 2). (Tableau XV)

Caryotype

La MFI des blastes des 14 leucémies ayant un caryotype de bon pronostic ($m = 1,36$; $\sigma = 1,30$) et celle des 58 leucémies ayant un caryotype de pronostic intermédiaire ($m = 2,11$; $\sigma = 2,74$) ne présentent pas de différence statistiquement significative ($p = 0,27$; $1-\beta = 22\%$). (Figure 36) De même les MFI des blastes des 20 leucémies ayant un caryotype de mauvais pronostic ($m = 2,04$; $\sigma = 1,76$) et des leucémies ayant un caryotype de pronostic intermédiaire ne présentent pas de différence statistiquement significative ($p = 0,099$; $1-\beta = 5\%$). En revanche, les leucémies avec un caryotype de mauvais pronostic ont une MFI statistiquement plus élevée que les leucémies au caryotype de bon pronostic ($p = 0,037$).

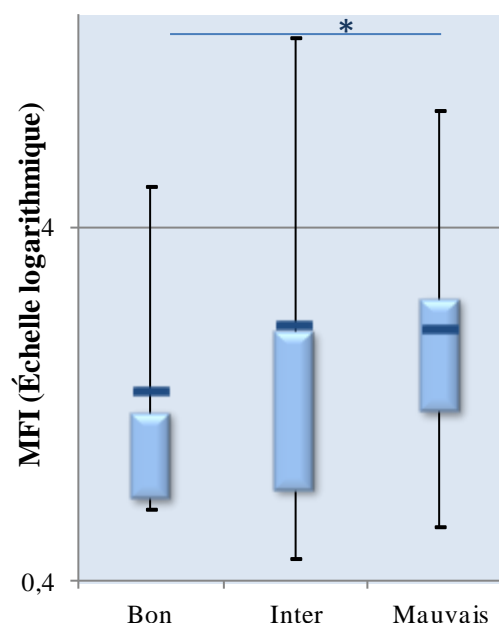


Figure 36 : Boîtes à moustaches représentant la répartition des MFI pour B7-H3 en fonction des classes pronostiques cytogénétiques

Les boîtes représentent les premiers et troisièmes quartiles, les moustaches, les valeurs maximales et minimales et le trait, la moyenne.

L'expression de B7-H3 est significativement plus élevée parmi les caryotypes de mauvais pronostic par rapport aux bons (* : $p < 0,05$)

$n = 14, 58$ et 20

Avec un seuil à 1,2, on ne note pas non plus de différences significatives de répartition des patients positifs parmi les patients présentant un caryotype de pronostic favorable ou intermédiaire ($p = 0,76$). Mais on note qu'il y a statistiquement plus de patients positifs (75%) dans le groupe des caryotypes défavorables que dans les groupes des caryotypes favorables (29% ; $p = 0,013$) et intermédiaires (38% ; $p = 0,0042$). Avec un seuil à 2, on ne note aucune différence significative de répartition ($p = 1, 0,47$ et $0,43$ respectivement).

Les patients présentant des remaniements chromosomiques impliquant les Core Binding Factors (translocations (8 ;21) et (16 ;16) et inversion du 16) présentent une tendance à avoir des MFI plus basses ($m = 0,95$; $\sigma = 0,51$) que les autres patients ($m = 2,19$; $\sigma = 2,74$), non statistiquement significative ($p = 0,054$; $1-\beta = 100\%$).

Biologie moléculaire

La MFI pour B7-H3 des blastes portant la duplication en tandem du gène FLT3 ($m = 1,73$; $\sigma = 1,31$) et celle des blastes ne portant pas la duplication en tandem ($m = 1,97$; $\sigma = 2,71$) ne présentent pas de différence significative ($p = 0,61$; $1-\beta = 7\%$). On ne note pas non plus de différence de répartition de la duplication parmi les patients positifs ou négatifs pour B7-H3 ($p = 0,51$ pour un seuil à 1,2 et 0,13 pour un seuil à 2).

De la même manière, parmi les 58 patients qui présentent un caryotype de pronostic intermédiaire sans FLT3-ITD et ayant bénéficié d'une recherche de mutation du gène NPM1, la MFI pour B7-H3 des blastes portant la mutation ($m = 2,24$; $\sigma = 2,02$) et celle des blastes de phénotype sauvage ($m = 2,04$; $\sigma = 3,08$) ne présentent pas de différence significative ($p = 0,08$; $1-\beta = 6\%$). On ne note pas non plus de différence significative de répartition de la mutation parmi les patients positifs ou négatifs pour B7-H3 ($p = 0,42$ pour un seuil à 1,2 et 0,07 pour un seuil à 2).

En revanche, parmi les 42 patients qui présentent un caryotype de pronostic intermédiaire sans FLT3-ITD et ayant bénéficié d'une recherche de mutation du gène C/EBP α , la MFI pour B7-H3 des blastes portant la mutation du gène C/EBP α ($m = 0,97$; $\sigma = 0,79$) est significativement plus faible ($p = 0,04$) que et celle des blastes de phénotype sauvage ($m = 2,49$; $\sigma = 3,34$). Les tests de répartition ne sont pas réalisables car il n'y a qu'un patient présentant une mutation de C/EBP α qui ait une MFI positive pour B7-H3 (2,74). Notons que les 9 autres patients de notre étude présentant une mutation de C/EBP α ont une MFI des

blastest pour B7-H3 particulièrement basse ($<0,9$) alors que le seul patient positif est classé par selon l’OMS parmi les leucémies associées aux SMD. (Figure 37)

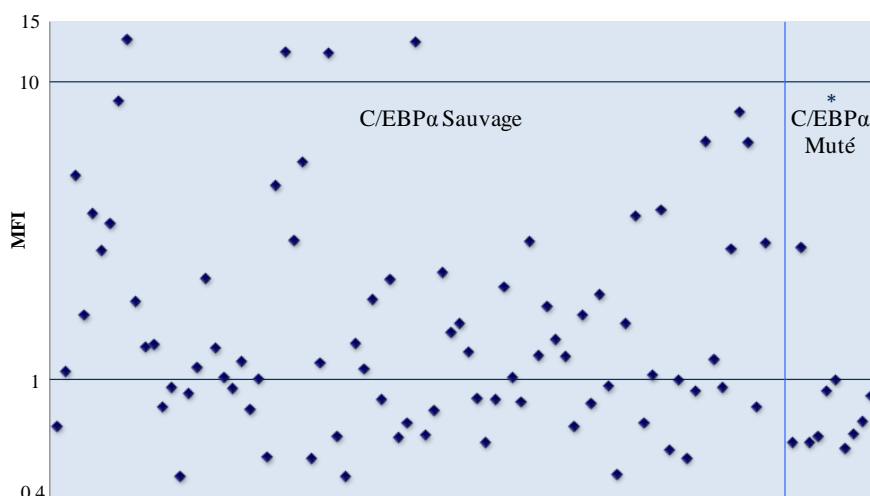


Figure 37 : Représentation des moyennes de fluorescence (MFI) des blastes pour B7-H3 des 92 patients ayant bénéficié d’une recherche de C/EBPα en fonction du statut de C/EBPα

On peut voir que 9 des 10 patients présentant une mutation de C/EBPα ont une expression de B7-H3 très basse ($MFI < 1$). Le 10^{ème} patient est atteint d’une leucémie associée aux SMD. ($p < 0,05$)

Obtention d’une rémission complète après l’induction

Sur la cohorte homogène de 54 patients adultes présentant une LAM (hors LAM3) traités par chimiothérapie intensive, seuls 7 patients n’ont pas présenté de rémission complète. La MFI des blastes des 7 patients n’ayant pas obtenu de rémission complète ($m = 1,56$; $\sigma = 0,86$) et celle des 47 patients ayant obtenu une rémission complète ($m = 1,44$; $\sigma = 1,50$) ne présentent pas de différence statistiquement significative ($p = 0,09$; $1-\beta = 6\%$). Le test exact de Fisher ne montre pas non plus de différence significative de répartition ($p = 0,41$ pour un seuil à 1,2 et 0,62 pour un seuil à 2). En effet, le taux de rémission complète est de 81-89% quels que soient les taux de B7-H3. (Tableau XVI)

Tableau XVI : Tableau de contingence montrant la positivité de B7-H3 avec un seuil à 1,2 en fonction de l’obtention d’une rémission complète

	B7-H3 -	B7-H3+	Total
Progression	3	4	7
Rémission complète	13	34	47
Total	16	38	54

Impact pronostique de la présence de B7-H3

Survie globale en cas de traitement intensif

La petite taille de notre cohorte homogène (54 patients adultes présentant une LAM - hors LAM3- traitée par chimiothérapie intensive) ne permet pas de réaliser des tests de survie sans événement qui créent de multiples sous-catégories et nécessitent de censurer les patients à la greffe. Nous avons donc réalisé des tests de survie globale. (Figure 38) Il n'y a pas de différence significative de survie chez les patients présentant des blastes positifs pour B7-H3 par rapport à ceux qui n'en présentent pas ($p = 0,73$).

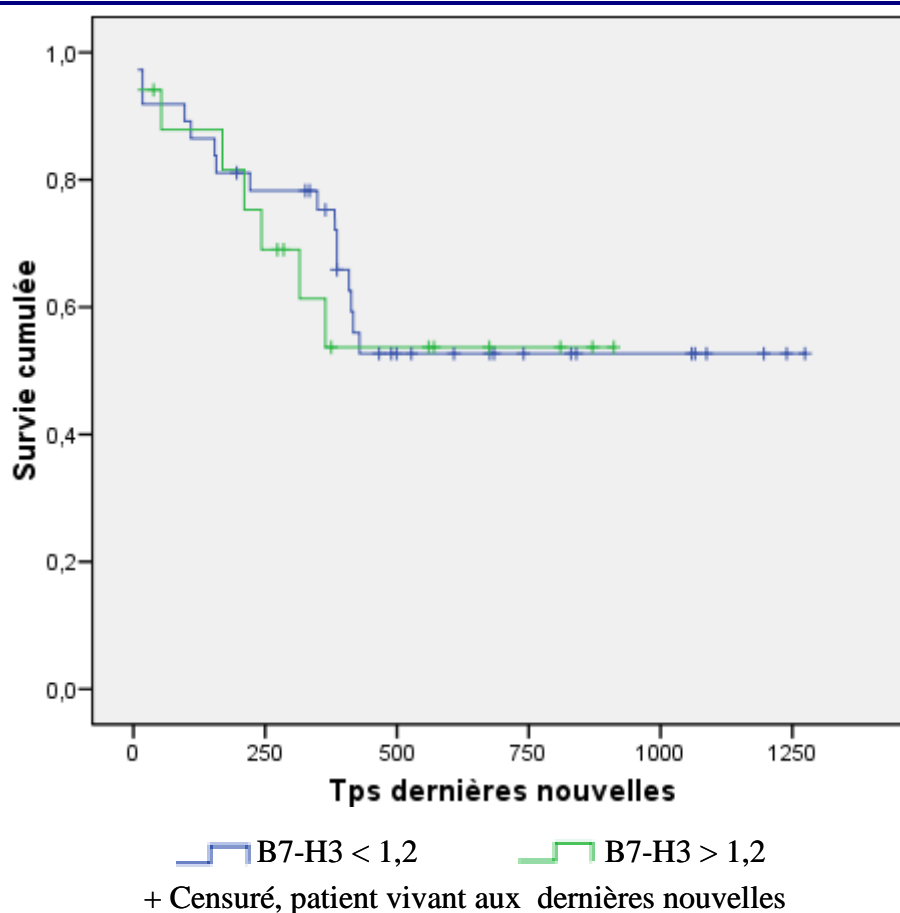


Figure 38 : Courbes de survie de l'ensemble des 54 patients en fonction de l'expression de l'expression de B7-H3 (seuil 1,2)

On peut voir qu'il n'y a aucune différence entre les deux groupes de patients présentant une LAM (hors LAM3) traitée par chimiothérapie intensive. ($p = 0,739$)
Temps en jours $n = 37$ et 17

Avec le seuil de MFI à 2, on n'obtient pas non plus de différence significative parmi l'ensemble de la population ($p = 0,559$). (Figure 39)

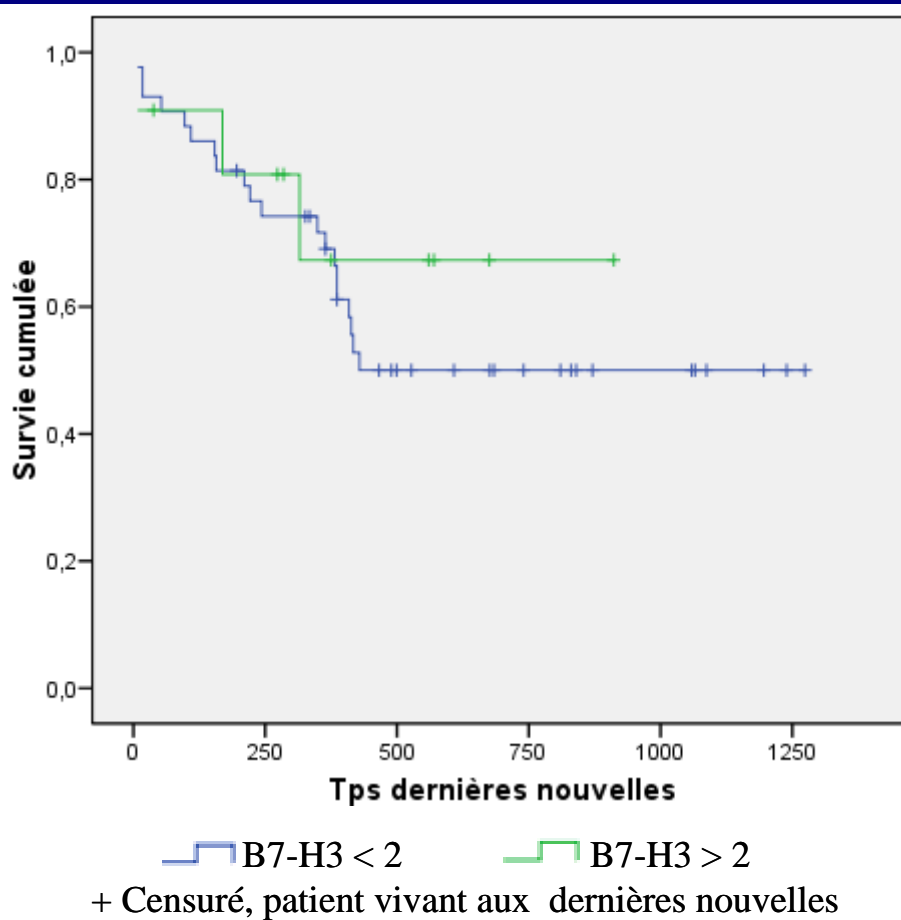


Figure 39 : Courbes de survie de l'ensemble des 54 patients en fonction de l'expression de l'expression de B7-H3 (seuil 2)

On peut voir qu'il n'y a pas de différence significative entre les 2 groupes. ($p = 0,559$)
Temps en jours. $n = 43$ et 11

Pour constater un impact pronostique de B7-H3 nous avons également étudié des groupes pronostiques par ailleurs homogènes. Dans le groupe des patients dont les blastes présentent un caryotype de pronostic intermédiaire, le seuil à 1,2 ne donne aucune différence ($p = 0,842$). En revanche, le seuil à 2 semble montrer une tendance non significative ($p = 0,264$) à l'évolution favorable des patients porteurs de B7-H3. (Figure 40)

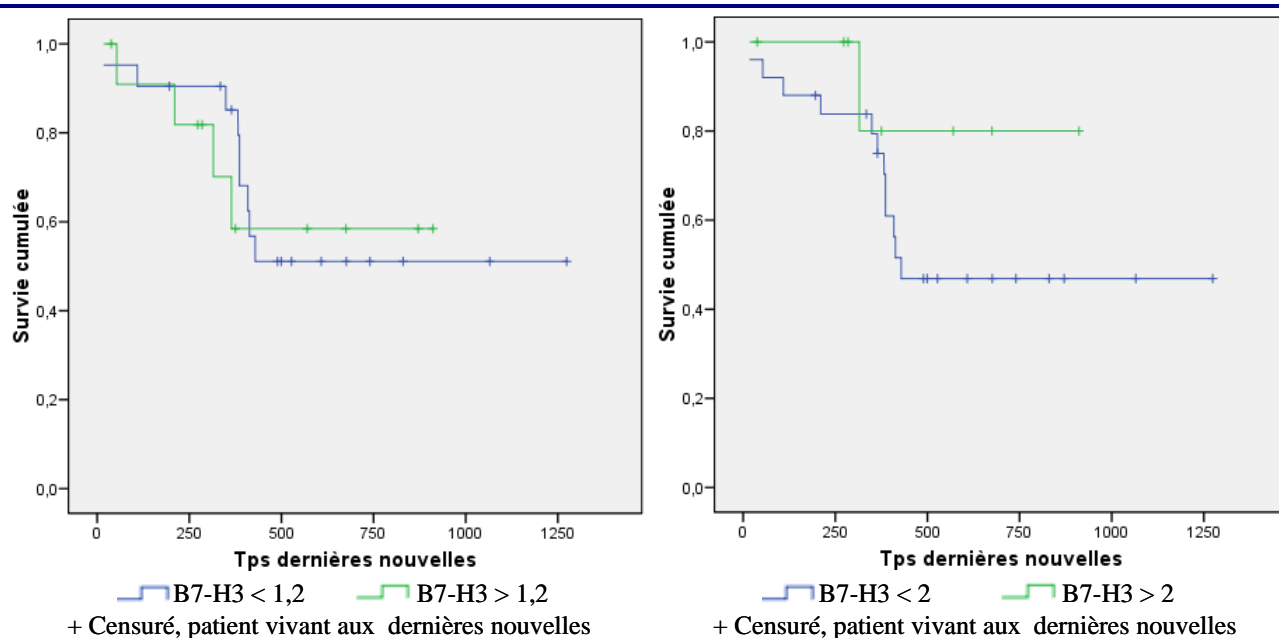


Figure 40 : Courbes de survie des 33 patients de caryotype intermédiaire en fonction de l'expression de B7-H3
 Un seuil à 1,2 ne montre pas de différence de survie ($p = 0,842$). Le seuil à 2 montre une tendance non significative au bon pronostic ($p = 0,264$). Temps en jours.

Enfin, nous avons reclassé les patients en fonction des facteurs pronostiques apportés par la biologie moléculaire. Nous pouvons constater qu'aucun des patients classés comme étant de bon pronostic avec la présence de B7-H3 (4 patients avec un seuil à 1,2 et 3 patients avec un seuil à 2) n'est décédé. Le faible effectif ne permet pas de mettre à jour un résultat statistiquement significatif ($p = 0,4$ quel que soit le seuil). (Figure 41)

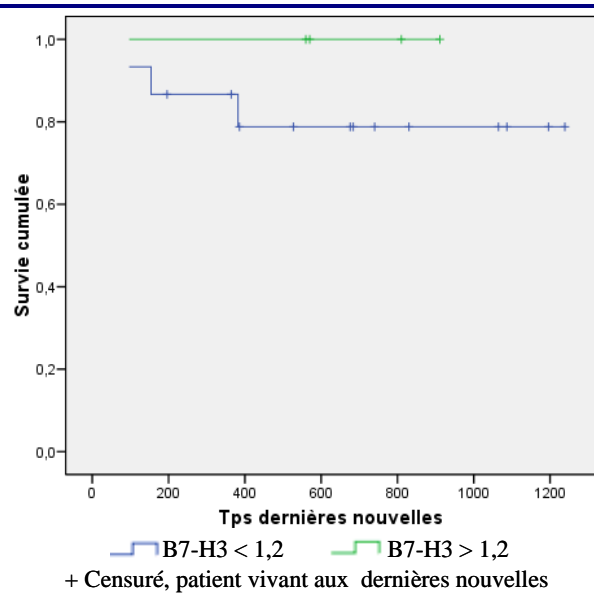


Figure 41 : Courbes de survie des patients de bon pronostic sur des critères moléculaires (seuil 1,2) Aucun des 4 patients portant B7-H3 n'est décédé. Temps en jours.

Les patients classés en pronostic intermédiaire sur ces critères moléculaires ne présentent pas de différence significative pour un seuil à 1,2 ($p = 0,993$). En revanche, le seuil à 2 semble montrer une tendance non significative à l'évolution favorable des patients porteurs de B7-H3 ($p = 0,356$). (Figure 42)

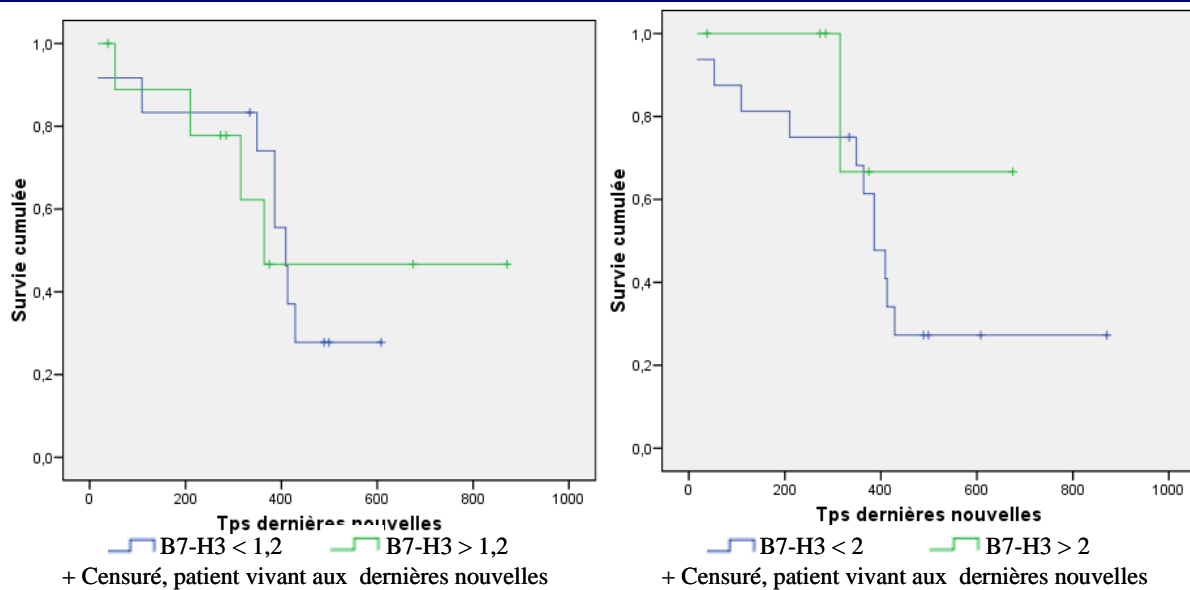


Figure 42 : Courbes de survie des 22 patients de pronostic intermédiaire sur des critères moléculaires en fonction de l'expression de B7-H3

Un seuil à 1,2 ne montre pas de différence de survie ($p = 0,993$). Le seuil à 2 montre une tendance non significative au bon pronostic ($p = 0,356$). Temps en jours.

Risque de rechute

Sur notre cohorte homogène, 47 patients ont obtenu une rémission complète. Nous avons voulu savoir si la présence de B7-H3 était un facteur de risque de rechute. Les 21 patients ayant rechuté ($m = 1,07$; $\sigma = 0,705$) ne présentent pas une expression de B7-H3 significativement différente ($p = 0,68$; $1-\beta = 38\%$) de celle des 26 patients n'ayant pas rechuté ($m = 1,75$; $\sigma = 1,87$). Le taux de rechute parmi les patients négatifs pour B7-H3 est de 50%. Le taux de rechute parmi les patients positifs pour B7-H3 est de 31% avec un seuil à 1,2 et de 22% pour un seuil à 2. Mais cette différence de répartition n'est pas significative ni pour un seuil à 1,2 ($p = 0,33$) ni pour un seuil à 2 ($p = 0,16$). (Tableau XVII)

Tableau XVII : Tableau de contingence des montrant la positivité de B7-H3 avec un seuil à 1,2 en fonction de la survenue de rechute

	B7-H3 -	B7-H3+	Total
Rechute	17	4	21
Absence de rechute	17	9	26
Total	34	13	47

Parmi les 21 patients ayant rechuté, nous avons voulu savoir si l'expression de B7-H3 est un facteur de risque de rechute précoce. La durée de rémission complète n'est pas statistiquement corrélée à la MFI des blastes ($r = -0,23$; $p = 0,31$).

Réponse au traitement par agent déméthylant

Parmi nos patients, 15 ont bénéficié d'un traitement par agent déméthylant en première intention. On peut séparer les patients en un groupe de 6 patients bons répondeurs (blastés < 20% dans la moelle au sixième mois) et un groupe de 9 patients mauvais répondeur (5 patients avec plus de 20% de blastes et 4 patients décédés au sixième mois). La MFI des blastes des patients bons répondeurs ($m = 1,66$; $\sigma = 0,77$) et celle des patients mauvais répondeurs ($m = 1,36$; $\sigma = 0,89$) ne présentent pas de différence statistiquement significative

Tableau XVIII : Tableau de contingence de patients traités par agent déméthylant (seuil : 1,2)

Montrant les bons et mauvais répondeurs en fonction de la positivité en B7-H3. $p = 0,61$

	B7-H3 -	B7-H3+	Total
Bons répondeurs	2	4	6
Mauvais répondeurs	5	4	9
Total	7	8	15

(Tableau XVIII)

($p = 0,52$; $1-\beta = 10\%$). On ne note pas non plus de différence de répartition de la mutation parmi les patients positifs ou négatifs pour B7-H3 ($p = 0,61$ pour un seuil à 1,2 et 1 pour un seuil à 2).

Courbes ROC

Pour terminer, nous avons déterminé quel seuil présente le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité en vue de prochaines études. Pour cela nous avons établi une courbe ROC (Receiving Operating Characteristics). Comme test diagnostique, nous avons choisi le mode d'expression en pourcentage de blastes plus positifs que les lymphocytes car c'est le mode d'expression qui présente les avantages d'être comparable entre laboratoires et d'être la manière de travailler en pratique courante. Comme critère clinique, nous avons utilisé l'absence de rechute car nous avons vu que la présence de B7-H3 semblait jouer principalement sur ce facteur. Comme population, nous avons utilisé les 32 patients adultes traités intensivement ayant présenté une rémission complète, et qui avaient un caryotype intermédiaire car nous avons montré que B7-H3 ne présentait un intérêt que chez ces patients-là. (Figure 43) L'aire sous la courbe est alors de 0,62 ($p = 0,88$). Le seuil le plus intéressant est de 19% avec une spécificité de 53%, et une sensibilité de 81%.

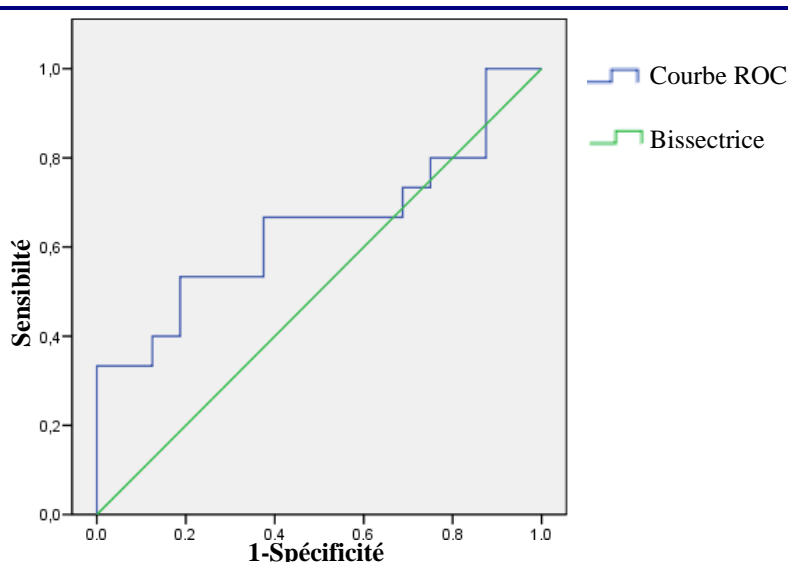


Figure 43 : Courbe ROC montrant la sensibilité et la spécificité du pourcentage de blastes plus positifs que les lymphocytes par rapport à la rechute
L'aire sous la courbe est de 0,62 ($p = 0,88$). Le seuil le plus intéressant est de 19% avec une sensibilité de 53% et une spécificité de 81%.

Intérêt de l'étude

La molécule B7-H3, molécule co-régulatrice de la synapse immunologique permettant la présentation antigénique, est largement étudiée dans le contexte des tumeurs solides.^[25] Ses actions complexes et partiellement élucidées au sein du système immunologique mais également au sein des voies de survie cellulaire rendent son impact pronostique difficile à modéliser. Le recours à la méthode expérimentale est donc indispensable pour le définir ; pourtant, une seule équipe a étudié la présence et l'impact pronostique de B7-H3 dans les leucémies aiguës : il s'agit d'un travail portant sur 134 leucémies aiguës toutes lignées confondues publié sous forme d'affiche au congrès de la European Hematology Association à Amsterdam en 2012.^[11] De plus, les données concernant B7-H3 sont fréquemment contradictoires, que ce soit concernant son profil d'expression, son action au sein du système immunitaire et son impact pronostique dans les tumeurs solides.^[25] Ceci nous a conduits à étudier l'expression de B7-H3 et son impact pronostique dans plus de 100 LAM.

Méthode

Choix de la technique

Nous avons choisi d'utiliser la cytométrie en flux car il s'agit d'une technique d'analyse quotidiennement utilisée dans l'arsenal diagnostique des hémopathies malignes, nous en avons donc une grande expertise. Comme cette technique permet de travailler avec une quantité limitée de matériel (3 millions de cellules pour l'ensemble des marquages), il est donc envisageable d'introduire ce nouveau marqueur dans les procédures diagnostiques de routine.

De plus, cette technique permet d'étudier spécifiquement les protéines exprimées à la surface cellulaire. Or le mécanisme d'action de B7-H3 nécessite que la protéine soit accessible à l'interaction cellulaire, la cytométrie est donc plus adaptée à cette étude que le western blot qui détecte l'ensemble des protéines cellulaires (y compris celles qui ne sont pas localisées à la membrane et ne contribuent donc pas à la synapse immunologique) et que la PCR qui recherche la présence d'ARNm sans savoir s'il sera traduit en protéine. Enfin, elle permet d'étudier l'expression de B7-H3 cellule par cellule et donc de pouvoir étudier les différentes populations cellulaires en même temps.

En revanche, contrairement au western blot, cette technique ne permet pas de vérifier le poids moléculaire de la protéine marquée. Nous ne pouvons donc pas connaître l'isoforme présente (B7-H3a ou b) ; nous ne pouvons pas non plus vérifier la spécificité de l'anticorps, nous ferons donc confiance au fournisseur tout en comparant nos résultats à ceux de la littérature.

Choix du réactif

Nous avons choisi d'utiliser la phycoérythrine car il s'agit du fluorochrome qui présente la fluorescence la plus intense, ce qui permet la détection de faibles expressions.^[37] Nous avons choisi l'anticorps anti-B7-H3, clone 185504 d'isotype IgG1 de la société R&D system car il s'agit du clone qui sépare le mieux les lymphocytes des monocytes circulants ce qui nous assurait de pouvoir discriminer les cellules positives des négatives tout au long de notre étude. Il était logique d'utiliser les lymphocytes comme témoin négatif puisque l'absence de B7-H3 à la surface des lymphocytes est assez consensuelle.^{[13][20]} La positivité de monocytes circulants est plus discutée : la positivité spontanée des monocytes est faible ou négative selon les études mais peut être fortement stimulée.^{[13][20][23][24]} Mais, dans notre étude, nous avons montré que la positivité des monocytes est faible au moment du prélèvement sur tube EDTA et augmente avec le temps. Ceci est cohérent avec la capacité reconnue des monocytes à être facilement activés *in vitro*.

Ce réactif n'est pas utilisé dans la littérature ; mais R&D system produit d'autres réactifs concernant B7-H3 qui sont utilisés dans la littérature, que ce soient des anticorps polyclonaux^{[34][38]} ou une protéine de fusion B7-H3/Fragment constant des immunoglobulines.^[22] Cette protéine de fusion est d'ailleurs la même qui a permis la génération de notre réactif. Ces données bibliographiques confortent le choix de ce clone et de ce fournisseur à la compétence reconnue.

Enfin, nous avons montré que la lignée cellulaire U937 est positive pour B7-H3. Ceci est cohérent avec la littérature qui retrouve une positivité de B7-H3 à la surface des cellules grâce à un anticorps qui reconnaît B7-H3a et b.^[18] Notons que la forme soluble de B7-H3 n'est pas retrouvée dans le milieu de culture de cette lignée grâce à un anticorps qui ne devrait reconnaître que la forme B7-H3a.^[22] La société R&D system nous a indiqué que notre réactif reconnaît les forme a et b de B7-H3.

Constitution du panel

L'utilisation de comarquages est nécessaire pour pouvoir identifier les différents types cellulaires et les différentes sous-populations de blastes. Nous avons donc constitué un panel permettant de séparer les blastes (population d'intérêt), des lymphocytes (témoin négatif), des monocytes (témoin positif) mais aussi des sous-populations de blastes très indifférenciés (potentielles « cellules souches leucémiques »). Notre étude montre que ce comarquage entraîne la diminution du signal, mais nous avons prouvé que cet affaiblissement du signal n'empêchait pas la détection de la présence de B7-H3 sur les blastes.

Nous avons montré également que la fixation des anticorps anti-B7-H3/PE et anti-CD14/AA750 à la surface de la même cellule provoque un signal artéfactuel. Nous avons choisi de conserver l'anticorps anti-CD14/AA750 car nous l'utilisons en routine diagnostique et le maîtrisons bien notamment par des critères de positivité robustes. De plus, il suffit d'ajouter un tube sans anticorps anti-CD14/AA750 dans le petit nombre de cas où les blastes portent du CD14 pour obtenir l'intensité réelle d'expression de B7-H3. Enfin, cela permettait de continuer à explorer cette interférence. Nous reviendrons plus loin sur les implications biologiques de ce phénomène.

Type d'étude

Nous avons choisi une étude rétrospective parce qu'elle peut être réalisée dans des délais compatibles avec la réalisation d'une thèse d'exercice malgré la faible incidence des leucémies, que nous avons ces échantillons en cellulothèque, que cela permettait d'utiliser l'ensemble des réactifs sans dépasser les dates de péremption et que l'étude de survie nécessite du recul. Nous n'avons pas pu étudier l'impact de la congélation sur l'expression de B7-H3. La congélation ne semble pas induire de biais puisque nous avons des patients négatifs, faiblement positifs et fortement positifs. De plus, cela ne devrait pas fausser les résultats de notre étude puisque tous nos échantillons ont subi le même mode de conservation. Si biais il y a, il est systématique et n'induit pas de conclusion erronée.

Représentativité de notre étude

Ensemble des patients

Dans l'ensemble de notre étude, parmi les 111 patients, les enfants sont surreprésentés (16% de nos patients) par rapport aux adultes. Ceci est expliqué par le fait que le Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille est le seul centre de traitement des leucémies aiguës pédiatriques du Nord-Pas-de-Calais alors que les leucémies de l'adulte sont traitées dans plusieurs centres hospitaliers de la région. Parmi les adultes, la moitié de nos patients avait moins de 60 ans au moment du diagnostic et la médiane d'âge de survenue dans la population générale est entre 60 et 65 ans.^[39] Dans notre étude, les répartitions des cas selon les classifications FAB et OMS sont globalement conformes aux données épidémiologiques.^[1] La fréquence anormalement élevée de l'hyperleucocytose dans notre étude (45% pour 4 à 13% attendus)^[8] est due à la méthode de recrutement : nous avons travaillé sur cellules congelées au diagnostic, il va de soi que plus un patient présente une masse tumorale importante, plus il est facile d'en conserver. Comme dans la littérature, les leucémies *de novo* représentent la grande majorité. Les groupes cytogénétiques et les anomalies moléculaires sont normalement représentés.^[1]

Cohorte homogène

Parmi les 54 patients adultes ayant bénéficié d'une chimiothérapie intensive à l'exclusion des leucémies aiguës promyélocyaires, il y a moins de patients âgés de plus de 60 ans et moins de caryotypes de mauvais pronostic que dans la cohorte générale car ces patients ont bénéficié d'un traitement par agent déméthylant plus fréquemment que les autres. La même anomalie concernant les patients hyperleucocytaires a été constatée. Les autres critères sont comparables à l'ensemble de nos patients et de la population générale (mise à part l'absence de LAM3).

Expression de B7-H3

Notre étude retrouve la même prévalence de B7-H3 dans les LAM (42% pour un seuil à 1,2) que celle de l'équipe de H. Qiu.^[11] En revanche, nous observons une expression significativement plus élevée ($p < 0,01$) dans les LAM3 (83%) et les LAM5 (76%), ils la trouvent inférieure dans les LAM3 (22%) et dans la moyenne pour les LAM5 (36%). Mais nous n'avons pas la référence précise du clone anti-B7-H3 utilisé par cette équipe ce qui rend difficile une comparaison directe de nos résultats. Puisque les monocytes sont notre témoin positif et que les granulocytes ont une expression faible de B7-H3, il est cohérent que les leucémies aiguës promyélocytaire et monocytaire soient plus fréquemment positives que les autres.

Nous nous accordons avec l'étude chinoise pour démontrer que l'expression de B7-H3 est plus élevée dans les caryotypes de mauvais pronostic que dans les caryotypes de bon pronostic ($p < 0,05$). Notons que les leucémies associées aux remaniements chromosomiques impliquant les gènes du complexe CBF (Core Binding Factors), qui représentent la majorité des caryotypes de bon pronostic, ont une expression plutôt basse de B7-H3 (à la limite de la significativité statistique : $p = 0,054$). De plus, les 9 patients présentant une mutation de C/EBP α sans que cela soit associé à un syndrome myélodysplasique présentent un taux de B7-H3 particulièrement bas ($p < 0,05$). La protéine C/EBP α est un facteur de transcription qui permet, en synergie avec les gènes du complexe CBF, la différenciation myéloïde.^[9] Nous voyons donc que les blastes présentant une mutation induisant un blocage de différenciation myéloïde ont une tendance à ne pas exprimer B7-H3 alors que les blastes différenciés (différenciation myéloïde : LAM3 ou monocytaire : LAM5) expriment plus fortement B7-H3. Ceci paraît cohérent avec la fonction de B7-H3 au sein du système immunitaire et particulièrement dans la fonction de présentation antigénique : la cellule hématopoïétique

semblerait n'exprimer B7-H3 qu'au cours de sa différenciation en cellule présentatrice d'antigène ou autre phagocyte concomitamment à l'acquisition des fonctions immunologiques. Notre hypothèse est confortée par l'expression faible de B7-H3 par les hémoblastes des moelles témoins.

Comme l'étude chinoise, nous ne trouvons pas de corrélation avec l'âge, le sexe ou la leucocytose au diagnostic. Nous n'avons pas trouvé non plus de corrélation avec FLT3-ITD ou la mutation de NPM1, deux anomalies impliquées dans la prolifération cellulaire.^[9] Il n'y a apparemment pas non plus de relation avec le caractère secondaire de la leucémie.

Impact pronostique de l'expression de B7-H3

Concernant l'impact pronostique de B7-H3, aucun de nos résultats n'est significatif. Cependant, bien que cohorte homogène soit petite, certaines tendances se dégagent : l'expression de B7-H3 ne modifie pas le taux de rémission complète (81% en l'absence de B7-H3 et 89% en sa présence, $p = 0,62$). Mais il y a plus de rechute en l'absence de B7-H3 (50%) qu'en présence de B7-H3 (31% ; $p = 0,33$) et le taux de rechute est encore plus faible pour un taux élevé de B7-H3 (22% pour un seuil de MFI à 2 ; $p = 0,16$).

Nous n'avons pas fait de courbe de survie sans événement à cause de notre faible effectif, mais les courbes de survie globale sur l'ensemble de notre cohorte homogène ne montrent pas d'effet de B7-H3 sur ce paramètre. En revanche l'étude de survie globale sur les groupes de caryotypes de pronostic bon ou intermédiaire, permet d'observer une tendance au bon pronostic chez les patients exprimant B7-H3 (86% de survie contre 54% ; $p = 0,264$).

. Ceci paraît contradictoire avec l'étude de H.Qiu qui trouvait que B7-H3 élevée était prédictif de progression et de survie plus courte. Pourtant, cela pourrait s'expliquer par le fait que B7-H3 est associée aux caryotypes de mauvais pronostic. L'effet bénéfique de l'expression de B7-H3 pourrait être écrasé par le pronostic sombre de ces caryotypes. Nous ne retrouvons pas cet effet dans notre étude car nous avons peu de caryotypes de mauvais pronostic dans notre cohorte homogène de patients traités intensivement. Si l'on écarte les caryotypes de mauvais pronostic, l'effet de bon pronostic de B7-H3 se révèle. Nous nous situons alors dans une démarche globale actuelle qui consiste à rechercher les facteurs qui rendent le groupe des caryotypes intermédiaires si hétérogène. La protéine B7-H3 pourrait faire partie des moyens permettant de séparer les patients en sous-classes pronostiques plus homogènes.

Mécanismes d'action de B7-H3

Dans les cancers solides, la présence de B7-H3 influence le pronostic de la tumeur qui la porte par son impact sur trois phénomènes différents : premièrement la survie et la multiplication cellulaire qui sont étroitement liées à la résistance aux traitements, deuxièmement la régulation du système immunitaire qui le rend plus ou moins apte à lutter contre la tumeur et troisièmement la capacité métastatique de la tumeur.^{[38][40]} Ce dernier point n'étant évidemment pas pertinent puisque les leucémies aiguës sont, par nature, des cancers d'emblée disséminés, nous n'étudierons donc que les deux premiers points.

Survie cellulaire

L'effet de B7-H3 sur la survie cellulaire et la résistance au traitement subséquente n'a été traité que dans un petit nombre d'études. À notre connaissance, elles démontrent toutes que B7-H3 favorise la survie cellulaire et la résistance au traitement en diminuant la mort cellulaire induite par le traitement.^{[34][35]} Dans notre travail, la présence de B7-H3 ne semble pas modifier la survie cellulaire ou la réponse au traitement des blastes leucémiques. En effet, nous avons montré premièrement que B7-H3 n'est pas de mauvais pronostic et deuxièmement qu'il ne modifie pas le taux de rémission complète après chimiothérapie intensive.

Ces discordances peuvent s'expliquer par deux points. D'une part, les blastes leucémiques ont une physiopathologie différente des cellules de tumeurs solides. D'autre part, le paclitaxel et la gemcitabine qui ont servi pour ces études ne sont pas utilisés dans le traitement des leucémies.

Modulation immunologique

Les effets de B7-H3 sur le système immunitaire sont beaucoup plus étudiés et beaucoup plus contradictoires. Elle a été décrite comme inhibant les fonctions cytotoxiques des lymphocytes NK,^[18] favorisant l'évasion tumorale par co-inhibition des lymphocytes T lors de la présentation antigénique^{[17][27]} et provoquant une diminution de la réponse inflammatoire globale^[31] ou sélectivement TH1^[33]. Mais elle a été aussi décrite comme activant la réponse inflammatoire globale^[13] ou sélectivement TH2^[28] et diminuant la taille tumorale en favorisant l'infiltration des tumeurs par des lymphocytes cytotoxiques T8 et NK.^[25] Dans notre cas, la diminution de l'immunité antitumorale liée à l'expression de B7-H3 semble hors de propos puisque la présence de B7-H3 à la surface des blastes myéloïdes semble plutôt de bon pronostic, au moins dans certains sous-groupes.

En revanche, l'hypothèse d'une action antitumorale de B7-H3 médiée par le système immunitaire est plausible puisque ce type d'effet est particulièrement efficace sur les petites masses tumorales. De plus, il est aussi, en théorie, dépendant de la concentration c'est-à-dire qu'il est d'autant plus marqué que l'expression est forte. Ceci correspond tout à fait à notre étude puisque l'effet constaté sur la survie est majoritairement dû à un taux de rechute plus bas en cas d'expression de B7-H3 (situation où la masse tumorale est très faible et potentiellement éliminée par le système immunitaire) et encore plus bas en cas de B7-H3 élevé. L'amélioration apparente de la réponse aux agents déméthylants pourrait aussi être expliquée par des phénomènes immunologiques puisque ces médicaments, bien que leur mode d'action soit incomplètement élucidé, ont une cytotoxicité directe assez faible.

Dans l'hypothèse d'un effet dépendant du niveau d'expression, il serait intéressant d'étudier la population qui se démarque par une expression anormalement élevée de B7-H3 (MFI > 12) mais nous n'avons pas pu le faire car il s'agit d'une population très rare : 4 cas au sein de notre étude.

Les implications de cette probable modulation immunologique sont nombreuses, puisque l'effet immunologique anti-tumoral est le principal mode d'action de la greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques (réaction du greffon contre la leucémie : GVL). Nous pouvons alors supposer que l'expression de B7-H3 par la maladie pourrait être prédictive de bonne réponse à la greffe. Notre cohorte est trop faible et les indications de greffe trop variées pour avoir pu tester cette hypothèse. Dans un domaine plus éloigné de notre travail, la capacité de B7-H3 à révéler la tumeur au système immunitaire, et ainsi à le stimuler spécifiquement contre cette tumeur, pourrait être utile dans la recherche sur l'immunité antitumorale.

Mais certains points restent à éclaircir, notamment : Comment l'expression de la même protéine B7-H3 à la surface de différentes tumeurs peut-elle avoir des effets si contrastés ? Comment peut-elle être, à la fois, fortement exprimée par les blastes au caryotype de mauvais pronostic et de bon pronostic lorsqu'elle est fortement exprimée dans les caryotypes de mauvais pronostic ? Nous avons vu que B7-H3 est une protéine dont le niveau d'expression est très variable. De plus, elle a probablement, à l'instar de nombreuses molécules de la famille B7, plusieurs récepteurs avec des fonctions différentes, voire opposées. Nous pouvons donc imaginer que B7-H3 présente des effets paradoxaux avec l'activation de différents récepteurs antagonistes selon son niveau d'expression.

Pour aller plus loin, il faut également se souvenir que B7-H3 est une molécule co-régulatrice au sein d'une synapse immunologique complexe. Peut-être obtiendrions-nous des résultats plus probants si nous n'étudiions pas seulement B7-H3 mais un ensemble de molécules co-régulatrices pour établir une sorte de « profil immunitaire » de la tumeur. Dans cette optique, les leucémies sont des cancers particuliers puisque la cellule d'origine de la tumeur est une cellule effectrice immature du système immunitaire et est donc potentiellement couverte de molécules co-régulatrices.

Les molécules d'intérêt pour l'établissement de ce « profil immunitaire » sont nombreuses, à commencer par les autres membres de la famille B7 : B7-1 et 2, B7-H1, 2, 4 et 6 et B7-DC (B7-dendritic cell molecule). Pour ouvrir ce panel en gardant une cohérence, nous pouvons proposer d'autres protéines participant à la synapse immunologique : CD40, ICOS-L (inducible T-cell co-stimulator ligand), CD80, CD86 ou ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1).^[15] Notre étude a aussi soulevé le cas de la protéine CD14.

Implications de l'interaction entre les réactifs anti-B7-H3/PE et anti-CD14/AA750

Nous pensons que le phénomène décrit n'est pas purement biologique, en effet les anticorps anti-B7-H3 ou anti-CD14 (qu'il soit couplé à l'AA750 ou au FITC) utilisés isolément ne provoquent pas de surexpression de B7-H3 ou de CD34. L'association des réactifs anti-CD14/FITC et anti-B7-H3/PE ne modifie pas non plus les expressions de B7-H3 ni de CD34.

L'interférence entre les réactifs anti-B7-H3/PE et anti-CD14/AA750 doit donc être le résultat d'interactions complexes entre les fluorochromes (excitation d'un fluorochrome par la lumière émise par le second fluorochrome, transfert d'énergie par résonance de type Förster, désexcitation non radiative...). Aucune hypothèse n'explique totalement le phénomène, toutefois l'ensemble de ces hypothèses nécessite une grande proximité entre les deux fluorochromes aptes à subir ces phénomènes qui traduisent donc la proximité entre B7-H3 et CD14 au sein de la membrane. Ainsi, l'interférence ne se produit pas lorsque l'AA750 est couplé à un anti-CD45 : les deux fluorochromes ne réagissent pas entre eux alors qu'ils sont tous les deux présents à la membrane mais probablement sans proximité suffisante.

Nous pouvons donc raisonnablement supposer que les molécules B7-H3 et CD14 sont très intimement colocalisées à la membrane. Ceci est très intéressant car les interactions protéiques entre B7-H3 et CD14 n'ont jamais été décrites, à notre connaissance. Une autre question est de savoir si ces deux molécules sont liées à la surface de la cellule native (des expériences de co-immunoprécipitation, qui n'entraient pas dans le cadre de ce travail, permettraient de le définir) ou si la fixation d'un des deux anticorps entraîne une activation ou un changement de conformation de la protéine qui produirait alors un remaniement de la répartition des protéines qui pourraient alors se regrouper sous forme de supercomplexe. Pour le savoir, il faudrait fixer les cellules avec du para-formaldéhyde pour empêcher ces

remaniements puis refaire un comarquage anti-B7-H3/PE et anti-CD14/AA750 pour voir si l'on constate toujours la même interférence. Ce type de manipulation étant difficile à réaliser sur des cellules primaires de patient, nous avons choisi de ne pas les effectuer.

Ces interactions, même indirectes, laisse présager la participation de ces deux protéines à une fonction cellulaire commune. Ceci est cohérent avec le fait que B7-H3 est surexprimée par les monocytes en présence de LPS et que le CD14 est un récepteur connu du LPS. Pourtant, leurs interactions ne s'arrêtent peut-être pas là, le CD14 pourrait faire partie de la cascade régulatrice de B7-H3. Seule une modélisation de la co-expression de CD14 et de B7-H3 par transfection d'un vecteur codant ces protéines en lignée cellulaire permettrait de mieux étudier cette régulation. Ceci sortait du cadre de ce travail.

Au final, la co-expression de B7-H3 et de CD14 pourrait expliquer une partie des résultats contradictoires observés en termes d'association de facteurs pronostiques sur la survie. Encore une fois, nous n'avons pas pu tester cette hypothèse pour cause d'effectifs trop faibles. Il est intéressant de noter que cette interférence d'abord décrite sur les monocytes est également présente (à divers degrés) sur les blastes leucémiques qui présentent une co-expression de B7-H3 et CD14. Ainsi la fonction commune que nous leur supposons est possiblement préservée à la surface de ces blastes.

Conclusion

Notre étude a démontré que la mise en évidence de la protéine B7-H3 à la surface des blastes de leucémie aiguë myéloïde est réalisable en pratique diagnostique courante grâce à la cytométrie en flux multiparamétrique. L'anticorps anti-B7-H3/PE clone 185504 de la société R&D system est approprié à cet usage à la condition de se méfier de l'interférence avec l'anticorps anti-CD14/AA750 clone RMO de la société Beckman-Coulter. L'expression de B7-H3 est observée sur les monocytes alors qu'elle est toujours négative sur les lymphocytes. Une grande hétérogénéité est observée sur les blastes.

Notre étude a permis de cibler une population d'intérêt : les patients atteints d'une leucémie aiguë myéloïde à caryotype de pronostic intermédiaire. En effet, seuls ces patients pourraient tirer bénéfice d'une amélioration de la précision pronostique amenée par B7-H3. Puisque notre étude montre une tendance au bon pronostic de B7-H3 sans significativité statistique, nous pensons qu'il est nécessaire de conduire une vaste étude multicentrique sur l'impact pronostique de B7-H3 dans les LAM au caryotype intermédiaire. Pour cela, il est possible de congeler les blastes médullaires au diagnostic et de réaliser la recherche *a posteriori* lorsque le caryotype est connu. Nous conseillons d'utiliser le pourcentage de blastes plus positifs que les lymphocytes avec un seuil à 20%.

L'impact pronostique de B7-H3 dans les leucémies traitées par agent déméthylant reste à déterminer. Notre expérience sur le sujet est trop faible pour en tirer des conclusions, mais nous pensons qu'il pourrait être pertinent de l'étudier.

D'un point de vue fondamental, les connaissances sur l'expression de B7-H3 lors de l'hématopoïèse sont fragmentaires. Son rôle dans l'immunité antitumorale est mal défini. L'éventuelle cascade de signalisation cellulaire induite par B7-H3 en réponse à l'exposition

des cellules aux chimiothérapies est peu documentée voire pas du tout dans les leucémies aiguës myéloïdes.

Notre étude montre qu'il serait nécessaire, par une approche plus fondamentale, d'éclaircir ces données pour mieux comprendre le rôle de l'expression de B7-H3 et ses conséquences en tant que facteur pronostique. Mais la question principale est de savoir s'il est judicieux de tester de manière isolée l'expression d'une molécule de signalisation immunologique ou s'il serait préférable de tester un profil immunologique d'expression d'un ensemble cohérent de molécules. Resterait alors à concevoir cet ensemble de molécules, nous proposons d'y inclure les autres membres de la famille B7, les autres protéines de la synapse immunologique mais également CD14 en raison de sa proximité physique avec B7-H3 sur la membrane cellulaire.

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma de l'hématopoïèse montrant la différenciation des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) en éléments figurés du sang tout en assurant leur autorenouvellement sous l'influence de facteurs de croissance	2
Figure 2 : Myéloblaste	4
Figure 3 : Promyélocyte	5
Figure 4 : Monoblaste	5
Figure 5 : Mégacaryoblaste	6
Figure 6 : Série monocyttaire	6
Figure 7 : Schéma de la transcription et de la traduction du gène B7-H3 montrant l'épissage alternatif conduisant aux protéines B7-H3a et B7-H3b	15
Figure 8 : Matrice de compensation utilisée pour notre étude	31
Figure 9 : Stratégie de fenêtrage utilisée dans notre étude	32
Figure 10 : Capacité des différents réactifs à discriminer les monocytes des lymphocytes	36
Figure 11 : Comparaison des marquages des différentes populations leucocytaires sanguines avec l'anticorps anti-B7-H3 clone 185504	37
Figure 12 : Comparaison du clone 185504 au contrôle isotypique et à l'autofluorescence	37
Figure 13 : Etablissement de la courbe de concentration saturante	38
Figure 14 : Test de stabilité de l'expression de B7-H3 après le prélèvement	39
Figure 15 : Tests de stabilité de l'expression de B7-H3 au cours de la technique	40
Figure 16 : Graphiques biparamétriques montrant la « flèche des monocytes » en B7-H3, CD34 et CD14	42
Figure 17 : Graphiques biparamétriques montrant la compensation efficace des signaux en PE et AA750	43
Figure 18 : Graphiques biparamétriques montrant la « flèche des monocytes » en B7-H3, CD34 et CD14	45
Figure 19 : Effet de l'âge sur l'expression de B7-H3	46
Figure 20 : Graphique représentant la MFI pour B7-H3 des monocytes circulants monomarqués avec 7,5µL de chaque témoin utilisé lors des mises au point	48
Figure 21 : Histogrammes représentant l'expression de B7-H3 par 2 lignées leucémiques par rapport au contrôle isotypique	49

Figure 22 : Camembert représentant la répartition des 111 patients selon la classification FAB	50
Figure 23 : Camemberts représentant la répartition des 111 patients selon la classification OMS avec détail des anomalies cytogénétiques récurrentes	50
Figure 24 : Boîtes à moustaches représentant la répartition des MFI des trois types cellulaires présents dans nos échantillons	52
Figure 25 : Graphiques montrant la MFI de chaque population cellulaire pour chaque patient	53
Figure 26 : Stratégie de détermination du pourcentage de blastes positifs	54
Figure 27 : Représentation des moyennes des MFI des blastes pour B7-H3 des 111 patients de notre étude montrant un seuil « naturel » à 2	56
Figure 28 : Représentation des moyennes de fluorescence (MFI) des blastes pour B7-H3 des 111 patients de notre étude en effectifs de classes d'une unité	57
Figure 29 : Boîtes à moustaches représentant la répartition des MFI des sous-populations de blastes	58
Figure 30 : Représentation des MFI des sous-populations de blastes en fonction de la MFI totale des blastes	59
Figure 31 : Blastes CD14+ et B7-H3- produisant une « flèche »	60
Figure 32 : Interférence minimale entre les réactifs anti-B7-H3/PE et anti-CD14/AA750	60
Figure 33 : Boîtes à moustaches représentant la répartition des MFI pour B7-H3 en fonction des classes d'âge	61
Figure 34 : Représentation des moyennes de fluorescence (MFI) des blastes pour B7-H3 des 111 patients en fonction de la classification FAB	62
Figure 35 : Représentation des moyennes de fluorescence (MFI) des blastes pour B7-H3 de 107 patients en fonction de la leucocytose au diagnostic	64
Figure 36 : Boîtes à moustaches représentant la répartition des MFI pour B7-H3 en fonction des classes pronostiques cytogénétiques	65
Figure 37 : Représentation des moyennes de fluorescence (MFI) des blastes pour B7-H3 des 92 patients ayant bénéficié d'une recherche de C/EBP α en fonction du statut de C/EBP α	67
Figure 38 : Courbes de survie de l'ensemble des 54 patients en fonction de l'expression de B7-H3 (seuil 1,2)	68
Figure 39 : Courbes de survie de l'ensemble des 54 patients en fonction de l'expression de B7-H3 (seuil 2)	69
Figure 40 : Courbes de survie des 33 patients de caryotype intermédiaire en fonction de l'expression de B7-H3	70
Figure 41 : Courbes de survie des patients de bon pronostic sur des critères moléculaires (seuil 1,2)	71

<u>Figure 42 : Courbes de survie des 22 patients de pronostic intermédiaire sur des critères moléculaires en fonction de l'expression de B7-H3</u>	<u>71</u>
<u>Figure 43 : Courbe ROC montrant la sensibilité et la spécificité du pourcentage de blastes plus positifs que les lymphocytes par rapport à la rechute</u>	<u>73</u>
<u>Tableau I : Classification FAB des leucémies aiguës myéloïdes</u>	<u>5</u>
<u>Tableau II : Classification OMS des leucémies aiguës myéloïdes</u>	<u>7</u>
<u>Tableau III : Principaux facteurs pronostiques des leucémies aiguës myéloïdes</u>	<u>11</u>
<u>Tableau IV : Liste des anticorps utilisés dans notre étude</u>	<u>23</u>
<u>Tableau V : Réalisation du test de concentration saturante</u>	<u>27</u>
<u>Tableau VI : Combinaisons d'anticorps destinées à explorer l'interaction entre l'anti-B7-H3/PE et l'anti-CD14/AA750</u>	<u>28</u>
<u>Tableau VII : Tableau récapitulatif des principales combinaisons d'anticorps utilisées</u>	<u>29</u>
<u>Tableau VIII : Tableau représentant la MFI des monocytes pour B7-H3 en présence de l'anti-B7-H3 seul et en bimarquage avec les autres réactifs</u>	<u>41</u>
<u>Tableau IX : Tableau montrant les MFI des monocytes marqués par les 2 anticorps en mono- et en bimarquage dans les 3 canaux d'intérêt</u>	<u>43</u>
<u>Tableau X : Comportement de l'anti-B7-H3/PE en présence d'un autre anticorps</u>	<u>44</u>
<u>Tableau XI : Comparaison des MFI en l'absence de chaque anticorps impliqué dans l'interférence</u>	<u>45</u>
<u>Tableau XII : Tableau représentant les MFI pour B7-H3 des différentes populations leucocytaires de 5 moelles témoins</u>	<u>46</u>
<u>Tableau XIII : Mise en évidence de la variabilité interindividuelle de l'expression monocyttaire de B7-H3 sur 15 patients</u>	<u>47</u>
<u>Tableau XIV : Interférence des réactifs anti-CD14/AA750 et anti-B7-H3/PE à la surface des blastes CD14+</u>	<u>59</u>
<u>Tableau XV : Tableau de contingence montrant la positivité de B7-H3 avec un seuil à 1,2 en fonction du caractère primitif ou secondaire de la leucémie</u>	<u>64</u>
<u>Tableau XVI : Tableau de contingence montrant la positivité de B7-H3 avec un seuil à 1,2 en fonction de l'obtention d'une rémission complète</u>	<u>67</u>
<u>Tableau XVII : Tableau de contingence montrant la positivité de B7-H3 avec un seuil à 1,2 en fonction de la survenue de rechute</u>	<u>72</u>
<u>Tableau XVIII : Tableau de contingence de patients traités par agent déméthylant (seuil : 1,2)</u>	<u>72</u>

Bibliographie

[1] M. Zandecki, « Hematocell.fr ». <http://hematocell.univ-angers.fr>, Site pédagogique du laboratoire d'hématologie de l'université d'Angers, 2012.

[2] S. H. Swerdlow, E. Campo, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, H. Stein, J. Thiele, et J. W. Vardiman, *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*, 4th Edition. World Health Organization and International Agency for Research on Cancer, 2008.

[3] J. M. Bennett, D. Catovsky, M.-T. Daniel, G. Flandrin, D. a. G. Galton, H. R. Galnick, et C. Sultan, « Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group », *British Journal of Haematology*, vol. 33, n° 4, p. 451–458, 1976.

[4] J. M. Bennett, D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. G. Galton, H. R. Galnick, et C. Sultan, « Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia A Report of the French-American-British Cooperative Group », *Ann Intern Med*, vol. 103, n° 4, p. 620-625, oct. 1985.

[5] J. M. Bennett, D. Catovsky, M.-T. Daniel, G. Flandrin, D. a. G. Galton, H. R. Galnick, et C. Sultan, « Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO) », *British Journal of Haematology*, vol. 78, n° 3, p. 325–329, 1991.

[6] J. M. Bennett, D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. G. Galton, H. R. Galnick, et C. Sultan, « Criteria for the Diagnosis of Acute Leukemia of Megakaryocyte Lineage (M7)A Report of the French-American-British Cooperative Group », *Ann Intern Med*, vol. 103, n° 3, p. 460-462, sept. 1985.



[7]T. Büchner, R. F. Schlenk, M. Schaich, K. Döhner, R. Krahl, J. Krauter, G. Heil, U. Krug, M. C. Sauerland, A. Heinecke, D. Späth, M. Kramer, S. Scholl, W. E. Berdel, W. Hiddemann, D. Hoelzer, R. Hehlmann, J. Hasford, V. S. Hoffmann, H. Döhner, G. Ehninger, A. Ganser, D. W. Niederwieser, et M. Pfirrmann, « Acute Myeloid Leukemia (AML): different treatment strategies versus a common standard arm--combined prospective analysis by the German AML Intergroup », *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, n° 29, p. 3604-3610, oct. 2012.

[8]C. Preudhomme, L. Llopis, et N. Boissel, « Classification et facteurs pronostiques des leucémies aiguës », *EMC - Hématologie*, vol. 7 (1), p. 1-17, 2012.

[9]A. Renneville, C. Roumier, V. Biggio, O. Nibourel, N. Boissel, P. Fenaux, et C. Preudhomme, « Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature », *Leukemia*, vol. 22, n° 5, p. 915-931, mai 2008.

[10]C. D. Baldus, S. M. Tanner, A. S. Ruppert, S. P. Whitman, K. J. Archer, G. Marcucci, M. A. Caligiuri, A. J. Carroll, J. W. Vardiman, B. L. Powell, S. L. Allen, J. O. Moore, R. A. Larson, J. E. Kolitz, A. de la Chapelle, et C. D. Bloomfield, « BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study », *Blood*, vol. 102, n° 5, p. 1613-1618, sept. 2003.

[11]H. Qiu, Y. Hu, X. Lv, Y. Wu, L. Wang, W. Cheng, W. Zhang, et J. Li, « Costimulatory molecule B7-H3 in akute leukemia: expression characteristics and prognostic significance », *Haematologica*, vol. 97, e-Supplement 1, p. 307-308, Communication affichée au congrès de la European Hematology Association à Amsterdam, abstract P0635, juin 2012.

[12]D. Olive, « Corécepteurs lymphocytaires », *médecine/sciences*, vol. 22, n° 12, p. 1069-1074, déc. 2006.



[13]A. I. Chapoval, J. Ni, J. S. Lau, R. A. Wilcox, D. B. Flies, D. Liu, H. Dong, G. L. Sica, G. Zhu, K. Tamada, et L. Chen, « B7-H3: A costimulatory molecule for T cell activation and IFN- γ production », *Nature Immunology*, vol. 2, n° 3, p. 269-274, mars 2001.

[14]P. Greaves et J. G. Gribben, « The role of B7 family molecules in hematologic malignancy », *Blood*, vol. 121, n° 5, p. 734-744, janv. 2013.

[15]C. Berthon, « Mécanismes d'immunoévasion dans les leucémies aiguës myéloïdes : la molécule B7 », Thèse de Biologie et Santé, Université de Lille 2, 2012.

[16]M. Collins, V. Ling, et B. M. Carreno, « The B7 family of immune-regulatory ligands », *Genome Biol.*, vol. 6, n° 6, p. 223, 2005.

[17]V. Ling, P. W. Wu, V. Spaulding, J. Kieleczawa, D. Luxenberg, B. M. Carreno, et M. Collins, « Duplication of primate and rodent B7-H3 immunoglobulin V- and C-like domains: divergent history of functional redundancy and exon loss », *Genomics*, vol. 82, n° 3, p. 365-377, sept. 2003.

[18]R. Castriconi, A. Dondero, R. Augugliaro, C. Cantoni, B. Carnemolla, A. R. Sementa, F. Negri, R. Conte, M. V. Corrias, L. Moretta, A. Moretta, et C. Bottino, « Identification of 4Ig-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 101, n° 34, p. 12640-12645, août 2004.

[19]D. Lemke, P.-N. Pfenning, F. Sahm, A.-C. Klein, T. Kempf, U. Warnken, M. Schnölzer, R. Tudoran, M. Weller, M. Platten, et W. Wick, « Costimulatory protein 4IgB7H3 drives the malignant phenotype of glioblastoma by mediating immune escape and invasiveness », *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, n° 1, p. 105-117, janv. 2012.

[20]G.-B. Zhang, H. Zhou, Y.-J. Chen, Y. Ge, F. Xie, Q. Shi, H.-B. Ma, M. Fei, et X.-G. Zhang, « Characterization and application of two novel monoclonal antibodies against



2IgB7-H3: expression analysis of 2IgB7-H3 on dendritic cells and tumor cells », *Tissue Antigens*, vol. 66, n° 2, p. 83-92, août 2005.

[21]M. Sun, S. Richards, D. V. R. Prasad, X. M. Mai, A. Rudensky, et C. Dong, « Characterization of mouse and human B7-H3 genes », *J. Immunol.*, vol. 168, n° 12, p. 6294-6297, juin 2002.

[22]G. Zhang, J. Hou, J. Shi, G. Yu, B. Lu, et X. Zhang, « Soluble CD276 (B7-H3) is released from monocytes, dendritic cells and activated T cells and is detectable in normal human serum », *Immunology*, vol. 123, n° 4, p. 538-546, avr. 2008.

[23]Y.-H. Zhou, Y.-J. Chen, Z.-Y. Ma, L. Xu, Q. Wang, G.-B. Zhang, F. Xie, Y. Ge, X.-F. Wang, et X.-G. Zhang, « 4IgB7-H3 is the major isoform expressed on immunocytes as well as malignant cells », *Tissue Antigens*, vol. 70, n° 2, p. 96-104, août 2007.

[24]P. Steinberger, O. Majdic, S. V. Derdak, K. Pfistershammer, S. Kirchberger, C. Klauser, G. Zlabinger, W. F. Pickl, J. Stöckl, et W. Knapp, « Molecular characterization of human 4Ig-B7-H3, a member of the B7 family with four Ig-like domains », *J. Immunol.*, vol. 172, n° 4, p. 2352-2359, févr. 2004.

[25]M. Loos, D. M. Hedderich, H. Friess, et J. Kleeff, « B7-H3 and Its Role in Antitumor Immunity », *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2010, p. 1-7, 2010.

[26]M. Hashiguchi, H. Kobori, P. Ritprajak, Y. Kamimura, H. Kozono, et M. Azuma, « Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, n° 30, p. 10495-10500, juill. 2008.

[27]J. Leitner, C. Klauser, W. F. Pickl, J. Stöckl, O. Majdic, A. F. Bardet, D. P. Kreil, C. Dong, T. Yamazaki, G. Zlabinger, K. Pfistershammer, et P. Steinberger, « B7-H3 is



a potent inhibitor of human T-cell activation: No evidence for B7-H3 and TREML2 interaction », *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, n° 7, p. 1754-1764, juill. 2009.

[28]O. Nagashima, N. Harada, Y. Usui, T. Yamazaki, H. Yagita, K. Okumura, K. Takahashi, et H. Akiba, « B7-H3 contributes to the development of pathogenic Th2 cells in a murine model of asthma », *J. Immunol.*, vol. 181, n° 6, p. 4062-4071, sept. 2008.

[29]L. Wang, C. C. Fraser, K. Kikly, A. D. Wells, R. Han, A. J. Coyle, L. Chen, et W. W. Hancock, « B7-H3 promotes acute and chronic allograft rejection », *Eur. J. Immunol.*, vol. 35, n° 2, p. 428-438, févr. 2005.

[30]D. V. R. Prasad, T. Nguyen, Z. Li, Y. Yang, J. Duong, Y. Wang, et C. Dong, « Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells », *J. Immunol.*, vol. 173, n° 4, p. 2500-2506, août 2004.

[31]A. Fukushima, T. Sumi, K. Fukuda, N. Kumagai, T. Nishida, T. Yamazaki, H. Akiba, K. Okumura, H. Yagita, et H. Ueno, « B7-H3 regulates the development of experimental allergic conjunctivitis in mice », *Immunol. Lett.*, vol. 113, n° 1, p. 52-57, oct. 2007.

[32]K. Mahnke, S. Ring, T. S. Johnson, S. Schallenberg, K. Schönfeld, V. Storn, T. Bedke, et A. H. Enk, « Induction of immunosuppressive functions of dendritic cells in vivo by CD4+CD25+ regulatory T cells: role of B7-H3 expression and antigen presentation », *Eur. J. Immunol.*, vol. 37, n° 8, p. 2117-2126, août 2007.

[33]W.-K. Suh, B. U. Gajewska, H. Okada, M. A. Gronski, E. M. Bertram, W. Dawicki, G. S. Duncan, J. Bukczynski, S. Plyte, A. Elia, A. Wakeham, A. Itie, S. Chung, J. Da Costa, S. Arya, T. Horan, P. Campbell, K. Gaida, P. S. Ohashi, T. H. Watts, S. K. Yoshinaga, M. R. Bray, M. Jordana, et T. W. Mak, « The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses », *Nat. Immunol.*, vol. 4, n° 9, p. 899-906, sept. 2003.



[34]H. Liu, C. Tekle, Y.-W. Chen, A. Kristian, Y. Zhao, M. Zhou, Z. Liu, Y. Ding, B. Wang, G. M. Mælandsmo, J. M. Nesland, O. Fodstad, et M. Tan, « B7-H3 silencing increases paclitaxel sensitivity by abrogating Jak2/Stat3 phosphorylation », *Mol. Cancer Ther.*, vol. 10, n° 6, p. 960-971, juin 2011.

[35]X. Zhao, G.-B. Zhang, W.-J. Gan, F. Xiong, Z. Li, H. Zhao, D.-M. Zhu, B. Zhang, X.-G. Zhang, et D.-C. Li, « Silencing of B7-H3 increases gemcitabine sensitivity by promoting apoptosis in pancreatic carcinoma », *Oncol Lett*, vol. 5, n° 3, p. 805-812, mars 2013.

[36]O. Lees, M.-C. Béné, et les membres du GEIL, *Immunophénotypage des leucocytes : Cluster de différenciation humains, application à la caractérisation des hémopathies*, Biotem Editions. GEIL.

[37]S. Brown et C. Poujol, « Mieux comprendre les fluorochromes pour la microscopie ». Support de formation du CNRS Formation Entreprises, 2009.

[38]C. Tekle, M. K. Nygren, Y.-W. Chen, I. Dybsjord, J. M. Nesland, G. M. Maelandsmo, et O. Fodstad, « B7-H3 contributes to the metastatic capacity of melanoma cells by modulation of known metastasis-associated genes », *Int. J. Cancer*, vol. 130, n° 10, p. 2282-2290, mai 2012.

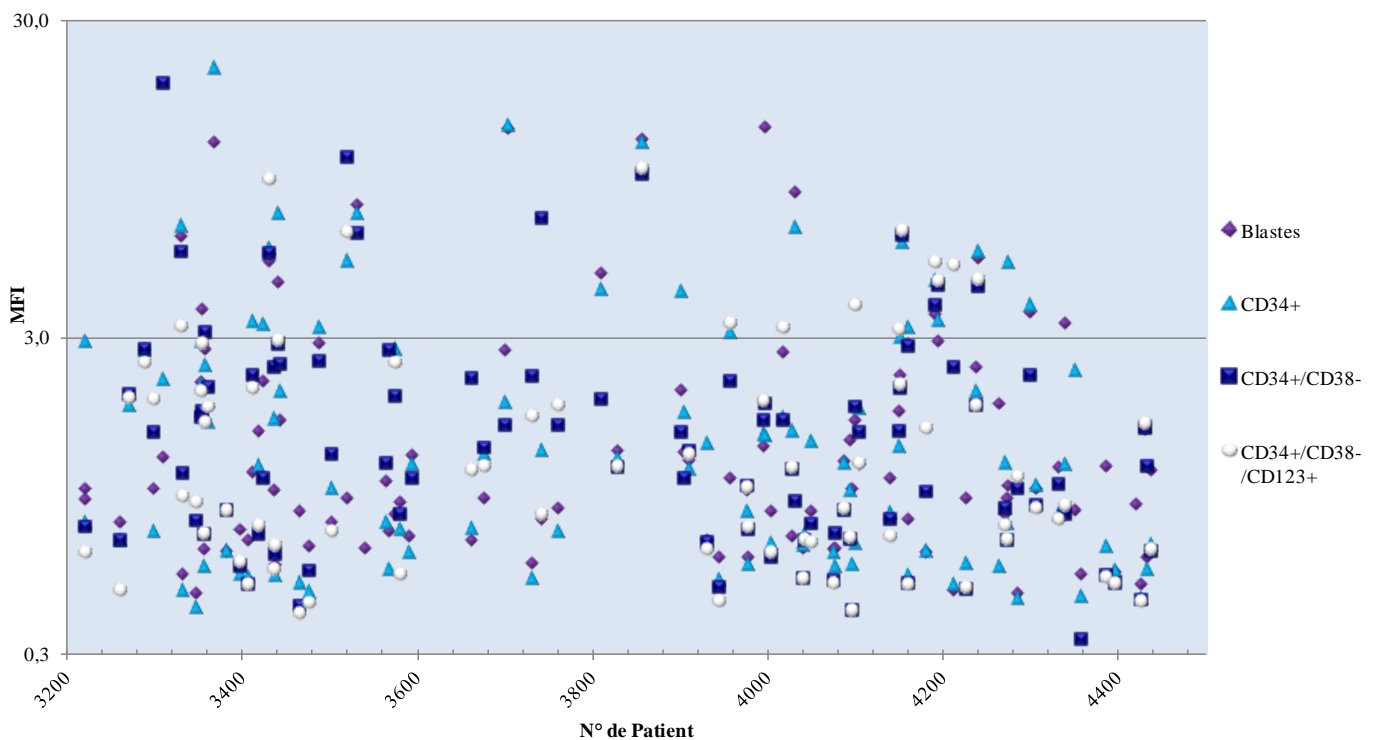
[39]B. Deschler et M. Lübbert, « Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology », *Cancer*, vol. 107, n° 9, p. 2099–2107, 2006.

[40]M. K. Nygren, C. Tekle, V. A. Ingebrigtsen, et O. Fodstad, « B7-H3 and its relevance in cancer; immunological and non-immunological perspectives », *Front Biosci (Elite Ed)*, vol. 3, p. 989-993, 2011.



Annexes

Annexe I: Représentation graphique de la MFI des blastes et des sous-population CD34+, CD34+/CD38- et CD34+/CD38-/CD123+ pour chaque patient



Annexe II: Tableau présentant l'ensemble des données pour chaque patient

Tous les temps sont indiqués en jours à partir du 1^{er} jour de traitement. Pour les patients n'ayant pas reçu de traitement, les temps sont indiqués en jours à partir du diagnostic.



Auteur : **Nom :** Guéry **Prénom :** Thomas

Date de soutenance : Mardi 1^{er} Octobre 2013

Titre de la thèse :

Expression de la protéine B7-H3 et impact pronostic dans les leucémies aiguës myéloïdes

Thèse, Médecine, Lille, 2013

Cadre de classement : Biologie médicale

Mots-clés : Leucémie aiguë myéloïde, B7-H3 (CD276), Cytométrie en flux, Pronostic

Résumé :

Contexte : Le traitement des leucémies aiguës myéloïdes, maladies hétérogènes au pronostic sombre (polychimiothérapie +/- allogreffe de cellule souches hématopoïétiques) est lourd et pourvoyeur d'effets secondaires graves parfois létaux. Il est donc nécessaire de disposer de facteurs pronostiques pour réserver les traitements les plus lourds aux patients les plus graves. La protéine B7-H3 (CD276) est une protéine transmembranaire immunorégulatrice de la super-famille des immunoglobulines de la famille B7 exprimée par de nombreux tissus et cellules hématopoïétiques notamment les monocytes activés. Son rôle, très discuté, dépend des tissus. Son expression à la surface des tumeurs solides est très étudiée et le pronostic associé dépend de la tumeur (bon pour les tumeurs gastriques et pancréatiques et mauvais pour les tumeurs pulmonaires, rénales, prostatiques, colorectales et ovariennes). Son expression à la surface des leucémies aiguës n'a été recherchée que dans une seule étude.

Méthode : Nous avons mesuré l'expression de la protéine B7-H3 par cytométrie en flux multiparamétrique à la surface des blastes de 111 Leucémies Aiguës Myéloïdes d'une cohorte rétrospective s'étalant sur 3 ans avec 2 à 5 ans de recul. Nous avons étudié la corrélation de la présence de B7-H3 avec les critères pronostiques classiques sur l'ensemble de la cohorte. Nous avons évalué l'impact pronostic de la présence de B7-H3 pour 54 patients ayant bénéficié d'une chimiothérapie intensive à l'exclusion des leucémies aiguës promyélocytaires.

Résultats : L'expression de B7-H3 est négative dans les lymphocytes, forte dans les monocytes et très variable dans les blastes. L'expression de B7-H3 par les blastes est significativement plus élevée dans les LAM3 et les LAM5 ($p < 0,01$) et dans les caryotypes de mauvais pronostic ($p < 0,05$). B7-H3 est significativement plus basse lorsque C/EBP α est muté ($p = 0,04$) et semble plus basse dans les remaniements chromosomiques impliquant les gènes du complexe Core Binding Factors ($p = 0,054$). La présence de B7-H3 ne modifie pas l'obtention d'une rémission complète ($p = 0,62$) mais semble diminuer le risque de rechute ($p = 0,16$). Dans le groupe des caryotypes intermédiaires, la survie globale semble être meilleure (86%) lorsque B7-H3 est positive que lorsque B7-H3 est négative (54%).

Conclusion : L'expression de B7-H3 est hétérogène. Elle pourrait être un facteur pronostic prometteur pour les LAM de cytogénétique intermédiaire avec un seuil à 20% de blastes positifs.

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur Claude Preudhomme

Asseseurs : Monsieur le Professeur Bruno Quesnel

Monsieur le Professeur Ibrahim Yakoub-Agha

Directeur : Monsieur le Docteur Christophe Roumier

████████████████████

██

████████████████████

████████████████████████████